



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

Rafael Mariano de Bitencourt

**ADMINISTRAÇÃO DE CANABINÓIDES NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL
FACILITA A EXTINÇÃO DE MEMÓRIAS AVERSIVAS EM RATOS**

Florianópolis – SC

2008



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

Rafael Mariano de Bitencourt

**ADMINISTRAÇÃO DE CANABINÓIDES NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL
FACILITA A EXTINÇÃO DE MEMÓRIAS AVERSIVAS EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Naoto Takahashi

Florianópolis – SC

2008

“I still haven’t found what I’m looking for”

U2

Dedico este trabalho

ao grande Arquiteto da vida, seja ele quem for, por tê-la feito de uma forma perfeitamente imperfeita, nos permitindo algumas dúvidas que nos impulsionam atrás de respostas.

Aos meus pais que muitas vezes abdicaram de seus próprios sonhos para que fossem possíveis os meus.

AGRADECIMENTOS

Aquele a quem a maioria das pessoas se refere como Deus, porém prefiro chamá-lo de o grande “Arquiteto” da vida, visto a trivialidade que o primeiro nome ganhou, muitas vezes se desviando do verdadeiro sentido no qual eu acredito. Obrigado pela energia, força e luz que guia meu caminho, sempre dispensadas quando preciso;

Aos meus pais, Pedro Paulo e Maria da Conceição (Nina), por me conceberem a vida, que não se trata apenas da fecundação de um óvulo pelo espermatozóide, e sim todo amor, carinho, apoio incondicional e ensinamentos exemplares que nunca me faltaram;

Aos meus irmãos, os quais me orgulham muito e que desde cedo aprenderam as virtudes do respeito e da paciência, entendendo que cada um tem sua vez e sabendo esperar quando necessário;

Aos meus avós. Aqueles que já foram, deixando a lembrança e o exemplo de pessoas batalhadoras e humildes; e aos presentes, pelo apoio e demonstração de que o tempo não é necessariamente um inimigo;

A minha namorada Raquel, pela paciência, dedicação, apoio e companheirismo, principalmente nos momentos mais difíceis, dos quais mais precisei dela;

A família da minha namorada que nesses tempos tem se portado como uma segunda família me dando apoio inquestionável sobre cada uma de minhas decisões;

Ao professor Reinaldo, o qual os ensinamentos ultrapassaram os limites da ciência, permitindo-me aprender muito mais do que como ser um bom pesquisador;

A professora Gina e todos os seus alunos da época, Inácio, Maristela, Léo e Fabi, cuja receptividade e apoio foram fundamentais no início da minha empreitada científica;

Ao demais professores do Departamento de Farmacologia os quais, sempre que precisei, mostraram-se bastante dispostos e eficientes, além de servirem como exemplos incentivadores cujos reflexos procuro me espelhar;

Ao colega de laboratório, parceiro deste trabalho e amigo Fabrício A. Pamplona pela colaboração, sugestões e críticas sempre bastante pertinentes e que certamente contribuíram (e continuam contribuindo) de forma perspicaz para o desenvolvimento deste estudo;

Aos colegas de laboratório e amigos Pablo, Daniel, Pamplona, Assini, Aderbal, Meigy, Vanessa e Cris e aos ex-colegas Rui, Leandro e Luciano pela amizade, companheirismo e momentos de descontração imprescindíveis para uma boa convivência no laboratório e, conseqüentemente, para que o trabalho pudesse fluir da melhor maneira possível.

Ao colega do Departamento Filipe S. Duarte pelas várias ajudas nos cálculos de diluição de drogas bem como no fornecimento da dose exata do diazepam utilizado nos experimentos do LCE potencializado pelo medo;

Aos demais colegas do Departamento e também colegas de “futeba” Rimenez, Gilliard, Fabrício, Pamplona, Daniel, Geison, Jarbas, Eduardo, Rodrigo, Rui e Francisney pelos bons

momentos de “cerva” que sucedem os não tão bons jogos de “futeba” os quais serviram, principalmente, para não deixar dúvidas sobre a carreira escolhida e mostrar a todos que são ótimos pesquisadores quando vistos jogando futebol;

A “família” do Juriti 301, aos integrantes atuais Gilliard “gillidói”, Murilo “morcego”, Gustavo “Finarde” e aos que já passaram Rimenez “careca”, Fabrício “calvício”, Leonardo “espagete”, Guilherme “blush”, por todos os momentos até aqui compartilhados, bons e ruins, por se portarem como família nos momentos difíceis e como grande amigos nos momentos felizes;

Aos funcionários do Departamento Pedro, Redna, Rita e Diana sempre prestativos e sem medir esforços para atender-me nos momentos que precisei;

Enfim, a todas as pessoas e amigos, muitos não citados, que de uma maneira ou de outra acabam contribuindo para que eu vá cada vez mais adiante;

A Sanofi-Aventis, por ter gentilmente doado uma das drogas utilizadas neste estudo;

A CAPES pelo apoio financeiro, fundamental para que eu pudesse desenvolver este trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIACÕES	XI
LISTA DE FIGURAS	XIII
RESUMO	XV
ABSTRACT	XVI
1 - INTRODUÇÃO	01
1.1 - Aspectos históricos e uso da <i>Cannabis Sativa</i>	01
1.2 - A descoberta do sistema endocanabinóide	03
1.3 - Desenvolvimento e caracterização farmacológica de ligantes para os receptores canabinóides	07
1.4 - O sistema endocanabinóide como alvo terapêutico em condições fisiopatológicas	08
1.5 - Comportamento defensivo, memórias aversivas e o modelo animal de extinção do condicionamento aversivo	10
2 - OBJETIVOS	15
2.1 - Objetivo geral	15
2.2 - Objetivos específicos	15
3 - MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1 - Animais	16
3.2 - Drogas	16
3.3 - Cirurgia estereotáxica	17

