



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

Jaqueline Maisa Franzen

**Efeito do canabidiol sobre a expressão e a reconsolidação da memória aversiva  
contextual em ratas: potencial mecanismo de ação no hipocampo**

Florianópolis  
2022

Jaqueline Maisa Franzen

**Efeito do canabidiol sobre a expressão e a reconsolidação da memória aversiva contextual em ratas: potencial mecanismo de ação no hipocampo**

Tese submetida ao Programa de pós-graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Doutora em Farmacologia  
Orientador: Prof. Dr. Leandro José Bertoglio, Dr.

Florianópolis

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Franzen, Jaqueline Maisa

Efeito do CANABIDIOL sobre a expressão e a  
reconsolidação da memória aversiva contextual em ratas:  
potencial mecanismo de ação no hipocampo, coorientador,  
Leandro José , 2022.

116 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós  
Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Farmacologia. 2. Canabidiol. 3. Memória. 4. Fêmeas.  
5. Hipocampo. I. Bertoglio, . II. , Leandro José. III.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós  
Graduação em Farmacologia. IV. Título.

Jaqueline Maisa Franzen

**Efeito do canabidiol sobre a expressão e a reconsolidação da memória aversiva contextual em ratas: potencial mecanismo de ação no hipocampo**

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Rafael Mariano de Bitencourt  
Universidade do Sul de Santa Catarina

Prof. Dr. Fabrício de Araújo Moreira  
Universidade Federal de Minas Gerais

Prof. Dr. José Eduardo da Silva Santos  
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutora em farmacologia obtido pelo programa da pós graduação em farmacologia.

---

Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

---

Prof. Dr. Leandro José Bertoglio  
Orientador

Florianópolis, 2022.

Este trabalho é dedicado à minha família, meu bem mais precioso e a todos aqueles que acreditam na beleza dos seus sonhos.

## AGRADECIMENTOS

O que é a ciência, se não, uma verdade apenas provisória? A rotina de trabalho rumo ao Ph.D., rumo à composição física (e agora também virtual) de uma tese também é. Durante esta breve passagem, lembrar dos motivos que fizeram ou farão o nosso trabalho valer a pena é essencial. Andar ao lado de gigantes, pode ser uma das formas de tornar a caminhada mais enriquecedora. Diante disto, devo deixar aqui registrado o meu muito obrigada àquelas pessoas que contribuíram, de uma ou de outra forma, para este trabalho.

Obrigada:

Ao Dr. Felipe Vanz, por sempre exigir o meu máximo experimental e intelectualmente desde o primeiro momento. Grata pela paciência e pelas intermináveis horas de discussão que contribuíram, de maneira grandiosa, para o meu crescimento docente e pessoal.

Às minhas alunas de iniciação científica Sophia, Daphany e Bruna pela confiança em meus ensinamentos, mentoria e conselhos. Podem ter certeza que, na verdade, o maior aprendizado veio de vocês. Muito obrigada “*Babies Farmas*” por toda a ajuda em todos os momentos que precisei. Tenho muito orgulho de cada uma de vocês.

A todos os professores do departamento de Farmacologia, Ciências Farmacêuticas e de Fisiologia da UFSC por dividirem comigo suas expertises e por nunca julgarem a minha vontade de aprender “de tudo um pouco”.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia pela dedicação e a CAPES e ao CNPq pelo suporte financeiro, sem o qual a execução deste trabalho não teria sido possível.

Aos professores, Rafael Bitencourt, José Eduardo da Silva, Fabrício Moreira, Geison Izídio, Marcelo Giachero por aceitarem avaliar e colaborar no aprimoramento desse trabalho.

Aos colegas de Laboratório e de Pós-Graduação pela companhia diária, risos, bolos e ensinamentos pessoais.

E por fim, ao meu orientador, Dr. Leandro Bertoglio, por aceitar o desafio de me orientar por tantos anos. Obrigada pelos ensinamentos, agora, eternizados neste trabalho.

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço aos meus pais **Marisa** (sargento) e **Auri** e também aos meus irmãos **Aline** e **River** pelo apoio, amor incondicional e por perdoarem a minha ausência ao longo desta caminhada (que perdura por cerca de 11 anos). Sem vocês, nenhuma linha do meu Currículo Lattes faria sentido.

Estendo os agradecimentos:

À minha irmã, **Line**, que sempre me manteve motivada e firme nos diversos âmbitos da minha vida, mesmo quando passamos por dificuldades e estivemos fisicamente tão distantes.

Ao meu grande amigo, incentivador e eterno orientador, **Rafa**, sua amizade, apoio e palavras foram cruciais em todos os momentos. Gratidão por tudo!

À **Ana Idalina**, meu famoso “*Córtex pré frontal*”. Você me mostrou que não é preciso ter vínculo sanguíneo para chamar alguém de irmã. Dividimos tantos sonhos, risadas e angústias ao longo desses anos, que cada momento ficará eternizado em nossas lembranças. Obrigada por ter sido um dos meus portos seguros, pelo ombro e ouvido amigo nos dias felizes e também, naqueles dias mais difíceis. É imensurável a minha gratidão a você.

À **Jessica**, minha eterna “canga”, minha inspiração de dedicação, força e persistência. São mais de 10 anos contando contigo, boa parte deles, fisicamente afastadas. Muito obrigada por sempre me apoiar, por não me deixar baixar a cabeça diante das dificuldades e por cada palavra de incentivo ao longo de todos esses anos.

À **Carina**, grande irmã que o handebol me deu. Eternamente grata por toda a irmandade, parceria, confiança, risadas. Nossas conversas, desabafos e teorias de vida foram/são fundamentais.

Ao **Marcel**, pela compreensão e apoio durante toda a reta final.

Ao meu grande amigo, **Vanz**, por todas as conversas, sugestões, risadas e idas ao RU.

Ao grande “Tárra-lá”, **Ruy**, que foi o meu primeiro amigo na UFSC. Desde aquele dia, em 2016, cultivamos uma amizade linda e teimosa, cheia de desabafos, sorrisos e de sonhos. Obrigada por todo o apoio. Ainda iremos dividir uma sala de aula, Dr. Ruy, e isso será incrível!

Ao **Naka**, por sua amizade, paciência e carinho. Obrigada por tudo, por cada palavra de incentivo e pelo ombro amigo durante todos esses anos.

Às minhas primeiras incentivadoras da carreira científica, professoras e amigas **Talize e Vilminha**. Vocês exerceram seu papel de educadoras e pesquisadoras muito além das paredes da universidade. Se cheguei até aqui, foi devido a tudo o que vocês fizeram por mim, dentro e fora da sala de aula. Minha gratidão é eterna!

Por fim, agradeço ao **universo** por garantir que cada coisa se encaixe perfeitamente em seu devido lugar, no seu devido tempo...



*Você não controla tudo o que acontece na sua vida  
Mas a maneira como reage é sua responsabilidade  
Você é apenas um instante no tempo, um breve instante  
Apenas pó, veio do pó e logo voltará ao pó  
Mas até lá seja, mas seja tudo o que puder ser*

*Já vivi demais o que eu não queria viver  
Como Perseu que desafio não recusa  
Mano, eu vi demais o que eu não deveria ver  
Agora só volto com a cabeça da Medusa*

*Pouco sono, muita gana sempre foi assim  
Noites em claro planejando o que eu quero pra mim  
Frustrações e raiva dominando a minha mente  
Mas o semblante sempre calmo nada aparente  
Aprendi a disfarçar e esconder  
Nesse jogo onde emoções são fakes  
Ciclo vicioso, mano eu sei que, perde quem demonstra  
Eu tô frio sempre*

*Já reclamei muito e já briguei muito  
Hoje eu tô indiferente mano, não discuto  
Sei que ser linha de frente tem um alto custo  
Tô no apetite, sangue quente, simplesmente luto  
Fora do padrão, eu já fui julgado  
Mas só senti, não sofri, os deixei de lado  
O homem fraco que eu fui já foi sepultado  
Por que o melhor combustível é ser subestimado*

*Não vou só observar, já flagrei  
Eu parei de falar, vou fazer  
Perseguindo a nona lei do poder  
Nesse jogo o que importa é vencer*

*Meu Helmo humildade, minha espada atitude  
Meu escudo é a verdade, pois nada aqui me ilude  
Mesmo que as coisas mudem, eu vou me adaptar  
Memento mori me lembrando que eu não posso errar  
Mano sem distrações, eu sou desejo puro  
Inabalável no presente, mirando o futuro  
Lutando no escuro sem medo ou desespero  
Não sou um soldado, eu sou o exército inteiro*

*Então tudo o que falam não tem me atingido  
Eu não os vejo no meu nível, não tenho inimigos  
Confiante sigo, mano não é arrogância  
É que lutar por tanto tempo dá autoconfiança  
Eu já caí mil vezes e passei por mil fases  
Vi que a dor é um ciclo e que também se encerra  
Aprendi que a vitória pertence aos audazes  
Tô sonhando com a paz, acordando na guerra*

*“Memento mori”*

**— Leto die**

*“Não deixe o fogo morrer!”*

**— Vó Ema, *in memoriam***



## RESUMO

O canabidiol (CBD), principal constituinte não psicotomimético da *Cannabis sativa*, apresenta propriedades ansiolíticas e é capaz de prejudicar a reconsolidação da memória aversiva contextual em ratos. Os mecanismos de ação e as regiões encefálicas envolvidas nesses efeitos do CBD estão sendo elucidados. O CBD age por meio de diversos alvos farmacológicos, tais como os receptores canabinoides CB1, CB2 e os serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub>. O antagonismo de receptores CB1 preveniu os efeitos do CBD sobre a reconsolidação da memória. Já o antagonismo de receptores 5-HT<sub>1A</sub> preveniu os efeitos anti-aversivos/ansiolíticos do CBD. O antagonismo dos receptores CB2 prejudicou a consolidação da memória. O hipocampo dorsal (HPCd) é uma região-chave na expressão e reconsolidação de memórias aversivas contextuais, embora poucos estudos investigaram tais aspectos em fêmeas. O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos do CBD sobre a expressão e a reconsolidação da memória aversiva contextual em ratas e os possíveis mecanismos de ação envolvidos. A hipótese de trabalho é que o CBD recruta receptores diferentes do HPCd para produzir seus efeitos sobre a ansiedade e a memória. Ratas Wistar adultas foram submetidas ao condicionamento aversivo contextual (CAC) e, no dia seguinte, foram tratadas com CBD (1, 3 ou 10 mg/kg, i.p.) ou veículo (VEH) antes da sessão de reexposição por 5 min ao contexto pareado. Houve redução significativa do comportamento de congelamento nos grupos tratados com 3 ou 10 mg/kg de CBD em relação ao grupo controle. Esse efeito foi prevenido em fêmeas pré-tratadas intra-HPCd com WAY100635 (0,0001 µg/0,5µL; antagonista 5-HT<sub>1A</sub>), mas não com AM251 (0,0002 µg/0,5µL; agonista/antagonista inverso CB1) ou AM630 (0,001 µg/0,5µL; antagonista CB2), o que sugere que o CBD produz efeito ansiolítico/anti-aversivo através da ativação dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> hipocampais. Posteriormente, avaliamos o efeito do CBD nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg i.p. administradas previamente à exposição no teste do labirinto em cruz elevado (LCE). Neste teste, nenhum efeito do CBD foi observado, independentemente da dose testada. A seguir, investigamos os efeitos do CBD sobre a reconsolidação da memória em ratas. Utilizamos novamente o CAC, mas neste caso, ratas *Wistar* adultas foram reexpostas ao contexto pareado por 2 min e imediatamente após receberam CBD i.p. (10 mg/kg) ou intra-HPCd (30 nmol/0,5µL por hemisfério). No dia seguinte e 7 dias mais tarde, elas foram avaliadas no contexto pareado e, posteriormente, submetidas à sessão de reinstalação. Os dados obtidos sugerem que a administração sistêmica ou local de CBD prejudicou a reconsolidação da memória aversiva de forma duradoura. Tal efeito (sistêmico) foi prevenido em animais tratados intra-HPCd com AM251, mas não AM630. Em conjunto, nossos resultados indicam um recrutamento diferencial de receptores 5-HT<sub>1A</sub> e CB1 do HPCd nos efeitos do CBD sobre a ansiedade e memória em ratas.

**Palavras-chave:** canabidiol, hipocampo, memória aversiva contextual, ansiedade, reconsolidação, fêmeas.

## ABSTRACT

Cannabidiol (CBD), the main non-psychotomimetic constituent of *Cannabis sativa*, has anxiolytic properties and is capable of impair reconsolidation of contextual aversive memory. The mechanisms of action and brain regions involved in these effects of CBD are being elucidated. CBD acts through several pharmacological targets, such as CB1, CB2 cannabinoid receptors and 5-HT<sub>1A</sub> serotonergic receptors. The antagonism of CB1 receptors prevented the effects of CBD on memory reconsolidation. Antagonism of 5-HT<sub>1A</sub> receptors prevented the anti-aversive/anxiolytic effects of CBD. Antagonism of CB2 receptors impaired memory consolidation. The dorsal hippocampus (dHPC) is a key region in the expression and reconsolidation of contextual aversive memories, although few studies have investigated such aspects in females. The aim of this study was to investigate the effects of CBD on the expression and reconsolidation of contextual aversive memory in rats and the possible mechanisms of action involved. The working hypothesis is that CBD recruit's different receptors than dHPC to produce its effects on anxiety and memory. Adult Wistar rats were subjected to contextual aversive conditioning (CAC) and the following day treated with CBD (1, 3 or 10 mg/kg, systemic) or vehicle (VEH) before re-exposure session for 5 min to the paired context. There was a significant reduction in freezing behavior in the groups treated with 3 or 10 mg/kg of CBD compared to the control group. This effect was prevented in females pretreated intra-HPCd with WAY100635 (0.0001 µg/0.5µL; 5-HT<sub>1A</sub> antagonist), but not AM251 (0.0002 µg/0.5µL; CB1 inverse agonist/antagonist) or AM630 (0.001 µg/0.5 µL; CB2 antagonist), which suggests that CBD produces an anxiolytic/anti-aversive effect through hippocampal 5-HT<sub>1A</sub> receptors. Subsequently, we evaluated the effect of CBD at doses of 1, 3 and 10 mg/kg systemic administered prior to exposure in the elevated plus maze (LCE) test. In this test, the effects of CBD were not observed in any of the doses tested, suggesting that, in this test, there was no change in the behavioral parameters. Next, we investigated the effects of CBD on memory reconsolidation in rats. We used CAC again, but in this case adult Wistar rats were re-exposed to the paired context for 2 min and immediately afterwards received CBD systemic (10 mg/kg) or intra-HPCd (30 nmol/0.5µL per hemisphere). On the following day and 7 days later, they were evaluated in the paired context and subsequently submitted to a reinstatement session. The data obtained suggest that the systemic or local administration of CBD impaired the reconsolidation of aversive memory in a lasting way. Such a (systemic) effect was prevented in animals treated intra-HPCd with AM251, but not AM630. Together, our results indicate a differential recruitment of HPCd 5-HT<sub>1A</sub> and CB1 receptors in the effects of CBD on anxiety and memory in female rats.

**Keywords:** cannabidiol, hippocampus, contextual aversive memory, anxiety, reconsolidation, females.

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1</b> – Representação da estrutura química das moléculas de CBD e $\Delta^9$ -THC .....   | 22 |
| <b>Figura 2</b> – Estrutura química do canabidiol (CBD) e (-) - trans - $\Delta^9$ - tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC) .....                                    | 23 |
| <b>Figura 3</b> – Alvos moleculares e possíveis mecanismos de ação do CBD .....   | 29 |
| <b>Figura 4</b> – Visão geral do sistema endocanabinoide na modulação da plasticidade sináptica em micróglia e neurônios .....  | 32 |
| <b>Figura 5</b> – Condicionamento aversivo ao contexto e protocolo experimental utilizado..   | 34 |
| <b>Figura 6</b> – As memórias podem ser reativadas, labilizadas e modificadas através da reconsolidação .....   | 37 |
| <b>Figura 7</b> – O microambiente hipocampal envolvido na codificação e manutenção da memória .....   | 42 |
| <b>Figura 8</b> – Hipocampo dorsal .....  | 53 |
| <b>Figura 9</b> – Condicionamento aversivo ao contexto (CAC) .....  | 54 |
| <b>Figura 10</b> – Aparato utilizado para o protocolo de reinstalação .....   | 55 |
| <b>Figura 11</b> – Protocolo experimental utilizado para avaliação da expressão do comportamento sob efeito agudo do CBD .....  | 57 |
| <b>Figura 12</b> – Protocolo experimental para estudo da reconsolidação da memória em fêmeas .....  | 58 |
| <b>Figura 13</b> – Labirinto em cruz elevado (LCE) .....  | 59 |
| <b>Figura 14</b> – Representação dos parâmetros analisados no labirinto em cruz elevado (LCE) .....   | 61 |
| <b>Figura 15</b> – A administração de CBD antes da reexposição ao contexto reduz a resposta de congelamento em fêmeas .....   | 68 |
| <b>Figura 16</b> – A administração de CBD antes da reexposição ao contexto reduz a resposta de congelamento em fêmeas independentemente da fase do ciclo estral ..... | 70 |
| <b>Figura 17</b> – O CBD apresenta efeito dismórfico na expressão do congelamento ...   | 71 |
| <b>Figura 18</b> – O efeito do CBD em fêmeas é específico para memórias aversivas contextuais que foram evocadas .....  | 72 |
| <b>Figura 19</b> – Envolvimento dos receptores CB1, CB2, e 5-HT <sub>1A</sub> hipocampais no efeito anti-aversivo do CBD em fêmeas .....                              | 74 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 20</b> – Efeito das doses de CBD intraperitoneal sobre o comportamento tipo ansioso e atividade exploratória geral no labirinto em cruz elevado ..... | 75 |
| <b>Figura 21</b> – A administração de canabidiol após a reexposição ao contexto reduz a resposta de congelamento no teste A .....                               | 77 |
| <b>Figura 22</b> – Efeito do CBD após uma reexposição de 2 min ao Contexto pareado é restrito a janela temporal de 6 horas em fêmeas .....                      | 78 |
| <b>Figura 23</b> – Efeito do CBD é específico para memórias que foram evocadas .....  | 79 |
| <b>Figura 24</b> – O hipocampo é um sítio importante para o efeito do CBD no prejuízo de reconsolidação da memória aversiva contextual .....                    | 81 |
| <b>Figura 25</b> – Envolvimento dos receptores CB1 e CB2 hipocampais no prejuízo de reconsolidação exercido pelo CBD intraperitoneal .....                      | 83 |



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                   |  |
|-------------------|--|
| <b>AEA</b>        | Anandamida   |
| <b>AMPC</b>       | Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico  |
| <b>ANOVA</b>      | Análise de variância   |
| <b>BDNF</b>       | Fator neurotrófico derivado do cérebro, do inglês "Brain-derived Neurotrophic Fator"                   |
| <b>CAC</b>        | Condicionamento aversivo ao contexto   |
| <b>CB1</b>        | Receptor canabinoide do tipo CB1   |
| <b>CB2</b>        | Receptor canabinoide do tipo CB2   |
| <b>CBD</b>        | Canabidiol, modulador alostérico negativo de receptores canabinoides                                   |
| <b>CPF</b>        | Córtex pré-frontal   |
| <b>CREB</b>       | Proteína de ligação ao elemento de resposta do AMPC, do inglês "cAMP response element-binding protein" |
| <b>CTX-A</b>      | Contexto A   |
| <b>CTX-B</b>      | Contexto B   |
| <b>DAG</b>        | Diacilglicerol   |
| <b>DAGL</b>       | Diacilglicerol lipase  |
| <b>eCB</b>        | Sistema endocanabinoide  |
| <b>EI</b>         | Estímulo incondicionado  |
| <b>EC</b>         | Estímulo condicionado  |
| <b>EMT</b>        | Transportador de endocanabinoides de membrana  |
| <b>EN</b>         | Estímulo neutro  |
| <b>EPM</b>        | Erro padrão da média   |
| <b>FAAH</b>       | Enzima amida hidrolase de ácido graxo  |
| <b>FABP</b>       | Proteína de ligação de ácidos graxos   |
| <b>GPCR, Gi/o</b> | Proteína G inibitória  |
| <b>HPC</b>        | Hipocampo  |
| <b>HPCd</b>       | Hipocampo dorsal   |
| <b>i.p.</b>       | Intraperitoneal  |
| <b>IFEN</b>       | Ifenprodil, antagonista seletivo para receptores NMDA NR2B   |
| <b>IOI</b>        | Ioimbina, antagonista de receptores $\alpha_2$ adrenérgicos  |

|                          |  |
|--------------------------|--|
| <b>ITC</b>               | Células intercaladas da amígdala, grupos de neurônios GABAérgicos entre a amígdala basolateral e central |
| <b>Kg</b>                | Quilograma   |
| <b>K<sub>i</sub></b>     | Constante de equilíbrio de dissociação do fármaco para o receptor, medida em experimentos de competição  |
| <b>LCE</b>               | Labirinto em cruz elevado  |
| <b>mA</b>                | Miliampére   |
| <b>MAGL</b>              | Enzima monoacilglicerol lipase   |
| <b>MDZ</b>               | Midazolam, modulador alostérico positivo GABA-A  |
| <b>mg</b>                | Miligrama  |
| <b>NAPE-PLD</b>          | N-acil-fosfatidiletanolamina fosfolipase D   |
| <b>PI3K</b>              | Fosfatidilinositol 3-cinase, do inglês, " <i>Phosphoinositide 3-kinase</i> "                             |
| <b>PK</b>                | Farmacocinética  |
| <b>PKA</b>               | Proteína cinase A, do inglês "Protein Kinase A"  |
| <b>PPAR-γ</b>            | Receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama  |
| <b>RC</b>                | Resposta condicionada  |
| <b>TA1</b>               | Teste 1 no contexto pareado, contexto A  |
| <b>TA2</b>               | Teste 2 no contexto pareado, contexto A  |
| <b>TA3</b>               | Teste 3 no contexto pareado, contexto A  |
| <b>TEPT</b>              | Transtorno do estresse pós-traumático  |
| <b>TRPV1</b>             | Receptor vaniloide potencial transiente tipo 1   |
| <b>VEH</b>               | Veículo  |
| <b>2-AG</b>              | 2-Araquidonilglicerol  |
| <b>5-HT<sub>1A</sub></b> | Receptor serotoninérgico do subtipo 1A   |
| <b>Δ9-THC</b>            | Δ9 – tetrahydrocannabinol  |



## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO.....   | 15 |
| 1.1 CANABIDIOL: DA QUÍMICA À FARMACOLOGIA.....  | 15 |
| 1.1.2 A química fundamental do canabidiol.....  | 15 |
| 1.1.3 Farmacocinética do canabidiol.....  | 17 |
| 1.1.4 Farmacodinâmica do canabidiol.....  | 20 |
| 1.2 O SISTEMA ENDOCANABINOIDE (eCB).....  | 22 |
| 1.3 PROCESSAMENTO DAS MEMÓRIAS E O HIPOCAMPO.....   | 25 |
| 1.4 SEXO, GÊNERO, HORMÔNIOS SEXUAIS E MEMÓRIAS AVERSIVAS.....   | 30 |
| 1.5 ENGRAMAS NEURONAIS E O PROCESSAMENTO DA MEMÓRIA AVERSIVA<br>CONTEXTUAL.....   | 33 |
| 1.4 O CANABIDIOL E A ANSIEDADE.....   | 36 |
| 2 HIPÓTESE.....   | 38 |
| 3 OBJETIVOS.....  | 39 |
| 3.1 OBJETIVO GERAL.....   | 39 |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....  | 39 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS.....   | 41 |
| 4.2 DROGAS.....   | 41 |
| 4.3 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA.....   | 42 |
| 4.4 MICROINJEÇÃO INTRA HIPOCAMPAL.....  | 44 |
| 4.5 HISTOLOGIA.....   | 44 |
| 4.6 CONDICIONAMENTO DE MEDO CONTEXTUAL.....   | 45 |
| 4.6.1 Aparatos experimentais para o condicionamento, reexposição e testes.....  | 45 |
| 4.6.2 Aparato experimental para reinstalação.....   | 46 |
| 4.6.3 Protocolo experimental para análise da expressão do comportamento de congelamento<br>sob efeito agudo do canabidiol.....  | 47 |
| 4.6.4 Protocolo experimental para análise do efeito do canabidiol sobre a reconsolidação da<br>memória aversiva contextual..... | 49 |

|  |    |
|--|----|
| 4.7 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO .....  | 50 |
| 4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....  | 53 |
| 5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....  | 55 |
| 5.1 Experimento 1: Efeito do CBD intraperitoneal 45 minutos antes da sessão de reexposição na expressão do congelamento em fêmeas .....  | 55 |
| 5.2 Experimento 2: Efeito do CBD intraperitoneal 45 minutos antes da sessão de reexposição na expressão do congelamento e no ciclo estral em fêmeas.....   | 55 |
| 5.3 Experimento 3: Efeito do CBD intraperitoneal 45 min antes da sessão de reexposição na expressão do congelamento em machos e fêmeas.....  | 55 |
| 5.4 Experimento 4: Efeito do CBD intraperitoneal na ausência da sessão de reexposição na expressão do congelamento em fêmeas.....  | 55 |
| 5.5 Experimento 5: Efeito do antagonismo dos receptores CB1, CB2 ou 5-HT <sub>1A</sub> do hipocampo dorsal e efeito do CBD intraperitoneal 45 min antes da sessão de reexposição na expressão do congelamento em fêmeas..... | 56 |
| 5.6 Experimento 6: Efeito das doses de 1, 3 ou 10 mg/kg de CBD intraperitoneal 45 min antes do teste do Labirinto em cruz elevado em fêmeas.....   | 56 |
| 5.7 Experimento 7: Efeito do CBD intraperitoneal após a sessão de reexposição na expressão do congelamento em fêmeas .....   | 57 |
| 5.8 Experimento 8: Efeito do CBD intraperitoneal 6 horas após a sessão de reexposição na expressão do congelamento em fêmeas.....  | 57 |
| 5.9 Experimento 9: Efeito do CBD intraperitoneal na ausência da sessão de reexposição na expressão do congelamento em fêmeas.....  | 57 |
| 5.10 Experimento 10: Efeito do CBD intra-hipocampal dorsal após a sessão de reexposição na expressão do congelamento em fêmeas.....  | 58 |
| 5.11 Experimento 11: Efeito do CBD intraperitoneal após a sessão de reexposição e do antagonismo dos receptores CB1 e CB2 no hipocampo dorsal na expressão do congelamento em fêmeas   | 58 |
| 6 RESULTADOS .....   | 59 |

|  |           |
|--|-----------|
| 6.1 Efeito do CBD intraperitoneal 45 minutos antes da sessão de reexposição na expressão do congelamento em fêmeas.....  | 59        |
| 6.2 Efeito do CBD intraperitoneal 45 minutos antes da sessão de reexposição na expressão do congelamento e no ciclo estral em fêmeas .....   | 60        |
| 6.3 Efeito do CBD intraperitoneal 45 min antes da sessão de reexposição na expressão do congelamento em machos e fêmeas.....   | 62        |
| 6.4 Efeito do CBD intraperitoneal na ausência da sessão de reexposição na expressão do congelamento em fêmeas.....   | 63        |
| 6.5 Efeito do antagonismo dos receptores CB1, CB2 ou 5-HT <sub>1A</sub> do hipocampo dorsal e efeito do CBD intraperitoneal 45 min antes da sessão de reexposição na expressão do congelamento em fêmeas | 64        |
| 6.6 Efeito das doses de 1, 3 ou 10 mg/kg de CBD intraperitoneal 45 min antes do teste do labirinto em cruz elevado em fêmeas .....   | 66        |
| 6.7 Efeito do CBD intraperitoneal imediatamente após a sessão de reexposição na expressão do congelamento em fêmeas .....  | 67        |
| 6.8 Efeito do CBD intraperitoneal 6 horas após a sessão de reexposição na expressão do congelamento em fêmeas.....   | 69        |
| 6.9 Efeito do CBD intraperitoneal na ausência da sessão de reexposição na expressão do congelamento em fêmeas.....   | 70        |
| 6.10 Efeito do CBD intra-hipocampal dorsal após a sessão de reexposição na expressão do congelamento em fêmeas.....  | 71        |
| 6.11 Efeito do CBD intraperitoneal após a sessão de reexposição e do antagonismo dos receptores CB1 e CB2 no hipocampo dorsal na expressão do congelamento em fêmeas.....                                | 72        |
| 7 DISCUSSÃO .....  | 75        |
| 7. 1 O CBD exerce efeito ansiolítico/anti-aversivo em fêmeas.....  | 75        |
| 7.2 O CBD prejudica a reconsolidação da memória aversiva contextual .....  | 83        |
| <b>1 CONCLUSÃO.....</b>  | <b>91</b> |
| REFERÊNCIAS .....  | 92        |

## 1 INTRODUÇÃO

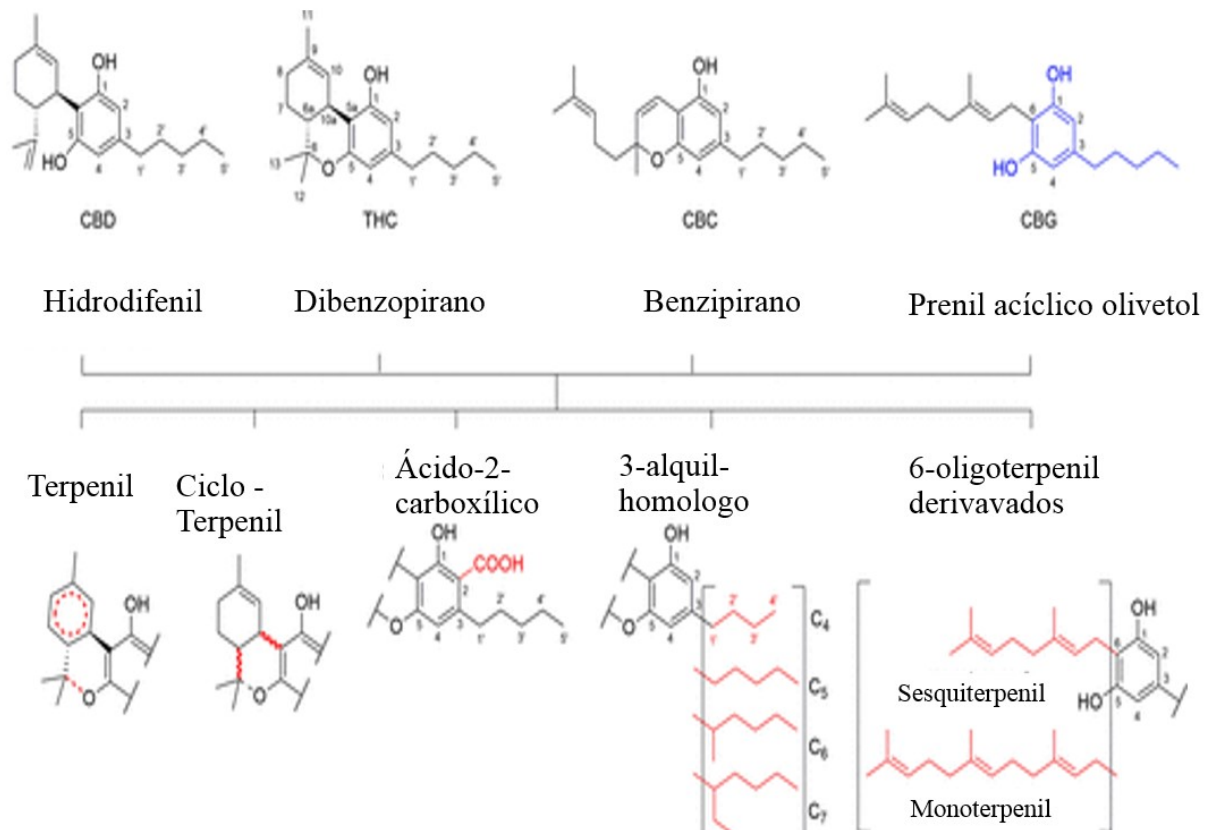
---

### 1.1 CANABIDIOL: DA QUÍMICA À FARMACOLOGIA

#### 1.1.2 A química fundamental do canabidiol

O canabidiol (CBD) é um dos mais de 150 compostos canabinoides, das mais de 400 substâncias presente na *Cannabis sativa*. O CBD é o segundo canabinoide mais abundante da planta, ficando atrás apenas da molécula mais abundante, o  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC) (NELSON et al., 2020). Quimicamente, através da União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC, do inglês, *International Union of Pure and Applied Chemistry*), o CBD recebe a denominação de 2-[(1R,6R)-3-metil-6-(prop-1-en-2-il)ciclohexo-2-en-1-il]-5-pentilbenzeno-1,3-diol.

O CBD é um terpenofenol de 21 carbonos, composto por um esqueleto tetrahidrobifenil, um núcleo bicíclico que representa um aduto formado pelo monoterpene, *p-quimeno*, e o derivado alquilresorcinol, olivetol, conforme ilustra a Figura 1 (BRUNETTI et al., 2020; NELSON et al., 2020; SHAHBAZI et al., 2020).

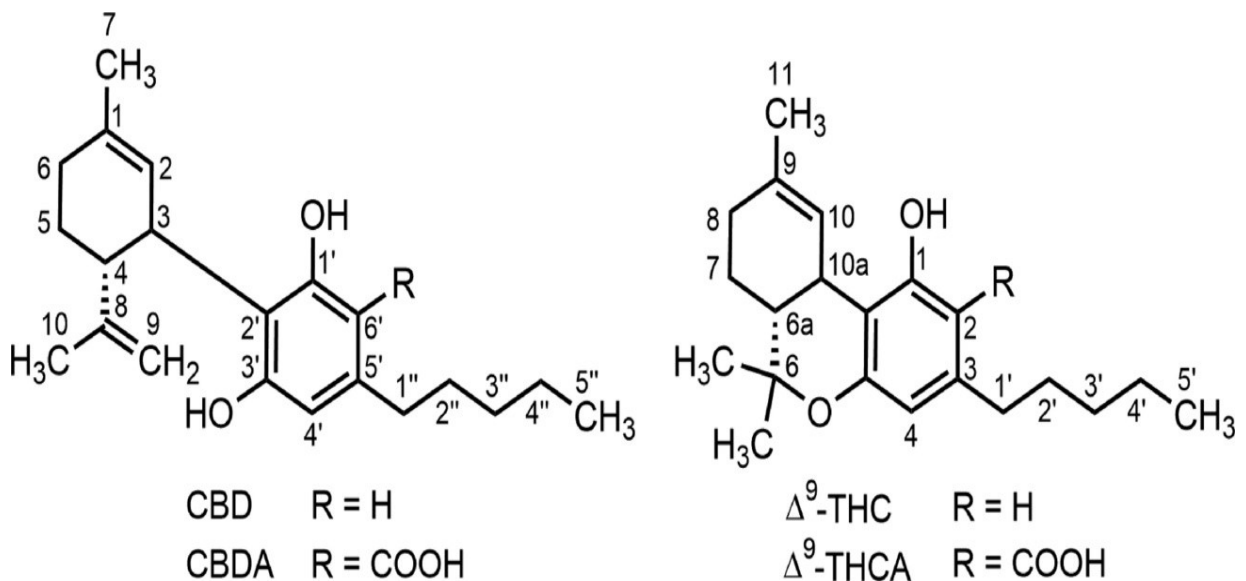


**Figura 1. Representação da estrutura química das moléculas de CBD e  $\Delta^9$ -THC.** Tanto o CBD, quanto o  $\Delta^9$ -THC, contém o esqueleto de tetrahidrodifenil. O CBD apresenta três outras classes principais de canabinoides (dibenzopiranos, benzopiranos e prenil-olivetóis acíclicos) (A) e cinco variações estruturais principais que ocorrem em todas as classes de canabinoides (B). Ambas as moléculas fazem parte dos mais de 150 canabinoides de origem natural (fitocanabinoides) encontrados no complexo metaboloma da *Cannabis sativa*. Atualmente, ambos são os compostos mais abundantes e estudados da *Cannabis sativa*. Fonte: Nelson et al., 2020.

O CBD emergiu na literatura científica na década de 40, quando Adams e colaboradores (1940) o isolaram do extrato de *Cannabis sativa*. Entretanto, sua estrutura química exata foi elucidada apenas em 1963, pela dupla de cientistas Rafael Mechoulam e Youval Shvo (MECHOULAM e SHVO, 1963). Este é um dos marcos históricos na química e na farmacologia dos compostos canabinoides. O termo “canabinoide” refere-se não apenas a uma única substância, mas sim, a uma família de compostos químicos, de várias subclasses, que atuam no sistema endocanabinoide (eCB). Atualmente, o termo canabinoide também abrange os inúmeros compostos sintéticos utilizados na pesquisa básica e clínica. Esses compostos são derivados principalmente de modificações não enzimáticas e estereoquímicas após a produção de um precursor comum. Por outro lado, o termo “fitocanabinoide” é reservado aos constituintes naturalmente presentes nas plantas de *Cannabis sp* (NELSON et al., 2020).



