

UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL

CAMPUS CHAPECÓ

CURSO DE MEDICINA

JESIEL DE MEDEIROS

PEDRO PAVAN

**EFEITO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM ÓLEO DE ESPECTRO COMPLETO
DE *CANNABIS SATIVA* SOBRE COMPORTAMENTO TIPO DEPRESSIVO E O
SISTEMA PURINÉRGICO EM RATOS SUBMETIDOS AO ESTRESSE NO INÍCIO
DA VIDA.**

CHAPECÓ

2024

JESIEL DE MEDEIROS

PEDRO PAVAN

**EFEITO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM ÓLEO DE ESPECTRO COMPLETO
DE *CANNABIS SATIVA* SOBRE COMPORTAMENTO TIPO DEPRESSIVO E O
SISTEMA PURINÉRGICO EM RATOS SUBMETIDOS AO ESTRESSE NO INÍCIO
DA VIDA.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Medicina da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), como requisito para obtenção do título de Bacharel em Medicina.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Zuleide Maria Ignácio

Coorientadora: Prof.^a Brunna Varela da Silva

**CHAPECÓ
2024**

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

, Jesiel de Medeiros

EFEITO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM ÓLEO DE ESPECTRO COMPLETO DE CANNABIS SATIVA SOBRE COMPORTAMENTO TIPO DEPRESSIVO E O SISTEMA PURINÉRGICO EM RATOS SUBMETIDOS AO ESTRESSE NO INÍCIO DA VIDA / Jesiel de Medeiros , Pedro Pavan. -- 2024.

40 f.:il.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Zuleide Maria Ignácio
Co-orientadora: Prof.^a Brunna Varela da Silva
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de
Bacharelado em Medicina, Chapecó, SC, 2024.

1. Depressão. 2. Sistema Purinérgico. 3. Cannabis sativa. I. Pavan, Pedro II. Ignácio, Zuleide Maria, orient. III. , Brunna Varela da Silva, co-orient. IV. Universidade Federal da Fronteira Sul. V. Título.

JESIEL DE MEDEIROS

PEDRO PAVAN

**EFEITO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM ÓLEO DE ESPECTRO COMPLETO
DE *CANNABIS SATIVA* SOBRE COMPORTAMENTO TIPO DEPRESSIVO E O
SISTEMA PURINÉRGICO EM RATOS SUBMETIDOS AO ESTRESSE NO INÍCIO
DA VIDA.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de
Medicina da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS),
como requisito para obtenção de título de Bacharel em
Medicina.

Este trabalho de conclusão foi defendido e aprovado pela banca em: 26/06/2024

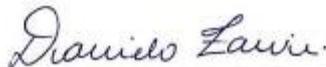
BANCA EXAMINADORA



Prof.ª Dr.ª Zuleide Maria Ignácio - UFFS
Orientadora



Prof.ª Brunna Varela da Silva - UFFS
Coorientadora



Prof.ª Dr.ª Daniela Zanini - UFFS
Avaliadora



Prof.ª Dr.ª Margarete Dulce Bagatini - UFFS
Avaliadora

RESUMO

A depressão é uma doença multifatorial, que pode estar relacionada ao acontecimento de episódios de estresse em fases iniciais da vida. Sob essa perspectiva, há o desenvolvimento de uma indiferença em relação a atividades consideradas objetivamente prazerosas, caracterizando um sintoma depressivo denominado anedonia. Além disso, indivíduos depressivos podem apresentar um quadro contínuo de irritabilidade e perda cognitiva em longo prazo. No mais, tratamentos convencionais para a depressão não são totalmente resolutivos em muitos casos. Para tanto, o presente estudo visou analisar o potencial terapêutico do óleo de espectro completo de *Cannabis sativa* (óleo EC *C. sativa*) em ratos submetidos à privação maternal (PM) e ao isolamento social (IS), além de verificar os efeitos no sistema purinérgico em células mononucleares do sangue periférico (PBMC), correlacionando-os com possíveis incrementos de inflamação no organismo dos ratos. Foram utilizados quarenta ratos *Wistar* machos no experimento, sendo que trinta foram submetidos a dez dias de PM nos primeiros dias de vida e ao IS a partir do quinquagésimo dia e dez compõem o grupo controle. Entre os trinta ratos submetidos aos protocolos de estresse, dez ratos foram submetidos ao tratamento com escitalopram na dosagem de 10mg/Kg; dez ratos foram submetidos ao tratamento com óleo de espectro EC *C. sativa* na dosagem de 1mg/Kg. Os ratos do grupo controle foram submetidos ao uso de salina. Após doze dias de tratamento farmacológico e de salina, os ratos foram submetidos ao teste de campo aberto (TCA), e após quatorze dias de tratamento foram submetidos ao teste de natação forçada (TNF). Após o último teste comportamental foi realizada eutanásia humanizada desses ratos e a coleta imediata de sangue e tecidos para a análise. Os resultados do TNF evidenciaram que, entre os grupos submetidos à PM e ao IS, o grupo tratado com óleo EC *C. sativa*, permaneceu menos tempo imóvel em comparação ao grupo estresse salina. Dessa forma, evidenciamos um potencial terapêutico no tratamento de sintomas tipo depressivo. Além disso, o grupo tratado com o óleo apresentou maior hidrólise dos biomarcadores do sistema purinérgico ATP, ADP e AMP, em comparação a todos os outros grupos. Estes resultados sugerem uma maior atividade das ectonucleotidases CD39 e CD73, tendo repercussões fisiológicas na ativação de receptores purinérgicos. Os resultados sugerem que o óleo EC *C. sativa* exerce efeito tipo antidepressivo. Um dos possíveis mecanismos biológicos, nos quais o óleo EC *C. sativa* é nos marcadores purinérgicos no meio extracelular, causando maior hidrólise dos mesmos. Dessa forma, fitofármacos da *Cannabis sativa* podem ser uma potencial forma de uso terapêutico.

Palavras-chave: Depressão; *Cannabis sativa*; Sinalização Purinérgica, Privação Maternal; Isolamento Social

ABSTRACT

Depression is a multifactorial disease that can be related to the occurrence of stressful episodes in early life stages. From this perspective, there is the development of indifference towards activities considered objectively pleasurable, characterizing a depressive symptom called anhedonia. Additionally, depressive individuals may present a continuous state of irritability and long-term cognitive loss. Moreover, conventional treatments for depression are not completely effective in many cases. Therefore, this study aimed to analyze the therapeutic potential of full-spectrum *Cannabis sativa* oil (EC *C. sativa*) in rats subjected to maternal deprivation (PM) and social isolation (IS), as well as to investigate its effects on the purinergic system in peripheral blood mononuclear cells (PBMC), correlating them with possible increases in inflammation in the rats' bodies. Forty male Wistar rats were used in the experiment, thirty of which were subjected to ten days of PM in the early days of life and IS from the fiftieth day, while ten comprised the control group. Among the thirty rats subjected to stress protocols, ten rats received escitalopram treatment at a dosage of 10mg/Kg; ten rats received treatment with EC *C. sativa* oil at a dosage of 1mg/Kg. The control group rats received saline. After twelve days of pharmacological and saline treatment, the rats were subjected to the open field test (TCA), and after fourteen days of treatment, they were subjected to the forced swim test (TNF). After the last behavioral test, humane euthanasia was performed on these rats, followed by immediate blood and tissue collection for analysis. The FST results showed that, among the groups subjected to PM and IS, the group treated with EC *C. sativa* oil spent less time immobile compared to the stress-saline group. Thus, we evidenced a therapeutic potential in treating depression-like symptoms. Additionally, the group treated with the oil showed higher hydrolysis of the purinergic system biomarkers ATP, ADP, and AMP compared to all other groups. These results suggest increased activity of the ectonucleotidases CD39 and CD73, having physiological repercussions on purinergic receptor activation. The results suggest that EC *C. sativa* oil exerts an antidepressant-like effect. One of the possible biological mechanisms in which EC *C. sativa* oil acts is on purinergic markers in the extracellular medium, causing their greater hydrolysis. Therefore, *Cannabis sativa* phytopharmaceuticals may be a potential form of therapeutic use.

Keywords: Depression; Cannabis sativa; Purinergic Signaling; Maternal Deprivation; Social Isolation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Desenho Experimental.....	16
Figura 2 - Teste de Natação Forçada.....	21
Figura 3 - Teste de Campo Aberto.....	22
Figura 4 - Quantificação de ATP Extracelular – Plasma.....	23
Figura 5 - Hidrólise de ATP, ADP e AMP – PBMC.....	24

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAACMB	Associação Alternativa de Apoio à Cannabis Medicinal do Brasil
ADP	Adenosina Difosfato
AMP	Adenosina Monofosfato
ATP	Adenosina Trifosfato
CBD	Canabidiol
CEUA	Comitê de Ética de Uso de Animais
CNPJ	Cadastro Nacional de Pessoa Jurídica
DAMP	Padrões Moleculares Associado a Danos
E5NT/CD73	Ecto-5'-Nucleotidase
HHA	Hipotálamo-Hipófise-Adrenal
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IL-1 β	Interleucina beta 1
IS	Isolamento Social
ISRS	Inibidores Seletivo de Recaptação de Serotonina
ISRSN	Inibidores Seletivo de Recaptação de Serotonina e Noradrenalina
KH ₂ PO ₄	Fosfato monopotássico
KO	<i>Knockout</i>
Óleo EC <i>C. sativa</i>	Óleo de espectro completo de <i>Cannabis sativa</i>
N	número
NaCl	Cloreto de Sódio
nM	nanomolar
NPP1	Ectonucleotídeo Pirofosfatase/Fosfodiesterase 1
NTPDase1/CD39	Ectonucleosídeo Trifosfato difosfohidrolase-1
mg	miligrama
ml	mililitro
PBMC	Células Mononucleares do Sangue Periférico
PM	Privação Materna
SEC	Sistema Endocanabinoide
TCA	Teste de Campo Aberto
TDM	Transtorno Depressivo Maior

