

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE EDUCAÇÃO E CIÊNCIAS HUMANAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOLOGIA

**EFEITOS DO CANABIDIOL SOBRE COMPORTAMENTOS “TIPO-
COMPULSIVO” EM RATOS: INFLUÊNCIAS DO SEXO E DO CICLO
ESTRAL**

DÉBORA DOS SANTOS FABRIS

São Carlos -SP

2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE EDUCAÇÃO E CIÊNCIAS HUMANAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOLOGIA

**EFEITOS DO CANABIDIOL SOBRE COMPORTAMENTOS “TIPO-
COMPULSIVO” EM RATOS: INFLUÊNCIAS DO SEXO E DO CICLO
ESTRAL**

DÉBORA DOS SANTOS FABRIS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Psicologia, da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Psicologia

Área de concentração: Psicologia

Orientadora: Profa. Dra. Amanda Ribeiro de Oliveira
Coorientador: Prof. Dr. Marcos Hortes Nisihara Chagas

São Carlos – SP

2020

FOLHA DE APROVAÇÃO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Educação e Ciências Humanas
Programa de Pós-Graduação em Psicologia

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Débora dos Santos Fabris, realizada em 19/03/2020:

Prof. Dra. Amanda Ribeiro de Oliveira
UFSCar

Prof. Dra. Joice Maria da Cunha
UFPR

Prof. Dr. Felipe Villela Gomes
USP

Certifico que a defesa realizou-se com a participação à distância do(s) membro(s) Joice Maria da Cunha e, depois das arguições e deliberações realizadas, o(s) participante(s) à distância está(ão) de acordo com o conteúdo do parecer da banca examinadora redigido neste relatório de defesa.

Prof. Dra. Amanda Ribeiro de Oliveira

Aos meus pais **Solange** e **Tadeu** e a minha irmã **Lígia**,

Significado de porto seguro e amor incondicional

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e por iluminar meus passos não deixando desistir dos meus sonhos.

Aos meus familiares por todo amor e incentivo. Minha eterna gratidão.

Ao meu namorado Rodrigo Garcia Leal Lelis pelo amor e paciência. Obrigada por caminhar ao meu lado e por me fazer feliz.

A Nilce Lelis e Laura Lelis pelas conversas, torcida e apoio constante.

A Profa. Dra. Amanda Ribeiro de Oliveira, minha orientadora, um agradecimento carinhoso pela excelente orientação. Exemplo de dedicação, competência e responsabilidade.

Ao Prof. Dr. Marcos Hortes Nisihara Chagas, meu co-orientador, pelas sugestões teóricas e pela oportunidade de aprender sobre a prática clínica junto ao seu grupo de pesquisa.

A minha banca examinadora, Profa. Dra. Joice Maria de Cunha e Prof. Dr. Felipe Vilela Gomes que gentilmente aceitaram a participar e colaborar com este trabalho.

A Profa. Dra. Azair Liane Canto de Souza e a Dra. Milene Cristina de Carvalho por cada contribuição feita no exame de qualificação.

A Karina Genaro por me conduzir na carreira acadêmica e por acreditar no meu potencial.

Aos meus colegas do Laboratório de Psicologia de Aprendizagem, pelo acolhimento e aprendizado diário.

Aos meus colegas do Grupo de Estudos e Pesquisas em Saúde Mental, Cognição e Envelhecimento pelo carinho.

A Universidade e a todo seu corpo docente pelo meu crescimento profissional.

A todos os funcionários da secretaria do Programa por estarem sempre dispostos a ajudar nas questões burocráticas.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro – número do processo: 88882.182609/2018-01.

FABRIS, D.S (2020). *Efeitos do canabidiol sobre comportamentos “tipo-compulsivo” em ratos: influências do sexo e do ciclo estral*. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Psicologia, Universidade Federal de São Carlos, SP. 70 pp.

RESUMO

O Transtorno Obsessivo-Compulsivo (TOC) é uma psicopatologia grave e crônica caracterizada por pensamentos intrusivos (obsessões) e ações ritualísticas (compulsões). A neurobiologia do TOC não é totalmente compreendida, e importantes diferenças em termos de prevalência, severidade e sintomatologia existem entre homens e mulheres. Além disso, uma porcentagem significativa dos pacientes é resistente aos tratamentos disponíveis. Estudos recentes demonstram o potencial uso terapêutico de um composto canabinoide não psicotrópico, o canabidiol (CBD), em transtornos mentais. O presente estudo teve por objetivo avaliar os efeitos do CBD sobre comportamentos “tipo-compulsivo” em ratos, considerando as influências do sexo e das fases do ciclo estral em fêmeas. Para isso, ratos Wistar machos e fêmeas receberam administração intraperitoneal de CBD nas doses de 0,3, 3 ou 30 mg/kg ou veículo e tiveram as respostas comportamentais analisadas nos testes do campo aberto, de enterrar esferas, de trituração para ninho e de alternância espontânea. O CBD não apresentou efeito significativo sobre os comportamentos avaliados no presente estudo. Em relação ao ciclo estral, no teste do campo aberto, fêmeas durante o diestro tardio apresentaram maior expressão do comportamento de autolimpeza quando comparadas a fêmeas em proestro. De maneira geral, os resultados obtidos indicam que o CBD parece não ter efeitos importantes sobre os comportamentos “tipo-compulsivo” avaliados. Efeitos do CBD na reversão de comportamentos “tipo-compulsivo” induzidos por outras manipulações devem ampliar nossa compreensão sobre o potencial terapêutico desse composto no TOC.

Palavras-Chave: campo aberto; enterrar esferas, trituração para ninho, alternância espontânea, autolimpeza; transtorno obsessivo-compulsivo.

FABRIS, D.S (2020). Effects of cannabidiol on “compulsive-like” behavior in rats: influences of sex and estrous cycle. Master’s Thesis in Psychology, Federal University of São Carlos, São Carlos, SP. 70 pp.

ABSTRACT

Obsessive-Compulsive Disorder (OCD) is a severe and chronic psychopathology characterized by intrusive thoughts (obsessions) and ritualistic actions (compulsions). The neurobiology of OCD is not fully understood, and important differences in terms of prevalence, severity, and symptomatology exist between men and women. In addition, a significant percentage of patients are resistant to available treatments. Recent studies demonstrate the potential therapeutic use of a non-psychotropic compound, the cannabidiol (CBD), in mental disorders. The present study aimed to evaluate the effects of CBD in “compulsive-like” behaviors in rats, considering the influences of sex and estrous cycle phase in females. For this, male and female Wistar rats received intraperitoneal administration of CBD in doses of 0,3, 3 or 30 mg/kg or vehicle and had their behavioral responses analyzed in the open-field, marble burying, nestlet shredding, and spontaneous alternation tests. CBD had no significant effects on the behaviors assessed in the present study. Regarding the estrous cycle, in the open-field test, females during late diestrus showed greater expression of self-grooming behavior when compared to females in proestrus. In general, the results obtained indicate that CBD does not seem to have important effects on the “compulsive-like” behaviors evaluated. The effects of CBD in reversing "compulsive-like" behaviors induced by other manipulations should expand our understanding of the therapeutic potential of this compound in OCD.

Keywords: open-field; marble burying, nestlet shredding, spontaneous alternation, self-grooming; obsessive-compulsive disorder.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação esquemática do delineamento experimental utilizado durante o presente estudo. Os machos foram submetidos aos mesmos procedimentos, com exceção do esfregaço vaginal.....29
- Figura 2.** Fotomicrografias ilustrativas da avaliação citológica característica das fases do ciclo estral de ratas ciclando espontaneamente: (A) proestro e (B) diestro tardio. Objetiva 10.....30
- Figura 3.** Fotografia da arena utilizada no teste do campo aberto.....31
- Figura 4.** Fotografia da caixa utilizada no teste de enterrar esferas.....32
- Figura 5.** Caixa utilizada no teste de trituração para o ninho.....33
- Figura 6.** Fotografia do labirinto utilizado para realização do teste de alternância espontânea.....34
- Figura 7.** Efeitos da administração intraperitoneal de canabidiol (CBD) em machos nas doses de 0,3, 3 ou 30 mg/kg em relação ao grupo controle (veículo) sobre os comportamentos avaliados durante os 20 min de exposição ao campo aberto. (A) Frequência de cruzamentos. (B) Frequência de levantamentos. (C) Tempo de imobilidade. (D) Frequência de cruzamentos no centro. (E) Permanência no centro. (F) Tempo de autolimpeza.....36
- Figura 8.** Efeitos da administração intraperitoneal de canabidiol (CBD) em fêmeas nas doses de 0,3, 3 ou 30 mg/kg em relação ao grupo controle (veículo) sobre os comportamentos avaliados durante os 20 min de exposição ao campo aberto. (A) Frequência de cruzamentos. (B) Frequência de levantamentos. (C) Tempo de imobilidade. (D) Frequência de cruzamentos no centro. (E) Permanência no centro. (F) Tempo de autolimpeza.....39
- Figura 9.** Efeitos da administração intraperitoneal de canabidiol (CBD) em machos nas doses de 0,3, 3 ou 30 mg/kg em relação ao grupo controle (veículo) sobre o número de esferas enterradas.....41
- Figura 10.** Efeitos da administração intraperitoneal de canabidiol (CBD) em fêmeas nas doses de 0,3, 3 ou 30 mg/kg em relação ao grupo controle (veículo) sobre o número de esferas enterradas.....42
- Figura 11.** Efeitos da administração intraperitoneal de canabidiol (CBD) em machos nas doses de 0,3, 3 ou 30 mg/kg em relação ao grupo controle (veículo) sobre a porcentagem de algodão triturado.....42
- Figura 12.** Efeitos da administração intraperitoneal de canabidiol (CBD) em fêmeas nas doses de 0,3, 3 ou 30 mg/kg em relação ao grupo controle (veículo) sobre a porcentagem de algodão triturado (A).....43

Figura 13. Efeitos da administração intraperitoneal de canabidiol (CBD) em machos nas doses de 0,3, 3 ou 30 mg/kg em relação ao grupo controle (veículo) sobre o número de tentativas até a primeira alternância espontânea (A), porcentagem de alternância espontânea (B) e latência para entradas (C).....45

Figura 14. Efeitos da administração intraperitoneal de canabidiol (CBD) em fêmeas durante o proestro tratadas com CBD 0,3, 3 ou 30 mg/kg em relação ao grupo controle (veículo) sobre o número de tentativas até a primeira alternância espontânea (A), porcentagem de alternância espontânea (B) e latência para entradas (C).....47

Figura 15. Efeitos da administração intraperitoneal de canabidiol (CBD) em fêmeas durante o diestro tardio tratadas com CBD 30 mg/kg em relação ao grupo controle (veículo) sobre o número de tentativas até a primeira alternância espontânea (A), porcentagem de alternância espontânea (B) e latência para entradas (C).....49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeitos da administração intraperitoneal de canabidiol (CBD) em machos nas doses de 0,3, 3 ou 30 mg/kg em relação ao grupo controle (veículo) sobre os comportamentos avaliados durante os primeiros 5 minutos de exposição ao campo aberto.....37

Tabela 2. Efeitos da administração intraperitoneal de canabidiol (CBD) em fêmeas durante nas doses de 0,3, 3 ou 30 mg/kg em relação ao grupo controle (veículo) sobre os comportamentos avaliados durante os primeiro 5 minutos de exposição ao campo aberto.....40

LISTA DE SIGLAS

CBD: Canabidiol;

DBS: *Deep Brain Stimulation*;

ISRS: Inibidores Seletivos de Recaptação de Serotonina;

LCE: Labirinto em Cruz Elevado;

mCPP: Meta-clorofenilpiperazina;

TOC: Transtorno Obsessivo-Compulsivo.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 O Transtorno Obsessivo-Compulsivo.....	14
1.2 Diferenças Sexuais no TOC.....	18
1.3 Modelos Animais para o Estudo do TOC.....	19
1.4 O Canabidiol.....	23
2 OBJETIVOS.....	27
2.1 OBJETIVO GERAL.....	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1 ANIMAIS.....	27
3.2 DROGAS.....	28
3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	28
3.4 DETERMINAÇÃO DA FASE DO CICLO ESTRAL.....	29
3.5 EXPERIMENTO 1: Teste do Campo Aberto.....	31
3.6 EXPERIMENTO 2: Teste de Enterrar Esferas.....	32
3.7 EXPERIMENTO 3: Teste de Trituração para Ninho.....	32
3.8 EXPERIMENTO 4: Teste de Alternância Espontânea.....	33
3.9 ANÁLISE DOS DADOS.....	34
4 RESULTADOS.....	35
4.1 EXPERIMENTO 1: Teste do Campo Aberto.....	35
4.1.1 Machos.....	35
4.1.2 Fêmeas.....	37
4.2 EXPERIMENTO 2: Teste de Enterrar Esferas.....	41
4.2.1 Machos.....	41
4.2.2 Fêmeas.....	41
4.3 EXPERIMENTO 3: Teste de Trituração para Ninho.....	42
4.3.1 Machos.....	42

4.3.2 Fêmeas.....	43
4.4 EXPERIMENTO 4: Teste de Alternância Espontânea.....	43
4.4.1 Machos.....	43
4.4.2 Fêmeas.....	46
5 DISCUSSÃO.....	50
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
ANEXO A – Certificado Comissão de Ética no Uso de Animais da UFSCar...	70

1. INTRODUÇÃO

1.1 O Transtorno Obsessivo-Compulsivo

O Transtorno Obsessivo-Compulsivo (TOC) é uma psicopatologia grave e crônica caracterizada por pensamentos intrusivos, sentimentos ou ideias recorrentes (obsessões) e ações ritualísticas (compulsões) que consomem tempo e causam sofrimento significativo. O indivíduo não possui controle sobre as obsessões e compulsões, o que pode causar ansiedade e interferir diretamente nas tarefas diárias (American Psychiatric Association, 2014). Em decorrência disso, os indivíduos com TOC podem apresentar mau funcionamento em vários domínios, como nas atividades diárias, nos relacionamentos pessoais e no desempenho profissional (Rosa et al., 2012). Os sintomas podem ser agrupados em diferentes subtipos como contaminação, agressão, simetria, acumulação e pensamentos sexuais ou religiosos (Ravindran et al., 2019; Lavallé et al., 2020, Gong et al., 2019). Vale ressaltar que o diagnóstico é feito quando os sintomas se diferem das preocupações e rituais pertinentes às fases de desenvolvimento e quando são excessivos e persistentes, além dos períodos apropriados, associados a uma qualidade de vida reduzida, assim como a altos níveis de prejuízo social e profissional (American Psychiatric Association, 2014).

O TOC afeta de 2 a 3% da população em geral (Ruscio et al., 2010; da Silva et al., 2019), sendo considerado o quarto transtorno mental mais comum depois da depressão, abuso de álcool e drogas e fobia social (Torres et al., 2017). O transtorno pode estar acompanhado de algumas comorbidades, principalmente transtorno de Tourette, transtorno depressivo maior, transtorno de ansiedade, tique e outros movimentos estereotipados e, em casos mais graves, transtornos psicóticos (American Psychiatric Association, 2014; Labad et al., 2018; Ruscio et al., 2010).

O TOC apresenta uma natureza heterogênea quanto a sua sintomatologia (Nakao et al., 2014), o que pode comprometer a terapêutica. Na 5ª edição do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-5), o TOC foi retirado do capítulo de Transtornos de Ansiedade, tendo sido criado um capítulo para Transtorno Obsessivo-Compulsivo e Transtornos Relacionados (American Psychiatric Association, 2014). Apesar da mudança de classificação, os critérios diagnósticos do TOC continuam basicamente os mesmos e a ansiedade continua sendo considerada como tendo importância central no transtorno.

Atualmente, os tratamentos de primeira linha para o TOC incluem a psicoterapia em combinação com o uso de medicamentos. Dentre as psicoterapias, a abordagem cognitivo-comportamental tem se mostrado mais eficaz. Em particular, a técnica de exposição com prevenção de respostas é a mais utilizada, tendo por objetivo a diminuição do medo/ansiedade através da exposição gradual e repetida ao estímulo aversivo, minimizando as obsessões e os comportamentos compulsivos (Diniz et al., 2012). Entretanto, o maior fator limitante dessa técnica é a recusa de alguns pacientes a se submeterem ao procedimento, devido ao caráter aversivo da exposição (Storch et al., 2009). Ainda nessa perspectiva, estudos clínicos também apontam técnicas de relaxamento como uma terapia alternativa para a diminuição dos sintomas do TOC (Shannahoff-Khalsa., 1996; 2019).