O CBD e o  $\Delta^9$ -THC dividem os holofotes quando o tema aborda os derivados da *Cannabis sativa*. Apesar de ambos apresentarem a mesma fórmula molecular,  $C_{21}H_{30}O_2$ , e o mesmo peso molecular 314,469 g/mol, eles não são a mesma molécula. O CBD e o  $\Delta^9$ -THC são enantiômeros estruturais e, como ilustra a Figura 2, o CBD é um terpenoide obtido a partir da alquilação de um alquilresorcinol com uma unidade de monoterpreno. Já o  $\Delta^9$ -THC é substituído na posição 1 por um grupo metil, na posição 3 por um grupo 2,6-di-hidroxi4-pentilfenil e na posição 4 com um grupo propil-1-en-2-il (GAONI & MECHOULAM, 1963). A diferença estrutural é facilmente reconhecida pela presença de dois grupos hidroxila (OH) na molécula de CBD, mas não na de  $\Delta^9$ -THC (BRUNETTI et al., 2020, MECHOULAM et al., 2002). Essa diferença química-estrutural resulta em diferenças na farmacocinética (PK) e farmacodinâmica (PD), tópicos que serão abordados nas seções seguintes. Na terapêutica, de forma simplista, o  $\Delta^9$ -THC apresenta efeito psicotomimético e euforizante, enquanto o CBD é rotulado como não psicotomimético, não euforizante e relaxante (MECHOULAM et al., 2014).



**Figura 2:** Estrutura química do canabidiol (CBD) e (-) - trans - $\Delta^9$  -tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC). Compostos terpenofenólicos de 21 carbonos que é formado após a descarboxilação de um precursor do ácido canabidiólico, ou sinteticamente com trifluoreto de boro ( $BF_3$ ) eterato. Fonte: Ujváry e Hanuš, 2016.

### 1.1.3 Farmacocinética do canabidiol

A caracterização da estrutura química e descoberta das rotas de síntese do CBD permitiram grande avanço no estudo dos efeitos farmacológicos em modelos experimentais. Impulsionado por sua versatilidade, o CBD tem sido estudado como tratamento para diversas doenças, principalmente, pela via oral (IZGELOV et al., 2020). O CBD, assim como outros

medicamentos, usufrui da tecnologia farmacêutica, fato que possibilita melhora substancial na biodisponibilidade e, conseqüentemente, no efeito terapêutico. Uma metanálise recente indica que diversas outras vias de administração seguem sob avaliação, como por exemplo, a via intravenosa, oromucosa, inalatória, transdérmica e fumada (MILLAR et al., 2018; WORLD HEALTH ORGANIZATION et al., 2017).

A PK (farmacocinética, do inglês, *pharmacokinetic*) do CBD depende da via de administração, da frequência e da dose de exposição. De forma geral, o CBD é altamente lipossolúvel, característica que favorece o deslocamento transmembrana no organismo. Por outro lado, a baixa solubilidade aquosa (estimada em menos de 6%) dificulta a solubilização no ambiente aquoso do trato gastrintestinal (AGURELL et al., 1981; MILLAR et al., 2018; WORLD HEALTH ORGANIZATION et al., 2017). Por via oral, o CBD é menos absorvido quando comparado a via inalatória. Se inalados, os canabinoides tem PK semelhante à via de administração intravenosa e, conseqüentemente, o efeito mais rápido é obtido por essa via. A  $C_{max}$  (concentração plasmática máxima medida no intervalo de tempo especificado) é obtida entre 3-10 minutos, comparado a, aproximadamente, 120 minutos por via oral em humanos. A administração inalatória ou oromucosa de canabinoides é capaz de reduzir o extenso metabolismo de primeira passagem observado na via oral (HUESTIS, 2005; HUESTIS, 2007; IZGELOV et al., 2020; MILLAR et al., 2018, MILLAR et al., 2020). Além das vias de administração supracitadas, atualmente o CBD também é encontrado em produtos alimentícios (SILMORE et al., 2021), em suplemento alimentar para atletas (MCCARTNEY et al., 2020; NAIK & TROJIAN, 2021), alimentos de caráter medicinal, como os *brownies* (WOLF et al., 2017) e mais recentemente, vaporizado em cigarros eletrônicos (KINTZ, 2020).

A distribuição do CBD está intimamente ligada à sua absorção. O volume de distribuição ( $V_d$ ) do CBD é relativamente alto e atinge o valor médio de 32 L  $kg^{-1}$  após administração intravenosa, contudo, é baixo após inalação, com valores aproximados de 3,4 L  $kg^{-1}$  (HUESTIS, 2007; OHLSSON et al., 1986). Desta forma, a faixa usual do  $V_d$  é de 20-40 L  $kg^{-1}$  (MILLAR et al., 2018; LANDMARK et al., 2020). O CBD apresenta alta lipossolubilidade e ampla ligação às lipoproteínas plasmáticas. Tais características resultam no padrão farmacocinético típico de alta biodisponibilidade, uma vez que, o CBD atinge inicialmente o tecido adiposo e órgãos bem perfundidos como o fígado, cérebro, coração e pulmões. Contudo, a concentração plasmática decai rapidamente até alcançar o equilíbrio entre os compartimentos. Após o uso repetido, o CBD e outros canabinoides acumulam-se no tecido adiposo e podem resultar na persistência da atividade canabinoide por vários dias (2-5)

e até semanas após cessar a administração (HUESTIS, 2005; HUESTIS, 2007; IZGELOV et al., 2020; MILLAR et al., 2018, MILLAR et al., 2020).

O extenso metabolismo de primeira passagem do CBD desencoraja seu uso através da via oral. Estima-se que cerca de 70 a 75% da dose utilizada por esta via é removida pelo metabolismo hepático de primeira passagem antes de atingir a circulação sistêmica (PERUCCA e BIALER, 2020). O fígado e o intestino são os principais sítios de biotransformação, através das enzimas do complexo do citocromo P450, e suas diferentes isoformas, como por exemplo, a CYP2C19 e/ou CYP3A4 e adicionalmente a CYP2C9, CYP1A2 e CYP2D6 (DOOHAN et al., 2021; HUESTIS, 2007; BRUNETTI et al., 2020; IZGELOV et al., 2020). As principais reações de biotransformação são a hidroxilação e a descarboxilação, que originam os principais metabólitos do CBD: o 7-hidroxi-canabidiol (7-OH-CBD) e o 7-carboxicanabidiol, respectivamente (7-COOH-CBD) (DOOHAN et al., 2021; HUESTIS, 2007; BRUNETTI et al., 2020; IZGELOV et al., 2020; ZENDULKA et al., 2016). Vale ressaltar que informações detalhadas sobre a atividade farmacológica dos metabólitos do CBD em humanos ainda são pouco relatadas na literatura (UJVÁRY e HANUŠ, 2016)

Recentemente, a discussão científica sobre a possível conversão do CBD em THC *in vivo* foi iniciada. Isso ocorreu após este fato ter sido demonstrado em condições *in vitro* em ambientes ácidos, semelhante às condições gastrintestinais (WATANABE et al., 2007, MERRICK et al., 2016, BONN-MILLER et al. 2016). Essa hipótese foi levantada para tentar explicar parte dos efeitos adversos do CBD como, por exemplo, a tontura, euforia, pensamento anormal, dificuldades de concentração, náusea e taquicardia (LACHENMEIER et al., 2019). Embora a literatura atual seja contraditória, a maioria dos estudos sugere que a probabilidade dessa conversão realmente ocorrer é baixa ou inexistente, mesmo quando altas doses de CBD são administradas (GROTENHERMEN, RUSSO e ZUARDI, 2017; CRIPPA et al., 2020). No entanto, essa informação permanece pertinente para o desenvolvimento de formulações, veículos (CRIPPA et al., 2021), embalagens protetoras adequadas, guiar a cadeia de transporte do medicamento e indicar as melhores condições de armazenamento para o CBD, de modo a não comprometer sua estabilidade.

A excreção do CBD ocorre, principalmente, através das fezes devido a reação de glicuronidação e em menor grau, através dos rins (HUESTIS, 2007; DOOHAN et al., 2021, PERUCCA e BIALER, 2020; SPINDLE et al., 2019). Porém, ele também pode ser detectado em outras amostras biológicas, como no fluido oral e nos cabelos (COULTER e WAGNER, 2021; HEINL et al., 2016; LIN et al., 2020; SPINDLE et al., 2020). Estima-se que a meia-

vida de eliminação seja de aproximadamente 22 horas após administração intravenosa, apesar da meia-vida inicial rápida desta via (aproximadamente 6 min) (OHLSSON et al., 1986). Outros autores relataram valores maiores de meia-vida de eliminação final, cerca de  $24 \pm 6$  h após administração intravenosa e  $1 \pm 4$  h com a via inalatória (HEUBERGER et al., 2015).

A meia-vida de eliminação do CBD é variável e segue a linha de raciocínio básico de outros medicamentos como o equilíbrio entre compartimentos e composição corporal, uso concomitante de outras drogas e a cronicidade ou não do uso de *Cannabis sp* ou compostos derivados (GROTHENHERMEN, 2003; HUESTIS, 2007; PERUCCA e BIALER, 2020).

Apesar da difusão de fármacos e produtos contendo canabinoides, a PK dessas substâncias e, particularmente, do CBD ainda é um campo em evolução. A literatura científica carece de dados em humanos e a extrapolação da PK do CBD de estudos *in vitro* e modelos animais deve ser cuidadosa. A maioria dos trabalhos disponíveis utilizou tamanho de amostra reduzido e nem todos incluíram ambos os sexos ou gêneros. Além disso, poucos estudos analisaram o CBD isoladamente. Os estudos mais frequentes englobam a avaliação da PK do CBD em combinação com  $\Delta^9$ -THC, ou ainda, na forma de extrato de *Cannabis sp.*, bem como, fumantes crônicos de cigarros de *Cannabis sp.* são frequentes.

#### **1.1.4 Farmacodinâmica do canabidiol**

O CBD desde sua descoberta e elucidação (ADAMS et al., 1940; MECHOULAM e SHVO, 1963) despertou a curiosidade da comunidade científica, uma vez que não reproduzira os efeitos tipicamente associados ao consumo de *Cannabis sp.* Mais de 60 anos se passaram e, até o momento, o (s) mecanismo (s) de ação do CBD não está (ão) totalmente esclarecido (s). Atualmente, estima-se que cerca de 65 alvos moleculares são passíveis de modulação pelo CBD (ELSAID & LE FOLL, 2020; SILVESTRO et al., 2020).

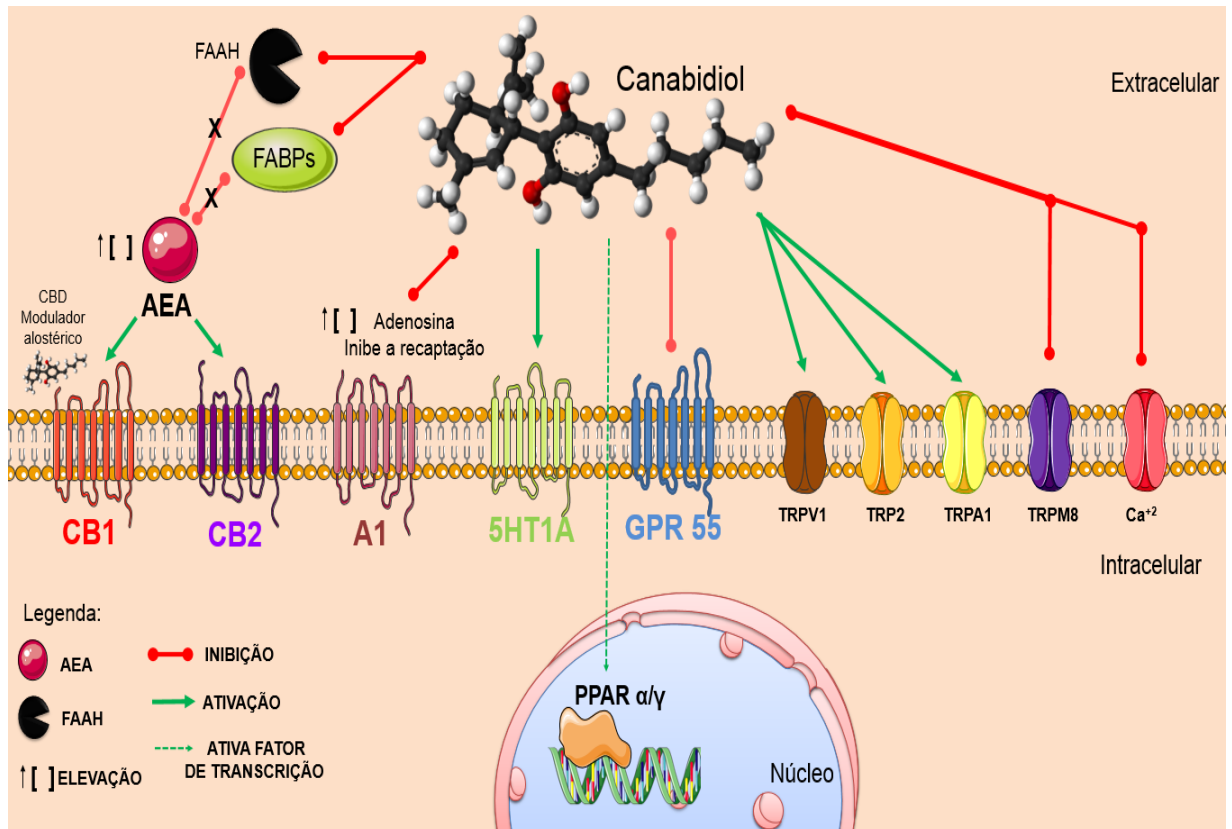
Como citado anteriormente, a alta lipofilicidade do CBD otimiza o transporte transmembrana, incluindo a barreira hematoencefálica. O sistema nervoso central (SNC) é irrigado rapidamente com o composto logo após ministrá-lo, em maior ou menor grau, de acordo com a via de administração (HUESTIS, 2007; MILLAR et al., 2018). No SNC o CBD apresenta propriedades anticonvulsivantes, antidepressivas, ansiolíticas, antipsicóticas e neuroprotetoras (PATEL et al., 2017; CRIPPA et al., 2018; ELSAID & LE FOLL, 2020; BRITCH et al., 2021).

A maioria dos efeitos do CBD no SNC surgem a partir da modulação e interação deste com diferentes receptores como, o receptor canabinoide do tipo 1 e 2, CB1 e CB2, respectivamente, GPR55 (receptor acoplado à proteína G 55), TRPV1 (receptor vaniloide de potencial transitório tipo 1), PPAR- $\gamma$  (receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama) e 5-HT<sub>1A</sub> (receptor serotoninérgico do subtipo 1A) conforme revisado por Pisanti et al., 2017). Esses alvos moleculares estão ilustrados na Figura 3.

O CBD se liga fracamente ao sítio ortostérico dos receptores CB1 e CB2 (PETITET et al., 1998; THOMAS et al., 1998). Estudos que avaliaram os valores de  $K_i$  ( $K_i$  é a constante de equilíbrio de dissociação do fármaco para o receptor, medida em experimentos de competição) indicaram valores distintos entre modelos animais e humanos. A afinidade para receptores CB1 no sítio ortostérico em humanos é de  $K_i = 1,5 \mu\text{M}$ , em camundongos é de 4,9 e 4,8  $\mu\text{M}$ . Recentemente, outros trabalhos demonstraram que o CBD é capaz de se ligar ao CB1 em seu sítio alostérico e neste, age como modulador negativo (DEVANE, 1992; MECHOULAM et al., 2002; RYBERG et al., 2007; PERTWEE, et al., 2008; LAPRAIRIE et al., 2015; McPARTLAND et al., 2015; JURKUS et al., 2016; PISANTI et al., 2017; THAM et al., 2019; LU & MACKIE, 2020; NELSON et al., 2020; PACHER et al., 2020; SHAHBAZI et al., 2020), apesar de *in vitro* sugerir ter propriedades agonistas demonstradas pelo ensaio de ligação de [35 S] GTP  $\gamma$  S, em que o CBD foi capaz de antagonizar os agonistas dos receptores canabinoides (CP55940 e R-(+)-WIN55212) no receptor CB1 de camundongo e no receptor CB2 humano.

O CBD tem baixa afinidade por receptores CB2 (PETITET et al., 1998; THOMAS et al., 1998), mas apresenta comportamento do tipo agonista inverso fraco (THOMAS et al., 2007), uma ação que pode ser responsável pelo antagonismo de CP-55,940, neste mesmo receptor com valores de  $K_i = 4,2 \pm 2,4 \mu\text{M}$ . Em receptores CB2, o CBD também pode atuar como modulador positivo e exercer ação do tipo agonista. Esta ação provém da inibição da enzima amida hidrolase de ácido graxo (FAAH; IC<sub>50</sub> 28  $\mu\text{M}$ ) e da proteína de ligação de ácidos graxos (FABP; IC<sub>50</sub> 11-25  $\mu\text{M}$ ). A FAAH é uma das enzimas que degrada os canabinoides endógenos, anandamida (EAE) e o 2-araquidonilglicerol (2-AG) ambos ligantes endógenos para CB1 e CB2. Logo, a inibição de FAAH é capaz de elevar as concentrações de AEA e o 2-AG na fenda sináptica. Já a FABP é uma das proteínas responsáveis pelo transporte desses endocannabinoides e auxilia no processo de recaptação e reciclagem de endocannabinoides.

O CBD é análogo à capsaicina e se comporta como um agonista do TRPV1. Ainda, o CBD é considerado agonista de receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT<sub>1A</sub> (BISOGNO et al., 2001; RUSSO et al., 2005; LIGRESTI et al., 2006; 2016; CAMPOS et al., 2008; PERTWEE, 2009; RESSTEL et al., 2009; McPARTLAND et al., 2015).



**Figura 3 – Alvos moleculares e possíveis mecanismos de ação do CBD.** O CBD exerce seus efeitos através dos receptores metabotrópicos CB1, CB2, A1, 5-HT<sub>1A</sub> e GPR 55 e também através da modulação de canais iônicos, como os canais iônicos do tipo TRPV1, TRPV2, TRPA1, TRPM8 e de cálcio, Ca<sup>2+</sup>. Esse fármaco inibe a enzima de degradação da AEA e 2-AG, a FAAH, e as FABPs que medeiam o transporte da AEA e do 2-AG para a fenda sináptica. Inibir a degradação AEA e 2-AG converge na ativação indireta dos receptores CB1 e/ou CB2. O CBD também modula a neurotransmissão serotoninérgica e ativa o receptor 5-HT<sub>1A</sub>, modula fatores de transcrição gênica, como o PPAR  $\alpha/\gamma$ . O CBD também é capaz de inibir a recaptação de adenosina, antagoniza o GPR55, TRPM8 e canais de Ca<sup>2+</sup> do tipo T. Adaptado de JURKUS et al., 2016 e PACHER et al., 2020.

## 1.2 O SISTEMA ENDOCANABINOIDE (eCB)

O sistema eCB é altamente organizado, síncrono e atípico, que ocupa o posto de um dos maiores sistemas moduladores do organismo. Didaticamente, o sistema eCB é composto pelos receptores clássicos, ligantes endógenos, enzimas de síntese e degradação e seus transportadores. Este sistema tem a característica particular de neurotransmissão retrógrada, além de ter seus neurotransmissores sintetizados sob demanda, ou seja, quando um estímulo é

fornecido (MECHOULAM et al., 2014; McPARTLAND et al., 2015; JURKUS et al., 2016; PACHER et al., 2020).

Os receptores canabinoides clássicos são os receptores CB1 e CB2. Ambos receptores são acoplados à proteína G inibitória (GPCR, Gi/o), inibem a adenilil ciclase e certos canais de cálcio sensíveis à voltagem, estimulam a MAPK (proteína cinase ativada por mitógenos) e os canais de potássio retificadores internos (GIRKs) (HOWLETT et al., 2002). Fisiologicamente, o CB1 e o CB2 são ativados por ligantes endógenos que incluem: N-araquidonoiletanolamina (anandamida, AEA), N-homo- $\gamma$ -linolenoiletanolamina (OEA), N-docosatetra-7,10,13,16-enoiletanolamina (docosatetraenoetanolamida, DEA) e o 2-araquidonoilglicerol (2-AG) (MECHOULAM et al., 1995; DEVANE et al., 1988; 1992, NELSON et al., 2020).

O receptor CB1 foi clonado a partir de tecidos de ratos, camundongos e humanos (97-99% de homologia entre as espécies) e é amplamente expresso no SNC e em diversos outros órgãos, incluindo o tecido adiposo, o fígado e a pele (LU & MACKIE, 2020). No SNC, o receptor CB1 está presente em neurônios GABAérgicos, incluindo interneurônios, e em sinapses glutamatérgicas, colinérgicas, glicinérgicas e serotoninérgicas, principalmente nos terminais pré-sinápticos (LU & MACKIE, 2020; SHAHBAZI et al., 2020).

O receptor CB2 foi descoberto em uma biblioteca HL60 da leucemia humana como um fragmento de cDNA que exibiu 68% de homologia com o receptor canabinoide CB1. Inicialmente, o CB2 foi caracterizado como um receptor periférico, que não era expresso no SNC, mas em macrófagos na zona marginal do baço (MUNRO et al., 1993). Entretanto, atualmente é sabido que o CB2 também está presente em regiões cerebrais importantes para a memória e aprendizado, como o hipocampo (HPC) (TSOU et al., 1998) e células nervosas de origem imunológica, como a micróglia (LU & MACKIE, 2020; NELSON et al., 2020; SHAHBAZI et al., 2020).

Além dos receptores CB1 e CB2, estudos recentes apontaram outros GPCRs como possíveis membros “órfãos” da família dos canabinoides, principalmente o GPR 18, GPR 55 e o GPCR 119. Outros receptores com estreita relação filogenética, os órfãos da classe A GPCRs, GPR3, GPR6 e GPR12, também foram associados aos canabinoides e todos esses podem interagir desempenhando papéis fisiologicamente relevantes, mas sugerem efeitos terapêuticos promissores. Contudo, até o momento da confecção deste texto, nenhum deles foi farmacologicamente validado como “receptor canabinoide tipo 3” pelo Comitê da União

Internacional de Farmacologia Clínica e Básica através da Nomenclatura de Receptor e Classificação de Medicamentos (IUPHAR BPS *Guide to PHARMACOLOGY*, 2020).

A partir da descoberta dos receptores canabinoides, iniciou-se a corrida pela busca de possíveis agonistas, antagonistas e a identificação dos ligantes endógenos para esses receptores. Os principais, e melhor caracterizados, ligantes endógenos são a AEA e o 2-AG (DEVANE et al., 1992; MECHOULAM et al., 1995; SUGIURA 1995), ambos elucidados na década de 1990. Os endocanabinoides são neurotransmissores moduladores que não ficam armazenados em vesículas e atuam como mensageiros sinápticos retrógrados. A neurotransmissão retrógrada faz com que os endocanabinoides sejam sintetizados sob demanda. Ambos, AEA e 2-AG, apresentam rotas de síntese complexas, que se iniciam a partir de estímulos, como despolarização de neurônios pelo influxo de íons cálcio ( $Ca^{2+}$ ). Ocorre também ativação secundária mediante vias intrínsecas de outros receptores metabotrópicos que recrutam a fosfolipase C (PLC). O recurso “sob demanda” dos eCBs significa que estes são liberados de maneira temporal e espacial muito precisa, o que contrasta fortemente com a administração de ligantes canabinoides exógenos, como o THC e CBD (LU & MACKIE, 2020).

Após liberação, os eCBs são rapidamente removidos do espaço extracelular por um processo de transporte de membrana ainda não totalmente caracterizado, via EMT (transportador de endocanabinoides de membrana). Dentro da célula, a AEA sofre hidrólise, principalmente, pela FAAH. O 2-AG é hidrolisado, majoritariamente, pela monoacilglicerol lipase (MAGL) na pré-sinapse, mas também ocorre degradação via ABDH6 (domínio  $\alpha/\beta$ -hidrolase 6) e nos dendritos pela FAAH, a AEA e o 2-AG interagem com os receptores CB1 e CB2 de maneira orto e alostérica. Ainda pouco se sabe sobre a modulação alostérica dos receptores CB2, mas vários moduladores alostéricos positivos e negativos dos receptores CB1 já foram descritos, incluindo o CBD (PACHER et al., 2020; SHABAZI et al., 2020).





passados aos atuais. Isso fornece o substrato para a tomada de decisões que pode ser traduzida em uma ação comportamental. Mas o que de fato é um contexto? Brevemente, contexto é o cenário, a soma do plano de fundo interno (cognitivo e hormonal) com o externo (ambiente e social). Em conjunto, esses fatores formam as representações internas, que tem o poder de moldar e ditar o comportamento dos seres vivos (DUDAI, 1989; DUDAI 2004; MAREN et al., 2013).

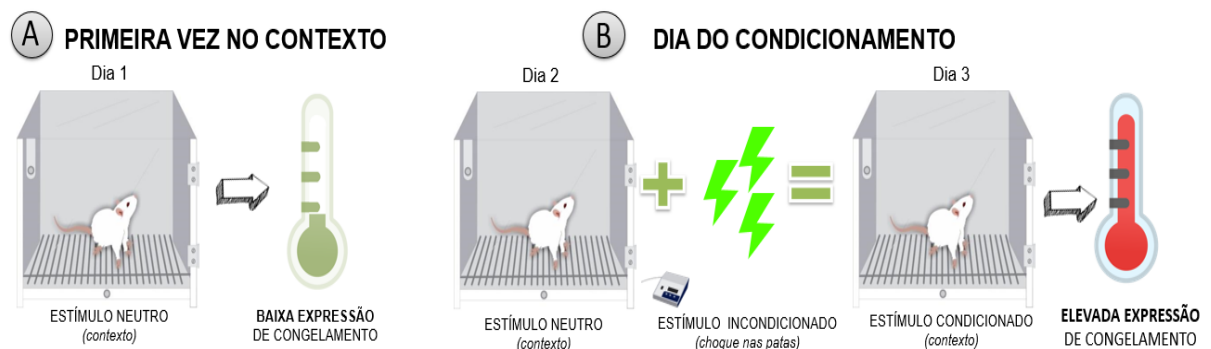
Grande parte do conhecimento que temos hoje sobre o comportamento humano diante de situações de perigo foi obtido através de estudos baseados no condicionamento aversivo contextual (CAC). O CAC é um paradigma clássico da década de 1920, que até hoje, é útil para o estudo das memórias aversivas contextuais. Este paradigma tem diversas vantagens. Primeiro, o CAC é de fácil manipulação, segundo, requer pouco recurso estrutural e financeiro e, por fim, é mundialmente aceito devido ao seu perfil de reprodutibilidade experimental. Vale ressaltar que este paradigma não ocorre apenas em condições experimentais controladas, mas sim acompanha os seres vivos durante a sua evolução, uma vez que ocorre naturalmente entre as espécies (GROSS & CANTERAS, 2012). Outra vantagem do CAC, digna de nota, é que ele tem como principal componente o contexto que, como mencionado anteriormente, é uma das peças centrais no processamento das memórias aversivas contextuais (MAREN et al., 2013).

Apesar deste modelo ser conhecido como “condicionamento Pavloviano” em homenagem às descobertas de Ivan Pavlov, em 1927, antes disso já haviam cientistas que trabalhavam em protocolos com estímulos elétricos e análise do comportamento defensivo em animais. Atualmente, as contribuições dos cientistas “*old school*” ainda são aplicadas. Por exemplo, este trabalho utilizou o CAC para induzir, avaliar e modular farmacologicamente o comportamento defensivo de roedores, nomeadamente, congelamento (do inglês, *freezing*) expresso por ratas e ratos da linhagem Wistar.

Funcionalmente, o CAC parte do pressuposto de que estímulos biologicamente relevantes, como um choque elétrico nas patas, são capazes de produzir alterações plásticas no âmbito hormonal, neuroquímico e cognitivo. Essas alterações são retidas na forma de memória, a partir de representações internas nos circuitos neuronais. As representações internas podem então ser novamente acessadas, modificadas ou mantidas. Para cada um desses caminhos, há protocolos comportamentais adequados, que torna o processamento mnemônico um prato cheio para intervenções farmacológicas.

A Figura 5 ilustra o CAC. Neste paradigma, pelo menos dois tipos de estímulos são requeridos: um estímulo inicialmente neutro (EN) e um estímulo incondicionado (EI). O EN, como um contexto, *per se* não deve desencadear respostas comportamentais defensivas significativas (Figura 5A). O EI deve ser um estímulo biologicamente relevante, como um choque elétrico nas patas. No entanto, a partir do momento em que o EI e o EN são pareados ou associados, o EN torna-se agora um estímulo condicionado (EC), como indicado na Figura 5B. A reexposição do animal ao EC é capaz de desencadear a resposta defensiva condicionada (RC). O aumento da RC no contexto é uma das garantias de que houve sucesso no protocolo de condicionamento. Essa garantia foi reforçada por Tulving em 1983, que afirmou que “a expressão do comportamento nos animais, assim como a declaração por humanos, pode ser a única prova de que a memória existe”.

A RC não é restrita ao comportamento propriamente expresso. Ela pode ser visualizada através da alteração de alguns parâmetros fisiológicos, tal como o aumento da pressão arterial e de hormônios relacionados ao estresse (LEDOUX, 2000). A quantificação do comportamento de congelamento durante a exposição ao EC é utilizada como parâmetro de retenção da memória (Figura 5C).



**Figura 5 – Condicionamento aversivo ao contexto e protocolo experimental utilizado.** (A) Animais *naive* expostos pela primeira vez ao EN expressam baixos níveis de congelamento. (B) Quando ocorre a apresentação de um estímulo biologicamente relevante, como um choque nas patas, o contexto neutro é atualizado com propriedades afetivas negativas. A partir desta associação ou condicionamento, o EN torna-se o EC e a reexposição a ele é capaz de induzir níveis mais altos de congelamento. EN, estímulo neutro; EI estímulo incondicionado; EC estímulo condicionado. Adaptado de Maren e colaboradores (2013).

O CAC permite não apenas avaliar o repertório de comportamentos associados às situações de estresse e aversão, mas também permite o estudo das fases do processamento da memória, como por exemplo, a consolidação (CAHILL; McGAUGH et al., 2000; DUDAI, 2004), a reconsolidação (ALBERINI & LEDOUX, 20015; FRANZEN et al., 2019), o estado de limbo ou fase intermediária (FRANZEN et al., 2019; VAVERKOVÁ et al., 2020) e a extinção (BOUTON, 2006). O CAC também permite o estudo dos processos associados às

fases da memória, entre eles, a reativação (CAHILL et al., 2001), a expressão da memória (DELORENZI et al., 2014), a labilização (BARREIRO et al., 2013) e a reinstalação (RESCORLA & HETH, 1975; FRANZEN et al., 2019). É importante salientar que todas as fases e processos mnemônicos aludidos são componentes indeclináveis do processamento das memórias traumáticas e podem ser modulados através da farmacologia canabinoide (NEY et al., 2019; SBARSKI & AKIRAV, 2020), exceto o processo de reinstalação que ainda carece de estudos farmacológicos adicionais. O processamento da memória tem natureza dinâmica, sendo composto pelas fases e processos subjacentes mencionados anteriormente. A Figura 6 ilustra as fases e processos mnemônicos de particular interesse para a hipótese trabalhada neste documento.

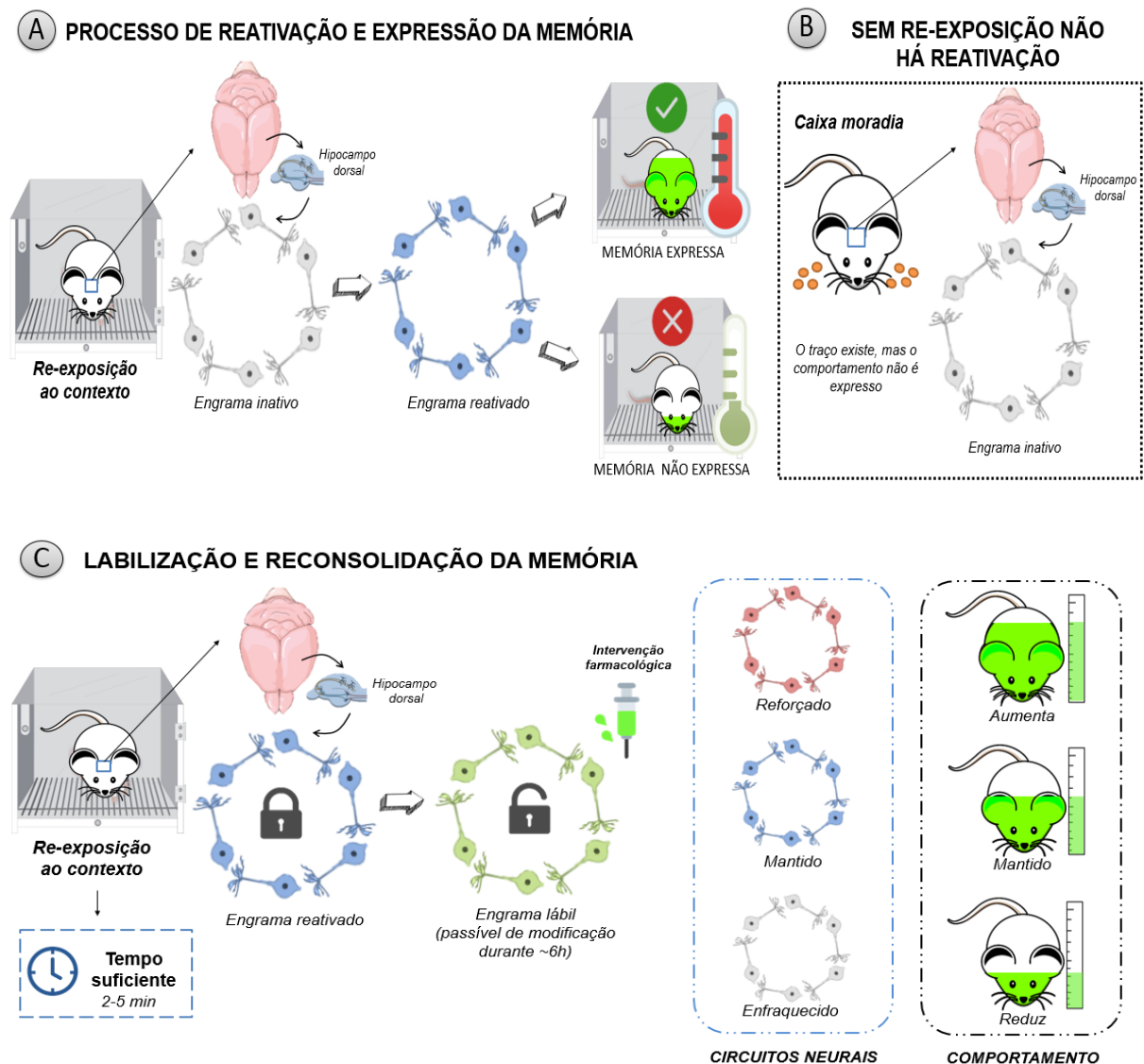
A aquisição é o primeiro processo decorrente do confronto com uma nova informação. Então, essa instrução permanece instável ou lábil por um período de tempo limitado, de aproximadamente 6 horas, denominada de janela temporal de estabilização. Durante esse lapso temporal, vias intracelulares são acionadas para estabilizar o traço de memória até a sua conformação final, etapa chamada de consolidação (McGAUGH, 2000). Uma vez consolidada, a memória pode ser evocada através da tentativa voluntária de lembrança, ou caso pistas suficientes sejam apresentadas (por exemplo, o tempo de permanência do animal no contexto durante a sessão de reexposição).

O acesso e declaração da lembrança podem ser a única prova da real existência de uma memória (TULVING, 1983). Para uma evocação efetiva, pistas adequadas devem ser reapresentadas. Em modelos experimentais com animais de laboratório, a evocação da memória é obtida pela reexposição do animal ao EC. Por outro lado, ambientes não associados ao estímulo aversivo, como a caixa de moradia dos roedores e contextos diferentes do qual ocorreu o condicionamento aversivo ao contexto, por vezes, não são capazes de induzir respostas defensivas condicionadas. Neste caso, quando a evocação e expressão do comportamento não são capazes de provocar um erro de predição (discrepância de informações entre algo esperado e aquilo que ocorre), as atualizações da memória e/ou intervenções farmacológicas nesse ambiente não são eficazes em modificar o comportamento (BUSTOS et al., 2009; FRANZEN, et al., 2019). Contudo, recentemente foram demonstradas que manipulações farmacológicas fora do contexto pareado também podem servir como uma possibilidade de manipulação da memória aversiva contextual (MARIN et al., 2020).