THC	Δ -9-Tetrahydrocannabinol
TNF	Teste de Natação Forçada
UFFS	Universidade Federal da Fronteira Sul
WHO	World Health Organization
μ L	microlitro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. MATERIAIS E MÉTODOS	12
2.1 ASPECTOS ÉTICOS	12
2.2. MATERIAIS, EQUIPAMENTOS E SOLVENTES	12
2.2.1. Quantificação Extracelular do ATP	13
2.2.2. Normalização das Proteínas	13
2.2.3 Atividades de Enzimas E-NTPDase1 (CD39) e E-5'-NT (CD73).....	13
2.3. DESENVOLVIMENTO DOS MÉTODOS	14
2.4. OBTENÇÃO E PROCESSAMENTO DA <i>CANNABIS SATIVA</i>	14
2.5. ANÁLISE QUÍMICA	15
2.5.1. Estimativa do Teor Total dos Canabinóides	15
2.6. AQUISIÇÃO DO COMPOSTO OXALATO DE ESCITALOPRAM	15
2.7. GRUPOS EXPERIMENTAIS E TRATAMENTOS.....	15
2.7.1 Protocolo de Privação Materna (PM)	17
2.7.2 Protocolo de Isolamento Social (IS)	17
2.8. TESTES COMPORTAMENTAIS	18
2.8.1 Teste de Campo Aberto (TCA)	18
2.8.2 Teste de Natação Forçada (TNF)	19
2.9 COLETA TOTAL DE SANGUE.....	19
2.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	20
3.RESULTADOS	21
3.1 EFEITOS DA PM, DO IS E DOS TRATAMENTOS NO TESTE DE NATAÇÃO FORÇADA	21
3.2 EFEITOS DA PM E DOS TRATAMENTOS NO TCA	22
3.3 QUANTIFICAÇÃO DE ATP EXTRACELULAR.....	22
3.4 - HIDRÓLISE DE ATP, ADP e AMP - PBMC	23
4.DISSCUSSÃO	25
5.CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO	30
REFERÊNCIAS	31
APÊNDICE A – Carta de Aprovação pela CEUA da UFFS	36

1. INTRODUÇÃO

O transtorno depressivo maior (TDM) constitui uma das afecções de ordem psiquiátrica mais prevalentes globalmente. Uma estimativa da Organização Mundial da Saúde afirma que cerca de 5% da população adulta vive com depressão (WHO, 2023). De acordo com a quinta edição do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-5), o TDM cursa, principalmente, com humor deprimido e perda de interesse em atividades previamente prazerosas - denominada anedonia -, podendo também haver alterações do ciclo circadiano e sentimento subjetivo de inutilidade. Ménard, Hodes e Russo (2016), dissertam sobre a patogênese da depressão, pontuando que eventos traumáticos na infância como abuso ou negligência, aumentam significativamente o risco de desenvolvimento de transtornos de humor na vida adulta. Os roedores de laboratório se apresentam como uma ótima via de estudo, em razão da diversidade de métodos de indução de comportamentos tipo depressivos, conforme relatado por Hao et al (2019). Em vista disso, aplicamos protocolos de indução em roedores que podem suscitar comportamento tipo depressivo, ocasionado por uma série de carências, como a privação maternas (PM) (ABELAIRA; REUS; QUEVEDO, 2013).

Existe uma gama de medicamentos com capacidade antidepressiva, incluindo várias classes farmacológicas relacionadas a distintos neurotransmissores, porém ainda temos 30% da população com essa doença psiquiátrica sem remissão (RUSH et al., 2006). Nesse contexto, a busca por fármacos ou fitofármacos com maior efetividade é de suma importância. Assim, o óleo de espectro completo de *Cannabis sativa* (Óleo EC *C. sativa*), está sendo investigado como um potencial terapêutico no TDM (SCHERMA et al., 2020). Neste estudo, os ratos com comportamentos tipo depressivos foram tratados com Óleo EC *C. sativa*, objetivando a reversão de possíveis comportamentos tipo depressivos induzidos pelo estresse na infância e na vida adulta jovem. O uso do Óleo EC *C. sativa* propicia a ativação de receptores do sistema endocanabinoide (SEC), que são compostos por receptores, endocanabinoides, canabinoides exógenos e enzimas moduladoras que interferem na síntese e na quebra de sinalizadores (SVIZENSKA; DUBOVY; SULCOVA, 2008). Os receptores do SEC são divididos em C1 e C2 e estão presentes em diversos sistemas dos mamíferos, principalmente no sistema nervoso central (SNC) (LU; MACKIE, 2020). Os compostos do Óleo EC *C. sativa*, que atuam na ativação de receptores endocanabinóides, são o Δ -9-tetrahydrocannabinol (THC) e o canabidiol (CBD), sendo este agonista parcial com baixa afinidade de ligação do sistema endocanabinoide (BRUNT; BOSSONG, 2020). A ativação dos receptores C1 e C2 propicia, respectivamente,

inibição de liberação de transmissores e o estímulo à liberação de citocinas (PERTWEE, 2006).

Para avaliação dos efeitos terapêuticos do Óleo EC *C. sativa* em roedores, foram quantificados e analisados sinalizadores do sistema purinérgico no sangue periférico de ratos, com a finalidade de observar as possíveis respostas da ativação dos receptores dessa via. O sistema purinérgico é composto, basicamente, por sinalizadores, receptores e enzimas extracelulares, as quais, por meio da degradação do nucleotídeo adenosina trifosfato (ATP), são capazes de interferir nas concentrações das purinas (BURNSTOCK, 2020). A hipótese de que moléculas com função primordial de suprimento energético celular, como o ATP, também serviriam como agonistas de receptores próprios, foi proposta, inicialmente, por Geoffrey Burnstock, no ano de 1972 (BURNSTOCK, 2012). O autor nomeou esse fenômeno como “sinalização purinérgica”, baseando-se na natureza estrutural do ATP (BURNSTOCK, 2012). Desde seu descobrimento, inúmeros mecanismos de sinalização purinérgica têm sido observados e estudados em uma miríade de pesquisas, com o intuito de elucidar resultados da ativação de receptores purinérgicos, tanto em sítios inflamatórios, quanto em situações patológicas que suscitem dano tecidual e, por consequência, maior liberação de partículas como o ATP, para o meio extracelular (BURNSTOCK; BOEYNAEMS, 2014).

Zimmermann (2021) aborda que os sinalizadores do sistema purinérgico são transportados ao meio extracelular em situações de estresse celular. Os produtos das quebras de ligações do ATP são a adenosina difosfato (ADP), a adenosina monofosfato (AMP) e a adenosina (CARDOSO et al., 2021). Níveis elevados dessas substâncias no meio extracelular podem culminar em respostas desproporcionais, dependendo das concentrações extracelulares de ATP, ADP e adenosina, bem como da expressão de seus respectivos receptores nas células circundantes ao evento (ELTZSCHIG; SITKOVSKY; ROBSON, 2012). Quanto aos receptores purinérgicos, há uma divisão em duas grandes classes, P2 - que são ativados pelo ATP, ADP e AMP, e P1, que são ativados pela adenosina (MAHMOOD; IQBAL, 2022). Além disso, os receptores P2 são subdivididos em P2X e P2Y, de acordo com a sua conformação estrutural, sendo os P2Y receptores metabotrópicos acoplados à proteína G, e os P2X, ionotrópicos (BURNSTOCK, 2018). E por último os receptores P1 são divididos em A1, A2A, A2B e A3, sendo todos metabotrópicos acoplados à proteína G (ZARRINMAYEH; TERRITO, 2020).

A análise das concentrações de sinalizadores purinérgicos, de seus receptores e das ectonucleotidases pode resultar em explicações para respostas inflamatórias descompensadas

em cenários patológicos, como no caso das doenças de caráter tipo depressivo, nas quais há aumento do estresse fisiológico (DIEZMOS; BERTRAND, LIU, 2016). Nesse cenário, parece haver relação entre a liberação excessiva de ATP por canais celulares com a ativação do receptor purinérgico P2X7, um receptor ionotrópico que, quando ativado, parece estar ligado a apoptose celular (SLUYTER, 2017). Na situação descrita, concentrações elevadas de ectonucleotidases parecem ser benéficas, pois a quebra do ATP, que, em uma condição inflamatória, está sendo liberado em excesso, corrobora para uma menor ativação de receptores P2X7 (COUTINHO-SILVA; MORANDINI; SAVIO, 2014). Em suma, concentrações de cada um dos integrantes do sistema purinérgico interferem em respostas inflamatórias, tanto em situações fisiológicas, quanto patológicas do organismo de mamíferos.

O Óleo EC *C. sativa*, recebe esse nome pois preserva em seu extrato, todos os fitoquímicos presente na planta, como visto por Ferrarini et al., (2022), que observou o óleo de *Cannabis sativa* de amplo espectro, sendo capaz de aliviar sintomas comportamentais tipo depressivo, relacionadas ao estresse em camundongos. O que parece estar envolvido no mecanismo farmacológico, seria que o CBD sozinho, é o composto de maior benefício e ação em receptores canabinoides, porém o THC atua como um intensificador do CBD, tornando essa sinergia uma forma mais eficaz de alcançar os efeitos terapêuticos (KARSCHNER et al., 2011).

MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 ASPECTOS ÉTICOS

Este projeto de pesquisa recebe o título de “Efeito do Tratamento Crônico com Óleo de *Cannabis Sativa* de Espectro Completo Sobre Comportamentos Tipo Depressivo e o Sistema Purinérgico em Ratos Submetidos a Estresse no Início da Vida” sendo um subprojeto vinculado a um projeto maior intitulado “Efeito do Estresse na Infância sobre Comportamentos Depressivos na Vida Adulta - Potencial Estratégia Terapêutica do Óleo de *Cannabis sativa* de Espectro Completo” que foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) com o seguinte protocolo: nº 2911170423, sendo aprovado pela CEUA da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), em 19/05/2023, anexado ao presente trabalho sob o título de APÊNDICE A.

Foram considerados os princípios éticos na utilização de modelos animais que visam o benefício associado para a produção de conhecimento científico (GUIMARÃES; FREIRE; MENEZES, 2016). Os pesquisadores passaram por capacitação, buscando uma manipulação que gerasse o mínimo de sofrimento e fosse compatível com um manejo descrito na literatura. Foi utilizado o número mínimo necessário de animais para que não houvesse o sacrifício desnecessário (ALMEIDA; NETO; ALMEIDA, 2016). O método utilizado para a eutanásia foi o processo mecânico de decapitação, devido a sua característica de não interferir nos resultados bioquímicos, bem como de possibilitar a retirada do sangue total, sem interferência externa (FERNANDES; PEDROSO, 2017). Dessa maneira, as amostras que foram analisadas possuem respaldo ético em sua obtenção e manipulação.

