



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
LABORATÓRIO DE NEUROBIOLOGIA E BIOMATERIAIS



LAURA FERREIRA E SILVA

**INVESTIGAÇÃO DOS IMPACTOS NA ESPERMATOGÊNESE DE
CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO COMPORTAMENTO TIPO-DEPRESSIVO E
TRATADOS COM CANABIDIOL**

Ouro Preto, MG

2024

LAURA FERREIRA E SILVA

**INVESTIGAÇÃO DOS IMPACTOS NA ESPERMATOGÊNESE DE
CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO COMPORTAMENTO TIPO-DEPRESSIVO E
TRATADOS COM CANABIDIOL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Federal de Ouro Preto, como requisito da disciplina Seminário de Pesquisas e Monografia II (CBI261) para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Ciências Biológicas

Orientadora: Prof^ª. Dra. Katiane de Oliveira P. C. Nogueira

Coorientadores: Prof. Dr. Laser Antônio M. Oliveira
MSc.: Karen del Carmen Barboza Salgado

Ouro Preto, MG

2024

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

S586i Silva, Laura Ferreira e.
Investigação dos impactos na espermatogênese de camundongos submetidos ao comportamento tipo-depressivo e tratados com canabidiol. [manuscrito] / Laura Ferreira e Silva. - 2024.
38 f.: il.: color., gráf., tab..

Orientadora: Profa. Dra. Katiane de Oliveira P. C. Nogueira.
Coorientadores: Ma. Karen del Carmen Barboza Salgado, Prof. Dr. Laser Antônio M. Oliveira.
Monografia (Bacharelado). Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Graduação em Ciências Biológicas .

1. Camundongos. 2. Isolamento social. 3. Depressão. 4. Canabidiol. 5. Espermatogênese. I. Nogueira, Katiane de Oliveira P. C.. II. Oliveira, Laser Antônio M.. III. Salgado, Karen del Carmen Barboza. IV. Universidade Federal de Ouro Preto. V. Título.

CDU 615.25

Bibliotecário(a) Responsável: Luciana De Oliveira - SIAPE: 1.937.800



FOLHA DE APROVAÇÃO

Laura Ferreira e Silva

Investigação dos impactos na espermatogênese de camundongos submetidos ao comportamento tipo-depressivo e tratados com canabidiol

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas, modalidade bacharelado da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel

Aprovada em 17 de outubro de 2024

Membros da banca

Dra. Katiane de Oliveira Pinto Coelho Nogueira - Orientadora
Dra. Danielle Barbosa Moraes (Universidade Federal de Ouro Preto)
M.Sc. Ana Luiza Sciandretti de Albuquerque - (Universidade Federal de Ouro Preto)

Katiane de Oliveira Pinto Coelho Nogueira, orientadora do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito na Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 13/11/2024



Documento assinado eletronicamente por **Katiane de Oliveira Pinto Coelho Nogueira, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 13/11/2024, às 08:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0810043** e o código CRC **0318E081**.

RESUMO

O isolamento social em animais naturalmente sociáveis, como os camundongos, está associado ao desenvolvimento de comportamentos ansiosos e depressivos. Uma potencial alternativa terapêutica é o canabidiol (CBD), um composto derivado da *Cannabis sativa*. Este estudo teve como objetivo investigar as alterações na espermatogênese de camundongos da linhagem C57BL/6 submetidos ao isolamento social durante 12 semanas e tratados com CBD na dose de 30 mg/kg. Foram realizadas análises histológicas e histomorfométricas de cortes transversais dos túbulos seminíferos nos estágios inicial, intermediário e tardio do ciclo do epitélio seminífero, visando avaliar mudanças estruturais induzidas pelas condições experimentais. Os resultados mostraram que, embora não houvesse diferença no peso do testículo dos animais, observou-se uma predominância do estágio inicial do ciclo do epitélio seminífero em relação aos demais estágios, com uma redução da frequência do estágio tardio. Em termos histomorfométricos, o CBD induziu um aumento na altura do epitélio seminífero no estágio intermediário, enquanto o isolamento social aumentou a altura no estágio tardio, e a área total dos túbulos seminíferos nos três estágios. Esse crescimento dos túbulos sugere uma possível adaptação para a produção dos espermatozoides, mas a literatura aponta que tanto o estresse crônico causado pelo isolamento social quanto o uso prolongado de CBD podem prejudicar o sistema reprodutivo masculino, afetando esse processo. A ausência de estudos que abordem as mesmas variáveis histomorfométricas e a falta de análises complementares neste trabalho impediram conclusões definitivas sobre os fatores que contribuíram para o aumento dos túbulos seminíferos e se ele foi acompanhado ou não de uma ampliação no rendimento da espermatogênese. Para esclarecer essa questão, trabalhos futuros devem realizar a quantificação dos níveis séricos de testosterona, LH e FSH, a contagem das células de Sertoli, Leydig e de outras células germinativas, avaliar o diâmetro dos túbulos seminíferos, bem como a análise quantitativa e qualitativa dos espermatozoides, avaliando se apresentam ou não anormalidades.

Palavras-chave: Camundongos, Isolamento social, Depressão, Canabidiol, Espermatogênese

ABSTRACT

Social isolation in naturally sociable animals, such as mice, is associated with the development of anxious and depressive behaviors. A potential therapeutic alternative is cannabidiol (CBD), a compound derived from *Cannabis sativa*. This study aimed to investigate changes in the spermatogenesis of C57BL/6 mice subjected to social isolation for 4 weeks and treated with CBD (30 mg/kg). Histological and histomorphometric analyses were carried out on cross-sections of seminiferous tubules in the early, middle, and late stages of the seminiferous epithelium cycle to assess structural changes induced by the experimental conditions. The results showed that, although there was no difference in the testis weight of the animals, there was a predominance of the early stage of the seminiferous epithelium cycle to the other stages, with a reduction in the frequency of the late stage. In histomorphometric terms, CBD induced an increase in the height of the epithelium in the intermediate stage, while social isolation increased the height in the late stage and the total area of the tubule in all three stages. This tubule growth suggests a possible adaptation for sperm production. Still, the literature points out that both chronic stress caused by social isolation and prolonged use of CBD can damage the male reproductive system, affecting this process. The absence of studies addressing the same histomorphometric variables and the lack of complementary analyses in this study prevented definitive conclusions about the factors that contributed to the enlargement of the seminiferous tubules and whether or not an increase in the yield of spermatogenesis accompanied it. To clarify this issue, future studies should quantify serum levels of testosterone, LH, and FSH, count Sertoli cells, Leydig cells, and other germ cells, assess the diameter of the seminiferous tubules, as well as quantitative and qualitative analysis of the spermatozoa, assessing whether or not they are abnormal.

Keywords: Mice, Social isolation, Depression, Cannabidiol, Spermatogenesis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Esquema ilustrativo dos túbulos seminíferos	1
Figura 2 Organização esquemática da estratificação de células da linhagem germinativa da espermatogênese	3
Figura 3 Processamento histológico dos testículos de camundongos C57BL/6.	13
Figura 4 Peso dos testículos dos camundongos C57BL/6 após isolamento social e tratamento com CBD	15
Figura 5 Fotos de cortes transversais dos túbulos seminíferos de camundongos C57BL/6. .	16
Figura 6 Frequência de cortes transversais dos túbulos seminíferos nos estágios inicial, intermediário e tardio da espermatogênese de camundongos C57BL/6.....	17
Figura 7 Delineamento das medidas histomorfométricas dos túbulos seminíferos de camundongos C57BL/6.....	18
Figura 8 Altura do epitélio seminífero nos estágios inicial, intermediário e tardio da espermatogênese em camundongos C57BL/6.....	19
Figura 9 Área total dos cortes transversais dos túbulos seminíferos nos estágios inicial, intermediário e tardio da espermatogênese de camundongos C57BL/6.....	20

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Associação dos tipos de células germinativas presentes nas várias fases do ciclo do epitélio seminífero do camundongo.....	4
Tabela 2 Número de cortes transversais de túbulos seminíferos presentes em cada um dos estágios da espermatogênese de camundongos C57BL/6.....	16
Tabela 3 Alterações estatisticamente significantes observadas nos grupos experimentais....	21
Tabela 4 Condições experimentais responsáveis pelas alterações observadas.....	21

LISTA DE ABREVIATURAS

2-AG	2-araquidonilglicerol
5-HT1A	Receptor 5-hidroxitriptamina 1A
A/A1-A4	Espermatogônia diferenciada- população A
AEA	Anandamida
ABHD12	Domínio 12 da serina hidrolase α - β -hidrolase
ABHD6	Domínio 6 da serina hidrolase α - β -hidrolase
ABP	Proteína ligadora de andrógenos
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
B	Espermatogônia diferenciada - população B
CBD	Canabidiol
CB1	Receptor canabinoide tipo 1
CB2	Receptor canabinoide tipo 2
COX-2	Ciclooxigenase 2
CUS	Estresse crônico imprevisível
D	Diacinese
D.M. 1 e 2	Divisão meiótica 1 e 2
DSM	Manual de Diagnóstico e Estatística das Perturbações Mentais
EMA	Agência Europeia de Medicamentos
FAAH	Amida hidrolase de ácidos graxos
FDA	Food and Drug Administration
GnRH	hormônio liberador de gonadotrofina
GPR55	Receptor acoplado à proteína G 55
GPCR	Receptores canabinoides acoplados à proteína G
In	Espermatogônia diferenciada população - intermediária
L	Leptóteno
LH	Hormônio luteinizante da hipófise
LGS	Síndrome de Lennox-Gastaut
LOX	Lisoenzimas lipooxigenase
MAGL	Monoacilglicerol lipase
NAAA	Naciletanolamina amidase do ácido hidrolisante
P	Paquíteno
TEPT	Transtorno de estresse pós-traumático
SD	Síndrome de Dravet

SEC	Sistema Endocanabinoide
SNC	Sistema nervoso central
TDM	Transtorno depressivo maior
TrpV1	Potencial receptor transitório canal catiônico subfamília V membro 1
TSC	Complexo de esclerose tuberosa
Z	Zigóteno

SUMÁRIO

1. Introdução	1
1.1. Espermatogênese	1
1.2. Isolamento Social e Comportamento Tipo-Depressivo	5
1.3. Canabidiol e Sistema Endocanabinoide.....	6
2. Justificativa	9
3. Objetivos.....	10
3.1. Objetivo Geral	10
3.2. Objetivos Específicos	10
4. Materiais e Métodos.....	11
4.1. Animais	11
4.2. Isolamento Social	11
4.3. Tratamento	11
4.4. Eutanásia	12
4.5. Processamento Histológico	12
4.6. Análise dos Estágios da Espermatogênese	13
4.7. Análise das Medidas Histomorfométricas	14
4.8. Análises Estatísticas	14
5. Resultados	15
5.1. Peso dos Testículos	15
5.2. Estágios da Espermatogênese	15
5.3. Análises Histomorfométricas	18
5.3.1. <i>Altura do Epitélio Seminífero (h)</i>	18
5.3.2. <i>Área Total dos Cortes Transversais do Túbulo Seminífero (S0)</i>	19
5.4. Síntese das Análises Observadas	21
6. Discussão	22
7. Conclusão	27
Referências	28
Anexo A: Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFOP).....	38

1. INTRODUÇÃO

1.1. Espermatogênese

A espermatogênese é o processo de formação dos gametas masculinos, os espermatozoides, a partir de células precursoras da linhagem germinativa, que garantem que o sistema reprodutor masculino se torne funcional (DISSANAYAKE; KEERTHIRATHNA; PEIRIS, 2019). Ela ocorre nos túbulos seminíferos, no parênquima dos testículos, de forma ordenada e contínua, onde as células germinativas precursoras, as espermatogônias-tronco, passam pelas fases de espermatogônia, espermatócito – primário e secundário – e espermátides redondas e alongadas até se tornarem espermatozoides, que serão liberados no lúmen dos túbulos (MEISTRICH; HESS, 2013). O túbulo seminífero (Fig. 1) é uma estrutura altamente dinâmica que passa por uma constante remodelação ao longo da vida para possibilitar a produção de espermatozoides. Ele é caracterizado por comunicações complexas entre células germinativas intimamente conectadas e células somáticas especializadas (CLÉMENT et al., 2021). Essas células da linhagem germinativa, juntamente às células de Sertoli compõem o epitélio seminífero, formando numerosas camadas concêntricas (HESS, FRANÇA, 2005).

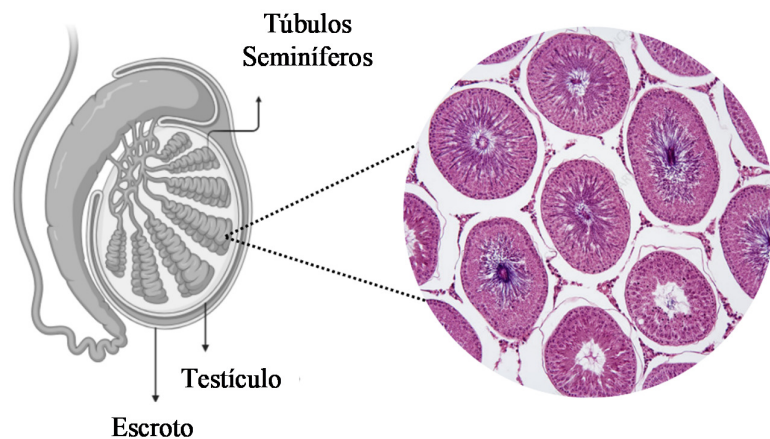


Figura 1: Esquema ilustrativo dos túbulos seminíferos. Os túbulos seminíferos localizam-se no interior do testículo, que é envolvido e protegido pelo escroto. À direita, observa-se uma seção histológica dos túbulos seminíferos. Fonte: Criado em BioRender.com/ imagem: Science Photo Library Search

A cinética da diferenciação das células germinativas é regulada com precisão, garantindo que sempre sejam encontrados em associação os estágios de espermatogônias, espermatócitos, espermátides redondas e espermátides tardias. Diante disso, nas secções transversais de túbulos seminíferos, é comum identificar cerca de quatro gerações de células germinativas (MEISTRICH; HESS, 2013).

As células de Sertoli são as únicas células somáticas presentes nos túbulos seminíferos. Elas criam um microambiente altamente especializado para que a espermatogênese se processe, além de desempenharem inúmeras funções como a reabsorção de corpos residuais, produção da proteína de ligação ao andrógeno (ABP), formação da barreira hematotesticular e sustentação mecânica e nutricional das células da linhagem germinativa (DE KRETZER et al., 1998). No espaço intersticial estão presentes os vasos sanguíneos que circundam células intersticiais e as células de Leydig (RUSSELL, 1993). As segundas produzem e secretam diversos andrógenos, incluindo a testosterona, hormônio responsável pelo início, processamento e manutenção da espermatogênese (HOLSTEIN; SCHULZE; DAVIDOFF, 2003).