O tratamento farmacológico é geralmente feito com o uso de antidepressivos como da classe dos inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS) (Fineberg et al., 2005; Diniz et al., 2012; Pizarro et al., 2014). Os ISRS mostraram ser clinicamente eficazes com 40% a 70% dos pacientes respondendo efetivamente (Katzman et al., 2014; Skapinakis et al., 2016). Embora, a fisiopatologia do TOC ainda permaneça questionável, vários estudos evidenciam o envolvimento da neurotransmissão

serotoninérgica (5-HT) (Zoar et al., 1987; Fineberg et al., 2005). O tratamento com ISRS parece modular a atividade funcional de algumas áreas associadas aos sintomas do TOC, por exemplo, áreas subcorticais e parietais (Sakai et al., 2001; Zhang et al., 2011). Desta forma, explorar as redes funcionais do cérebro de pacientes com TOC antes e após o tratamento com ISRS tem contribuído para o entendimento sobre a natureza do transtorno (Shin et al., 2014). Os ISRS de primeira linha incluem: fluoxetina (Montgomery et al., 1993), citalopram (Montgomery, 2001) e escitalopram (Stein et al., 2008). Entretanto, há pacientes que respondem apenas parcialmente aos ISRS. A resposta parcial a esse tratamento pode estar associada a comorbidades e a maior gravidade do transtorno (Rosa et al., 2012). Nestes casos, a estratégia mais usada é a potencialização com antipsicóticos (Flament et al., 1997; Van Ameringen et al., 2014). Os antipsicóticos de primeira linha como a risperidona e o aripiprazol apresentam melhores evidências, enquanto o haloperidol apresenta perfil farmacológico desfavorável devido aos efeitos colaterais, como disforia, distonia, parkinsonismo, acatisia, discinesia e aumento do nível de prolactina (Tyler et al., 2017; Thamby et al., 2019). O tratamento com ISRS isoladamente ou em combinação com antipsicóticos, sugere o papel da serotonina e da dopamina na fisiopatologia do TOC (Denys et al., 2006).

Apesar disso, uma porcentagem significativa dos indivíduos com TOC – de 30% a 40% – não respondem aos tratamentos convencionais (Lopes et al., 2009). Desta forma, há um grande interesse no desenvolvimento de terapias mais eficazes para pacientes que não respondem ou não toleram os efeitos adversos dos tratamentos disponíveis. Nesse sentido, estudos experimentais que avaliam novos fármacos ou novas abordagens terapêuticas a fim de minimizar os sintomas dessa psicopatologia são de grande importância.

A neurobiologia do TOC ainda não é totalmente compreendida. Estudos de neuroimagem indicam a participação dos circuitos córtico-estriado-tálamo-cortical como um possível mecanismo subjacente aos sintomas do TOC (Subira et al., 2016). Anormalidades especificamente no córtex orbitofrontal tem sido um dos achados mais consistentes (Hoexter et al., 2015). A participação dessas estruturas envolve uma via excitatória direta que estimula o processamento de informações do tálamo ao córtex e uma via inibitória indireta, que opera na mesma rede. A atividade das vias direta e indireta deve promover o equilíbrio entre a atividade excitatória e inibitória do circuito. Desequilíbrio nessas vias pode levar a um inadequado bloqueio talâmico, resultando na hiperatividade do córtex orbitofrontal (Fernandes et al., 2016; Ravindran et al., 2019).

Tais avanços no entendimento da fisiopatologia do TOC têm contribuído para o desenvolvimento de tratamentos envolvendo neuromodulação. A estimulação transcraniana por corrente contínua (*Transcranial Direct-Current Stimulation*), por exemplo, é uma técnica de neuroestimulação não invasiva que consiste em aplicar uma corrente de baixa voltagem no cérebro por meio de eletrodos colocados no couro cabeludo (Freire et al., 2020). Esta técnica vem sendo examinada na prática clínica mas, por enquanto, não há forte evidência de sua eficácia no tratamento do TOC (Brunoni et al., 2018; da Silva et al, 2019). De forma similar, a estimulação cerebral profunda (*Deep Brain Stimulation* - DBS) também está sendo investigada como uma opção de tratamento. A DBS é um procedimento neurocirúrgico que envolve o implante preciso de microeletrodos em áreas específicas do encéfalo através de técnicas estereotáxicas e de neuroimagem. Um dispositivo de bateria externa subcutânea é conectado a esses eletrodos e a corrente elétrica é usada para modular a atividade neuronal disfuncional (Widge et al., 2019; Vicheva et al., 2020). Por enquanto, a DBS para o TOC permanece

estritamente experimental, sendo realizado apenas com pacientes rigorosamente selecionados (Bilge et al., 2018).

1.2 Diferenças Sexuais no TOC

Os transtornos mentais representam um sério problema de saúde pública (Lopez et al., 1998). Vários estudos epidemiológicos apontam que há influência da diferença de sexo na incidência, prevalência e curso dos transtornos mentais (Andrade et al., 2006). Os homens tendem a apresentar maior prevalência de transtornos associados ao uso de substâncias psicoativas (McHugh et al., 2018), transtornos de personalidade antissocial e déficit de atenção e hiperatividade (Andrade et al., 2006). As mulheres tendem a apresentar maior prevalência de depressão e outros transtornos de humor (Bromet et al., 2011; Wittchen et al., 2011), e um importante fator de risco pode ser a influência de hormônios sexuais e da resposta do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal das mulheres ao estresse (Kuehner, 2016). Além disso, o DSM-5 aponta que, de modo geral, os transtornos relacionados ao medo e ansiedade são mais prevalentes em mulheres (American Psychiatric Association, 2014). O desenvolvimento da ansiedade na mulher pode ser influenciado pela variação cíclica dos hormônios gonadais, particularmente a progesterona e o estrógeno (Kinrys et al., 2005), que podem modificar neurotransmissores e neuroesteroides, como também modular processos cognitivos e comportamentais (Riecher-Rössler, 2017).

Especificamente para o TOC, apesar de uma grande diferença não existir para a prevalência do transtorno, estudos apontam para diferenças na gravidade e sintomatologia entre homens e mulheres (Kinrys et al., 2005; Torres et al., 2005; Somers et al., 2006). Evidências clínicas apontam diferenças na incidência, fisiopatologia e manifestação do TOC entre homens e mulheres (Torresan et al., 2013;

Cherian et al., 2014; Vulink et al., 2006). Diferenças também existem em termos de idade de início, com homens podendo apresentar sintomas um pouco mais cedo do que as mulheres (Torres et al., 2005; Somers et al., 2006; Vulink et al., 2006). Outro aspecto importante, é a diferença na expressão dos subtipos do TOC entre homens e mulheres (Torresan et al. 2009).

Nas mulheres, é observado aumento de casos de TOC após o período de menarca, sugerindo um possível efeito resultante das alterações nas concentrações de estrogênio (Ruscio et al., 2010). De acordo com esse achado, o aumento da vulnerabilidade para o início ou exacerbação do TOC em mulheres coincide com eventos reprodutivos associados a alterações de estrogênio, como gravidez, pós-parto e menopausa, apoiando ainda mais o possível papel dos hormônios gonadais no TOC (Guglielmi et al., 2014). A ocorrência de dimorfismo sexual no TOC pode estar relacionada à interação entre os hormônios gonadais e a neurotransmissão serotoninérgica, mediada principalmente pelo receptor 5-HT_{2c} (Reimer et al., 2018; Ghaziuddin et al., 2003). Entretanto, não são compreendidas totalmente as causas dessas diferenças e, até o momento, poucas pesquisas considerando a diferença de sexo foram realizadas.

1.3 Modelos Animais para o Estudo do TOC

Os modelos animais podem ser utilizados na investigação pré-clínica para selecionar novos fármacos com potencial terapêutico para os transtornos mentais, bem como para investigar seu mecanismo de ação, ou ainda para testar hipóteses sobre a fisiopatologia dos transtornos mentais (Graeff et al., 2002). Uma questão importante no estudo do TOC é que ainda não existem modelos animais ideais que atendam aos critérios de validade de face, isto é, a similaridade entre o modelo e o transtorno que ele simula considerando a sua sintomatologia; validade preditiva, que se refere a

previsibilidade na qual o desempenho no teste prevê o desempenho na condição modelada, principalmente em relação ao tratamento; e validade de constructo teórico, que indica que o modelo possui um embasamento teórico sólido para a utilização em pesquisa, com similaridade em relação aos sistemas e mecanismos envolvidos no transtorno (Joel, 2006; Korff et al., 2006).

Cabe ressaltar que é impossível desenvolver um modelo animal que reproduza algum transtorno mental em sua totalidade, e o critério de validação depende da finalidade do modelo (Joel, 2006). Os modelos animais para o TOC podem ser divididos em modelos etológicos, com a compreensão dos comportamentos naturais/espontâneos emitidos pelos animais que se assemelham aos sintomas presentes no TOC; genéticos, com o uso de animais geneticamente modificados para estudo do componente genético subjacente ao comportamento compulsivo; comportamentais, com a possibilidade do comportamento humano ser modelado em animais; e farmacológicos, capacidade de induzir comportamentos específicos com uso de drogas (Alonso et al., 2015; Fineberg et al., 2011).

Um aspecto importante é que os modelos animais disponíveis para estudos sobre o TOC possuem uma limitação relevante sobre a explicação dos comportamentos observados em humanos, isto é, não é possível modelar os pensamentos intrusivos/obsessões presente no diagnóstico em humanos (Abreu et al., 2011). Entretanto, os modelos animais podem ser úteis para o estudo de outros aspectos da fisiopatologia do TOC, como compulsividade, estereotipia ou perseveração (Alonso et al., 2015). Uma vez que as manifestações cognitivas e motoras do TOC estão intimamente ligadas, a modelagem de comportamentos compulsivos é uma abordagem comum para um modelo animal para TOC (Diniz et al., 2012).

Alguns modelos animais para o TOC têm sido propostos na literatura e o comportamento de autolimpeza mostra-se como um componente importante em vários deles (Joel, 2006; Marroni et al., 2007; Diniz et al., 2012; Reimer et al., 2015). Este comportamento em roedores consiste em uma sequência ritualizada e padronizada: primeiramente o animal limpa as patas, em seguida realiza a limpeza da cabeça com as patas anteriores na região dos olhos, posteriormente a região do focinho seguida da região das orelhas e por último o corpo ventral, lateral e dorsalmente (Kalueff et al., 2007). A autolimpeza em roedores tem sido entendida como de particular importância para o estudo de sintomas do TOC associados à preocupação com contaminação (Ahmari et al., 2013; Kalueff et al., 2016). Este comportamento também pode ser desencadeado quando os animais enfrentam uma situação nova ou desconhecida e, neste caso, o comportamento de autolimpeza pode estar associado à ansiedade (Sachs, 1988).

Outros comportamentos tidos como “tipo-compulsivo” estão relacionados a esconder objetos, a fazer verificações do contexto, à construção ou trituração de materiais para ninho, e relacionados ao conflito para entrar e explorar novas áreas (Berridge et al., 2005; Kalueff et al., 2007). O teste de enterrar esferas, foi proposto inicialmente para avaliar o efeito de drogas ansiolíticas baseado no comportamento natural dos animais de enterrar objetos potencialmente perigosos (Treit et al., 1981; Broekkamp et al., 1986). Ao contrário dos resultados obtidos nos modelos de ansiedade, os animais reexpostos ao teste de enterrar esferas exibiram o mesmo comportamento observado na primeira sessão (Njung'e et al., 1991) e tolerância à administração repetida de diazepam (Broekkamp et al. 1986; Casarotto et al., 2010). Com base nisso, o modelo passou a ser considerado útil para investigar as respostas repetitivas/compulsivas presentes no TOC (Korff et al., 2006; Thomas et al., 2009) e compostos com propriedades anticomulsivas (Nardo et al., 2013).

O teste de trituração para o ninho também pode ser utilizado para avaliar comportamentos “tipo-compulsivo” em roedores (Angoa-Peréz et al., 2013). Biologicamente, esses comportamentos “tipo-compulsivo” podem estar associados ao comportamento natural/instintivo de construção de ninhos para proteção de si mesmos e para os filhotes contra as condições ambientais (Angoa-Pérez et al., 2013). Além disso, o teste permite avaliar os efeitos de uma ampla variedade de drogas sobre esses comportamentos repetitivos (Witkin, 2008).

O teste de alternância espontânea é outro modelo animal utilizado em estudos sobre o TOC. Com a utilização de um labirinto em T, o teste de alternância espontânea avalia a tendência natural dos animais de explorar novas áreas (Lalonde, 2002), o padrão de escolha dos animais pelos lados do aparato, ou a flexibilidade comportamental de fazer escolhas/mudanças para um lado desconhecido e de alternar as escolhas de braço após sucessivas tentativas (Ellen et al., 1968; Deacon et al., 2006). Entretanto, a checagem excessiva/diminuição da alternância espontânea a um único ambiente pode ser caracterizada como comportamento “tipo-compulsivo” (Joel, 2006) ou pode ser comparada a indecisão e à perseveração observadas nos indivíduos com TOC (Yadin, 1991).

Cabe destacar que estudos pré-clínicos com uso de modelos animais são realizados predominantemente em machos e, seus resultados, generalizados para as fêmeas. Ainda são escassos estudos considerando a influência da diferença de sexo e o impacto da flutuação cíclica dos hormônios gonadais femininos na expressão das emoções, nas manifestações e curso dos transtornos mentais e sobre os efeitos dos fármacos utilizados no tratamento desses transtornos.

O ciclo estral das fêmeas de ratos é marcado por quatro fases: proestro, estro, diestro inicial e diestro tardio. Durante o proestro ocorre a maior concentração dos

hormônios gonadais, comparado com os baixos níveis encontrados durante o estro quando ocorre a ovulação (Butcher et al., 1974). Ao final do ciclo, o diestro inicial é caracterizado pelos baixos níveis de estrógeno e um pequeno aumento da concentração de progesterona. O ciclo termina com o diestro tardio uma fase marcada pela queda abrupta dos níveis de progesterona (Spornitz et al., 1999; Lovick, 2014).

Estudo recente do nosso grupo de pesquisa demonstrou alterações comportamentais relacionadas ao TOC diferindo entre machos e fêmeas de ratos. Reimer e colaboradores (2018) apontaram que fêmeas da linhagem Sprague-Dawley previamente tratadas com meta-clorofenilpiperazina (mCPP), agonista de receptores serotoninérgicos, apresentam prejuízo da extinção do medo condicionado, especificamente na fase de diestro tardio quando submetidas ao protocolo do medo contextual. Esses achados sugerem que possivelmente exista uma relação entre o dimorfismo sexual e a consequente variação nos níveis dos hormônios sexuais no desenvolvimento do TOC. Entretanto, a influência dos hormônios gonadais nos modelos animais para TOC e seu tratamento ainda precisa ser melhor investigada.

1.4 O Canabidiol

A planta *Cannabis sativa* vem sendo usada para fins medicinais há milhares de anos, por diferentes povos e em diversas culturas, embora hoje se conheçam também seus efeitos adversos. No início do século XX, extratos de *cannabis* chegaram a ser comercializados para tratamento de transtornos mentais, principalmente como sedativos e hipnóticos (Russo et al., 2006). Atualmente, diversos estudos vêm demonstrando o potencial uso terapêutico de alguns compostos canabinoídeos na psiquiatria.

Na década de 1960, as estruturas químicas dos principais componentes da *cannabis* foram identificadas (Mechoulam, 2010). O tetra-hidrocanabinol (Δ^9 -THC)

recebeu inicialmente maior atenção, por ser o componente psicotrópico da planta. As investigações sobre o mecanismo de ação do Δ^9 -THC levaram à descoberta de um receptor canabinoide localizado no sistema nervoso central, denominado CB1 (Devane et al., 1988). A descoberta desse receptor iniciou a busca por ligantes endógenos e em 1992 e 1995 foram identificados a N-aracidoiletanolamida (anandamida) e o 2-aracidoilglicerol (2-AG), dois agonistas endógenos dos receptores CB1 (Devane et al., 1992; Mechoulam et al., 1995; Sugiura et al., 1995). A síntese desses endocanabinoides ocorre pela fosfolipase D no caso da anandamida e pela diaciglicerol lipase para a 2-AG, que convertem os fosfolípidos em endocanabinoides (Piomelli, 2003). A degradação desses endocanabinoides também ocorre por enzimas específicas, a hidrólise da anandamida e da 2-AG ocorre através da amida hidrolase de ácidos graxos (FAAH) e da lipase monoacilglicerol (MGL), respectivamente (Cravatt et al., 1996; Dinh et al., 2002). Depois da descoberta do receptor CB1, outro receptor canabinoide foi encontrado em células do sistema periférico e imune, nomeado então de CB2 (Munro et al., 1993; Howlett et al., 2002).