2.2. MATERIAIS, EQUIPAMENTOS E SOLVENTES

A presente pesquisa foi conduzida utilizando reagentes e produtos químicos de grau analítico, adquiridos das empresas Sigma-Aldrich Inc. (St. Louis, MO, EUA) e Merck KGaA (Darmstadt, Alemanha). Outros reagentes empregados no estudo, quando não especificados de outra forma, eram de pureza analítica. As medições necessárias para as análises foram realizadas com um espectrofotômetro de microplacas Multiskan™ GO, fabricado pela Thermo Fisher Scientific (EUA).

1.2.1. Quantificação Extracelular do ATP

A determinação quantitativa de ATP foi realizada utilizando um kit comercial fornecido pela Invitrogen®. Este procedimento envolveu um ensaio de bioluminescência que utilizou luciferase de vagalume recombinante e seu substrato, a D-luciferina, especificamente aplicado ao soro dos grupos de ratos Wistar. O princípio do ensaio baseia-se na dependência da luciferase em relação ao ATP para a produção de luz, com uma emissão máxima ocorrendo em aproximadamente 560 nm em um pH de 7,8. Os componentes necessários para a reação foram combinados conforme as instruções do fabricante, a fim de preparar uma solução de reação padrão, ajustando cuidadosamente os volumes de acordo com os requisitos específicos do experimento. Este ajuste minucioso garantiu que a mistura reagente estivesse otimizada para a máxima eficiência e precisão durante a medição. Após um período de incubação de 15 minutos, a reação foi realizada em condições controladas para permitir a completa interação entre a luciferase e o ATP. A luminescência resultante foi então medida com precisão e representada em termos de concentração de ATP, expressa em nanomolar (nM/ATP) (KARAMOHAMED; GUIDOTTI, 2001).

2.2.2. Normalização das Proteínas

Para a determinação de proteínas foi utilizada a técnica de Bradford (BRADFORD, 1976). Inicialmente deve-se normalizar as proteínas com a curva padrão usando curva de correção do comassie, utilizando Albumina Bovina (0,1 mg/ml) como padrão. Para a determinação utiliza-se em cada poço 250uL de azul de comassie filtrado e 5 µL da amostra. Para obter o resultado da concentração de proteínas deve-se aplicar o cálculo: $((\text{Abs da amostra} - \text{Abs do branco}) \times \text{FC}) / 0.05$ (5 µL).

2.2.3 Atividades de Enzimas E-NTPDase1 (CD39) e E-5'-NT (CD73)

As atividades das enzimas purinérgicas foram conduzidas utilizando amostras de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de ratos Wistar, provenientes dos respectivos grupos experimentais. Para avaliar as mudanças nas atividades das enzimas do sistema purinérgico, foram analisadas a hidrólise de nucleotídeos como ATP e ADP

(NTPDase1, CD39), e AMP (E-5'-nucleotidase, CD73). Inicialmente, as amostras de PBMCs foram ajustadas em termos de concentração proteica, em seguida, 20 µL de cada amostra foi adicionada a misturas reacionais específicas para cada enzima e pré-incubados a 37 °C por 10 minutos. A reação enzimática foi iniciada com a adição dos substratos específicos: ATP e ADP para a CD39 e AMP para a CD73. Após um período de incubação de 70 minutos a 37 °C, as reações foram interrompidas pela adição de ácido tricloroacético a 10%. O fosfato inorgânico liberado devido à hidrólise dos nucleotídeos ATP, ADP e AMP foi quantificado utilizando o reagente colorimétrico verde malaquita. Para garantir a precisão das medições, foi preparada uma curva padrão com KH₂PO₄ (fosfato monopotássico), controles foram realizados para corrigir qualquer hidrólise não enzimática que pudesse ocorrer. A absorbância das amostras foi medida a 630 nm, e as atividades específicas das enzimas foram expressas como nanomoles de fosfato inorgânico liberado por minuto por miligramas de proteína (nmol/Pi/min/mg de proteína) (LUNKES et al., 2003).

2.3. DESENVOLVIMENTO DOS MÉTODOS

A presente pesquisa trata-se de um estudo quantitativo analítico, de natureza experimental. Foram mensurados níveis de ATP extracelular e avaliada a atividade de enzimas do sistema purinérgico em amostras de plasma heparinizado e PBMCs, respectivamente, provenientes de ratos Wistar machos. O estudo comparou os diferentes grupos experimentais, que chamamos de controle, estresse salina (controle negativo), escitalopram (controle positivo) e tratado por Óleo EC *C. sativa*.

2.4. OBTENÇÃO E PROCESSAMENTO DA *CANNABIS SATIVA*

O Óleo EC *C. sativa* foi obtido por doação da Associação Alternativa de Apoio à Cannabis Medicinal do Brasil - (AAACMB) que é natural de Imbituba – Santa Catarina, inscrita no Cadastro Nacional da Pessoa Jurídica (CNPJ) sob o número 45.458.633/0001-86. A AAACMB foi a responsável pela produção e análise do óleo, apresentando em forma líquida, contendo CBD e THC em uma proporção de 20:1, respectivamente. O certificado de análise foi fornecido como informação de apoio.

2.5. ANÁLISE QUÍMICA

2.5.1. Estimativa do Teor Total dos Canabinóides

A análise do Óleo EC *C. sativa* por parte da AAACMB foi realizada por seu responsável técnico farmacêutico, por meio de *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC), um método de cromatografia desenvolvido para quantificação de resinas e óleos como descrito por Carvalho et al., 2020. Este óleo de *Cannabis Sativa* é chamado de espectro completo porque preserva a totalidade de todos os seus componentes, além do amplamente conhecido CBD, o produto também contém THC, ambos em maiores quantidades em relação a outros fenóis canabinóides e não canabinóides (ODIEKA, et al. 2022). O óleo de *Cannabis* do estudo, apresentou, como total de seus canabinóides, o percentual de 81,31%, sendo o canabinóide majoritário o CBD, com 71,76%, consecutivamente o THC, com 3,61%; restando 5,94% de outros canabinóides.

2.6. AQUISIÇÃO DO COMPOSTO OXALATO DE ESCITALOPRAM

O oxalato de escitalopram foi adquirido na quantidade de 15mL por unidade de frasco, contendo 20 mg/mL do princípio ativo, sendo fabricado pela empresa Aché Laboratórios Farmacêuticos S.A., com sede no município de Guarulhos, no estado de São Paulo - Brasil.

2.7. GRUPOS EXPERIMENTAIS E TRATAMENTOS

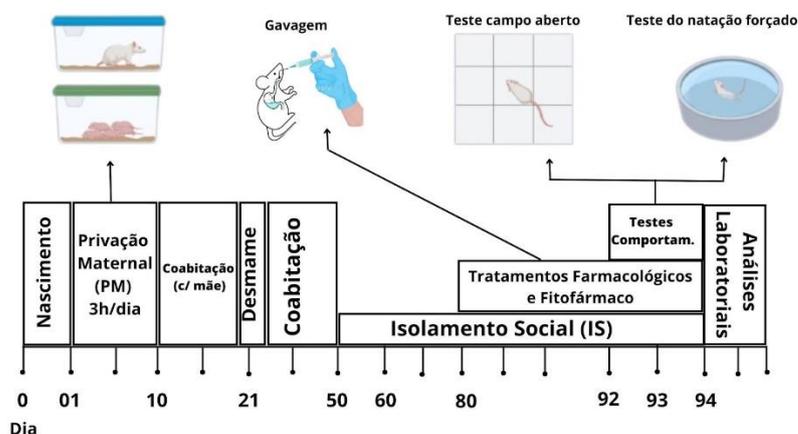


Figura 1 - Desenho experimental do protocolo de PM, IS, tratamentos farmacológicos, testes comportamentais e análises laboratoriais.

Desde o momento do nascimento, que representa o dia zero (0) (figura 1), os filhotes permaneceram em contato ininterrupto com a rata mãe até a conclusão do primeiro dia de vida. No dia 01 (um dia após o nascimento) iniciou-se o protocolo de PM, o qual perdurou até o décimo dia de vida. Durante a PM, diariamente, os filhotes foram retirados da gaiola da mãe por um período de 3 horas. Após o término do protocolo de PM, os filhotes voltaram a coabitar continuamente com a mãe na mesma gaiola até o vigésimo primeiro dia de vida (dia 21), quando foi realizado o desmame. O desmame ocorreu com a retirada da rata mãe da gaiola de habitação, deixando os filhotes sem o contato da mãe de forma permanente. A partir desse ponto, os filhotes permaneceram juntos, coabitando na mesma gaiola até o quinquagésimo dia de vida (dia 50).

A partir do quinquagésimo dia de vida, os filhotes foram separados entre si e colocados em caixas individuais, dando início ao protocolo de isolamento social (IS). O IS durou do dia 50 ao dia 94. Entre os dias 80 e 94, os animais receberam tratamentos farmacológicos e fito farmacológicos. Especificamente, foram administrados a salina, o oxalato de escitalopram e o óleo de espectro completo de *Cannabis sativa*, todos por gavagem, respeitando a divisão dos grupos a seguir: grupo Controle, sem estresse e tratado com salina, com número de integrantes (N) equivalente a dez (=10), não passando pelo protocolo de PM. A salina é um veículo de soro fisiológico com concentração de 0,9% de cloreto de sódio (NaCl). Assim, esse grupo equivale como controle sem estresse para comparações. Cabe ressaltar que a gavagem com salina faz-se necessária, para descartarmos a via de administração como fator de interferência nos resultados posteriores do presente estudo. O segundo grupo (controle negativo) (N = 10) é o que foi submetido à PM e IS e recebeu salina como tratamento. Dessa forma, atuou como controle negativo, para avaliar os efeitos do estresse induzido pela PM e IS. O terceiro grupo (controle positivo) (N = 10) foi submetido à PM e IS tratado com escitalopram 10 mg/kg, permitindo comparar os efeitos do escitalopram com os efeitos de outros tratamentos. O quarto grupo, com N=10, foi submetido à PM e IS e tratado com Óleo EC *C. sativa* 1 mg/kg. A administração por gavagem garantiu a dosagem precisa e consistente dos compostos. Este período de tratamento farmacológico teve uma duração de 14 dias, caracterizando um tratamento crônico. Nos dias noventa e dois, noventa e três e noventa e quatro, foram realizados

testes comportamentais para avaliar os efeitos do estresse e dos tratamentos farmacológicos. Os tratamentos farmacológicos nos dias dos testes comportamentais foram realizados 60 (sessenta) minutos antes de cada teste. No nonagésimo segundo dia (dia 92), os ratos e seus respectivos grupos foram submetidos ao teste de campo aberto (TCA). No dia seguinte, no nonagésimo terceiro dia (dia 93), os ratos realizaram o treino do nado forçado, sendo colocados em contato com a água pela primeira vez e submetidos a um treino de 15 minutos. No dia posterior (dia 94), após a conclusão dos tratamentos e do teste de nado forçado (TNF), os ratos foram submetidos à eutanásia por decapitação, sendo coletado o sangue total dos animais e imediatamente congelado para análises bioquímicas futuras.