Sendo assim, os hormônios são os fatores mais importantes no controle da espermatogênese, dependendo da ação do hormônio folículo-estimulante (FSH), que age nas células de Sertoli promovendo a síntese e a secreção de proteína ligante de andrógeno-ABP, e do hormônio luteinizante da hipófise (LH), que age nas células de Leydig estimulando a produção de testosterona. A alta concentração desse hormônio andrógeno no túbulo seminífero é uma condição muito importante para estimular a espermatogênese (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2018). Estudos anteriores em modelos murinos demonstraram que os hormônios sexuais, em concentrações fisiológicas normais, são cruciais para a produção de espermatozoides, sendo assim, qualquer desvio nesses níveis pode impactar significativamente o ciclo espermatogênico (ATANASSOVA et al., 1999; STANTON et al., 2012). Portanto, a regulação e manutenção da espermatogênese estão associadas às funções endócrinas do organismo, de modo que alterações hormonais causadas pelo estresse podem afetar esse processo (BHONGADE et al., 2015; HARDY et al., 2005; JANEVIC et al., 2014; LI et al., 2020; MCGRADY, 1984).

As células-tronco espermatogoniais são essenciais para a fertilidade masculina, uma vez que representam a base da espermatogênese (PHILLIPS; GASSEI; ORWIG, 2010). Essas células possuem potenciais de autorenovação, para manter a produção de espermatogônias-tronco (tipo A), e de se diferenciarem em espermatogônias do tipo B (DE ROOIJ; GROOTEGOEDT, 1998). Essas células precursoras diploides, que residem nas membranas basais dos túbulos seminíferos, sofrem mitoses sucessivas e aumentam de tamanho para dar origem aos espermátócitos primários. Estes, ainda diploides, realizam a primeira divisão meiótica, que é reducional, originando os espermátócitos secundários, células já haploides. A partir deles serão formadas as espermátides arredondadas, por uma divisão meiótica equacional (Fig. 2). Na última etapa da espermatogênese, chamada de espermiogênese, as espermátides

arredondadas e haploides se diferenciam em espermátides alongadas e finalmente em espermatozoides, células altamente especializadas que são liberadas no lúmen dos túbulos seminíferos (HESS; FRANÇA, 2008).

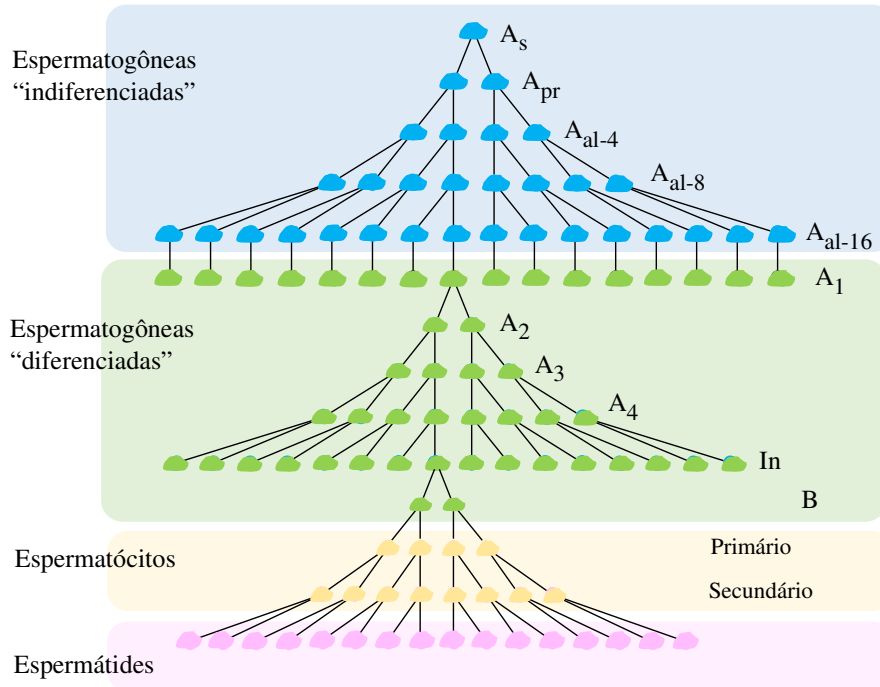


Figura 2: Organização esquemática da estratificação de células da linhagem germinativa da espermatogênese. Populações de espermatogônias indiferenciadas, que possuem atividade de células tronco, representada pelas populações A_s , A_{pr} , A_{al-4} , A_{al-8} e A_{al-16} . Já as espermatogônias diferenciadas são representadas pelas populações A_1 - A_4 , In e B, que irão se transformar nos espermatócitos primários e secundários para dar origem, então, às espermátides. Fonte: Adaptado de (YOSHIDA, 2010).

Na espermatogênese, denomina-se "estágios" as conexões típicas de células germinativas identificadas em cortes transversais dos túbulos seminíferos, representando as diferentes fases que compõem esse processo (AHMED; DE ROOIJ, 2009). Em camundongos, pelo método do sistema acrossômico, foram descritos 12 estágios que acontecem por volta de 8.6 dias (CLERMONT; TROTT, 1969; OAKBERG, 1956), com capacidade de produzir até 40 milhões de espermatozoides por grama de parênquima testicular diariamente, mesmo por um reduzido grupo de células tronco – o que indica uma alta eficiência espermática (TEGELENBOSCH; DE ROOIJ, 1993; THAYER et al., 2001; VALLI et al., 2015).

Já em humanos, todo o processo espermatogênico é mais longo e dura cerca de 64 dias, gerando uma quantidade reduzida de 4,4 milhões de espermatozoides por grama de parênquima testicular e apresentando apenas 6 estágios do ciclo do epitélio seminífero, também pelo método do sistema acrossômico (HESS; FRANÇA, 2008; VALLI et al., 2015; CLERMONT, 1966).

Cada um dos estágios revela distintas associações celulares que variam conforme o tipo de espermatogônia presente (A, In, B), a fase específica da meiose em que os espermátocitos se encontram (pré-leptóteno, leptóteno, zigóteno, paquíteno e diplóteno), assim como o tipo (1 a 16) e a quantidade (exclusivamente redonda, exclusivamente alongada ou ambas) de espermátides em um corte específico (Tab. 1) (HESS; FRANÇA, 2008). A identificação e avaliação dos estágios da espermatogênese podem indicar mudanças histopatológicas nas células reprodutivas de animais (LI et al., 2019; VANGOMPEL; XU, 2010).

Estágios/Tipos Celulares	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
Espermátides	13	13	14	14	15	15	16	16				
Espermátides	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Espermatócitos	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P/D	D	DM 1 E 2
Espermatogônia	A	In	B	B	B	B/pL	pL	pL/L	L	L/Z	Z	Z/P
Espermatogônia							A	A	A	A	A	A

Tabela 1: Associação dos tipos de células germinativas presentes nas várias fases do ciclo do epitélio seminífero do camundongo. De acordo com o método do sistema acrossômico, os números romanos identificam os 12 estágios do ciclo do epitélio seminífero, enquanto os números de 1 a 8 denotam as espermátides redondas, e os números de 9 a 16 indicam as espermátides alongadas. As espermatogônias diferenciadas são representadas pelas populações A, In e B. Já os termos pL, L, Z, P, D e D.M. 1 e 2, indicam a fase da meiose em que se encontra espermátocito no processo de divisão celular. Fonte: Adaptado de (AHMED; DE ROOIJ, 2009).

A sequência de eventos que ocorre desde o desaparecimento de uma determinada associação celular até seu reaparecimento em uma determinada área do epitélio seminífero constitui o ciclo do epitélio seminífero (BERNDTSON, 1977). Já a maneira sincronizada pela qual acontece a diferenciação espermatogênica recebe o nome de “onda do epitélio seminífero”, nela, as células germinativas mudam de forma cíclica com as outras camadas ao longo do tempo, dando origem a uma sequência sucessiva de estágios, que vão se repetindo ao longo do comprimento dos túbulos. Sendo assim, o estágio I é sucedido pelo estágio II, seguido pelo estágio III e assim por diante, até alcançar o estágio XII, que retorna ao estágio I. A formação dessa sequência é gerada pelo desenvolvimento coordenado de unidades clonais de células germinativas. (PEREY; CLERMONT; LEBLOND, 1961; RUSSELL, 1993). Sendo assim, o processo de espermatogênese em camundongos, desde as espermatogônias indiferenciadas do tipo A até a formação dos espermatozoides maduros, requer 4 ciclos, que ocorrem ao longo de aproximadamente 35 dias (RUSSEL, 1993).

Apesar da importância dos mecanismos regulatórios na espermatogênese, estudos

indicam que esse processo é vulnerável a influências externas, como o uso crônico de canabidiol (CBD) (CAPODICE; KAPLAN, 2021; CARVALHO et al., 2018, 2022; DALTERIO et al., 1984; LIM; SQUIRE; JUNG, 2023; PACEY et al., 2014; THOMPSON, 1993) e o estresse advindo de comportamentos tipo-depressivo (BHONGADE et al., 2015; HARDY et al., 2005; JANEVIC et al., 2014; LI et al., 2020; MCGRADY, 1984).

1.2. Isolamento Social e Comportamento Tipo-Depressivo

O isolamento social se tornou um assunto recorrente desde que a pandemia do COVID19 atingiu todo o mundo e tornou necessária a adoção do distanciamento como medida indispensável para conter a disseminação da doença (FELDMAN et al., 2022). Para as espécies altamente sociais, como a maioria dos mamíferos, o isolamento é um estressor associado a uma variedade de efeitos nocivos, incluindo raiva, pensamentos obsessivos, perturbações cognitivas, insônia, perturbação de estresse pós-traumático (PTSD), problemas de controle dos impulsos, perda de identidade, paranoia e psicose (BRAIN; BENTON, 1979; JAMES; VANKO, 2021).

A exposição crônica de modelos animais ao isolamento pode impactar o funcionamento do sistema cardiovascular, das atividades neuroendócrinas e induzir um aumento na incidência de comportamentos associados à ansiedade e depressão (BOSCH et al., 2009; GRIPPO; CUSHING; CARTER, 2007; GRIPPO et al., 2007; MEDENDORP et al., 2018). As mudanças observadas em modelos murinos estão relacionadas a alterações cerebrais como, alterações na plasticidade sináptica, redução no número global de neurônios e na vascularização (BLANCO-SUAREZ, 2019; LOBEL; AKIL, 2018). As consequências dessas alterações são observadas em aspectos fisiológicos e comportamentais, que podem desencadear o aparecimento nos roedores de sintomas semelhantes aos do transtorno depressivo maior (TDM) e a ansiedade em humanos (CHALLA et al., 2023; GRIPPO; CUSHING; CARTER, 2007; KIM; KIRKPATRICK, 1966).

O transtorno depressivo maior é caracterizado pela manifestação de uma extensa variedade de sintomas, que abrangem desde aspectos emocionais, motivacionais, cognitivos e fisiológicos (EVANS et al., 2005). De acordo com a Organização Mundial de Saúde, os distúrbios depressivos passaram a ser a principal causa de incapacidade, ultrapassando todas as demais condições físicas ou mentais (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017). Conforme o Manual de Diagnóstico e Estatística das Perturbações Mentais (DSM), o TDM é identificado por dois sinais principais: o humor deprimido e a perda de interesse e prazer nas atividades, conhecida como anedonia. Além desses, há também sintomas secundários, incluindo pensamentos recorrentes de morte e/ou suicídio, dificuldades de atenção ou concentração, sentimentos de inutilidade, culpa excessiva ou inadequada, fadiga ou perda de energia, agitação,

atraso psicomotor, insônia ou hipersonia e perda ou aumento significativo de peso (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013). Além disso, ele também se associa a uma variedade de efeitos adversos e formas de incapacidade funcional, incluindo o desenvolvimento de condições como diabetes, ataques cardíacos, doenças coronárias, acidentes vasculares cerebrais, alguns tipos de cânceres e disfunções reprodutivas (KESSLER et al., 2015; DAWOOD et al., 2013; BRESLAU et al., 2008; GILLEN et al., 2001).

Muitos transtornos somáticos e mentais decorrentes desse estresse crônico, incluindo a depressão (SCHMIDT et al., 2010), levam à disfunção da espermatogênese (FENSTER et al., 1997; JANEVIC et al., 2014). Estudos clínicos indicam que ele reduz a contagem e a motilidade de espermatozoides humanos (GOLLENBERG et al., 2010; FENSTER et al., 1997); e trabalhos utilizando modelo animal revelaram declínio significativo na capacidade de fertilização, atraso da maturação testicular e danos orgânicos em células da linhagem germinativa masculina (ALMEIDA et al., 2000; SAKI et al., 2009; RIBEIRO et al., 2018; WANG et al., 2017).

Induzir esse estresse em roedores através do isolamento social, tem sido utilizado como um bom modelo para desencadear o comportamento do tipo-depressivo, com consequências semelhantes às aquelas observadas em seres humanos (MARTIN; BROWN, 2010). Essa separação de animais adultos resulta no surgimento de características tipo-depressivas como, anedonia, déficits exploratórios relacionados à ansiedade, aumento na imobilidade durante o teste de natação forçada, entre outros comportamentos relacionados (KIM; HAN, 2006; LEE et al., 2013; ULLOA et al., 2010; VOORHEES et al., 2013).

Dada a frequência, os custos, os efeitos adversos e o impacto funcional das perturbações depressivas, o desenvolvimento de estratégias de avaliação e intervenção são de suma importância (ROSE et al., 2020). Uma vez que os métodos tradicionais se mostram limitados, a busca por novas alternativas de terapia se tornou necessária (LEDFORD, 2014).

1.3. Canabidiol e Sistema Endocanabinoide

O canabidiol (CBD) é um fitocanabinoide não psicomimético, extraído de plantas do gênero *Cannabis*, que vem sendo extensamente estudado por suas características farmacológicas (CAPODICE; KAPLAN, 2021). Além disso, o aumento do consumo recreativo da planta *Cannabis sativa* nas décadas de 1960 e 1970 impulsionou a intensificação das pesquisas voltadas ao isolamento de seus principais constituintes (ZUARDI, 2006). A progressão dos estudos tem apontado o CBD como uma possível estratégia terapêutica para o tratamento de quadros de depressão e ansiedade (GARCÍA-GUTIÉRREZ et al., 2020).