Estudos sobre o mecanismo de ação do Δ^9 -THC levou a descoberta de outro fitocanabinoide, o Canabidiol (CBD). O CBD é o segundo maior componente da planta depois do Δ^9 -THC (Silote et al., 2019). Identificado e isolado na década de 1930, pelos grupos de Cahn e Todd no Reino Unido (Cahn, 1932) e por Adams nos Estados Unidos (Adams, 1942) e, sua estrutura foi elucidada posteriormente pelo grupo de Mechoulam e Shvo em 1963 (Mechoulam et al., 1963). Diferentemente do Δ^9 -THC, o CBD não apresenta efeitos psicotomiméticos ou reforçadores (Karniol et al., 1974; Mechoulam, 2014). O CBD, apesar de apresentar baixa afinidade pelos receptores CB1 e CB2 (Thomas et al., 1998), pode atuar como antagonista dos receptores CB1 e agonista dos receptores CB2 (Thomas et al. 2007). Além disso, foi proposto que o CBD poderia

facilitar a sinalização endocanabinoide através da inibição da captação e da hidrólise enzimática dos endocanabinoides (Gomes et al., 2011). O CBD também pode interagir com o sistema serotoninérgico atuando como agonista 5-HT_{1A} (Russo et al., 2005; Campos et al., 2013). O CBD apresenta diversos efeitos farmacológicos, incluindo efeito ansiolítico (Guimarães et al., 1990; Crippa et al., 2004; Zuardi et al., 2008) e anticomulsivo (Cassaroto et al., 2010; Nardo et al., 2014; Deiana et al., 2012).

Embora o conhecimento de diferenças sexuais na funcionalidade do cérebro já estivesse presente no final do século XIX (Andreano et al., 2009), poucos estudos consideram o dimorfismo sexual existente no sistema endocanabinoide (Fattore et al., 2007, 2010; Craft et al., 2013; Cooper et al., 2018). A expressão dos vários componentes do sistema endocanabinoide é diferente em machos e fêmeas (Fattore et al., 2010). Por exemplo, machos apresentam maior densidade de receptores CB1 no hipotálamo, enquanto que na amígdala a distribuição do receptor é maior em fêmeas do que nos machos, uma diferença que parece depender da presença de estradiol (Riebe et al., 2010). Além disso, evidências da literatura descrevem diferenças sexuais nas respostas comportamentais e neuroquímicas aos compostos canabinoides (Rubino et al., 2011).

Os efeitos do CBD já foram estudados também em vários modelos animais de ansiedade usando roedores. Os estudos pré-clínicos, realizados predominantemente em machos, mostraram que o CBD aumenta a exploração dos braços abertos de roedores submetidos ao labirinto em cruz elevado (Guimarães et al., 1990). Nesse sentido, em estudo anterior, demonstramos resultados significativos para os efeitos do CBD na ansiedade em ratos, com destaque para diferenças entre machos e fêmeas (Fabris et al., 2017). Machos que receberam CBD na dose de 3 mg/kg tiveram aumento significativo da exploração dos braços abertos do labirinto em cruz elevado, indicativo de efeito tipo-

ansiolítico. Já para fêmeas, o mesmo efeito tipo-ansiolítico foi encontrado apenas na fase de diestro tardio, com a dose de 0,3 mg/kg. Esses resultados indicam que as fêmeas durante o diestro tardio apresentam maior sensibilidade aos efeitos do tratamento sistêmico com CBD, comparadas aos machos e às fêmeas nas demais fases do ciclo estral. De acordo com os resultados obtidos em modelos animais, estudos clínicos também apontam propriedades ansiolíticas do CBD. Em um estudo de neuroimagem, foi demonstrado que o CBD foi capaz de reduzir os níveis de ansiedade em voluntários com diagnóstico de transtorno de ansiedade social submetidos ao teste de falar em público (Crippa et al., 2004, 2011; Bergamaschi et al., 2011a).

Pouco se sabe, entretanto, sobre os efeitos do CBD no TOC, e nenhum trabalho considerou as diferenças de sexo e o impacto da flutuação cíclica dos hormônios gonadais femininos. Estudos sugerem que o CBD parece capaz de diminuir o número de esferas enterradas e reverter o aumento desse comportamento induzido por mCPP em camundongos machos (Casarotto et al., 2010; Nardo et al., 2014), mas os efeitos sobre fêmeas não foram explorados. Assim, considerando o papel central da ansiedade no TOC, a necessidade de uma opção farmacológica mais eficaz para os sintomas compulsivos e a escassez de estudos com fêmeas, este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos do CBD na expressão de comportamentos “tipo-compulsivo” em ratos, considerando a diferença de sexo e do ciclo estral em fêmeas. Era esperado que o CBD fosse capaz de atenuar os comportamentos “tipo-compulsivo” avaliados e que tais efeitos fossem dependentes do sexo e da flutuação dos hormônios gonadais. Mais especificamente, esperávamos que a dose de CBD 3 mg/kg fosse mais eficaz para os machos enquanto a dose de 0,3 mg/kg tivesse efeito significativo para fêmeas em diestro tardio.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do canabidiol sobre comportamentos “tipo-compulsivo” em ratos, considerando a influência do sexo e das fases do ciclo estral em fêmeas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar os efeitos da administração intraperitoneal de canabidiol em ratos machos e fêmeas durante o proestro e diestro tardio nos testes do campo aberto, de enterrar esferas, de trituração para ninho e de alternância espontânea.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados 122 ratos Wistar machos e 229 fêmeas, com aproximadamente 70 dias de idade e peso variando entre 260-320 g e 220-300 g respectivamente, provenientes do biotério central da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) – *campus* São Carlos. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno forradas com maravalha (40 × 33 × 25 cm; divididos em grupos de 4) e ficaram alojados no biotério setorial do Laboratório de Psicologia da Aprendizagem (LPA), no Departamento de Psicologia. Os animais foram mantidos em um ambiente com temperatura controlada ($23 \pm 1^\circ\text{C}$), com água e ração oferecidas *ad libitum*. O biotério setorial conta com um ciclo de iluminação artificial 12/12 h, com início do período claro às 7:00 h, e todos os experimentos foram realizados durante a fase clara do ciclo. Todos os procedimentos seguiram as recomendações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSCar (protocolo no. 5812011217 – ANEXO A).

3.2 DROGAS

A droga utilizada foi o canabidiol (CBD; BSPG Lab Discovery Park, Inglaterra). O canabidiol foi dissolvido em solução salina fisiológica (0,9 %) contendo 2 % de Tween 80 (Sigma-Aldrich, EUA), imediatamente antes da sua utilização, de maneira a se obter as seguintes concentrações: 0,3, 3 e 30 mg/ml. Foram utilizadas injeções intraperitoneais uma hora antes dos experimentos, em um volume constante de 1,0 ml/kg. O grupo controle recebeu volume equivalente de salina fisiológica contendo 2 % de Tween 80 (veículo). As doses e os tempos de espera foram selecionados com base em estudos anteriores (Genaro et al., 2017; Fabris et al., 2017).

3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Antes de qualquer experimento, os animais permaneceram no biotério setorial por pelo menos 3 dias para habituação e, na sequência, foi realizado diariamente esfregaço vaginal nas fêmeas para acompanhamento do ciclo por aproximadamente duas semanas. Para cada experimento, os animais foram divididos em quatro grupos distintos: veículo, CBD 0,3 mg/kg, CBD 3,0 mg/kg e CBD 30 mg/kg, considerando em fêmeas, especificamente os subgrupos de proestro e diestro tardio. Nos dias em que ocorreram os experimentos, a verificação da fase do ciclo foi realizada nas fêmeas e, na sequência, os animais aptos para o teste, receberam uma injeção intraperitoneal de uma das doses de CBD ou de veículo. Uma hora depois, foram avaliados os efeitos das administrações sobre as respostas comportamentais. Foram realizados quatro experimentos (Fig. 1): Experimento 1 – Teste do Campo Aberto; Experimento 2 – Teste de Enterrar Esferas; Experimento 3 – Teste de Trituração para Ninho; Experimento 4 –

Teste de Alternância Espontânea. Ao final dos experimentos foi realizada a confirmação da fase do ciclo nas fêmeas.

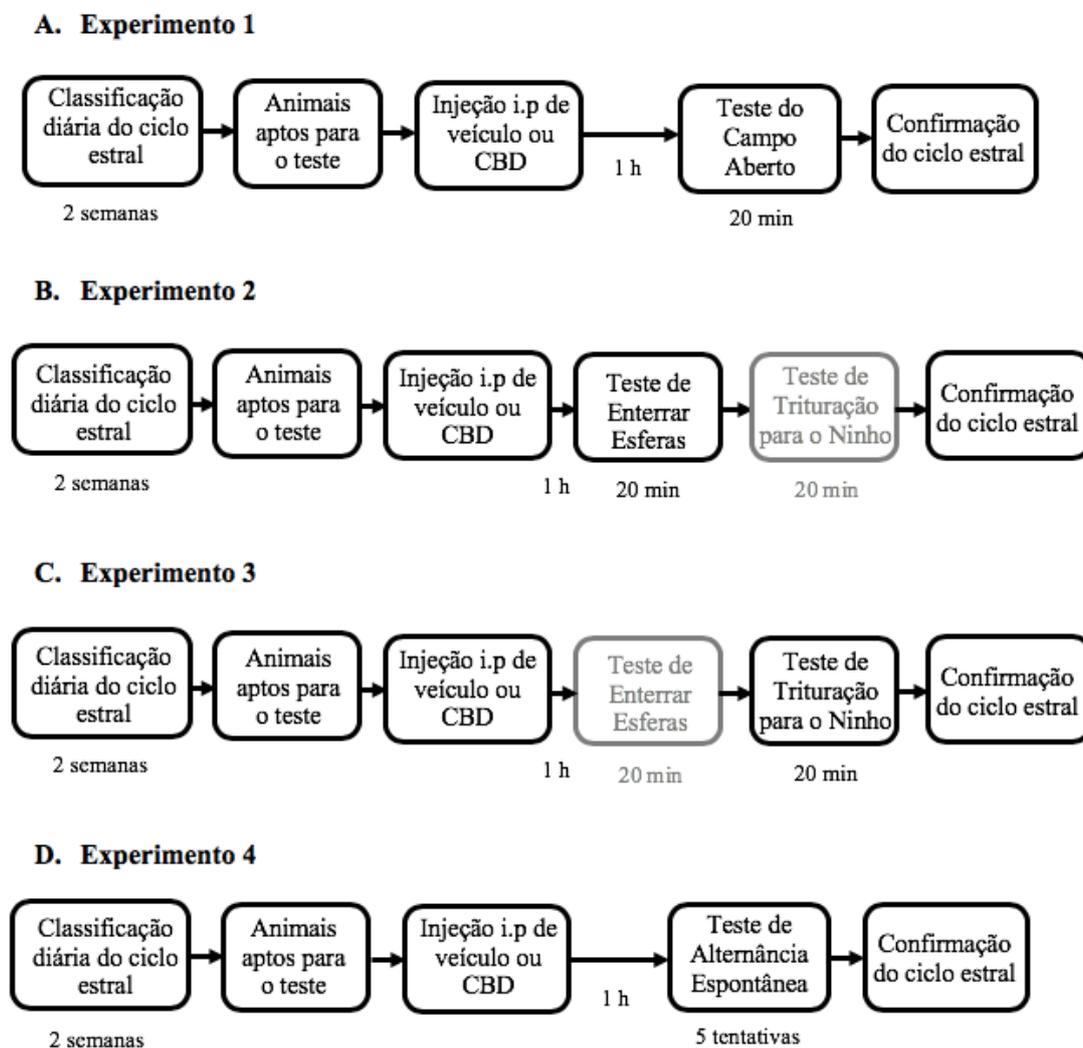


Fig. 1. Representação esquemática do delineamento experimental utilizado durante o presente estudo. Os machos foram submetidos aos mesmos procedimentos, com exceção do esfregaço vaginal.

3.4 DETERMINAÇÃO DA FASE DO CICLO ESTRAL

Foi realizado esfregaço vaginal diário para a determinação da fase do ciclo estral das fêmeas. O procedimento foi realizado aproximadamente às 9:00 h da manhã e novamente após cada sessão experimental. Para tanto, uma alça de inoculação foi

esterilizada em uma chama, mergulhada em água estéril e depois inserida suavemente na vagina para reunir as células, que depois foram distribuídas em uma lâmina de microscopia. Foi utilizado o corante do tipo Panótico Rápido (Laborclin Ltda., Brasil) e, após a coloração e secagem, a lâmina foi submetida à microscopia óptica com aumento de 40x para avaliação celular. Cada fase do ciclo foi identificada com base na proporção de células epiteliais, células cornificadas e leucócitos observados no esfregaço (Machado Figueiredo et al., 2019). O presente projeto incluiu apenas duas fases do ciclo, proestro e diestro tardio. Essas fases foram escolhidas pois apresentam diferenças importantes em relação às concentrações hormonais e, em um estudo anterior, não observamos diferenças significativas nas fases intermediárias do ciclo estral, estro e diestro inicial (Fabris et al., 2017). Assim, as ratas destinadas aos experimentos foram divididas de acordo com o ciclo estral em proestro, fase identificada através da presença de células nucleadas, e diestro tardio, fase com grande concentração de leucócitos que posteriormente se desfazem (Fig. 2). Apenas os animais que completaram pelo menos dois ciclos regulares foram considerados aptos e utilizados nos experimentos comportamentais propostos.

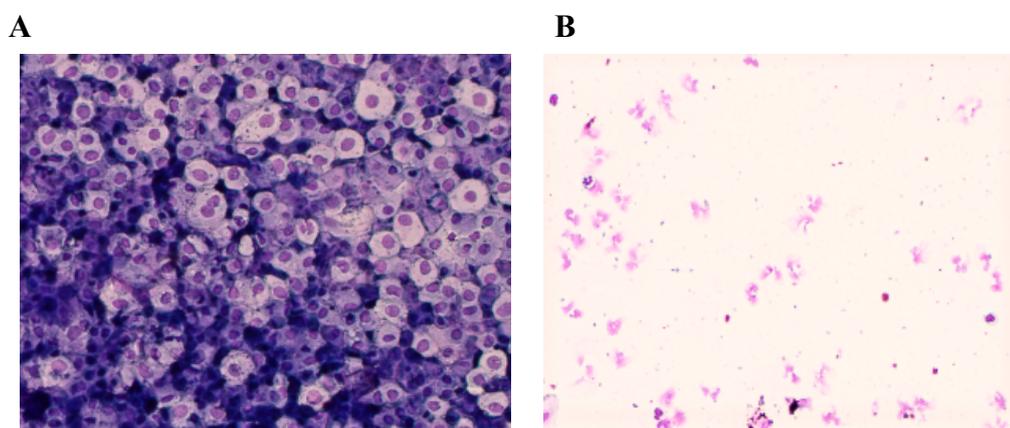


Fig. 2. Fotomicrografias ilustrativas da avaliação citológica característica das fases do ciclo estral de ratas ciclando espontaneamente: (A) proestro e (B) diestro tardio. Aumento de 40x.

3.5 EXPERIMENTO 1: Teste do Campo Aberto

O protocolo experimental para o teste do campo aberto foi baseado naqueles descritos por De Oliveira e colaboradores (2006) e Barroca e colaboradores (2019). O aparato consiste em uma arena circular de acrílico transparente, sua proporção é de aproximadamente 60 cm de diâmetro e 50 cm de altura, colocada em um assoalho dividido em 12 seções (Fig. 3). Cada animal foi colocado individualmente na área central da arena para um período de 20 minutos para livre exploração. Os comportamentos emitidos pelos animais foram registrados por uma câmera de vídeo posicionada acima da arena. Foram registrados e analisados o número total de seções percorridas, o número de seções centrais percorridas, o tempo de permanência na região central do aparato, o número de levantamentos (em pé com as patas dianteiras levantadas no meio da arena ou contra as paredes), o tempo gasto em imobilidade (ausência de movimentos do corpo) e em autolimpeza (limpeza da cabeça e/ou do corpo com as patas dianteiras).



Fig. 3. Fotografia da arena utilizada no teste do campo aberto.