A memória evocada pode ou não ser detectada comportamentalmente. Em ambos os casos, ela pode se tornar lábil e sofrer modulação farmacológica para enfraquecer ou se

fortalecer. Assim como na consolidação, a chance para modificar o comportamento também está limitada à janela temporal de aproximadamente 6 horas, chamada de janela de reconsolidação (ALBERINI & LEDOUX, 2013; LEE & FLAVELL, 2014; LEE et al., 2017; FRANZEN et al., 2019; HAUBRICH et al., 2020). As intervenções farmacológicas podem ser feitas ao longo de todas as fases da memória. Contudo, o momento da intervenção é que determina o desfecho comportamental e a cascata intracelular neuronal que será o alvo modulado (ALBERINI, 2005; HAUBRICH et al., 2020).

Para verificar se um fármaco é capaz de atenuar a expressão transitória ou aguda da RC, a intervenção deve ser feita antes do animal ser exposto ao EC e, desta forma, o comportamento pode ser mensurado e avaliado durante a sessão (BARREIRO et al., 2013). Por outro lado, se a manipulação farmacológica for realizada após a apresentação breve da pista contextual, outros processos são desencadeados (ALBERINI, 2005; SOETER & KINDT, 2011). A mesma droga poderá exercer efeitos semelhantes comportamentalmente, ou seja, atenuar a RC. Porém, esse desfecho ocorre através da interferência em vias e substratos neurais, por vezes, distintos (DELORENZI et al., 2014; BOLSONI et al., 2019; HAUBRICH et al., 2020).



**Figura 6 – As memórias podem ser reativadas, labilizadas e modificadas através da reconsolidação (A)** A reexposição ao contexto o qual ocorreu o CAC é capaz de promover a reativação dos circuitos neurais/engramas hipocámpais que codificam a memória aversiva. O engrama reativado pode induzir ou não a expressão do comportamento, logo, a reativação da memória é uma etapa limitante. **(B)** Nem todos os contextos são capazes de reativar os engramas da memória aversiva. Em locais não pareados, como a caixa moradia de roedores, o engrama está latente e não induz alteração comportamental detectável. **(C)** Caso a reexposição ao contexto pareado ocorra por tempo suficiente o engrama não é apenas reativado, mas também é labilizado e torna-se passível de modificação. Esse período é limitado, por aproximadamente 6 horas e, durante esta janela temporal, intervenções farmacológicas são capazes de modificar a composição dos circuitos neurais envolvidos. O desfecho final dessa modificação é mensurável através do comportamento, que neste caso, pode ser mantido, aumentado ou diminuído. A análise destas variações comparada a grupos controle indica o sucesso ou não da intervenção. FONTE: autora.

#### 1.4 SEXO, GÊNERO, HORMÔNIOS SEXUAIS E MEMÓRIAS AVERSIVAS

De forma análoga, a expressão da RC comportamental é a ponta de um *iceberg* que tem submerso inúmeros fenômenos de plasticidade sináptica e cognição. Esses fenômenos são confrontados com as experiências prévias de cada indivíduo e são capazes de direcionar o organismo em questão, para a escolha da melhor estratégia de enfrentamento da situação atual. Em roedores, alguns comportamentos defensivos foram caracterizados, embora, eles e seus testes comportamentais foram padronizados através da métrica de modelos animais que consideraram apenas a resposta comportamental expressa por machos. Ou seja, os padrões e conclusões comportamentais foram lapidados e adaptados a partir das respostas, níveis e estratégias adotadas por machos para consolidar o “padrão ouro” dos paradigmas comportamentais. Logo, essa padronização negligenciou o possível dimorfismo sexual no comportamento defensivo e deixou uma grande lacuna aberta na história das neurociências e da farmacologia (ARCHER, 1973; BLANCHARD et al., 1976; SHANSKY, 2020).

Na tentativa de estreitar parte desta lacuna, no ano de 2014, o Instituto Nacional da Saúde (NIH, do inglês, *National Institutes of Health*) publicou novas diretrizes que exigiram a inclusão do sexo e gênero como variável biológica na pesquisa básica e clínica, respectivamente. Em junho de 2015, a mesma instituição realizou a divulgação de um guia para incentivar os cientistas na pesquisa de ambos os sexos (COLLINS e TABAK, 2014; NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2015). A temática também foi destaque do volume 176, da edição especial de número 21 da tradicional revista de farmacologia “*British Journal of Pharmacology*” que abordou a importância das diferenças sexuais na pesquisa em farmacologia, e já em seu editorial, traz consigo a mudança nas diretrizes da revista que, teve como objetivo, garantir que o sexo não seja mais uma variável ignorada (DOCHERTY et al., 2019).

Fêmeas e mulheres foram deixadas em segundo plano na ciência ao longo dos anos. Essa negligência resultou em um viés de sexo em diversas áreas das ciências biológicas, que incluem a neurociência e a farmacologia, áreas alvo deste trabalho (BERRY & ZUCKER, 2011; CHECK HAYDEN, 2010). Curiosamente, a descoberta das diferenças sexuais no comportamento animal não é algo recente. Estudos da década de 30 e 50 verificaram que, em modelos de aprendizagem, o comportamento de ratas era “*mais variável*” do que o dos machos (McNEMAR & STONE, 1932; BROADHURST, 1959). Mas, o que poderia ser um prato cheio para o avanço da ciência e consagrar maior aplicabilidade translacional aos estudos não clínicos, na verdade foi interpretado por outro lado: o lado excludente, enviesado e tendencioso para o estudo único do sexo.

Diversos fatores contribuíram para o cenário enviesado das diferenças sexuais em modelos animais (CRAIG et al., 2004; PRENDERGAST et al., 2014). Entre eles, a segregação e a falta de representatividade histórica de mulheres na ciência (ECKLUND et al., 2012), e a atribuição de complexidade demasiada ao organismo de sexo feminino em virtude do par de cromossomos X, que lhe fornece flutuações hormonais cíclicas relacionadas à reprodução. Ainda, outro fator agravante pode ser a tentativa de explicar as diferenças comportamentais emocionais de humanos com o foco direcionado para o ciclo estral de outros mamíferos. É comum atribuir a explicação do dimorfismo encontrado em animais apenas aos hormônios sexuais (GRAY & LEVINE, 1964; GRAY, 1971). Fatores técnicos relacionados à escrita dos relatórios científicos, artigos, teses e dissertações também contribuem. Por exemplo, a ausência de informação de qual sexo foi utilizado em artigos científicos e o uso de palavras qualificadoras como, “*melhor*” ou “*pior*”, mas não “*diferente*” durante seções de interpretação de resultados entre machos e fêmeas, foram capazes de direcionar a escolha para apenas um sexo (McNEMOR & STONE, 1932). Além disso, devido às interpretações e descrições de “*melhor*” desempenho dos machos em modelos experimentais, quando comparados às fêmeas, os protocolos comportamentais acabaram padronizados e ajustados de acordo com as estratégias de enfrentamento adotadas por esse sexo (BROADHURST et al., 1959; ARCHER 1973; SHANSKY, 2018). A soma de todos esses fatores transformou a variável sexo em um grande problema que, tendenciosamente, excluiu mulheres e fêmeas de outras espécies dos avanços científicos (SHANSKY, 2020).

Diferenças sexuais no comportamento defensivo não são mero acaso ou coincidência. As diferenças sexuais têm notável participação evolutiva e adaptativa entre as espécies. Um exemplo interessante destas diferenças é o papel de cada um dos sexos em uma colônia de roedores. Nelas, fêmeas apesar de menores em tamanho, geram e defendem sua prole, enquanto machos tendem a proteger o território da colônia (BLANCHARD et al., 1976). No CAC, assim como em qualquer outro modelo experimental, o repertório de comportamentos é limitado. Tradicionalmente, no CAC o comportamento mais estudado e mensurado é o de congelamento. O congelamento é detectado através da postura arqueada, com ausência de movimentos, exceto, os relacionados com a respiração e às vocalizações. Sabidamente, o congelamento é expresso em magnitudes diferentes entre machos e fêmeas. Por exemplo, fêmeas expressam menor nível de congelamento quando comparadas aos machos em tarefas contextuais, mesmo quando a mesma intensidade de choque elétrico (EI) nas patas é fornecido (GUPTA et al., 2001; MAREN et al., 1994).



No âmbito hormonal, os hormônios gonadais são relevantes para o processamento da memória e para a expressão comportamental subsequente. Tal fato varia com o tipo de condicionamento utilizado. Algumas dessas variações foram detectadas em protocolos que utilizaram condicionamento ao som, mas não o CAC (GUPTA et al., 2001; MAREN et al., 1994). Por outro lado, outros trabalhos optaram pela técnica de ovariectomia das fêmeas associada ao aprendizado e memória e, por isso, prejuízos cognitivos significativos foram detectados (GRAHAM et al., 2013, 2014). Os hormônios gonadais são fundamentais não apenas para as funções relacionadas à reprodução, mas também para o desenvolvimento e manutenção das funções fisiológicas das fêmeas. Os hormônios gonadais são potentes neuromoduladores e essenciais para o aprendizado e memória, como aborda a recente revisão de Taxier e colaboradores (2020). Logo, os estudos devem avaliar o organismo feminino de forma global, quando a hipótese de trabalho não for a elucidação da influência hormonal sob um ou mais parâmetros. Mesmo com os incentivos à inclusão do sexo como variável biológica, muitos paradigmas devem ser rompidos. É necessário que haja uma mudança cultural e estrutural na forma de condução dos estudos comportamentais. Essas mudanças podem ser capazes de produzir um corpo de conhecimento mais equitativo, representativo e, portanto, translacional (SHANSKY & MURPHY, 2021).

## **1.5 ENGRAMAS NEURONAIS E O PROCESSAMENTO DA MEMÓRIA AVERSIVA CONTEXTUAL**

Diferentes substratos neurais participam da codificação, manutenção e expressão das memórias aversivas contextuais (GROSS & CANTERAS, 2012). Entre elas, o lobo temporal medial (MTL), com particular destaque para o hipocampo (HPC). O HPC recebe atenção especial por ser uma estrutura que processa tanto componentes contextuais, quanto componentes emocionais das memórias ao longo do seu eixo dorsal-ventral (CAHILL & McGAUGH, 2011; CHAAYA et al., 2018).

No século XV, o cientista Julius Caesars Arantius descreveu o hipocampo pela primeira vez. Mas foi apenas no século XX que, Santiago Ramón y Cajal e Raphael Lorente de Nó, através da coloração de Golgi, conseguiram detalhes da citoarquitetura hipocampal. Posteriormente, outros estudos surgiram, principalmente, estudos de inativação farmacológica transitória e com lesões hipocampais. Tais intervenções produziram déficits cognitivos em

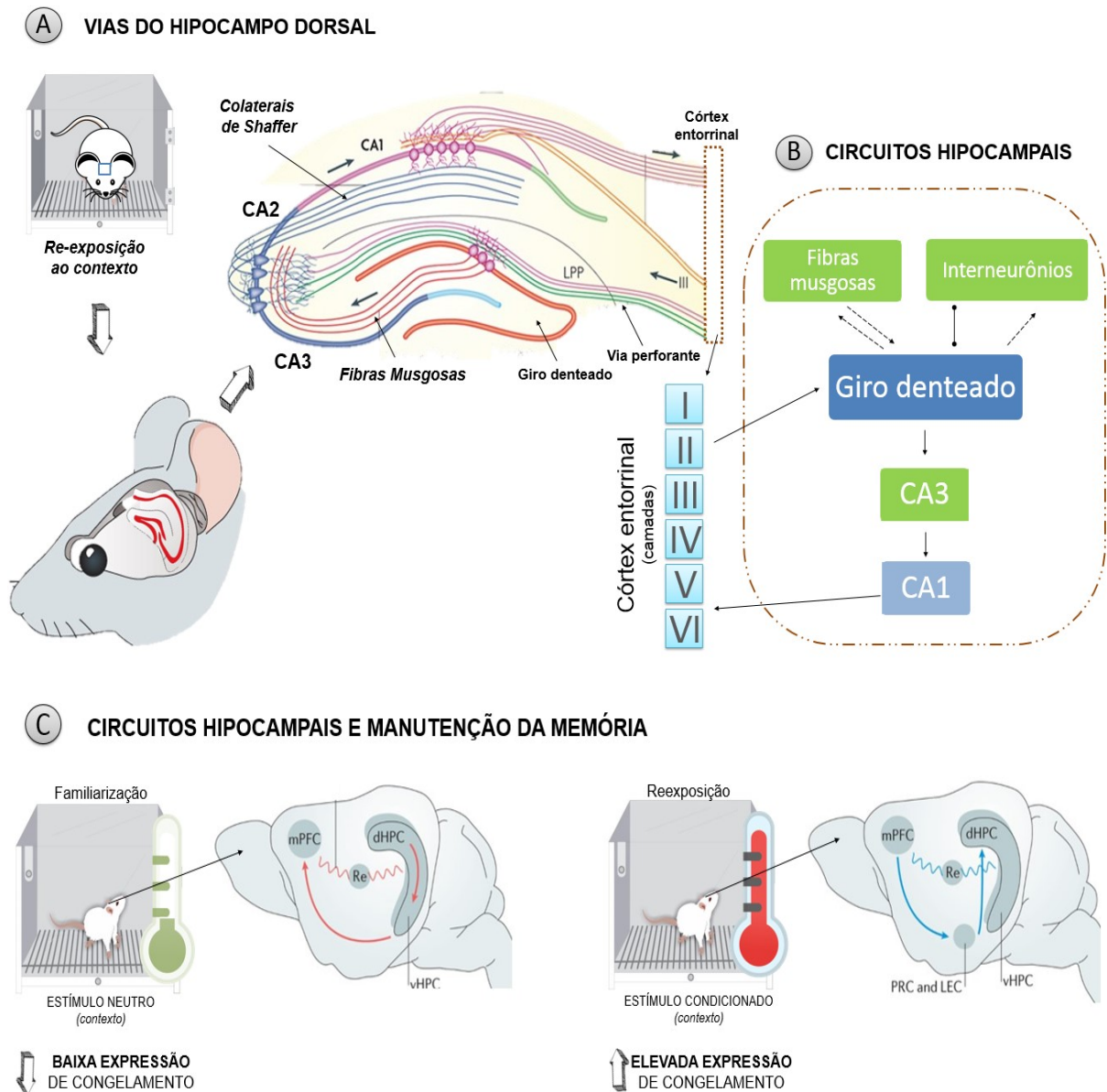
diversos tipos de memória, inclusive, em memórias declarativas, das quais, a memória aversiva contextual faz parte (MAREN et al., 2013).

No âmbito morfológico e funcional, o HPC de roedores pode ser dividido em duas porções ao longo do seu eixo longitudinal, em porção ventral e dorsal. A porção ventral (HPCv) está mais relacionada aos componentes emocionais contextuais, enquanto a porção dorsal (HPCd) é altamente eficaz em codificar os componentes espaciais (MAREN et al., 2013). Essas diferenças entre as duas porções hipocâmpais podem ser explicadas devido à alta conectividade do HPC com outras regiões corticais e subcorticais. A conexão HPC-córtex, coordenadamente, codifica, mantém, atualiza e dita as estratégias comportamentais adotadas pelo organismo. O HPC compartilha circuitos com regiões do córtex pré-frontal (CPF) que, em roedores, é subdividido em córtex cingulado anterior (CA), pré-límbico (PL) e córtex infralímbico (IL). Ainda, ocorrem conexões bidirecionais entre HPC e CPF, que envolvem outras regiões como, o núcleo reuniens do tálamo e córtex perirrinal e entorrinal (GROSS & CANTERAS, 2012; EICHENBAUM et al., 2017).

Também fazem parte da formação hipocâmpal as subdivisões CA1, CA2 e CA3, o giro denteado, o subínculo e o córtex entorrinal (CE). Essas sub-regiões fazem do microambiente hipocâmpal uma estrutura altamente organizada que processa informações do meio externo através da via trissináptica. Didaticamente, essa via é o caminho da informação espacial e emocional recebida até o seu processamento final, como ilustra a Figura 7.

A via trissináptica inicia no córtex entorrinal, através da via perforante, a qual projeta informações sensoriais (estímulos visuais e olfatórios) advindos de seus córtices específicos. Em seguida, as informações partem até o giro denteado que envia seus axônios (compostos pelas fibras musgosas) para as células piramidais da região CA3. Posteriormente, o sinal migra através da via colateral de Schaffer para a região CA1. Uma vez na CA1, a informação é dita como processada e, distribuída para as demais regiões cerebrais (MAREN et al., 2013).

As alterações plásticas que ocorrem no microambiente hipocâmpal e suas conexões, estão intimamente relacionadas com as respostas de medo, ansiedade e enfrentamento de situações de estresse. Nesse contexto, um sistema de neurotransmissão merece destaque: o sistema eCB (LUTZ et al., 2015). O sistema eCB é uma rede neuromodulatória difundida no organismo, o qual participa do desenvolvimento do SNC e periférico, capaz de sincronizar muitos processos cognitivos e fisiológicos, principalmente o aprendizado e memória (NEY et al., 2018; KRUK-SLOMKA et al., 2017; MORENA e CAMPOLONGO, 2014; MARSICANO e LAFENÊTRE, 2009).



**Figura 7 – Microambiente hipocámpal envolvido na codificação e manutenção da memória** (A) Cada exposição ao contexto envolve a ativação de regiões encefálicas responsáveis pela codificação do ambiente e da escolha da estratégia de enfrentamento. (B) Representação do diagrama da rede neural do hipocampo e a via trissináptica excitatória. Inicialmente, o estímulo é recebido através da camada II do córtex entorrinal (CE) e seus axônios se projetam para o giro denteado (DG) através da via perforante (PP), lateral (LPP) e medial (MPP). Em seguida a informação segue para o DG que envia projeções para as células piramidais em CA3 por meio de fibras musgosas. O estímulo espacial segue para a região CA1 através dos neurônios piramidais via colaterais de Schaffer. Finalmente, os neurônios piramidais da CA1 enviam projeções reversas para os neurônios das camadas profundas do EC. A CA3 também recebe projeções diretas de neurônios da camada II de CE por meio da PP. A CA1 recebe entrada direta de neurônios da camada III de CE através da via temporoamônica (TA). (C) Quando pistas contextuais são apresentadas pela primeira vez, as representações contextuais hipocámpais são conectadas e sincronizadas ao córtex pré-frontal medial através do núcleo reuniens (Re). Se a memória necessita ser novamente acessada através da reexposição ao contexto este circuito é novamente recrutado. Adaptado de Deng et al. 2010 e BANNERMAN et al. 2014.

## 1.6 O CANABIDIOL E A ANSIEDADE

O efeito ansiolítico do CBD emergiu na literatura na década de 1980, com o trabalho do cientista brasileiro Antônio Zuardi e seus colaboradores (1982). Na ocasião, os autores demonstraram que o CBD era dotado de propriedades ansiolíticas, pois era capaz de reduzir os efeitos ansiogênicos provocados pela administração do  $\Delta^9$ -THC, quando submetidos ao desafio de falar em público (ZUARDI et al., 1993). Quase uma década depois, o mesmo grupo demonstrou efeito ansiolítico do CBD em voluntários saudáveis (CRIPPA et al., 2004).

A redução da ansiedade em humanos é um processo complexo. Envolve, principalmente, a percepção neural da situação estressante somada às experiências prévias relacionadas (BLESSING et al., 2015; SKELLEY et al., 2020). Estudos mais refinados de neuroimagem sugerem que o CBD é capaz de alterar a atividade de diversas regiões cerebrais envolvidas com o processamento emocional e tomada de decisões, como por exemplo, a conectividade entre as regiões pré-frontal, subcortical e circuitos hipocampo-amigdalares (LUTZ et al., 2015; MAREN et al., 2013; NEY et al., 2019). O CBD diminuiu significativamente a ansiedade subjetiva e aumentou a sedação mental, sugerindo que o CBD reduz a ansiedade por exercer seus efeitos sobre a atividade de áreas cerebrais límbicas e paralímbicas (CRIPPA et al., 2004; 2011). Uma das consequências disso seria a redução da ansiedade induzida por falar em público, simulado em pacientes com fobia social (BERGAMASCHI et al., 2011). Entretanto, pacientes com TEPT, submetidos à sessão de recordação do evento traumático, sob efeito do CBD (dose relativamente baixa), não obtiveram melhora nos sintomas de ansiedade, alerta e desconforto induzidos pela sessão (BOLSONI et al., 2022).

Apesar das evidências robustas, e por vezes contraditórias, da efetividade do CBD como ansiolítico ou anti-aversivo, nenhum destes estudos mencionou mulheres no seu público. Apenas o trabalho de Zuardi e colaboradores (2017) relatou ambos os sexos no estudo, o qual também avaliou a curva de resposta à dose. O resultado obtido foi uma curva em forma de U invertido do efeito ansiolítico do CBD durante o desafio de falar em público, e diferenças sexuais não foram encontradas (ZUARDI et al., 2017).

Estudos mais recentes que investigaram os efeitos do CBD na ansiedade também incluíram mulheres. Entretanto, apesar da inclusão, não houve estratificação direta dos resultados quanto ao gênero. Bolsoni e colaboradores (2022) avaliaram o efeito do CBD nos sintomas induzidos pela recordação de eventos traumáticos em pacientes com TEPT. De modo geral, o estudo relatou que o CBD 300 mg administrados por via oral tem impacto

limitado na redução dos sintomas de ansiedade, alerta e desconforto induzidos pela rememoração do evento traumático, apesar de reduzir o comprometimento cognitivo se comparado aos pacientes que receberam placebo (BOLSONI et al., 2022). Resultado semelhante quanto à ansiedade foram obtidos em pacientes com COVID-19 leve a moderado (CRIPPA et al., 2021). Juntos, esses estudos sugerem que, apesar da vasta literatura suportar o efeito ansiolítico do CBD em humanos, esse padrão nem sempre é obtido e fatores como o tipo de trauma envolvido, a intensidade da sessão de rememoração, a dose de CBD utilizada e a existência de comorbidades devem ser levados em consideração.

Em ratos machos, o CBD já demonstrou ser capaz de, não apenas promover respostas ansiolíticas em baixas doses (2,5, 5 e 10 mg/kg) (GUIMARÃES et al., 1990), mas também, de prevenir respostas ansiogênicas no LCE em animais submetidos ao estresse por contenção e no teste de conflito de Vogel. O mesmo foi visualizado nas respostas cardiovasculares, através do recrutamento de receptores 5-HT<sub>1A</sub> (RESTEL et al., 2008) e nos efeitos tipo antidepressivos associados ao aumento do BDNF mediado pelos receptores 5-HT<sub>1A</sub> (ZANELATI et al., 2010), incluindo animais diabéticos tipo 1 (CHAVES et al., 2021).

O efeito do CBD se fortaleceu nos últimos anos e recentemente, tornou-se um fitofármaco produzido e vendido sob prescrição médica no Brasil. Contudo, apesar de seguir em fase de farmacovigilância, o mecanismo de ação preciso pelo qual o CBD exerce efeito ansiolítico não é totalmente conhecido. Os estudos que avaliaram o efeito do CBD em fêmeas associado à modulação da memória aversiva e da ansiedade ainda são escassos. Porém, resultados anti-aversivos obtidos em trabalhos prévios que utilizaram machos sugerem que o receptor 5-HT<sub>1A</sub> é um dos principais receptores envolvidos no efeito ansiolítico (RESTEL et al., 2006; CAMPOS e GUIMARÃES et al., 2008; O'SULLIVAN et al., 2020).

Em animas de laboratório, o padrão de resultado ansiolítico do CBD corrobora a maioria dos achados em humanos (BITENCOURT & TAKAHASHI, 2018). Estes estudos podem ser categorizados em pelo menos duas vertentes: uma que avalia respostas tipo-ansiosas “inatas” em testes como o LCE e interação social e, outra, que avalia respostas provocadas por experiências prévias, através do condicionamento aversivo ou, diferentes tipos de estresse (LISBOA et al., 2019; PELLOW et al., 1885). Assim, diferenciar e discutir essas vertentes se faz necessário para maior compreensão sobre quais componentes emocionais podem ser modulados farmacologicamente pelo CBD. Tão importante quanto entender esses componentes, também é necessário definir o melhor momento para administração do CBD em estudos que incluam o sexo como variável biológica.

## **2 HIPÓTESE**

A hipótese deste trabalho é que o mecanismo de ação subjacente ao efeito ansiolítico/anti-aversivo do CBD recruta o receptor 5HT-1A do hipocampo dorsal enquanto o efeito amnésico do CBD envolve o receptor CB1 do hipocampo dorsal.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Investigar o potencial mecanismo de ação do CBD no hipocampo dorsal sobre a redução aguda da expressão do congelamento, no prejuízo da reconsolidação da memória aversiva contextual em ratas e avaliar o efeito do CBD no comportamento tipo-ansioso.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar tratamento sistêmico com o CBD antes da sessão de reexposição na expressão da memória aversiva contextual;
- Analisar se a fase do ciclo estral influencia os efeitos do CBD sobre a expressão da memória de medo contextual durante a exposição ao contexto pareado;
- Investigar as diferenças sexuais nos efeitos do CBD antes da sessão de reexposição na expressão da memória aversiva contextual;
- Avaliar o efeito do CBD na ausência da sessão de reexposição de 5 minutos sobre a expressão da memória aversiva contextual;
- Investigar o efeito do antagonismo de receptores CB1, CB2 ou 5-HT<sub>1A</sub> hipocampais sobre os efeitos do tratamento sistêmico com CBD na expressão da memória aversiva contextual;
- Analisar o efeito tratamento sistêmico com CBD sobre o comportamento tipo-ansioso e atividade exploratória geral no labirinto em cruz elevado;
- Avaliar o efeito do tratamento sistêmico com CBD depois da sessão de reexposição de 2 minutos sobre a reconsolidação da memória aversiva contextual;
- Investigar se o efeito do tratamento sistêmico com CBD sobre a reconsolidação da memória é restrito a um período temporal de 6 horas após a sessão de reexposição;
- Avaliar o efeito tratamento sistêmico com CBD na ausência de uma sessão de reexposição de 2 minutos sobre a reconsolidação da memória aversiva contextual;

- Investigar se o hipocampo dorsal é um sítio de ação para o CBD prejudicar a reconsolidação da memória aversiva contextual;
- Investigar o efeito do antagonismo de receptores CB1 ou CB2 hipocampais e do tratamento sistêmico com CBD sobre a reconsolidação da memória aversiva contextual.



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 ANIMAIS

Neste trabalho foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) fêmeas e machos, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), com idade entre 90 e 100 dias e peso aproximado de 180 à 240 g para fêmeas e 300 à 400 g para machos. Os animais de diferentes sexos foram alocados separadamente em caixas de propileno padrão para roedores com dimensões de 36 x 30 x 15 cm. Dentro das caixas, uma camada de serragem foi fornecida e um número máximo de 5 fêmeas por caixa e 4 machos foi mantido por caixa. Durante todo o tempo de permanência no biotério, os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura e luminosidade. O ciclo de luz claro/escuro foi de 12 h. O início da fase clara às 07:00 h e a temperatura foi mantida em  $22 \pm 2$  °C, com água e comida *ad libitum*. Todos os experimentos e procedimentos deste trabalho foram executados após aprovação do comitê de ética para o uso de animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA - Nº 6335220419). Todos os testes comportamentais foram realizados durante a fase clara do ciclo claro/escuro. Foram respeitadas as normas internacionais do cuidado e bem-estar animal que também estão em conformidade com o Guia do Instituto Nacional de Saúde para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório (NIH Nº 80- 23, 1996).

### 4.2 DROGAS

O canabidiol (CBD; 99,6% de pureza pelo BioSynthesis Pharma Group (BSPG - UK), um modulador alostérico negativo e inibidor das enzimas de degradação dos endocanabinoides, foi pesado em balança analítica sob proteção da luz. Após preparo das alíquotas, o CBD foi incorporado à 5 % de monooleato de polioxietilensorbitol (Tween 80; Vetec, Brasil) e homogeneizado com auxílio de espátula de aço inoxidável para redução do tamanho das partículas de cristais. Em seguida, ainda sob proteção da luz, cuidadosamente e aos poucos, a solução de cloreto de sódio a 0,9% (NaCl) foi adicionada com auxílio de micropipeta. A cada volume de NaCl adicionado, foi executada a homogeneização do eppendorf em vórtex. Essa etapa foi executada para evitar separação e sedimentação dos componentes. Independentemente da dose preparada (1, 3, 10 mg/kg ou 30 nmol/), os mesmos

critérios, procedimentos de preparo e manuseio foram aplicados. O CBD foi administrado sistemicamente (i.p.) no volume de 1 ml/kg a partir de seringas estéreis de 1 mL e agulhas hipodérmicas descartáveis de 13 x 4,5 mm e intra-hipocampal através de micro injeção com auxílio de microseringas de 10 $\mu$ L.

O AM 251, antagonista/agonista inverso de receptores canabinoides do tipo 1 (Tocris, USA) foi dissolvido em solução de cloreto de sódio (NaCl 0,9 %) contendo 5 % de Tween 80 (Vetec, Brasil) e infundido no hipocampo dorsal na dose de 0,0002  $\mu$ g/0,5 $\mu$ L em cada um dos hemisférios hipocampais a uma taxa de infusão de 0,25 $\mu$ L por minuto. Essa concentração foi escolhida baseada em experimentos pilotos realizados em nosso laboratório.

O AM 630, antagonista de receptores canabinoides do tipo 2 (Sigma-Aldrich) dissolvido em solução de cloreto de sódio (NaCl 0,9 %) contendo 5 % de DMSO e 5 % de Tween 80 e infundido no hipocampo dorsal na dose de 0,001  $\mu$ g/0,5 $\mu$ L em cada um dos hemisférios a uma taxa de infusão de 0,25 $\mu$ L por minuto. Essa concentração foi escolhida baseada em experimentos pilotos realizados em nosso laboratório.

O WAY100635 (Sigma, EUA), um antagonista dos receptores de serotonina do tipo 5-HT<sub>1A</sub>, foi dissolvido em solução de cloreto de sódio (NaCl 0,9%) e administrado intra-hipocampo dorsal na dose de 0,0001  $\mu$ g/0,5 $\mu$ L em cada um dos hemisférios a uma taxa de infusão de 0,25 $\mu$ L por minuto. Essa concentração foi escolhida baseada em experimentos pilotos realizados em nosso laboratório.

As soluções controle/veículo (VEH) foram preparadas utilizando a mesma composição de diluentes e/ou tensoativos das soluções teste, com exceção de que, nas primeiras, nenhuma droga foi veiculada. Logo, as soluções controles diferiram, entre os experimentos, de acordo com o modo de preparo de cada uma das soluções teste. O mesmo volume, proporcional de veículo e da solução teste, foram injetados. Isso ocorreu tanto sistemicamente, quanto intra-hipocampal, de acordo com o experimento.

### **4.3 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA**

Em sala apropriada para procedimento cirúrgico, os animais foram inicialmente pesados e anestesiados com uma injeção i.p. contendo a mistura anestésica de cetamina (100 mg/ml/kg; Syntec Ltda., Brasil) e xilazina (10 mg/ml/kg; Syntec Ltda., Brasil) no volume de

1,0 ml/kg. Após alguns minutos, e depois de atingir plano anestésico adequado, a verificação dos sinais vitais e reflexos musculares foram executadas para assegurar anestesia profunda. Em caso afirmativo, os animais passaram por tricotomia na região superior frontal da cabeça e foram posicionados no aparelho estereotáxico (Stoelting, EUA) com auxílio de duas barras auriculares. Antes do posicionamento do animal, o campo cirúrgico foi cuidadosamente limpo com álcool 70%. Após ajuste do animal, no aparelho estereotáxico e antes da incisão, a superfície do campo cirúrgico foi limpa com solução de álcool iodado 2%. Em seguida, a solução anestésica de lidocaína 3% com adrenalina 1:50000 (Dentsply Pharmaceutical, Brasil) foi injetada por via subcutânea no local. A incisão longitudinal da pele, teve início acima do crânio, e permitiu a exposição e raspagem do periósteo, bem como da formação óssea do crânio e das suturas lambdoide e coronal.

Após verificação da formação óssea cranial, uma broca odontológica foi utilizada para perfuração e afixação de um parafuso de aço inoxidável no crânio. Este procedimento com intuito de auxiliar a fixação da camada protetora de acrílico. Feita a fixação do parafuso, cânulas guias de aço inoxidável (comprimento = 11,0 mm; diâmetro externo = 0,6 mm), foram implantadas, bilateralmente, no hipocampo dorsal. As coordenadas de implantação foram as seguintes: AP = -3,0 mm a partir da Bregma, ML =  $\pm$  2,2 mm em relação à sutura central, DV = 1,8 mm a partir do osso do crânio. As coordenadas foram obtidas usando o Atlas do Cérebro de Ratos (PAXINOS, WATSON, 2009) e ajustadas através de procedimentos cirúrgicos pilotos para fêmeas. Uma vez as cânulas implantadas a camada de acrílico odontológico, autopolimerizável e de secagem rápida, foi aplicada para cobrir toda a superfície craniana exposta.

Após o encerramento da cirurgia e verificação dos sinais vitais, o procedimento de analgesia pós-cirúrgica foi iniciado. Este consistiu na injeção subcutânea (s.c.) de flunixinina meglumina (2,5 mg/kg; Schering-Plough, Brasil), uma substância com propriedade analgésica, antipirética e anti-inflamatória. Posteriormente, os animais foram mantidos dispostos em caixas de polietileno, sob uma manta elétrica aquecida por 30 minutos para diminuir o risco de hipotermia e retorno dos reflexos musculares pós-anestesia. Por fim, os animais foram levados ao biotério do Laboratório de Neuropsicofarmacologia no qual permaneceram em suas caixas-moradia em um número máximo de 5 animais por caixa por 7-10 dias para recuperação. Em casos de comprometimento do bem-estar animal, decorrente de sequelas advindas da cirurgia, fins humanitários foram adotados.

#### 4.4 MICROINJEÇÃO INTRA HIPOCAMPAL

Todas as microinjeções foram realizadas no dia da sessão de reexposição, antes desta sessão, para análise da expressão da memória e, após, para os experimentos voltados ao estudo da reconsolidação. O aparato de microinfusão consistiu em uma microseringa (Hamilton, EUA) de 10  $\mu$ L conectada por um tubo de polietileno (PE10) a uma agulha gengival adaptada (30 G; comprimento = 12 mm). A microinfusão foi feita através da introdução da agulha gengival em cada uma das cânulas implantadas durante a cirurgia com o auxílio de uma bomba de microinfusão (Insight, Brasil) na velocidade de 0,5  $\mu$ L/min e volume total de injeção de 0,5  $\mu$ L/hemisfério para as drogas e veículos utilizados. Após o término do fluxo da solução, a agulha foi mantida no local por mais 30 segundos para reduzir o fluxo retrógrado e garantir a microinfusão.

#### 4.5 HISTOLOGIA

No final dos experimentos, as ratas foram profundamente anestesiadas como já descrito anteriormente. Após atingirem plano anestésico adequado os animais receberam uma solução contendo cloral hidratado (15%; 3,0 ml/kg; Vetec, Brasil) através de injeção intraperitoneal, seguida pela microinjeção central de corante azul de Evans (0,2  $\mu$ L/hemisfério) para marcar os locais onde as drogas foram infundidas no dia da microinfusão. Os cérebros foram removidos do crânio, fixados em formalina 10% (48 h) e submersos em solução de sacarose 30% por, pelo menos, 72 h antes da realização dos cortes histológicos com intuito de garantir a crioproteção do tecido. Para a verificação do sítio de microinfusão da droga, cortes coronais de 20  $\mu$ M de espessura foram obtidos utilizando um criostato (Leica, Alemanha) a uma temperatura aproximada de -21 °C.

Os cortes foram fixados em lâminas de vidro gelatinizadas para microscopia. Após a secagem, as lâminas foram submetidas à coloração por hematoxilina-eosina, montadas com resina sintética e cobertas com lamínulas. Imagens histológicas representativas foram obtidas com o auxílio de um microscópio óptico (Eclipse 50i, Nikon, EUA) equipado com câmera digital. Os cortes foram comparados aos diagramas do cérebro de ratos (Paxinos e Watson, 2009) e apenas os animais com histologia confirmada para o hipocampo dorsal (sem especificação de subdivisões) bilateralmente foram incluídos na análise estatística dos dados

(a média de acerto foi de aproximadamente 80% do total de todos os grupos experimentais), como indicada na Figura 8.