A eficácia do CBD é comprovada no tratamento da epilepsia, um distúrbio do sistema

nervoso central. Nesse sentido foi desenvolvido um medicamento comercialmente conhecido como Epidiolex®, à base de CBD, aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos EUA em 2018 e pela Agência Europeia de Medicamentos (EMA) em 2019, como tratamento complementar para duas epilepsias raras: síndrome de Dravet (SD) e síndrome de Lennox-Gastaut (LGS). Em 2020 e 2021, ambas as organizações também deram aval à formulação oral do medicamento destinado ao tratamento do complexo de esclerose tuberosa (TSC) (EPIDIOLEX, 2024.; U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2020). Outro medicamento, chamado Sativex®, um spray oral contendo CBD e THC delta-9 na proporção de 1:1, foi aprovado em vários países, incluindo Reino Unido, União Europeia e Canadá, para o tratamento da espasticidade associada à esclerose múltipla (SATIVEX®, s.d.). No Brasil, a farmacêutica Prati-Donaduzzi detém os direitos legais para produzir e comercializar soluções de CBD, cujo uso é controlado pela ANVISA e autorizado para o tratamento de enfermidades específicas, como a epilepsia, em humanos e animais, sendo sua utilização condicionada à receita médica e ao cumprimento das diretrizes da ANVISA para assegurar a segurança e eficácia do tratamento (BASTOS; BONORINO, 2022; HADDAD; RAMOS; DE FREITAS; JÚNIOR et al., 2022; OSORIO-DE-CASTRO, 2024; REZENDE; TOFFANO, 2021; SANTOS PINTO; ESHER; DOS SANTOS OLIVEIRA; WORLD HEALTH, 2016).

Além da utilização do CBD ser aprovada por agências de segurança em saúde, muitas pesquisas vêm apresentando novas perspectivas terapêuticas, que ainda precisam de mais estudos, relacionadas a distúrbios alimentares e do sono, convulsões, transtorno do espectro autista, doença de Huntington, Parkinson e Alzheimer (BARCHEL et al., 2019; CHAVES; FURTADO; MATHEUS, 2022; MILLAR et al., 2019). Estudos prévios também mostraram a sua possível eficácia antimicrobiana, imunossupressora, antiemética, antireabsortiva, espasmolítica, antitumoral, antifibrótica e anticonvulsivante (AVIELLO et al., 2012; EL-REMESSY et al., 2006; KARMAUS et al., 2013; PISANTI et al., 2017).

Os mecanismos de ação do CBD no organismo ainda estão sob investigação, mas é conhecido que os mamíferos possuem um sistema específico onde atuam endocanabinoides e fitocanabinoides (MOUSLECH; VALLA, 2009). O sistema endocanabinoide humano (ECS) é formado pelos receptores canabinoides acoplados à proteína G (GPCR), do tipo 1 e 2 (CB1 e CB2) e seus principais ligantes endógenos, que são responsáveis por modular suas atividades, chamados de endocanabinoides, sendo eles o araquidonoiletanolamida (AEA ou anandamida) e 2- araquidonoilglicerol (2- AG), ambos derivados do ácido araquidônico (HILL et al., 2009; HILLARD, 2000; HOWLETT, 2002 TSUBOI et al., 2018) e por duas famílias principais de enzimas, a amida hidrolase de ácidos graxos (FAAH) e a monoacilglicerol lipase (MAGL)

(VANDEVOORDE; LAMBERT, 2007).

Os receptores CB1 são amplamente expressos no sistema nervoso central (SNC), estando mais abundante em áreas do cérebro associadas ao controle motor, respostas emocionais, comportamento motivado e homeostase energética, mas também estão presentes no fígado, pulmões, trato gastrointestinal, músculos, coração, pâncreas, tecido adiposo, sistema imune e sistema reprodutivo. Já os receptores CB2 são encontrados principalmente em células e tecidos relacionadas ao sistema imunológico, como em leucócitos, timo, baço e medula óssea e também podem ser identificados em ossos, na pele, no pâncreas e no fígado (PENG et al., 2022; REZENDE et al., 2023).

Os endocanabinoides 2-AG e AEA são mantidos em seus níveis basais pelas enzimas FAAH e MAGL (VANDEVOORDE; LAMBERT, 2007). No entanto, os endocanabinoides também podem ser hidrolisados pela ciclooxigenase-2 (COX-2), pela nacetanolamina amidase do ácido hidrolisante (NAAA), por isoenzimas lipo-oxigenase (LOX), por serinas hidrolases α - β -hidrolase (ABHD6, ABHD12) e pelo citocromo P-450 (BORNHEIM et al., 1993; MARRS et al., 2010; SAVINAINEN; SAARIO; LAITINEN, 2012; UEDA et al., 1995; UEDA; TSUBOI; UYAMA, 2010; YU; IVES; RAMESHA, 1997).

Embora sistema endocanabinoide seja primariamente um sistema neuromodulador central e periférico, responsável pela regulação da resposta neuroendócrina ao estresse, seus componentes estão amplamente distribuídos pelo organismo, sendo capazes de interagirem com outros sistemas, como o reprodutor. No contexto masculino, esses elementos estão presentes nos corpos cavernosos, vesículas seminais, testículos e espermatozoides, destacando o importante papel que o SEC desempenha na regulação do sistema reprodutor masculino. (CAPODICE; KAPLAN, 2021).

O CBD possui um mecanismo de ação múltiplo, uma vez que atua em diferentes sistemas, como os sistemas serotoninérgico, opioide e o endocanabinoide (KATHMANN et al., 2006; PERTWEE, 2008, RUSSO, 2005). Nesse último, sua ação é realizada através de modulação alostérica negativa com os receptores CB1 e CB2, aos quais possui uma fraca afinidade (CHYE et al., 2019; LAPRAIRIE et al., 2015; MARTÍNEZ- PINILLA et al., 2017; MORALES et al., 2016). Além destes receptores, o CBD interage com outros receptores neurais, incluindo Gpr55, TrpV1 e 5-HT1A (ZUARDI et al., 2017). Essa diversidade de efeitos do CBD através de múltiplas vias parece ser a explicação para sua potencial aplicabilidade em variadas abordagens terapêuticas (CAPODICE; KAPLAN, 2021).

2. JUSTIFICATIVA

Este estudo se justifica pelo crescente uso terapêutico de fitocanabinoides – especialmente o canabidiol – e pela intensificação de fatores de estresse social, como o isolamento social. Ambos têm sido relacionados a disfunções no sistema reprodutivo masculino, impactando diretamente a espermatogênese e a fertilidade, já que este processo é particularmente vulnerável a influências externas.

Trabalhos anteriores indicam que o isolamento social, uma forma de estresse crônico, pode desencadear respostas fisiológicas e comportamentais prejudiciais. Animais submetidos a essa condição apresentam não apenas comportamentos ansiosos e depressivos, mas também disfunções no eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, um dos principais reguladores da espermatogênese.

Quanto ao uso crônico de CBD, embora ele, aparentemente, apresente características farmacológicas em diversas condições, estudos sugerem que pode afetar negativamente o sistema reprodutivo. Sendo assim, embora haja evidências científicas que sustentem o potencial terapêutico do CBD, os impactos de seu uso prolongado ainda não foram totalmente esclarecidos. Aparentemente, o seu uso contínuo pode interferir negativamente na espermatogênese.

Portanto, investigar os efeitos do isolamento social e do CBD sobre a espermatogênese é essencial para compreender melhor os impactos dessas condições e desenvolver estratégias que preservem a fertilidade masculina.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Investigar as mudanças na dinâmica da espermatogênese em camundongos C57BL/6 que foram submetidos ao isolamento social e tratados com canabidiol.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o impacto da indução do comportamento do tipo depressivo através do isolamento social no ciclo do epitélio seminífero;
- Avaliar o impacto do uso crônico do canabidiol no ciclo do epitélio seminífero;
- Analisar a histomorfometria dos túbulos seminíferos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais

Para a realização deste trabalho foram utilizados 36 camundongos isogênicos machos adultos (de 10 a 12 semanas) da linhagem C57BL/6 divididos em 4 grupos experimentais (n=9): (1) Veículo agrupado, (2) CBD agrupado, (3) Veículo isolado e (4) CBD isolado. Os animais foram alojados em caixas de plástico medindo 20,5 x 30 x 13 cm, forradas com maravalha que foram mantidas em uma sala do Centro de Ciência Animal (CCA) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), com temperatura controlada de 23°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) e umidade relativa do ar em torno de 70%. O ambiente seguiu um ciclo de iluminação reverso de 12 horas claro/12 horas escuro, com as luzes se apagando às 18:00 e acendendo às 06:00. Os animais tiveram acesso *ad libitum* a ração comercial e água filtrada.

Todos os protocolos experimentais do projeto foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Ouro Preto (protocolo nº 9436050721-CEUA/UFOP).

4.2. Isolamento social

A indução do comportamento tipo-depressivo por isolamento social foi realizada adaptando o modelo de Martin e Brown (2010). Os camundongos isolados permaneceram em caixas individuais durante 12 semanas (BUCKNER et al., 2008) e o teste de preferência à sacarose foi realizado na 8ª e 12ª semana de isolamento para confirmar a anedonia. Já os camundongos agrupados foram dispostos em gaiolas com 3 animais cada.

4.3. Tratamento

Após 8 semanas de isolamento, iniciou-se o protocolo de tratamento; assim, as últimas 4 semanas de isolamento também foi acompanhada da administração de CBD ou veículo.

O tratamento com CBD na dose de 30 mg/kg/dia (Prati-Donaduzzi 50 mg/ml solução oral em frascos com 30 ml) via gavagem dos grupos isolado e agrupado foi realizado sob autorização da ANVISA pelo protocolo número 25352.893423/2131. A administração foi feita por 4 semanas e o volume foi corrigido diariamente com base no peso do animal. Os camundongos isolados e agrupados utilizados como controle receberam óleo de girassol como veículo.

A dose de CBD escolhida para o tratamento foi feita com base na literatura e dados obtidos em uma investigação piloto realizada pelo grupo de pesquisa do Laboratório de

Neurobiologia e Biomateriais da UFOP (dados não publicados) (HARTMANN; LISBOA; SONEGO; COUTINHO et al., 2019; VIUDEZ-MARTÍNEZ; GARCÍA- GUTIÉRREZ; MEDRANO RELINQUE; NAVARRÓN et al., 2019).

4.4. Eutanásia

Após as 4 semanas de tratamento, totalizando 12 semanas de isolamento ou agrupamento, os camundongos passaram por testes comportamentais e foram eutanasiados por deslocamento cervical (CLARKSON; MARTIN; MCKEEGAN, 2022) seguindo as orientações da Resolução Normativa CONCEA nº 37/2018. Após a eutanásia os animais passaram por incisão na bolsa escrotal e coleta dos testículos e epidídimos.

4.5. Processamento Histológico

Os testículos foram lavados em solução salina, pesados e fixados em formol (10%) tamponado (pH 7.2) por 48 horas. Após a fixação, desidratou-se as amostras em séries crescentes de álcoois iniciando em álcool etílico 70% com trocas a cada meia hora para as concentrações de 80%, 90%, 95% e álcool absoluto por 40 minutos. Após a completa desidratação, elas foram infiltradas por resina acrílica (Leica®) *overnight* e embebidas em resina acrílica nova por mais 2 h.

Foi preparado o meio de inclusão com 15 ml do meio de infiltração e 1 ml de endurecedor *Hardner*, deixando-o no freezer por 1 semana. Para a montagem da placa de inclusão, os órgãos e o meio de inclusão foram distribuídos em moldes de polietileno e mantidos na estufa por 3 dias. Em seguida, retiraram-se as amostras dos moldes e as colaram com cola instantânea (cianoacrilato) em blocos de madeira.

Os blocos foram seccionados em micrótomo semiautomático (Easypath) com intervalos de 14 seções para a coleta de cada corte na espessura de 3 µM. Foram preparadas 2 lâminas com 6 cortes cada para cada animal. As lâminas foram coradas com azul de toluidina/borato de sódio (1%) por 3 minutos e montadas com o meio de montagem Entellan (Fig. 3).

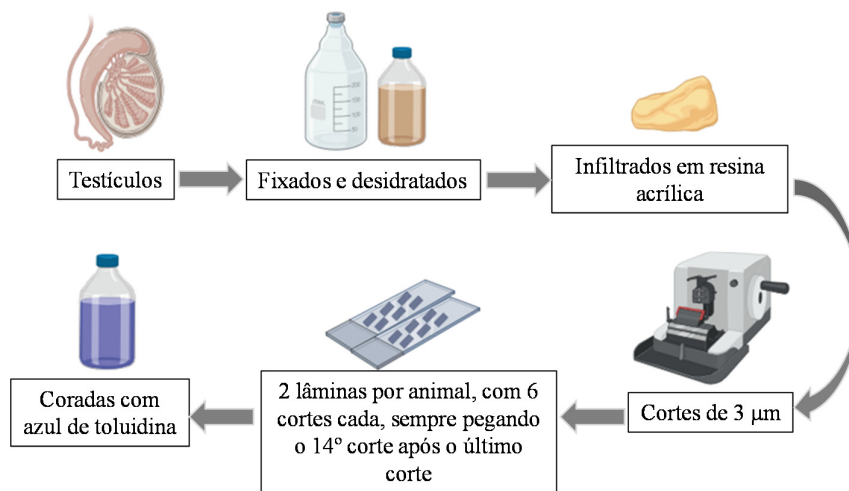


Figura 3: Processamento histológico dos testículos de camundongos C57BL/6. Esquema representativo de como foi realizada a confecção das lâminas com cortes transversais dos túbulos seminíferos de testículos de camundongos C57BL/6. Fonte: Criado em BioRender.com

4.6. Análise dos Estágios da Espermatogênese

Todas as imagens deste estudo foram capturadas com uma câmera AmScope (Modelo MU300) acoplada ao microscópio de luz (Olympus BX31) com aumento de 400x.