3.4 - Procedimento de infusão	18
3.5 - Procedimentos comportamentais	19
3.5.1 - Condicionamento aversivo contextual	19
3.5.1.1 - <i>Experimento 1: Efeitos da administração i.c.v. de AM404 na extinção do CA contextual</i>	20
3.5.1.2 - <i>Experimento 2: Efeitos da administração i.c.v. de CBD na extinção do CA contextual</i>	21
3.5.1.3 - <i>Experimento 3: Participação dos receptores canabinóides CB₁ nos efeitos do AM404</i>	21
3.5.1.4 - <i>Experimento 4: Participação dos receptores CB₁ nos efeitos do CBD</i>	22
3.5.1.5 - <i>Experimento 5: Participação dos receptores vanilóides TRPV₁ nos efeitos do AM404</i>	22
3.5.1.6 - <i>Experimento 6: Participação dos receptores TRPV₁ nos efeitos do CBD</i>	23
3.5.2 - Labirinto em cruz elevado	24
3.5.2.1 - <i>Experimento 7: Efeitos do AM404, CBD e DZP no LCE potencializado pelo medo</i>	24
3.6 - Perfusão e histologia	25
3.7 - Análise gráfica e estatística	26
4 - RESULTADOS	28
4.1 - Condicionamento aversivo contextual	28
4.1.1 - <i>Experimento 1: Efeitos da administração i.c.v. de AM404 na extinção do CA contextual</i>	28

4.1.2 - <i>Experimento 2: Efeitos da administração i.c.v. de CBD na extinção do CA contextual</i>	30
4.1.3. - <i>Experimento 3: Participação dos receptores canabinóides CB₁ nos efeitos facilitatórios do AM404</i>	32
4.1.4 - <i>Experimento 4: Participação dos receptores CB₁ nos efeitos facilitatórios do CBD</i>	34
4.1.5 - <i>Experimento 5: Participação dos receptores vanilóides TRPV₁ nos efeitos facilitatórios do</i>	36
4.1.6 - <i>Experimento 6: Participação dos receptores TRPV₁ nos efeitos facilitatórios do CBD</i>	38
4.2 - Labirinto em cruz levado.....	40
4.2.1 - <i>Experimento 7: Efeitos do AM404, CBD e DZP no LCE potencializado pelo medo</i>	41
5 - DISCUSSÃO	44
6 - CONCLUSÕES	56
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

LISTA DE ABREVIACÕES

Δ^9 -THC - Δ^9 - tetrahidrocanabinol

2-AG - 2-araquidonilglicerol

a.C - antes de Cristo

AMPc - adenosina monofasfato cíclica

ANOVA - análise de variância

AP - anteroposterior

BLA - amígdala basolateral

CA - condicionamento aversivo

CBD - canabidiol

CEUA - Comitê de Ética Para o Uso de Animais

CPZ - capsazepina

DV - dorso ventral

E.P.M. - erro padrão da média

EC - estímulo condicionado

eCB - endocanabinóide

EI - estímulo incondicionado aversivo

EUA - Estados Unidos da América

FAAH - amido hidrolase de ácidos graxos

GABA - ácido δ -amino-butírico

i.c.v. - intracerebroventricular

i.p. - intraperitoneal

LCE - labirinto em cruz levado

LTD - depressão de longa duração

LTP - potenciação de longa duração

ML - médio lateral

RNAm - ácido ribonucléico

SNC - sistema nervoso central

UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Breve histórico dos registros de uso da <i>Cannabis</i> em todo o mundo.....	02
Figura 2 - Breve histórico dos avanços na investigação sobre os mecanismos de ação dos canabinóides.....	04
Figura 3 - Representação esquemática do sistema endocanabinóide nos neurônios pré- e pós-sinápticos.....	06
Figura 4 - Representação esquemática do procedimento realizado no experimento 1.....	20
Figura 5 - Representação esquemática do procedimento realizado no experimento 2.....	21
Figura 6 - Representação esquemática do procedimento realizado no experimento 3.....	22
Figura 7 - Representação esquemática do procedimento realizado no experimento 4.....	22
Figura 8 - Representação esquemática do procedimento realizado no experimento 5.....	23
Figura 9 - Representação esquemática do procedimento realizado no experimento 6.....	23
Figura 10 - Representação esquemática do procedimento realizado no experimento 7.....	25
Figura 11 – Efeitos da administração i.c.v. de AM404 (0,2; 1,0; 2,0 µg/µl) na extinção do CA contextual.....	30
Figura 12 – Efeitos da administração i.c.v. de CBD (0,2; 1,0; 2,0 µg/µl) na extinção do CA contextual.....	32
Figura 13 – Efeitos do antagonista dos receptores canabinóides CB ₁ SR141716A (0,2 mg/kg; i.p.) nos efeitos facilitatórios do AM404 (1,0 µg/µl; i.c.v.).....	34

Figura 14 - Efeitos do antagonista SR141716A (0,2 mg/kg; i.p.) nos efeitos facilitatórios do CBD (2,0 µg/µl; i.c.v).....	36
Figura 15 - Efeitos do antagonista dos receptores vanilóides TRPV ₁ CPZ (5,0 µg/µl; i.c.v.) nos efeitos facilitatórios do AM404 (1,0 µg/µl; i.c.v).....	38
Figura 16 - Efeitos do antagonista CPZ (5,0 µg/µl; i.c.v.) nos efeitos facilitatórios do CBD (2,0 µg/µl; i.c.v).....	40
Figura 17 – Efeitos da administração i.c.v. de AM404 (1,0 µg/µl), CBD (2,0 µg/µl) e DZP (2,85 µg/µl) no LCE potencializado pelo medo.....	43