3.6 EXPERIMENTO 2: Teste de Enterrar Esferas

O protocolo experimental para o teste de enterrar esferas foi baseado naquele descrito por Reimer e colaboradores (2015). O aparato utilizado neste experimento consistiu em uma caixa de polipropileno ($40 \times 33 \times 25$ cm) com piso coberto por 5 cm de maravalha. Para o teste, 20 esferas de vidro com 1 cm de diâmetro foram espalhadas de forma que possuíssem a mesma distância entre si sobre a maravalha (Fig. 4). Os animais permaneceram no aparato contendo as esferas por 20 min e foi registrado e analisado o número de esferas enterradas.



Fig.4. Fotografia da caixa utilizada no teste de enterrar esferas.

3.7 EXPERIMENTO 3: Teste de Trituração para Ninho

O protocolo experimental para o teste de trituração para ninho foi baseado naquele descrito por Angoa-Pérez e colaboradores (2013). O aparato utilizado neste experimento consistiu em uma caixa de polipropileno ($33 \times 25 \times 20$ cm) contendo uma esfera de algodão de peso conhecido previamente, que ficou disposta sobre o assoalho da caixa (Fig. 5). Os animais permaneceram no aparato contendo o algodão por 20 min. Após a finalização do teste, a esfera de algodão foi retirada da caixa e mantida por 48 horas enrolada em papel toalha de forma a absorver líquidos que pudessem influenciar

no peso final do algodão. Após 48 horas, foi registrado e analisado a variação do peso do algodão antes e depois (maior porção intacta restante do algodão) do teste.



Fig. 5. Caixa utilizada no teste de trituração para o ninho.

3.8 EXPERIMENTO 4: Teste de Alternância Espontânea

O protocolo experimental para o teste de alternância espontânea foi baseado naquele descrito por Yadin e colaboradores (1991) e Taguchi (2018). Foi utilizado um labirinto em cruz elevado modificado, composto por três braços de madeira com as mesmas dimensões (10 cm de largura e 50 cm de comprimento) elevados 50 cm acima do solo. Dois braços possuem paredes laterais de madeira com 40 cm de altura e portas móveis de madeira que permitem isolar os braços. O terceiro braço não possui parede e está disposto entre os outros dois braços perpendicularmente, formando um “T” (Fig. 6). Os animais foram colocados na porção final do braço aberto do labirinto e, quando entraram com o corpo inteiro, incluindo a cauda, em um dos braços fechados, a porta móvel foi abaixada e passados 30 s, o animal foi retirado do aparato. Foram registrados e avaliados o braço escolhido (% de alternância e número de repetições até a primeira alternância) e a latência para a entrada, em um total de 5 tentativas consecutivas.



Fig. 6. Fotografia do labirinto utilizado para realização do teste de alternância espontânea.

3.9 ANÁLISE DOS DADOS

Os dados são apresentados como média \pm EPM. Para machos, comparações entre os grupos foram realizadas com análises de variância (ANOVAs) de uma via em todos os experimentos. Para fêmeas, comparações entre os grupos foram realizadas com ANOVAs de duas vias para os experimentos 1, 2 e 3. No experimento 4, comparações entre grupos de fêmeas em proestro foram realizadas com ANOVAs de uma via. Após as ANOVAs seguiu-se, no caso de significância estatística, o teste de Newman-Keuls. Especificamente, para o experimento 4 para fêmeas durante o diestro tardio foram realizados testes t de Student. Valores de p menores que 0,05 foram considerados significativos.

4. RESULTADOS

4.1 EXPERIMENTO 1: Teste do Campo Aberto

4.1.1 Machos

A Figura 7 apresenta os resultados referentes ao total de cruzamentos, levantamentos, tempo de imobilidade, cruzamentos no centro, permanência no centro e tempo de autolimpeza no teste do campo aberto. Todos os comportamentos foram observados durante 20 minutos de livre exploração para os grupos tratados com veículo ($n = 10$), CBD 0,3 mg/kg ($n = 10$), CBD 3 mg/kg ($n = 10$) e CBD 30 mg/kg ($n = 11$). A ANOVA de uma via não revelou efeito significativo para os tratamentos no número total de cruzamentos ($F_{3,37} = 1,45; p > 0,05$), número de levantamentos ($F_{3,37} = 0,77; p > 0,05$), tempo de imobilidade ($F_{3,37} = 0,93; p > 0,05$), número de cruzamentos no centro ($F_{3,37} = 0,65; p > 0,05$), permanência no centro ($F_{3,37} = 0,59; p > 0,05$) ou tempo de autolimpeza ($F_{3,37} = 0,31; p > 0,05$).

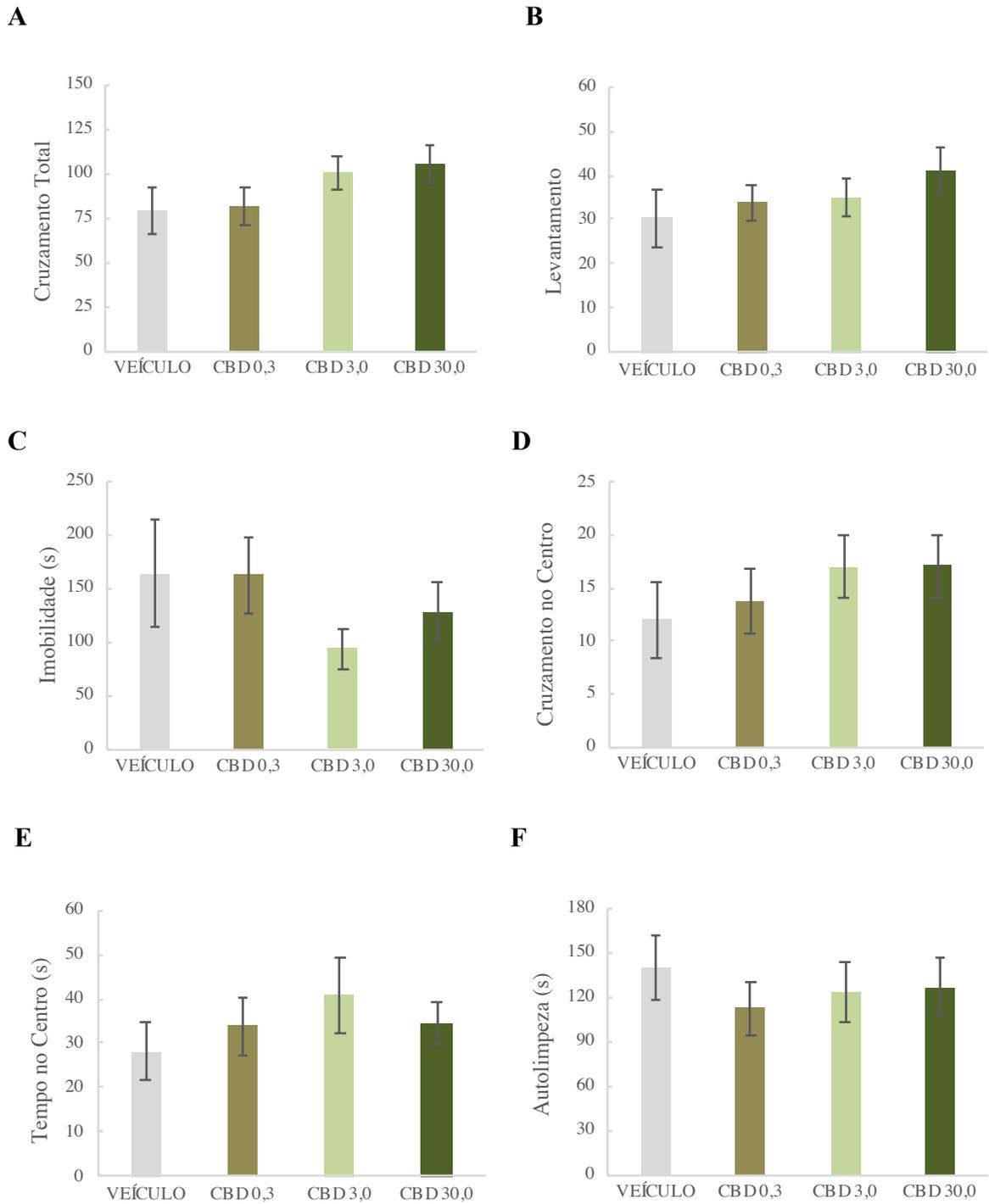


Fig. 7. Efeitos da administração intraperitoneal de canabidiol (CBD) em machos nas doses de 0,3, 3 ou 30 mg/kg em relação ao grupo controle (veículo) sobre os comportamentos avaliados durante os 20 min de exposição ao campo aberto. **(A)** Frequência de cruzamentos. **(B)** Frequência de levantamentos. **(C)** Tempo de imobilidade. **(D)** Frequência de cruzamentos no centro. **(E)** Permanência no centro. **(F)** Tempo de autolimpeza. Média \pm EPM. $n = 10-11$. ANOVA de uma via.

A Tabela 1 apresenta os resultados referentes ao total de cruzamentos, levantamentos, tempo de imobilidade, cruzamentos no centro, permanência no centro e tempo de autolimpeza no teste do campo aberto. Todos os comportamentos foram analisados durante os primeiros 5 minutos de livre exploração no aparato para os grupos tratados com veículo (n = 10), CBD 0,3 mg/kg (n = 10), CBD 3 mg/kg (n = 10) e CBD 30 mg/kg (n = 11). A ANOVA de uma via não revelou efeito significativo para os tratamentos no número total de cruzamentos ($F_{3,37} = 1,13$; $p > 0,05$), número de levantamentos ($F_{3,37} = 0,03$; $p > 0,05$), tempo de imobilidade ($F_{3,37} = 1,64$; $p > 0,05$), número de cruzamentos no centro ($F_{3,37} = 0,86$; $p > 0,05$), permanência no centro ($F_{3,37} = 0,54$; $p > 0,05$) ou tempo de autolimpeza ($F_{3,37} = 0,25$; $p > 0,05$).

Tabela 1. Efeitos da administração intraperitoneal de canabidiol (CBD) em machos nas doses de 0,3, 3 ou 30 mg/kg em relação ao grupo controle (veículo) sobre os comportamentos avaliados durante os primeiros 5 minutos de exposição ao campo aberto.

	Cruzamento Total	Levantamento	Imobilidade	Cruzamento no Centro	Tempo no Centro	Autolimpeza
Veículo	47,60 ± 7,13	17,20 ± 2,40	7,80 ± 5,07	7,40 ± 1,62	16,70 ± 3,16	24,90 ± 9,28
CBD 0,3	47,50 ± 5,23	17,60 ± 2,28	21,10 ± 12,67	7,30 ± 10	24,00 ± 6,23	18,40 ± 5,73
CBD 3	53,10 ± 6,56	17,60 ± 2,19	0,70 ± 0,70	9,30 ± 1,76	21,90 ± 3,83	16,30 ± 3,57
CBD 30	61,27 ± 5,80	18,09 ± 2,32	4,09 ± 3,45	10,18 ± 1,68	22,64 ± 3,48	22,27 ± 9,69

Média ± EPM. n = 10-11. ANOVA de uma via.

4.1.2 Fêmeas

A Figura 8 apresenta os resultados referentes ao total de cruzamentos, levantamentos, tempo de imobilidade, cruzamentos no centro, permanência no centro e tempo de autolimpeza no teste do campo aberto. Todos os comportamentos foram observados durante 20 minutos de livre exploração para os grupos tratados com veículo (P: n = 10; LD: n = 11), CBD 0,3 (P: n = 11; LD: n = 12), CBD 3 (P: n = 10; LD: n = 8) e CBD 30 (P: n = 10; LD: n = 12). A ANOVA de duas vias não revelou efeitos significativos para número total de cruzamentos (fase: $F_{1,76} = 2,98$, tratamento: $F_{3,76} =$

0,28, interação: $F_{3,76} = 0,34$; $p > 0,05$), número de levantamentos (fase: $F_{1,76} = 2,19$, tratamento: $F_{3,76} = 0,78$, interação: $F_{3,76} = 0,65$; $p > 0,05$), tempo de imobilidade (fase: $F_{1,76} = 0,11$, tratamento: $F_{3,76} = 1,30$, interação: $F_{3,76} = 0,79$; $p > 0,05$), número de cruzamentos no centro (fase: $F_{1,76} = 2,48$, tratamento: $F_{3,76} = 0,65$, interação: $F_{3,76} = 2,27$; $p > 0,05$) ou permanência no centro (fase: $F_{1,76} = 0,45$, tratamento: $F_{3,76} = 0,67$, interação: $F_{3,76} = 1,00$; $p > 0,05$). Em relação ao tempo de autolimpeza, a ANOVA de duas vias revelou efeito significativo para fase ($F_{1,76} = 5,12$; $p < 0,05$), mas não para tratamentos ($F_{3,76} = 0,03$; $p > 0,05$) ou interação entre fase e tratamentos ($F_{3,76} = 0,48$; $p > 0,05$). A análise *post hoc* com o teste de *Newman-Keuls* revelou maior tempo de autolimpeza para os grupos testados em diestro tardio em relação aos testados em proestro ($p < 0,05$).

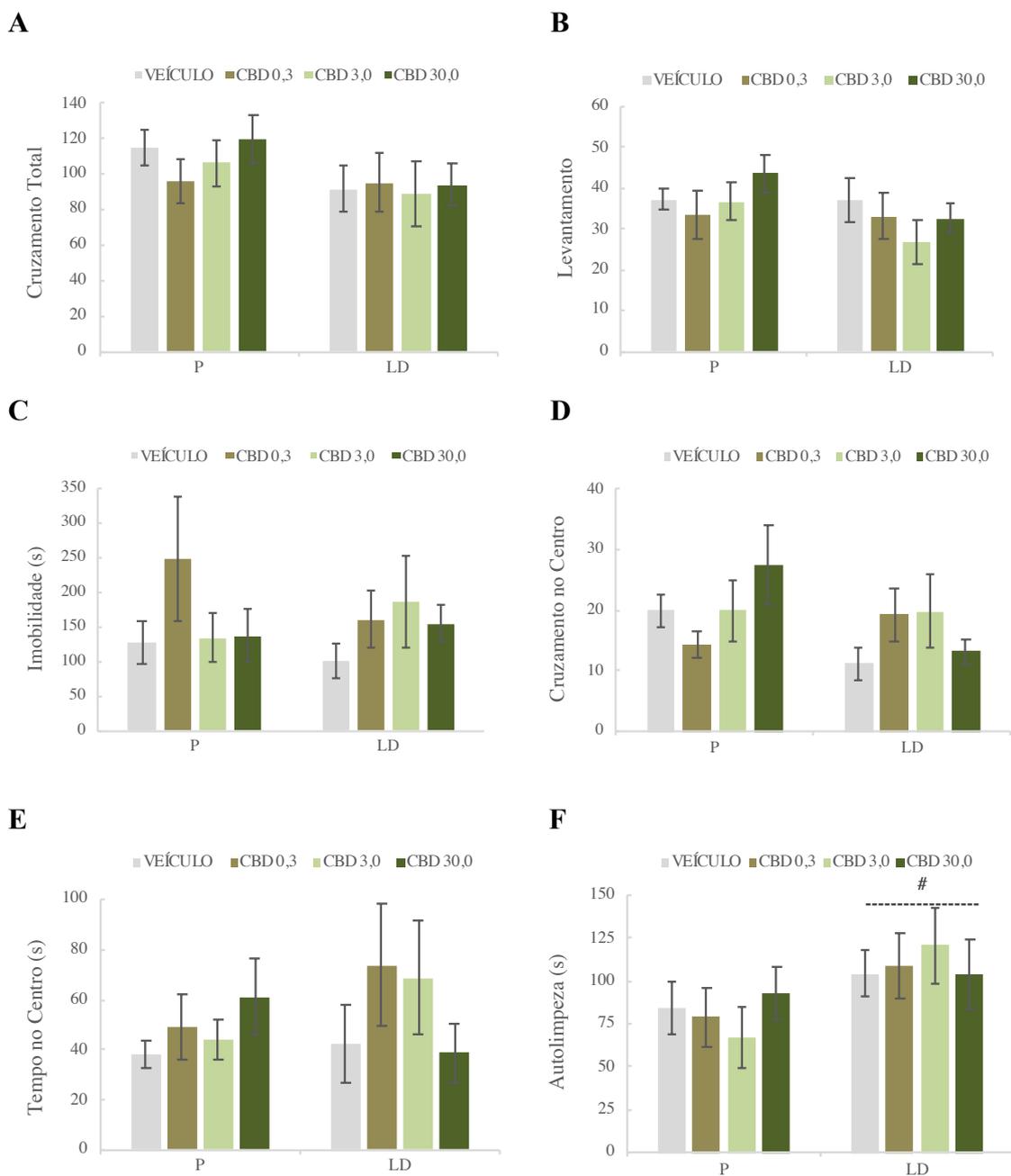


Fig. 8. Efeitos da administração intraperitoneal de canabidiol (CBD) em fêmeas nas doses de 0,3, 3 ou 30 mg/kg em relação ao grupo controle (veículo) sobre os comportamentos avaliados durante os 20 min de exposição ao campo aberto. **(A)** Frequência de cruzamentos. **(B)** Frequência de levantamentos. **(C)** Tempo de imobilidade. **(D)** Frequência de cruzamentos no centro. **(E)** Permanência no centro. **(F)** Tempo de autolimpeza. P = Proestro; LD = Diestro tardio. Média \pm EPM. n = 8-12. ANOVA de duas vias seguida pelo teste de *Newman-Keuls*. #Diferença estatística em relação ao proestro, $p < 0,05$.