A avaliação da espermatogênese foi realizada por meio da análise de 96 fotos de cortes transversais de túbulos seminíferos por animal, utilizando o software AmScope ToupView (Versão 3.7.). A frequência dos estágios foi estimada a partir da subdivisão do ciclo do epitélio seminífero da espermatogênese em três estágios principais, de acordo com características adaptadas de Hess e França (2008) e Meistrich e Hess (2013):

- Estágio Inicial (I-V): presença de espermátides arredondas e alongadas, espermátócitos em paquíteno e espermatogônias do tipo A ou intermediárias.
- Estágio Intermediário (VI-VIII): presença de espermátides alongadas ao redor do lúmen, espermátides arredondadas, espermatogônias do tipo B e espermátócitos pré-leptótenos e leptótenos. Especificamente, no estágio VIII ocorre a espermiogênese e as espermátides alongadas estão sendo liberadas no lúmen.
- Estágio Tardio/de Maturação (IX-XII): espermatozoides no lúmen dos túbulos, presença de apenas espermátides alongadas, espermátócitos meióticos e/ou secundários leptótenos ou zigótenos E diversas figuras de meiose.

4.7. Análise das Medidas Histomorfométricas

Para a investigação das medidas histomorfométricas dos túbulos seminíferos, foram coletadas 45 fotos de cortes transversais aleatórios de túbulos por animal, sendo 15 fotos para cada estágio (inicial, intermediário e tardio).

A análise das fotografias foi realizada utilizando o software ImageJ (1.8.0). Com os recursos de mensuração do programa, os seguintes parâmetros foram obtidos sobre as secções transversais de túbulos seminíferos: (1) área total (S0) em μm^2 e (2) altura do epitélio (h) em μm .

A escala foi construída baseada na comparação de uma imagem de corte transversal padrão com régua, no aumento de 400x do microscópio, que indicou que 326 pixels correspondiam a 100 μm .

4.8. Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o sistema de software de análise Graph-Pad Prism (versão 9.0), também responsável por gerar os gráficos. A normalidade foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk e os outliers foram removidos. Para comparações múltiplas, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de duas vias (estresse x tratamento) e as diferenças significativas foram testadas pelo teste pós-teste de Tukey. O nível de significância considerado foi $p < 0,05$. Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão.

5. RESULTADOS

5.1. Peso dos Testículos

O peso dos testículos dos animais variou entre 0,07 e 0,10 gramas em todos grupos. No entanto, a análise estatística não revelou diferenças significativas entre eles, indicando que tanto o CBD quanto o comportamento tipo-depressivo não foram capazes de provocar alterações nesse parâmetro (Fig. 4).

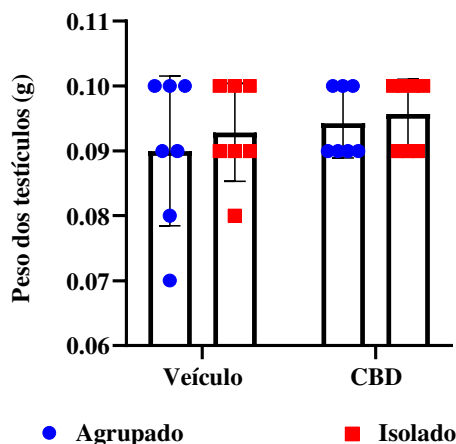


Figura 4: Peso dos testículos dos camundongos C57BL/6 após isolamento social e tratamento com CBD. (VA = 9 animais; VI = 9 animais, CBDA= 9 animais, CBDI = 9 animais). Veículo agrupado: 0,090 ± 0,0115 g; Veículo isolado: 0,093 ± 0,0076 g; CBD agrupado: 0,094 ± 0,0053 g; CBD isolado: 0,096 ± 0,0053 g. A análise por Two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey demonstrou que não houve diferença entre os grupos analisados quando comparado aos controles nos seguintes parâmetros: significância do tratamento [F (1, 24) = 1,442; P=0,2415], do estresse [F (1, 24) = 0,5192; P=0,4781] e da interação tratamento x estresse [F (1, 24) = 0,05769; P=0,8122]. Fonte: elaboração própria.

5.2. Estágios da Espermatogênese

Seguindo o padrão das associações celulares que variam conforme o tipo de espermatogônia presente, a fase específica da meiose em que os espermatócitos se encontram, assim como o tipo e a quantidade de espermátides em um corte específico, foi possível agrupar cada uma das 3456 imagens dos cortes transversais dos túbulos seminíferos no seu estágio correspondente do ciclo do epitélio seminífero da espermatogênese (Fig. 5).

Nos cortes em estágio inicial, que compreende as fases I a V da espermatogênese, foram observadas duas gerações de espermátides, onde as espermátides arredondadas apresentavam o início da formação do acrossoma, uma geração de espermatócitos em estágio de paquíteno e algumas espermatogônias do tipo A ou intermediárias. Já no estágio intermediário, que compreende as fases VI a VIII, foram observadas espermatogônias do tipo B, que podem ser identificadas por sua heterocromatina, duas gerações de espermátides e espermatócito

pré-leptótenos ou leptótenos; mais especificamente no estágio VIII, ocorre a espermiogênese, e as espermátides alongadas são liberadas no lúmen. Por fim, nos cortes em estágio tardio, que compreendem as fases IX a XII da espermatogênese, foram observadas apenas espermátides alongadas, espermátocitos na 1ª ou 2ª divisão meiótica e/ou espermátocitos secundários na fase de leptóteno ou zigóteno.

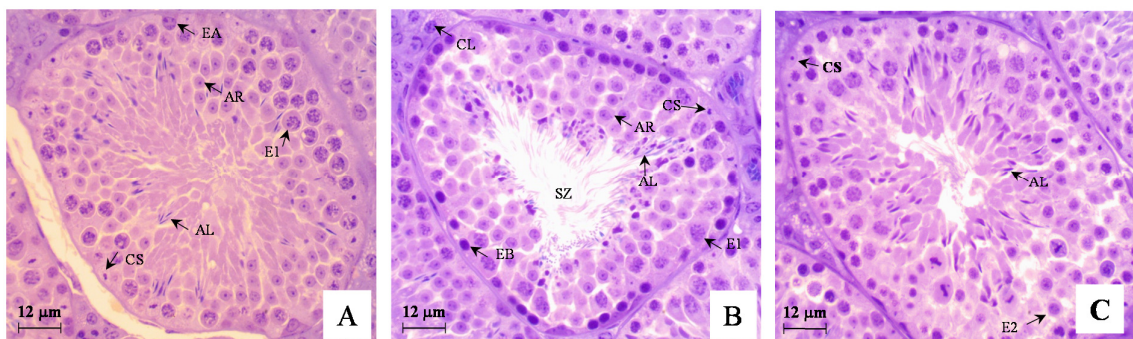


Figura 5: Fotos de cortes transversais dos túbulos seminíferos de camundongos C57BL/6. (A) Estágio inicial; (B) Estágio intermediário; (C) Estágio tardio. EA- Espermatogônia tipo A; EB- Espermatogônia tipo B; AR- Espermátide arredondada; AL- Espermátide alongada; E1- Espermátocito primário; E2- Espermátocito secundário; CS- Célula de Sertoli. CL-Célula de Leydig; SZ: Espermatozoide. Imagens tiradas na câmera AimScope acoplada ao microscópio de luz Olympus BX31. Aumento de 400X. Fonte: elaboração própria.

Em relação ao número de cortes transversais dos túbulos seminíferos agrupados em estágios inicial, intermediário ou tardio, houve o mesmo padrão de distribuição entre os camundongos isolados e agrupados, tratados com CBD ou veículo. Em todos os grupos foi observada a predominância do estágio inicial sobre o intermediário, e deste sobre o tardio (Tab.2).

Grupos	Número total de cortes transversais dos túbulos seminíferos por estágio		
	Estágio Inicial	Estágio Intermediário	Estágio Tardio
Veículo Agrupado	441	235	186
CBD Agrupado	464	251	149
Veículo Isolado	474	219	169
CBD Isolado	423	270	169
TOTAL	1802	975	673

Tabela 2: Número de cortes transversais de túbulos seminíferos presentes em cada um dos estágios da espermatogênese de camundongos C57BL/6. Número de cortes transversais de túbulos seminíferos em estágios inicial (I a V), intermediário (VI a VIII) e tardio (IX a XII) em cada um dos 4 grupos experimentais. Fonte: elaboração própria.

As análises estatísticas mostraram que não houve diferença entre os grupos avaliados nos estágios inicial e intermediário. Já o número total de cortes transversais em estágio tardio foi menor ($p= 0,0489$) no grupo de camundongos agrupados que receberam CBD, quando comparado aos animais agrupados que receberam apenas veículo (Fig. 6).

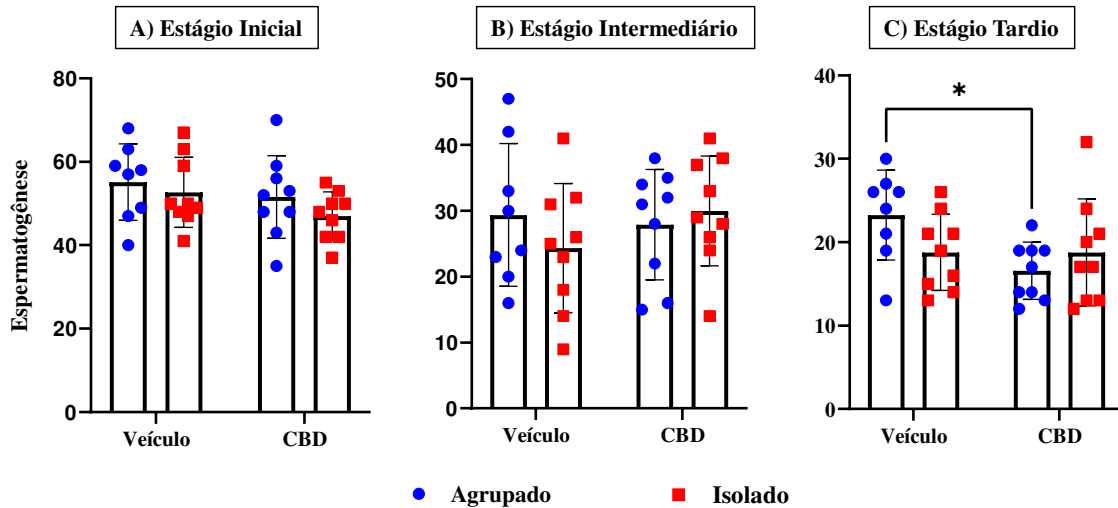


Figura 6: Frequência de cortes transversais de túbulos seminíferos nos estágios inicial, intermediário e tardio da espermatogênese de camundongos C57BL/6. (VA = 9 animais; VI = 9 animais, CBDA= 9 animais, CBDI = 9 animais). A) Veículo agrupado: $55 \pm 9,2$; Veículo isolado: $53 \pm 8,4$; CBD agrupado: $52 \pm 9,9$; CBD isolado: $47 \pm 5,8$. Nesse estágio, a análise por Two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey demonstrou que não houve diferença entre os grupos analisados quando comparado aos controles nos seguintes parâmetros: significância do tratamento [$F(1, 31) = 2,602$; $P=0,1168$], do estresse [$F(1, 31) = 1,501$; $P=0,2298$] e da interação tratamento x estresse [$F(1, 31) = 0,1342$; $P=0,7166$]. B) Veículo agrupado: 29 ± 11 ; Veículo isolado: $24 \pm 9,8$; CBD agrupado: $28 \pm 8,4$; CBD isolado: $30 \pm 8,3$. Nesse estágio, a análise por Two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey demonstrou que não houve diferença entre os grupos analisados quando comparado aos controles nos seguintes parâmetros: significância do tratamento [$F(1, 31) = 0,4374$; $P=0,5133$], do estresse [$F(1, 31) = 0,2149$; $P=0,6462$] e da interação tratamento x estresse [$F(1, 31) = 1,280$; $P=0,2665$]. C) Veículo agrupado: $23 \pm 5,4$; Veículo isolado: $19 \pm 4,6$; CBD agrupado: $17 \pm 3,4$; CBD isolado: $19 \pm 6,4$. Nesse estágio, a análise por Two-way ANOVA demonstrou que não houve diferença entre os grupos analisados quando comparado aos controles nos seguintes parâmetros significância do tratamento [$F(1, 31) = 3,823$; $P=0,0596$], do estresse [$F(1, 31) = 0,4319$; $P=0,5159$] e da interação tratamento x estresse [$F(1, 31) = 3,823$; $P=0,0596$]; contudo, o teste de comparações múltiplas de Tukey revelou diferença significativa entre VA e CBDA ($P= 0,0489$). * $p < 0,05$. Fonte: elaboração própria.

5.3. Análises Histomorfométricas

As análises histomorfométricas dos cortes transversais dos túbulos seminíferos foram realizadas seguindo os critérios ilustrados na prancha abaixo (Fig.7):

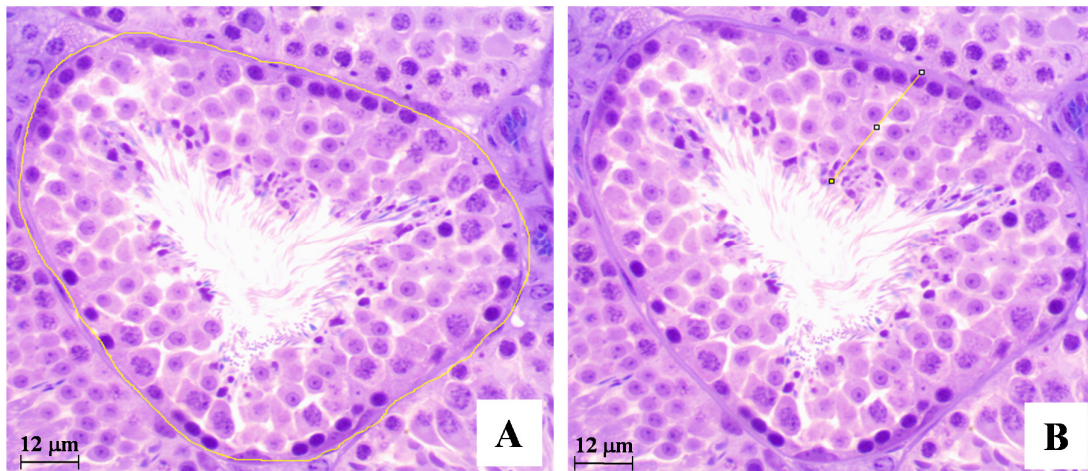


Figura 7: Delineamento das medidas histomorfométricas dos túbulos seminíferos de camundongos C57BL/6. A- área total do túbulo (S0) delineada manualmente; B – altura do epitélio (h) indicada pelo traço da base ao lúmen do túbulo. Imagens tiradas na câmera AmScope acoplada ao microscópio de luz Olympus BX31. Aumento de 400X. Fonte: elaboração própria.