RESUMO

Recentemente, estudos têm demonstrado a capacidade do sistema endocanabinóide (eCB) em modular estados emocionais e a extinção de memórias aversivas em animais. Em um estudo pioneiro foi demonstrada a liberação de eCB no cérebro de camundongos durante a extinção do condicionamento aversivo (CA), destacando a influência que manipulações farmacológicas do sistema eCB poderiam exercer sobre as memórias aversivas. Sendo assim, o aumento da transmissão eCB, por inibição da sua recaptação e/ou metabolismo, parece ser uma alternativa farmacológica bastante interessante. Além do mais, acredita-se que o canabidiol (CBD), um fitocanabinóide não-psicotomimético, possa agir inibindo a recaptação e degradação de anandamida, aumentando seus níveis endógenos em áreas específicas do cérebro. Portanto, o objetivo deste trabalho foi comparar os efeitos da administração intracerebroventricular (i.c.v.) de AM 404, um inibidor da recaptação de anandamida, e CBD, na extinção do CA. Ratos Wistar machos adultos foram condicionados e 24 h após o condicionamento foram injetados i.c.v. com AM404 (0,2; 1,0; 2,0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) ou CBD (0,2; 1,0; 2,0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) e submetidos a três sessões de extinção. Cada sessão constituiu de uma exposição de 9 min à gaiola de condicionamento (total de 3 exposições com intervalo de 24 h). Um teste adicional de 3 min, na ausência de drogas, foi realizado 24 h após a última sessão de extinção no intuito de verificar a persistência de um possível efeito das drogas sobre a extinção do CA. A administração i.c.v. de AM404 (1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) e CBD (2,0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) facilitou a extinção do CA contextual, sendo que estes efeitos prevaleceram mesmo nos testes sem droga realizados após a última sessão de extinção. Estes efeitos foram revertidos pela administração prévia do antagonista dos receptores CB_1 , SR141716A (0.2 mg/kg, i.p.), mas não pelo antagonista dos receptores VR_1 , capsazepina (CPZ) (5,0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, i.c.v.), sugerindo então o envolvimento dos receptores canabinóides CB_1 nos efeitos facilitatórios destas drogas sobre a extinção do CA contextual. Efeitos do tipo ansiolítico não parecem ter contribuído de forma direta para os efeitos facilitatórios do AM404 e do CBD sobre a extinção do CA contextual, visto a ausência de efeitos nos animais “naïve” expostos ao LCE, porém, podem ter contribuído de uma forma indireta, como sugerida pelos efeitos anti-ansiossênicos destas drogas observados no teste do LCE potencializado pelo medo. Visto que o CBD e AM404 podem estar interferindo com a recaptação de eCB, este trabalho sugere que o aumento dos níveis de endocanabinóides por inibidores da recaptação pode constituir uma estratégia original para o tratamento de transtornos emocionais relacionados à recordação de eventos traumáticos.

ABSTRACT

Fear conditioning models are useful to study aversive memories, which play a role in anxiety disorders such as the posttraumatic stress. In contextual fear conditioning, the animal is shocked in a conditioning chamber, so that context re-exposure elicits freezing behavior. Repeated non-reinforced context re-exposures results in progressive decrease of freezing (i.e. conditioned-fear extinction). Recently, studies have suggested an important role of the endocannabinoids (eCB) system in modulation of emotional states and extinction of aversive memories in animals. More specifically, it was reported that knockout mice for the CB₁ cannabinoid receptor showed impaired extinction of fear memories, highlighting the influence of the pharmacological manipulation of the endocannabinoid system on the aversive memories. Particularly, the enhancement of eCB transmission by inhibition of uptake/metabolism seems to be an interesting pharmacological approach. Moreover, it is believed that the cannabidiol (CBD), a non psychomimetic phytocannabinoid, might inhibit the eCB uptake, increasing their endogenous levels in specific brains areas. Hence, the aim of the present study was to investigate the central effects of the inhibitor of eCB uptake/metabolism, AM404, and the putative inhibitor of eCB uptake, CBD, on extinction of contextual fear memories in rats. Male Wistar rats were conditioned and 24h after injected i.c.v. with AM404 (0.2, 1.0, 2.0 µg/µl) or CBD (0.2, 1.0, 2.0 µg/µl) and subjected to 3 consecutive 9-min non-reinforced exposures to the conditioning context (extinction sessions). A 3-min drug-free test of contextual memory was performed 24h after the last extinction session to investigate long-lasting effects. The i.c.v. injection of AM404 (1.0 µg/µl) and CBD (2.0 µg/µl) facilitated the extinction of contextual fear memory, with long-lasting effects. This response was antagonized by the CB₁-selective antagonist SR141716A (0.2 mg/kg, i.p.), but not by the VR₁-selective antagonist capsazepine (CPZ) (5.0 µg/µl, i.c.v.), therefore suggesting the involvement of CB₁ cannabinoid receptors in the facilitation of extinction by these drugs. Anxiolytic-like effects might have contributed by indirect pathway to the facilitation of extinction, as suggested by an anti-anxiogenic effect in the fear-potentiated plus-maze test. Since CBD and AM404 are thought to interfere with eCB uptake, this work suggest that increasing levels of eCB might constitute new strategy to facilitate extinction of fear memories, thus contributing to reduce behavioral symptoms of anxiety disorders related to unpleasant fear memories.

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - ASPECTOS HISTÓRICOS E USO DA *CANNABIS SATIVA*

A *Cannabis sativa* pode ser a primeira planta não alimentícia cultivada pelo homem. Os primeiros indícios arqueológicos que evidenciam o uso da *Cannabis* datam cerca de 10000 anos atrás, quando fibras do pedúnculo eram utilizadas para a fabricação de cordas e vestuário. Os primeiros registros do uso da *Cannabis* datam cerca de 2700 a.C, quando o “pai da medicina chinesa”, Shen Nung, descreveu o uso da *Cannabis* para tratar várias condições patológicas. Na Índia antiga, o consumo de *Cannabis* desempenhou um papel importante na religião, como descrito no Veda escrito por volta de 2000 a.C. Já o haxixe, preparado a partir da resina da *Cannabis*, é conhecido no mundo árabe desde o século X (para revisão histórica ver Abel, 1980).

Embora a *Cannabis* seja mais conhecida em sociedades ocidentais pelo uso recreativo de suas preparações populares, do tipo maconha e haxixe, seu potencial terapêutico vem sendo cientificamente avaliado desde o século XIX (Childers e Breivogel, 1998; Di Marzo e Petrocellis, 2006). No entanto, no início do século XX, o uso e a pesquisa com *Cannabis* sofreram um considerável declínio, principalmente nos Estados Unidos da América (EUA), devido a questões sócio-políticas. Esta situação ficou ainda mais drástica quando, em 1937, o Congresso Americano criou o decreto de proibição da maconha (Marijuana Tax Act) que banuiu o cultivo, comercialização e uso dos derivados desta planta (Chalsma, Boyum *et al.*, 1994). Estas questões sócio-políticas dificultaram ainda mais os estudos a cerca desta planta e, principalmente, em relação ao seu potencial terapêutico (Di Marzo e Petrocellis, 2006) (figura 1).