2.7.1 Protocolo de Privação Materna (PM)

O protocolo da PM consistiu na remoção dos filhotes da gaiola na qual estava contida a rata mãe. Esta retirada ocorreu uma vez ao dia, pelo período de três horas, desde o primeiro dia até o décimo dia do estudo, como exposto na figura 1. Faz-se importante ressaltar que os filhotes do grupo controle não foram privados, permanecendo na gaiola com a rata mãe. Os animais foram mantidos em ciclo de alternância de exposição à luminosidade “claro/escuro” de doze horas, sendo o ciclo claro das sete horas da manhã às sete horas da noite, e o ciclo escuro das sete horas da noite às sete horas da manhã. Em ambos os ciclos de luminosidade, os ratos foram supridos de ração e água *ad libitum*, o ambiente de condicionamento dos ratos foi mantido a uma temperatura de 23 ± 1 °C. Após o protocolo de PM, encerrou no décimo dia de vida dos filhotes, os ratos ficaram em coabitação com a rata mãe sem privação, o desmame ocorreu somente no vigésimo primeiro dia após o nascimento, quando permaneceram em condição padrão até a indução do protocolo de IS no quinquagésimo dia. (ABELEIRA; RÉUS; QUEVEDO, 2013).

2.7.2 Protocolo de Isolamento Social (IS)

O protocolo de IS consiste em manter cada animal condicionado em alojamentos individuais por um período de 30 dias e durante os 14 dias de tratamento. Os animais podiam sentir somente o aroma e os sons produzidos por outros ratos. Os animais do grupo controle permaneceram alojados em grupo de cinco animais por gaiola, com ciclo de alternância de

luminosidade claro/escuro de doze horas (das sete horas da manhã às sete horas da noite com claridade), providos de ração e água *ad libitum*. O ambiente foi mantido à temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$ (LUKKES et al., 2009).

2.8. TESTES COMPORTAMENTAIS

Os testes comportamentais foram realizados entre o nonagésimo segundo dia e o nonagésimo quarto dia do experimento, sendo o teste de campo aberto (TCA) realizado no nonagésimo segundo dia. No nonagésimo terceiro dia os ratos foram colocados em contato com a água, para a realização do treino que tem por fim prepará-los para o teste de nado forçado (TNF), cuja realização ocorreu no nonagésimo quarto dia. Os testes, TCA e TNF, bem como o treino, foram realizados no período matutino, das oito às doze horas, sendo iniciados após sessenta minutos do tratamento farmacológico e fitofarmacológico dos ratos. Os testes tiveram sua realização conduzida por um observador cego aos grupos experimentais. O TCA foi realizado para verificar a atividade locomotora dos animais, como descrito por Katz; Roth; Carroll (1981). O comportamento depressivo foi avaliado conforme descrito por Abeleira; Réus; Quevedo, 2013. Posteriormente os ratos foram decapitados como descrito por Da Silva et al (2022), e foram separadas as amostras biológicas para posterior análise de biomarcadores purinérgicos.

2.8.1 Teste de Campo Aberto (TCA)

O teste de campo aberto avalia a atividade motora exploratória dos ratos, sendo que cada grupo é composto por dez ratos. A avaliação da atividade locomotora dos animais é realizada no campo aberto, uma caixa de 40 centímetros de largura e 60 centímetros de comprimento, cercada por três paredes de madeira e uma parede frontal de vidro, contendo um assoalho dividido em nove retângulos isométricos formados por linhas pretas. É permitido que os animais explorem o ambiente por cinco minutos, tempo no qual serão contabilizados os cruzamentos entre as linhas pretas, que formam os retângulos, e a quantidade de vezes em que o rato ficou apoiado nas patas traseiras a fim de explorar o ambiente (levantamentos) (KATZ; ROTH; CARROLL, 1981). O campo sempre é higienizado entre os testes para evitar influências residuais de substâncias deixadas por ratos que realizaram o teste anteriormente, como dejetos.

2.8.2 Teste de Natação Forçada (TNF)

O teste de natação forçada avalia o comportamento tipo depressivo, conforme descrito anteriormente por Abeleira, Réus e Quevedo, 2013. Para realizar o teste, cada rato será colocado individualmente em um cilindro com água à temperatura de 23°C, preenchido suficientemente para que o animal não consiga apoiar as patas no fundo do recipiente, nem consiga retirar-se do mesmo. Este teste é realizado em dois dias, sendo que no primeiro dia - septuagésimo terceiro dia do experimento e décimo terceiro dia de tratamento farmacológico - os ratos são forçados a nadar durante quinze minutos, efetuando o que chamamos de pré-teste, uma ação com o intuito de propiciar ao rato maior intimidade com a água. Já no segundo dia do teste - nonagésimo quarto dia do experimento e décimo quarto dia de tratamento farmacológico - os ratos são forçados a nadar por cinco minutos, realizando o TNF propriamente dito. Neste teste, são avaliados os parâmetros de imobilidade, que enquadram imobilidade total ou apenas movimentos para manter a cabeça fora da água sem intenção de escapar, como também são avaliados parâmetros de mobilidade, como o tempo que o animal realiza movimentos para manter-se na superfície (natação) e o tempo que escala o cilindro na tentativa de escapar do ambiente.

Abeleira, Réus e Quevedo, 2013, discutem que, nesse teste, os ratos tratados com fármacos de ação antidepressiva tendem a apresentar menor tempo de imobilidade, conseqüentemente aumentando os tempos de mobilidade, com realização de natação e/ou escalada. O que parece ser visto é que, drogas atuantes na neurotransmissão noradrenérgica, aumentam o tempo de escalada, ao mesmo tempo em que drogas que atuam no sistema serotoninérgico, aumentam o tempo de natação.

2.9 COLETA TOTAL DE SANGUE

No nonagésimo quarto dia do experimento, após o término do último teste comportamental, os animais passaram por eutanásia por decapitação. Foram coletados, imediatamente após o ato da decapitação, aproximadamente 2 ml de sangue total do animal, colocados diretamente em um tubo com gel separador e um tubo com heparina, sem contato com nenhuma outra superfície. Posteriormente, o tubo com sangue é centrifugado a 3.500 rpm por quinze minutos, para a obtenção do sobrenadante (plasma HEP), ao conteúdo restante, foi

adicionado soro fisiológico na proporção 1:1. Após homogeneizado, foi colocado em um novo tubo com 3 ml de Ficoll-Hypaque e centrifugado por 30 min a 1800 rpm, retirando as PBMC posteriormente à centrifugação (DA SILVA et al. 2022).

2.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Na análise estatística do comportamento foi utilizado o teste de normalidade *Shapiro-wilk*. Após, foi realizada ANOVA *one-way* com múltiplas comparações, seguido do teste post-hoc de Tukey pelo software GraphPad Prism 9.0.0. Para a análise estatística de elementos do sistema purinérgico, foi utilizado o teste de normalidade *Shapiro-wilk*. Após, foi realizada ANOVA *one-way* com múltiplas comparações, seguido do teste *Holm-sidak*. Foi utilizado o software GraphPad Prism 9.0.0. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. As médias dos grupos são apresentadas em gráficos em barras. Os resultados são expressos por média \pm desvio padrão da média ($M \pm DPM$)

3.RESULTADOS

3.1 EFEITOS DA PM, DO IS E DOS TRATAMENTOS NO TESTE DE NATAÇÃO FORÇADA

Os efeitos da PM + IS e dos tratamentos com Óleo EC *C. sativa* (1 mg/kg), e escitalopram (10 mg/kg) nos parâmetros avaliados no teste de natação forçada estão ilustrados na figura 2. No protocolo de natação forçada a ANOVA de uma via revelou uma interação significativa no tempo de imobilidade entre os grupos sem estresse e os grupos privados maternalmente e isolados socialmente e entre os tratamentos ($F = 10,34$; $p < 0,0001$). O teste Post hoc de Tukey revelou que a PM + IS elevou significativamente o tempo de imobilidade ($p < 0,05$) no teste de natação forçada e os tratamentos com Óleo EC *C. sativa* ($p < 0,01$) e escitalopram ($p < 0,05$) reverteram o efeito da PM + IS. Em relação ao tempo de nado, observou-se na ANOVA de uma via uma interação significativa entre os grupos sem estresse e os grupos privados maternalmente e isolados socialmente e entre os tratamentos ($F = 5,622$; $p = 0,0030$). O teste de Post hoc de Tukey revelou que a PM + IS apresentou menor tempo de natação em comparação ao grupo sem estresse ($p < 0,01$) e em relação ao grupo tratado com Óleo EC *C. sativa* ($p < 0,05$). Por fim, no teste de escalada, houve diferença estatística significativa entre os grupos privados maternalmente e isolados socialmente e entre os tratamentos ($F = 4,108$; $p = 0,0148$). O testes post hoc mostrou que o estresse reduziu significativamente a escalada e os tratamentos reverteram este comportamento ($p < 0,05$).