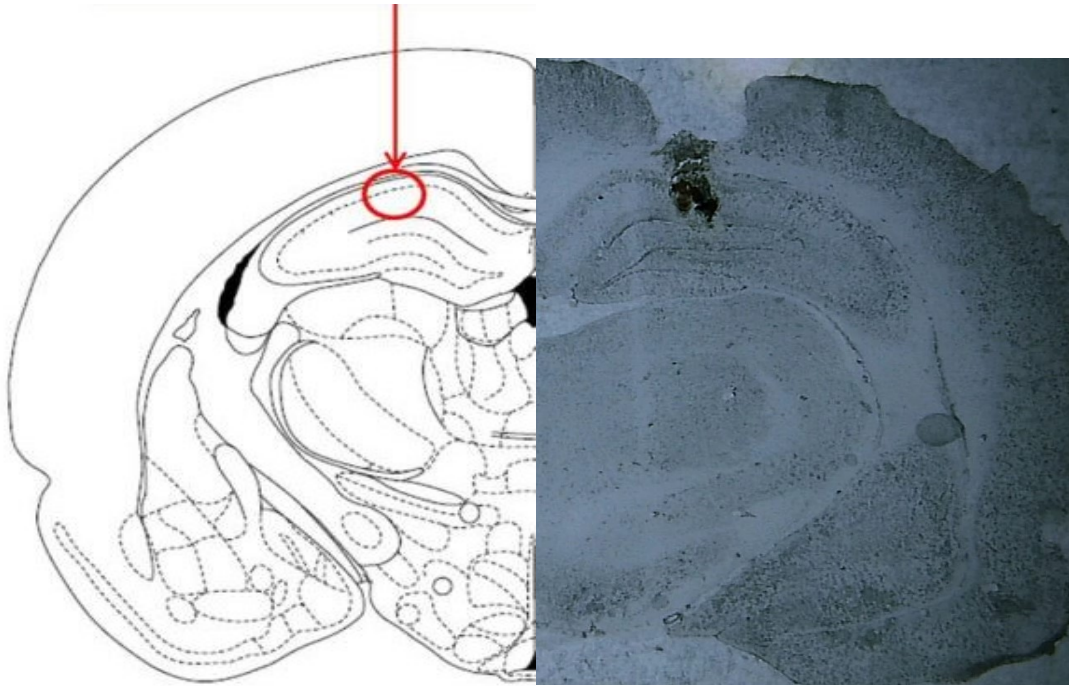


Figura 8. **Hipocampo dorsal.** Imagem representativa do sítio de injeção considerado como correto para a microinfusão do CBD, VEH ou dos antagonistas no HPCd em cortes transversais do cérebro de ratas *Wistar*. Fonte: compilação do autor a partir de Paxinos, et al., 2019, e figura de própria autoria. Fonte: autora.

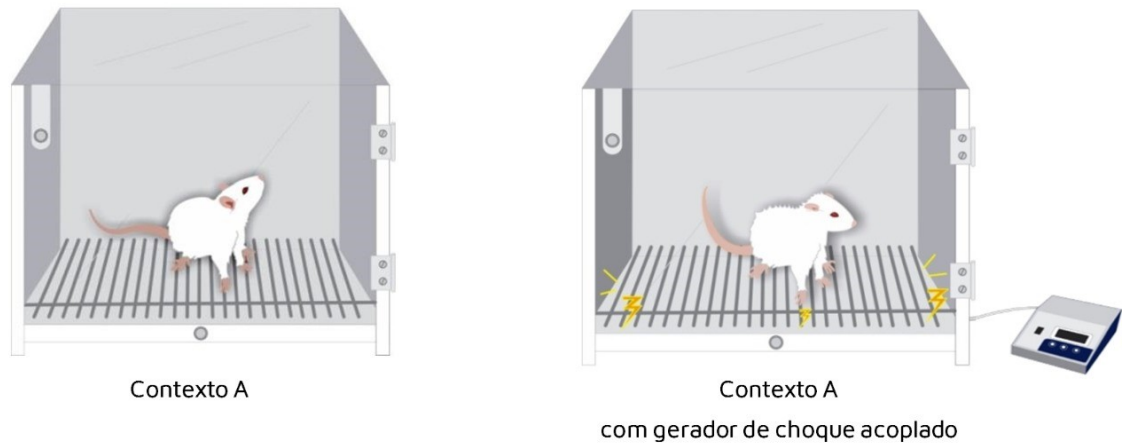
## 4.6 CONDICIONAMENTO DE MEDO CONTEXTUAL

### 4.6.1 Aparatos experimentais para o condicionamento, reexposição e testes

O condicionamento aversivo ao contexto (CAC) foi realizado em uma caixa retangular (35 x 20 x 30 cm), com paredes laterais e traseira de alumínio, parede frontal e tampa removível de acrílico, com piso gradeado, denominada contexto A (CTX-A). O piso do CTX-A foi composto por barras de aço inoxidável de 3 mm de diâmetro com espaçamento entre as barras de 9 mm (Insight, Ribeirão Preto, Brasil). Junto ao CTX-A, um gerador de choques acoplado foi utilizado para pareamento neste ambiente (apenas no dia do condicionamento, estímulo incondicionado, EI) para a aplicação dos estímulos elétricos nas patas dos animais. Neste mesmo ambiente, na ausência do EI, foram realizadas as sessões de

reexposição e de Teste A. Apenas durante sessão de reexposição de Testes A, o comportamento de congelamento foi quantificado. Durante estas sessões, foi realizada a contagem do tempo total de congelamento, e posteriormente, transformado em porcentagem média do tempo. Os aparatos experimentais utilizados no CAC são ilustrados na Figura 9.

**A APARATOS EXPERIMENTAIS UTILIZADOS NO CAC**



**Figura 9 – Condicionamento aversivo ao contexto (CAC).** (A) Na imagem da esquerda a representação gráfica do CTX-A, confeccionado em alumínio, no formato de caixa retangular (35 x 20 x 30 cm), parede frontal de acrílico e tampa com sistema abre-fecha, também de acrílico, e piso gradeado para possibilitar a passagem da corrente elétrica. Essa composição contextual foi utilizada tanto na sessão de familiarização quanto na sessão de reexposição e Testes A. Na imagem da direita, o mesmo contexto, mas agora acoplado com o gerador de choques elétricos, utilizado apenas durante a sessão de condicionamento. Fonte: autora.

#### 4.6.2 Aparato experimental para reinstalação

Neste trabalho, um protocolo de reinstalação foi utilizado para verificar o prejuízo, ou não, da reconsolidação da memória em fêmeas, como previamente descrito por Franzen e colaboradores (2019). A sessão de reinstalação ocorreu no aparato denominado contexto B (CTX-B). O CTX-B consistiu em uma caixa retangular (45 x 35 x 45 cm), com paredes laterais e traseira confeccionadas em polietileno cinza e fosco. A parede traseira interna do contexto foi coberta por listras pretas verticais. A parede frontal e a tampa do aparato foram confeccionadas com material acrílico transparente. O piso do CTX-B foi composto por barras de aço inoxidável de 3 mm de diâmetro com espaçamento entre as barras de 10 mm foi conectado a um gerador de choques elétricos (Insight, Ribeirão Preto, Brasil), conforme disposto na Figura 10. O CTX-B acoplado ao gerador de choques foi utilizado apenas uma vez e nenhum comportamento foi avaliado neste contexto.

A configuração espacial da sala de experimentos foi alterada para execução da sessão de reinstalação. O CTX-B foi disposto sob uma superfície preta. A vista da caixa de condicionamento foi direcionada para uma parede móvel de madeira da cor branca. O protocolo experimental da reinstalação é descrito na sessão 4.6.4

(A) APARATO EXPERIMENTAL UTILIZADO NA REINSTALAÇÃO



**Figura 10 – Aparato utilizado para o protocolo de reinstalação.** (A) Ilustração do CTX-B, confeccionado em polietileno cinza fosco e formato retangular (45 x 30 x 45 cm). O contexto também apresentou parede frontal e tampa de acrílico com piso gradeado, que permitiu a passagem da corrente elétrica. Esse contexto foi utilizado apenas na sessão de reinstalação e nenhum tipo de comportamento foi analisado neste local. Fonte: autora.

#### 4.6.3 Protocolo experimental para análise da expressão do comportamento de congelamento sob efeito agudo do canabidiol

O protocolo experimental utilizado para avaliação da expressão do comportamento sob efeito do CBD é ilustrado na Figura 11. Após aclimatação mínima de 30 min na sala de experimentação, os animais foram inicialmente dispostos no CTX-A para a sessão denominada de “familiarização” por um período de 3 min. Durante este tempo, os animais ficaram livres para explorar e adquirir da representação espacial do ambiente. Finalizado o tempo de 3 min, os animais foram retirados do CTX-A e devolvidos para caixa moradia.

No dia seguinte, cada animal foi novamente exposto ao CTX-A para realização do condicionamento, ou seja, para administração dos choques nas patas. Durante o condicionamento, os animais receberam após 30 segundos iniciais (período pré-choque) três estímulos elétricos nas patas de 1 mA, 60 Hz, por 3 segundos e com 30 segundos de intervalo entre cada estímulo.

Um dia depois do condicionamento ocorreu a sessão de reexposição ao CTX-A. Nesta sessão, os animais foram reexpostos ao CTX-A por 5 min na ausência do EI e paralelamente, tiveram seu comportamento avaliado e mensurado para certificação de que

houve retenção da memória aversiva, em magnitude suficiente para se manifestar comportamentalmente. As drogas utilizadas durante os experimentos foram administradas antes da sessão de reexposição sistemicamente (i.p., CBD) ou intra-hipocampal (antagonistas CB1, CB2 e 5HT1A). Essa abordagem foi realizada com o intuito de avaliar a expressão do comportamento dos animais sob efeito das drogas avaliadas. Esse protocolo foi utilizado nos experimentos de 1 até 5 e está graficamente representado na Figura 11.

O comportamento denominado de congelamento, quantificado neste trabalho, foi padronizado de acordo com Blanchard & Blanchard em 1969, em que se definiu a ausência total de movimentos do corpo e da cabeça, exceto, aqueles associados à respiração e à vocalização, e postura arqueada remetem ao comportamento de medo expresso por roedores. Todos os experimentos foram gravados por um sistema de câmera de vídeo e DVD. A sessão de reexposição foi de 5 min para os experimentos em que a administração de CBD ocorreu 45 min antes do teste. Durante o período de 5 min, o congelamento foi quantificado em segundos, com auxílio de um cronômetro, e posteriormente, transformado em porcentagem em relação ao tempo total da sessão.



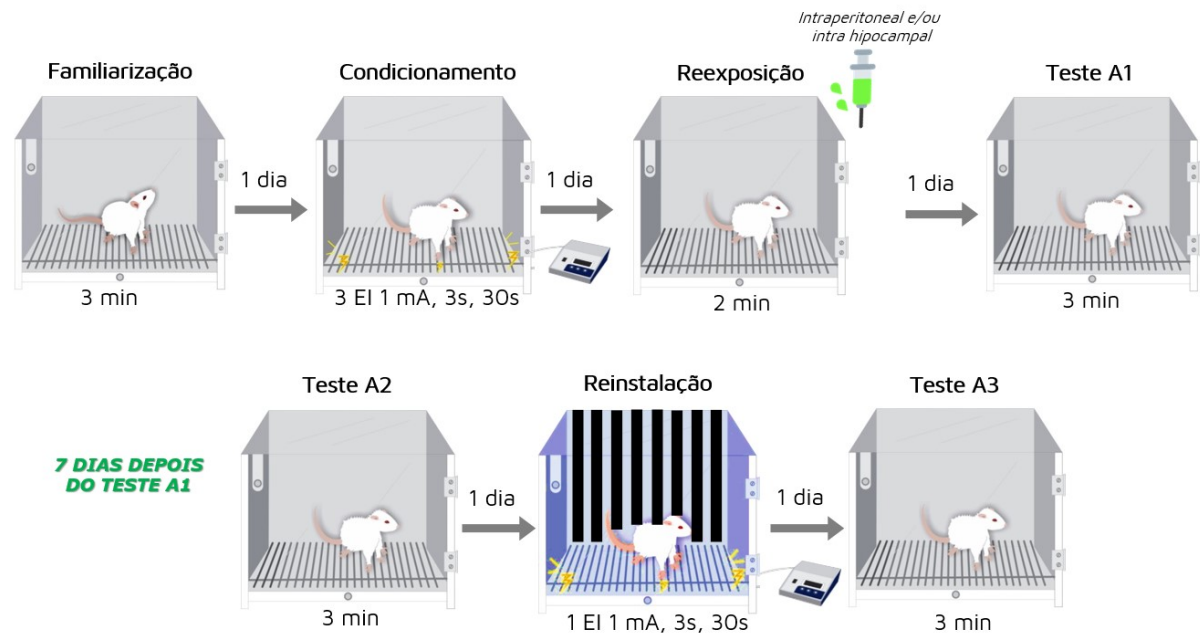
**Figura 11 - Protocolo experimental utilizado para avaliação da expressão do comportamento sob efeito agudo do CBD.** (A) Na sessão de familiarização, animais *naive* são expostos pela primeira vez ao CTX-A. Nesse, expressam baixos níveis de congelamento. No dia seguinte, durante o condicionamento, ocorre a administração de 3 choques nas patas de 1 mA, durante 3 segundos e com 30 segundos entre cada um dos estímulos. Esse procedimento faz com que o ambiente, antes neutro, seja atualizado com propriedades afetivas negativas, capaz de induzir níveis mais altos de congelamento. Por fim, no terceiro dia de protocolo, a sessão de reexposição de 5 minutos é executada para avaliação e mensuração do comportamento de congelamento. É nesta sessão que ocorrem as manipulações farmacológicas. O CBD é injetado e os antagonistas são microinfundidos 45 min antes da reexposição dos animais ao CTX-A. Este protocolo foi utilizado apenas para os experimentos e 1 a 5. Fonte: autora.



#### **4.6.4 Protocolo experimental para análise do efeito do canabidiol sobre a reconsolidação da memória aversiva contextual**

O protocolo experimental utilizado para o estudo da reconsolidação é representado na Figura 12. A sessão de familiarização e de condicionamento ocorreu da mesma forma como descrito, previamente, na seção 4.6.1. No dia da sessão de reexposição o tempo de teste e o momento de injeção das drogas foram alterados. Neste protocolo, a sessão de reexposição durou 2 minutos e o CBD e/ou os antagonistas foram administrados, não antes, mas imediatamente após a sessão de reexposição. Um dia mais tarde, os animais foram testados junto ao CTX-A, no Teste A1, bem como, novamente testados 7 dias mais tarde, no Testes A2. No dia seguinte ao Teste A2, a técnica de reinstalação foi executada. Nessa técnica, os animais foram expostos a um contexto inédito, diferente do CTX-A, denominado de CTX-B. O CTX-B foi utilizado apenas para a sessão de reinstalação, onde os animais foram dispostos por 30 segundos, seguidos da administração de um único estímulo elétrico (1 mA, 60 Hz, por 3 s), e permaneceram no mesmo lugar por mais 30 segundos. Por fim, os animais foram removidos do CTX-B. Como previamente padronizado e descrito por Franzen e colaboradores (2019), é considerada a reinstalação da memória, a avaliação e comparação do nível de congelamento entre o Teste A3 e a sessão de reexposição. Caso o grupo apresente níveis de congelamento no Teste A3 similares a si mesmo durante a sessão de reexposição, a memória é considerada reinstalada. Caso os níveis de congelamento permaneçam significativamente inferiores à sessão de reexposição, diz-se que a memória não reinstalou e, neste último caso, ocorre a confirmação do prejuízo de reconsolidação.

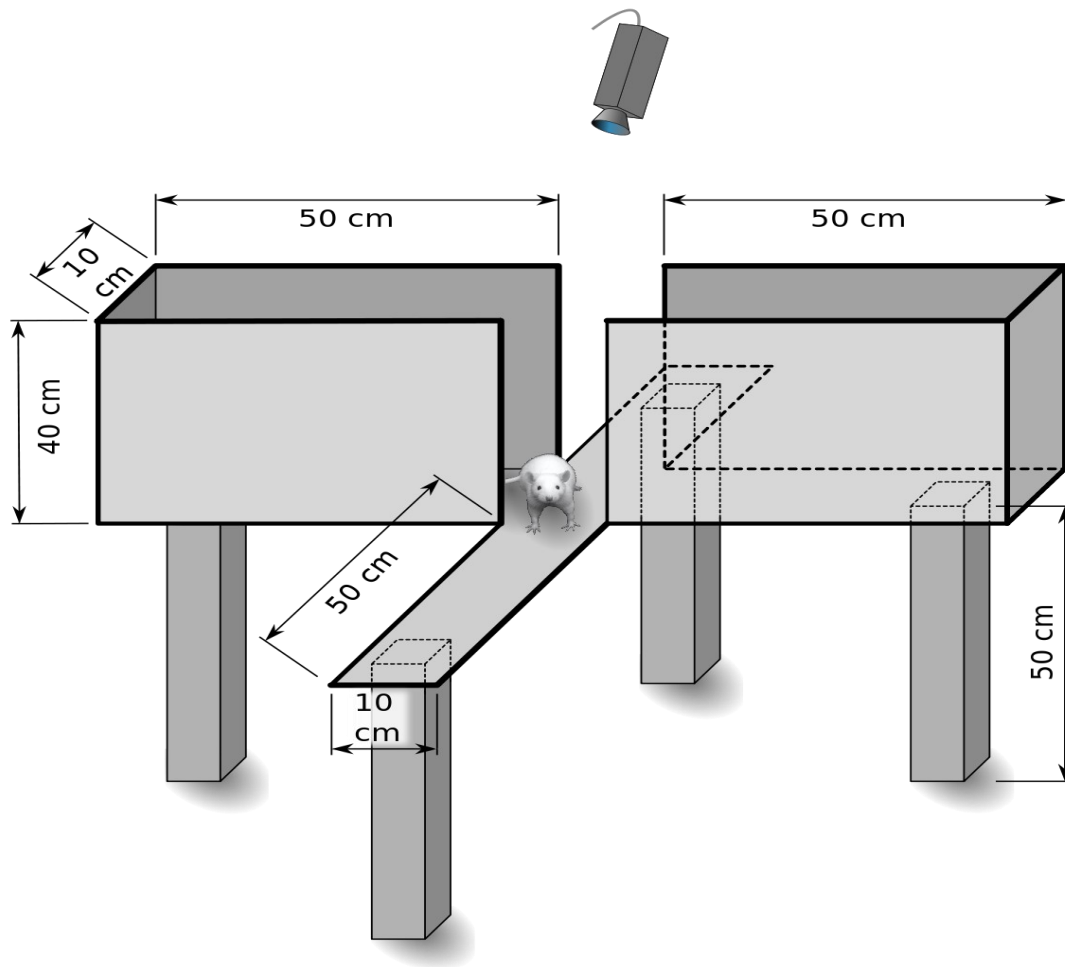
**(A) PROTOCOLO EXPERIMENTAL**



**Figura 12 - Protocolo experimental para estudo da reconsolidação da memória em fêmeas.** (A) A sessão de familiarização é o primeiro contato dos animais ao CTX-A, onde permanecem por 3 minutos para livre exploração. Um dia mais tarde, ocorre o condicionamento através da administração de 3 choques nas patas de 1 mA, durante 3 segundos e 30 segundos entre cada estímulo. Esse pareamento entre CTX-A e choque faz com que o ambiente, antes neutro, seja atualizado com propriedades afetivas negativas. Dessa forma, a reexposição a esse ambiente é capaz de induzir níveis mais altos de congelamento, resposta defensiva típica de roedores frente estímulos aversivos. É depois da sessão de reexposição que o CBD e/ou os antagonistas são administrados. No dia seguinte, o Teste A1 é executado, sem administração de drogas, e o mesmo ocorre 7 dias mais tarde, no Teste A2. Um dia depois, a sessão de reinstalação é executada no CTX-B, quando 1 estímulo elétrico de 1 mA, por 3 segundos é dado 30 segundos após o animal ser colocado no contexto. Por fim, no último dia de protocolo, o Teste A3 é realizado para detectar a reinstalação ou não do comportamento de congelamento. A confirmação do prejuízo da reconsolidação através do CBD é indicado quando o nível de congelamento no Teste A3 não retorna ao nível semelhante ao da sessão de reexposição. Fonte: autora.

#### 4.7 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

O teste do labirinto em cruz elevado (LCE) foi executado em um aparato padronizado, confeccionado em MDF acinzentado (EP-151, Insight, Brasil). O LCE é composto por 4 compartimentos que se cruzam em formato de cruz no qual, dois deles são abertos, porém, circundados por anteparos de acrílico com 1 cm de altura (50 x 10 cm) e dois deles fechados por paredes laterais também de MDF cinza (50 x 10 x 40 cm), dispostos de maneira oposta, como indicado na Figura 13.



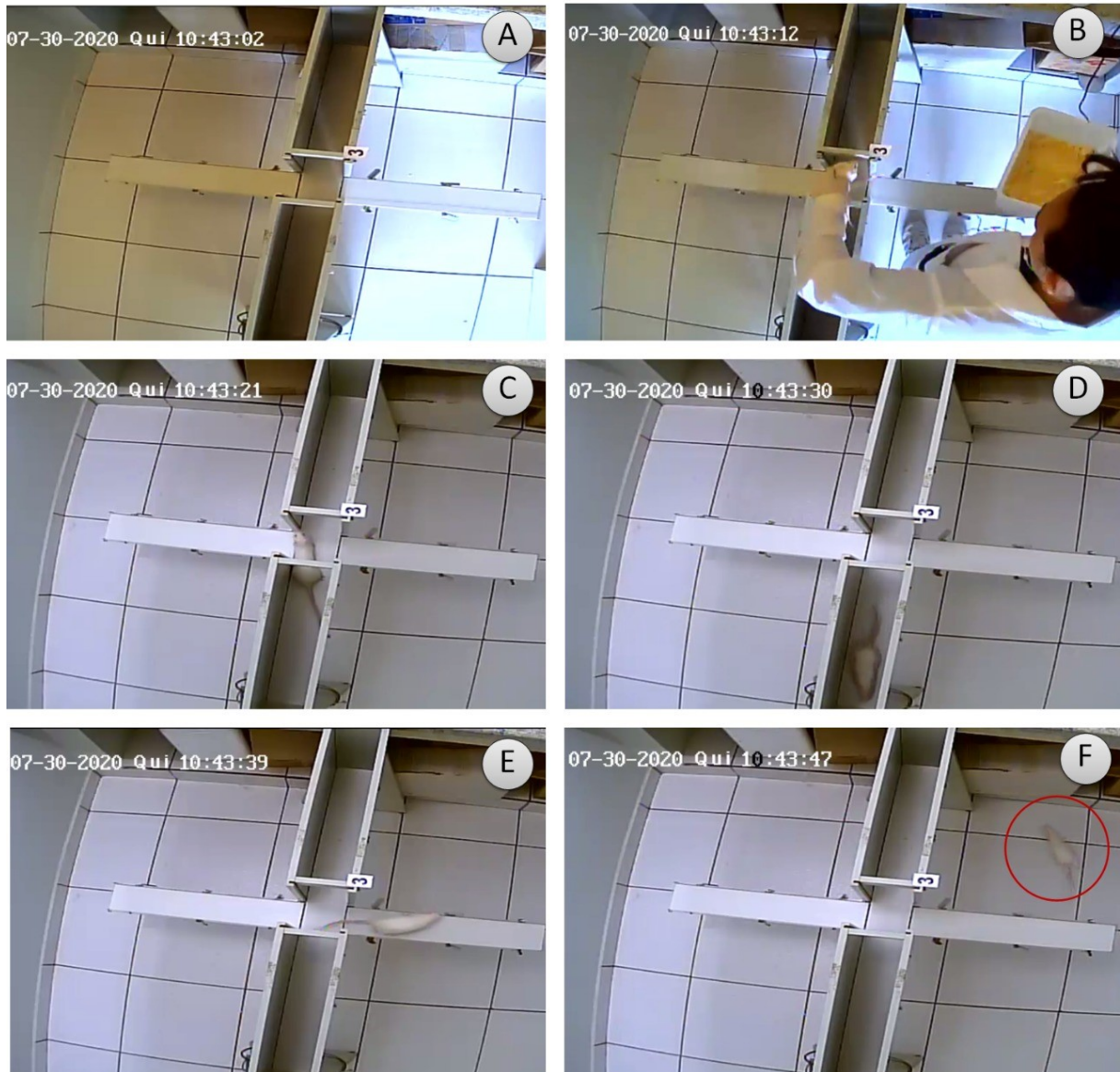
**Figura 13 – Labirinto em cruz elevado (LCE).** Representação gráfica das dimensões do LCE utilizado nos experimentos comportamentais. Fonte: Wikipedia.

No início do teste, o experimentador adentrou a sala de experimento onde estava o aparato do LCE e cuidadosamente posicionou o animal no quadrante central com a cabeça apontada sempre para o mesmo sentido (braço fechado). O ambiente teve luminosidade controlada de 40 lux. Um sistema de câmera acoplado a monitores possibilitou a captação da imagem com vista de cima para todos os braços e, desta forma, foi viável a avaliação de todos os comportamentos elencados para o teste. O teste teve duração de 5 minutos. O experimentador permaneceu na antessala e acompanhou o animal pelo monitor. Entre um animal e outro, a devida higienização foi executada através da solução de etanol a 10% (v/v). Todas as gravações foram arquivadas e encaminhadas para análise de outro experimentador, cujo o mesmo não tinha conhecimento dos tratamentos administrados.

Os parâmetros analisados foram (a) porcentagem de entradas nos braços abertos (%EA;  $[(\text{entradas nos braços abertos}/\text{total de entradas nos braços abertos e fechados}) \times 100]$ ), (b) porcentagem de tempo nos braços abertos (%TA;  $[(\text{tempo nos braços abertos}/300) \times 100]$ ),

(c) frequência de posturas de avaliação de risco (SAP) e (d) número de entradas no braço fechado (EF).

Os seguintes critérios de avaliação foram adotados para computar os comportamentos descritos acima: (a) a entrada no braço fechado e aberto ocorreu quando os animais colocaram as quatro patas no braço em questão (b) a postura de avaliação de risco (SAP) foi definida pelo comportamento típico de estiramento, quando o animal colocou ao menos uma pata em um dos braços abertos e, posteriormente, volta à posição original no centro do aparato ou no braço fechado (c) o tempo de permanência foi quantificado no momento da entrada do roedor (com as quatro patas) em um braço e assim a contagem prosseguiu até que o mesmo se movesse e uma de suas patas fosse colocada em outra parte do aparato. Em casos em que o animal caiu ou saltou dos braços do labirinto, este foi imediatamente recolhido e os dados excluídos da análise estatística, uma vez que, não completou o tempo total de teste. Todas essas situações estão ilustradas na Figura 14.



**Figura 14 - Representação dos parâmetros analisados no labirinto em cruz elevado (LCE).** (A) Vista de cima do LCE antes de iniciar o experimento. (B) Experimentadora posicionando o animal no aparato. (C) Animal disposto no quadrante central pronto para iniciar o teste. (D) Animal dentro do braço fechado, posição que contabiliza o número de entradas no braço fechado. (E) Animal no braço aberto, posição que viabiliza a análise dos parâmetros número de entradas no braço aberto e porcentagem de tempo no braço aberto. (F) Animal que saltou ou caiu dos braços do aparato, após fuga, critério de exclusão do teste LCE. Fonte: autora.

#### 4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados comportamentais foram submetidos ao teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov e ao teste de Levene para a determinação da homogeneidade de variância e demonstrados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Depois da compilação dos dados comportamentais foi realizada a análise de variância (ANOVA) de uma, duas vias ou fatorial.

Nos experimentos em que apenas uma variável independente se apresentava, como por exemplo, os animais eram do mesmo sexo e o fator preditor era apenas o tratamento farmacológico a ANOVA de uma via foi executada.

Nas comparações em que a média de duas ou mais variáveis independentes foram analisadas, como no caso de comparações que envolveram tratamento farmacológico e sexo, a ANOVA fatorial foi utilizada. Nas comparações em que a média de duas ou mais variáveis era requerida e houve a comparação entre sessão de reexposição e testes, a ANOVA de duas vias com medidas repetidas foi utilizada. Após a ANOVA, em casos em que houve efeito significativo ou interação entre as variáveis, o teste *post-hoc* de Newman-Keuls foi executado. Foram considerados efeitos significativos valores de  $P \leq 0,05$  para determinação das diferenças entre os grupos e / ou testes.

Em comparações entre dois grupos independentes sem reexposição ao mesmo contexto, o teste de “t” de *Student* foi adotado.

O eta-quadrado parcial ( $\eta^2$ ) foi calculado para estimar o tamanho do efeito de cada variável independente. Um valor de  $\eta^2 > 0,14$  foi considerado um efeito grande.

As análises foram realizadas através do programa Statistica® (versão 13; StatSoft Inc., EUA) e os valores obtidos da média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) graficamente representados através do programa GraphPad Prism® (versão 7.0 GraphPadPrism, San Diego, EUA).

## **5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL**

### **5.1 Experimento 1: Efeito do CBD intraperitoneal 45 minutos antes da sessão de reexposição na expressão do congelamento em fêmeas**

Com o objetivo de investigar se o CBD poderia influenciar na expressão da memória aversiva contextual durante a sessão de reexposição, 41 ratas foram condicionadas no CTX-A e, posteriormente, alocadas aleatoriamente em quatro grupos independentes (n= 9 - 11/grupo) com base no tratamento (VEH ou CBD 1, 3 ou 10 mg/kg i.p.) administrado 45 min antes da sessão de reexposição de 5 minutos como ilustra a Figura 15.

### **5.2 Experimento 2: Efeito do CBD intraperitoneal 45 minutos antes da sessão de reexposição na expressão do congelamento e no ciclo estral em fêmeas**

Este experimento teve o objetivo de investigar se a fase do ciclo estral poderia influenciar no efeito do CBD e na expressão da resposta defensiva diante ao contexto pareado. Para isso, 62 ratas foram condicionadas no CTX-A e, no dia seguinte, alocadas em seis grupos independentes (n= 9 - 11/grupo) de acordo com a fase do ciclo estral e o tratamento com CBD 10 mg/kg intraperitoneal ou VEH, no dia da sessão de reexposição, como representado graficamente na Figura 16.

### **5.3 Experimento 3: Efeito do CBD intraperitoneal 45 min antes da sessão de reexposição na expressão do congelamento em machos e fêmeas**

Com o intuito de determinar se fêmeas e machos podem diferir quanto aos efeitos do CBD na expressão do comportamento, 21 fêmeas e 20 machos foram condicionados e alocados em quatro grupos distintos (n = 10 - 11/grupo para fêmeas e n = 9 - 10/grupo para machos) com base no sexo e no tratamento (VEH ou CBD 10 mg/kg.ip). O desenho experimental está esquematizado na Figura 17.

### **5.4 Experimento 4: Efeito do CBD intraperitoneal na ausência da sessão de reexposição na expressão do congelamento em fêmeas**

O presente experimento foi executado com o objetivo de investigar se o CBD exerce efeito *per se* sobre o comportamento de congelamento ou se apenas a sessão de reexposição é capaz de promover um ambiente neural favorável para o CBD exercer efeito comportamental. Para tal, 18 ratas (n = 9 /grupo) foram previamente condicionadas ao CTX-A. No dia seguinte, omitiu-se a sessão reexposição, mas de maneira similar aos demais experimentos, os animais receberam aleatoriamente VEH ou CBD 10 mg/kg por via i.p. No dia seguinte, os grupos foram testados no CTX-A e tiveram seu comportamento avaliado, como ilustra Figura 18.

### **5.5 Experimento 5: Efeito do antagonismo dos receptores CB1, CB2 ou 5-HT<sub>1A</sub> do hipocampo dorsal e efeito do CBD intraperitoneal 45 min antes da sessão de reexposição na expressão do congelamento em fêmeas**

Com o objetivo de investigar alguns dos receptores que poderiam mediar o efeito do CBD sobre a expressão da resposta defensiva, 89 ratas submetidas a cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas direcionadas ao hipocampo dorsal foram condicionadas no CTX-A. Após o condicionamento as ratas foram alocadas aleatoriamente em oito grupos distintos de acordo com o tratamento intraperitoneal com veículo ou CBD 10 mg/kg e com a infusão intra-hipocampal de VEH, AM 251 0,0002 µg/0,5µL, AM 630 0,001 µg/0,5µL e WAY 100635 0,0001 µg/0,5µL dos antagonistas dos receptores CB1, CB2 e 5HT1A, respectivamente. O desenho experimental está esquematizado na Figura 19.

### **5.6 Experimento 6: Efeito das doses de 1, 3 ou 10 mg/kg de CBD intraperitoneal 45 min antes do teste do labirinto em cruz elevado em fêmeas**

Este experimento teve o objetivo de complementar a análise do efeito do CBD em fêmeas diante comportamentos de esquiva inibitória e avaliação de risco, que diferem do comportamento de congelamento. Para tal, 43 ratas foram alocadas em quatro grupos (n = 8-15/grupo) com base no tratamento com VEH ou CBD (1, 3, ou 10 mg/kg, i.p.). Os animais receberam o tratamento 45 minutos antes de serem submetidos ao teste de 5 min do LCE (como previamente descrito na seção 4.7). Os resultados são graficamente expressos na Figura 20.



### **5.7 Experimento 7: Efeito do CBD intraperitoneal após a sessão de reexposição na expressão do congelamento em fêmeas**

O presente experimento foi executado com o objetivo de investigar se o CBD seria capaz de prejudicar a reconsolidação da memória aversiva contextual. Para tal, 19 ratas foram previamente condicionadas ao Contexto A. No dia seguinte, as ratas foram alocadas aleatoriamente em dois grupos independentes (VEH n = 10 e CBD n = 9) com base no tratamento (VEH ou CBD 10 mg/kg) administrado imediatamente após a sessão de reexposição como ilustra a Figura 21.

### **5.8 Experimento 8: Efeito do CBD intraperitoneal 6 horas após a sessão de reexposição na expressão do congelamento em fêmeas**

Com o intuito de determinar se o efeito do CBD é restrito à janela temporal limitada, realizou-se o seguinte experimento. Neste experimento, 18 ratas (n = 9/grupo), foram previamente condicionadas e, um dia mais tarde, foram submetidas à sessão de reexposição de 2 min ao CTX-A e receberam aleatoriamente VEH ou CBD 10 mg/kg i.p., não imediatamente, mas sim 6 h depois desta sessão. No dia seguinte, as ratas foram testadas e retestadas, 18 horas e 7 dias depois, respectivamente, e posteriormente submetidas à sessão de reinstalação (como previamente descrito em 4.6.4), como indicado na Figura 22.

### **5.9 Experimento 9: Efeito do CBD intraperitoneal na ausência da sessão de reexposição na expressão do congelamento em fêmeas**

Objetivando investigar se o CBD é capaz de exercer efeito *per se* sobre o comportamento de congelamento ou se apenas a sessão de reexposição é capaz de induzir a labilidade da memória 18 ratas (n = 9 / grupo) foram condicionadas ao CTX-A. No dia seguinte, os animais receberam VEH ou CBD 10 mg/kg i.p., entretanto, omitiu-se a sessão de reexposição. Um dia mais tarde, os animais tiveram seu comportamento avaliado durante a sessão de Teste A1, como ilustra a Figura 23.

### **5.10 Experimento 10: Efeito do CBD intra-hipocampal dorsal após a sessão de reexposição na expressão do congelamento em fêmeas**

No intuito de investigar se o hipocampo seria um sítio neural importante para ação do CBD sobre a reconsolidação da memória aversiva contextual, realizou-se este experimento. Para tal, 16 ratas foram previamente submetidas à cirurgia estereotáxica com cânulas direcionadas ao hipocampo dorsal (como previamente descrito em 4.5). Após a recuperação, foram condicionadas no CTX-A e alocadas em dois grupos distintos de acordo com o tratamento intra-hipocampal com VEH ou CBD 30 nmol, bilateral. O desenho experimental está esquematizado na Figura 24.