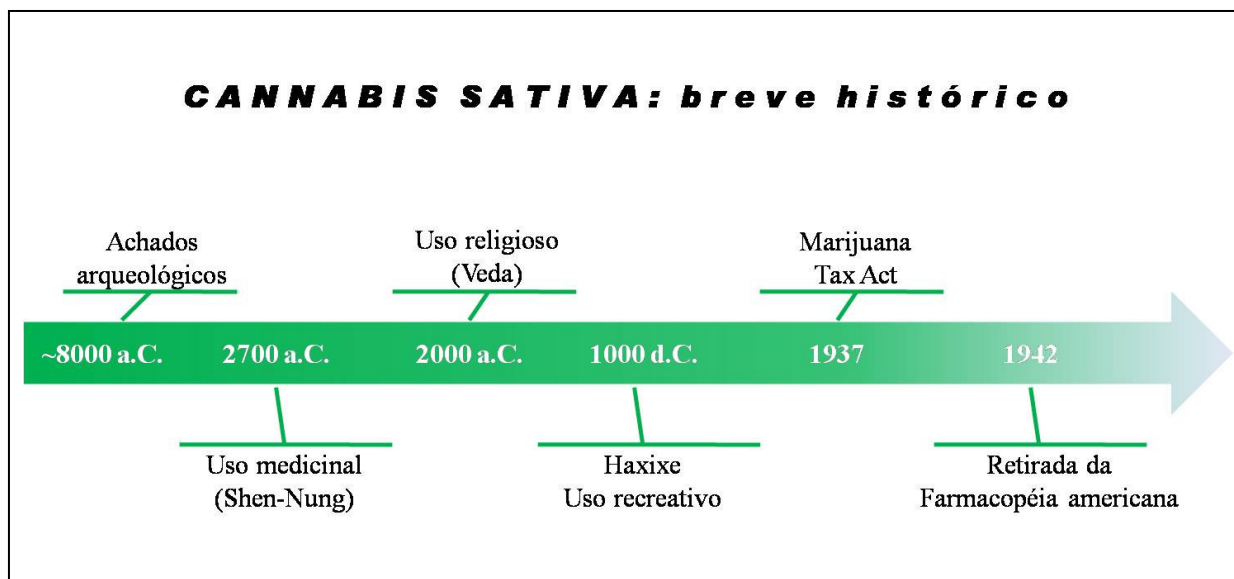


Figura 1 - Breve histórico dos registros de uso da Cannabis em todo o mundo (modificado de Childers e Breivogel, 1998). (a.C.) antes de Cristo.

Mesmo com todos os problemas sócio-políticos envolvendo a planta *Cannabis sativa* ao longo destes anos, os estudos químicos desta planta vêm sendo realizados desde o início do século XIX. Mais de um século de tentativas e erros levaram, primeiramente, a identificação de dois constituintes não psicoativos, canabinol e canabidiol (CBD) e, finalmente, a identificação do maior constituinte psicoativo da *Cannabis*, o Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC), em 1964 pelo pesquisador Mechoulam (Mechoulam e Hanus, 2000; Di Marzo e Petrocellis, 2006). Embora o CBD tenha sido considerado, à primeira vista, como um constituinte não psicoativo, existem evidências experimentais sugerindo o oposto em ambos, tanto em seres humanos (Zuardi, Morais *et al.*, 1995; Crippa, Zuardi *et al.*, 2004) como também em animais (Carlini, Leite *et al.*, 1973; Izquierdo, Orsingher *et al.*, 1973; Consroe e Wolkin, 1977; Leite, Carlini *et al.*, 1982; Moreira, Aguiar *et al.*, 2006; Resstel, Joca *et al.*, 2006). Hoje em dia sabe-se que a *Cannabis* é constituída por pelo menos 66 compostos conhecidos como canabinóides ou fitocannabinóides, sendo destes, geralmente, o Δ^9 -THC e o CDB os mais abundantes na planta (Mechoulam, Shani *et al.*, 1970).

1.2 - A DESCOBERTA DO SISTEMA ENDOCANABINÓIDE (eCB)

Embora vários estudos sugerissem que as ações do Δ^9 -THC estariam relacionadas apenas às alterações de fluidez de membrana biológicas (Hillard, Harris *et al.*, 1985), um grande número de dados farmacológicos indicava uma relação estrutura-atividade específica para os canabinóides, implicando em um possível mecanismo baseado na interação com proteínas receptoras (Dewey, 1986; Childers e Breivogel, 1998).

Evidências da existência de receptores canabinóides só foram confirmadas em meados dos anos 80 quando Howlett demonstrou que os canabinóides inibem a produção de AMPc (adenosina monofosfato cíclica) em cultura de células (Howlett, 1984), sugerindo um sistema de transdução mediado pela ativação de receptores acoplados a proteínas G_i (Howlett e Fleming, 1984; Howlett, 1985; Howlett, Qualy *et al.*, 1986). Este achado foi seguido pelo ensaio de ligação com radioativos (*binding*) para receptores canabinóides (Devane, Dysarz *et al.*, 1988), localização destes receptores (Herkenham, Lynn *et al.*, 1990) e, finalmente, clonagem e seqüenciamento do primeiro receptor canabinóide, denominado CB_1 (Matsuda, Lolait *et al.*, 1990).

Estes receptores são pertencentes à grande família de receptores acoplados a proteína $G_{i/o}$ e parecem controlar de forma negativa a atividade da adenilato ciclase, com conseqüente diminuição dos níveis intracelulares de AMPc (Felder, Briley *et al.*, 1993; Vogel, Barg *et al.*, 1993).