5.3.1. Altura do Epitélio Seminífero (h)

No estágio inicial da espermatogênese não foram observadas diferenças significativas entre a altura do epitélio seminífero dos grupos, indicando que o CBD e o comportamento tipo-depressivo não afetaram esse parâmetro nesse estágio. Já no estágio intermediário da espermatogênese foi observado aumento na altura do epitélio seminífero do grupo CBD isolado em relação ao grupo veículo agrupado ($p=0,0174$) e ao grupo CBD agrupado ($p=0,0231$). Por fim, no estágio tardio da espermatogênese, houve aumento na altura do epitélio seminífero dos animais isolados, tratados ($p=0,0317$) ou não ($p=0,0270$) com CBD (Fig. 8).

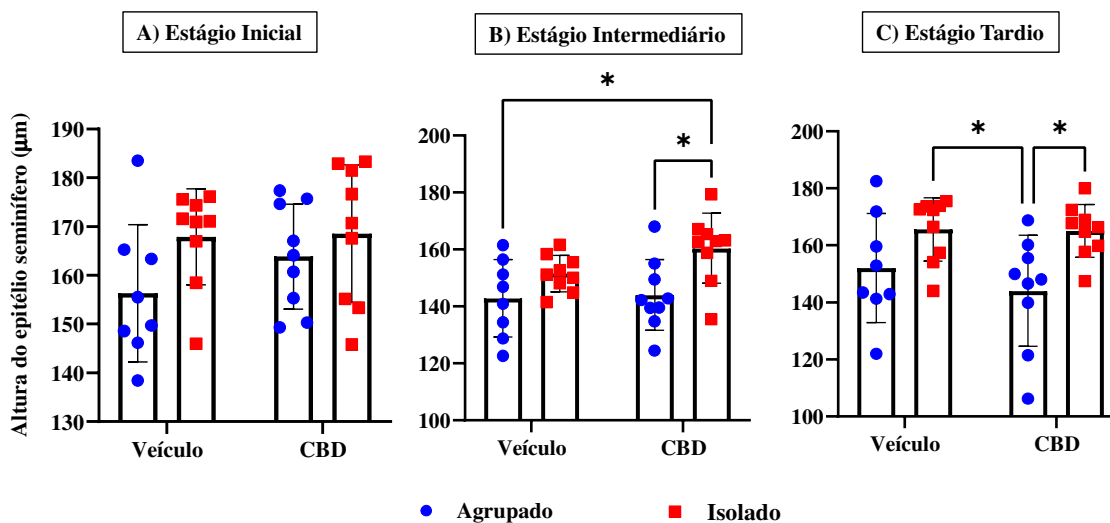


Figura 8: Altura do epitélio seminíferos nos estágios inicial, intermediário e tardio da espermatogênese de camundongos C57BL/6. (VA = 9 animais; VI = 9 animais, CBDA= 9 animais, CBDI = 9 animais). A) Veículo agrupado: $156 \pm 14 \mu\text{m}$; Veículo isolado: $171 \pm 5,7 \mu\text{m}$; CBD agrupado: $164 \pm 11 \mu\text{m}$; CBD isolado: $169 \pm 14 \mu\text{m}$. Nesse estágio, a análise por Two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey demonstrou que não houve diferença entre os grupos analisados quando comparado aos controles nos seguintes parâmetros: significância do tratamento [F (1, 31) = 0,9664; P=0,3332], do estresse [F (1, 31) = 3,840; P=0,0591] e da interação tratamento x estresse [F (1, 31) = 0,6832; P=0,4148]. B) Veículo agrupado: $143 \pm 14 \mu\text{m}$; Veículo isolado: $152 \pm 6,4 \mu\text{m}$; CBD agrupado: $144 \pm 12 \mu\text{m}$; CBD isolado: $160 \pm 12 \mu\text{m}$. Nesse estágio, a análise por Two-way ANOVA demonstrou efeito significativo do estresse [F (1, 31) = 10,51; P=0,0028], ausência de significância do tratamento [F (1, 31) = 1,687; P=0,2035] e da interação tratamento x estresse [F (1, 31) = 1,001; P=0,3248]; já o teste de comparações múltiplas de Tukey revelou diferença significativa entre VA e CBDI (P= 0,0174), CBDA e CBDI (P= 0,0231). C) Veículo agrupado: $152 \pm 19 \mu\text{m}$; Veículo isolado: $166 \pm 11 \mu\text{m}$; CBD agrupado: $144 \pm 19 \mu\text{m}$; CBD isolado: $165 \pm 9,3 \mu\text{m}$. Nesse estágio, a análise por Two-way ANOVA demonstrou efeito significativo do estresse [F (1, 31) = 11,10; P=0,0022], ausência de significância do tratamento [F (1, 31) = 0,6704; P=0,4192] e da interação tratamento x estresse [F (1, 31) = 0,5247; P=0,4743]; já o teste de comparações múltiplas de Tukey revelou diferença significativa entre VI e CBDA (P= 0,0270), CBDA e CBDI (P= 0,0317). *p < 0,05. Fonte: elaboração própria.

5.3.2. Área Total dos Cortes Transversais do Túbulo Seminífero (S0)

A área total dos túbulos seminíferos apresentou diferenças entre os grupos em todos os estágios da espermatogênese. No estágio inicial, houve aumento na área dos grupos veículo isolado (p=0,0022) e CBD isolado (p=0,0088) em relação ao grupo veículo agrupado e também aumento no grupo veículo isolado em relação ao CBD agrupado (p=0,0181). No estágio intermediário foi possível observar aumento da área nos grupos veículo isolado e CBD isolado, tanto em relação ao grupo veículo agrupado (p=0,0116 e p=0,0176, respectivamente), quanto ao grupo CBD agrupado (p=0,0491 e p=0,0441, respectivamente). Já no estágio tardio houve aumento da área do grupo veículo isolado em relação aos grupos agrupado que receberam veículo (p=0,0455) ou CBD (p=0,0322) (Fig.9).

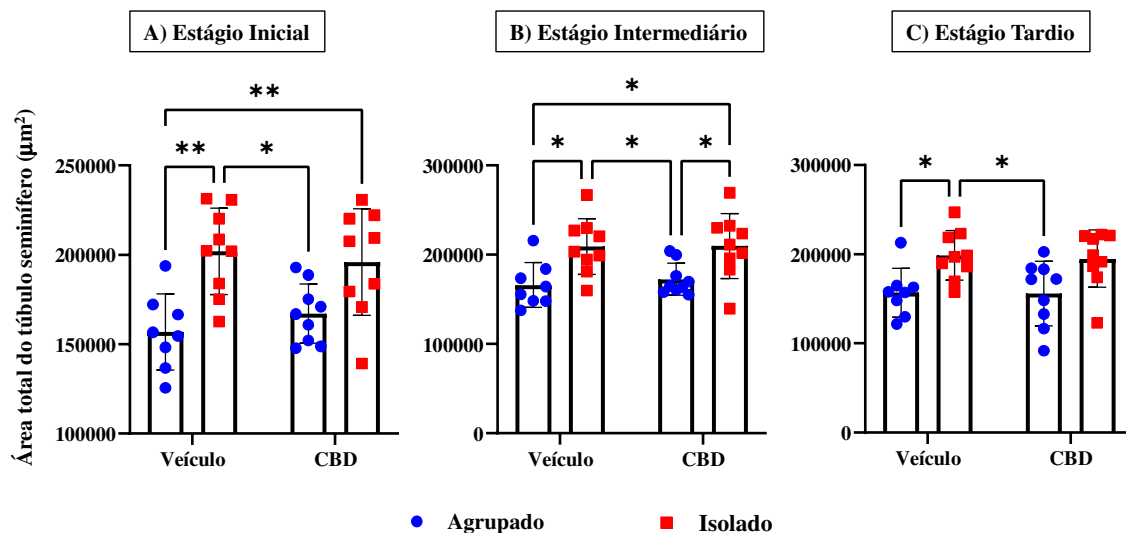


Figura 9: Área total dos cortes transversais dos túbulos seminíferos nos estágios inicial, intermediário e tardio da espermatogênese de camundongos C57BL/6. (VA = 9 animais; VI = 9 animais, CBDA= 9 animais, CBDI = 9 animais). A) Veículo agrupado: $156757 \pm 21259 \mu\text{m}^2$; Veículo isolado: $201931 \pm 24140 \mu\text{m}^2$; CBD agrupado: $167111 \pm 16534 \mu\text{m}^2$; CBD isolado: $195940 \pm 29738 \mu\text{m}^2$. Nesse estágio, a análise por Two-way ANOVA demonstrou efeito significativo do estresse [$F(1, 31) = 21,68$; $P < 0,0001$], ausência de significância do tratamento [$F(1, 31) = 0,07532$; $P = 0,7856$] e da interação tratamento x estresse [$F(1, 31) = 1,057$; $P = 0,3118$]; já o teste de comparações múltiplas de Tukey revelou diferença significativa entre VA e VI ($P = 0,0022$), VA e CBDI ($P = 0,0088$), VI e CBDA ($P = 0,0181$). B) Veículo agrupado: $165940 \pm 25167 \mu\text{m}^2$; Veículo isolado: $209148 \pm 31167 \mu\text{m}^2$; CBD agrupado: $164080 \pm 7260 \mu\text{m}^2$; CBD isolado: $209783 \pm 36290 \mu\text{m}^2$. Nesse estágio, a análise por Two-way ANOVA demonstrou efeito significativo do estresse [$F(1, 31) = 17,33$; $P = 0,0002$]; ausência de significância do tratamento [$F(1, 31) = 0,1381$; $P = 0,7127$] e da interação tratamento x estresse [$F(1, 31) = 0,09356$; $P = 0,7617$]; já o teste de comparações múltiplas de Tukey revelou diferença significativa entre VA e VI ($P = 0,0196$), VA e CBDI ($P = 0,0176$), VI e CBDA ($P = 0,0491$), CBDA e CBDI ($P = 0,0441$). C) Veículo agrupado: $156899 \pm 27437 \mu\text{m}^2$; Veículo isolado: $198624 \pm 27634 \mu\text{m}^2$; CBD agrupado: $155945 \pm 36213 \mu\text{m}^2$; CBD isolado: $203966 \pm 18602 \mu\text{m}^2$. Nesse estágio, a análise por Two-way ANOVA demonstrou efeito significativo do estresse [$F(1, 31) = 14,67$; $P = 0,0006$], ausência de significância do tratamento [$F(1, 31) = 0,04720$; $P = 0,8294$] e da interação tratamento x estresse [$F(1, 31) = 0,01607$; $P = 0,9000$]; já o teste de comparações múltiplas de Tukey revelou diferença significativa entre VA e VI ($P = 0,0455$), VI e CBDA ($P = 0,0322$). * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$. Fonte: elaboração própria.

5.4. Síntese das Análises Observadas

Na Tabela 3, estão resumidas todas as alterações observadas entre os grupos experimentais em comparação com o grupo controle — composto por animais mantidos agrupados e não tratados com canabidiol.

Alterações	Estágios	Veículo Agrupado	CBD Agrupado	Veículo Isolado	CBD Isolado
Peso dos testículos	Inicial	GRUPO CONTROLE	-	-	-
	Intermediário		-	-	-
	Tardio		-	-	-
Frequência	Inicial		-	-	-
	Intermediário		-	-	-
	Tardio		↓	-	-
Altura do Epitélio Seminífero	Inicial		-	-	-
	Intermediário		-	-	↑
	Tardio		-	↑	↑
Área Total do Epitélio Seminífero	Inicial		-	↑	↑
	Intermediário		-	↑	↑
	Tardio		-	↑	-

Tabela 3: Alterações estatisticamente significantes observadas nos grupos experimentais. Mudanças identificadas nos estágios do ciclo do epitélio seminífero da espermatogênese em relação ao grupo controle. (-) sem alteração / (↓) redução / (↑) aumento. Fonte: elaboração própria.

Na Tabela 4, as alterações são atribuídas especificamente ao isolamento social ou ao tratamento com canabidiol.

Alterações	CAUSA - Condições externas experimentais		
	Estágio Inicial	Estágio Intermediário	Estágio Tardio
Redução do estágio	-	-	CBD
Aumento da altura (h)	-	CBD	Isolamento
Aumento da área total (S0)	Isolamento	Isolamento	Isolamento

Tabela 4: Condições experimentais responsáveis pelas alterações observadas. Atribuição das causas das mudanças nos túbulos seminíferos, nos diferentes estágios do ciclo do epitélio seminífero, ao tratamento com canabidiol (CBD) ou ao isolamento social. (-) sem alterações observadas. Fonte: elaboração própria.

6. DISCUSSÃO

Este estudo avaliou o impacto do isolamento social e do canabidiol no ciclo do epitélio seminífero da espermatogênese de camundongos C57BL/6, subdividindo seus 12 estágios em três principais: inicial, intermediário e tardio. Durante esse processo, cerca de $\frac{1}{4}$ da duração de um ciclo do epitélio seminífero é necessário para produção dos espermatócitos primários e os outros $\frac{3}{4}$ são ocupados pela meiose e espermiogênese (OAKBERG, 1956b). Assim, a maioria dos espermatócitos observados em cortes testiculares está na fase de espermatócito primário, devido à sua prófase prolongada, enquanto os espermatócitos secundários são raramente observados, pois permanecem por um tempo muito breve na interfase antes de iniciarem a segunda divisão meiótica, que resulta na formação das espermátides (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2018). A predominância do estágio inicial sobre o intermediário, e deste sobre o tardio observadas em todos os grupos deste estudo mostram que o isolamento social e o canabidiol não interferiram na duração das etapas do ciclo do epitélio seminífero, e que as associações celulares encontradas nos estágios seguiram os padrões previamente descritos por Hess e França (2008) e Meistrich e Hess (2013).