A Tabela 2 apresenta os resultados referentes ao total de cruzamentos, levantamentos, tempo de imobilidade, cruzamentos no centro, permanência no centro e tempo de autolimpeza no teste do campo aberto. Todos os comportamentos foram analisados durante os primeiros 5 minutos de livre exploração no aparato para os grupos tratados com veículo (P: n = 10; LD: n = 11), CBD 0,3 (P: n = 11; LD: n = 12), CBD 3 (P: n = 10; LD: n = 8) e CBD 30 (P: n = 10; LD: n = 12). A ANOVA de duas vias não revelou efeitos significativos para número total de cruzamentos (fase: $F_{1,76} = 1,29$, tratamento: $F_{3,76} = 1,00$, interação: $F_{3,76} = 0,35$; $p > 0,05$), número de levantamentos (fase: $F_{1,76} = 0,24$, tratamento: $F_{3,76} = 2,67$, interação: $F_{3,76} = 0,08$; $p > 0,05$), tempo de imobilidade (fase: $F_{1,76} = 0,02$, tratamento: $F_{3,76} = 1,32$, interação: $F_{3,76} = 0,79$; $p > 0,05$), número de cruzamentos no centro (fase: $F_{1,76} = 0,87$, tratamento: $F_{3,76} = 0,07$, interação: $F_{3,76} = 1,72$; $p > 0,05$), permanência no centro (fase: $F_{1,76} = 1,02$, tratamento: $F_{3,76} = 1,03$, interação: $F_{3,76} = 1,38$; $p > 0,05$) ou tempo de autolimpeza (fase: $F_{1,76} = 0,04$, tratamentos: $F_{3,76} = 1,32$, interação: $F_{3,76} = 0,38$; $p > 0,05$).

Tabela 2. Efeitos da administração intraperitoneal de canabidiol (CBD) em fêmeas nas doses de 0,3, 3 ou 30 mg/kg em relação ao grupo controle (veículo) sobre os comportamentos avaliados durante os primeiros 5 minutos de exposição ao campo aberto.

	Cruzamento Total	Levantamento	Imobilidade	Cruzamento no Centro	Tempo no Centro	Autolimpeza
<u>Proestro</u>						
Veículo	59,60 ± 6,10	18,20 ± 1,46	3,60 ± 2,44	10,70 ± 1,16	25,30 ± 3,98	18,30 ± 6,33
CBD 0,3	48,82 ± 5,88	15,82 ± 2,22	43,00 ± 22,42	6,91 ± 1,14	19,00 ± 3,76	13,36 ± 3,86
CBD 3	48,80 ± 4,26	15,50 ± 2,46	20,90 ± 5,90	9,00 ± 1,69	28,50 ± 4,70	9,10 ± 3,23
CBD 30	55,30 ± 5,05	21,30 ± 2,08	15,90 ± 7,62	10,20 ± 2,30	23,80 ± 4,68	9,60 ± 3,40
<u>Diestro Tardio</u>						
Veículo	48,36 ± 6,29	18,18 ± 2,62	18,55 ± 11,57	6,45 ± 1,36	18,00 ± 3,68	16,91 ± 4,51
CBD 0,3	48,42 ± 6,55	15,58 ± 2,50	23,33 ± 15,28	9,58 ± 2,14	36,00 ± 10,32	10,08 ± 2,37
CBD 3	41,38 ± 7,61	13,25 ± 2,55	30,00 ± 7,79	8,88 ± 1,99	37,00 ± 8,95	12,75 ± 4,03
CBD 30	54,08 ± 7,27	20,42 ± 2,96	16,33 ± 7,80	7,42 ± 1,33	24,08 ± 6,74	12,75 ± 2,75

Média ± EPM. n = 8-12. ANOVA de duas vias.

4.2 EXPERIMENTO 2: Teste de Enterrar Esferas

4.2.1 Machos

A Figura 9 apresenta os resultados referentes ao comportamento de enterrar esferas. O comportamento foi observado durante 20 minutos, nos grupos tratados com veículo (n = 11), CBD 0,3 (n = 10), CBD 3 (n = 10) e CBD 30 (n = 10). A ANOVA de uma via não revelou efeito significativo dos tratamentos para o número de esferas enterradas ($F_{3,37} = 2,12$; $p > 0,05$).

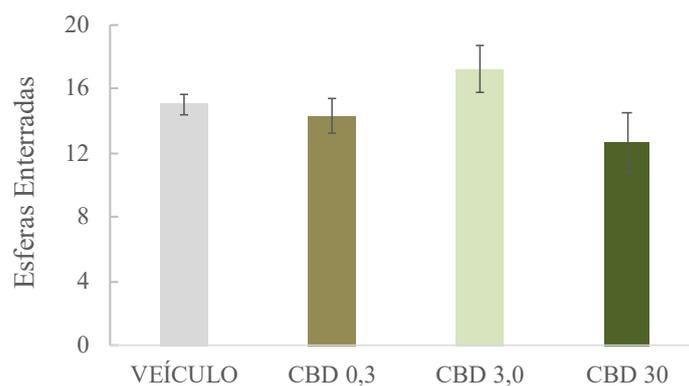


Fig. 9. Efeitos da administração intraperitoneal de canabidiol (CBD) em machos nas doses de 0,3, 3 ou 30 mg/kg em relação ao grupo controle (veículo) sobre o número de esferas enterradas. Média \pm EPM. n = 10-11. ANOVA de uma via.

4.2.2 Fêmeas

A Figura 10 apresenta os resultados referentes ao comportamento de enterrar esferas. O comportamento foi observado durante 20 minutos, nos grupos tratados com veículo (P: n = 10; LD: n = 10), CBD 0,3 (P: n = 10; LD: n = 10), CBD 3 (P: n = 12; LD: n = 10) e CBD 30 (P: n = 10; LD: n = 10). A ANOVA de duas vias não revelou efeitos significativos para o número de esferas enterradas (fase: $F_{1,74} = 3,60$, tratamento: $F_{3,74} = 0,44$, interação: $F_{3,74} = 0,76$; $p > 0,05$).

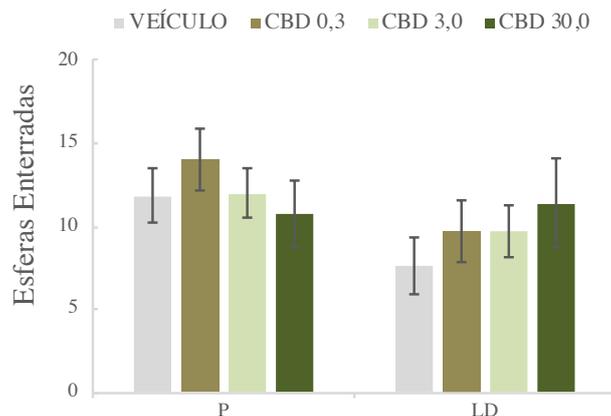


Fig. 10. Efeitos da administração intraperitoneal de canabidiol (CBD) em fêmeas nas doses de 0,3, 3 ou 30 mg/kg em relação ao grupo controle (veículo) sobre o número de esferas enterradas. P = Proestro; LD = Diestro tardio. Média \pm EPM. n = 10-12. ANOVA de duas vias.

4.3 EXPERIMENTO 3: Teste de Trituração para Ninho

4.3.1 Machos

A Figura 11 apresenta os resultados referentes ao comportamento de trituração para ninho. O comportamento foi observado durante 20 minutos, nos grupos tratados com veículo (n = 11), CBD 0,3 (n = 10), CBD 3 (n = 10) e CBD 30 (n = 10). A ANOVA de uma via não revelou efeito significativo dos tratamentos para a quantidade de algodão triturado ($F_{3,37} = 1,71$; $p > 0,05$).

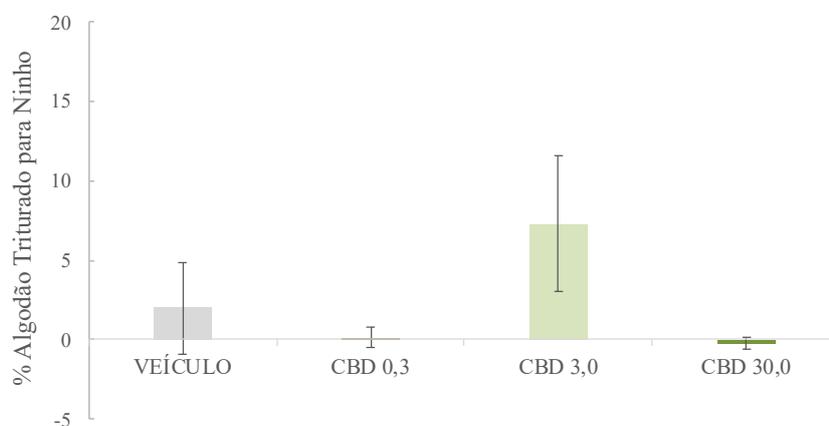


Fig. 11. Efeitos da administração intraperitoneal de canabidiol (CBD) em machos nas doses de 0,3, 3 ou 30 mg/kg em relação ao grupo controle (veículo) sobre a porcentagem de algodão triturado. Média \pm EPM. n = 10-11. ANOVA de uma via.

4.3.2 Fêmeas

A Figura 12 apresenta os resultados referentes ao comportamento de trituração para o ninho. O comportamento foi observado durante 20 minutos, nos grupos tratados com veículo (P: n = 10; LD: n = 10), CBD 0,3 (P: n = 10; LD: n = 10), CBD 3 (P: n = 12; LD: n = 10) e CBD 30 (P: n = 10; LD: n = 10). A ANOVA de duas vias não revelou efeitos significativos para a quantidade de algodão triturado (fase: $F_{1,74} = 0,22$, tratamento: $F_{3,74} = 0,81$, interação: $F_{3,74} = 0,13$; $p > 0,05$).

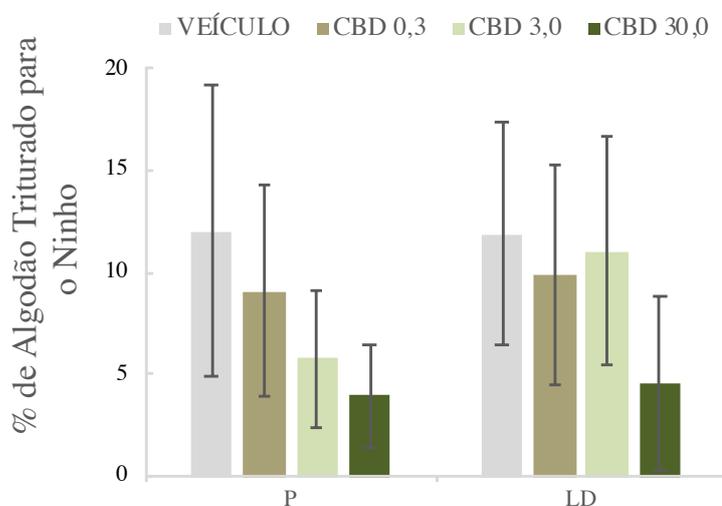


Fig. 12. Efeitos da administração intraperitoneal de canabidiol (CBD) em fêmeas nas doses de 0,3, 3 ou 30 mg/kg em relação ao grupo controle (veículo) sobre a porcentagem de algodão triturado. P = Proestro; LD = Diestro tardio. Média \pm EPM. n = 10-12. ANOVA de duas vias.

4.4 EXPERIMENTO 4: Teste de Alternância Espontânea

4.4.1 Machos

A Figura 13 ilustra o número de tentativas até a primeira alternância, a porcentagem de alternância espontânea e a latência para entradas no teste de alternância espontânea para os grupos tratados com veículo (n = 7), CBD 0,3 (n = 9), CBD 3 (n = 7) e CBD 30 mg/kg (n = 10). A ANOVA de uma via não revelou efeito significativo dos

tratamentos para o número de tentativas até a primeira alternância ($F_{3,29} = 0,51$; $p > 0,05$), para a porcentagem de alternância espontânea ($F_{3,29} = 0,46$; $p > 0,05$) ou para a latência para entradas no teste de alternância espontânea ($F_{3,29} = 1,06$; $p > 0,05$). Os dados de sete animais submetidos ao teste mas que não completaram as 5 tentativas não foram incluídos nas análises – veículo ($n = 3$), CBD 0,3 ($n = 1$), CBD 3,0 ($n = 3$).

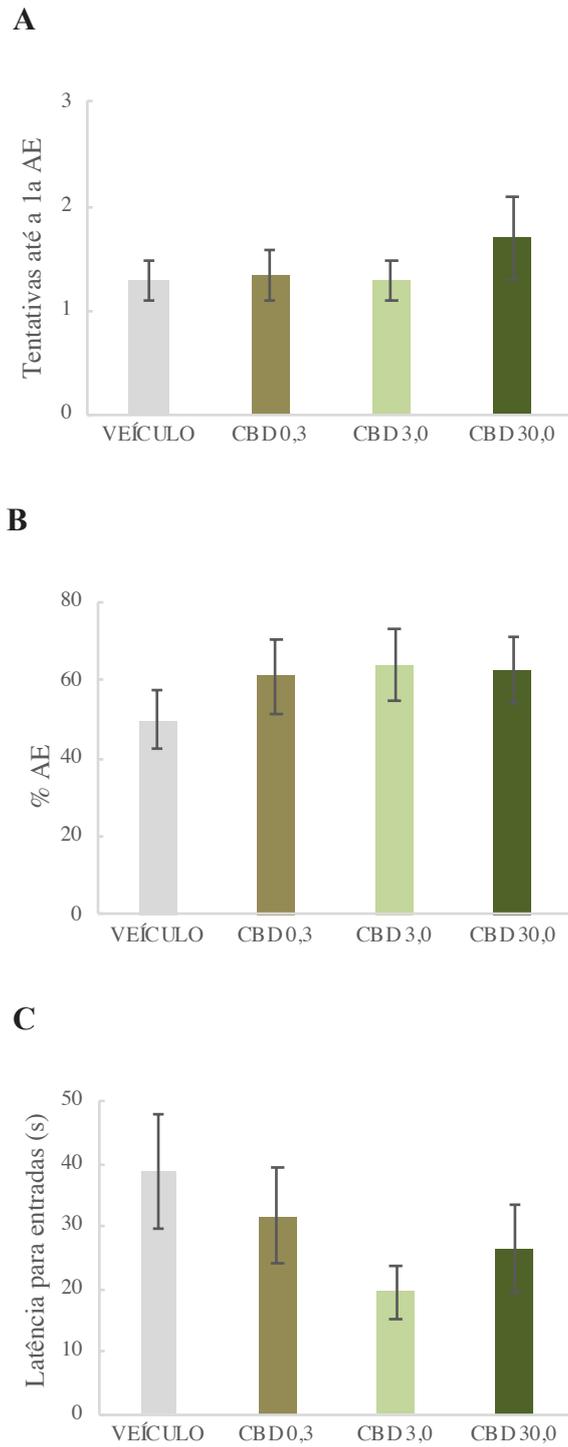


Fig. 13. Efeitos da administração intraperitoneal de cannabidiol (CBD) em machos nas doses de 0,3, 3 ou 30 mg/kg em relação ao grupo controle (veículo) sobre o número de tentativas até a primeira alternância espontânea (A), porcentagem de alternância espontânea (B) e latência para entradas (C). AE = alternância espontânea. Média \pm EPM. n = 7-10. ANOVA de uma via.