Os receptores CB_1 são expressos predominantemente em tecidos nervosos da periferia e do sistema nervoso central (SNC) e podem ser encontrados em maiores concentrações em fibras axonais, especialmente localizadas em botões terminais de neurônios pré-sinápticos (Katona, Sperlagh *et al.*, 2000). Devido a esta localização, aliado ao fato de atuarem inibindo a adenilato ciclase, estes receptores podem mediar à inibição da liberação de outros neurotransmissores (Pertwee, 2006). A ampla distribuição dos receptores CB_1 lhes confere a

característica de serem os principais mediadores dos efeitos centrais conhecidos dos canabinóides (Howlett, Barth *et al.*, 2002). Estudos mais detalhados mostram que os receptores CB₁ são amplamente encontrados na região da amígdala, principalmente em terminais pré-sinápticos de neurônios GABAérgicos, podendo atuar inibindo esta neurotransmissão nesta região (Marsicano e Lutz, 1999; Azad, Eder *et al.*, 2003). Além do mais, os receptores CB₁ encontrados nesta região parecem estar crucialmente envolvidos no controle de diversos estados emocionais como na extinção de memórias aversivas (Marsicano, Wotjak *et al.*, 2002) (Ver avanços científicos na figura 2).

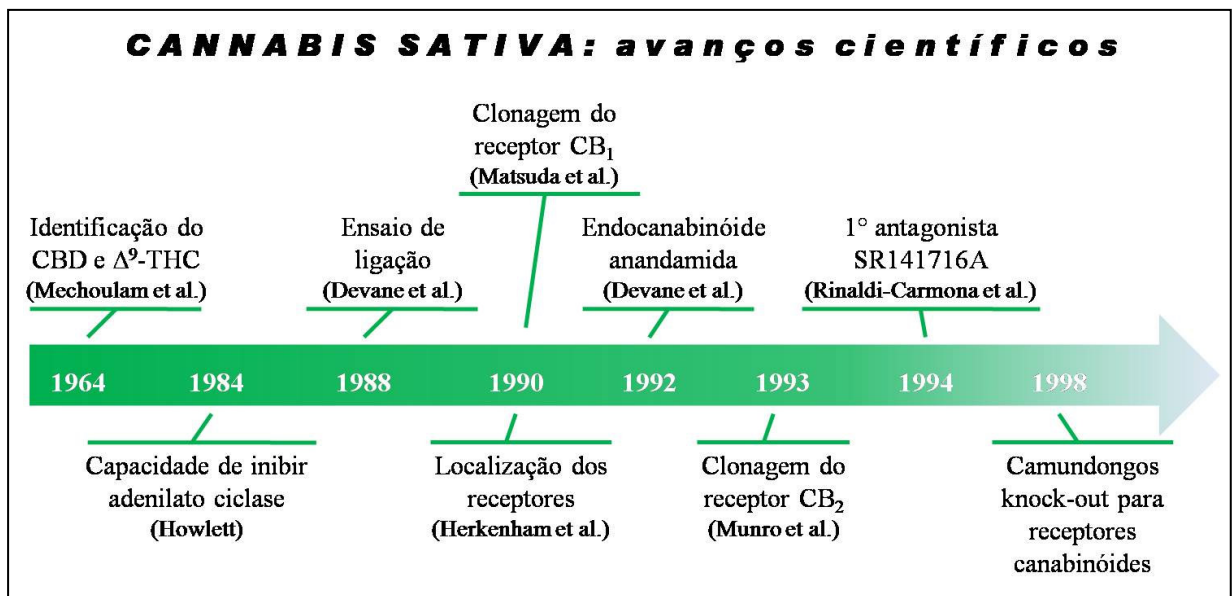


Figura 2 - Breve histórico dos avanços na investigação sobre os mecanismos de ação dos canabinóides (modificado de Childers e Breivogel, 1998).

A descoberta dos receptores canabinóides levou ao desenvolvimento de uma série de bioensaios *in vitro* que podem ser usados para monitorar a ativação ou bloqueio destes receptores, ou seja, auxiliar no desenvolvimento de agonistas ou antagonistas (Pertwee, 1997; Howlett, Barth *et al.*, 2002; Pertwee, 2005). Mas antes que se desenvolvessem tais compostos, os pesquisadores queriam estabelecer se existiria algum ligante endógeno para os receptores canabinóides, visto ser pouco provável que estes fossem alvos apenas dos canabinóides derivados da planta (revisado em Pertwee, 2006).

Usando da lógica de que uma substância canabinóide endógena exibiria as mesmas propriedades lipofílicas dos já conhecidos canabinóides (oriundos da *Cannabis*), Devane e colaboradores (1992) utilizaram extratos de cérebro de suínos e isolaram compostos endógenos que se ligavam aos receptores canabinóides CB₁ (Devane, Hanus *et al.*, 1992). Surgiam então os primeiros endocanabinóides (eCB), nome dado aos compostos endógenos que possuem a capacidade de ativar receptores canabinóides. O primeiro destes compostos foi a etanolamina do ácido araquidônico, o qual recebeu o nome de anandamida, uma palavra derivada do sânscrito, que significa “êxtase” (Childers e Breivogel, 1998).

A anandamida exibe uma afinidade moderada pelos receptores CB₁ (aproximadamente 100 nM) e é extremamente instável, sendo rapidamente metabolizada por amidases (Deutsch e Chin, 1993). Este eCB pode ser considerado um agonista parcial ou total dos receptores CB₁, o que dependeria do tecido e das respostas biológicas avaliadas (Pacher, Batkai *et al.*, 2006). Esta característica é conferida conforme sua habilidade de ativar proteínas G (Breivogel, Selley *et al.*, 1998), inibir adenilato ciclase (Childers, Sexton *et al.*, 1994) e afetar as funções dos canais de íons (Mackie, Devane *et al.*, 1993; Shen, Piser *et al.*, 1996). Além dos receptores canabinóides, existem relatos de que a anandamida possa ativar também os receptores vanilóides TRPV₁ (Ross, 2003), os quais têm mostrado possuir funcionalidade cruzada com os receptores canabinóides quando estes são encontrados nas mesmas células (Cristino, De Petrocellis *et al.*, 2006). Após a descoberta da anandamida diversos eCB vêm sendo identificados (ex. 2-araquidonilglicerol/2-AG), no entanto, a anandamida continua sendo o eCB mais estudado (Pacher, Batkai *et al.*, 2006).