Alterações morfológicas em órgãos reprodutivos, sob condições normais, é comum e esperada, principalmente em espécies de reprodução sazonal, um mecanismo natural que regula a capacidade reprodutiva em mamíferos adultos, possibilitando que a prole nasça em condições ambientais favoráveis à sua sobrevivência (BELTRÁN-FRUTOS et al., 2022). Variações nas condições ambientais, como o ciclo de luz, a temperatura e a disponibilidade de alimentos, geram mudanças fisiológicas que estão diretamente associadas a essas modificações (DARK; MILLER; ZUCKER, 1994; REITER, 1968; RUBY; ZUCKER, 1992). Durante períodos não-reprodutivos, o epitélio seminífero pode sofrer modificações devido a diferentes estratégias reprodutivas (BELTRÁN-FRUTOS et al., 2022). Alguns animais, como veados (HOCHEREAU-DE REVIERS et al., 1978) e carneiros (HOCHEREAU-DE REVIERS et al., 1992), reduzem a espermatogênese, mantendo todas as linhagens de células germinativas. Outros, como a ratazana-do-banhado (TAHKA et al., 1997) e o cão da pradaria (FOREMAN, 1997), interrompem a espermatogênese, deixando visíveis ao microscópio apenas espermatogônias e espermatócitos em seções tubulares. Já pequenos mamíferos, como os roedores, que têm vida curta e raramente vivem mais de um ano, só conseguem atingir o sucesso reprodutivo máximo ao se acasalarem em todas as oportunidades disponíveis (BRONSON, PERRIGO, 1987). Contudo, isso pode variar não só entre diferentes espécies, mas também entre populações e até dentro de uma mesma população (PRENDERGAST et al., 2001). Portanto,

apesar da diversidade de estratégias reprodutivas observadas entre camundongos, a espécie *Mus musculus*, utilizada neste estudo, costuma apresentar um ciclo reprodutivo contínuo e não sazonal, o que lhe permite se reproduzir mesmo em condições desafiadoras, salvo se inibido por fatores ambientais (BRONSON, 1979).

Uma vez que os roedores deste estudo foram mantidos em ambiente controlado, não era esperado encontrar mudanças nas gônadas. No entanto, foram observados: (1) redução do estágio tardio da espermatogênese; (2) aumento da altura do epitélio seminífero nos estágios intermediário e tardio; e (3) aumento da área total dos túbulos seminíferos em todos os estágios—ambos em relação ao grupo controle do estágio em questão. Sendo assim, pode-se dizer que as condições externas experimentais usadas neste trabalho, que foram o isolamento social e a administração de canabidiol (30 mg/kg), induziram alterações nos três estágios do ciclo do epitélio seminífero.

Em relação à altura do epitélio seminífero, no estágio intermediário, observou-se aumento nos camundongos isolados tratados com CBD, em comparação aos demais grupos, sugerindo que o canabidiol exerce uma influência sobre a espermatogênese nessa fase. No estágio tardio, o aumento na altura dos túbulos foi registrado nos animais isolados, independentemente do tratamento com CBD, indicando que essa alteração foi causada pelo isolamento social. Uma vez que a altura do epitélio seminífero é indicadora da atividade espermatogênica (COUROT ET AL., 1970; FRANÇA & RUSSEL, 1998), é de se esperar que os grupos que apresentaram aumento nesta variável também aumentaram a eficiência no processo de espermatogênese. Contudo, a literatura descreve tanto CBD quanto o estresse causado pelo isolamento social como fatores prejudiciais à espermatogênese.

Estudos relatam que o uso crônico de canabidiol pode atuar como um mediador potencial de toxicidade reprodutiva (CAPODICE; KAPLAN, 2021; CARVALHO et al., 2022; LIM; SQUIRE; JUNG, 2023), levando a redução na concentração de hormônios hipotalâmicos, hipofisários e gonadais (DALTERIO et al., 1984; PACEY et al., 2014; THOMPSON, 1993) e ocasionando disfunções no trato reprodutivo masculino ao comprometer o processo de formação dos espermatozoides (CAPODICE; KAPLAN, 2021; CARVALHO et al., 2018, 2022). A exemplo dos efeitos do CBD no sistema reprodutor, trabalhos anteriores – descritos a seguir – demonstraram que ele pode reduzir níveis de hormônios essenciais, causar degeneração dos túbulos seminíferos, afetar a maturação dos espermatozoides e aumentar a ocorrência de anomalias espermatogênicas. Camundongos Swiss, que receberam solução oral de 30 mg/kg de CBD por 5 semanas, apresentaram uma redução de 76% nos níveis circulantes de testosterona total e de 38% na contagem de espermatozoides na cauda do epidídimo, alterações nos estágios

meióticos, além de maior incidência de anomalias na cabeça dos espermatozoides e presença de gotículas citoplasmáticas na região medial do flagelo (CARVALHO et al., 2018). Essas alterações podem ser resultantes da ação do CBD sobre componentes do sistema endocanabinoide como a anandamida, os receptores CB1 e a enzima FAAH envolvidos na espermiogênese (COBELLIS et al., 2006; GRIMALDI et al., 2009). Em outros experimentos *in vivo*, Rosenkrantz e Hayden, em 1981, demonstraram que a inalação aguda e subcrônica de fumaça de CBD nas doses de 0,6; 0,8 e 1,2 mg/kg por ratos, causou uma degeneração grave dos túbulos seminíferos, com efeitos dose-dependentes que interferiram na maturação dos espermatozoides. Já em experimentos *in vitro*, Reich e colaboradores (1982) observaram redução de 75-88% de progesterona e testosterona após o tratamento em cultura de folículos pré-ovulatórios com doses de 50 a 200 μ M de CBD. Em outro ensaio, a atividade da enzima progesterona 17 α -hidroxilase foi significativamente inibida por concentrações de 100-1000 μ M de CBD (WATANABE et al., 2005).

No presente estudo, o tratamento dos camundongos com o CBD, além de aumentar a altura do epitélio, também resultou em uma redução no estágio tardio da espermatogênese nos camundongos agrupados tratados com CBD, indicando alterações na espermiogênese (SUEDE, MALIK, SAPPRA, 2023). Em um estudo semelhante, Carvalho e colaboradores (2022) administraram o CBD a camundongos Swiss durante 34 dias consecutivos e também encontraram uma redução na frequência e um aumento na altura do epitélio seminífero, ambos no estágio pós meiótico XII. Eles relataram uma relação de compensação entre essas variáveis, em que a redução de um fator foi equilibrada pelo aumento do outro. No entanto, como as mudanças aqui observadas foram em grupos distintos, não é possível estabelecer uma relação compensatória entre essas variáveis.

Além disso, considerando que a espermatogênese é regulada por hormônios e que qualquer desequilíbrio hormonal pode afetar significativamente o ciclo espermatogênico, a literatura sugere que o estresse crônico, induzido por comportamentos tipo-depressivo, pode comprometer esse processo, uma vez que ele é capaz de ocasionar alterações nos eixos hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) e hipotálamo-hipófise-gonadal (HPG) e levar a disfunções no sistema reprodutivo (JANEVIC et al., 2014; LI et al., 2020; BHONGADE et al., 2015), podendo reduzir a secreção do hormônio luteinizante da hipófise (LH) e do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) (AGUS et al., 2024). Além disso, esse estresse pode elevar os níveis de glicocorticoides, reduzindo a produção de testosterona pelas células de Leydig e potencialmente induzindo apoptose, o que afeta diretamente a espermatogênese (HARDY et al., 2005; MCGRADY, 1984). Dessa forma, os testículos tendem a apresentar alterações

morfológicas e funcionais em indivíduos sob estresse (RIBEIRO et al., 2018).

Dito isso, neste trabalho, o isolamento social também foi capaz de causar alterações na histomorfometria dos túbulos seminíferos. Nos estágios inicial e intermediário da espermatogênese, em ambos os grupos submetidos ao isolamento social, independentemente da administração do CBD, a área total dos túbulos aumentou, sugerindo que o estresse causado por essa condição foi o principal responsável por essa alteração, sem influência significativa do CBD. Já durante o estágio tardio, o isolamento social provocou um aumento tanto na altura quanto na área total dos túbulos seminíferos, efeito que não foi observado nos animais agrupados, indicando que esse aumento não está associado ao CBD.

A exemplo dos efeitos do estresse crônico, Li e colaboradores (2020) investigaram os efeitos da depressão na função espermatogênica e relataram perda de peso, atrofia do timo e das gônadas, alterações na estrutura histológica testicular e redução na qualidade do sêmen. Em um estudo sobre os efeitos do estresse crônico nos testículos, Ribeiro et al. (2018), observou que o estresse é mais prejudicial quando ocorre na idade adulta e a curto prazo. Esse estresse resultou em uma redução significativa nos níveis de testosterona sérica, na motilidade e viabilidade espermática, bem como no diâmetro dos túbulos seminíferos. No entanto, os efeitos a longo prazo foram menos pronunciados.

Em contraste com estudos citados anteriormente, Mohamed e colaboradores (2024), ao investigarem os efeitos do estresse crônico imprevisível (CUS) sobre fatores como a qualidade do esperma e a morfologia testicular, observaram um aumento no diâmetro dos túbulos seminíferos, que se apresentaram alongados, com espaços intersticiais mais evidentes e uma redução significativa na espermatogênese, marcada pela menor presença de espermátides primárias e alongadas. Por outro lado, no grupo controle sem estresse, os túbulos seminíferos mantiveram uma morfologia consistente e arredondada, com menor espaçamento intersticial e uma atividade espermatogênica mais evidente, caracterizada por uma maior quantidade de espermátides primárias e alongadas. Dessa forma, mesmo sem a observação dos espaços intersticiais e sem a contagem de espermátides primárias e alongadas, a mudança nos túbulos seminíferos observado neste estudo pode ter seguido a dinâmica descrita no trabalho de Mohamed (2024), onde a expansão dos túbulos não foi acompanhada de uma ampliação no rendimento da espermatogênese.

Quanto ao peso dos testículos, sabe-se que a área ocupada pelos túbulos seminíferos exerce grande influência na produção espermática e no peso testicular, de modo que o tamanho dos testículos está intimamente relacionado ao comprimento total dos túbulos seminíferos, o qual, por sua vez, é determinado pelo volume tubular, pelo diâmetro dos túbulos e pela

proporção volumétrica desses componentes (AMANN, 1970). Neste estudo, contudo, não foram observadas variações resultantes do uso do CBD ou do isolamento social. De forma semelhante, Carvalho et al. (2018, 2022) também não relataram diferenças significativas nos pesos relativos ou absolutos dos testículos após tratamento com CBD. Além disso, outras pesquisas que investigaram os efeitos do isolamento social em roedores machos não identificaram alterações no peso testicular (BUCKINX et al., 2021; IERACI; MALLEI; POPOLI, 2016; LIN et al., 2015).

Dado que desenvolver um modelo animal preciso para investigar os efeitos da depressão na função da espermatogênese representa um desafio significativo (Li et al., 2020), até o momento, não foram encontradas referências que relacionem o estresse crônico, o isolamento social ou o comportamento tipo-depressivo com as mudanças histomorfométricas observadas no presente estudo. Trabalhos com o canabidiol que analisem as mesmas medidas realizadas neste estudo também são escassos. Além disso, a ausência de análises complementares, como a avaliação dos níveis séricos hormonais (testosterona, LH e FSH), a mensuração do diâmetro dos túbulos seminíferos, a quantidade e a qualidade dos espermatozoides produzidos – avaliando se apresentam ou não anormalidades, a contagem das células de Sertoli e Leydig, bem como de outras células germinativas, restringe a interpretação dos dados obtidos. Dessa forma, é importante destacar que há limitações importantes no entendimento dos efeitos das condições experimentais nos resultados obtidos. A ausência das investigações complementares impede uma conclusão definitiva quanto à possibilidade de a expansão dos túbulos ter sido acompanhada por uma melhora na produção espermática ou se o crescimento observado reflete um comprometimento estrutural que esteja prejudicando a espermatogênese. Assim, novos estudos e avaliações são necessários para o entendimento completo da ação do CBD sobre os túbulos seminíferos de camundongos com comportamento tipo-depressivo.

7. CONCLUSÃO

Este estudo revelou que o isolamento social de camundongos C57BL/6 por 12 semanas induziu alterações histomorfométricas nos túbulos seminíferos em todos os três estágios da espermatogênese, evidenciadas pelo aumento da altura e da área total dos túbulos. Além disso, foi observado que o tratamento com canabidiol (30 mg/kg) durante 4 semanas, impactou a dinâmica da espermatogênese, reduzindo o estágio tardio do ciclo do epitélio seminífero nos roedores que foram mantidos agrupados, e provocando modificações na histomorfometria dos túbulos seminíferos, com o aumento da altura do epitélio nos animais isolados durante o estágio intermediário da espermatogênese. O aumento dos túbulos pode ter acontecido para otimizar a produtividade nas etapas do processo de formação dos espermatozoides, contudo, a ausência de análises complementares impede uma conclusão definitiva se a expansão dos túbulos foi acompanhada ou não de um aumento da eficiência espermatogênica.

REFERÊNCIAS

- AGUS, S. et al. Postweaning Social Isolation Alters Puberty Onset by Suppressing Electrical Activity of Arcuate Kisspeptin Neurons. **Neuroendocrinology**, v. 114, n. 5, p. 439–452, 25 jan. 2024.
- AHMED, E. A.; DE ROOIJ, D. G. Staging of mouse seminiferous tubule cross-sections. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, 2009.
- ALMEIDA, S. A. et al. Chronic immobilization-induced stress increases plasma testosterone and delays testicular maturation in pubertal rats. **Andrologia**, v. 32, n. 1, p. 7–11, jan. 2000.
- AMANN, R.P. Sperm production in rats. Em: JOHNSON, A.D.; GOMES, W.R.; VANDERMARK, N.L. **The testis**. New York: Academic Press, 1970. v. 1, cap. 7, p. 7-11, 2000.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION; DSM-5 TASK FORCE. Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-5™. 5. ed. Arlington: **American Psychiatric Publishing, Inc.**, 2013.
- ATANASSOVA, N. et al. Permanent Effects of Neonatal Estrogen Exposure in Rats on Reproductive Hormone Levels, Sertoli Cell Number, and the Efficiency of Spermatogenesis in Adulthood. **The Endocrine Society**, v. 140, n. 11, 1999.
- AVIELLO, G. et al. Chemopreventive effect of the non-psychotropic phytocannabinoid cannabidiol on experimental colon cancer. **Journal of Molecular Medicine**, v. 90, n. 8, p. 925–934, ago. 2012.
- BARCHEL, D. et al. Oral cannabidiol use in children with autism spectrum disorder to treat related symptoms and Co-morbidities. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, n. JAN, 2019.
- BASTOS, R.; BONORINO, R. J. R. I. O uso de canabidiol na terapêutica em cães com epilepsia e dor (Medicina Veterinária). **Anais do 24º simpósio de TCC do Centro Universitário ICESP**, n. 1, 2023.
- BELTRÁN-FRUTOS, E. et al. Cellular Modifications in Spermatogenesis during Seasonal Testicular Regression: An Update Review in Mammals. **Animals, MDPI**, 1 jul. 2022.
- BERNDTSON, W. E. Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: a review 1. **Journal of Animal Science**, v. 44, 1977.
- BHONGADE, M. B. et al. Effect of psychological stress on fertility hormones and seminal quality in male partners of infertile couples. **Andrologia**, v. 47, n. 3, p. 336–342, 1 abr. 2015.
- BLANCO-SUAREZ, E. The effects of solitary confinement on the brain. **Psychology Today**, 27 fev. 2019.
- BORNHEIM, L. M. et al. The effect of cannabidiol on mouse hepatic microsomal cytochrome P450-dependent anandamide metabolism. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 197, n. 2, p. 740–746, 1993.