4.4.2 Fêmeas

A Figura 14 ilustra o número de tentativas até a primeira alternância, a porcentagem de alternância espontânea e a latência para entradas no teste de alternância espontânea para os grupos de fêmeas em proestro tratadas com veículo (n = 6), CBD 0,3 (n = 6), CBD 3 (n = 7) e CBD 30 mg/kg (n = 6). A ANOVA de uma via não revelou efeitos significativos dos tratamentos em fêmeas durante o proestro para o número de tentativas até a primeira alternância ($F_{3,21} = 1,89$; $p > 0,05$), para a porcentagem de alternância espontânea ($F_{3,21} = 0,88$; $p > 0,05$) ou para a latência para entradas no teste de alternância espontânea ($F_{3,21} = 0,32$; $p > 0,05$). Os dados de seis animais que foram submetidos ao teste mas não completaram as 5 tentativas não foram incluídos nas análises – veículo (n = 2), CBD 0,3 (n = 2), CBD 30 (n = 2).

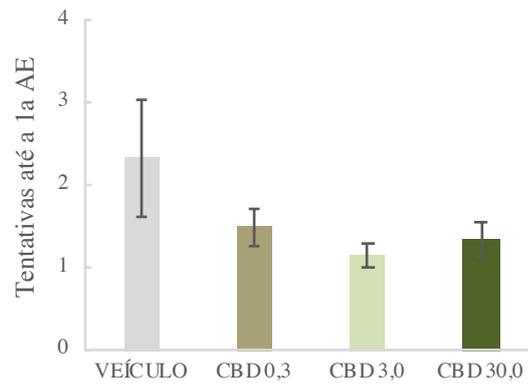
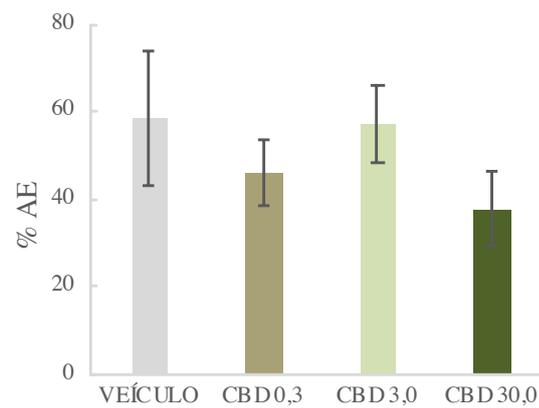
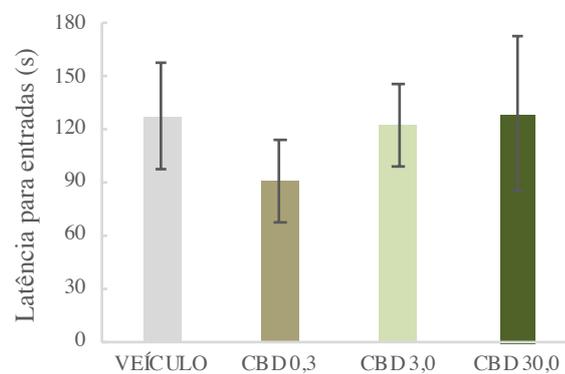
A**B****C**

Fig. 14. Efeitos da administração intraperitoneal de canabidiol (CBD) em fêmeas durante o proestro tratadas com CBD 0,3, 3 ou 30 mg/kg em relação ao grupo controle (veículo) sobre o número de tentativas até a primeira alternância espontânea (A), porcentagem de alternância espontânea (B) e latência para entradas (C). Média \pm EPM. n = 6-7. ANOVA de uma via.

A Figura 15 ilustra o número de tentativas até a primeira alternância, a porcentagem de alternância espontânea e a latência para entradas no teste de alternância espontânea para os grupos de fêmeas em diestro tardio tratadas com veículo (n = 7) ou CBD 30,0 (n = 8). O *test-t* de Student não revelou efeitos significativos dos tratamentos em fêmeas durante o diestro tardio para o número de tentativas até a primeira alternância ($t_{13} = 0,81$; $p > 0,05$), para a porcentagem de alternância espontânea ($t_{13} = 0,25$; $p > 0,05$) ou para a latência para entradas no teste de alternância espontânea ($t_{13} = 0,91$; $p > 0,05$). Os dados de um animal do grupo controle (veículo; n = 1) que foi submetido ao teste mas não completou as 5 tentativas não foram incluídos nas análises. Os dados dos grupos tratados com CBD 0,3 e CBD 3 também não foram incluídos nas análises uma vez que apenas dois animais de um total de oito no grupo CBD 0,3 e quatro de oito no grupo CBD 3 completaram as 5 tentativas.

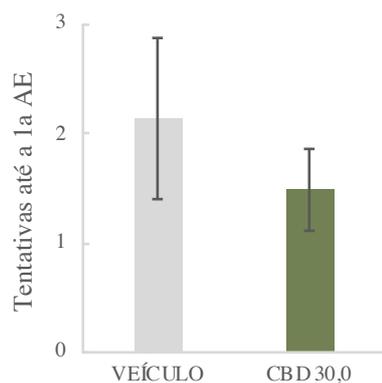
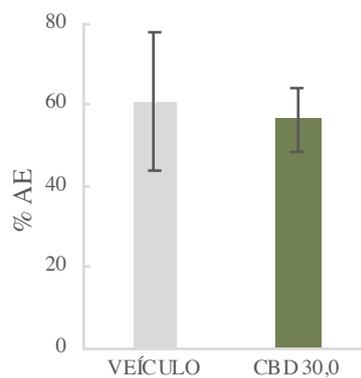
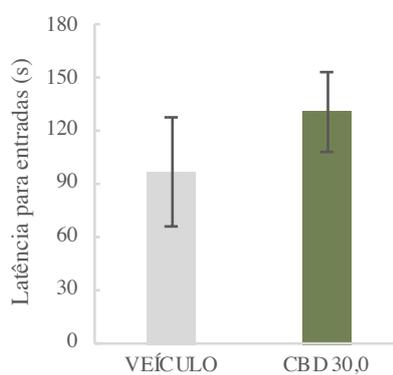
A**B****C**

Fig. 15. Efeitos da administração intraperitoneal de canabidiol (CBD) em fêmeas durante o diestro tardio tratadas com CBD 30 mg/kg em relação ao grupo controle (veículo) sobre o número de tentativas até a primeira alternância espontânea (A), porcentagem de alternância espontânea (B) e latência para entradas (C). AE = alternância espontânea. Média \pm EPM. n = 7-8. Teste t de Student.

5. DISCUSSÃO

Em roedores, estereotípias e comportamentos repetitivos estão entre os principais elementos avaliados em estudos que buscam um melhor entendimento das bases biológicas do TOC e o desenvolvimento de fármacos mais eficazes e menos prejudiciais para tratamento desse transtorno (Diniz et al., 2012; Ahmari et al., 2013; Reimer et al., 2015). O CBD é um fitocanabinoide desprovido dos efeitos psicotomiméticos típicos da *cannabis* (Zuardi et al., 1982, 2008) e com potencial terapêutico bastante explorado atualmente nos transtornos mentais (Leweke et al., 2008; Breuer et al., 2016). O presente estudo avaliou os efeitos do CBD sobre comportamentos “tipo-compulsivo” em ratos, considerando a influência do sexo e das fases do ciclo estral. Para isso, ratos Wistar machos e fêmeas na fase proestro e diestro tardio receberam administração intraperitoneal de CBD e foram avaliados nos testes do campo aberto, de enterrar esferas, de trituração para o ninho e de alternância espontânea. De maneira geral, os resultados obtidos indicam que o CBD parece não ter efeitos importantes sobre os comportamentos “tipo-compulsivo” avaliados em machos ou fêmeas no presente estudo.

A administração intraperitoneal de CBD não afetou os comportamentos exibidos por machos e fêmeas no campo aberto. Foi realizada a análise dos comportamentos exibidos durante o tempo total do teste (20 min) e também durante seus cinco primeiros minutos. Nenhuma diferença para os tratamentos foi observada em ambas as análises. Em relação ao comportamento de autolimpeza, comportamento “tipo-compulsivo” avaliado durante o teste do campo aberto, apesar de nenhum efeito para o CBD, fêmeas durante o proestro e diestro tardio apresentaram respostas distintas. Na fase de diestro tardio, para os 20 min de teste, foi observado aumento significativo do comportamento

de autolimpeza comparado ao das fêmeas em proestro, independentemente dos tratamentos. Na fase de diestro tardio ocorre a queda abrupta da progesterona (Spornitz et al., 1999; Butcher et al., 1974) e conseqüentemente de seu metabólito, a alopregnanolona (Griffiths et al., 2005). Neste sentido, alterações das concentrações de progesterona estão relacionadas com a maior reatividade emocional e aumento de comportamentos relacionados à ansiedade (Devall et al., 2009; Sundström-Poromaa et al., 2018). Portanto, a flutuação hormonal nas fêmeas pode alterar as respostas emocionais em humanos e outros animais (Lovick, 2014). Estudos mostraram que o aumento da concentração hormonal induzido por fármacos pode ser suficiente para atenuar o declínio da concentração de alopregnanolona e impedir conseqüentemente o desenvolvimento da resposta ansiogênica (Soares-Rachetti et al., 2016; Machado Figueiredo et al., 2019). Fortalecendo ainda mais essa hipótese, Devall e colaboradores (2015) mostraram que o mesmo efeito não é observado em outras fases do ciclo estral. Nenhuma diferença significativa foi observada, entretanto, para os 5 min iniciais do experimento. A autolimpeza é um dos comportamentos repetitivos mais comumente avaliados em modelos animais para o TOC, sendo relacionada aos rituais de limpeza observados em alguns pacientes e respondendo ao tratamento com ISRS (Veith, 1986; Stein et al., 1994). Como um comportamento deslocado que pode ocorrer em situações em que o animal experimenta conflito (Sachs, 1988; Spruitj et al., 1982), a autolimpeza pode agir como um mecanismo de compensação para sobrepor aumentos na ansiedade (Diniz et al., 2012). Diferenças na exibição de comportamentos relacionados ao TOC entre as fases do ciclo estral também já foram demonstradas em outros estudos, por exemplo, déficits na retenção da extinção induzidos por mCPP prevalecendo nas fases de baixa hormonal (Reimer et al., 2018).

O modelo do campo aberto também é muito utilizado em estudos sobre a ansiedade, e algumas comparações podem ser feitas nessa direção. As medidas de cruzamentos e permanência no centro do aparato podem ser, por exemplo, de alguma forma comparadas à exploração dos braços abertos do LCE, uns dos modelos mais amplamente utilizado em estudos sobre ansiedade (Pellow, 1985; Rodgers 1997; Scholl et al 2019). Efeitos significativos do CBD para aumento da exploração dos braços abertos em camundongos e ratos machos submetidos ao LCE já foram demonstrados, indicativo de uma ação ansiolítica desse composto (Onaivi et al.,1990; Guimarães et al., 1990). De forma similiar, o CBD foi capaz de atenuar as respostas ansiogênicas de ratos expostos ao estresse de restrição e submetidos ao LCE 24 horas depois (Resstel et al., 2009). Avaliamos em estudo anterior os efeitos do CBD em machos e fêmeas submetidos ao LCE, e os resultados mostraram que machos que receberam CBD na dose de 3,0 mg/kg apresentaram aumento na resposta exploratória nos braços abertos, enquanto que em fêmeas durante o diestro tardio o CBD aumentou significativamente a proporção de entradas e tempo de permanência nos braços abertos do LCE em uma dose dez vezes menor que nos machos (Fabris et al., 2017). No presente estudo com o campo aberto, entretanto, nenhum efeito significativo para o CBD pôde ser observado em relação ao número de cruzamentos e tempo de permanência no centro do aparato.

O tratamento com CBD também não causou alterações motoras, visto que não afetou o total de cruzamentos, levantamentos e tempo de imobilidade de machos e fêmeas no campo aberto. Para machos, esses resultados estão de acordo com estudos anteriores que também não mostraram efeito do CBD na atividade locomotora (Campos et al., 2013; Nardo et al., 2013; Hartmann et al., 2019). Tais resultados em relação à atividade motora são importantes pois sugerem que a ausência de efeitos dessas doses

de CBD sobre os comportamentos “tipo-compulsivo” e defensivos não deve estar relacionada a um comprometimento motor induzido pelo fármaco.

No teste de enterrar esferas, não houve efeitos significativos para o tratamento com CBD, para machos ou fêmeas. Casarotto e colaboradores (2010) demonstraram que o tratamento agudo (15, 30 ou 60 mg/kg) ou crônico de sete dias (30 mg/kg) com CBD foi capaz de diminuir o número de esferas enterradas em camundongos. Um aspecto importante, é que o efeito do CBD no tratamento agudo foi bloqueado pelo antagonista dos receptores CB1 (AM 251), sugerindo que os efeitos do CBD podem ocorrer através da neurotransmissão mediada por esse tipo de receptor. Baseados nesses achados, Gomes e colaboradores (2011) demonstraram posteriormente que drogas que facilitam a neurotransmissão mediada por CB1, isto é, agonistas diretos ou inibidores das enzimas de captação e enzima de degradação de endocanabinoides, também são eficazes no teste de enterrar esferas. De forma similar, Nardo e colaboradores (2013) apontaram que os tratamentos com CBD (30 mg/kg), fluoxetina (10 mg/kg) ou o tratamento combinado (fluoxetina 3 mg/kg e CBD 15 mg/kg) foram capazes de diminuir o número de esferas enterradas em camundongos. Portanto, os trabalhos indicam um possível efeito anticomulsivo do CBD e sugerem também que o sistema serotoninérgico e canabinoide poderiam interagir para controlar esse tipo de comportamento repetitivo. A presença de efeitos do CBD no teste de enterrar esferas em camundongos e a ausência de efeitos em ratos podem estar relacionados a especificidades comportamentais que podem diferir entre essas duas espécies de roedores.

Não foram observados efeitos significativos do CBD no teste de trituração para ninho no presente estudo. Nossos resultados estão de acordo com um estudo recente que mostrou que a administração de CBD em camundongos adultos também não altera a porcentagem de algodão triturado (Murphy et al., 2017). Por outro lado, Angoa-Pérez e

colaboradores (2013) demonstraram que camundongos machos geneticamente modificados para a expressão da serotonina (ausência do gene da triptofano hidroxilase 2) tiveram 50% do material triturado comparado a 10% do respectivo grupo controle. Contudo, a frequência e a intensidade do comportamento “tipo-compulsivo” avaliado podem variar após diferentes modificações genéticas. De maneira geral, tais resultados em conjunto sugerem que não parece haver interação entre os sistemas serotoninérgico e canabinoide na expressão do comportamento de trituração para ninho em roedores.

Para o teste de alternância espontânea, não houve efeito significativo para o tratamento com CBD, para machos e fêmeas em relação à porcentagem de alternância, número de tentativas até a primeira alternância ocorrer ou para a latência para entradas. Diante de um ambiente desconhecido, as regiões abertas são potencialmente perigosas e conflituosas para o animal (Treit et al., 1993; Wall et al., 2001). Entretanto, no presente projeto, uma porcentagem importante dos machos (17,50%) e das fêmeas (26,98%) permaneceram no braço aberto do aparato, não completando as cinco tentativas do teste. Em relação às fêmeas, um número ainda maior de animais não finalizou o teste durante o diestro tardio (34,37%), principalmente quando receberam CBD nas doses de 0,3 e 3 mg/kg. Este comportamento pode indicar que os animais não tiveram aversão ao braço aberto do aparato, o que poderia ser interpretado como possível efeito panicolítico. O teste do labirinto em T elevado, também é um modelo utilizado para estudo do perfil ansiolítico e/ou panicolítico de diversos fármacos. Nesse sentido, Campos e colaboradores (2013) apresentaram efeito ansiolítico do CBD na diminuição da latência para esquivar ao mesmo tempo em que o CBD não afetou a fuga (ausência de efeito panicolítico). Já no modelo presa-predador, Uribe-Mariño e colaboradores (2012) demonstraram redução significativa nos comportamentos de escape explosivo (fuga),

imobilidade defensiva (congelamento) e evitação em camundongos tratados com injeção sistêmica de CBD.