Figura 2 - Teste de Natação Forçada

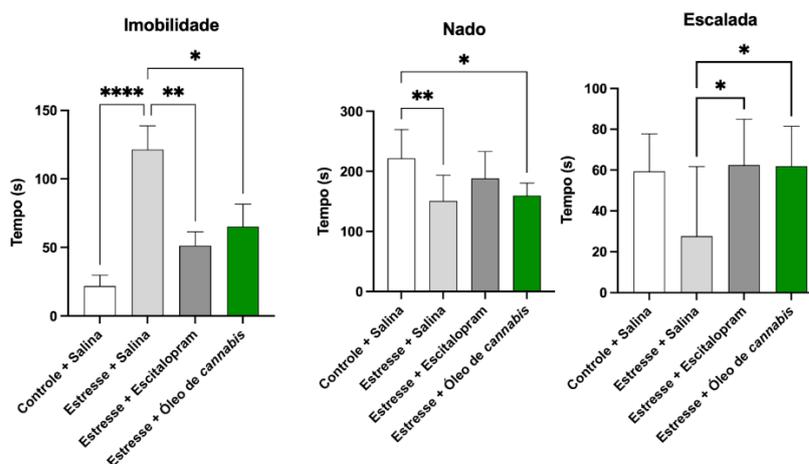


Figura 2 - Efeitos do estresse de PM + IS e dos tratamentos com Óleo EC *C. sativa* (1 mg/kg), e escitalopram (10 mg/kg) sobre a os parâmetros de mobilidade no teste de natação forçada em machos. Os dados são apresentados

como média \pm erro padrão da média, e significância estatística foi definida para valores de p de * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

3.2 EFEITOS DA PM E DOS TRATAMENTOS NO TCA

Os efeitos da PM + IS e dos tratamentos com óleo de *Cannabis sativa* de espectro completo (1 mg/kg), e escitalopram (10 mg/kg) nos parâmetros avaliados no TCA estão ilustrados na figura 5. A ANOVA de uma via não revelou interação significativa entre os grupos controle e os grupos estressados. Tanto os protocolos de PM + IS quanto os tratamentos não induziram alterações significativas na atividade locomotora, avaliada através dos números de cruzamentos ($F = 1,145$; $p = 0,3398$) e levantamentos ($F = 1,596$; $p = 0,2015$) no teste do campo aberto.

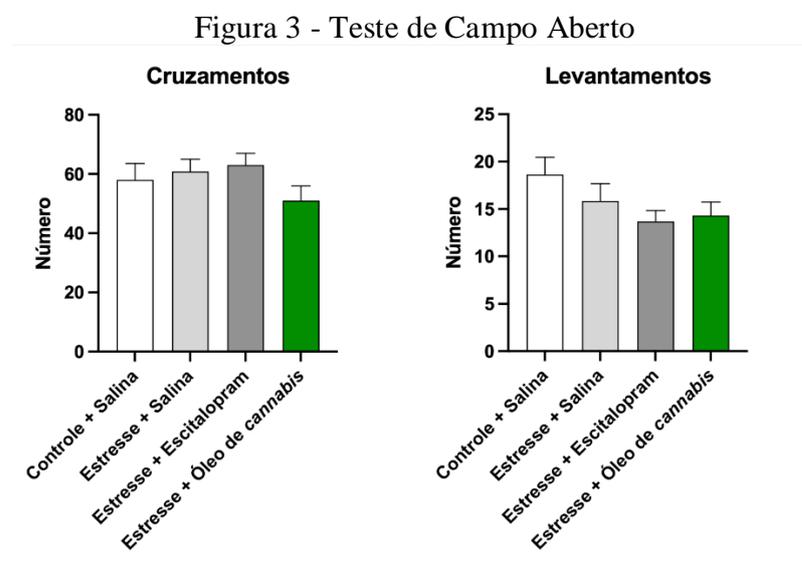


Figura 3 - Efeitos do estresse de PM + IS e dos tratamentos com Óleo EC *C. sativa* (1 mg/kg), e escitalopram (10 mg/kg) sobre a atividade motora exploratória em machos. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média.

3.3 QUANTIFICAÇÃO DE ATP EXTRACELULAR

Os efeitos do estresse e dos tratamentos com óleo de EC *C. sativa* (1 mg/kg) e escitalopram (10 mg/kg) nos níveis de ATP extracelular no plasma estão ilustrados na figura 4. A ANOVA de uma via não revelou diferenças significativas nos níveis de ATP extracelular entre os diferentes grupos experimentais ($F = 2,028$; $p = 0,1684$).

Figura 4 - Quantificação de ATP Extracelular - Plasma

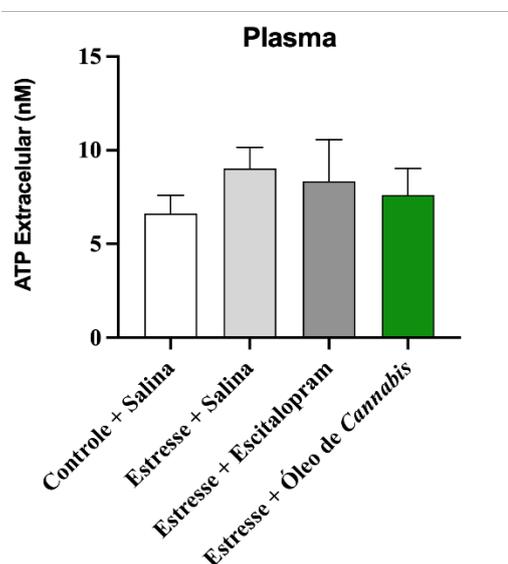


Figura 4 : Efeitos do estresse e dos tratamentos com Óleo EC *C. sativa* (1 mg/kg) e escitalopram (10 mg/kg) nos níveis de ATP extracelular em plasma de ratos Wistar. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média (SEM).

3.4 - HIDRÓLISE DE ATP, ADP e AMP - PBMC

Os efeitos do estresse e dos tratamentos com Óleo EC *C. sativa* (1 mg/kg) e escitalopram (10 mg/kg) nos parâmetros de hidrólise de ATP, ADP e AMP em PBMCs estão ilustrados na figura 5. A ANOVA de uma via revelou interações significativas nos níveis de hidrólise de ATP, ADP e AMP entre os diferentes grupos experimentais: **ATP**: A análise mostrou diferenças significativas na hidrólise de ATP entre os grupos ($F = 17,35$; $p < 0,0001$). O teste *Holm-sidak* indicou que o grupo tratado com Óleo EC *C. sativa* apresentou um aumento significativo na hidrólise de ATP quando comparado ao grupo estresse salina ($p < 0,0001$). **ADP**: Similarmente, para a hidrólise de ADP, a ANOVA indicou uma interação significativa ($F = 31,59$; $p < 0,0001$). O grupo tratado com Óleo EC *C. sativa* também mostrou um aumento significativo na hidrólise de ADP em comparação ao grupo estresse salina ($p < 0,0001$). **AMP**: No caso da hidrólise de AMP, a ANOVA revelou uma interação significativa entre os grupos ($F = 10,82$; $p = 0,0001$). O teste *Holm-sidak* demonstrou que o grupo tratado com Óleo EC *C. sativa* apresentou um aumento significativo na hidrólise de AMP comparado ao grupo estresse salina ($p < 0,001$). Esses resultados sugerem que o tratamento com Óleo EC *C. sativa*, aumenta

significativamente a atividade das ectonucleotidasas, em hidrólise de ATP, ADP e AMP em PBMCs de ratos Wistar, indicando um efeito modulador potencialmente benéfico do conjunto CBD e THC em condições de estresse.

Figura 5 - Hidrólise de ATP, ADP e AMP - PBMCs

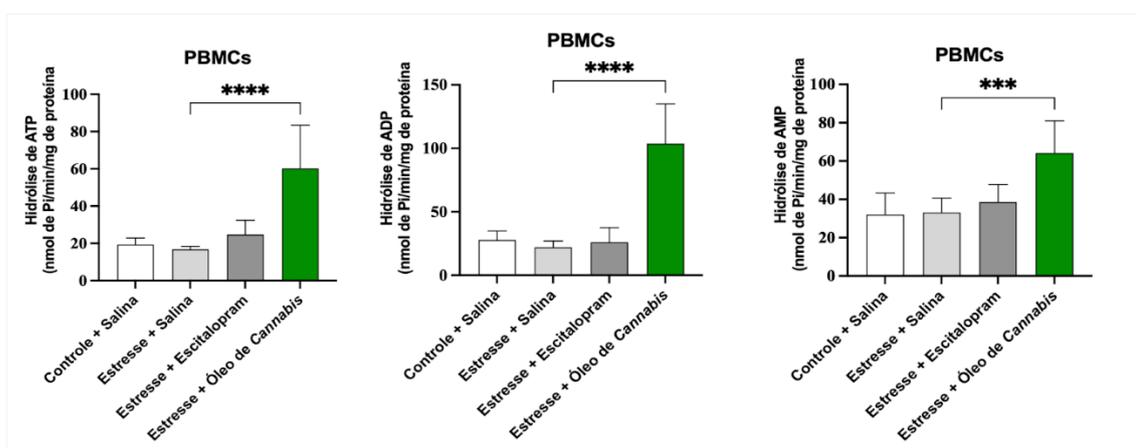


Figura 5 - Hidrólise de ATP, ADP e AMP em PBMCs de ratos Wistar submetidos a estresse e tratados com Óleo EC *C. sativa* (1 mg/kg) e escitalopram (10 mg/kg). A atividade da E-NTPDase1 foi medida pela hidrólise de ATP e ADP, enquanto a hidrólise de AMP mediu 5'-NT. Os dados são apresentados como média \pm SEM. Análise estatística: ANOVA de uma via seguida do teste de Holm-Sidak. Valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. **A:** É visível um aumento significativo na hidrólise de ATP nas PBMCs dos ratos tratados com Óleo EC *C. sativa* em comparação ao grupo estresse salina. A significância estatística foi **** $p < 0,0001$. **B:** Observa-se um aumento significativo na hidrólise de ADP nas PBMCs dos ratos tratados com Óleo EC *C. sativa* em comparação ao grupo estresse salina. A significância estatística foi **** $p < 0,0001$. **C:** A hidrólise de AMP nas PBMCs foi significativamente maior nos ratos tratados com Óleo EC *C. sativa* em comparação ao grupo estresse salina. A significância estatística foi *** $p < 0,001$.