Há indícios de que os eCB, ao contrário dos neurotransmissores clássicos, sejam sintetizados sob demanda, e rapidamente liberados pelos neurônios em decorrência de atividade elétrica induzida por despolarização e conseqüente influxo de íons cálcio (Di Marzo, Melck *et al.*, 1998). Uma vez sintetizada, a anandamida pode agir como mensageiro

retrógrado, sendo liberada pela pós-sinapse, difundindo-se para a pré-sinapse até alcançar os receptores canabinóides. Ao ligar-se nestes receptores, a anandamida atua diminuindo a liberação de outros neurotransmissores por interferir em uma etapa dependente de cálcio no processo de liberação de vesículas sinápticas (Hoffman e Lupica, 2000). A inativação da anandamida ocorre por dois processos cooperativos, a recaptação e a degradação. Ainda que um transportador específico não tenha sido identificado, a recaptação da anandamida da fenda sináptica é saturável, dependente de energia e sensível a ação de inibidores, típico de um processo mediado por carreadores protéicos (Di Marzo, Fontana *et al.*, 1994; Beltramo, Di Tomaso *et al.*, 1997; Hillard e Campbell, 1997). Depois de recaptada, a anandamida sofre a ação de uma enzima de degradação específica, a amido hidrolase de ácidos graxos (FAAH, do inglês *fatty acid amid hydrolase*), que é responsável pela hidrólise da anandamida em etanolamina e ácido araquidônico (Pacher, Batkai *et al.*, 2006) (Ver figura 3).

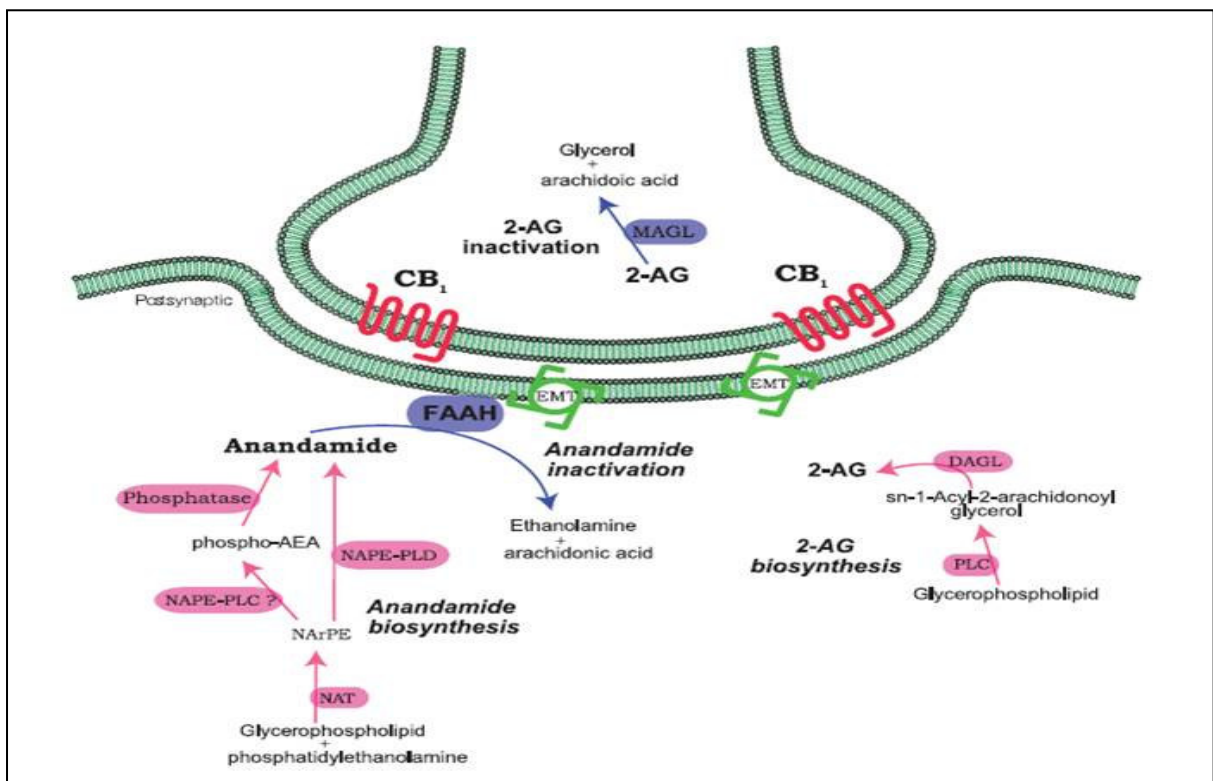


Figura 3 - Representação esquemática do sistema endocanabinóide nos neurônios pré- e pós-sinápticos. O terminal pré-sináptico está localizado no topo, enquanto que o terminal pós-sináptico está localizado na parte inferior da página. (EMT) transportador membranar de endocanabinóide; (MAGL) lipase de monoacilglicerol; (DAGL) lipase de diacilglicerol; (AEA) anandamida; (NAPE) N-araquidonil-fosfatidiletanolamina; (NAT) N-aciltransferase (adaptado de Pacher *et al.*, 2006).

1.3 - DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO FARMACOLÓGICA DE LIGANTES PARA OS RECEPTORES CANABINÓIDES

Além dos compostos naturalmente encontrados na *Cannabis* (Δ^9 -THC e CBD) e dos já descritos eCB, a indústria farmacêutica tem desenvolvido diversos compostos que agem no sistema canabinóide. Uma classe bastante importante de agonistas canabinóides que surgiram recentemente foram os aminoalquilindóis, que foram as primeiras moléculas desenvolvidas com atividade canabiméticas e sem similaridade estrutural com o Δ^9 -THC (ex. WIN55212) (Pertwee, 2006).

Outro grande avanço que sucedeu a descoberta dos receptores canabinóides foi o desenvolvimento de antagonistas seletivos para estes receptores. O primeiro antagonista dos receptores canabinóides tipo CB₁ de que se tem notícia foi o SR141716A (rimonabanto), desenvolvido em 1994 por Rinaldi-Carmona e colaboradores (Rinaldi-Carmona, Barth *et al.*, 1994).

Existe também uma terceira classe de ferramentas farmacológicas que atuam, diferentemente dos agonistas e antagonistas dos receptores canabinóides, ao interferirem com o metabolismo dos eCB. O primeiro e mais bem estudado entre os inibidores da recaptação/degradação de endocanabinóides é o AM404, um derivado estrutural da anandamida que age como substrato falso para o suposto transportador e para a enzima de degradação da anandamida. Como resultado tem-se a elevação dos níveis deste eCB e conseqüente potencialização dos seus efeitos *in vivo* (Beltramo, Stella *et al.*, 1997).