Soares-Rachetti e colaboradores (2016) demonstraram efeito ansiolítico com o diazepam ou do tratamento combinado de diazepam (1,0 mg/kg) e fluoxetina (1,75 mg/kg) em fêmeas submetidas ao LCE. Especificamente em fêmeas durante o diestro tardio, só foi observado efeito ansiolítico do diazepam em fêmeas pré-tratadas com baixas doses de fluoxetina. Este efeito ansiolítico da fluoxetina (1,75 mg/kg) em fêmeas durante o diestro tardio também foram observados no teste de vocalização ultrassônica e na resposta de desligamento da luz (*light switch-off*) (Machado et al., 2019). Isso se deve ao fato de que baixas doses de fluoxetina é capaz de aumentar a concentração de alopregnanolona (Devall et al., 2015). No presente projeto, a ausência de efeitos do CBD no teste de alternância espontânea pode se dever ao fato que o teste tem sido usado para modelar comportamentos “tipo-compulsivo” relacionados ao TOC (Tsaldas et al., 2005) e não ao comportamento defensivo observado no LCE. Desta forma, os resultados indicam que a sensibilidade ao CBD parece depender do tipo de resposta defensiva ou compulsiva avaliada e diferir de acordo com o gênero e a fase do ciclo estral.

Cabe mencionar aqui que, para os animais controle (veículo), as fêmeas parecem mais ativas no campo aberto, explorando mais o aparato do que os machos, ou seja, realizam mais cruzamentos e permanecem menos tempo imóveis. Os machos, por sua vez, parecem expressar mais comportamentos de autolimpeza, principal comportamento associado ao TOC em modelos animais (Diniz et al., 2012; Reimer et al., 2015, 2018). No presente trabalho, também parecem existir diferenças entre machos e fêmeas para os testes de trituração para ninho (com as fêmeas apresentando mais comportamentos de trituração de algodão do que os machos) e de alternância espontânea (com machos

apresentando menor latência para entradas do que as fêmeas). Uma vez que os experimentos com machos e fêmeas foram realizados em momentos distintos, uma comparação direta entre os resultados não pôde ser realizada. Estudos voltados para exploração de tais diferenças entre machos e fêmeas, sem administração de fármacos, estão em andamento em nosso laboratório e poderão contribuir para o melhor entendimento de tais possíveis diferenças.

Outra questão importante que deve ser destacada é que, no estudo do TOC, ainda não existem modelos animais ideais que atendam aos critérios de validade de face, constructo teórico e previsibilidade. Nesse sentido, a administração de mCPP, agonista serotoninérgico, é um modelo farmacológico que vem sendo frequentemente utilizado em estudos sobre o TOC para induzir respostas do tipo-compulsivas em roedores (Graf et al., 2006; Kreiss et al., 2013). Estudos do nosso laboratório mostraram que ratos machos tratados com mCPP apresentaram aumento da resposta de autolimpeza, e uma diminuição da atividade exploratória no teste do campo aberto (Kawaoku, 2017), além de uma diminuição da porcentagem de alternância e aumento da latência para entradas quando submetidos ao teste de alternância espontânea (Taguchi, 2018). Tsalgas e colaboradores (2005), apontaram que ratos machos tratados com mCPP apresentaram aumento acentuado do comportamento persistente no teste de alternância espontânea. Esse comportamento foi atenuado nos animais pré-tratados com fluoxetina, mas não pela desipramina ou diazepam. Nessa mesma direção, Reimer e colaboradores (2018) mostraram que tanto machos quanto fêmeas apresentaram índices mais altos de autolimpeza durante o pré-teste e nos treinamentos de extinção do medo condicionado ao contexto e ao som após tratamento com mCPP. Além disso, as fêmeas tratadas com mCPP apresentaram prejuízo da extinção, especificamente durante as fases de baixas taxas do hormônio ovariano. São encontrados na literatura poucos trabalhos

avaliando os efeitos do CBD sobre as alterações comportamentais induzidas pela mCPP. Casaroto e colaboradores (2010) e Nardo e colaboradores (2013) demonstraram que o CBD reduziu o número de esferas enterradas em camundongos submetidos ao teste de enterrar esferas, indicando um possível efeito anticomulsivo do CBD. Entretanto, ainda não é encontrado na literatura estudos sobre potenciais efeitos bloqueadores do CBD sobre a ação da mCPP em outros comportamentos “tipo-compulsivo” em ratos machos e fêmeas. Neste sentido, a avaliação dos efeitos do CBD em machos e fêmeas previamente tratados com mCPP, investigando assim se o CBD seria capaz de atenuar os comportamentos “tipo-compulsivo” induzidos pela mCPP, é um próximo passo importante para um melhor esclarecimento de eventuais efeitos anticomulsivos do CBD em ratos.

De maneira geral, os resultados obtidos até o momento indicam que o CBD parece não ter efeitos importantes sobre os comportamentos “tipo-compulsivo” avaliados nos testes do campo aberto, de enterrar esferas, de trituração para ninho e de alternância espontâneas. Efeitos do CBD na reversão de comportamentos “tipo-compulsivo” induzidos por outras manipulações devem ampliar nossa compreensão sobre o potencial terapêutico desse composto no TOC.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abreu PR., et al. Efeitos de instruções sobre respostas de checagem. *Psicologia: Teoria e Pesquisa*, 27(3), 301-307, 2011.
- Adams R. Marihuana: Harvey Lectures, February 19. *Bulletin of the New York Academy of Medicine*, 18(11), 1942.
- Ahmari SE., et al Repeated cortico-striatal stimulation generates persistent OCD-like behavior. *Science*, 340(6137), 1234-1239, 2013.
- Alonso P., et al. Animal models of obsessive-compulsive disorder: utility and limitations. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 11, 1939, 2015.

- American Psychiatric Association. *Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais*. 5ª edição. Editora Artmed, Porto Alegre, 2014.
- Andrade LHS., et al. Epidemiologia dos transtornos psiquiátricos na mulher. *Revista de Psiquiatria Clínica*, 33(2), 43-54, 2006.
- Andreano JM., et al. Sex influences on the neurobiology of learning and memory. *Learning & Memory*, 16:(4), 248–266, 2009.
- Angoa-Pérez, M., et al. Marble burying and nestlet shredding as tests of repetitive, compulsive-like behaviors in mice. *Journal of Visualized Experiments*, (82), e50978, 2013.
- Berridge KC., et al. Sequential superstereotypy of an instinctive fixed action pattern in hyper-dopaminergic mutant mice: a model of obsessive compulsive disorder and Tourette's. *BMC Biology*, 3:4, 2005.
- Barroca NCB et al. Influence of aversive stimulation on haloperidol-induced catalepsy in rats. *Behavioral Pharmacology*, 30:229-238, 2019.
- Bergamaschi MM., et al Cannabidiol reduces the anxiety induced by simulated public speaking in treatment-naive social phobia patients. *Neuropsychopharmacology*, 36(6), 1219–1226, 2011a.
- Bilge MT., et al. Deep brain stimulation in psychiatry: mechanisms, models, and next-generation therapies. *Psychiatric Clinics*, 41(3), 373-383, 2018.
- Butcher RL., et al. Plasma concentration of LH, FSH, prolactin, progesterone and estradiol-17beta throughout the 4-day estrous cycle of the rat. *Endocrinology*, 94(6):1704-8, 1974.
- Breuer A., et al. Fluorinated cannabidiol derivatives: enhancement of activity in mice models predictive of anxiolytic, antidepressant and antipsychotic effects. *Plos One*, 11(7), 2016.
- Bromet E., et al. Cross-national epidemiology of DSM-IV major depressive episode. *BMC Medicine*, 9:90, 1-16 2011.
- Broekkamp CL., et al. Major tranquillizers can be distinguished from minor tranquillizers on the basis of effects on marble burying and swim-induced grooming in mice. *European Journal of Pharmacology*, 126(3), 223-229, 1986.
- Brunoni AR., et al. Noninvasive brain stimulation in psychiatric disorders: a primer. *Brazilian Journal of Psychiatry*, 2018.

- Cahn RS. Cannabis indica resin, Part, III The constitution of Cannabinol. *Journal of the Chemical Society*, 1342–1353, 1932.
- Campos AC., et al. Involvement of serotonin-mediated neurotransmission in the dorsal periaqueductal gray matter on cannabidiol chronic effects in panic-like responses in rats. *Psychopharmacology*, 226:13–24, 2013.
- Casarotto PC., et al. Cannabidiol inhibitory effect on marble-burying behaviour: involvement of CB1 receptors. *Behavioural Pharmacology*, 21(4):353-358, 2010.
- Cherian AV., et al. Gender differences in obsessive-compulsive disorder: findings from a large Indian sample. *Asian Journal of Psychiatry*, 9:17-21, 2014.
- Cooper ZD., et al. Sex-dependent effects of cannabis and cannabinoids: a translational perspective. *Neuropsychopharmacology*, 43(1), 34-51, 2018.
- Craft RM., et al. Sex differences in cannabinoid pharmacology: a reflection of differences in the endocannabinoid system? *Life sciences*, 92(8-9):476-481, 2013.
- Cravatt, B. S. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature*, 384(6604):83-87, 1996.
- Crippa JA., et al. Effects of cannabidiol (CBD) on regional cerebral blood flow. *Neuropsychopharmacology*, 29(2):417-426, 2004.
- Crippa JAS., et al. Neural basis of anxiolytic effects of cannabidiol (CBD) in generalized social anxiety disorder: a preliminary report. *Journal of Psychopharmacology*, 25(1), 121-130, 2011.
- da Silva., et al. Transcranial direct current stimulation for Obsessive-Compulsive Disorder: patient selection and perspectives. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 15:2663–2669, 2019.
- De Oliveira AR, Reimer AE, Brandão ML. Dopamine D2 receptor mechanisms in the expression of conditioned fear. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 84:102–111, 2006.
- Deacon RM., et al. T-maze alternation in the rodent. *Nature Protocols*, 1(1), 7, 2006.
- Deiana S., et al. Plasma and brain pharmacokinetic profile of cannabidiol (CBD), cannabidivarin (CBDV), Δ 9-tetrahydrocannabivarin (THCV) and cannabigerol (CBG) in rats and mice following oral and intraperitoneal administration and CBD action on obsessive–compulsive behaviour. *Psychopharmacology*, 219(3), 859-873, 2012.

- Denys D., et al. Association between the dopamine D2 receptor TaqI A2 allele and low activity COMT allele with obsessive-compulsive disorder in males. *European Neuropsychopharmacology*, 16(6), 446-450, 2006.
- Devall AJ., et al. Hyperalgesia in the setting of anxiety: sex differences and effects of the oestrous cycle in Wistar rats. *Psychoneuroendocrinology*, 34(4):587-96, 2009.
- Devall AJ., et al. Elevation of brain allopregnanolone rather than 5-HT release by short term, low dose fluoxetine treatment prevents the estrous cycle-linked increase in stress sensitivity in female rats. *European Neuropsychopharmacology: The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, 25(1):113-123, 2015.
- Devane WA., et al. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Molecular Pharmacology*, 34(5):605-613, 1988.
- Devane WA., et al. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*, 258(5090):1946-1949, 1992.
- Dinh TP., et al. Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(16):10819-10824, 2002.
- Diniz JB., et al. Outlining new frontiers for the comprehension of obsessive-compulsive disorder: a review of its relationship with fear and anxiety. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 34(Supl1):S81-S103, 2012.
- Ellen P., et al. Hippocampal lesions and spontaneous alternation behavior in the rat. *Physiology and Behavior*, 3(6), 857-860, 1968.
- Fabris D., et al. *Efeitos do canabidiol nas respostas defensivas de ratos considerando a influência do sexo e das fases do ciclo estral em fêmeas*. Relatório de Iniciação Científica CNPq, 2017.
- Fattore L., et al. How important are sex differences in cannabinoid action? *British Journal of Pharmacology*, 160(3):544-548, 2010.
- Fattore L., et al. Cannabinoid self-administration in rats: sex differences and the influence of ovarian function. *British Journal of Pharmacology*, 52:5, 795-804, 2007.
- Fernandes PA., et al. Alterações Neurobiológicas Verificadas a partir do Tratamento com Terapia Cognitivo-comportamental no Transtorno Obsessivo-Compulsivo. *Psicologia: Teoria e Pesquisa*, 32(2), 2016.

- Fineberg NA., et al. Evidence-based pharmacotherapy of obsessive-compulsive disorder. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 8:107-129, 2005.
- Fineberg NA., et al. Translational approaches to obsessive-compulsive disorder: from animal models to clinical treatment. *British journal of pharmacology*, 164(4), 1044-1061, 2011.
- Flament MF, et al. Pharmacologic treatment of obsessive-compulsive disorder: comparative studies. *The Journal of Clinical Psychiatry*, 58 (Suppl 12):18-22, 1997.
- Freire R., et al. Neurostimulation in Anxiety Disorders, Post-traumatic Stress Disorder, and Obsessive-Compulsive Disorder. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1191:331-346, 2020.
- Genaro K., et al. Cannabidiol is a potential therapeutic for the affective-motivational dimension of incision pain in rats. *Frontiers in pharmacology*, 8:1-12, 2017.
- Gomes FV., et al. Facilitation of CB1 receptor-mediated neurotransmission decreases marble burying behavior in mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 35(2), 434-438, 2011.
- Ghaziuddin N., et al. Central serotonergic effects of m-chlorophenylpiperazine (mCPP) among normal control adolescents. *Neuropsychopharmacology*, 28:133-139, 2003.
- Gomes FV., et al. Facilitation of CB1 receptor-mediated neurotransmission decreases marble burying behavior in mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 35(2), 434-438, 2011.
- Gong F., et al. The Suitability of Different Subtypes and Dimensions of Obsessive-Compulsive Disorder for Treatment with Anterior Capsulotomy: A Long-Term Follow-Up Study. *Stereotactic and Functional Neurosurgery*, 1-18, 2019.
- Graf M. 5-HT_{2c} receptor activation induces grooming behaviour in rats: possible correlations with obsessive-compulsive disorder. *Neuropsychopharmacol Hung.* 8, 23-28, 2006.
- Graeff FG., et al. Animal models of anxiety disorders. In: D'haenen, H. et al. *Biological Psychiatry*. John Wiley & Sons: London, 879-893, 2002.
- Griffiths JL et al. GABAergic neurones in the rat peri-aqueductal grey matter express alpha4, beta1 and delta GABA_A receptor subunits: Plasticity of expression during the estrous cycle. *Neuroscience*, 136: 457-466, 2005.

- Guglielmi V., et al. Obsessive–compulsive disorder and female reproductive cycle events: Results from the OCD and reproduction collaborative study. *Depression and anxiety*, 31(12), 979-987, 2014.
- Guimarães FS., et al. Antianxiety effect of cannabidiol in the elevated plus-maze. *Psychopharmacology*, 100(4), 558-559, 1990.
- 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*, 94:109637, 2019.
- Hoexter MQ., et al. Orbitofrontal thickness as a measure for treatment response prediction in obsessive–compulsive disorder. *Depression Anxiety* 32(12):900–908, 2015.
- Howlett AC. The cannabinoid receptors. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, (68-69):35, 619-631, 2002.
- 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* confrontation paradigm. *Neuropsychopharmacology*, 37(2):412-421, 2012.
- Joel D. Current animal models of obsessive compulsive disorder: a critical review. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 30:374-388, 2006.
- Kalueff AV., et al. Analyzing grooming microstructure in neurobehavioral experiments. *Nature Protocols*, 2: 2538–2544, 2007.
- Kalueff AV., et al. Neurobiology of rodent self-grooming and its value for translational neuroscience. *Nature Reviews Neuroscience*, 17(1), 45, 2016.
- Katzman MA., et al. Canadian clinical practice guidelines for the management of anxiety, posttraumatic stress and obsessive-compulsive disorders. *BMC Psychiatry*, 14(Suppl 1):S, 1-83, 2014.
- Karniol IG., et al. Cannabidiol interferes with the effects of delta 9 - tetrahydrocannabinol in man. *European Journal of Pharmacology*, 28(1), 172- 177, 1974.
- Kawaoku VM. *Efeitos da meta-clorofenilpiperazina (mCPP) na indução de comportamentos “tipo-compulsivo” em ratos avaliados no teste do campo aberto*. Monografia (Graduação em Psicologia) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2017.