### **5.11 Experimento 11: Efeito do CBD intraperitoneal após a sessão de reexposição e do antagonismo dos receptores CB1 ou CB2 no hipocampo dorsal na expressão do congelamento em fêmeas**

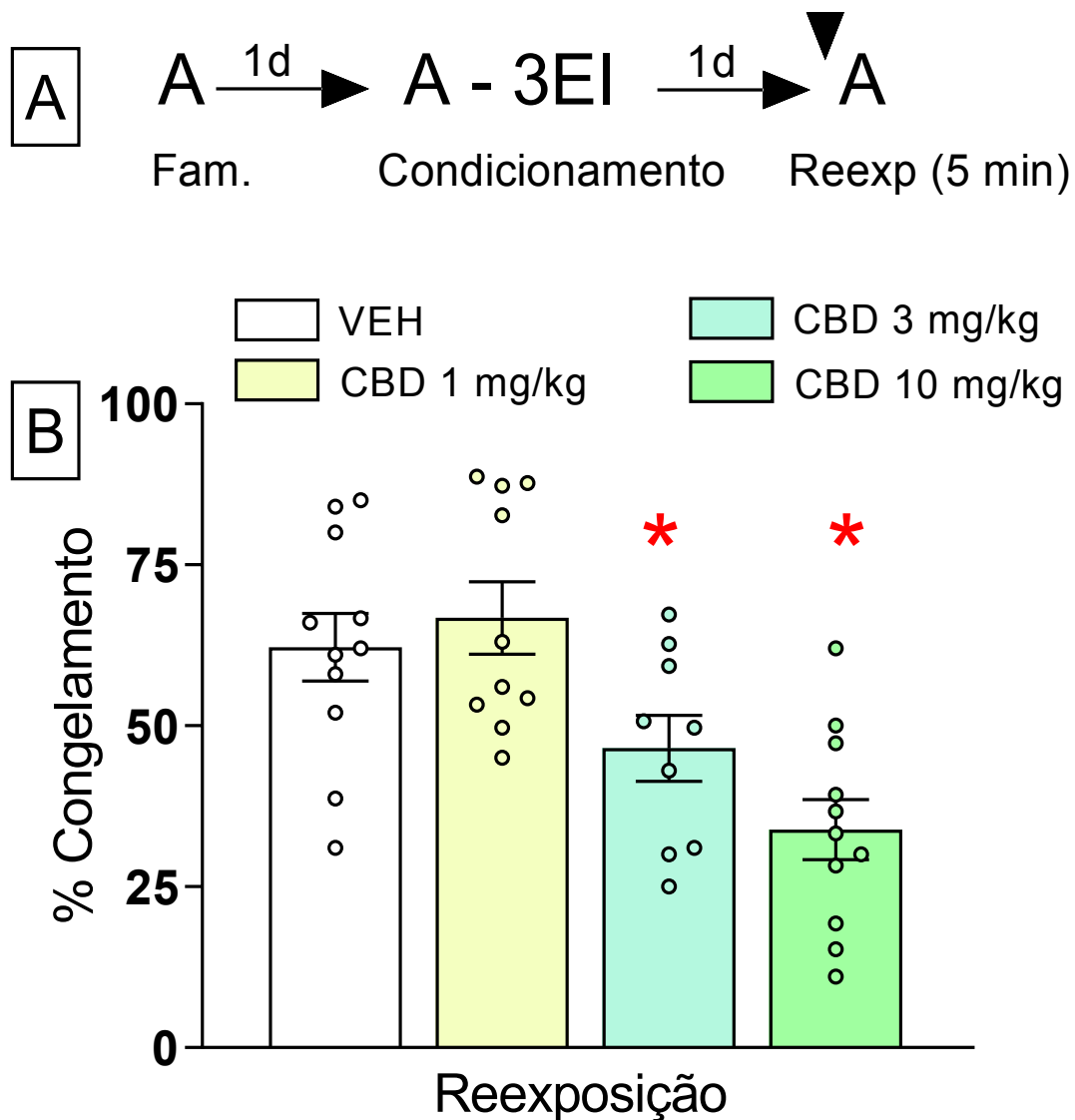
Com o objetivo de analisar quais receptores hipocampais poderiam mediar o efeito do CBD no prejuízo de reconsolidação da memória aversiva contextual, 60 ratas submetidas a cirurgia estereotáxica com cânulas direcionadas ao hipocampo dorsal (como previamente descrito em 4.7), foram condicionadas no CTX-A. Após o condicionamento as ratas foram alocadas aleatoriamente em seis grupos baseados no tratamento intraperitoneal com VEH ou CBD 10 mg/kg i.p e na infusão intra-hipocampal de VEH, AM 251 0,0002 µg/0,5µL e AM 630 0,001 µg/0,5µL, antagonistas dos receptores CB1 e CB2, respectivamente. O desenho experimental está esquematizado na Figura 25.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Efeito do CBD intraperitoneal 45 minutos antes da sessão de reexposição na expressão do congelamento em fêmeas

Houve um efeito significativo do tratamento sobre o tempo de congelamento expresso durante a sessão de reexposição ao contexto pareado [ $F_{(3,37)} = 8,8104$ ,  $p = 0,00015$ ;  $\eta^2 = 0,416$ ].

Conforme ilustrado na Figura 15, durante a sessão de reexposição, os grupos CBD 10 mg/kg ( $p = 0,001311$ ) ou CBD 3 mg/kg ( $p = 0,038757$ ), mas não o grupo CBD 1 mg/kg ( $p = 0,537714$ ), expressaram significativamente menos congelamento do que o grupo controle. Esses resultados sugerem que as duas maiores doses de CBD testadas produziram um efeito anti-aversivo/ansiolítico.

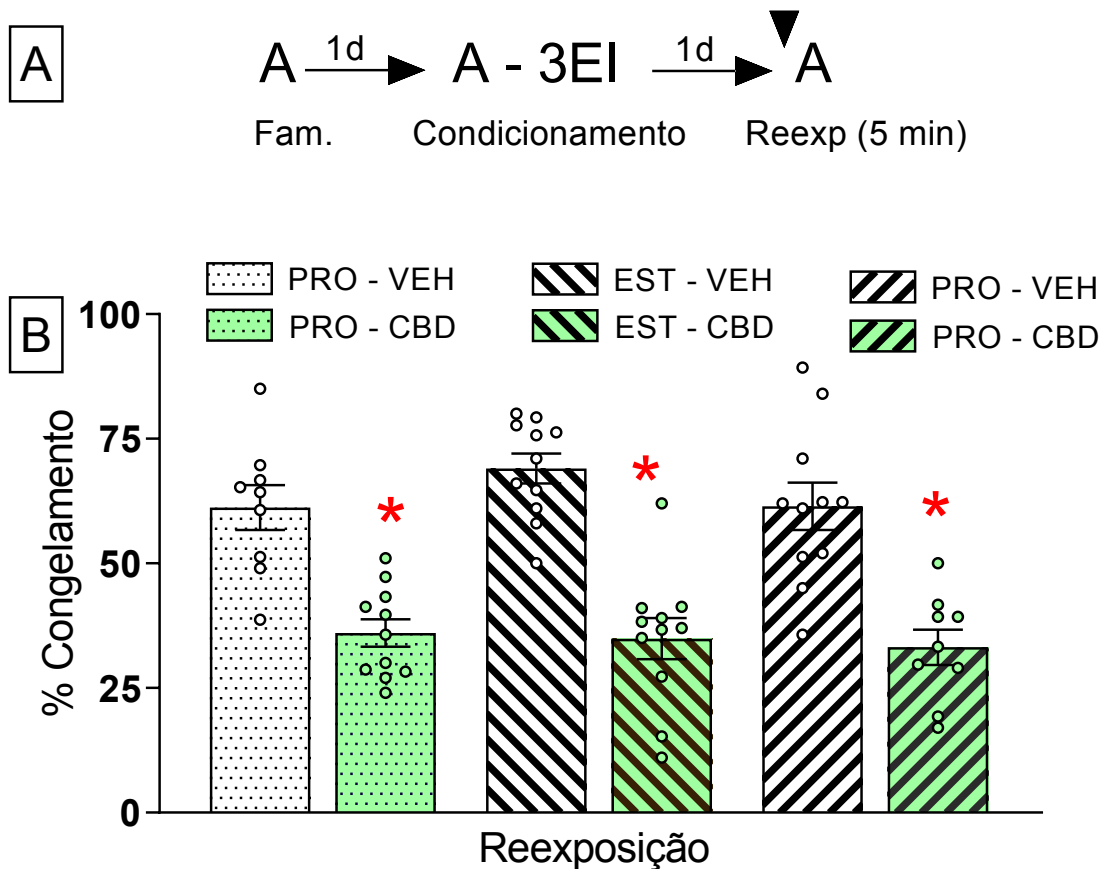


**Figura 15 – A administração sistêmica de canabidiol (CBD) antes da reexposição ao contexto reduz a resposta de congelamento em fêmeas.** (A) Protocolo experimental utilizado. (B) Representação gráfica dos níveis de congelamento durante a sessão de reexposição. Os dados são representados com média  $\pm$  E.P.M. da porcentagem de congelamento (VEH  $n = 11$ ; CBD 1 mg/kg,  $n = 10$ ; CBD 3 mg/kg,  $n = 9$ ; CBD 10 mg/kg,  $n = 11$ ). Os círculos representam os valores individuais dos animais no respectivo grupo. A seta indica o momento da administração do tratamento. \* indica  $P < 0,05$  comparado ao grupo controle. ANOVA de uma via seguida pelo teste de *post-hoc* de Newman-Keuls.

## 6.2 Efeito do CBD intraperitoneal 45 minutos antes da sessão de reexposição na expressão do congelamento e no ciclo estral em fêmeas

Houve um efeito significativo do tratamento [ $F(1, 56) = 85,928$ ,  $p = 0,000001$ ;  $\eta^2 = 0,605$ ], mas não do ciclo estral [ $F(2, 56) = 0,80438$ ;  $p = 0,45246$ ;  $\eta^2 = 0,027$ ] ou interação entre os fatores [ $F(2, 56) = 0,72101$ ;  $p = 0,49072$ ;  $\eta^2 = 0,0251$ ] sobre o tempo de congelamento.

Como demonstrado na figura 16, os grupos tratados com CBD 10 mg/kg expressaram significativamente menos congelamento durante a sessão de reexposição em comparação com respectivos grupos VEH em todas as fases do ciclo estral (CBD - PRO  $p = 0,000132$ ; CBD - EST  $p = 0,000129$ ; CBD - DIES  $p = 0,000159$ ). Durante a sessão de reexposição, as fêmeas nas três fases do ciclo estral tratadas com CBD 10 mg/kg se comportaram de forma semelhante ( $p \geq 0,861$ ). Cada uma das fases investigadas expressou significativamente menos congelamento quando comparadas os respectivos controles, VEH ( $p \leq 0,960$ ). Esses resultados sugerem que o ciclo estral não influenciou a expressão da memória e os efeitos induzidos pelo CBD na expressão do medo contextual.

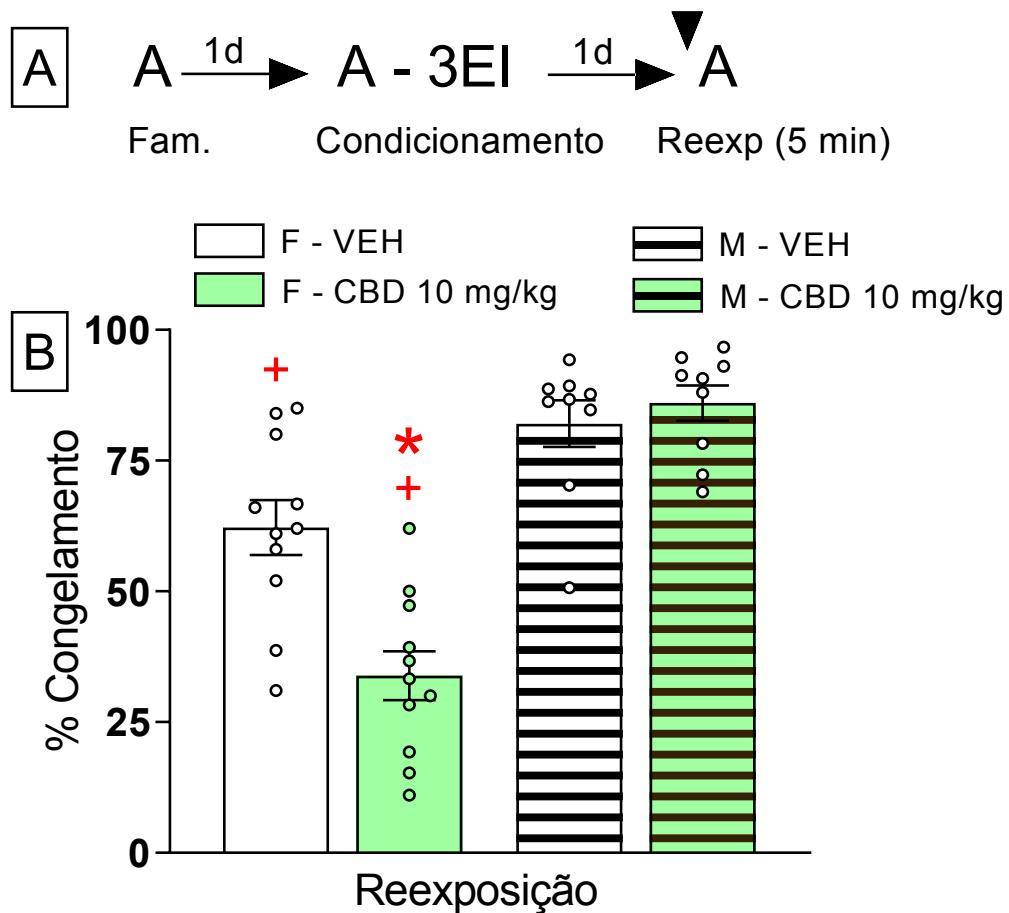


**Figura 16 – A administração sistêmica de canabidiol (CBD) antes da reexposição ao contexto reduz a resposta de congelamento em fêmeas independentemente da fase do ciclo estral.** (A) Protocolo experimental utilizado. (B) Representação gráfica dos níveis de congelamento durante a sessão de reexposição. EST indica a fase do ciclo estral estro; PRO proestro; DIE, diestro. VEH indica o grupo controle e CBD os grupos CBD 10 mg/kg. Os dados são representados com média  $\pm$  E.P.M. da porcentagem de congelamento (n = 9-11/ grupo). Os círculos representam os valores individuais dos animais no respectivo grupo. A seta indica o momento da administração do tratamento. \* indica  $P < 0,05$  comparado ao respectivo controle. ANOVA de uma via seguida pelo teste de *post - hoc* de Newman-Keuls.

### 6.3 Efeito do CBD intraperitoneal 45 min antes da sessão de reexposição na expressão do congelamento em machos e fêmeas

Houve efeito significativo do sexo [ $F_{(1, 35)} = 55,923$ ,  $p = 0,000001$ ;  $\eta^2 = 0,615$ ], do tratamento [ $F_{(1, 35)} = 6,2440$ ,  $p = 0,0017$ ;  $\eta^2 = 0,151$  ] e da interação entre os fatores [ $11,779$ ;  $p = 0,00155$ ;  $\eta^2 = 0,251$ ].

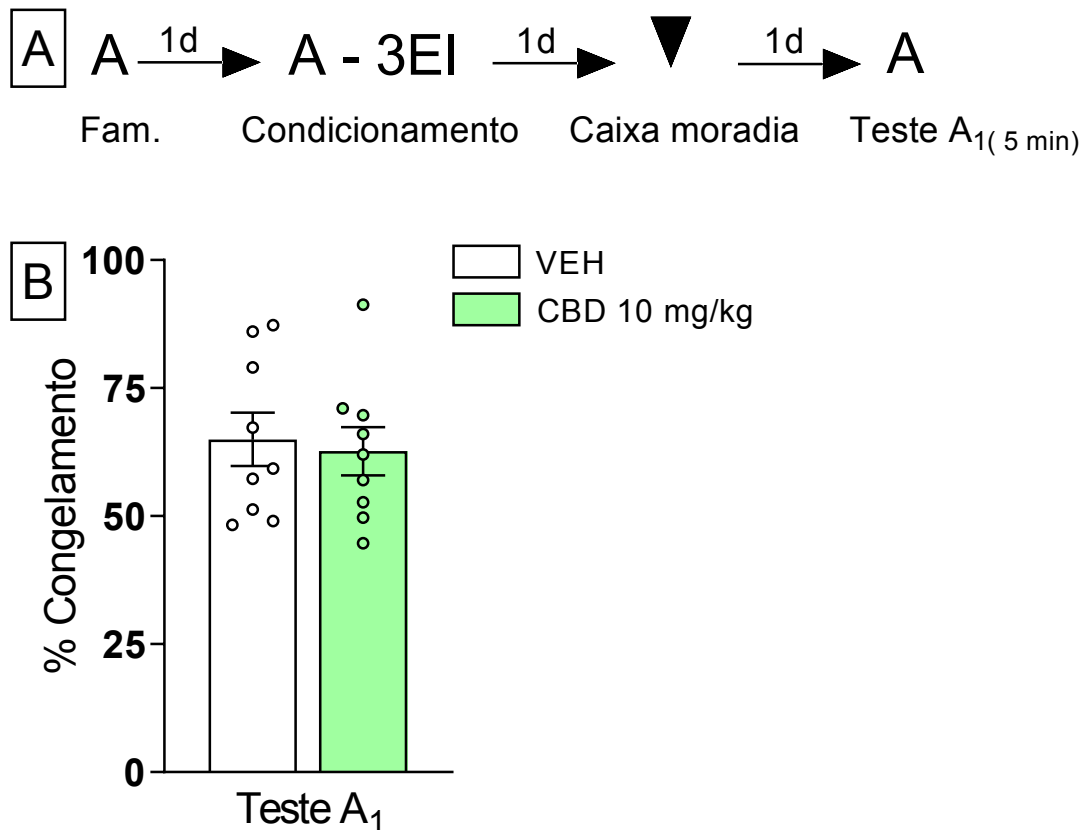
Como representado na Figura 17, o grupo de fêmeas tratado com CBD 10 mg/kg expressou significativamente menos congelamento durante a sessão de reexposição do que o respectivo grupo controle F-VEH ( $p = 0,000290$ ). No entanto, o grupo de machos tratado com CBD não obteve diferença significativa durante a sessão de reexposição quando comparado ao respectivo grupo controle M-VEH ( $p = 0,513782$ ). O grupo de machos controles (M-VEH) obteve maior tempo de congelamento do que o grupo controle de fêmeas F- VEH, ( $p = 0,007209$ ). De maneira semelhante, o grupo de machos tratados com CBD 10 mg/kg permaneceu significativamente mais tempo em congelamento do que o grupo de fêmeas tratado com CBD 10 mg/kg, F-CBD ( $p = 0,000160$ ). Esses resultados sugerem que houve diferenças sexuais na magnitude da expressão da memória para o comportamento de congelamento e no efeito ansiolítico/anti-aversivo do CBD quando machos e fêmeas foram submetidos ao mesmo protocolo de CAC.



**Figura 17 – A administração sistêmica de canabidiol (CBD) produziu efeitos dismórficos na expressão do congelamento quando ratos e ratas foram expostos ao contexto pareado (A) Protocolo experimental utilizado. (B) Representação gráfica dos níveis de congelamento durante a sessão de reexposição. Os dados são representados com média  $\pm$  E.P.M. da porcentagem de congelamento (F-VEH,  $n = 11$ ; F-CBD 10 mg/kg,  $n = 11$ ; M-VEH,  $n = 9$ ; M-CBD 10 mg/kg,  $n = 9$ ). Os círculos representam os valores individuais dos animais no respectivo grupo. A seta indica o momento da administração do tratamento. \* indica  $P < 0,05$  comparado ao respectivo controle. + indica  $P < 0,05$  na comparação entre os sexos. ANOVA de uma via seguida pelo teste de *post-hoc* de Newman-Keuls.**

#### **6.4 Efeito do CBD intraperitoneal na ausência da sessão de reexposição na expressão do congelamento em fêmeas**

Não houve efeito significativo do tratamento com CBD 10 mg/kg sobre o congelamento expresso 24 h após, durante o Teste A1 ( $t_{16} = 0,333260$ ;  $p = 0,743265$ ;  $\eta^2 = 0,157$ ). Conforme denota a Figura 18, ambos os grupos, CBD e VEH, apresentaram um tempo de congelamento comparável nesta sessão. Esses resultados indicam que, os efeitos anti-aversivos de uma administração de CBD persistem por menos de 24 h.



**Figura 18 – O efeito da administração sistêmica de canabidiol (CBD) em fêmeas é específico para memórias aversivas contextuais evocadas (A) Protocolo experimental utilizado. (B) Representação gráfica dos níveis de congelamento durante a sessão de reexposição, Teste A<sub>1</sub>. Os dados são representados com Média  $\pm$  E.P.M. da porcentagem de congelamento (VEH n = 9 e CBD 10 mg/kg n = 9). Os círculos representam os valores individuais dos animais no respectivo grupo. A seta indica o momento da administração do tratamento. Teste de “t” de *Student* para grupos independentes.**

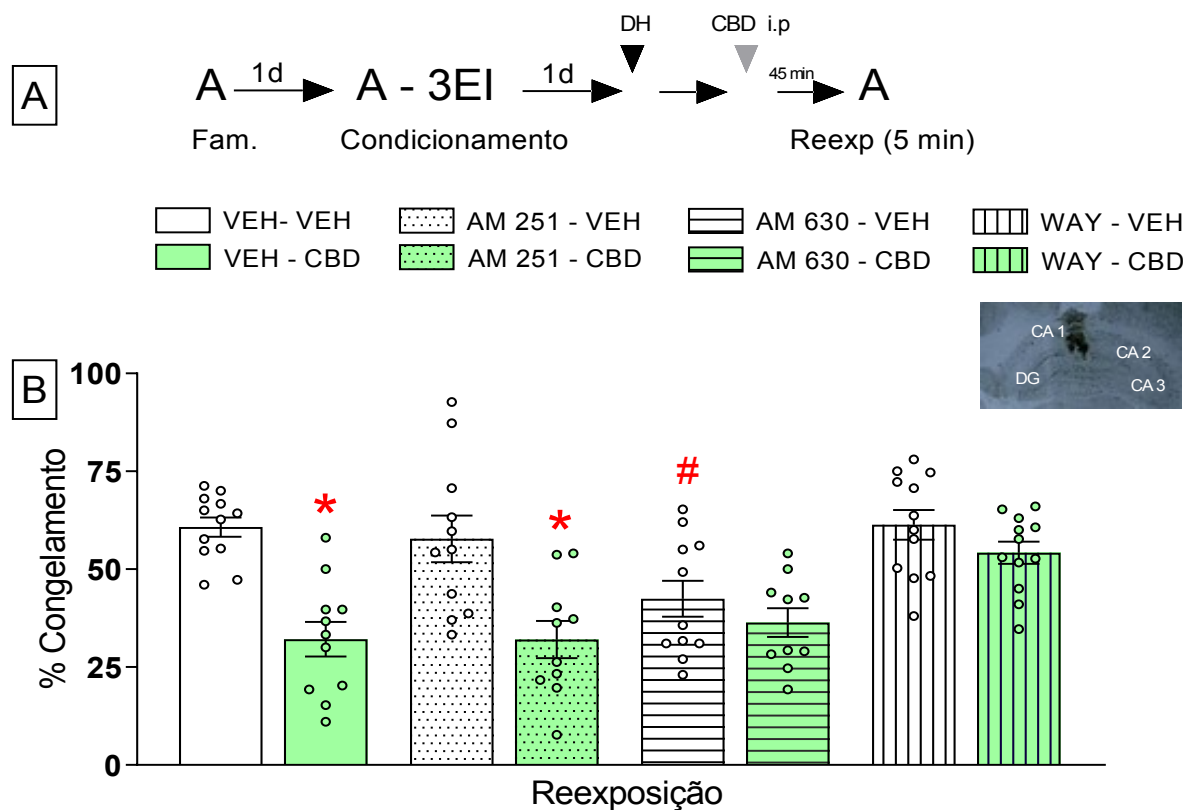
### 6.5 Efeito do antagonismo dos receptores CB<sub>1</sub>, CB<sub>2</sub> ou 5-HT<sub>1A</sub> do hipocampo dorsal e efeito do CBD intraperitoneal 45 min antes da sessão de reexposição na expressão do congelamento em fêmeas

Houve efeito significativo do tratamento [ $F(1, 80) = 22,345$ ;  $p = 0,00001$ ;  $\eta^2 = 0,218$ ], do pré-tratamento [ $F(3, 80) = 6,1172$ ;  $p = 0,00084$ ;  $\eta^2 = 0,186$ ] e da interação entre os fatores [ $F(3, 80) = 3,4328$ ,  $p = 0,02084$ ;  $\eta^2 = 0,114$ ] sobre o tempo de congelamento.

Conforme mostrado na figura 19, os grupos VEH – AM251 ( $p = 0,639313$ ) e VEH – WAY ( $p = 0,922996$ ), mas não o grupo VEH – AM630 ( $p = 0,024018$ ), expressaram níveis de congelamento semelhante ao do grupo controle, VEH – VEH. Os grupos VEH-CBD e AM251-CBD apresentaram menos tempo de congelamento do que seus grupos controles ( $p = 0,003292$  e  $p = 0,001478$ , respectivamente). Em contraste, os grupos WAY – CBD e AM630



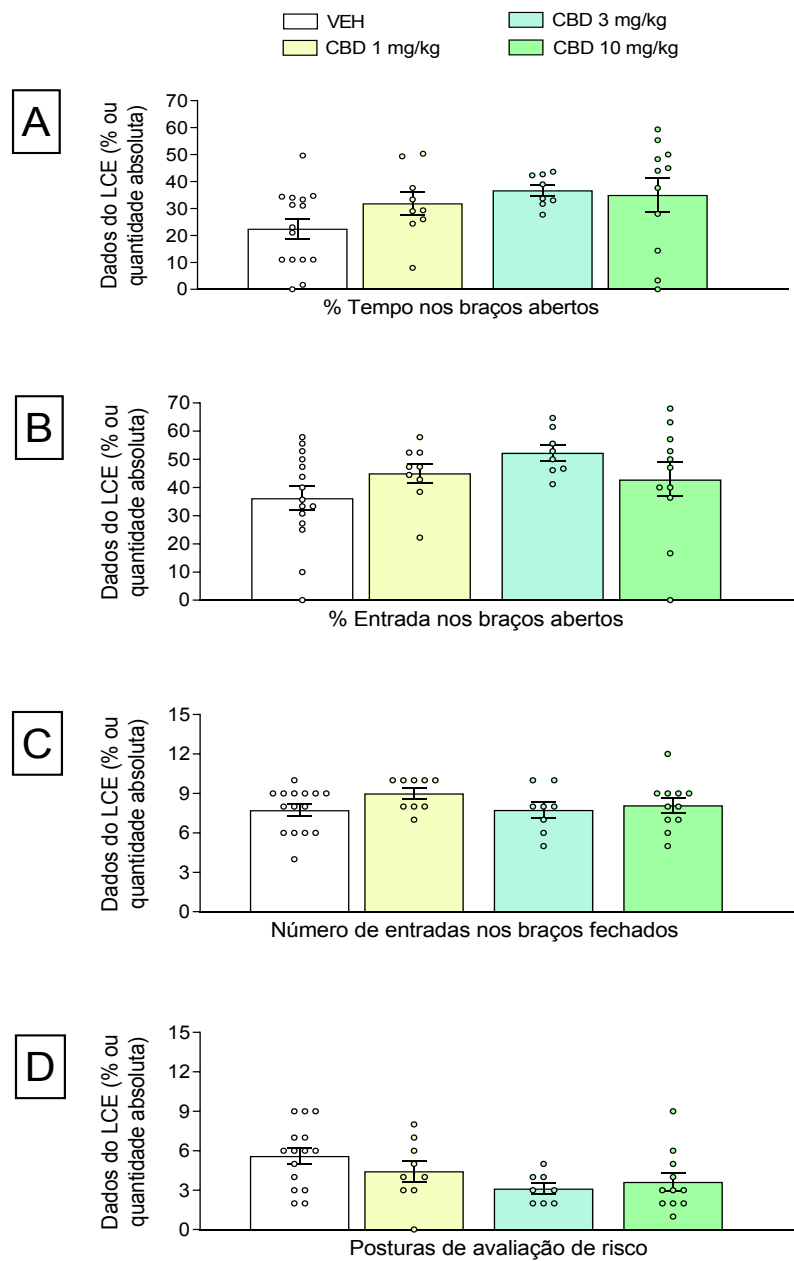
– CBD tiveram valores semelhantes em relação aos seus respectivos grupos de controle ( $p = 0,829493$  e  $p = 0,507110$ , respectivamente). Quando realizada a comparação entre os grupos tratados com CBD e os antagonistas, os grupos AM251 – CBD ( $p = 0,474676$ ), AM630 – CBD ( $p = 0,787445$ ), apresentaram níveis semelhantes de congelamento. Entretanto, o grupo WAY 100635-CBD apresentou maior tempo de congelamento do que o grupo VEH-CBD ( $p = 0,014466$ ). Em conjunto, esses resultados sugerem que o efeito anti-aversivo do CBD administrado intraperitonealmente envolveu, em especial, a ativação de receptores 5-HT<sub>1A</sub> no hipocampo dorsal.



**Figura 19 – Avaliação do envolvimento dos receptores CB1, CB2, e 5-HT<sub>1A</sub> hipocampais no efeito anti-aversivo/ansiolítico do canabidiol CBD (10 mg/kg .i.p.) em fêmeas.** (A) Protocolo experimental utilizado. (B) Representação gráfica dos níveis de congelamento durante a sessão de reexposição, Teste A1. Os dados são representados como média  $\pm$  E.P.M. da porcentagem de congelamento ( $n = 10-12/$  grupo). Os círculos representam os valores individuais dos animais no respectivo grupo. A seta preta indica o momento da administração dos antagonistas no hipocampo dorsal e a seta cinza indica o momento da administração intraperitoneal do CBD. \* indica  $P < 0,05$  comparado ao respectivo controle. # indica diferença em relação ao grupo VEH-VEH. O antagonismo dos receptores CB1, CB2 e 5-HT<sub>1A</sub> foi realizado através das drogas AM251 (0,0002  $\mu$ g/0,5 $\mu$ L) e AM630 (0,001  $\mu$ g/0,5 $\mu$ L), WAY100635 (0,0001  $\mu$ g/0,5 $\mu$ L), respectivamente. ANOVA de uma via seguida pelo teste de *post-hoc* de Newman-Keuls. Apenas animais com acerto cirúrgico bilateral foram incluídos na análise estatística.

### **6.6 Efeito das doses de 1, 3 ou 10 mg/kg de CBD intraperitoneal 45 min antes do teste do labirinto em cruz elevado em fêmeas**

Não houve efeito significativo do tratamento sobre nenhum dos parâmetros avaliados: porcentagem de tempo no braço aberto (%TA) [ $F(3,39) = 2,2191$ ;  $p = 0,10123$ ;  $\eta^2 = 0,0145$ ], figura 20A, porcentagem de entradas no braço aberto %EA [ $F(3,39) = 2,0484$ ,  $p = 0,12292$ ;  $\eta^2 = 0,136$ ] figura 20B, número de entradas no braço aberto EA, [ $F(3,39) = 2,2528$ ,  $\eta^2 = 0,097430$ ] figura 20C, número de entradas no braço fechado EF [ $F(3,39) = 1,2229$ ,  $p = 0,31430$ ;  $\eta^2 = 0,085$ ] figura 20D sugerindo que o CBD em doses de 1, 3 ou 10 mg/kg não foram capazes de alterar o comportamento tipo-ansioso. Ainda, não houve diferença significativa no parâmetro postura de avaliação de risco, SAP [ $F(3,39) = 2,8190$ ,  $p = 0,05148$ ;  $\eta^2 = 0,178$ ] figura 20E, indicando que o comportamento tipo ansioso não foi afetado.

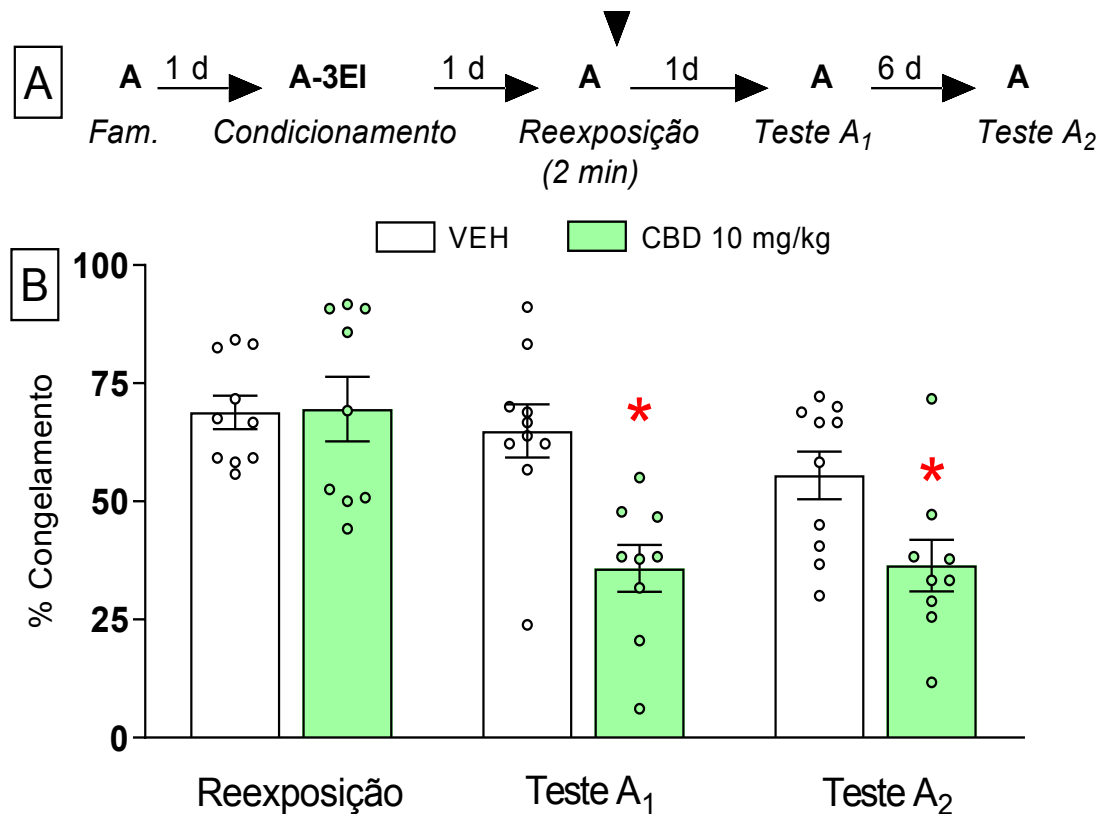


**Figura 20 – Efeito das doses de canabidiol (CBD, 10 mg/kg.i.p.) intraperitoneal sobre o comportamento tipo-ansioso e atividade exploratória geral no labirinto em cruz elevado.** Os dados são representados com média  $\pm$  E.P.M. da porcentagem de congelamento (VEH,  $n = 15$ ; CBD 1 mg/kg,  $n = 9$ ; CBD 3 mg/kg,  $n = 8$ ; CBD 10 mg/kg,  $n = 11$ ). Não houve diferença significativa entre os grupos em nenhum dos parâmetros analisados (ANOVA fatorial). Os círculos representam os valores individuais dos animais no respectivo grupo.

### 6.7 Efeito do CBD intraperitoneal imediatamente após a sessão de reexposição na expressão do congelamento em fêmeas

Houve efeito significativo do tratamento [ $F(1, 17) = 8,8118$ ,  $p = 0,00861$ ;  $\eta^2 = 0,341$ ], da repetição [ $F(2, 34) = 14,796$ ,  $p = 0,00002$ ;  $\eta^2 = 0,465$ ] e da interação entre esses fatores sobre o tempo de congelamento [ $F(2, 34) = 5,5834$ ,  $p = 0,00800$ ;  $\eta^2 = 0,247$ ]. Conforme mostrado na figura 21, os grupos tratados com VEH e CBD apresentaram valores semelhantes na sessão de reexposição ( $p = 0,9402$ ), mas durante os testes A1 e A2 o grupo tratado com CBD expressou significativamente menos congelamento do que o respectivo controle ( $p = 0,027158$  e  $p = 0,0544$ ). O grupo que recebeu VEH manteve os níveis de congelamento durante o teste A1 ( $p = 0,5429$ ) e durante o teste A2 ( $p = 0,1096$ ).

Estes resultados sugerem que o CBD administrado sistemicamente prejudica a reconsolidação da memória quando a sessão de reexposição é capaz de induzir um estado lábil e esse efeito persiste por pelo menos uma semana.