1.4 - O SISTEMA ENDOCANABINÓIDE COMO ALVO TERAPÊUTICO EM CONDIÇÕES FISIOPATOLÓGICAS

Os canabinóides endógenos, geralmente referidos como eCB, e suas respectivas enzimas de síntese e degradação, juntamente com o conjunto de receptores canabinóides, constituem o sistema eCB. A descoberta deste sistema tem sido de grande impacto, não apenas sobre a farmacologia dos fitocannabinóides e seus análogos sintéticos, mas também sobre a farmacologia dos eCB nos eventos fisiológicos e patológicos que estes podem estar envolvidos (Pertwee, 2006).

Evidências têm sugerido que alterações no sistema eCB podem estar relacionadas a vários distúrbios. Em alguns destes distúrbios como, esclerose múltipla, alguns tipos de dor, câncer, esquizofrenia, transtorno de estresse pós-traumático, excitotoxicidade, algumas doenças cardiovasculares e intestinais, este aumento na eficiência do sistema eCB pode causar uma redução da gravidade dos sintomas ou até mesmo uma desaceleração na progressão da doença. No entanto, existem outros distúrbios como, diminuição da fertilidade, obesidade, cistite, ileíte e íleo paralítico, no qual os efeitos indesejáveis parecem resultar desta supra-regulação do sistema eCB, sugerindo que este sistema tem suas próprias patologias e algumas vezes é capaz de mediar seus próprios efeitos indesejáveis. Estas evidências têm instigado a procura por estratégias clínicas melhores que irão, por um lado, imitar ou aumentar a “auto-proteção” mediada pelos eCB e, por outro lado, evitar o “auto-prejuízo” mediado por este sistema (revisado em Pertwee, 2006).

Tendo em vista as várias ações exercidas pelos canabinóides exógenos no cérebro e as recentes descobertas da relevância dos eCB em uma série de funções fisiológicas, existe um interesse emergente no papel dos canabinóides como moduladores dos estados emocionais e de memória (Kathuria, Gaetani *et al.*, 2003; Viveros, Marco *et al.*, 2005). Estes efeitos são sustentados pela densa expressão de receptores canabinóides CB₁ e a presença de eCB em

regiões cerebrais conhecidas por desempenhar um importante papel nos comportamentos de ansiedade e nos processos de aprendizado de memórias aversivas, incluindo amígdala e hipocampo (Herkenham, Lynn *et al.*, 1990; Di Marzo, Breivogel *et al.*, 2000). Está bastante aceito que agonistas dos receptores canabinóides freqüentemente prejudicam a aquisição e consolidação de memórias aversivas (Ferrari, Ottani *et al.*, 1999; Mishima, Egashira *et al.*, 2001; Varvel, Hamm *et al.*, 2001; Pamplona e Takahashi, 2006), enquanto que a administração sistêmica de antagonistas dos receptores CB₁ freqüentemente melhoram a aquisição e consolidação das memórias. A maioria dos estudos realizados em camundongos com deleção gênica para os receptores CB₁ mostrou respostas normais por parte destes animais para aquisição e consolidação de memórias aversivas (Marsicano, Wotjak *et al.*, 2002; Varvel e Lichtman, 2002; Varvel, Anum *et al.*, 2005; Kamprath, Marsicano *et al.*, 2006), mas estes resultados podem depender da linhagem empregada (Mikics, Dombi *et al.*, 2006).

Além dos processos de aquisição e consolidação, existe outro, igualmente importante e pouco compreendido, que é o processo de extinção da memória. No intuito de compreender melhor o papel dos eCB e dos receptores CB₁ na extinção de memórias aversivas, intensos esforços têm sido feitos nesse sentido. Dadas as semelhanças entre os procedimentos de extinção e as psicoterapias baseadas em exposição usadas para o tratamento de distúrbios de medo em humanos (Myers e Davis, 2002), acredita-se que o sistema eCB pode representar um novo alvo farmacológico para o tratamento de distúrbios de ansiedade relacionados à recordação de eventos traumáticos, como fobias específicas e transtorno de estresse pós-traumático (Marsicano, Wotjak *et al.*, 2002; Chhatwal, Davis *et al.*, 2005; Pamplona, Prediger *et al.*, 2006; Niyuhire, Varvel *et al.*, 2007).

1.5 - COMPORTAMENTO DEFENSIVO, MEMÓRIAS AVERSIVAS E O MODELO ANIMAL DE EXTINÇÃO DO CONDICIONAMENTO AVERSIVO

O aprendizado emocional é extremamente necessário para que o indivíduo possa sobreviver e até mesmo prosperar. Contudo, uma vez adquiridas, as associações emocionais nem sempre são manifestadas. Na verdade, a regulação das respostas emocionais sob diferentes condições ambientais é essencial para a saúde mental. Sendo assim, a forma mais simples de regulação das respostas emocionais é a extinção, na qual a resposta condicionada a um estímulo diminui quando o reforço (estímulo) é omitido. No entanto, em certos momentos este mecanismo de extinção pode não ocorrer de forma satisfatória e as respostas emocionais podem se tornar exageradas ou começarem a ocorrer em situações inapropriadas, caracterizando um distúrbio de ansiedade. Neste caso, agentes farmacológicos que viessem a promover a facilitação da extinção destas memórias poderiam ser úteis se somados a terapias cognitivo-comportamentais (Quirk e Mueller, 2008). Para isso, os modelos animais têm contribuído de forma bastante importante na triagem deste tipo de composto farmacológico. Isso se torna viável porque diversas similaridades relacionam os sintomas de ansiedade em seres humanos à expressão de comportamentos defensivos em animais, já que assim como os humanos, os animais tendem a apresentar comportamentos defensivos evidentes em situações potencialmente ameaçadoras (Borsini, Podhorna *et al.*, 2002). Esta similaridade de resposta comportamental tem sido utilizada na tentativa de se desenvolver modelos refinados de comportamento animal que possam ser utilizados no estudo de potenciais fármacos para as patologias ligadas à ansiedade. Neste sentido, dois dos modelos animais mais populares no estudo de comportamentos defensivos condicionados e inatos são, respectivamente, o modelo de condicionamento aversivo (CA) e o labirinto em cruz elevado (LCE).