- Kinrys G., et al. Anxiety disorders in women: does gender matter to treatment? *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 2:43-50, 2005.
- Korff S., et al. Animal models of obsessive-compulsive disorder: rationale to understanding psychobiology and pharmacology. *Psychiatric Clinics*, 29(2), 371-390, 2006.
- Kuehner C. Why is depression more common among women than among men? *Lancet Psychiatry*, 2016.
- Kreiss DS., et al. Ritualistic chewing behavior induced by mCPP in the rat is an animal model of obsessive compulsive disorder. *Pharmacology Biochemistry Behavior* 104, 119-124, 2013.
- Labad J., et al. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in the comorbidity between obsessive-compulsive disorder and major depression. *Psychoneuroendocrinology*, 93, 20-28, 2018.
- Lalonde, R. The neurobiological basis of spontaneous alternation. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 26(1), 91-104, 2002.
- Lavallé L., et al. Review of source-monitoring processes in obsessive-compulsive disorder. *World Journal of Psychiatry*, 10(2), 12, 2020.
- Leweke FM., et al. Cannabis and psychiatric disorders: it is not only addiction. *Addiction Biology*, 13(2), 264-275, 2008.
- Lopez AD., et al. The global burden of disease, 1990-2020. *Nature Medicine*, 4(11):1241-3, 1998.
- Lopes AC., et al. Treatment of Resistant Obsessive-Compulsive Disorder with Ventral Capsular/Ventral Striatal Gamma Capsulotomy: A Pilot Prospective Study. *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*, 21(4):381-392, 2009.
- Lovick TD. Sex determinants of experimental panic attacks. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 46(3):465-471, 2014.
- Machado Figueiredo R., et al. Short-term, low-dose fluoxetine prevents estrous cycle-linked increase in anxiety-like behaviour in female rats. *Journal of Psychopharmacology*, 33(5):548-557, 2019.
- Marroni SS., et al. Neuroanatomical and cellular substrates of hypergrooming induced by microinjection of oxytocin in central nucleus of amygdala, an experimental model of compulsive behavior. *Molecular psychiatry*, 12(12), 1103-1117, 2007.
- Mechoulam R., et al. Hashish. I. The structure of cannabidiol. *Tetrahedron*, 19(12):2073-8, 1963.

- Mechoulam R., et al. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochemical Pharmacology*, 50(1):83–90, 1995.
- Mechoulam, R. Endocannabinoids and psychiatric disorders: the road ahead. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 32:1-2, 2010.
- Mechoulam R., et al. Early phytocannabinoid chemistry to endocannabinoids and beyond. *Nature Reviews Neuroscience*, 15:757–764, 2014.
- McHugh RK., et al. Sex and gender differences in substance use disorders. *Clinical Psychology Review*, 66:12-23, 2018.
- Montgomery S., et al. A double-blind, placebo-controlled study of fluoxetine in patients with DSM- III-R obsessive-compulsive disorder. The Lilly European OCD Study Group. *European Neuropsychopharmacology*, 3(2):143-52, 1993.
- Munro R., et al. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, 365(6441):61-65, 1993.
- Montgomery S., et al. Citalopram 20 mg, 40 mg and 60 mg are all effective and well tolerated compared with placebo in obsessive-compulsive disorder. *International Clinical Psychopharmacology*, 16(2):75-86, 2001.
- Murphy M., et al. Chronic adolescent Δ 9-tetrahydrocannabinol treatment of male mice leads to long-term cognitive and behavioral dysfunction, which are prevented by concurrent cannabidiol treatment. *Cannabis and Cannabinoid Research*, 2(1), 235-246, 2017.
- Nakao T., et al Neurobiological model of obsessive– compulsive disorder: evidence from recent neuropsychological and neuroimaging findings. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, 68:587–605, 2014.
- Nardo M., et al. Cannabidiol reverses the mCPP-induced increase in marble-burying behavior. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 28(5):544-550, 2013.
- Njung'e K., et al. Evaluation of marble-burying behavior as a model of anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 38:63–67, 1991.
- Onaivi ES., et al. Pharmacological characterization of cannabinoids in the elevated plus maze. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 253(3), 1002-1009, 1990.
- Pellow S. et al. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 14, 149-167, 1985.

- Piomelli, D. The molecular logic of endocannabinoid signaling. *Nature Reviews Neuroscience*, 4(11):873-884, 2003.
- Pizarro M., et al. An updated review of antidepressants with marked serotonergic effects in obsessive-compulsive disorder. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 15:1391-401, 2014.
- Ravindran A., et al. Functional connectivity in obsessive-compulsive disorder and its subtypes. *Psychological medicine*, 1-9, 2019.
- Reimer AE., et al. Rats with differential self-grooming expression in the elevated plus-maze do not differ in anxiety-related behaviors. *Behavioural Brain Research*, 292:370–380, 2015.
- Reimer AE., et al. Fear extinction in an obsessive-compulsive disorder animal model: Influence of sex and estrous cycle. *Neuropharmacology*, 131, 104-115, 2018.
- Resstel LB., et al. 5-HT1A receptors are involved in the cannabidiol-induced attenuation of behavioural and cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. *British Journal of Pharmacology*, 156(1), 181-188, 2009.
- Riebe CJ., et al. Estrogenic regulation of limbic cannabinoid receptor binding. *Psychoneuroendocrinology*, 35(8):1265–1269, 2010.
- Riecher-Rössler A. Sex and gender differences in mental disorders. *The Lancet Psychiatry*, 4(1), 8–9, 2017.
- Rodgers J. Animal models of ‘anxiety’: where next? *Behavior Pharmacology*, 8: 477–496, 1997.
- Rosa AC., et al. Clinical correlates of social adjustment in patients with obsessive-compulsive disorder. *Journal of Psychiatric Research*, (46)1286-1292, 2012.
- Ruscio A., et al. The epidemiology of obsessive-compulsive disorder in the National Comorbidity Survey Replication. *Molecular Psychiatry*, 15:53-63, 2010.
- Rubino T., et al. Sexually dimorphic effects of cannabinoid compounds on emotion and cognition. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 28(5):1-5, 2011.
- Russo, E et al. A tale of two cannabinoids: the therapeutic rationale for combining tetrahydrocannabinol and cannabidiol. *Medical Hypotheses*, 66(2), 234-246, 2006.
- Russo EB., et al. Agonistic properties of cannabidiol at 5-HT1a receptors. *Neurochemical Research*, 30(8):1037–1043, 2005.
- Sakai Y., et al. Corticostriatal functional connectivity in non-medicated patients with obsessive-compulsive disorder. *European Psychiatry*, 26: 463–469, 2011.

- Sachs BD. The development of grooming and its expression in adult animals. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 525:17, 1988.
- Scholl JL., et al. Sex differences in anxiety-like behaviors in rats. *Physiology and Behavior*, 211, 112670, 2019.
- Shannahoff-Khalsa DS., et al. Clinical case report: efficacy of yogic techniques in the treatment of obsessive compulsive disorders. *International Journal of Neuroscience*, 85:1–17, 1996.
- Shannahoff-Khalsa DS., et al. Kundalini Yoga Meditation Versus the Relaxation Response Meditation for Treating Adults with Obsessive- Compulsive Disorder: A Randomized Clinical Trial. *Frontiers in Psychiatry*, 10:793, 2019.
- Shin NY., et al. Cognitive functioning in obsessive-compulsive disorder: a meta-analysis. *Psychological Medicine*, 44(6), 1121-1130, 2014.
- Skapinakis P., et al. Pharmacological and psychotherapeutic interventions for management of obsessive-compulsive disorder in adults: A systematic review and network meta-analysis. *Lancet Psychiatry*, 3:730–9, 2016.
- Silote GP., et al. Emerging evidence for the antidepressant effect of cannabidiol and the underlying molecular mechanisms. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 2019.
- Soares-Rachetti V., et al. Short term, low dose fluoxetine blocks estrous cycle-linked changes in responsiveness to diazepam in female rats. *Journal of Psychopharmacology*, 30:10, 1062-1068, 2016.
- Somers JM., et al. Prevalence and Incidence Studies of Anxiety Disorders: A Systematic Review of the Literature. *The Canadian Journal of Psychiatry*, 51(2):100-113, 2006.
- Sugiura T., et al. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 45(5):405-446, 1995.
- Spornitz UM., et al. Estrous stage determination in rats by means of scanning electron microscopic images of uterine surface epithelium. *The Anatomical Record*, 54(1):116-26, 1999.
- Spruijt BM., et al. Ethology and neurobiology of grooming behavior. *Physiological Reviews*, 72(3), 825-852, 1982.
- Stein DJ., et al. Behavioral disorders in veterinary practice: relevance to psychiatry. *Comprehensive Psychiatry*, 35(4), 275-285, 1994.

- Stein DJ. Psychobiology of anxiety disorders and obsessive-compulsive spectrum disorders. *CNS Spectrums*, 13.S14:23-28, 2008.
- Storch EA., et al. Psychotherapy for obsessive-compulsive disorder. *Current psychiatry reports*, 11(4), 296-301, 2009.
- Subira M., et al. Structural covariance of neostriatal and limbic regions in patients with obsessive compulsive disorder. *Journal of Psychiatry & Neuroscience JPN*, 41(2):115–123, 2016.
- Sundström-Poromaa, I. The menstrual cycle influences emotion but has limited effect on cognitive function. *Vitamins and Hormones*, 107: 349–376, 2018.
- Taguchi LM. *Relações entre autolimpeza induzida por metaclorofenilpiperazina (mCPP) e os comportamentos de alternância espontânea e checagem compulsiva em ratos*. Monografia (Graduação em Psicologia) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2018.
- Thamby A., et al. Antipsychotic augmentation in the treatment of obsessive-compulsive disorder. *Indian Journal of Psychiatry*, 61(Suppl 1):S51-S57, 2019.
- Thomas BF., et al. Comparative Receptor Binding Analyses of Cannabinoid Agonists and Antagonists. *Journal of Pharmacology Experimental Therapeutics*, 285(1) 285-92, 1998.
- Thomas A., et al. Cannabidiol displays unexpectedly high potency as an antagonist of CB1 and CB2 receptor agonists in vitro. *British Journal Pharmacology*, 150(5):613–623, 2007.
- Thomas A., et al. Marble burying reflects a repetitive and perseverative behavior more than novelty-induced anxiety. *Psychopharmacology*, 204(2):361-73, 2009.
- Todd AR. Hashish. *Experientia* 2, 55–60, 1946.
- Torres AR., et al. Epidemiology of obsessive-compulsive disorder: a review. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 27, 237-242, 2005.
- Torres AR., et al. Epidemiology, comorbidity, and burden of OCD. In: Pittenger, C. (Ed.), *Obsessive-Compulsive Disorder: Phenomenology, Pathophysiology, and Treatment*. Oxford University Press, Oxford, UK, 2017.
- Torresan RC., et al. Sex differences in the phenotypic expression of obsessive-compulsive disorder: an exploratory study from Brazil. *Comprehensive Psychiatry*, 50, 63-69 2009.

- Torresan RC., et al. Symptom dimensions, clinical course and comorbidity in men and women with obsessive-compulsive disorder. *Psychiatry Research*, 209:186-195, 2013.
- Treit DJPJ., et al. Conditioned defensive burying: a new paradigm for the study of anxiolytic agents. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 15(4):619-26, 1981.
- Tsaltas E., et al. Reinforced spatial alternation as an animal model of obsessive-compulsive disorder (OCD): investigation of 5-HT_{2C} and 5-HT_{1D} receptor involvement in OCD pathophysiology. *Biological Psychiatry*, 57(10), 1176-1185, 2005.
- Tyler MW., et al. Classics in chemical neuroscience: haloperidol. *ACS Chemical Neuroscience*, 8(3), 444-453, 2017.
- Van Ameringen M., et al. Pharmacological treatment strategies in obsessive compulsive disorder: A cross-sectional view in nine international OCD centers. *Journal of Psychopharmacology*, 28:596–602, 2014.
- Veith L. Acral lick dermatitis in the dog. *Canine Practice*, (13):15-22, 1986.
- Vicheva P., et al. Deep brain stimulation for obsessive-compulsive disorder: A systematic review of randomised controlled trials. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 109, 129–138, 2020.
- Vulink NC., et al. Female hormones affect symptom severity in obsessive–compulsive disorder. *International Clinical Psychopharmacology*, 21(3), 171-175, 2006.
- Wall PM., et al. Methodological and conceptual issues in the use of the elevated plus-maze as a psychological measurement instrument of animal anxiety like behavior. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 25:3, 275-286, 2001.
- Widge A.S., et al. Deep brain stimulation of the internal capsule enhances human cognitive control and prefrontal cortex function. *Nature communications*, 10(1), 1-11, 2019
- Wittchen HU., et al. The size and burden of mental disorders and other disorders of the brain in Europe 2010. *European Neuropsychopharmacology*, 21: 655–79, 2011.
- Witkin JM. Animal models of obsessive-compulsive disorder. *Current Protocols in Neuroscience*, 9:30, 1-9, 2008.
- Yadin E., et al. Spontaneous alternation behavior: an animal model for obsessive-compulsive disorder? *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 40(2):311-5, 1991.

- Zhang T., et al. Abnormal small-world architecture of top-down control networks in obsessive-compulsive disorder. *Journal of Psychiatry & Neuroscience: JPN*, 36(1), 23, 2011.
- Zohar J., et al. Serotonergic responsivity in obsessive-compulsive disorder. Comparison of patients and healthy controls. *Archives of General Psychiatry*, 44: 946-951, 1987.
- Zuardi AW. Action of cannabidiol on the anxiety and other effects produced by delta 9-THC in normal subjects. *Psychopharmacology*, 245-50, 1982.
- Zuardi AW. Cannabidiol: from an inactive cannabinoid to a drug with wide spectrum of action. *Brazilian Journal of Psychiatry*, 30(3), 271-278, 2008.

ANEXO A – Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais da UFSCar

Pró Reitoria
Pesquisa

Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "EFEITOS DO CANNABIDIOL SOBRE COMPORTAMENTOS [TIPO COMPULSIVO] EM RATOS: INFLUÊNCIAS DO SEXO E DO CICLO ESTRAL", protocolada sob o CEUA nº 5812011217, sob a responsabilidade de **Amanda Ribeiro de Oliveira** e equipe; *Débora Fabris* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (CEUA/UFSCAR) na reunião de 20/02/2018.

We certify that the proposal "CANNABIDIOL EFFECTS ON COMPULSIVE-LIKE BEHAVIORS IN RATS: INFLUENCES OF SEX AND ESTRAL CYCLE", utilizing 360 Heterogenics rats (120 males and 240 females), protocol number CEUA 5812011217, under the responsibility of **Amanda Ribeiro de Oliveira and team; Débora Fabris** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of São Carlos (CEUA/UFSCAR) in the meeting of 02/20/2018.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [01/2018](#) a [07/2020](#) Área: [Psicologia](#)

Origem:	Biotério Central da UFSCar	sexo:	Machos	idade:	60 a 90 dias	N:	120
Espécie:	Ratos heterogênicos			Peso:	260 a 320 g		
Linhagem:	Wistar						
Origem:	Biotério Central da UFSCar	sexo:	Fêmeas	idade:	60 a 90 dias	N:	240
Espécie:	Ratos heterogênicos			Peso:	260 a 320 g		
Linhagem:	Wistar						

Resumo: O Transtorno Obsessivo-Compulsivo (TOC) é uma psicopatologia severa e crônica caracterizada por pensamentos intrusivos (obsessões) e ações ritualísticas (compulsões) que consomem tempo e causam sofrimento significativo. De modo particular, apesar da retirada do TOC do capítulo referente a Transtornos de Ansiedade na última revisão do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, a ansiedade desempenha um papel importante nessa psicopatologia. A neurobiologia do TOC e de outros transtornos de ansiedade não é totalmente compreendida, e importantes diferenças em termos de prevalência, severidade e sintomatologia existem entre homens e mulheres. Além disso, do ponto de vista clínico, uma porcentagem significativa dos pacientes é resistente ao tratamento. Pesquisas sobre o comportamento defensivo em roedores têm contribuído positivamente para o entendimento das bases neurais subjacentes aos transtornos emocionais relacionados ao medo/ansiedade. Nesse sentido, alguns modelos animais que relacionam determinados comportamentos defensivos e compulsivos ao TOC têm se mostrado de grande utilidade. Paralelamente, pesquisas recentes demonstram o potencial uso terapêutico de um composto canabinoide não psicotrópico, o canabidiol (CBD) na ansiedade. A partir disso, o presente estudo tem como objetivo avaliar os efeitos do canabidiol sobre comportamentos [tipo compulsivo] em ratos, considerando influências do sexo e das fases do ciclo estral em fêmeas. As respostas comportamentais serão analisadas no teste do campo aberto, testes de enterrar esferas e de trituração para ninho e no teste de alternância espontânea. É esperado que os resultados obtidos possam contribuir para a identificação de novos fármacos que atendam melhor aos sintomas presentes no TOC.

Local do experimento: Laboratório de Psicologia da Aprendizagem (LPA) do DPsi UFSCar

São Carlos, 20 de fevereiro de 2018