- BOSCH, O. J. et al. The CRF system mediates increased passive stress-coping behavior following the loss of a bonded partner in a monogamous rodent. **Neuropsychopharmacology**, v. 34, n. 6, p. 1406–1415, maio 2009.
- BRAIN, P.; BENTON, D. The interpretation of physiological correlates of differential housing in laboratory rats. **Life Sciences**, v. 24, p. 99–116, 1979.
- BRESLAU, J. et al. Mental disorders and subsequent educational attainment in a US national sample. **Journal of Psychiatric Research**, v. 42, n. 9, p. 708–716, jul. 2008.
- BRONSON, F. H. The reproductive ecology of the house mouse. **The Quarterly Review of Biology**, v.54, 1979.
- BRONSON, F.H.; PERRIGO, G. Seasonal regulation of reproduction in muroid rodents. **American Zoologist**, v. 27, p. 929-940, 1987.
- BUCKINX, A. et al. Exploring Refinement Strategies for Single Housing of Male C57BL/6Jrj Mice: Effect of Cage Divider on Stress-Related Behavior and Hypothalamic-Pituitary-Adrenal-Axis Activity. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 15, 28 out. 2021.
- BUCKNER, J. D. et al. Implications of the DSM’s emphasis on sadness and anhedonia in major depressive disorder. **Psychiatry Research**, v. 159, n. 1–2, p. 25–30, 30 maio 2008.
- CAPODICE, J. L.; KAPLAN, S. A. The endocannabinoid system, cannabis, and cannabidiol: Implications in urology and men’s health. **Current Urology**, 1 jun. 2021.
- CARVALHO, R. K. et al. Chronic exposure to cannabidiol induces reproductive toxicity in male Swiss mice. **Journal of Applied Toxicology**, v. 38, n. 9, p. 1215–1223, 1 set. 2018.
- CARVALHO, R. K. et al. Decreasing sperm quality in mice subjected to chronic cannabidiol exposure: New insights of cannabidiol-mediated male reproductive toxicity. **Chemico-Biological Interactions**, v. 351, 5 jan. 2022.
- CHALLA, S. R. et al. The Impact of Social Isolation and Environmental Deprivation on Blood Pressure and Depression-Like Behavior in Young Male and Female Mice. **Chronic Stress**, v. 7, 1 jan. 2023.
- CHAVES, G. S. B.; FURTADO, J. D.; MATHEUS, M. E. Aspectos farmacológicos dos compostos da cannabis sativa. **REINPEC**, v. 7, p. 1–2, 2022.
- CHYE, Y. et al. The endocannabinoid system and cannabidiol’s promise for the treatment of substance use disorder. **Frontiers in Psychiatry**, v. 10, n. fev. 2019.
- CLARKSON, J. M.; MARTIN, J. E.; MCKEEGAN, D. E. F. A review of methods used to kill laboratory rodents: issues and opportunities. **Laboratory Animals**, SAGE Publications Ltd, 1 out. 2022.
- CLÉMENT, F. et al. The follicle-stimulating hormone signaling network in gonadal cells. Em: **Cellular endocrinology in health and disease**. 2. ed. 2021. cap. 20, p. 421-443.

- CLERMONT, Y. Renewal of Spermatogonia in Man. **American Journal of Anatomy**, v. 118, p. 509–524, 1966.
- CLERMONT, Y.; TROTT, M. Duration of the Cycle of the Seminiferous Epithelium in the Mouse and Hamster Determined by Means of 8H-Thymidine and Radioautography. **Fertility & Sterility**, v. 20, No.5, p. 805–817, 1969.
- COBELLIS, G.; CACCIOLA, G.; SCARPA, D.; MECCARIELLO, R.; CHIANESE, R.; FRANZONI, M. F.; MACKIE, K.; PIERANTONI, R.; FASANO, S. Endocannabinoid system in frog and rodent testis: type-1 cannabinoid receptor and fatty acid amide hydrolase activity in male germ cells. **Biology of Reproduction**, v. 75, p. 82–89, 2006.
- CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (Brasil). *Resolução Normativa CONCEA nº 37, de 15 de fevereiro de 2018*. Estabelece a Diretriz da Prática de Eutanásia. Diário Oficial da União: seção 1, Brasília, DF, p. 6, 21 fev. 2018.
- COUROT, M.; HOCHEREAU DE REVIERS, M-T.; ORTAVANT, R. Spermatogenesis. In: JOHNSON, A.D.; GOMES, W.R.; VANDEMARK, N.L. (Eds.). **The testis**. New York: Academic Press, 1970. v. 1, p. 339-432.
- DALTERIO, S. et al. Early Cannabinoid Exposure Influences Neuroendocrine and Reproductive Functions in Mice: II. Postnatal Effects. **Pharmacology Biochemistry & Behavior**, v. 20, p. 115–123, 1984.
- DARK, J.; MILLER, D. R.; ZUCKER, I. Reduced glucose availability induces torpor in Siberian hamsters. **American Physiological Society**, 1994.
- DAWOOD, S. et al. Heterogeneity of interpersonal problems among depressed young adults: Associations with substance abuse and pathological personality traits. **Journal of Personality Assessment**, v. 95, n. 5, p. 513–522, 1 set. 2013.
- DE KRETZER, D. M. et al. Spermatogenesis. **European Society for Human Reproduction & Embryology**, 1998.
- DE ROOIJ, D. G.; GROOTEGOEDT, J. A. Spermatogonial stem cells. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 10, p. 694–701, 1998.
- DISSANAYAKE, D. M. I. H.; KEERTHIRATHNA, W. L. R.; PEIRIS, L. D. C. Male Infertility Problem: A Contemporary Review on Present Status and Future Perspective. **Gender and the Genome**, v. 3, p. 1–7, jan. 2019.
- EL-REMESSY, A. B. et al. Neuroprotective and Blood-Retinal Barrier-Preserving Effects of Cannabidiol in Experimental Diabetes. **American Journal of Pathology**, v. 168, 2006.
- Epidiolex. Disponível em: <https://www.gwpharm.com/healthcare-professionals/sativex>. Acesso em: 2 de janeiro de 2024.
- EVANS, D. L. et al. Mood disorders in the medically ill: Scientific review and recommendations. **Biological Psychiatry**, 1 ago. 2005.
- FELDMAN, I. et al. Social distancing and bacteraemia in the time of COVID-19. **Internal Medicine Journal**, v. 52, n. 2, p. 223–227, 1 fev. 2022.

- FENSTER, L. et al. Effects of psychological stress on human semen quality. **Journal of Andrology**, v. 18, p. 194-202, 1997.
- FOREMAN, D. Seminiferous Tubule Stages in the Prairie Dog (*Cynomys ludovicianus*) During the Annual Breeding Cycle. **The Anatomical Record**, v. 247, p. 355–367, 1997.
- FRANÇA, L.R.; RUSSELL, L.D. The testis of domestic animals. In: REGADERA, J.; MARTINEZ-GARCIA, F. (Eds.). **Male reproduction: A multidisciplinary overview**. Madrid: Churchill Livingstone, 1998. p. 197-219.
- 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, p. 1–34, 1 nov. 2020.
- GILLEN, R. et al. Depressive symptoms and history of depression predict rehabilitation efficiency in stroke patients. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, v. 82, n. 12, p. 1645–1649, 2001.
- GOLLENBERG, A. L. et al. Semen quality in fertile men in relation to psychosocial stress. **Fertility and Sterility**, v. 93, n. 4, p. 1104–1111, 1 mar. 2010.
- GRIMALDI, P.; ORLANDO, P.; DI SIENA, S.; LOLICATO, F.; PETROSINO, S.; BISOGNO, T.; GEREMIA, R.; DE PETROCELLIS, L.; DI MARZO, V. The endocannabinoid system and pivotal role of the CB2 receptor in mouse spermatogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, p. 11131–11136, 2009.
- GRIPPO, A. J. et al. Social isolation induces behavioral and neuroendocrine disturbances relevant to depression in female and male prairie voles. **Psychoneuroendocrinology**, v. 32, n. 8–10, p. 966–980, set. 2007.
- GRIPPO, A. J.; CUSHING, B. S.; CARTER, C. S. Depression-like behavior and stressor-induced neuroendocrine activation in female prairie voles exposed to chronic social isolation. **Psychosomatic Medicine**, v. 69, n. 2, p. 149–157, 2007.
- HADDAD, R. R.; RAMOS, A. J. M.; DE FREITAS, A. S. P. M.; JÚNIOR, C. A. P. et al. Percepção dos acadêmicos de medicina sobre o uso do canabidiol em tratamentos medicinais. 6, p. 2, 2022.
- HARTMANN, A. et al. Cannabidiol attenuates aggressive behavior induced by social isolation in mice: Involvement of 5-HT1A and CB1 receptors. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 94, 30 ago. 2019.
- HARDY, M. P. et al. Stress hormone and male reproductive function. **Cell and Tissue Research**, out. 2005.
- HESS, R. A.; FRANÇA, L. R. History of the Sertoli Cell Discovery. Em: SKINNER, M. K.; GRISWOLD, M. D. (Eds.). **Sertoli Cell Biology**. Elsevier Science, p. 1–11, 2005.
- HESS, R. A.; FRANÇA, L. R. Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium. Em: CHENG, C. Y. (Ed.). **Molecular Mechanisms in Spermatogenesis**, Chapter 1, 2008.

- HILL, M. N. et al. The Therapeutic Potential of the Endocannabinoid System for the Development of a Novel Class of Antidepressants. **Trends in Pharmacological Sciences** set. 2009.
- HILLARD, C. J. Biochemistry and pharmacology of the endocannabinoids arachidonylethanolamide and 2-arachidonylglycerol. **Prostaglandins & other Lipid Mediators**. Elsevier Science Inc., p. 3–18, 2000.
- HOCHEREAU-DE REVIERS; LINCOLN, G. A. Seasonal variation in the histology of the testis of the red deer, *Cervus elaphus*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 54, p. 209–213, 1978.
- HOCHEREAU-DE REVIERS, M. et al. Effect of a 2-Month Light Cycle Regimen on Testicular Parameters of Adult Ile-de-France Rams. **Microscopy Research and Technique**, 1992.
- HOLSTEIN, A.-F.; SCHULZE, W.; DAVIDOFF, M. Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. **Reproductive Biology and Endocrinology**, 2003.
- HOWLETT, A. C. The cannabinoid receptors. **Prostaglandins & other Lipid Mediators**. Elsevier Science Inc., p. 619–631, 2002.
- IERACI, A.; MALLEI, A.; POPOLI, M. Social Isolation Stress Induces Anxious-Depressive-Like Behavior and Alterations of Neuroplasticity-Related Genes in Adult Male Mice. **Neural Plasticity**, v. 2016, 2016.
- JAMES, K.; VANKO, E. The Impacts of Solitary Confinement. **Vera: Institute of Justice**, 2021.
- JANEVIC, T. et al. Effects of work and life stress on semen quality. *Fertility and Sterility*, v. 102, n. 2, p. 530–538, 2014.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. *Histologia Básica: Texto & Atlas*. 13. ed. EDITORA GUANABARA KOOGAN LTDA, 2017.
- KARMAUS, P. W. F. et al. Cannabidiol (CBD) enhances lipopolysaccharide (LPS)-induced pulmonary inflammation in C57BL/6 mice. **Journal of Immunotoxicology**, v. 10, n. 3, p. 321–328, jul. 2013.
- KESSLER, R. et al. Epidemiology of depression. In: GOTLIB, I.H.; HAMMEN, C. (Eds.). **Handbook of depression**. 3. ed. New York: Guilford Press, 2015. p. 7–24.
- KATHMANN, M. et al. Cannabidiol is an allosteric modulator at mu- and delta-opioid receptors. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 372, n. 5, p. 354–361, fev. 2006.
- KIM, J. W.; KIRKPATRICK, B. Social Isolation in Animal Models of Relevance to Neuropsychiatric Disorders. **Society of Biological Psychiatry**, 1966.

- KIM, K. S.; HAN, P. L. Optimization of chronic stress paradigms using anxiety- and depression-like behavioral parameters. **Journal of Neuroscience Research**, v. 83, n. 3, p. 497–507, 15 fev. 2006.
- LAPRAIRIE, R. B. et al. Cannabidiol is a negative allosteric modulator of the cannabinoid CB1 receptor. **British Journal of Pharmacology**, v. 172, n. 20, p. 4790–4805, 1 out. 2015.
- LEDFORD, H. Medical research: If depression were cancer. **Nature** 515, p. 182–184, 2014.
- LEE, B. et al. Chronic administration of baicalein decreases depression-like behavior induced by repeated restraint stress in rats. Korean **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 17, n. 5, p. 393–403, out. 2013.
- LI, H. et al. DAZL is a master translational regulator of murine spermatogenesis. **National Science Review**, v. 6, n. 3, p. 455–468, 1 maio 2019.
- LI, T. et al. Chronic stress impairs male spermatogenesis function and nectin-3 protein expression in the testis. **Physiological Research**, v. 69, n. 2, p. 297–306, 1 abr. 2020.
- LIM, J.; SQUIRE, E.; JUNG, K. M. Phytocannabinoids, the Endocannabinoid System and Male Reproduction. **World Journal of Men's Health**, Korean Society for Sexual Medicine and Andrology, 1 jan. 2023.
- LIN, E. J. D. et al. Social overcrowding as a chronic stress model that increases adiposity in mice. **Psychoneuroendocrinology**, v. 51, p. 318–330, 1 jan. 2015.
- LOBEL, J.; AKIL, H. Law & neuroscience: The case of solitary confinement. **Daedalus**, v. 147, n. 4, p. 61–75, 1 out. 2018.
- MARRS, W. R. et al. The serine hydrolase ABHD6 controls the accumulation and efficacy of 2-AG at cannabinoid receptors. **Nature Neuroscience**, v. 13, n. 8, p. 951–957, ago. 2010.
- MARTIN, A. L.; BROWN, R. E. The lonely mouse: Verification of a separation-induced model of depression in female mice. **Behavioural Brain Research**, v. 207, n. 1, p. 196–207, 11 fev. 2010.
- MARTÍNEZ-PINILLA, E. et al. Binding and signaling studies disclose a potential allosteric site for cannabidiol in cannabinoid CB2 receptors. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, out. 2017.
- MCGRADY, A. V. Effects of psychological stress on male reproduction: a review. **Archives of Andrology**, 1984.
- MEDENDORP, W. E. et al. Altered behavior in mice socially isolated during adolescence corresponds with immature dendritic spine morphology and impaired plasticity in the prefrontal cortex. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 12, 9 maio 2018.
- MEISTRICH, M. L.; HESS, R. A. Assessment of Spermatogenesis Through Staging of Seminiferous Tubules. Em: **Methods in Molecular Biology**, v. 927p. 299–307, 2013.
- MILLAR, S. A. et al. A systematic review of cannabidiol dosing in clinical populations. **British Journal of Clinical Pharmacology**, Blackwell Publishing Ltd, 2019.