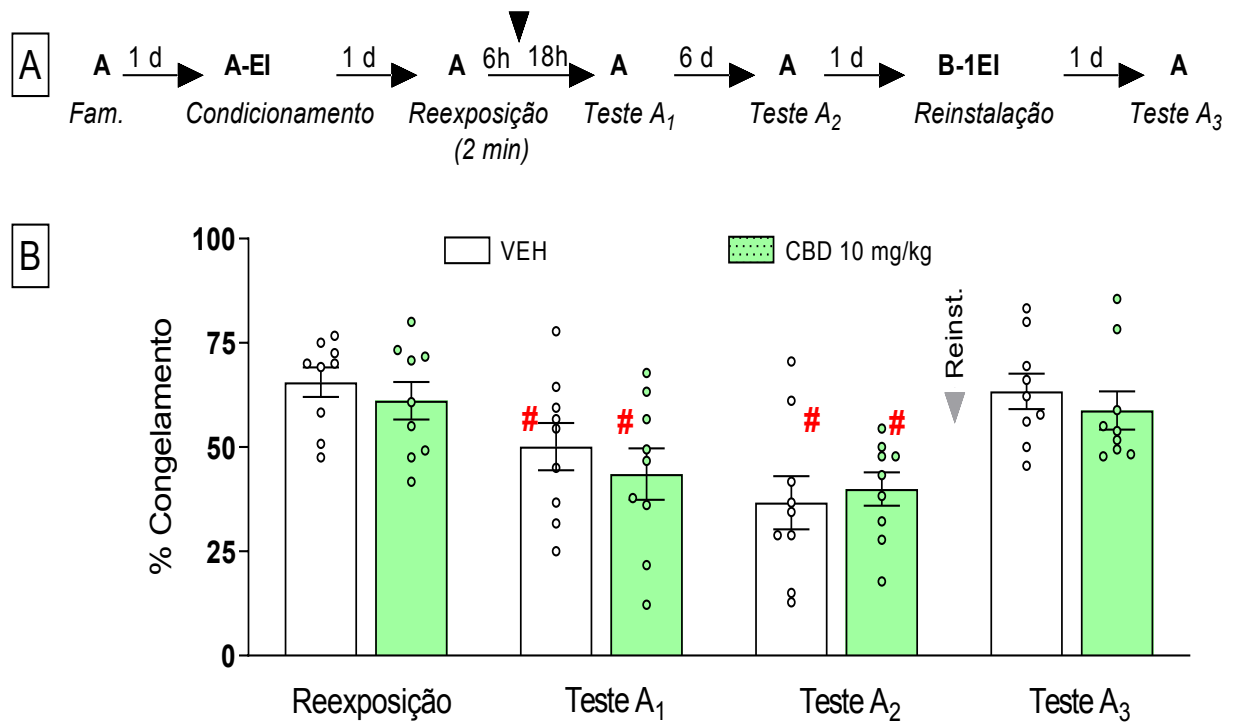


**Figura 21 – A administração sistêmica de canabidiol (CBD) após a reexposição ao contexto reduz a resposta de congelamento nos testes A.** (A) Protocolo experimental utilizado. (B) Representação gráfica dos níveis de congelamento durante a sessão de reexposição, Teste A1 e A2. Os dados são representados com Média ± E.P.M. da porcentagem de congelamento (VEH n = 10 e CBD 10 mg/kg n = 11). Os círculos representam os valores individuais dos animais no respectivo grupo. A seta indica o momento da administração do tratamento. \* indica  $P < 0,05$  comparado ao respectivo controle. ANOVA de medidas repetidas de uma via seguida pelo teste de *post-hoc* de Newman-Keuls.

### **6.8 Efeito do CBD intraperitoneal 6 horas após a sessão de reexposição na expressão do congelamento em fêmeas**

Houve efeito significativo da repetição [ $F_{(3,48)} = 20,365$ ,  $p = 0,00000$ ;  $\eta^2 = 0,560$ ], mas não do tratamento [ $F_{(1,16)} = 0,33431$ ,  $p = 0,57118$ ;  $\eta^2 = 0,020$ ] ou da interação entre os fatores [ $F_{(3,48)} = 0,68356$ ,  $p = 0,5664$ ;  $\eta^2 = 0,040$ ] sobre o congelamento. Durante a sessão de reexposição ( $p = 0,9103$ ), Teste A1 ( $p = 0,5469$ ), Teste A2 ( $p = 0,7644$ ) e Teste A3 ( $0,9031$ ), ambos os grupos, VEH e CBD expressaram níveis de congelamento semelhante. No teste A1, ambos os grupos apresentaram redução dos níveis de congelamento em relação a sessão de reexposição (VEH  $p = 0,0399$  e CBD  $p = 0,0087$ ). De maneira semelhante, também não houve diferença no Teste A2 em relação a sessão de reexposição, e ambos os grupos apresentaram redução dos níveis de congelamento referente tanto à sessão de reexposição (VEH  $p = 0,000166$  e CBD  $p = 0,001972$ ) quanto ao Teste A1 (VEH  $p = 0,0646$  e CBD  $p = 0,5005$ ). Após serem submetidos à sessão de reinstalação e expostos ao Teste A3, ambos os grupos apresentaram aumento no nível de congelamento quando comparados ao Teste A2 (VEH  $p = 0,6839$  e CBD  $p = 0,6585$ ), apresentando níveis de congelamento semelhantes a primeira exposição ao contexto, conforme indica a figura 22.

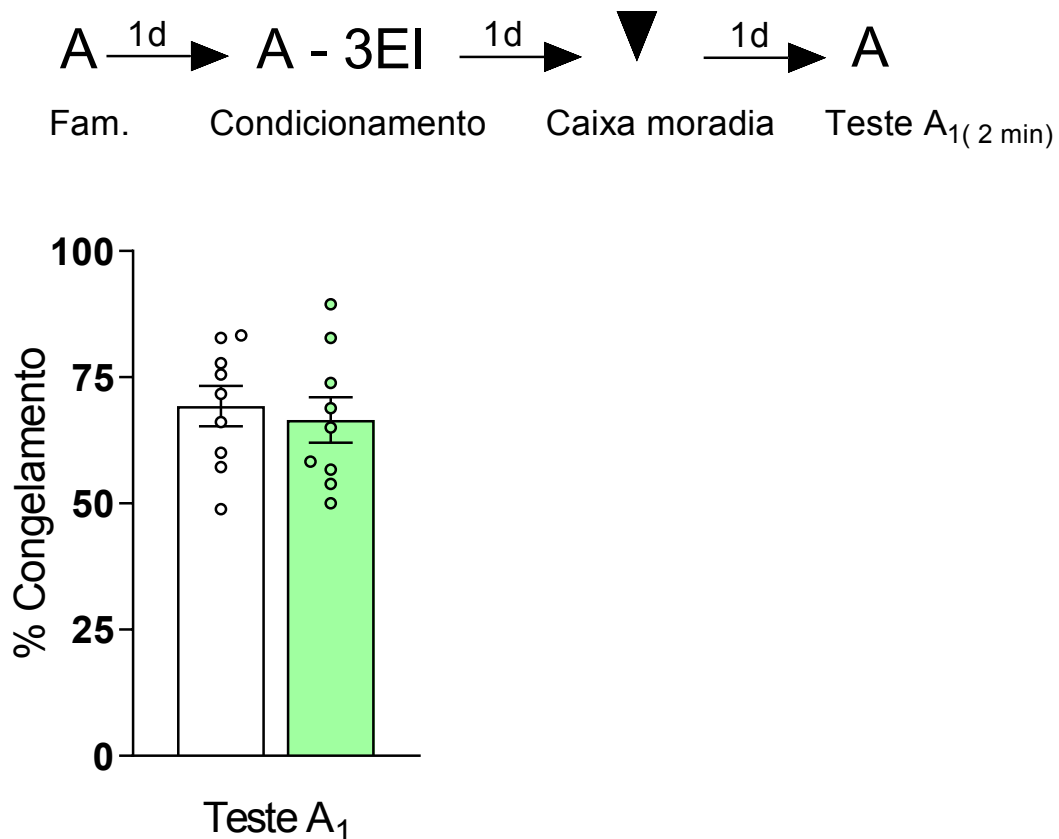
Avaliados em conjunto, estes dados sugerem que o efeito do CBD sobre a reconsolidação da memória aversiva contextual só ocorre se o intervalo entre a reexposição e a administração for inferior a 6 horas.



**Figura 22 – O prejuízo na reconsolidação causado pela administração sistêmica de canabidiol (CBD) é restrito a janela temporal de 6 horas em fêmeas. (A)** Protocolo experimental utilizado. **(B)** Representação gráfica dos níveis de congelamento durante a sessão de reexposição, Teste A1, A2 e A3. Os dados são representados com Média ± E.P.M. da porcentagem de congelamento (VEH n = 9 e CBD 10 mg/kg n = 9). Os círculos representam os valores individuais dos animais no respectivo grupo. A seta preta indica o momento da administração do tratamento. A seta cinza indica o momento da reinstalação. # indica  $P < 0,05$  comparado ao respectivo controle. ANOVA de medidas repetidas de uma via seguida pelo teste de post - hoc de Newman-Keuls.

### 6.9 Efeito do CBD intraperitoneal na ausência da sessão de reexposição na expressão do congelamento em fêmeas

Conforme graficamente indicado na figura 23, o teste “t” de Student indicou que não houve efeito do tratamento para o Teste A1 ( $t_{15} = 0,394$ ;  $p = 0,698847$ ;  $\eta^2 = 0,191$ ) quando omitida a sessão de reexposição e o CBD administrado. Através deste resultado, pode-se sugerir que o efeito do CBD sobre a reconsolidação da memória é específico para memórias que foram evocadas e desestabilizadas.



**Figura 23 – Efeito do canabidiol (CBD) é específico para memórias que foram evocadas.** (A) Protocolo experimental utilizado. (B) Representação gráfica dos níveis de congelamento durante a sessão de reexposição, Teste A1. Os dados são representados com média  $\pm$  E.P.M. da porcentagem de congelamento (VEI  $n = 9$  e CBD 10 mg/kg  $n = 9$ ). Os círculos representam os valores individuais dos animais no respectivo grupo. A seta preta indica o momento da administração do tratamento. Teste de “t” de Student para grupos independentes.

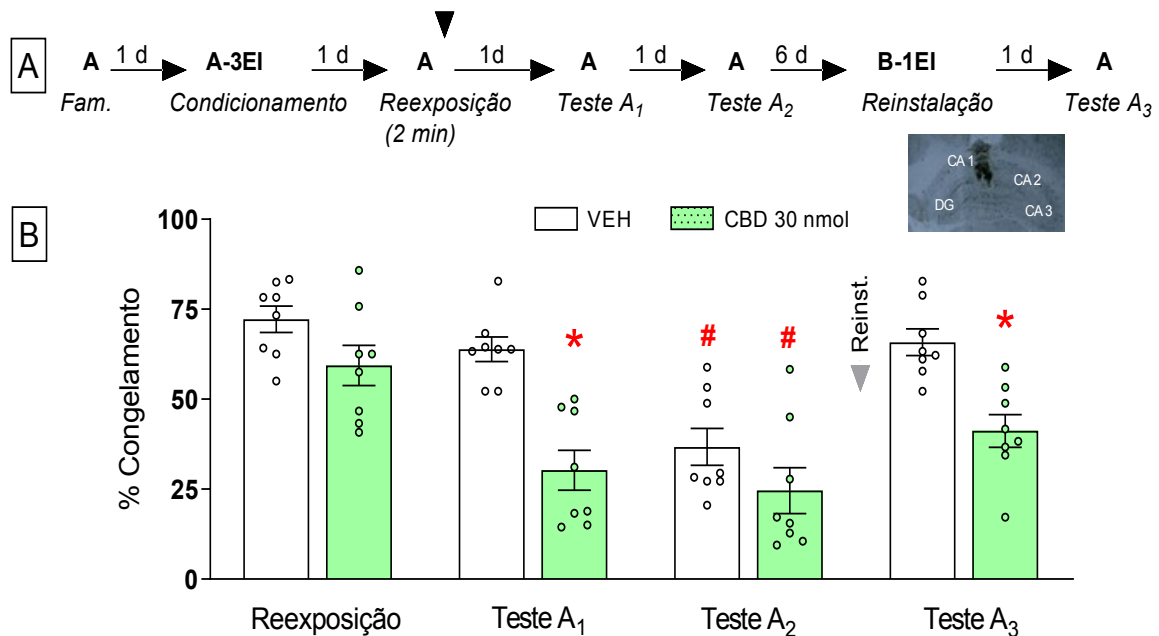
### 6.10 Efeito do CBD intra-hipocampal dorsal após a sessão de reexposição na expressão do congelamento em fêmeas

Houve efeito do tratamento [ $F(1,14) = 18,385, p = 0,00075; \eta^2 = 0,567$ ], da repetição [ $F(3,42) = 27,198, p = 0,000001; \eta^2 = 0,66$ ] e da interação entre esses fatores [ $F(3,42) = 3,3647, p = 0,02735; \eta^2 = 0,193$ ] sobre o congelamento.

De acordo com a figura 24, os grupos tratados com VEH e CBD apresentaram valores semelhantes de congelamento durante a sessão de reexposição ( $p = 0,5660$ ). Durante o Teste A1 o grupo tratado com CBD expressou significativamente menos congelamento do que o respectivo controle ( $p = 0,00019$ ) e o mesmo ocorreu durante o Teste A2 ( $p = 0,00013$ ). Entretanto, o grupo que recebeu VEH também reduziu a expressão do congelamento durante

o Teste A2 ( $p = 0,00025$ ), não apresentando diferença com o grupo CBD neste mesmo teste ( $p = 0,4438$ ). Após serem submetidos à sessão de reinstalação e expostos ao Teste A3, apenas o grupo VEH restabeleceu os níveis de congelamento da sessão de reexposição ( $p = 0,2637$ ), enquanto o grupo que recebeu CBD intra-hipocampal manteve baixo nível de congelamento em relação a si mesmo na sessão de reexposição ( $p = 0,0024$ ).

Analisados em conjunto, estes dados indicam que o hipocampo dorsal é um sítio importante para ação do CBD sobre a reconsolidação da memória aversiva contextual sugerindo que vias de transdução de sinais presentes nessa região podem mediar a ação do CBD neste efeito.



**Figura 24. A administração de canabidiol (CBD) no hipocampo dorsal prejudica a reconsolidação da memória aversiva contextual.** (A) Protocolo experimental, (B) Representação gráfica dos níveis de congelamento durante a sessão de reexposição, TA1, TA2 e TA3. Os dados são representados como média  $\pm$  E.P.M. da porcentagem de congelamento (VEH  $n = 9$  e CBD 30 nmol  $n = 9$ ). A imagem superior direita refere-se ao sítio da microinjeção. Os círculos representam os valores individuais dos animais no respectivo grupo. A seta preta indica o momento da administração do CBD ou VEH no hipocampo dorsal. A seta cinza indica o momento da reinstalação. \* indica  $P < 0,05$  comparado ao respectivo controle. # indica diferença em relação ao mesmo grupo comparado a sessão de reexposição. ANOVA de medidas repetidas de uma via seguida pelo teste de post - hoc de Newman-Keuls. Apenas animais com acerto cirúrgico bilateral foram incluídos na análise estatística.

### 6.11 Efeito do CBD intraperitoneal após a sessão de reexposição e do antagonismo dos receptores CB1 e CB2 no hipocampo dorsal na expressão do congelamento em fêmeas

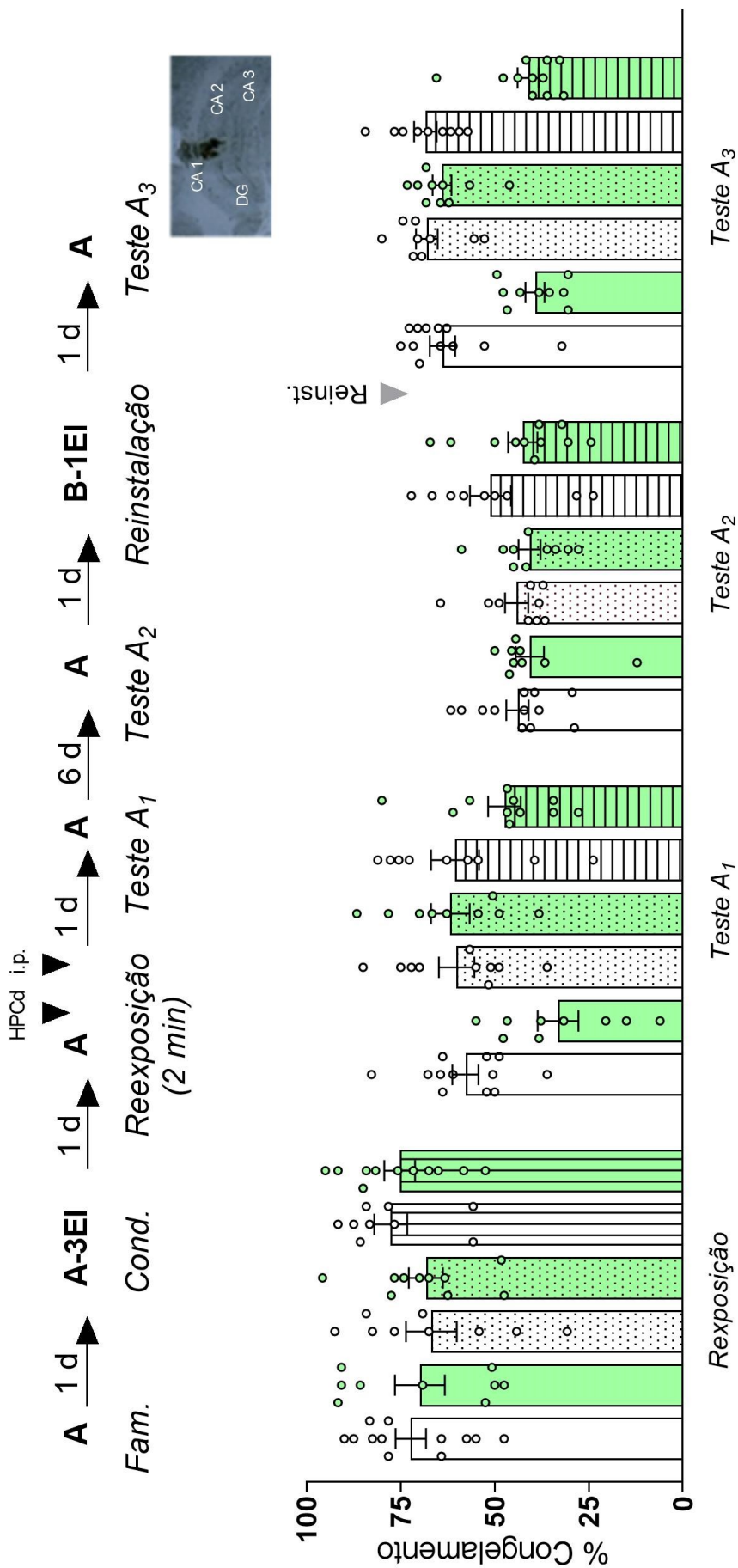


Houve efeito do tratamento [ $F(1, 53) = 13,390$ ,  $p = 0,00058$ ;  $\eta^2 = 0,201$ ], da repetição [ $F(3, 159) = 68,869$ ,  $p = 0,00001$ ;  $\eta^2 = 0,565$ ], mas não do pré-tratamento [ $F(2, 53) = 2,7288$ ,  $p = 0,07448$ ;  $\eta^2 = 0,09$ ]. A análise também indicou que houve interação desses fatores [ $F(6, 159) = 2,2791$ ,  $p = 0,03878$ ;  $\eta^2 = 0,079$ ].

Durante a sessão de reexposição todos os grupos expressaram níveis de congelamento semelhante ( $p \geq 0,7407$ ), assim como durante o TA1 ( $p \geq 0,1925$ ) e TA2 ( $p \geq 0,8479$ ). Quando realizada a comparação entre a sessão de reexposição e o Teste A1, os grupos VEH – CBD ( $p = 0,000046$ ), AM630 – VEH ( $p = 0,0212$ ) e AM630 – CBD ( $p = 0,00002$ ) reduziram significativamente os níveis de congelamento. Entretanto, os grupos VEH – VEH ( $p = 0,099432$ ), AM251 – VEH ( $p = 0,7242$ ) e AM251 – CBD ( $p = 0,7956$ ) não apresentaram mudança significativa na expressão do congelamento.

Após serem submetidos à sessão de reinstalação e expostos ao Teste A3, os grupos VEH – VEH ( $p = 0,642662$ ), AM251 – VEH ( $p = 0,9641$ ), AM251 – CBD ( $p = 0,9623$ ) e AM630 – VEH ( $p = 0,3041$ ) expressaram níveis de congelamento semelhantes a si mesmos na sessão de reexposição. Por outro lado, os grupos VEH – CBD ( $p = 0,000043$ ) e AM630 – CBD ( $p = 0,00003$ ), mantiveram níveis de congelamento significativamente inferiores quando comparados a si mesmo na sessão de reexposição.

Avaliados em conjunto, estes dados indicam que (a) o CBD é capaz de prejudicar a reconsolidação da memória, evidenciado pela sessão de reinstalação, (b) a dose dos antagonistas utilizados não interfere na expressão do congelamento *per se*, (c) o antagonismo do receptor CB2 no hipocampo não impede o prejuízo de reconsolidação induzido pelo CBD e (d) o antagonismo do receptor CB1 no hipocampo é capaz de reverter o efeito do CBD em prejudicar a reconsolidação da memória.



**Figura 25 – Envolvimento dos receptores CB1 e CB2 hipocámpais no prejuízo de reconsolidação exercido pelo CBD intraperitoneal. Protocolo experimental utilizado. (A) Representação gráfica dos níveis de congelamento durante a sessão de reexposição, Teste A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> e A<sub>3</sub>. Os dados são representados como média ± E.P.M. da porcentagem de congelamento (n = 9-12/ grupo). As setas pretas indicam o momento da administração dos antagonistas no hipocampo dorsal e em seguida, a administração intraperitoneal do CBD. \* indica P < 0,05 comparado ao respectivo controle. O antagonismo dos receptores CB1 e CB2**

## 7 DISCUSSÃO

### 7.1 O CBD exerce efeito ansiolítico/anti-aversivo em fêmeas

Ratas tratadas sistemicamente com 3 ou 10 mg/kg de CBD atenuaram a expressão de congelamento em comparação aos controles, sugerindo efeito anti-aversivo/ansiolítico (figura 15). Esse resultado confirma o encontrado em estudos anteriores em ratos e camundongos machos avaliados no CAC e outros testes comportamentais (GUIMARÃES et al., 1990; MOREIRA et al., 2005; 2010; RESSTEL et al., 2006;2009; LEMOS et al., 2010; LEVIN et al., 2012; JURKUS et al., 2016; ASSAREH et al., 2020; LIU et al., 2021).

O CBD foi capaz de produzir efeito anti-aversivo/ansiolítico em fêmeas nas doses de 3 e 10 mg/kg, mas não na dose de 1 mg/kg (figura 15). Esse resultado corrobora dados prévios em que a administração sistêmica de 10 mg/kg ou 3 mg/kg denotou propriedade ansiolítica/anti-aversiva semelhante à do diazepam (2,5 mg/kg) no CAC em ratos (RESSTEL et al., 2006), facilitadora da extinção (BITENCOURT et al., 2008) e de prejuízo da reconsolidação (STERN et al., 2012). Além disso, ambas as doses se encontram dentro da faixa usualmente relatada como ansiolítica em roedores (2,5 - 30 mg/kg i.p.) em outros testes comportamentais como o LCE (GUIMARÃES et al., 1990; CHAVES et al., 2021) e o teste de lambida punida de Vogel (MOREIRA et al., 2006). Por outro lado, no estudo de Assareh e colaboradores (2020) a dose de 30 mg/kg i.p, mas não as doses de 1; 10 ou 100 mg/kg i.p, foi efetiva em redução a expressão do congelamento em camundongos. Em contraste com o efeito ansiolítico, a maior dose utilizada neste estudo (10 mg/kg i.p) exerceu efeito ansiogênico em outros estudos em que animais que receberam injeções diárias de CBD durante 14 dias (ELBATSH et al., 2012). Esse resultado foi atribuído, pelo menos em parte, à tolerância devido a regulação negativa de receptores canabinoides induzida por agonistas (OVIEDO et al., 1993).

Apesar da dose de 1 mg/kg i.p de CBD ser usualmente adotada em outros paradigmas, que também avaliam comportamento tipo-ansioso, como o LCE (LEE et al., 2017), neste estudo, não houve diferença sobre o comportamento de congelamento entre ratas que receberam CBD e VEH. Isso sugere que, nestas condições, o CBD não produziu o efeito anti-aversivo/ansiolítico das demais doses avaliadas. Este resultado concorda com Assareh e colaboradores (2020) que obteve efeito ansiolítico/anti-aversivo do CBD quando

camundongos foram submetidos ao condicionamento auditivo, entretanto, nenhuma das doses avaliadas, nesse mesmo estudo, exerceu efeito ansiolítico no teste claro-escuro.

Algumas diferenças na metodologia entre o presente estudo e aqueles que relataram efeitos ansiogênicos e/ou bifásicos foram encontradas. Por exemplo, Levin e colaboradores (2012), encontrou efeito bifásico do CBD 1 mg/kg i.p. quando comparou ratos da linhagem *Wistar* com ratos da linhagem espontaneamente hipertensos (SHR), uma vez que, essa dose promoveu efeito ansiolítico em ratos *Wistar* mas aumentou o congelamento em ratos SHR. Este estudo utilizou linhagem de ratos SHR machos e protocolo de condicionamento contextual com cinco estímulos de choque nas patas de 0,4 mA, em contraste com o presente estudo que utilizou fêmeas e três estímulos de 1 mA. Long e colaboradores (2010) relataram efeito ansiogênico do CBD com a dose de 1 mg/kg i.p. no teste claro-escuro, mas não no teste de campo aberto, quando avaliou o efeito de 21 injeções sistêmicas diárias em camundongos adultos machos C57BL/6Jarc. No presente estudo, utilizou-se fêmeas *Wistar* no protocolo de CAC e avaliou-se uma única administração do CBD. Elbatsh et al., (2012) encontrou efeito ansiogênico do CBD quando administrou a dose de 10 mg/kg i.p. durante 14 dias em ratos *machos* Lister-hooded nos testes de condicionamento aversivo, mas não detectou efeitos sobre a atividade locomotora. Este efeito bidirecional do CBD pode estar relacionado aos níveis de estresse induzidos pelo condicionamento e evocados na reativação da memória durante a reexposição ao contexto, em vez da força da memória em si. Outros paradigmas que avaliaram comportamentos tipo-ansiosos foram utilizados, como por exemplo, o LCE (LEE et al., 2017) que, sabidamente, apresenta eventos plásticos diferentes dos eventos desencadeados pelo CAC e que são farmacologicamente modulados de diferentes maneiras pelo CBD (BANNERMAN et al., 2014; MORENA e CAMPOLONGO et al., 2014; BLESSING et al., 2015; KRUK-SLOMKA et al., 2017; LU MACKIE et al., 2020; BRITCH et al., 2021). Logo, a variação entre os resultados deste estudo pode estar relacionada a fatores como a espécie utilizada, ao teste comportamental empregado ou à dose e duração da administração do CBD.

Majoritariamente, os resultados deste estudo reproduzem os achados obtidos em estudos clínicos que avaliaram o efeito ansiolítico agudo do CBD. Por exemplo, em voluntários humanos submetidos a uma situação estressante, a dose de 300 mg de CBD via oral foi eficaz em reduzir a ansiedade (ZUARDI et al., 1993), inclusive aquela induzida pela ingestão de THC (ZUARDI et al., 1982). Efeito semelhante foi obtido com 600 mg de CBD em pacientes com fobia social, que nunca haviam recebido tratamento antes, durante o teste simulado de falar em público (BERGAMASCHI et al., 2011). Logo, o efeito ansiolítico do

CBD em humanos é geralmente obtido após administração aguda (ZUARDI et al., 2006; LEE et al., 2017; O'SULLIVAN et al., 2020).

No presente trabalho não foram detectadas diferenças na expressão do congelamento entre as fases do ciclo estral e todos os grupos demonstram efeito anti-aversivo/ansiolítico do CBD (figura 16). Esses resultados sugerem que, os hormônios gonadais não afetam qualitativamente a capacidade de aprendizado, expressão do congelamento e sensibilidade ao CBD. Esses resultados concordam com estudos anteriores em que fêmeas controles também não variaram a expressão do congelamento no CAC, tanto no dia do condicionamento (KASHEFI e RASHIDY, 2014), quanto no dia da reexposição e teste subsequente (CHANG et al., 2009; DA SILVA et al., 2016; FRANZEN et al., 2019).

O dimorfismo sexual pode influenciar as respostas comportamentais dos ratos no CAC por si só. Por exemplo, Gupta et al., (2001) e Maren et al., (1994) comparam machos e fêmeas diretamente quanto a expressão do congelamento e, em ambos os estudos, fêmeas expressaram menos congelamento, quando comparadas aos machos, sob as mesmas condições experimentais. Por outro lado, Markus e colaboradores (1997) encontraram redução na retenção do aprendizado no CAC apenas na fase proestro e, na fase estro, machos e fêmeas obtiveram respostas semelhantes, mas nenhuma diferença foi detectada quando expostos em um contexto diferente do utilizado no condicionamento. No condicionamento auditivo, durante a administração do som, fêmeas expressaram maior nível de congelamento do que machos (GRESACK et al., 2009), entretanto, machos exibem retenção a longo prazo do condicionamento contextual de medo maior do que fêmeas (GRESACK et al., 2009; BARKER e GALEA et al., 2010). Vale ressaltar que, neste trabalho, as fêmeas foram distribuídas de forma semelhante entre os grupos quanto a fase do ciclo estral. Essa condição não fornece a caracterização do papel dos hormônios gonadais sobre o comportamento ansiolítico/anti-aversivo, bem como os mecanismos que sustentam tais diferenças. Por outro lado, outros paradigmas que avaliam o comportamento tipo ansioso (MARCONDES et al., 2001) e de aprendizado associativo (WARREN e JURASKA, 1997) como, condicionamento aversivo ao som (MILAD et al., 2009), de preferência condicionada ao lugar (ROBERTS et al., 1989; RUSSO et al., 2003), condicionamento com estímulo ocular (WOOD et al., 2001), o condicionamento operante (SFIKAKIS et al., 1978) e o condicionamento apetitivo (MORALES et al., 2014), indicaram variação no comportamento de acordo com a fase do ciclo estral. Entretanto, neste trabalho, apenas fêmeas foram sensíveis aos efeitos anti-aversivos/ansiolíticos do CBD (figura 17). Esse dado discorda dos resultados obtidos em

estudos anteriores que avaliaram apenas ratos machos submetidos ao CAC (RESSTEL et al., 2006; LEMOS et al., 2010). Alguns fatores, além do sexo, podem ter contribuído para essas diferenças, como por exemplo, a duração e intensidade dos estímulos elétricos utilizados durante o condicionamento. Por exemplo, Resstel e colaboradores (2006) e Lemos et al., (2010) obtiveram efeito ansiolítico do CBD em machos com a dose de 10 mg/kg i.p., entretanto, o primeiro utilizou seis estímulos de 2,5 mA, em uma sessão de condicionamento que durou 10 min, enquanto o segundo, utilizou 3 estímulos de 1 mA ao longo de 3 min em machos que, anteriormente, passaram por cirurgia estereotáxica. Em contraste, no presente estudo foram utilizados 3 estímulos de 1 mA, protocolo que demonstrou ser adequado para o estudo da reconsolidação em fêmeas (Franzen et al., 2019).

Os estudos supracitados devem ser comparados com cautela, pois, nenhum deles comparou diretamente machos e fêmeas sob as mesmas condições experimentais no CAC uma vez que, sabidamente, este protocolo produz respostas comportamentais dismórficas (MAREN et al., 1994; GUPTA et al., 2001; GRUENE et al., 2015). Logo, ajustes nos protocolos devem ser feitos para que os fenômenos neurobiológicos envolvidos com o processamento da memória possam ser desencadeados. Este tipo de abordagem permite que a modulação farmacológica com o CBD possa ocorrer (FATORE e FRATTA, 2010; CRAFT et al., 2013; SHANSKY, 2018;2019; FRANZEN et al., 2019; SHANSKY e MURPHY, 2021). O ajuste no protocolo é de suma importância porque a força ou intensidade da memória é um fator limitante nas intervenções farmacológicas e comportamentais nos estudos com animais de laboratório (MONTI et al., 2017). Em conjunto, os resultados desse trabalho, somados aos estudos prévios, sugerem que, o dimorfismo sexual no condicionamento aversivo está relacionado com o processamento de informações hipocampais.

O CBD 10 mg/kg sistêmico foi capaz de produzir efeito anti-aversivo/ansiolítico em fêmeas e esse efeito foi prejudicado pelo antagonismo dos receptores 5-HT<sub>1A</sub>, mas não CB1 ou CB2 do HPCd (figura 19). Esses resultados sugerem que os efeitos induzidos pelo CBD são sensíveis ao WAY100635, antagonista do receptor 5-HT<sub>1A</sub>, injetado no HPCd, em uma dose que não produziu nenhum efeito por si só. Esse resultado concorda com estudos comportamentais anteriores que demonstraram o envolvimento do receptor 5-HT<sub>1A</sub> como mediador dos efeitos ansiolíticos/anti-aversivos do CBD por via sistêmica e também quando injetado em outras regiões cerebrais (JURKUS et al., 2016; LEE et al., 2017; PATEL et al., 2017; DE ALMEIDA e DEVI, 2020).

Sistemicamente, o CBD é capaz de antagonizar o efeito ansiogênico de altas doses de  $\Delta^9$ -THC e produzir efeito ansiolítico (FUSAR-POLI et al., 2009; TODD et al., 2016; ZUARDI et al. 1981). Além disso, o CBD atenua as consequências autonômicas e comportamentais do estresse por contenção em ratos, como a redução da pressão arterial, a frequência cardíaca e resposta ansiogênica no LCE 24 h depois do evento estressor (RESSTEL et al., 2008). Os receptores 5-HT<sub>1A</sub> do cérebro estão localizados pré-sinápticamente em corpos celulares nos núcleos da rafe do tronco cerebral e pós-sinápticamente em várias estruturas límbicas, incluindo regiões responsáveis pelas respostas adaptativas a eventos aversivos, processamento e expressão da memória aversiva, como o HPC (DEAKIN e GRAEFF, 1991; SHARP e BARNES 2020; VILARÓ et al., 2020; BARNES et al., 2021). Acredita-se que este receptor desempenhe um papel importante na fisiopatologia dos transtornos de ansiedade. Um dos principais alvos moleculares propostos para o CBD é o receptor de serotonina 5-HT<sub>1A</sub>, apoiado pela interação direta com o sítio de ligação ortostérico (RUSSO et al., 2005). O HPCd, além de ser crucial para o processamento da memória aversiva contextual (CAHILL & McGAUGH, 2011; MAREN et al., 2013; CHAAYA et al., 2018) apresenta uma alta concentração de receptores pós-sinápticos 5-HT<sub>1A</sub> (CHALMERS e WATSON, 1991). A ativação de receptores pós-sinápticos 5-HT<sub>1A</sub> foi relacionada a adaptação ao estresse (JOCA et al., 2003).

Corroborando os achados comportamentais deste trabalho, o antagonismo sistêmico do receptor serotoninérgico 5-HT<sub>1A</sub>, pelo WAY-100635 (0,1 mg/kg), foi capaz de atenuar as consequências emocionais tardias do estresse por contenção, fato que pode ser explicado a partir do efeito facilitador da neurotransmissão mediada pelo receptor 5-HT<sub>1A</sub> desencadeada pelo CBD (RESSTEL et al., 2008). No entanto, o antagonismo dos receptores CB1 pelo AM251 e do CB2 pelo AM630 do HPCd não foi capaz de prevenir a resposta ansiolítica/anti-aversiva promovida pelo CBD. Esse resultado foi semelhante ao obtido através da injeção de CBD diretamente na substância cinzenta periaquedutal dorsolateral, em que, na presença de WAY-100635, mas não na de AM251, o CBD exerceu efeito ansiolítico/anti-aversivo (CAMPOS e GUIMARÃES et al., 2008), anticomulsivo (DEIANA et al., 2012; NARDO et al., 2014) e panicolítico (DE PAULA SOARES et al., 2010). Esse mesmo mecanismo também foi relatado em comportamentos inatos relacionados ao medo, evocados por um paradigma baseado na interação presa-predador (URIBE-MARIÑO et al., 2012; TWARDOWSCHY et al., 2013).

O CBD pode modular a atividade neuronal na substância cinzenta periaquedutal dorsal (CAMPOS & GUIMARÃES, 2008), núcleo do leito da estria terminal (GOMES et al., 2011), córtex pré-frontal medial (LEMOS et al., 2010; MARINHO et al., 2015), amígdala (HSIAO et al., 2012) e HPC (CAMPOS et al., 2013b) para exercer efeitos ansiolíticos. Em outras regiões cerebrais, o CBD também exerceu efeito semelhante ao obtido neste estudo. Por exemplo, quando injetado na cisterna magna, o CBD apresentou efeito ansiolítico (GRANJEIRO et al., 2011), no núcleo do leito da estria terminal, dispôs dos mesmos efeitos ansiolíticos e teve efeito positivo na modulação da resposta barorreflexa, capaz de reduzir a pressão arterial (ALVES et al., 2010; GOMES et al., 2011), inclusive, àquela induzida pelo estresse por contenção (GOMES et al., 2013). Assim como encontrado neste estudo, o CBD reduziu a expressão da memória aversiva contextual (GOMES et al., 2012) e todos os efeitos supracitados foram mediados pelos receptores 5-HT<sub>1A</sub>. Por outro lado, nem sempre o CBD produziu apenas efeito ansiolítico. Efeito ansiogênico também foi relatado. Marinho et al., (2015) demonstrou que o CBD pode exercer efeito bidirecional de acordo a experiência estressante anterior. Outros autores demonstraram que o CBD injetado no córtex infralímbico de ratos induz efeito ansiogênico no CAC (LEMOS et al., 2010), mas promove efeito ansiolítico no LCE. Tanto o efeito ansiolítico, quanto o efeito ansiogênico, demonstraram ser sustentados pelo recrutamento dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> (MARINHO et al., 2015). Ademais, efeito bidirecional do CBD também foi relatado na extinção do CAC (SONG et al., 2016).