4.DISCUSSÃO

O presente estudo buscou avaliar os efeitos do Óleo EC *C. sativa* em ratos Wistar machos submetidos a protocolos de indução ao comportamento tipo depressivo. Para isso, foram comparados os efeitos do reconhecido antidepressivo inibidor seletivo da recaptação de serotonina (ISRS), escitalopram e do Óleo EC *C. sativa* no TNF e no TCA, objetivando a observação de mudanças nos parâmetros comportamentais. Além disso, foram avaliados marcadores do sistema purinérgico, encontrados no plasma e nas PBMC do sangue dos ratos.

Čater e Majdić (2022) exploraram o impacto desfavorável, em âmbito neurobiológico e comportamental, em ratos induzidos a comportamento tipo depressivo por PM e IS. O estudo demonstrou que o estresse precoce é capaz de ocasionar um aumento significativo na ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA), resultando em uma resposta exacerbada ao estresse e em disfunções emocionais e cognitivas. Esses achados sugerem que as experiências adversas no início da vida podem ter consequências duradouras, afetando o desenvolvimento cerebral e a capacidade de resposta ao estresse na vida adulta.

Sob a perspectiva da sinalização purinérgica, pesquisas pré-clínicas indicam que o sistema purinérgico desempenha um papel crucial na regulação dos comportamentos depressivos em ratos. A superexpressão dos receptores A2A e a ativação dos receptores P2X7 estão ligadas ao aumento dos comportamentos depressivos, enquanto a deficiência nos receptores A1 parece aumentar a resiliência contra esses comportamentos. Antagonistas desses receptores demonstraram potencial antidepressivo, sugerindo que a modulação do sistema purinérgico pode ser uma abordagem terapêutica eficaz. Além disso, a elevação dos níveis de adenosina após tratamentos antidepressivos, destaca os benefícios da modulação purinérgica na depressão. Esses achados sugerem que interferir na função do sistema purinérgico pode ser uma potencial estratégia para aumentar a efetividade dos tratamentos antidepressivos (BARTOLI et al., 2020).

Neste estudo foi utilizado o grupo estressado e tratado com salina como um controle negativo e, para ter um grupo controle positivo, foi utilizado o antidepressivo oxalato de escitalopram. Cipriani et al. (2009), coloca este fármaco entre os quatro antidepressivos com melhor perfil de aceitação pelos pacientes, resultando em menores desistências ao manejo. Ainda assim, os tratamentos convencionais para a depressão, como os ISRS e os antidepressivos duais, inibidores seletivos da recaptação de serotonina e noradrenalina

(ISRSN), podem ser ineficazes na remissão de sintomas em cerca de 30% dos casos (KVERNO; MANGANO, 2021).

Para tanto, o Óleo EC *C. sativa* pode se apresentar como uma alternativa para a remissão dos sintomas depressivos, uma vez que em modelos experimentais em animais já foram evidenciados efeitos antidepressivos (GARCÍA-GUTIÉRREZ et al., 2020). É provável que isso ocorra pelo envolvimento direto com receptores serotoninérgicos 5HT1A, facilitando a neurotransmissão mediada por esse receptor, como visto no estudo feito com camundongos suíços, comparando grupos que receberam CBD e imipramina, nos testes de TNF e TCA (ZANELATI et al. 2009).

Para a avaliação de nossos grupos de estudo, foram utilizados testes comportamentais que são essenciais para identificar a eficácia dos medicamentos em roedores. O TNF foi descrito por Porsolt et al. (1978) para estudar os efeitos de novos medicamentos antidepressivos, observando a duração do comportamento de imobilidade, tempo de natação e escalada. Esses autores perceberam que uma diminuição no estado de humor dos ratos, refletia em um maior tempo imóvel no teste, sendo sensivelmente revertido com uso de agentes antidepressivos. A partir da figura 2, podemos observar, que os ratos do grupo estresse + salina, permaneciam mais tempo imóveis, manifestações que foram revertidas significativamente pelo grupo Escitalopram e Óleo EC *C. sativa*. Entretanto, ocorreu uma diminuição significativa no tempo de nado dos grupos de Escitalopram e Óleo EC *C. sativa*, quando comparados ao grupo Controle. Também o grupo Óleo EC *C. sativa*, nos tempos de escalada, que é representado pela avidez de fugir/sair do cilindro de água, parece permanecer concordante com o grupo Controle, enquanto o grupo Estresse Salina tem esse tempo reduzido, demonstrando sua desistência da vida quando somado aos outros parâmetros.

Esses resultados aparecem corroborados na pesquisa experimental de Réus et al., (2011), que estressou os roedores por PM e usou como método de avaliação o TNF, observando tempos de nados e escaladas reduzidos e tempo de imobilidade aumentado. Outro estudo de Bright e Akirav., (2023) com ratos, analisou o efeito antidepressivo do CBD em testes, incluindo o TNF, demonstrou reversões significativas nos indicadores de imobilidade, nado e escalada, quando comparado ao grupo estresse. Além do TNF, há uma ampla gama de testes sendo utilizados em roedores na contemporaneidade para a avaliação de comportamentos dos ratos. Neste caso, nosso estudo com o uso do TCA, objetivou-se observar o efeito estressor dos tratamentos na atividade motora e exploratória dos animais. Também Gould, Dao e Kovacsics (2009) discute sobre sua utilização para avaliar manifestações sedativas ou estimulantes de

novos fármacos, além de eventos de estresse agudo e crônico. Para Hao et al., (2019), o TCA é capaz de mimetizar um ambiente desconhecido, inseguro e tenso, a forma como eles se movimentam ao longo do campo revela seu estado comportamental e emocional, espera-se que o rato em seu instinto, tenha uma posição mais exploratória. Todavia, no TCA de nosso estudo, não houve mudanças comportamentais estatisticamente significativas entre os grupos, nem entre o controle e o estresse salina, tão pouco entre o estresse salina e o Óleo EC *C. sativa*, revelando que o nosso fitofármaco de pesquisa não se demonstrou capaz de embotar ou estimular os ratos nesse teste. Adicionalmente, uma pesquisa comportamental realizada por Sartim, Guimarães e Joca (2016), injetou CBD diretamente no córtex pré-frontal de ratos, testando doses diferentes de CBD (10, 30, 45 e 60 nmol), tendo como resultado, nenhuma diferença significativa locomotora dos ratos quando comparados os grupos ao controle. Fato que corrobora ainda mais com nossos achados, já em TNF, realizados nos grupos tratados, reduziu significativamente o tempo de imobilidade, consequentemente aumentando o tempo de nado, induzindo a efeitos antidepressivos (SARTIM; GUIMARÃES; JOCA, 2016).

Este estudo também avaliou a sinalização purinérgica, quantificando o ATP extracelular em plasma, por meio de bioluminescência, demonstrando assim, um aumento desse sinalizador em ambiente extracelular, no grupo estresse salina quando comparados ao controle, porém não houve significância estatística. Esse incremento observado, é abordado por Di Virgilio, Sarti e Coutinho-Silva (2020) como os "Padrões Moleculares Associada a Danos" (DAMPs → sigla da expressão em inglês), que são moléculas endógenas liberadas em ambientes de interstício como sinalizadores de inflamação. O ATP extracelular é visto como um DAMPs, fenômeno aparente no grupo estresse + salina. Por seguinte, o grupo estresse tratado com escitalopram, teve uma leve redução desses níveis, demonstrando seu efeito regulador nos níveis de ATP extracelular. Uma pesquisa experimental realizada por Basso et al., (2009) com camundongos knockout (KO) de receptor P2X7, evidenciou nos testes TNF e suspensão de cauda, efeito tipo antidepressivo semelhante aos efeitos apresentados por camundongos tipo selvagens que fizeram uso de imipramina, corroborando que o bloqueio do receptor P2X7, representa um potencial antidepressivo. Ainda, os camundongos KO que receberam uma subdose de antidepressivo tiveram seu manejo antidepressivo potencializado, quando observado no TNF (BASSO et al. 2009). Outro resultado é que, embora o Óleo de *Cannabis sativa* tenha aumentado os níveis de ATP extracelular, ele se mostrou menos pronunciado em comparação com o Escitalopram, indicando que o Óleo EC *C. sativa*, tem um potencial efeito anti-inflamatório. A *Cannabis sativa* exerce efeito anti-inflamatório através

dos seus compostos THC e CBD, que por ativação dos receptores CB1 e CB2, apresentam, entre outras respostas, diminuição da produção de citocinas pró inflamatórias e interação com receptores de adenosina, respectivamente, como descrito por Kopustinskiene et al. (2022).

Também foi avaliada a hidrólise de ATP, ADP e AMP em PBMCs. Assim, foi possível analisar de forma indireta a atividade das CD39 e CD73. Começando pela atividade da NTPDase1/CD39, o grupo estresse e tratado com Óleo *C sativa* demonstrou taxas elevadas de hidrólise de ATP em comparação aos outros grupos como visto na Figura 5a. O nível de significância deste achado foi de $p < 0,0001$. O ATP é responsável por ligar-se em receptores purinérgicos P2, que são expressos em várias células e tecidos orgânicos (DOU et al., 2018). É possível que uma maior quantidade do ATP em meio extracelular seja responsável pela maior ativação dos receptores que estão envolvidos em uma série de respostas pró-inflamatórias do organismo de mamíferos. Por exemplo, o receptor P2X7, estimula liberação de citocinas e quimiocinas, além de estimular a proliferação e a diferenciação de linfócitos (DI VIRGILIO et al., 2017). Além disso, pode se atribuir o incremento da hidrólise de ATP à ação das ectonucleotidases, como a NTPDase1/CD39, que é responsável por clivar o ATP em em ADP, AMP e ADO (TIMPERI; BARNABA, 2021). Corroborando com isso, em um sítio inflamatório, para além da ação de recrutamento de células do sistema imune pela concentração elevada de ATP (DI VIRGILIO et al., 2017), aumentando os níveis de hidrólise de ATP, parece haver diminuição desses efeitos inflamatórios, principalmente reduzindo o recrutamento de interleucina pró-inflamatória beta 1 (IL-1 β) (CAUWELS et al., 2014). A redução dos níveis de ATP no meio extracelular parece ser mais efetiva para um efeito terapêutico anti-inflamatório do que a ação de inativação dos receptores P2, observa Cauwels et al., (2014).