- MOHAMED, Z. I. et al. Chronic unpredictable stress (CUS) reduced phoenixin expression, induced abnormal sperm and testis morphology in male rats. **Neuropeptides**, v. 107, 1 out. 2024.
- MORALES, P. et al. Allosteric Modulators of the CB1 Cannabinoid Receptor: A Structural Update Review. **Cannabis and Cannabinoid Research**, Mary Ann Liebert Inc., 1 jan. 2016.
- MOUSLECH, Z.; VALLA, V. Endocannabinoid System: An overview of its potential in current medical practice. **Neuro Endocrinology Letters**, 2009.
- OAKBERG, E. F. Duration of spermatogenesis in the mouse and timing of stages of the cycle of the seminiferous epithelium. **American Journal of Anatomy**, 1956.
- OAKBERG, E. F. A description of spermiogenesis in the mouse and its use in analysis of the cycle of the seminiferous epithelium and germ cell renewal. **American Journal of Anatomy**, v. 99,3, p. 391–413, 1956b.
- PACEY, A. A. et al. Modifiable and non-modifiable risk factors for poor sperm morphology. **Human Reproduction**, v. 29, n. 8, p. 1629–1636, 2014.
- PENG, J. et al. A narrative review of molecular mechanism and therapeutic effect of cannabidiol (CBD). **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, John Wiley and Sons Inc, 1 abr. 2022.
- PEREY, B.; CLERMONT, Y.; LEBLOND, C. P. The Wave of the Seminiferous Epithelium in the Rat. **American Journal of Anatomy**, 108, p. 47–77, 1961.
- PERTWEE, R. G. The diverse CB 1 and CB 2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids: Δ 9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and Δ 9-tetrahydrocannabivarin. **British Journal of Pharmacology**, jan. 2008.
- PHILLIPS, B. T.; GASSEI, K.; ORWIG, K. E. Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**Royal Society, 27 maio 2010.
- PISANTI, S. et al. Cannabidiol: State of the art and new challenges for therapeutic applications. **Pharmacology and Therapeutics**Elsevier Inc., 1 jul. 2017.
- PRENDERGAST, B.; KRIEGSFELD, L.; NELSON, R. The quarterly review of b jlg photoperiodic polyphenisms in rodents: neuroendocrine mechanisms, costs, and functions. **The Quarterly Review of Biology**, v.76, n.3, 2001.
- REICH, R. et al. In Vitro Effects of Cannabinoids on Follicular Function in the Rat. **Biology of Reproduction**, v.27, p.223-231, 1982.
- REITER, R. J. Morphological Studies on the Reproductive Organs of Blinded Male Hamsters and the Effects of Pinealectomy or Superior Cervical Ganglionectomy. **The Anatomical Record**, 1968.

- REY, R. A. et al. Is Infancy a Quiescent Period of Testicular Development? Histological, Morphometric, and Functional Study of the Seminiferous Tubules of the Cebus Monkey from Birth to the End of Puberty. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, 1993
- REZENDE, B. et al. Endocannabinoid System: Chemical Characteristics and Biological Activity. **Pharmaceuticals**, MDPI, 1 fev. 2023.
- REZENDE, M. C.; TOFFANO, M. J. R. A legalização da cannabis medicinal no brasil como fonte do direito à vida e os impactos socioeconômicos. **Revista de Iniciação Científica da Faculdade de Direito de Franca**, n. 1, 2021.
- RIBEIRO, C. T. et al. Immediate and late effects of chronic stress in the testes of prepubertal and adult rats. **Asian Journal of Andrology**, v. 20, n. 4, p. 385–390, 1 jul. 2018.
- ROSE, A. L. et al. Major depressive disorder. Em: **Functional Analysis in Clinical Treatment**, Second Edition. Elsevier, p. 339–373, 2020.
- ROSENKRANTZ, H.; HAYDEN, D. W. Acute and Subacute Inhalation Toxicity of Turkish Marihuana, Cannabichromene, and Cannabidiol in Rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 48, p.375-386, 1979.
- RUBY, N. F.; ZUCKER, I. Daily torpor in the absence of the suprachiasmatic nucleus in Siberian hamsters. **American Physiological Society**, 1992.
- RUSSELL, L. DEE. et al. Histological and histopathological evaluation of the testis. **International Journal of Andrology**, p. 83, 1993.
- SAKI, G.; RAHIM, F.; ALZADEH, K. Effect of forced swimming stress on count, motility and fertilization capacity of the sperm in adult rats. **Journal of Human Reproductive Sciences**, v. 2, n. 1, 2009.
- SANTOS-PINTO, C. D. B.; ESHER, Â.; DOS SANTOS OLIVEIRA, C. V.; OSORIO- DE-CASTRO, C. G. S. The expansion of the medical Cannabis market in Brazil and regulatory gaps. **SciELO Preprints**, 2024.
- Sativex®. Disponível em: <https://www.gwpharm.com/healthcare-professionals/sativex>. Acesso em: 2 de janeiro de 2024.
- SAVINAINEN, J. R.; SAARIO, S. M.; LAITINEN, J. T. The serine hydrolases MAGL, ABHD6 and ABHD12 as guardians of 2-arachidonoylglycerol signalling through cannabinoid receptors. **Acta Physiologica**, fev. 2012.
- SCHMIDT, M. V. et al. High susceptibility to chronic social stress is associated with a depression-like phenotype. **Psychoneuroendocrinology**, v. 35, n. 5, p. 635–643, jun. 2010.
- STANTON, P. G. et al. Proteomic changes in rat spermatogenesis in response to in vivo androgen manipulation; Impact on meiotic cells. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, 30 jul. 2012.
- SUEDE, S.H.; MALIK, A.; SAPRA, A. Histology, Spermatogenesis. **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2024.

- TAHKA, K. M. et al. Photoperiod-Induced Changes in Androgen Receptor Expression in Testes and Accessory Sex Glands of the Bank Vole, *Clethrionomys glareolus*. **Biology of Reproduction**, v.56, p.898-908, 1997.
- TEGELENBOSCH, R. A. J.; DE ROOIJ, D. G. A quantitative study of spermatogonial multiplication and stem cell renewal in the C3H/101 F 1 hybrid mouse. **Mutation Research**, 290, v. 290, p. 193–200, 1993.
- THAYER, K. A. et al. Altered prostate growth and daily sperm production in male mice exposed prenatally to subclinical doses of 17 α -ethinyl oestradiol. **Human Reproduction**, v. 16, n. 5, p. 988–996, 2001.
- THOMPSON, S. T. Preventable causes of male infertility. **World Journal of Urology**, 1993.
- TSUBOI, K. et al. Endocannabinoids and related N-acylethanolamines: Biological activities and metabolism Makoto Murakami. **Inflammation and Regeneration** BioMed Central Ltd., 1 out. 2018.
- UEDA, N. et al. Lipoxygenase-catalyzed oxygenation of arachidonylethanolamide, a cannabinoid receptor agonist. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1254, p. 127–134, 1995.
- UEDA, N.; TSUBOI, K.; UYAMA, T. N-acylethanolamine metabolism with special reference to N-acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase (NAAA). **Progress in Lipid Research**, out. 2010.
- ULLOA, J. L. et al. Comparison of the antidepressant sertraline on differential depression-like behaviors elicited by restraint stress and repeated corticosterone administration. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 97, n. 2, p. 213–221, dez. 2010.
- U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. FDA approves new indication for drug containing an active ingredient derived from cannabis to treat seizures in rare genetic disease. 2020.
- VALLI, H. et al. Spermatogonial Stem Cells and Spermatogenesis. Em: **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction: Two-Volume Set**. Elsevier Inc, v. 1p. 595–635, 2015.
- VANDEVOORDE, S.; LAMBERT, D. M. The Multiple Pathways of Endocannabinoid Metabolism: A Zoom Out. **Chemistry & Biodiversity**, v. 4, p. 1858–1881, 2007.
- VANGOMPEL, M. J. W.; XU, E. Y. A novel requirement in mammalian spermatid differentiation for the DAZ-family protein Boule. **Human Molecular Genetics**, v. 19, n. 12, p. 2360–2369, 15 jun. 2010.
- VIUDEZ-MARTÍNEZ, A. et al. Cannabidiol does not display drug abuse potential in mice behavior. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 40, n. 3, p. 358–364, 1 mar. 2019.
- VOORHEES, J. L. et al. Prolonged Restraint Stress Increases IL-6, Reduces IL-10, and Causes Persistent Depressive-Like Behavior That Is Reversed by Recombinant IL-10. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, 8 mar. 2013.

WANG, B. et al. The Non-Peptide Vasopressin V1b Receptor Antagonist, SSR149415, Ameliorates Spermatogenesis Function in a Mouse Model of Chronic Social Defeat Stress. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 118, n. 11, p. 3891–3898, 1 nov. 2017.

WATANABE, K. et al. Marijuana extracts possess the effects like the endocrine disrupting chemicals. **Toxicology**, v. 206, n. 3, p. 471–478, 31 jan. 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Depression and Other Common Mental Disorders: Global Health Estimates. Switzerland, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO expert committee on drug dependence. World Health Organization technical report series, n. 998, p. 1-34, 2016.

YOSHIDA, S. Stem cells in mammalian spermatogenesis. **Development Growth and Differentiation**, Blackwell Publishing, 1 out. 2010.

YU, M.; IVES, D.; RAMESHA, C. S. Synthesis of prostaglandin E2 ethanolamide from anandamide by cyclooxygenase-2. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 34, p. 21181–21186, 22 ago. 1997.

ZUARDI, A. W. History of cannabis as a medicine: a review. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, 2006.

ZUARDI, A. W. et al. The anxiolytic effects of cannabidiol (CBD). **Em: Handbook of Cannabis and Related Pathologies: Biology, Pharmacology, Diagnosis, and Treatment.**, Elsevier Inc., p. e131–e139, 2017

ANEXO A: PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA/UFOP)



UNIVERSIDADE
FEDERAL DE
OURO PRETO



PROPP - Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Comissão de Ética no Uso de Animais

Ouro Preto, 29 de abril de 2022
CEUA N 6925100821

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Katiane Oliveira Pinto Coelho Nogueira
Área: Ciências Biológicas

Título da proposta: "Avaliação da associação da melatonina e derivados esterificados híbridos de ácido cinâmico-eugenol como tratamento neuroprotetor sobre culturas primárias de neurônios hipocâmpais expostas ao peptídeo B-amiloide".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais UFOP (ID 000407)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Ouro Preto, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Emenda (versão de 19/abril/2022) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "O isolamento social se tornou uma realidade dentro do contexto pandêmico mundial. Um dos efeitos desta vivência pode ser o desenvolvimento do quadro de Depressão Maior (DM) que, somando prejuízos sociais e cognitivos já era uma das doenças mais prevalentes em todo o mundo anteriormente ao contexto da pandemia. A DM atingia antes da pandemia 2,9% dos homens e 5,0% das mulheres. Humor deprimido, diminuição de interesse/prazer, anedonia, insônia ou hipersonia, sentimentos de culpa, são alguns dos sintomas considerados pelo Manual de Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais 5ª (DSM-V). Assim como em humanos, o estresse é um ponto significativo para o desenvolvimento da DM em modelo animal. Para avaliar o isolamento social como mecanismo gerador de estresse em modelo animal, a presente proposta visa isolar camundongos machos e fêmeas por 16 semanas, de acordo com protocolo pré-estabelecido na literatura (Martin e Brown, 2010), para avaliar comportamentos semelhantes aos da DM, como a anedonia e prejuízos cognitivos. Associado ao comportamento tipo depressivo os animais serão submetidos o tratamento com canabidiol (CBD), um fitocanabinoide presente na planta Cannabis sativa. O CBD pode atuar no sistema nervoso central de diversas formas, como, por exemplo, bloqueando efeitos ansiogênicos em voluntários submetidos a estudo de procedimento simulado de falar em público. Além disso, o CBD atenuou o comportamento agressivo induzido em camundongos. Outro aspecto que aponta o CBD como interessante candidato no tratamento de neuropatologias é sua ação pró-neurogênica em modelos experimentais. A carência em fármacos que consigam oferecer um tratamento efetivo sem o agravante de efeitos colaterais é uma realidade. Assim, este projeto busca avaliar o efeito do tratamento com CBD no comportamento tipo depressivo de camundongos C57BL/6 submetidos ao isolamento social, bem como seus resultados na neurogênese adulta, morfologia do hipocampo e parâmetros neuroquímicos a fim de elucidar novas terapias. Estamos solicitando a adição da análise da neurogênese no hipocampo, pela técnica de BrDU, visto que de acordo com a literatura, o canabidiol tem capacidade de induzir a proliferação neuronal no giro denteado. Para realizar essa alteração precisaremos fazer um pequeno ajuste à metodologia do protocolo já aprovado (9436050721), segue: 1 - Alteração na metodologia Pretendemos adicionar à metodologia do protocolo já aprovado (9436050721) a aplicação por 3 dias consecutivos do BRdU para análise posterior (após a eutanásia) da neurogênese hipocâmpal. Com a entrada de novos alunos de pós-graduação também vislumbramos a oportunidade de um novo aluno de mestrado (Marcel Lucindo), aprovado no último processo seletivo do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (BIOTEC), participar como executor do projeto. O referido aluno da pós-graduação tem experiência de 120 horas e ingressará como executante. "

Comentário da CEUA: "".

Prof. Dr. Leonardo Máximo Cardoso
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Ouro Preto

Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Ouro Preto