O antagonismo de CB1 e CB2 do HPCd não foi capaz de reverter o efeito do CBD (figura 19). Esse resultado pode ser explicado pela baixa afinidade do CBD pelos receptores CB1 e CB2 (PETITET et al., 1998; THOMAS et al., 1998). Entretanto, um dos mecanismos de ação do CBD envolve o aumento de endocanabinoides, que são considerados agonistas endógenos dos receptores CB1 e CB2. Logo, a administração de CBD aumenta a concentração de AEA por impedir sua recaptção e inibição da FAAH (PACHER et al., 2020; SHABAZI et al., 2020). Contudo, somando os resultados obtidos neste estudo aos estudos prévios da literatura, pode-se sugerir que esta facilitação da neurotransmissão endocanabinoide não é suficiente para produzir o efeito ansiolítico/anti-aversivo agudo do CBD. Admite-se que, neste trabalho, não avaliamos a neurotransmissão endocanabinoide no nível enzimático, com inibidores de FAAH, apesar disso, as evidências até o momento suportam a baixa probabilidade de que, os efeitos do CBD observados neste trabalho, sejam mediados pela sua capacidade de inibir a recaptção celular e hidrólise de AEA e 2-AG e sua posterior interação com CB1.



O CBD exerce outros efeitos, além do ansiolítico/anti-aversivo, a partir do recrutamento dos receptores 5-HT<sub>1A</sub>. Por exemplo, o efeito antidepressivo do CBD depende da ativação de receptores 5-HT<sub>1A</sub> e da expressão hipocampal do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e o pré-tratamento com WAY100635 impede parte desses efeitos (ZANELATI et al., 2010). Efeitos antialodínicos do CBD foram prevenidos pelo WAY100135, mas não pelo AM251 ou AM630, antagonistas do receptor CB1 e CB2, respectivamente (JESUS et al., 2019). Além disso, um estudo que avaliou os efeitos antidepressivos do CBD (20 mg/kg) encontrou aumento da atividade motora vertical de roedores e esse comportamento também foi atenuado pelo antagonista pelo WAY100635 (ESPEJO-PORRAS et al., 2013).

O efeito ansiolítico do CBD pode ser confundido com aumento da atividade de locomoção em roedores. Outrossim, este não parece ser o fator determinante na redução da expressão do congelamento visualizada em nossos resultados. Trabalhos anteriores indicaram que, apesar do CBD aumentar a exploração de braços abertos no LCE, bem como o número de lambidas punidas no teste de Vogel, sugerindo um efeito ansiolítico (GOMES et al., 2011), tal efeito não é atrelado ao aumento da distância percorrida em outros testes, como por exemplo, no campo aberto. Lemos et al., (2010) demonstrou que o CBD injetado em áreas como o córtex pré- e infralímbico não altera a distância total percorrida por ratos machos no campo aberto. Esse resultado é reforçado por estudos em que o CBD atenuou os efeitos de drogas psicotomiméticas em camundongos, sem reduzir por si mesmo a locomoção (MOREIRA et al., 2005). O mesmo foi observado por Elbatsh et al., (2012) após a administração crônica de CBD (10 mg/kg, i.p. por 14 dias). O CBD também não alterou o número de entradas nos braços fechados do LCE, nem interferiu no consumo de água ou limiar nociceptivo, descartando potenciais fatores de confusão nos dois testes. Além disso, o pré-tratamento com o antagonista do receptor 5-HT<sub>1A</sub> WAY100635 (0,37 nmol) aboliu os efeitos do CBD em ambos os modelos (GOMES et al., 2011). Juntos, estes estudos mostram que, a ativação do receptor 5-HT<sub>1A</sub> no sistema nervoso central e periférico, pelo CBD regula a excitabilidade neuronal e a liberação de neurotransmissores que, comportamentalmente, resultam no efeito ansiolítico/anti-aversivo.

O labirinto em cruz elevado (LCE) é um teste comportamental validado para avaliar os efeitos ansiolíticos de agentes farmacológicos em roedores (PELLOW et al., 1985; CAROBREZ & BERTOGLIO, 2005; WALF et al., 2007). Neste trabalho, ratas tratadas

sistemicamente com CBD 1, 3 ou 10 mg/kg para investigar o efeito tipo ansiolítico do CBD. Os resultados obtidos não diferiram em nenhum dos parâmetros analisados no decurso do teste do LCE, dos grupos tratados com CBD em comparação com os controles (figura 20). Esse perfil sugere que o efeito ansiolítico do CBD durante o LCE não ocorreu. Este resultado discorda com o encontrado em estudos anteriores em ratos e camundongos machos (GUIMARÃES et al., 1990; ONAIVI et al., 1990; RESSTEL et al., 2009; SALVIATO et al., 2021).

Vários fatores podem ter contribuído para a divergência entre os nossos resultados e os trabalhos supracitados. Por exemplo, diferenças na fase do ciclo estral, no sexo dos animais, na intensidade da luz, na cepa do rato, dose de CBD utilizada e o momento da análise e coleta dos dados podem explicar os resultados divergentes desses estudos. Estudos prévios mostraram que ratas fêmeas passam mais tempo nos braços abertos do teste do LCE do que ratos machos, indicando um menor nível de ansiedade nas fêmeas (JOHNSTON & FILE, 1991). Já nos estudos que avaliaram o efeito do CBD, foram comumente realizados em machos. Guimarães et al., (1990) encontrou uma curva dose-resposta completa em ratos machos, após administração sistêmica aguda de CBD, que produziu uma curva dose-resposta “em forma de sino” a partir das doses de 2,5, 5,0 e 10,0 mg/kg. i.p., entretanto, a dose de 20,0 mg/kg não foi mais eficaz e não induziu efeito tipo ansiolítico, e nenhuma das doses de CBD usadas alterou o número total de entradas, uma medida da atividade exploratória total. A caracterização farmacológica de canabinoides no LCE, incluindo o CBD apresentou resultados positivos para o efeito ansiolítico do CBD, mas, novamente, testado apenas em machos (ONAIVI et al., 1990).

Além da dose e do sexo avaliados, a fase do ciclo estral pode influenciar nas respostas relacionadas à ansiedade. Os níveis basais de ansiedade podem variar dentro de um animal, dependendo de uma variedade de condições externas e internas que afetam o processamento emocional (JOHNSTON & FILE, 1991). Ratas em proestro podem passar mais tempo nos braços abertos do que as ratas diestro, sugerindo diferente sensibilidade ao teste do LCE ao longo do ciclo estral (MARCONDES et al., 2001; IMHOF et al., 1993).

Entretanto, diferenças comportamentais relacionadas ao ciclo estral nem sempre são visualizadas (NOMIKOS & SPYRAKI, 1988). O número de entradas nos braços abertos, em nosso estudo foi semelhante ao estudo de Marcondes et al., (2001) que encontrou ausência de diferença no número de entradas de braços fechados, sugerindo que a atividade locomotora das ratas no LCE não foi influenciada pelo ciclo estral. Em nosso trabalho, optamos por não

separar as fêmeas pela fase do ciclo estral, em virtude de, experimentalmente, verificarmos que a fase do ciclo estral não afetou a resposta do CBD no CAC. Esse resultado concordou com trabalhos anteriores em que não houve diferença significativa na porcentagem de entradas nos braços abertos ou no número de entradas nos braços fechados entre as fases do ciclo estral ou, ainda, entre machos e fêmeas naturalmente cíclica ou ovariectomizadas (MARCONDES et al., 2001).

O CBD, assim como, baixas doses de benzodiazepínicos produzem efeito tipo-ansiolítico durante o LCE em machos. Em nossos resultados, não incluímos um controle positivo, como o diazepam (2,0 mg/kg), como o utilizado por Guimarães et al., (1990), ou MDZ (0,125–1,0 mg/kg i.p.) ou por Bertoglio & Carobrez, (2002). Apesar das condições experimentais similares entre o presente trabalho e os estudos anteriormente citados, não observamos efeito ansiolítico do CBD no LCE. Em contraste, o efeito ansiolítico do diazepam (1,0 mg/kg), só foi revelado em fêmeas pré-tratadas com baixas doses de fluoxetina (1,75 mg/kg) e durante a fase do ciclo estral diestro tardio (SOARES-RACHETTI et al., 2016). Quando drogas canabinoides foram utilizadas, relatos anteriores sugerem que fêmeas demonstram ser mais sensíveis do que machos aos efeitos destas (COOPER et al., 2018; KASTEN et al., 2019). Ratas fêmeas tratadas sistemicamente com THC 0,075 ou 0,1 mg/kg exploraram por mais tempo os braços abertos em comparação com controles (SALVIATO et al., 2021).

## **7.2 O CBD prejudica a reconsolidação da memória aversiva contextual**

Ratas fêmeas tratadas sistemicamente com CBD 10 mg/kg após a sessão de evocação da memória expressaram menos congelamento em comparação com os controles, no dia seguinte e após 7 dias, sugerindo que houve prejuízo persistente da reconsolidação. Este resultado replica o encontrado em estudos anteriores em ratos machos que também utilizaram o CBD como agente amnésico (STERN et al., 2012, 2015; GAZARINI et al., 2014; MURKAR et al., 2019; BAYER et al., 2022).

Neste trabalho demonstramos pela primeira vez que, em fêmeas, o CBD 10 mg/kg intraperitoneal é capaz de prejudicar a restabilização da memória aversiva contextual. Encontramos ainda que, esse efeito depende da reexposição ao contexto e é restrito a uma janela temporal de aproximadamente 6 horas após a reexposição. Anteriormente, estes achados só haviam sido demonstrados em modelos experimentais que utilizaram roedores

machos (STERN et al., 2012,2015; GAZARINI et al., 2014; MURKAR et al., 2019) e os desfechos envolvendo fêmeas eram limitados. Aqui utilizamos apenas a dose de 10 mg/kg i.p. para obter este resultado. Essa dose também foi efetiva em estudos anteriores (STERN et al., 2012,2015; GAZARINI et al., 2014; MURKAR et al., 2019; BAYER et al., 2022). Por exemplo, Stern et al., (2012) demonstrou em machos que, doses de CBD 3, 10 ou 30 mg/kg sistêmico, foram efetivas no prejuízo de reconsolidação da memória (STERN et al., 2012). O mesmo ocorreu em memórias reforçadas pela estimulação adrenérgicas (GAZARINI et al., 2014). É importante ressaltar que, assim como ocorreu em nossos experimentos, o efeito do CBD foi visualizado apenas em situações onde a desestabilização de fato ocorreu e dentro de uma janela temporal limitada de, aproximadamente, 6 horas (BUSTOS et al., 2006;2009; STERN et al., 2012;2017; ALFEI et al., 2015; PIÑEYRO et al., 2014; FRANZEN et al., 2019), e durante a consolidação, o efeito do CBD parece ser restrito ao período aproximado de 1 hora (RAYMUNDI et al., 2020). Juntos, esses resultados indicam que o CBD é uma droga potencial para intervir na memória aversiva contextual e reforçam a premissa de que apenas memórias lábeis são suscetíveis às intervenções farmacológicas (ALBERINI & LEDOUX, 2013; KRUK-SLOMKA et al., 2017; LEE et al., 2017; DE OLIVEIRA & DOMONTE, 2021; STEMERDING et al., 2022).

Em nossas condições, o efeito amnésico do CBD obtido 24 horas depois, durante o Teste A, persistiu por pelo menos mais 7 dias. O CBD já demonstrou ser eficaz na redução de respostas condicionadas e incondicionadas, fortemente relacionadas ao comportamento tipo-ansioso em roedores (GUIMARÃES et al., 1990; MOREIRA et al., 2005; 2010; RESSTEL et al., 2006;2009; LEMOS et al., 2010). Efeitos anti-aversivos/ansiolíticos persistentes podem explicar a redução do congelamento aqui encontrados. Entretanto, no delineamento experimental utilizado, essa explicação seria improvável, uma vez que o CBD foi injetado sistemicamente após a sessão de reexposição e a redução do tempo de congelamento foi observado durante o Teste A realizado 24 horas após e 7 dias depois. Nos estudos que encontraram efeitos anti-aversivos/ansiolíticos do CBD, esse efeito foi obtido quando os animais estavam sob ação do CBD, ou seja, de forma aguda durante o LCE e/ou durante o CAC, e não foram relatadas alterações da atividade exploratória geral e de locomoção (GUIMARÃES et al., 1990; MOREIRA et al., 2005; 2010; RESSTEL et al., 2006;2009; LEMOS et al., 2010).

Outro fator que poderia suportar a redução visualizada relaciona-se com a farmacocinética do CBD, em que o efeito obtido 24 horas mais tarde, pode ser explicado por

efeito anti-aversivo/ansiolítico tardio do CBD. Contudo, de acordo com estudos farmacocinéticos em ratos machos, após a administração sistêmica, o CBD atinge níveis centrais máximos em torno de 2 horas, apresenta meia-vida de cerca aproximadamente 8 horas e é completamente eliminado nas primeiras 24 horas, mas pode variar com o veículo utilizado (DEIANA et al, 2012). Ainda, o CBD exerce efeitos ansiolíticos/anti-aversivos, quando administrado previamente a sessão de reexposição e os animais estão sob efeito da droga (LEMOS et al., 2010, GOMES et al., 2012, JURKUS et al., 2016). Logo, os resultados obtidos sugerem um efeito amnésico (prejuízo de reconsolidação) do CBD e não efeitos ansiolíticos/anti-aversivos transitórios sobre a expressão do congelamento.

A reconsolidação da memória e seus processos subjacentes ainda são pouco estudados em modelos experimentais que utilizam fêmeas. De forma geral, mamíferos experimentam flutuações dos hormônios gonadais ao longo da vida. Esses hormônios exercem importante efeito organizacional e ativacional no encéfalo e, suportam as diferenças entre os sexos (BEATTY, 1984; ROSENFELD, 2017). Apesar da influência dos hormônios gonadais femininos no aprendizado contextual nem sempre ser levada em consideração (MAREN et al., 1994; GUPTA et al., 2001), estudos prévios corroboram a ideia de que o ciclo estral não interfere na capacidade de expressão da RC em uma sessão de teste subsequente (CHANG et al., 2009; KASHEFI e RASHIDY, 2014; DA SILVA et al., 2016). Esse padrão de resultados foi reproduzido em nosso laboratório, onde encontramos que a fase do ciclo estral não altera a expressão do congelamento nem a suscetibilidade à labilização e reconsolidação da memória (FRANZEN et al., 2019). Somadas, essas evidências prévias suportam a decisão de não separarmos os grupos experimentais de acordo com a fase do ciclo estral.

A memória contextual reativada pode seguir diversos destinos, dentre eles, a labilização, reconsolidação e extinção (DUVARCI & NADER, 2004; SUZUKI et al., 2004, BUSTOS et al., 2006, LEE et al., 2006, DE OLIVEIRA ALVARES et al., 2008; STERN et al., 2012, 2015; FRANZEN et al., 2019; TROYNER & BERTOGLIO 2020; BAYER et al., 2022). O CBD, sabidamente, apresenta efeito facilitador da extinção em ratos machos (BITENCOURT et al., 2008; DO MONTE et al., 2013). Os protocolos de reconsolidação e extinção por reexposição podem ser confundidos em fêmeas, uma vez que, comportamentalmente, ambos reduzem a expressão do congelamento e o prejuízo da reconsolidação pode ser mascarado (FRANZEN et al., 2019). Diante de tais evidências, não descartamos a possibilidade de que, a redução do congelamento obtida após a administração

do CBD, pode ser resultado do efeito facilitador sobre a extinção da memória. Para dissociar a reconsolidação da extinção utilizamos a reinstalação, como ferramenta adicional, para comprovar o prejuízo na reconsolidação da memória. Em diversos experimentos, demonstramos que, quando houve desestabilização e o CBD foi capaz de interromper a restabilização, a memória não tende a sofrer reinstalação. Esse resultado concorda com a teoria geral da reconsolidação que postula que a memória lábil, enfraquecida e posteriormente reconsolidada, não reinstala diante de um estímulo incondicionado (DUVARCI e NADER, 2004; RESCORLA, 2004). Encontramos aqui que, a memória prejudicada pelo CBD não reinstala. Esse resultado é reforçado por estudos anteriores que utilizaram a reinstalação e/ou a recuperação espontânea para confirmar o prejuízo de reconsolidação advindo do CBD (STERN et al., 2012; GAZARINI et al., 2014) ou de outros agentes amnésicos (DUVARCI e NADER, 2004; BUSTOS et al., 2006;2009). Desta forma, é improvável que o efeito na redução do congelamento seja atrelado à facilitação da extinção (BITENCOURT et al., 2008; DO MONTE et al., 2013; SONG et al., 2016). Assim, a redução do congelamento observada em nossos resultados está mais bem associada ao prejuízo duradouro da reconsolidação da memória.

O efeito amnésico do CBD encontrado neste trabalho corrobora os resultados encontrados por outros autores que, após a intervenção com diversas ferramentas farmacológicas, demonstram ser eficazes em prejudicar a restabilização da memória. Por exemplo, em machos, o benzodiazepínico midazolam (MDZ) prejudicou a reconsolidação da memória aversiva contextual (BUSTOS et al., 2006;2009; ALFEI et al., 2015; SCHROYENS et al., 2019) e o mesmo padrão de resultados foi encontrado em fêmeas (FRANZEN et al., 2019). Ainda, o MK-801 (antagonista de receptores NMDA) apresenta propriedades amnésicas em memórias aversivas contextuais (CASSINI et al., 2017; MERLO et al., 2014), auditivas (ALFEI et al., 2015; SUZUKI et al., 2004) e em memórias apetitivas (LEE e FLAVELL, 2014). Outras drogas também evidenciaram que, tempos de sessão de reexposição adequados associados com drogas amnésicas são capazes de tornar a memória lábil e, conseqüentemente, suscetível à atualização, como por exemplo, o L-NAME, inibidor da óxido nítrico sintase (BARATI et al., 2008), a anisomicina (NADER et al., 2000; DÍAZ-MATAIX et al., 2013), rapamicina (BLUNDELL et al., 2008; RADISKE et al., 2021), o propranolol (PRZYBYSLAWSKI & SARA, 1999; MILTON et al., 2008; SCHROYENS et al., 2019), cicloheximida (SCHROYENS et al., 2019), clonidina (GAZARINI et al., 2013) e o  $\Delta^9$ -THC (STERN et al., 2015).

O HPC é uma região chave para codificar e reativar memórias contextuais. Está envolvido nos processos de aprendizado e memória que permitem associações entre pistas espaciais e estímulos biologicamente relevantes, como o CAC (MAREN et al., 2013). O CBD é um importante modulador da plasticidade sináptica hipocampal (SCARANTE et al., 2017) e, a neurotransmissão canabinoide nesta região, demonstrou interferir com diversos processos envolvidos no processamento da memória aversiva contextual (MARSICANO et al., 2009; MORENA & CAMPOLONGO, 2014; LUNARDI et al., 2020).

Neste trabalho, ratas fêmeas que receberam CBD, 30 nmol/hemisfério no HPCd, após a sessão de evocação da memória, expressaram menos congelamento em comparação aos controles. Este efeito foi visualizado no dia seguinte a reexposição, persistiu por 7 dias e foi resistente à reinstalação. Estes resultados replicam os dados obtidos sistemicamente com o CBD e sugerem que houve prejuízo da reconsolidação. Estes dados concordam com estudos prévios que obtiveram prejuízo da reconsolidação após a injeção do CBD no córtex pré-frontal (BAYER et al., 2022). Em outras regiões cerebrais envolvidas com o aprendizado e memória, como o córtex pré-límbico e BNST o CBD foi capaz de reduzir a expressão do congelamento, durante a sessão de reexposição (LEMOS et al., 2010; GOMES et al., 2012; FOGAÇA et al., 2014), entretanto, quando infundido no córtex pré-límbico, efeito oposto foi encontrado (LEMOS et al., 2010; MARINHO et al., 2015). Esse padrão bidirecional sobre a expressão do congelamento, após a infusão central do CBD, também foi encontrado durante a extinção da memória (SONG et al., 2016) e em outros testes comportamentais como o LCE (FOGAÇA et al., 2014; MARINHO et al., 2015). Além da reconsolidação, outros processos mnemônicos provenientes do CAC foram sensíveis à modulação central do CBD, como a expressão (GOMES et al., 2010; LEMOS et al., 2010; GOMES et al., 2012; FOGAÇA et al., 2014), consolidação (NORRIS et al., 2016; ROSSIGNOLI et al., 2017) e a extinção (BITENCOURT et al., 2008; DO MONTE et al., 2013; SONG et al., 2016). Os resultados obtidos com o CBD seguem o mesmo padrão de ferramentas farmacológicas clássicas, como a infusão de inibidores da síntese de proteínas no HPCd (LEE et al., 2004; RODRIGUEZ-ORTIZ et al., 2008).

A maioria dos efeitos do CBD durante o processamento da memória surgem a partir da modulação e interação deste com diferentes receptores como o CB1, CB2 (LEE et al., 2017; PISANTI et al., 2017). Esses receptores são alguns, dos muitos, sítios moleculares do CBD e, dependendo do processo neurobiológico envolvido, o recrutamento destes é alterado

e, conseqüentemente, o desfecho comportamental (LIGRESTI et al., 2016; LEE et al., 2017; PISANTI et al., 2017; NELSON et al., 2020).

O pré-tratamento com o antagonista/agonista inverso do receptor CB1 AM251 no HPCd aboliu o prejuízo de reconsolidação produzido pelo tratamento sistêmico com CBD. Por outro lado, isso não ocorreu com o pré-tratamento com o antagonista do receptor CB2, o AM630.

Esses resultados concordam com estudos anteriores, que verificaram efeitos semelhantes obtidos através do antagonismo do receptor CB1. Por exemplo, Bayer et al., (2022) encontrou que, o pré-tratamento com o AM251 no AC, PL ou IL preveniu os efeitos prejudiciais do tratamento sistêmico com CBD na reconsolidação. De forma semelhante ao presente trabalho, assim como no HPCd, o CBD infundido diretamente no córtex pré-límbico e cíngulo anterior foram capazes de prejudicar a reconsolidação (BAYER et al., 2022). A infusão de CBD no córtex infralímbico facilita a extinção do medo via receptores CB1 (DO MONTE et al., 2013), mas não é capaz de prejudicar a reconsolidação (BAYER et al., 2022). A infusão de CBD diretamente no HPCd prejudicou a consolidação da memória aversiva (RAYMUNDI, et al., 2020) e memórias generalizadas (STERN et al., 2017).

No HPCd, a alta densidade de receptores CB1 suporta o envolvimento da sinalização do receptor CB1 na aprendizagem e na memória (HERKENHAM et al., 1990; TSOU et al., 1998). Estudos em animais de laboratório demonstraram que o CB1 é recrutado de maneira oposta durante a reconsolidação e na extinção da memória. Por exemplo, De Oliveira Alvares et al. (2008) demonstrou que a infusão de AM251 no HPCd melhora a reconsolidação da memória e aumenta a expressão do congelamento em um teste subsequente. Entretanto, quando o processo desencadeado é a extinção da memória, o AM251 prejudicou a consolidação da extinção (DE OLIVEIRA ALVARES, 2008). Em animais submetidos ao CAC e protocolos de estresse prévio, a infusão do AM251 facilitou a expressão do congelamento e de respostas autonômicas (SPIACCI et al., 2016).

Em outros trabalhos, a ativação do receptor CB1 no HPCd prejudicou a reconsolidação da memória aversiva contextual (SANTANA et al., 2016) e a memória de longo prazo do reconhecimento de objetos (CLARKE et al., 2008). Em contraste, o antagonismo do receptor CB1 no córtex insular granular ou área somatossensorial facilita a consolidação desse tipo de memória (O'BRIEN et al., 2014).

Embora os primeiros estudos tenham demonstrado que os receptores CB2 eram expressos na periferia, mas não no cérebro (DEVANE et al., 1988; ATWOOD et al., 2010),



atualmente, mostrou-se que estes receptores também estão expressos no SNC, incluindo a formação hipocampal (GONG et al., 2006; ONAIVI et al., 2006; STEMPEL et al., 2016; VISVANATHAR et al., 2021). Em nossos estudos, o pré-tratamento com o AM630 no HPCd foi incapaz de impedir os efeitos prejudiciais da administração sistêmica do CBD na reconsolidação.

Esses resultados são apoiados por evidências prévias que demonstraram que nem todos os efeitos do CBD envolvem seus receptores clássicos, como o CB2. Por exemplo, o efeito ansiolítico/anti-aversivo do CBD é mediado via receptores 5-HT<sub>1A</sub>, mas não via receptores CB1 ou CB2 (JURKUS et al., 2016; LEE et al., 2017; PATEL et al., 2017; DE ALMEIDA e DEVI, 2020). O receptor CB2 também não foi recrutado, em outros paradigmas comportamentais, como aqueles que investigam respostas compulsivas (DEIANA et al., 2012; NARDO et al., 2014) e panicóticas (DE PAULA SOARES et al., 2010) em animas de laboratório.

Diversos estudos relatam os efeitos do CBD sobre a memória e aprendizado dependem da ativação de receptores CB2 (STERN et al., 2017, CHESWORTH ET AL., 2020; RAYMUNDI et al., 2020), inclusive mediando tais efeitos quando outras drogas canabinoides são administradas (BUSQUETS-GARCIA et al., 2011). Entretanto, sustenta-se que, a plasticidade sináptica envolvida durante o teste comportamental é um fator na visualização dos efeitos do CBD e recrutamento de seus alvos farmacológicos (ABUSH & AKIRAV, 2010).

Diante o exposto, é possível prever que diversos fatores podem explicar as discrepâncias entre os resultados aqui obtidos e os estudos anteriores. Sabe-se que a fase da memória escolhida para intervenção do CBD pode resultar em desfechos diferentes, como mostram trabalhos anteriores ao nosso (BITENCOURT et al., 2008; STERN et al., 2017; RAYMUNDI et al., 2020; DO MONTE et al., 2013; RESSTEL et al., 2006;2009; LEMOS et al., 2010). Por exemplo, Stern et al., (2017), após submeter ratos machos ao CAC (com intensidade de estímulos suficiente para gerar memórias generalizadas) encontrou que a administração do antagonista CB2, AM630, sistemicamente ou infundido no HPCd, aboliu os efeitos do CBD durante o prejuízo da consolidação. Um padrão semelhante para a consolidação da memória também foi obtido por Raymundi et al., (2020), assim como a deleção genética de receptores CB2 prejudicou a memória aversiva contextual (LI & KIM, 2016). Em nossos resultados, não observamos nenhum prejuízo do CBD ou do AM630 isoladamente. Tal diferença pode ser explicada pela divergência entre a fase da memória

estudada aqui e nos estudos citados anteriormente. Já é bem estabelecido que a consolidação e a reconsolidação da memória aversiva contextual compartilham mecanismos moleculares, entretanto, a reconsolidação não é apenas uma reprodução passiva dos processos neurobiológicos decorridos da consolidação (ALBERINI, 2005; DUVARCI et al., 2008). As principais diferenças ocorrem justamente durante a reexposição ao contexto em que a memória aversiva foi formada, durante a labilização e restabilização da memória (ALBERINI & LEDOUX, 2013), momento no qual administramos as drogas canabinoides.

Não podemos descartar que, a redução do congelamento, mantida após o estímulo de reinstalação, nos grupos que receberam CBD, isoladamente, ou CBD associado ao AM630 intra-hipocampal, sejam efeitos ansiolíticos ou anti-aversivos tardios. Estudos prévios demonstraram que tanto o CBD quanto o AM630 podem exercer efeitos bidirecionais sobre a expressão do congelamento, e a atividade locomotora (GARCÍA-GUTIÉRREZ ET AL., 2012; LI & KIM, 2015; MARINHO et al., 2015; LEMOS et al., 2010; SONG et al., 2016). A ativação crônica ou antagonismo de CB2 em roedores aumenta ou diminui, respectivamente, comportamentos tipo ansioso e a atividade locomotora (GARCÍA-GUTIÉRREZ ET AL., 2012; LI & KIM, 2015).

Em contraste, relatos também indicam que, camundongos knockout para CB2 percorreram uma distância menor no teste de campo aberto e passaram menos tempo nos braços abertos LCE em comparação com camundongos controle (ORTEGA-ALVARO et al., 2011). Contudo, este não parece ser o que ocorreu em nossos resultados, uma vez que, tais intervenções foram realizadas antes da exposição aos testes comportamentais, em contraste com o que realizado neste estudo. Ainda, como previamente padronizado em fêmeas por Franzen et al., (2019), e em concordância com o postulado da reconsolidação (RESCORLA & HETH, 1975; DUVARCI & NADER, 2004), memórias que sofreram interferência durante a reconsolidação não reinstalam como observado nos grupos controles. Juntos, esses resultados sustentam a hipótese de que o CBD não recruta os receptores CB2 no HPCd para exercer seus efeitos sobre a reconsolidação da memória, mas sim, os receptores CB1.

## 1 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que CBD exerce efeito ansiolítico/anti-aversivo quando administrado previamente à sessão de reexposição e o ciclo estral não interferiu na expressão da memória e/ou nesses efeitos. Machos e fêmeas, quando comparados diretamente, apresentaram diferenças quanto à sensibilidade aos efeitos do CBD e apenas fêmeas obtiveram redução na expressão do congelamento na dose de 10 mg por kg. Os efeitos visualizados foram restritos a grupos que estavam sob efeito do CBD durante o teste. Esclarecemos ainda que o CBD recruta receptores diferentes de acordo com a fase da memória estudada. Para produzir efeito ansiolítico /anti-aversivo, demonstramos que o CBD necessita do receptor 5-HT<sub>1A</sub> do HPCd.

Por outro lado, a administração do CBD após a sessão de reexposição, prejudicou a reconsolidação da memória. Esse efeito foi visualizado quando o CBD foi injetado sistemicamente e também quando infundido diretamente no HPCd. Entretanto o efeito amnésico do CBD foi restrito à janela temporal menor do que 6 horas e desapareceu quando a sessão de reexposição foi omitida. Finalmente, encontramos que o efeito amnésico do CBD engaja o receptor CB1, mas não o CB2, do HPCd para prejudicar a reconsolidação da memória

Em síntese, nossos dados sugerem que o momento da intervenção farmacológica com o CBD é de extrema importância na modulação da memória aversiva. A obtenção de resultados duradouros ou transitórios está estritamente relacionada ao momento da administração do CBD. O presente estudo fornece dados que ampliam as fronteiras do conhecimento envolvendo os efeitos do CBD no processamento da memória. Além disso, estudamos esses fenômenos em fêmeas, sexo que frequentemente é ignorado como variável nos estudos em farmacologia neurociências. Portanto, este conjunto de resultados pode auxiliar, futuramente, em estudos clínicos mais abrangentes, sem que haja exclusão do sexo biológico e particularidades de cada um dos gêneros.

## REFERÊNCIAS

BARATTI, Carlos M. et al. Reactivated memory of an inhibitory avoidance response in mice is sensitive to a nitric oxide synthase inhibitor. **Neurobiology of learning and memory**, v. 89, n. 4, p. 426-440, 2008.

BARKER, Jennifer M.; GALEA, Liisa AM. Males show stronger contextual fear conditioning than females after context pre-exposure. **Physiology & behavior**, v. 99, n. 1, p. 82-90, 2010.

BARNES, Nicholas M. et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. CX. Classification of receptors for 5-hydroxytryptamine; pharmacology and function. **Pharmacological reviews**, v. 73, n. 1, p. 310-520, 2021.

BERGAMASCHI, M. M., et al. (2011). Cannabidiol reduces the anxiety induced by simulated public speaking in treatment-naive social phobia patients. **Neuropsychopharmacology**, 36(6), 1219-1226.

BERTOGLIO, L. J.; CAROBREZ, A. P. Prior maze experience required to alter midazolam effects in rats submitted to the elevated plus-maze. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 72, n. 1-2, p. 449-455, 2002.

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

BLANCHARD, Robert J.; FUKUNAGA, Kenneth K.; BLANCHARD, D. Caroline. Environmental control of defensive reactions to footshock. **Bulletin of the Psychonomic Society**, v. 8, n. 2, p. 129-130, 1976.

BLESSING, Esther M. et al. Cannabidiol as a potential treatment for anxiety disorders. **Neurotherapeutics**, v. 12, n. 4, p. 825-836, 2015.

BLUNDELL, Jacqueline; KOUSER, Mehreen; POWELL, Craig M. Systemic inhibition of mammalian target of rapamycin inhibits fear memory reconsolidation. **Neurobiology of learning and memory**, v. 90, n. 1, p. 28-35, 2008.

BANNERMAN, David M. et al. Hippocampal synaptic plasticity, spatial memory and anxiety. **Nature reviews neuroscience**, v. 15, n. 3, p. 181-192, 2014.

BEERY, Annaliese K.; ZUCKER, Irving. Sex bias in neuroscience and biomedical research. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 35, n. 3, p. 565-572, 2011.

BOLSONI, Livia Maria et al. Effects of cannabidiol on symptoms induced by the recall of traumatic events in patients with posttraumatic stress disorder. **Psychopharmacology**, p. 1-9, 2022.

BONN-MILLER, Marcel O., Stan L. Banks, and Terri Sebre. "Conversion of cannabidiol following oral administration: authors' response to grotenhermen et al. Doi: 10.1089/can.2016.0036. **Cannabis and cannabinoid research** 2, no. 1 (2017): 5-7.

BOUTON, Mark E. et al. Contextual and temporal modulation of extinction: behavioral and biological mechanisms. **Biological psychiatry**, v. 60, n. 4, p. 352-360, 2006.

BRITCH, Stevie C.; BABALONIS, Shanna; WALSH, Sharon L. Cannabidiol: pharmacology and therapeutic targets. **Psychopharmacology**, v. 238, n. 1, p. 9-28, 2021.

BROADHURST, P. L.; SINHA, S. N.; SINGH, S. D. The effect of stimulant and depressant drugs on a measure of emotional reactivity in the rat. **The Journal of genetic psychology**, v. 95, n. 2, p. 217-226, 1959.

BRUNETTI, Pietro et al. Pharmacology and legal status of cannabidiol. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanità**, v. 56, n. 3, p. 285-291, 2020.

BUSQUETS-GARCIA, Arnau et al. Differential role of anandamide and 2-arachidonoylglycerol in memory and anxiety-like responses. **Biological psychiatry**, v. 70, n. 5, p. 479-486, 2011.

CAHILL, Larry; MCGAUGH, James L.; WEINBERGER, Norman M. The neurobiology of learning and memory: some reminders to remember. **Trends in neurosciences**, v. 24, n. 10, p. 578-581, 2001.

CAMPOS, Alline C; GUIMARÃES, Francisco Silveira. Involvement of 5HT1A receptors in the anxiolytic-like effects of cannabidiol injected into the dorsolateral periaqueductal gray of rats. **Psychopharmacology**, v. 199, n. 2, p. 223-230, 2008.

CAMPOS, Alline C et al. "The anxiolytic effect of cannabidiol on chronically stressed mice depends on hippocampal neurogenesis: involvement of the endocannabinoid system. **International journal of neuropsychopharmacology** 16, no. 6 (2013): 1407-1419.

CAROBREZ, A. P.; BERTOGLIO, L. J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 29, n. 8, p. 1193-1205, 2005.

CASAROTTO, Plinio C. et al. Cannabidiol inhibitory effect on marble-burying behaviour: involvement of CB1 receptors. **Behavioural pharmacology**, v. 21, n. 4, p. 353-358, 2010.

CASSINI, Lindsey F. et al. On the transition from reconsolidation to extinction of contextual fear memories. **Learning & Memory**, v. 24, n. 9, p. 392-399, 2017.

CHALMERS, Derek T.; WATSON, Stanley J. Comparative anatomical distribution of 5-HT1A receptor mRNA and 5-HT1A binding in rat brain—a combined in situ hybridisation/in vitro receptor autoradiographic study. **Brain research**, v. 561, n. 1, p. 51-60, 1991.

CHAVES, Yane Costa et al. Cannabidiol induces antidepressant and anxiolytic-like effects in experimental type-1 diabetic animals by multiple sites of action. **Metabolic Brain Disease**, v. 36, n. 4, p. 639-652, 2021.

CHAAYA, Nicholas; BATTLE, Andrew R.; JOHNSON, Luke R. An update on contextual fear memory mechanisms: Transition between Amygdala and Hippocampus. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 92, p. 43-54, 2018.

CHESWORTH, Rose; KARL, Tim. Cannabidiol (CBD) reduces cocaine-environment memory in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 199, p. 173065, 2020.