Quando observada a hidrólise ADP na figura 5b, podemos ver um movimento convergente com a análise das PBMC vista em hidrólise de ATP. Dos grupos pesquisados, evidenciou maiores valores na hidrólise do ADP, no grupo submetido ao tratamento com Óleo EC *C. sativa*. O valor estatístico encontrado no gráfico de comparação da hidrólise de ADP foi de $p < 0,0001$. Assim, novamente é possível sugerir um aumento na ação das ectonucleotidases, como a NTPDase1/CD39, que atua tanto na hidrólise do ATP, quanto na do ADP. É bem estabelecida a afirmação de que há desregulação tanto do sistema imune inato, quanto do adaptativo de um paciente com depressão (BEUREL; TOUPS; NEMEROFF, 2020).

Antonioli et al. (2013) afirma que a sinalização purinérgica, por meio da ação das ectonucleotidases, é capaz de iniciar como uma estimulação pró-inflamatória e tornar-se uma estimulação anti-inflamatória, sempre por conta dos níveis de ATP extracelular, que

induzem inflamação, e dos níveis de adenosina, que, ao se ligar em receptores P1, induzem respostas anti-inflamatórias. Somando com os outros gráficos, na figura 5c, esta análise encontrou um maior número na hidrólise de AMP, com nível de significância $p < 0,001$, no grupo tratado com Óleo *C sativa* em comparação ao grupo estresse salina. A maior hidrólise de AMP, vista no presente estudo, pode ter resultado da atividade da ecto-5'-nucleotidase CD73 (GIULIANI; SARTI; DI VIRGILIO, 2020), responsável por diminuir a quantidade desse marcador purinérgico em meio extracelular. As consequências de uma maior hidrólise de AMP extracelular podem ser benéficas para um cenário anti-inflamatório do organismo, uma vez que contribuem para maior quantidade de adenosina (ANTONIOLI et al., 2013). Algo que corrobora com a discussão, é que Holien et al., (2018) aborda que a CD73 e receptores de adenosina (A1R, A2AR, A2BR, A3R), são expressos em larga escala em todo organismo, e que pela sua diversidade está envolvido tanto em processos fisiológicos com fisiopatológicos. Entretanto, o que chama atenção é o A2AR, que parece ser sinalizado tanto por adenosina como por AMP, sendo este também responsável por ativá-lo, desempenhando um papel anti-inflamatório (HOLIEN et al. 2018).

Há um vasto campo de informações a ser descoberto sobre os efeitos da *Cannabis sativa* e seus metabólitos, como CBD e THC, presentes no óleo de abordagem deste estudo. Porém nessa ampla área de sinalização extracelular, conseguimos abordar um fragmento muito importante do sistema purinérgico, destacando a capacidade do Óleo EC *C. sativa* de estimular a atividade enzimática relacionada à hidrólise de nucleotídeos (ATP, ADP e AMP) em PBMCs. Poucos são os estudos experimentais *in vivo*, envolvendo *Cannabis sativa* e o sistema purinérgico, concomitantemente. Entretanto, existe uma projeção crescente para estes dois tópicos, e nosso estudo traz grandes resultados que corroboram com a ascensão desses estudos. Outrossim, frequentemente analisa-se o composto CBD isolado, e neste estudo há a proposição de que CBD e THC atuam em sinergia. O THC atua como um potencializador dos efeitos benéficos do CBD. Em uma pesquisa realizada com ratos *Sprague Dawley*, Erukainure et al. (2021) indicou, através análise de atividade da ENTPDase em lesões hepáticas, que havia uma redução da atividade desta enzima em tecido hepático lesionado e sem tratamento. Por outro lado, o tratamento com extrato que continha a díade CBD e THC, foram capazes de modular a atividade purinérgica, por meio da restauração da atuação da ENTPDase, ajudando a proteger as células hepáticas dos danos oxidativo e pró-inflamatório, por intermédio da regulação dos níveis de adenosina. Os processos inflamatórios são vistos por muitos autores, como parte importante e constituinte do arcabouço fisiopatológico da depressão e, portanto, tratar ou curar

a depressão passa por terapêuticas com potencial anti-inflamatório, como descrito por Beurel, Toups e Nemeroff (2020).

Destaca-se que, em nosso estudo, não houve diferença significativa entre o grupo controle e o estresse + salina, nas taxas de hidrólise das purinas ATP, ADP e AMP, demonstrando que o estresse intrinsecamente, não é capaz de aumentar a taxa de hidrólise desses nucleotídeos. Esse fenômeno é corroborado por um estudo realizado com ratos *Wistar*, que foram submetidos ao estresse crônico e comparado com controle, posteriormente avaliando as taxas de hidrólise de ATP e ADP em soro sanguíneo (TORRES et al., 2002). Estes tiveram como resultados de sua pesquisa, que a taxa de hidrólise de ATP se manteve inalterada, quando comparados os dois grupos, enquanto que a taxa de hidrólise de ADP teve uma leve redução com significância estatística ($p > 0,005$). Torres et al. (2002) discutem que a invariabilidade e a redução dos parâmetros observados podem ser interpretadas como um efeito adaptativo ao estresse crônico, um fenômeno que, conforme destacado pelos autores, pode ser ainda dependente do tecido ou do material biológico em estudo.

Portanto, observou-se que os resultados obtidos em nossa pesquisa, com tratamento de Óleo EC *C. sativa* em ratos com comportamento tipo depressivo, em parâmetros comportamentais e em biomarcadores bioquímicos, demonstraram concordância com a literatura científica presente. Sendo assim, nosso tratamento com o Óleo EC *C. sativa*, foi capaz de reverter comportamentos depressivos quando comparado ao grupo estresse salina e concomitantemente estudado as respostas de ectonucleotidases, observando-se o efeito redutor de inflamação, isso quando comparados com todos os grupos, inclusive com escitalopram, nosso fármaco de controle positivo. No entanto, faz-se necessário novos estudos na área dessa planta milenar; acreditamos que ainda há muito a ser elucidado, tanto em mecanismos atuantes no sistema purinérgico, quanto em doenças psiquiátricas como a depressão.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO

Nosso estudo demonstrou que o Óleo EC *C. sativa* tem um potencial efeito antidepressivo em ratos Wistar submetidos a estresse por PM e IS, atribuído à sinergia entre THC e CBD. A análise da hidrólise de ATP, ADP e AMP em PBMCs indicou que o óleo estimula a atividade das ectonucleotidases CD39 e CD73, regulando o ambiente inflamatório, contribuindo para reversão de comportamentos tipo depressivos. Esses achados reforçam o potencial do Óleo EC *C. sativa*, como alternativa no tratamento de sintomas depressivos, destacando a importância da sinergia entre THC e CBD na modulação dos sistemas purinérgico e endocanabinoide. Futuros estudos devem investigar esses efeitos em diferentes modelos e contextos biológicos.

REFERÊNCIAS

ABELAIRA, H. M.; REUS, G. Z.; QUEVEDO, J. Animal models as tools to study the pathophysiology of depression. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 35, n. suppl 2, p. S112–S120, 2013.

ALMEIDA, I; NETO, J; ALMEIDA, T, B;. **Princípios Básicos de Pesquisa com Animais de Laboratório**. IFSC, Sergipe, v. 1, ed. 1, 2016.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-5**. 5. ed. Arlington: American Psychiatric Association, 2013.

ANTONIOLI, L. et al. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. **Trends in Molecular Medicine**, v. 19, n. 6, p. 355–367, 1 jun. 2013.

BARTOLI, F. et al. Purinergic Signaling and Related Biomarkers in Depression. **Brain Sciences**, v. 10, n. 3, p. 160, 12 mar. 2020.

BASSO, A. M. et al. Behavioral profile of P2X7 receptor knockout mice in animal models of depression and anxiety: Relevance for neuropsychiatric disorders. **Behavioural Brain Research**, v. 198, n. 1, p. 83–90, mar. 2009.

BEUREL, E.; TOUPS, M.; NEMEROFF, C. B. The Bidirectional Relationship of Depression and Inflammation: Double Trouble. **Neuron**, v. 107, n. 2, jun. 2020.

BRADFORD, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248–254, 7 maio 1976.

BRIGHT, U.; IRIT AKIRAV. Cannabidiol Modulates Alterations in PFC microRNAs in a Rat Model of Depression. v. 24, n. 3, p. 2052–2052, 20 jan. 2023.

BRUNT, T. M.; BOSSONG, M. G. The neuropharmacology of cannabinoid receptor ligands in central signaling pathways. **European Journal of Neuroscience**, 5 dez. 2020.

BURNSTOCK, G.; BOEYNAEMS, J.-M. Purinergic signalling and immune cells. **Purinergic Signalling**, v. 10, n. 4, p. 529–564, 29 out. 2014. **Connexins and Pannexins**. v. 10, 29 jun. 2016.

BURNSTOCK, G. Discovery of purinergic signalling, the initial resistance and current explosion of interest. **British Journal of Pharmacology**, v. 167, n. 2, p. 238–255, 1 set. 2012.

BURNSTOCK, G. Introduction to Purinergic Signaling. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 2041, p. 1–15, 2020.