CLARKE, Julia R. et al. Post training activation of CB1 cannabinoid receptors in the CA1 region of the dorsal hippocampus impairs object recognition long-term memory. **Neurobiology of learning and memory**, v. 90, n. 2, p. 374-381, 2008.

CRAIG, Ian W.; HARPER, Emma; LOAT, Caroline S. The genetic basis for sex differences in human behaviour: role of the sex chromosomes. **Annals of Human Genetics**, v. 68, n. 3, p. 269-284, 2004.

COOPER, Ziva D.; CRAFT, Rebecca M. Sex-dependent effects of cannabis and cannabinoids: a translational perspective. **Neuropsychopharmacology**, v. 43, n. 1, p. 34-51, 2018.

COLLINS, Francis S.; TABAK, Lawrence A. Policy: NIH plans to enhance reproducibility. **Nature News**, v. 505, n. 7485, p. 612, 2014.

CRAFT, Rebecca M.; MARUSICH, Julie A.; WILEY, Jenny L. Sex differences in cannabinoid pharmacology: a reflection of differences in the endocannabinoid system? **Life sciences**, v. 92, n. 8-9, p. 476-481, 2013.

CRIPPA, José A., et al. "Effect of two oral formulations of cannabidiol on responses to emotional stimuli in healthy human volunteers: pharmaceutical vehicle matters. **Brazilian Journal of Psychiatry** (2021).

CRIPPA, José Alexandre S. et al. Cannabidiol for COVID-19 Patients with Mild to Moderate Symptoms (CANDIDATE Study): A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Trial. **Cannabis and Cannabinoid Research**, 2021.

CRIPPA, José Alexandre S. et al. Neural basis of anxiolytic effects of cannabidiol (CBD) in generalized social anxiety disorder: a preliminary report. **Journal of psychopharmacology**, v. 25, n. 1, p. 121-130, 2011.

CRIPPA, José Alexandre S. et al. Oral cannabidiol does not convert to  $\Delta^8$ -THC or  $\Delta^9$ -THC in humans: a pharmacokinetic study in healthy subjects. **Cannabis and cannabinoid research**, v. 5, n. 1, p. 89-98, 2020.

CRIPPA, José A. et al. Translational investigation of the therapeutic potential of cannabidiol (CBD): toward a new age. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 2009, 2018.

COULTER, Cynthia; WAGNER, Jarrad R. Cannabinoids in oral fluid: limiting potential sources of cannabidiol conversion to  $\Delta^9$ - and  $\Delta^8$ -tetrahydrocannabinol. **Journal of analytical toxicology**, 2021

DEAKIN, JF William; GRAEFF, Frederico G. 5-HT and mechanisms of defence. **Journal of psychopharmacology**, v. 5, n. 4, p. 305-315, 1991.

DE ALMEIDA, Douglas L.; DEVI, Lakshmi A. Diversity of molecular targets and signaling pathways for CBD. **Pharmacology research & perspectives**, v. 8, n. 6, p. e00682, 2020.

DEIANA, Serena, et al. "Plasma and brain pharmacokinetic profile of cannabidiol (CBD), cannabidivarin (CBDV),  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THCV) and cannabigerol (CBG) in rats and mice following oral and intraperitoneal administration and CBD action on obsessive-compulsive behaviour. **Psychopharmacology** 219, no. 3 (2012): 859-873.

DENG, Wei; AIMONE, James B.; GAGE, Fred H. New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? **Nature reviews neuroscience**, v. 11, n. 5, p. 339-350, 2010.

DE OLIVEIRA ALVARES, L. et al. Opposite action of hippocampal CB1 receptors in memory reconsolidation and extinction. **Neuroscience**, v. 154, n. 4, p. 1648-1655, 2008.

DE OLIVEIRA ALVARES, Lucas; DO-MONTE, Fabricio H. Understanding the dynamic and destiny of memories. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 125, p. 592-607, 2021

DELORENZI, Alejandro et al. Memory beyond expression. **Journal of Physiology-Paris**, v. 108, n. 4-6, p. 307-322, 2014.

DE PAULA SOARES, Vanessa, et al. "Intra-dorsal periaqueductal gray administration of cannabidiol blocks panic-like response by activating 5-HT<sub>1A</sub> receptors. **Behavioural brain research** 213, no. 2 (2010): 225-229.

DEVANE, William A. et al. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. **Molecular pharmacology**, v. 34, n. 5, p. 605-613, 1988.

DEVANE, William A. et al. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. **Science**, v. 258, n. 5090, p. 1946-1949, 1992.

DOCHERTY, James R. et al. Sex: A change in our guidelines to authors to ensure that this is no longer an ignored experimental variable. 2019.

DO MONTE, Fabricio H. et al. Infusion of cannabidiol into infralimbic cortex facilitates fear extinction via CB1 receptors. **Behavioural brain research**, v. 250, p. 23-27, 2013.

DOOHAN, Peter T. et al. Cannabinoid interactions with cytochrome P450 drug metabolism: A full-spectrum characterization. **The AAPS journal**, v. 23, n. 4, p. 1-9, 2021.

DUDAI, Yadin. **The neurobiology of memory: concepts, findings, trends**. Oxford University Press, 1989.

DUDAI, Yadin. **Memory from A to Z: Keywords, concepts, and beyond**. Oxford University Press, USA, 2004.

DUVARCI, Sevil; NADER, Karim. Characterization of fear memory reconsolidation. **Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 42, p. 9269-9275, 2004.

DUVARCI, Sevil; NADER, Karim; LEDOUX, Joseph E. De novo mRNA synthesis is required for both consolidation and reconsolidation of fear memories in the amygdala. **Learning & Memory**, v. 15, n. 10, p. 747-755, 2008.

ECKLUND, Elaine Howard; LINCOLN, Anne E.; TANSEY, Cassandra. Gender segregation in elite academic science. **Gender & Society**, v. 26, n. 5, p. 693-717, 2012

EICHENBAUM, Howard. Prefrontal–hippocampal interactions in episodic memory. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 18, n. 9, p. 547-558, 2017.

ELBATSH, Maha M., N. Assareh, C. A. Marsden, and D. A. Kendall. "Anxiogenic-like effects of chronic cannabidiol administration in rats. **Psychopharmacology** 221, no. 2 (2012): 239-247.

ELSAID, Sonja; LE FOLL, Bernard. The complexity of pharmacology of cannabidiol (CBD) and its implications in the treatment of brain disorders. **Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 45, n. 1, p. 229-230, 2020.

ESPEJO-PORRAS, Francisco et al. Motor effects of the non-psychotropic phytocannabinoid cannabidiol that are mediated by 5-HT1A receptors. **Neuropharmacology**, v. 75, p. 155-163, 2013.

FABRIS, Débora dos Santos. Efeitos do canabidiol sobre comportamento “tipo-compulsivo” em: influências do sexo e do ciclo estral. 2020.

FATTORE, Liana; FRATTA, Walter. How important are sex differences in cannabinoid action? **British journal of pharmacology**, v. 160, n. 3, p. 544-548, 2010.

FRANZEN, Jaqueline M.; GIACHERO, Marcelo; BERTOGLIO, Leandro J. Dissociating retrieval-dependent contextual aversive memory processes in female rats: Are there cycle-dependent differences?. **Neuroscience**, v. 406, p. 542-553, 2019.

FUSAR-POLI, Paolo et al. Distinct effects of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol and cannabidiol on neural activation during emotional processing. **Archives of general psychiatry**, v. 66, n. 1, p. 95-105, 2009.



GARCÍA-GUTIÉRREZ, María S. et al. Chronic blockade of cannabinoid CB2 receptors induces anxiolytic-like actions associated with alterations in GABAA receptors. **British journal of pharmacology**, v. 165, n. 4, p. 951-964, 2012

GARCÍA-GUTIÉRREZ, María S. et al. Synaptic plasticity alterations associated with memory impairment induced by deletion of CB2 cannabinoid receptors. **Neuropharmacology**, v. 73, p. 388-396, 2013.

GAONI, Yehiel; MECHOULAM, Raphael. Isolation, structure, and partial synthesis of an active constituent of hashish. **Journal of the American chemical society**, v. 86, n. 8, p. 1646-1647, 1964.

GOMES, Felipe V.; RESSTEL, Leonardo; GUIMARÃES, Francisco S. The anxiolytic-like effects of cannabidiol injected into the bed nucleus of the stria terminalis are mediated by 5-HT1A receptors. **Psychopharmacology**, v. 213, n. 2, p. 465-473, 2011.

GOMES, Felipe V., et al. "Cannabidiol injected into the bed nucleus of the stria terminalis reduces the expression of contextual fear conditioning via 5-HT1A receptors. **Journal of psychopharmacology** 26, no. 1 (2012): 104-113.

GOMES, Felipe V., et al. "Cannabidiol administration into the bed nucleus of the stria terminalis alters cardiovascular responses induced by acute restraint stress through 5-HT1A receptor." **European Neuropsychopharmacology** 23, no. 9 (2013): 1096-1104.

GRANJEIRO, Erica M., et al. "Effects of intracisternal administration of cannabidiol on cardiovascular and behavioral responses to acute restraint stress". **Biochemical Pharmacology and Behavior** 99, no. 4 (2011): 743-748.

GROTENHERMEN, Franjo. "Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cannabinoids." **Clinical pharmacokinetics** 42, no. 4 (2003): 327-360.

GONG, Jian-Ping, Emmanuel S. et al. "Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain." **Brain research** 1071, no. 1 (2006): 10-23.

GRAHAM, Bronwyn M.; MILAD, Mohammed R. Blockade of estrogen by hormonal contraceptives impairs fear extinction in female rats and women. **Biological psychiatry**, v. 73, n. 4, p. 371-378, 2013

GRAHAM, Bronwyn M.; MILAD, Mohammed R. Inhibition of estradiol synthesis impairs fear extinction in male rats. **Learning & memory**, v. 21, n. 7, p. 347-350, 2014

GRAY, J. A.; LEVINE, S. Effect of induced oestrus on emotional behaviour in selected strains of rats. **Nature**, v. 201, n. 4925, p. 1198-1200, 1964.

GRAY, Jeffrey A. Sex differences in emotional behaviour in mammals including man: endocrine bases. **Acta psychologica**, v. 35, n. 1, p. 29-46, 1971.

GRESACK, J. E. et al. "Sex differences in contextual fear conditioning are associated with differential ventral hippocampal extracellular signal-regulated kinase activation". **Neuroscience**, v. 159, n. 2, p. 451-467, 2009.

GROSS, Cornelius T.; CANTERAS, Newton Sabino. The many paths to fear. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 13, n. 9, p. 651-658, 2012.

GROSS, Cornelius; HEN, Rene. "The developmental origins of anxiety". **Nature Reviews Neuroscience**, v. 5, n. 7, p. 545-552, 2004

GRUENE, Tina M. et al. "Sexually divergent expression of active and passive conditioned fear responses in rats". **Elife**, v. 4, p. e11352, 2015.

GUIMARÃES, Francisco Silveira, and Antonio Waldo Zuardi. "Intra-dorsal periaqueductal gray administration of cannabidiol blocks panic-like response by activating 5-HT1A receptors. **Behavioural brain research** 213, no. 2 (2010): 225-229.

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

GUPTA, Rishi R. et al. "Estrogen modulates sexually dimorphic contextual fear conditioning and hippocampal long-term potentiation (LTP) in rats". **Brain research**, v. 888, n. 2, p. 356-365, 2001.

HEINL, Sonja; LERCH, Oliver; ERDMANN, Freidoon. Automated GC-MS Determination of  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol, Cannabinol and Cannabidiol in Hair. **Journal of analytical toxicology**, v. 40, n. 7, p. 498-503, 2016.

HERKENHAM, M. A. B. L. et al. Cannabinoid receptor localization in brain. **Proceedings of the national Academy of sciences**, v. 87, n. 5, p. 1932-1936, 1990.

HEUBERGER, Jules AAC et al. Population pharmacokinetic model of THC integrates oral, intravenous, and pulmonary dosing and characterizes short-and long-term pharmacokinetics. **Clinical pharmacokinetics**, v. 54, n. 2, p. 209-219, 2015.

HSIAO, Yi-Tse, et al. "Effect of cannabidiol on sleep disruption induced by the repeated combination tests consisting of open field and elevated plus-maze in rats." **Neuropharmacology** 62, no. 1 (2012): 373-384.

HUESTIS, M. A. Pharmacokinetics and metabolism of the plant cannabinoids,  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol, cannabidiol and cannabinol. **Cannabinoids**, p. 657-690, 2005.

HUESTIS, Marilyn A. Human cannabinoid pharmacokinetics. **Chemistry & biodiversity**, v. 4, n. 8, p. 1770, 2007.

IMHOF, Jania T. et al. Influence of gender and age on performance of rats in the elevated plus maze apparatus. **Behavioural brain research**, v. 56, n. 2, p. 177-180, 1993.

IZGELOV, Dvora et al. Pharmacokinetic investigation of synthetic cannabidiol oral formulations in healthy volunteers. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 154, p. 108-115, 2020.

JESUS, Carlos Henrique Alves et al. Cannabidiol attenuates mechanical allodynia in streptozotocin-induced diabetic rats via serotonergic system activation through 5-HT1A receptors. **Brain Research**, v. 1715, p. 156-164, 2019.

JOHNSTON, Amanda L.; FILE, Sandra E. Sex differences in animal tests of anxiety. **Physiology & behavior**, v. 49, n. 2, p. 245-250, 1991.

JURKUS, Regimantas et al. Cannabidiol regulation of learned fear: implications for treating anxiety-related disorders. **Frontiers in pharmacology**, v. 7, p. 454, 2016.

KASTEN, Chelsea R.; ZHANG, Yanping; BOEHM, Stephen L. Acute cannabinoids produce robust anxiety-like and locomotor effects in mice, but long-term consequences are age-and sex-dependent. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 13, p. 32, 2019.

KINTZ, Pascal. Vaping Pure Cannabidiol e-Cigarettes Does Not Produce Detectable Amount of  $\Delta$  9-THC in Human Blood. **Journal of analytical toxicology**, v. 44, n. 9, p. e1-e2, 2020.

KRUK-SLOMKA, Marta et al. Endocannabinoid system: the direct and indirect involvement in the memory and learning processes—a short review. **Molecular neurobiology**, v. 54, n. 10, p. 8332-8347, 2017.

LACHENMEIER, Dirk W., et al "Are side effects of cannabidiol (CBD) products caused by tetrahydrocannabinol (THC) contamination?" *F1000Research* 8 (2019).

LANDMARK, Cecilie Johannessen; BRANDL, Ulrich. Pharmacology and drug interactions of cannabinoids. **Epileptic Disorders**, v. 22, p. S16-S22, 2020.

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, 2015.

LEDOUX, Joseph E. Emotion circuits in the brain. **Annual review of neuroscience**, v. 23, n. 1, p. 155-184, 2000.

LEE, Jonathan LC; NADER, Karim; SCHILLER, Daniela. An update on memory reconsolidation updating. **Trends in cognitive sciences**, v. 21, n. 7, p. 531-545, 2017.

LEE, Jonathan LC; FLAVELL, Charlotte R. Inhibition and enhancement of contextual fear memory destabilization. **Frontiers in behavioral neuroscience**, v. 8, p. 144, 2014.

LE MOS, José Inácio; RESSEL, Leonardo Barbosa; GUIMARÃES, Francisco Silveira. Involvement of the prelimbic prefrontal cortex on cannabidiol-induced attenuation of contextual conditioned fear in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 207, n. 1, p. 105-111, 2010.

LEVIN, Raquel et al. Antipsychotic profile of cannabidiol and rimonabant in an animal model of emotional context processing in schizophrenia. **Current pharmaceutical design**, v. 18, n. 32, p. 4960-4965, 2012.

LIGRESTI, Alessia et al. Antitumor activity of plant cannabinoids with emphasis on the effect of cannabidiol on human breast carcinoma. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 318, n. 3, p. 1375-1387, 2006.

LIGRESTI, Alessia; DE PETROCELLIS, Luciano; DI MARZO, Vincenzo. From phytocannabinoids to cannabinoid receptors and endocannabinoids: pleiotropic physiological and pathological roles through complex pharmacology. **Physiological reviews**, v. 96, n. 4, p. 1593-1659, 2016.

LI, Yong; KIM, Jimok. CB2 cannabinoid receptor knockout in mice impairs contextual long-term memory and enhances spatial working memory. **Neural plasticity**, v. 2016, 2016.

LIN, Lin et al. Quantitation of  $\Delta^8$ -THC,  $\Delta^9$ -THC, Cannabidiol and 10 Other Cannabinoids and Metabolites in Oral Fluid by HPLC-MS-MS. **Journal of Analytical Toxicology**, 2020.

LISBOA, Sabrina F. et al. Tempering aversive/traumatic memories with cannabinoids: a review of evidence from animal and human studies. **Psychopharmacology**, v. 236, n. 1, p. 201-226, 2019.

LIU, Junhan; SCOTT, Brian W.; BURNHAM, W. M. Effects of cannabidiol and  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol in the elevated plus maze in mice. **Behavioural pharmacology**, 2021.

LU, Hui-Chen; MACKIE, Ken. Review of the endocannabinoid system. **Biological Psychiatry: Cognitive Neuroscience and Neuroimaging**, 2020.

LUNARDI, Paula et al. Effect of the endocannabinoid system in memory updating and forgetting. **Neuroscience**, v. 444, p. 33-42, 2020.

LUTZ, Beat et al. The endocannabinoid system in guarding against fear, anxiety and stress. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 16, n. 12, p. 705-718, 2015.

MARCONDES, Fernanda Klein et al. Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze test. **Physiology & behavior**, v. 74, n. 4-5, p. 435-440, 2001.

MAREN, Stephen; DE OCA, Beatrice; FANSELOW, Michael S. "Sex differences in hippocampal long-term potentiation (LTP) and Pavlovian fear conditioning in rats: positive correlation between LTP and contextual learning". **Brain research**, v. 661, n. 1, p. 25-34, 1994.

MAREN, Stephen; PHAN, K. Luan; LIBERZON, Israel. The contextual brain: implications for fear conditioning, extinction and psychopathology. **Nature reviews neuroscience**, v. 14, n. 6, p. 417-428, 2013.

MARIN, Fernanda Navarro et al. Taking advantage of fear generalization-associated destabilization to attenuate the underlying memory via reconsolidation intervention. **Neuropharmacology**, v. 181, p. 108338, 2020.

MARINHO, A. L. Z., et al. "Effects of intra-infralimbic prefrontal cortex injections of cannabidiol in the modulation of emotional behaviors in rats: contribution of 5HT1A receptors and stressful experiences." **Behavioural brain research** 286 (2015): 49-56

MARKUS, Etan J.; ZECEVIC, Maja. "Sex differences and estrous cycle changes in hippocampus-dependent fear conditioning". **Psychobiology**, v. 25, n. 3, p. 246-252, 1997.

MARSICANO, Giovanni; LAFENÊTRE, Pauline. Roles of the endocannabinoid system in learning and memory. **Behavioral neurobiology of the endocannabinoid system**, p. 201-230, 2009.

MCCARTNEY, Danielle et al. Cannabidiol and sports performance: a narrative review of relevant evidence and recommendations for future research. **Sports Medicine-Open**, v. 6, n. 1, p. 1-18, 2020.

MCGAUGH, James L. Memory--a century of consolidation. **Science**, v. 287, n. 5451, p. 248-251, 2000.

MCNEMAR, Quinn; STONE, Calvin P. Sex differences in rats on three learning tasks. **Journal of Comparative Psychology**, v. 14, n. 1, p. 171, 1932.

MCPARTLAND, John M. et al. Are cannabidiol and  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabivarin negative modulators of the endocannabinoid system? A systematic review. **British journal of pharmacology**, v. 172, n. 3, p. 737-753, 2015

MECHOULAM, Raphael; PARKER, Linda A.; GALLILY, Ruth. Cannabidiol: an overview of some pharmacological aspects. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 42, n. S1, p. 11S-19S, 2002.

MECHOULAM, R., and Y. Shvo. "Hashish—I: the structure of cannabidiol. **tetrahedron** v.19, n. 12 p. 2073-2078, 1963.

MECHOULAM, Raphael et al. Early phytocannabinoid chemistry to endocannabinoids and beyond. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 15, n. 11, p. 757-764, 2014.

MERRICK, John, et al. "Identification of psychoactive degradants of cannabidiol in simulated gastric and physiological fluid." **Cannabis and Cannabinoid Research** 1, no. 1 (2016): 102-112.

MILLAR, Sophie A. et al. A systematic review on the pharmacokinetics of cannabidiol in humans. **Frontiers in pharmacology**, v. 9, p. 1365, 2018.

MILLAR, Sophie A. et al. Towards better delivery of cannabidiol (CBD). **Pharmaceuticals**, v. 13, n. 9, p. 219, 2020.

MILTON, Amy L.; LEE, Jonathan LC; EVERITT, Barry J. Reconsolidation of appetitive memories for both natural and drug reinforcement is dependent on  $\beta$ -adrenergic receptors. **Learning & memory**, v. 15, n. 2, p. 88-92, 2008.

MONTI, Roque I. Ferrer et al. A comparison of behavioral and pharmacological interventions to attenuate reactivated fear memories. **Learning & memory**, v. 24, n. 8, p. 369-374, 2017.

MOREIRA, Fabrício A.; GUIMARÃES, Francisco S. Cannabidiol inhibits the hyperlocomotion induced by psychotomimetic drugs in mice. **European journal of pharmacology**, v. 512, n. 2-3, p. 199-205, 2005.

MOREIRA, Fabrício A.; AGUIAR, Daniele C.; GUIMARÃES, Francisco S. Anxiolytic-like effect of cannabidiol in the rat Vogel conflict test. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 30, n. 8, p. 1466-1471, 2006.

MORENA, Maria; CAMPOLONGO, Patrizia. The endocannabinoid system: an emotional buffer in the modulation of memory function. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 112, p. 30-43, 2014.

MUNRO, Sean; THOMAS, Kerrie L.; ABU-SHAAR, Muna. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. **Nature**, v. 365, n. 6441, p. 61-65, 1993.

NAIK, Heli; TROJIAN, Thomas H. Therapeutic Potential for Cannabinoids in Sports Medicine: Current Literature Review. **Current Sports Medicine Reports**, v. 20, n. 7, p. 345-350, 2021.

NARDO, Mirella, Plinio C. Casarotto, Felipe V. Gomes, and Francisco S. Guimaraes. "Cannabidiol reverses the mCPP-induced increase in marble-burying behavior." **Fundamental & clinical pharmacology** 28, no. 5 (2014): 544-550.

NELSON, Kathryn M. et al. The essential medicinal chemistry of cannabidiol (CBD). **Journal of medicinal chemistry**, v. 63, n. 21, p. 12137-12155, 2020.

NEY, Luke John et al. "Modulation of the endocannabinoid system by sex hormones: Implications for posttraumatic stress disorder". **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 94, p. 302-320, 2018.

NOMIKOS, George G.; SPYRAKI, Christina. Influence of oestrogen on spontaneous and diazepam-induced exploration of rats in an elevated plus maze. **Neuropharmacology**, v. 27, n. 7, p. 691-696, 1988.

NORRIS, Christopher et al. Cannabidiol modulates fear memory formation through interactions with serotonergic transmission in the mesolimbic system. **Neuropsychopharmacology**, v. 41, n. 12, p. 2839-2850, 2016.

ONAIVI, Emmanuel S., et al. "Discovery of the presence and functional expression of cannabinoid CB2 receptors in brain." **Annals of the New York Academy of Sciences** 1074, no. 1 (2006): 514-536.

O'BRIEN, Lesley D. et al. "CB1 receptor antagonism in the granular insular cortex or somatosensory area facilitates consolidation of object recognition memory". **Neuroscience Letters**, v. 578, p. 192-196, 2014.

OHLSSON, Agneta et al. "Single-dose kinetics of deuterium-labelled cannabidiol in man after smoking and intravenous administration". **Biomedical & environmental mass spectrometry**, v. 13, n. 2, p. 77-83, 1986.

ORTEGA-ALVARO, Antonio et al. "Deletion of CB2 cannabinoid receptor induces schizophrenia-related behaviors in mice". **Neuropsychopharmacology**, v. 36, n. 7, p. 1489-1504, 2011.

OVIEDO, Angelica; GLOWA, John; HERKENHAM, Miles. Chronic cannabinoid administration alters cannabinoid receptor binding in rat brain: a quantitative autoradiographic study. **Brain research**, v. 616, n. 1-2, p. 293-302, 1993.

PACHER, Pal; KOGAN, Natalya M.; MECHOULAM, Raphael. "Beyond THC and endocannabinoids". **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 60, p. 637-659, 2020.

PATEL, Sachin et al. "The endocannabinoid system as a target for novel anxiolytic drugs". **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 76, p. 56-66, 2017.

PAVLOV, I. P. Conditioned reflexes: London: **Oxford UP**. 1927.

PISANTI, Simona et al. "Cannabidiol: State of the art and new challenges for therapeutic applications". **Pharmacology & therapeutics**, v. 175, p. 133-150, 2017.

PELLOW, Sharon et al. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of neuroscience methods**, v. 14, n. 3, p. 149-167, 1985.

PERTWEE, R. et al. "The diverse CB1 and CB2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids:  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol, cannabidiol and  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabivarin". **British journal of pharmacology**, v. 153, n. 2, p. 199-215, 2008.

PERUCCA, Emilio; BIALER, Meir. "Critical aspects affecting cannabidiol oral bioavailability and metabolic elimination, and related clinical implications". **CNS drugs**, v. 34, p. 795-800, 2020.

PETITET, François, et al. "Complex pharmacology of natural cannabinoids: Evidence for partial agonist activity of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol and antagonist activity of cannabidiol on rat brain cannabinoid receptors." *Life sciences* 63, no. 1 (1998): PL1-PL6.

PRENDERGAST, Brian J.; ONISHI, Kenneth G.; ZUCKER, Irving. Female mice liberated for inclusion in neuroscience and biomedical research. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 40, p. 1-5, 2014

PRZYBYSLAWSKI, Jean; ROULLET, Pascal; SARA, Susan J. "Attenuation of emotional and nonemotional memories after their reactivation: Role of  $\beta$  adrenergic receptors". **Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 15, p. 6623-6628, 1999.

RADISKE, Andressa et al. "mTOR inhibition impairs extinction memory reconsolidation". **Learning & Memory**, v. 28, n. 1, p. 1-6, 2021.

RAYMUNDI, Ana Maria et al. "A time-dependent contribution of hippocampal CB1, CB2 and PPAR $\gamma$  receptors to cannabidiol-induced disruption of fear memory consolidation". **British Journal of Pharmacology**, v. 177, n. 4, p. 945-957, 2020.

RESCORLA, Robert A.; HETH, C. Donald. Reinstatement of fear to an extinguished conditioned stimulus. **Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes**, v. 1, n. 1, p. 88, 1975.

RESSTEL, L. B. M. et al. "Involvement of medial prefrontal cortex neurons in behavioral and cardiovascular responses to contextual fear conditioning". **Neuroscience**, v. 143, n. 2, p. 377-385, 2006.

RESSTEL, Leonardo BM et al. "5-HT1A receptors are involved in the cannabidiol-induced attenuation of behavioural and cardiovascular responses to acute restraint stress in rats". **British journal of pharmacology**, v. 156, n. 1, p. 181-188, 2009.

ROBERTSON, James M. et al. "Anxious behavior induces elevated hippocampal Cb2 receptor gene expression". **Neuroscience**, v. 352, p. 273-284, 2017.

ROSSIGNOLI, Matheus Teixeira et al. "Selective post-training time window for memory consolidation interference of cannabidiol into the prefrontal cortex: reduced dopaminergic modulation and immediate gene expression in limbic circuits". **Neuroscience**, v. 350, p. 85-93, 2017

RUSSO, Ethan B. et al. "Agonistic properties of cannabidiol at 5-HT1a receptors". **Neurochemical research**, v. 30, n. 8, p. 1037-1043, 2005.

RYBERG, E. et al. "The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor". **British journal of pharmacology**, v. 152, n. 7, p. 1092-1101, 2007.

SANTANA, Fabiana et al. "Involvement of the infralimbic cortex and CA1 hippocampal area in reconsolidation of a contextual fear memory through CB1 receptors: effects of CP55", 940. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 127, p. 42-47, 2016.

SALVIATO, Beatriz Zanutto et al. Female but not male rats show biphasic effects of low doses of  $\Delta$ 9-tetrahydrocannabinol on anxiety: can cannabidiol interfere with these effects? **Neuropharmacology**, v. 196, p. 108684, 2021.



SCARANTE, Franciele F. et al. "Cannabinoid modulation of the stressed hippocampus". **Frontiers in molecular neuroscience**, v. 10, p. 411, 2017.

SILVA, Rafael Scoz et al. "Papel dos receptores canabinoides do tipo 2 hipocampais na modulação das memórias traumáticas". 2018.

SPIACCI, Gabriela BL et al. "Dorsal hippocampus cannabinoid type 1 receptors modulate the expression of contextual fear conditioning in rats: Involvement of local glutamatergic/nitroergic and GABAergic neurotransmissions". **European Neuropsychopharmacology**, v. 26, n. 10, p. 1579-1589, 2016.

SHARP, Trevor; BARNES, Nicholas M. "Central 5-HT receptors and their function; present and future". **Neuropharmacology**, v. 177, p. 108155, 2020.

SCHROYENS, Natalie et al. "Limited replicability of drug-induced amnesia after contextual fear memory retrieval in rats". **Neurobiology of learning and memory**, v. 166, p. 107105, 2019.

SCHROYENS, Natalie; BECKERS, Tom; KINDT, Merel. "In search for boundary conditions of reconsolidation: a failure of fear memory interference". **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 11, p. 65, 2017

SILVESTRO, Serena et al. "Molecular targets of cannabidiol in experimental models of neurological disease". **Molecules**, v. 25, n. 21, p. 5186, 2020.

SKELLEY, Jessica W. et al. "Use of cannabidiol in anxiety and anxiety-related disorders". **Journal of the American Pharmacists Association**, v. 60, n. 1, p. 253-261, 2020.

STEMERDING, Lotte E. et al. "Demarcating the boundary conditions of memory reconsolidation: An unsuccessful replication". **Scientific reports**, v. 12, n. 1, p. 1-13, 2022.

SHAHBAZI, Fred et al. "Cannabinoids and cannabinoid receptors: the story so far". **Iscience**, p. 101301, 2020.

SHANSKY, Rebecca M. "Are hormones a "female problem" for animal research?". **Science**, v. 364, n. 6443, p. 825-826, 2019.

SHANSKY, Rebecca M. "Sex differences in behavioral strategies: avoiding interpretational pitfalls". **Current opinion in neurobiology**, v. 49, p. 95-98, 2018.

SHANSKY, Rebecca M. Sex differences in amygdala structure and function: From rodents to humans. In: **Handbook of Behavioral Neuroscience**. Elsevier, 2020. p. 275-284.

SHANSKY, Rebecca M.; MURPHY, Anne Z. "Considering sex as a biological variable will require a global shift in science culture". **Nature neuroscience**, v. 24, n. 4, p. 457-464, 2021.

SILMORE, Lucy H. et al. "Food effects on the formulation, dosing, and administration of cannabidiol (CBD) in humans: A systematic review of clinical

studies". **Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy**, v. 41, n. 4, p. 405-420, 2021.

SPINDLE, Tory R. et al. "Urinary pharmacokinetic profile of cannabinoids following administration of vaporized and oral cannabidiol and vaporized CBD-dominant cannabis". **Journal of analytical toxicology**, v. 44, n. 2, p. 109-125, 2020.

STEMPEL, A. Vanessa et al. "Cannabinoid type 2 receptors mediate a cell type-specific plasticity in the hippocampus". **Neuron**, v. 90, n. 4, p. 795-809, 2016.

STINCHCOMB, A. L., Valiveti, S., Hammell, D. C., & Ramsey, D. R. (2004). Human skin permeation of  $\Delta$ 8-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and cannabinol. **Journal of pharmacy and pharmacology**, 56(3), 291-297.

SOETER, Marieke; KINDT, Merel. "Disrupting reconsolidation: pharmacological and behavioral manipulations". **Learning & Memory**, v. 18, n. 6, p. 357-366, 2011.

TAXIER, Lisa R.; GROSS, Kellie S.; FRICK, Karyn M. Oestradiol as a neuromodulator of learning and memory. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 21, n. 10, p. 535-550, 2020

THAM, Mylyne et al. Allosteric and orthosteric pharmacology of cannabidiol and cannabidiol-dimethylheptyl at the type 1 and type 2 cannabinoid receptors. **British journal of pharmacology**, v. 176, n. 10, p. 1455-1469, 2019.

THOMAS, Brian F., et al "Comparative receptor binding analyses of cannabinoid agonists and antagonists." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 285, no. 1 (1998): 285-292.

THOMAS, Adele et al. Cannabidiol displays unexpectedly high potency as an antagonist of CB1 and CB2 receptor agonists in vitro. **British journal of pharmacology**, v. 150, n. 5, p. 613-623, 2007.

TROYNER, Fernanda; BERTOGLIO, Leandro Jose. "Thalamic nucleus reuniens regulates fear memory destabilization upon retrieval". **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 175, p. 107313, 2020.

TODD, S. M., and J. C. Arnold. "Neural correlates of interactions between cannabidiol and  $\Delta$ 9-tetrahydrocannabinol in mice: implications for medical cannabis." **British journal of pharmacology** 173, no. 1 (2016): 53-65.

TSOU, K. et al. "Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system". **Neuroscience**, v. 83, n. 2, p. 393-411, 1998.

TULVING, Endel. Euphoric processes in episodic memory. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences**, v. 302, n. 1110, p. 361-371, 1983.

TWARDOWSCHY, André, et al. "The role of 5-HT<sub>1A</sub> receptors in the anti-aversive effects of cannabidiol on panic attack-like behaviors evoked in the presence of the wild snake *Epicrates cenchria crassus* (Reptilia, Boidae)." **Journal of psychopharmacology** 27, no. 12 (2013): 1149-1159.

UJVÁRY, István; HANUŠ, Lumír. "Human metabolites of cannabidiol: a review on their formation, biological activity, and relevance in therapy". **Cannabis and cannabinoid research**, v. 1, n. 1, p. 90-101, 2016.

VAVERKOVÁ, Zuzana; MILTON, Amy L.; MERLO, Emiliano. Retrieval-dependent mechanisms affecting emotional memory persistence: reconsolidation, extinction, and the space in between. **Frontiers**

VILARÓ, M. T. et al. "Distribution of 5-HT receptors in the central nervous system: an update". In: **Handbook of Behavioral Neuroscience**. Elsevier, 2020. p. 121-146.

VISVANATHAR, Robin et al. "Hippocampal CB<sub>2</sub> receptors: an untold story". **Reviews in the Neurosciences**, 2021.

WALF, Alicia A.; FRYE, Cheryl A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. **Nature protocols**, v. 2, n. 2, p. 322-328, 2007.

WATANABE, K., et al. "Conversion of cannabidiol to  $\Delta$  9-tetrahydrocannabinol and related cannabinoids in artificial gastric juice, and their pharmacological effects in mice". **Forensic Toxicology**, 25(1), 16-21, 2007.

WOLF, Carl E.; POKLIS, Justin L.; POKLIS, Alphonse. "Stability of tetrahydrocannabinol and cannabidiol in prepared quality control edible brownies". **Journal of analytical toxicology**, v. 41, n. 2, p. 153-157, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. "Cannabidiol (CBD) pre-review report". **Meet Pre-Review Rep**, p. 6-10, 2017.

WRAY, Louise et al. "Cannabidiol does not convert to  $\Delta$ 9-tetrahydrocannabinol in an in vivo animal model". **Cannabis and cannabinoid research**, v. 2, n. 1, p. 282-287, 2017.

ZHANG, J. Jane et al. "Limits on lability: Boundaries of reconsolidation and the relationship to metaplasticity". **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 154, p. 78-86, 2018.

ZANELATI, T. V. et al. "Antidepressant-like effects of cannabidiol in mice: possible involvement of 5-HT<sub>1A</sub> receptors". **British journal of pharmacology**, v. 159, n. 1, p. 122-128, 2010.

ZENDULKA, Ondrej et al. "Cannabinoids and cytochrome P450 interactions". **Current drug metabolism**, v. 17, n. 3, p. 206-226, 2016.

ZUARDI, Antônio Waldo et al. "Action of cannabidiol on the anxiety and other effects produced by  $\Delta$ 9-THC in normal subjects. **Psychopharmacology**, v. 76, n. 3, p. 245-250, 1982.

ZUARDI, A.W. "Cannabidiol: from an inactive cannabinoid to a drug with wide spectrum of action". **Brazilian Journal of Psychiatry**, v. 30, p. 271-280, 2008.

ZUARDI, Antônio Waldo et al. "Effects of ipsapirone and cannabidiol on human experimental anxiety". **Journal of psychopharmacology**, v. 7, n. 1\_suppl, p. 82-88, 1993.