- BURNSTOCK, G. Purine and purinergic receptors. **Brain and Neuroscience Advances**, v. 2, p. 239821281881749, jan. 2018.
- CARDOSO, A. M. et al. Sinalização purinérgica e suas implicações fisiológicas. **Sinalização purinérgica: implicações fisiopatológicas**, p. 15–27, 2021.
- CARVALHO, V. M. et al. QUANTIFICAÇÃO DE CANABINOIDES EM EXTRATOS MEDICINAIS DE Cannabis POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA. **Química Nova**, v. 43, n. 1, p. 90–97, 1 jan. 2020.
- CAUWELS, A. et al. Extracellular ATP drives systemic inflammation, tissue damage and mortality. **Cell Death & Disease**, v. 5, n. 3, p. e1102–e1102, mar. 2014.
- ČATER, M.; MAJDIČ, G. How early maternal deprivation changes the brain and behavior? **European Journal of Neuroscience**, v. 55, n. 9-10, 28 abr. 2021.
- CIPRIANI, A. et al. Comparative efficacy and acceptability of 12 new-generation antidepressants: a multiple-treatments meta-analysis. **The Lancet**, v. 373, n. 9665, p. 746–758, fev. 2009.
- COUTINHO-SILVA, R.; MORANDINI, A.; SAVIO, L. B. The role of p2x7 receptor in infectious inflammatory diseases and the influence of ectonucleotidases. **Biomedical Journal**, v. 37, n. 4, p. 169, 2014.
- DA SILVA, G. B. et al. High levels of extracellular ATP lead to different inflammatory responses in COVID-19 patients according to the severity. **Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)**, v. 100, n. 4, p. 645–663, 2022.
- DIEZMOS, E. F.; BERTRAND, P.; LIU, L. Purinergic Signaling in Gut Inflammation: The Role of Connexins and Pannexins. v. 10, 29 jun. 2016.
- DI VIRGILIO, F. et al. The P2X7 Receptor in Infection and Inflammation. **Immunity**, v. 47, n. 1, p. 15–31, 18 jul. 2017.
- DI VIRGILIO, F.; SARTI, A. C.; COUTINHO-SILVA, R. Purinergic signaling, DAMPs, and inflammation. **American Journal of Physiology-cell Physiology**, v. 318, n. 5, p. C832–C835, 1 maio 2020.
- DOU, L. et al. Extracellular ATP signaling and clinical relevance. **Clinical Immunology**, v. 188, p. 67–73, mar. 2018.
- ELTZSCHIG, H. K.; SITKOVSKY, M. V.; ROBSON, S. C. Purinergic Signaling during Inflammation. **New England Journal of Medicine**, v. 367, n. 24, p. 2322–2333, 13 dez. 2012.
- ERUKAINURE, O. L. et al. Cannabis sativa L. (var. indica) Exhibits Hepatoprotective Effects by Modulating Hepatic Lipid Profile and Mitigating Gluconeogenesis and Cholinergic Dysfunction in Oxidative Hepatic Injury. **Frontiers in pharmacology**, v. 12, 21 dez. 2021.

FERNANDES, M. R.; PEDROSO, A. R. Animal experimentation: A look into ethics, welfare and alternative methods. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 63, n. 11, p. 923–928, nov. 2017.

FERRARINI, E. G. et al. Broad-spectrum cannabis oil ameliorates reserpine-induced fibromyalgia model in mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 154, p. 113552, out. 2022.

GARCÍA-GUTIÉRREZ, M. S. et al. Cannabidiol: A Potential New Alternative for the Treatment of Anxiety, Depression, and Psychotic Disorders. **Biomolecules**, v. 10, n. 11, 19 nov. 2020.

GIULIANI, A. L.; SARTI, A. C.; DI VIRGILIO, F. Ectonucleotidases in Acute and Chronic Inflammation. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, p. 619458, 2020.

GOULD, T. D.; DAO, D. T.; KOVACSICS, C. E. The Open Field Test. **Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice**, v. 42, p. 1–20, 2009.

GUIMARÃES, M. V.; FREIRE, J. E. DA C.; MENEZES, L. M. B. DE. Utilização de animais em pesquisas: breve revisão da legislação no Brasil. **Revista Bioética**, v. 24, n. 2, p. 217–224, ago. 2016.

HAO, Y. et al. Selecting an Appropriate Animal Model of Depression. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 19, p. 4827, 28 set. 2019.

HOLIEN, J. K. et al. AMP and adenosine are both ligands for adenosine 2B receptor signaling. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 28, n. 2, p. 202–206, 15 jan. 2018.

KARAMOHAMED, S.; GUIDOTTI, G. Bioluminometric Method for Real-Time Detection of ATPase Activity. **BioTechniques**, v. 31, n. 2, p. 420–425, ago. 2001.

KARSCHNER, E. L. et al. Plasma Cannabinoid Pharmacokinetics following Controlled Oral Δ^9 -Tetrahydrocannabinol and Oromucosal Cannabis Extract Administration. **Clinical chemistry**, v. 57, n. 1, p. 66–75, 1 jan. 2011.

KATZ, R. J.; ROTH, K. A.; CARROLL, B. J. Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: Implications for a model of depression. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 5, n. 2, p. 247–251, jun. 1981.

KOPUSTINSKIENE, D. M. et al. Cannabis sativa L. Bioactive Compounds and Their Protective Role in Oxidative Stress and Inflammation. **Antioxidants**, v. 11, n. 4, p. 660, 29 mar. 2022.

KVERNO, K. S.; MANGANO, E. Treatment-Resistant Depression: Approaches to Treatment. **Journal of Psychosocial Nursing and Mental Health Services**, v. 59, n. 9, p. 7–11, set. 2021.

LU, H.-C.; MACKIE, K. Review of the Endocannabinoid System. **Biological Psychiatry: Cognitive Neuroscience and Neuroimaging**, v. 6, n. 6, ago. 2020.

LUKKES, J. L. et al. Adult rats exposed to early-life social isolation exhibit increased anxiety and conditioned fear behavior, and altered hormonal stress responses. **Hormones and Behavior**, v. 55, n. 1, p. 248–256, jan. 2009.

LUNKES, G. I. et al. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies. **Thrombosis Research**, v. 109, n. 4, p. 189–194, fev. 2003.

MAHMOOD, A.; IQBAL, J. Purinergic receptors modulators: An emerging pharmacological tool for disease management. **Medicinal Research Reviews**, v. 42, n. 4, p. 1661–1703, 13 maio 2022.

MÉNARD, C.; HODES, G. E.; RUSSO, S. J. Pathogenesis of depression: Insights from human and rodent studies. **Neuroscience**, v. 321, p. 138–162, maio 2016.

ODIEKA, A. E. et al. The Medicinal Natural Products of Cannabis sativa Linn.: A Review. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 27, n. 5, p. 1689, 4 mar. 2022.

PERTWEE, R. G. The pharmacology of cannabinoid receptors and their ligands: an overview. **International journal of obesity (2005)**, v. 30 Suppl 1, p. S13-8, 2006.

PORSOLT, R. D. et al. Behavioural despair in rats: A new model sensitive to antidepressant treatments. **European Journal of Pharmacology**, v. 47, n. 4, p. 379–391, fev. 1978.

RÉUS, G. Z. et al. Maternal Deprivation Induces Depressive-like Behaviour and Alters Neurotrophin Levels in the Rat Brain. **Neurochemical Research**, v. 36, n. 3, p. 460–466, 1 mar. 2011.

RUSH, A. J. et al. Acute and Longer-Term Outcomes in Depressed Outpatients Requiring One or Several Treatment Steps: A STAR*D Report. **American Journal of Psychiatry**, v. 163, n. 11, p. 1905–1917, nov. 2006.

SARTIM, A. G.; GUIMARÃES, F. S.; JOCA, S. R. L. Antidepressant-like effect of cannabidiol injection into the ventral medial prefrontal cortex—Possible involvement of 5-HT_{1A} and CB₁ receptors. **Behavioural Brain Research**, v. 303, p. 218–227, abr. 2016.

SCHERMA, M. et al. Cannabinoids and their therapeutic applications in mental disorders. **Cannabinoids**, v. 22, n. 3, p. 271–279, set. 2020.

SLUYTER, R. The P2X7 Receptor. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1051, p. 17–53, 2017.

SVIZENSKA, I.; DUBOVY, P.; SULCOVA, A. Cannabinoid receptors 1 and 2 (CB1 and CB2), their distribution, ligands and functional involvement in nervous system structures — A short review. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 90, n. 4, p. 501–511, out. 2008.

TIMPERI, E.; BARNABA, V. CD39 Regulation and Functions in T Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 15, p. 8068, 28 jul. 2021.

TORRES, I. L. S. et al. Chronic stress effects on adenine nucleotide hydrolysis in the blood serum and brain structures of rats. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 74, n. 1, p. 181–186, 1 dez. 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Depressive disorder (depression)**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/depression>>.

ZANELATI, T. et al. Antidepressant-like effects of cannabidiol in mice: possible involvement of 5-HT1A receptors. **British Journal of Pharmacology**, v. 159, n. 1, p. 122–128, 4 dez. 2009.

ZARRINMAYEH, H.; TERRITO, P. R. Purinergic Receptors of the Central Nervous System: Biology, PET Ligands, and Their Applications. **Molecular Imaging**, v. 19, p. 1536012120927609, 15 jun. 2020

ZIMMERMANN, H. History of ectonucleotidases and their role in purinergic signaling. **Biochemical Pharmacology**, v. 187, p. 114322, maio 2021.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito do Estresse na Infância sobre Comportamentos Depressivos na Vida Adulta - Potencial Estratégia Terapêutica do Óleo de Cannabis sativa de Espectro Completo", protocolada sob o CEUA nº 2911170423 (ID 000503), sob a responsabilidade de **Zuleide Maria Ignácio e equipe; Amanda Gollo Bertollo; Maiqueli Eduarda Dama Mingoti; Jesiel de Medeiros; Brunna Varela da Silva** - 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 da Fronteira Sul (CEUA/UFFS) na reunião de 19/05/2023.

We certify that the proposal "Effect of Early Life Stress on Depressive Behaviors in Adult Life - Potential Therapeutic Strategy of Full Spectrum Cannabis sativa Oil", utilizing 40 Heterogenic rats (40 males), protocol number CEUA 2911170423 (ID 000503), under the responsibility of **Zuleide Maria Ignácio and team; Amanda Gollo Bertollo; Maiqueli Eduarda Dama Mingoti; Jesiel de Medeiros; Brunna Varela da Silva** - 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 South Border (CEUA/UFFS) in the meeting of 05/19/2023.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 07/2023 a 06/2025 Área: Ciências da Saúde

Origem: Aplicável ao Biotério

Espécie: Ratos heterogênicos

Linhagem: Wistar

sexo: Machos

idade: 0 a 95 dias

Quantidade: 40

Peso: 6 a 400 g

Realeza, 08 de junho de 2024



Prof. Dra. Fabíola Dalmolin
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Fronteira Sul



Biol. Cássio Batista Marcon
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Fronteira Sul