O modelo animal de CA tem sido utilizado para o estudo de memórias aversivas e da expressão de comportamentos defensivos que sucedem a recordação destas memórias, uma

vez que a aquisição de comportamentos defensivos condicionados pode estar envolvida no desenvolvimento de patologias de ansiedade deflagradas pela exposição a experiências traumáticas (Brewin e Holmes, 2003). Estas similaridades entre os mecanismos de aquisição e expressão do medo condicionado e as patologias de ansiedade tornam o estudo dos modelos animais de CA de grande importância para o entendimento dos mecanismos biológicos inerentes às memórias emocionais e para o desenvolvimento de terapias farmacológicas para estas patologias (Pare, Quirk *et al.*, 2004).

Basicamente, um modelo animal de CA implica no aprendizado de que certos estímulos ambientais (pistas cognitivas) estão relacionados a eventos aversivos. Um estímulo condicionado (EC), inicialmente neutro e incapaz de provocar reação comportamental explícita, adquire a capacidade de provocar reações comportamentais após a associação a um estímulo incondicionado (EI) aversivo. Assim que a associação EC-EI é aprendida e os animais são re-expostos ao EC, uma série de respostas comportamentais de medo condicionado ocorre, incluindo o comportamento de congelamento (Blanchard e Blanchard, 1969). Este tipo de resposta comportamental pode ser estabelecida com apenas um pareamento EC-EI formando invariavelmente uma memória de longa duração (Yaniv, Desmedt *et al.*, 2004). Um tipo de CA bastante utilizado é o condicionamento aversivo contextual que é realizado com a associação do EI a estímulos variados, de múltiplas modalidades sensoriais e que requerem a sua integração em uma representação única do ambiente, denominada de contexto, o que confere um EC bastante complexo (Yaniv, Desmedt *et al.*, 2004). Um modelo de CA, como qualquer modelo animal de aprendizado e memória, possui diversas etapas relacionadas aos processos mnemônicos de aquisição, consolidação, evocação e extinção ou reconsolidação, todas passíveis de manipulação farmacológica e com grande importância biológica. A etapa de extinção de uma memória aversiva, enfoque deste trabalho, pode ser estudada através da submissão do animal a várias exposições prolongadas e

não-reforçadoras do EC, o que tende a enfraquecer as respostas de medo (Suzuki, Josselyn *et al.*, 2004). Neste caso, a associação do EC-EI deixa de ser biologicamente relevante para o animal (em geral pela perda do componente aversivo - EI) e este passa a deixar de expressar comportamentos defensivos em resposta à apresentação do EC. Esta perda da relevância caracteriza o fenômeno de extinção, ou seja, é formada uma nova associação EC-“ausência de EI” que se sobrepõe a associação EC-EI inicialmente realizada (Cammarota, Bevilaqua *et al.*, 2005). Em um sentido mais amplo pode-se dizer que a extinção de uma memória não se trata apenas de um evento simples como um “esquecimento” ou uma “rasura”, e sim um conjunto de flexibilidades comportamentais, adaptação às alterações ambientais ou até mesmo uma forma de inibição, o que caracterizaria um novo aprendizado (Suzuki, Josselyn *et al.*, 2004; Hill, Froese *et al.*, 2006; Kamprath, Marsicano *et al.*, 2006; Quirk e Mueller, 2008). Diversos fatores devem estar em equilíbrio para que uma memória seja extinta, sendo de crucial importância o tempo de exposição ao EC na ausência do EI (Suzuki, Josselyn *et al.*, 2004). Embora as pesquisas neurocientíficas acerca da extinção tenham evoluído muito nos últimos anos, ainda não se sabe ao certo quais mecanismos neurais regulam esta forma de aprendizado. Dificilmente uma única estrutura seja responsável por este fenômeno e, provavelmente, uma série de estruturas chave, incluindo amígdala basolateral (BLA), córtex pré-frontal e hipocampo devem estar interagindo para que esse processo ocorra. No entanto, é bem provável que a plasticidade relacionada à extinção em cada uma destas estruturas deva exercer funções diferenciadas como, por exemplo, a plasticidade na amígdala pode servir para inibir a expressão do medo, enquanto que a plasticidade ocorrida no hipocampo ou córtex pré-frontal pode possibilitar a modulação contextual desta inibição (revisado em Quirk e Mueller, 2008).

O modelo do LCE, anteriormente mencionado, consiste num aparelho com áreas abertas (expostas) e fechadas (protegidas) que pode ser explorado livremente pelo animal.

Consistente com a idéia de que lugares abertos provocam reações comportamentais semelhantes à ansiedade em animais, ratos expostos ao LCE tendem a entrar menos vezes e permanecer menos tempo nas áreas expostas do labirinto em comparação às áreas protegidas. Estas medidas comportamentais no LCE foram validadas farmacologicamente, etologicamente e fisiologicamente. Primeiro, a administração de benzodiazepínicos, ansiolíticos clássicos, aumenta o número de entradas e o tempo de permanência nas áreas abertas do LCE, enquanto manipulações ansiogênicas tendem a reduzir estes parâmetros (Pellow, Chopin *et al.*, 1985; Pellow e File, 1986). Segundo, a análise etológica de uma sessão experimental demonstra que os animais expostos ao LCE tendem a expressar comportamentos defensivos principalmente nas áreas expostas do labirinto (Pellow, Chopin *et al.*, 1985; Pellow e File, 1986; Cruz, Frei *et al.*, 1994). Por último, animais confinados às áreas abertas do LCE produzem maiores concentrações de corticosterona (resposta emocional endócrina) e bolos fecais (resposta emocional autonômica) comparados aos animais confinados às áreas protegidas do labirinto (Pellow, Chopin *et al.*, 1985). O LCE também pode ser utilizado para se avaliar a ansiogênese causada pela recordação de experiências aversivas em uma modificação experimental conhecida como LCE potencializado pelo medo (Mechiel Korte e De Boer, 2003).

A densa expressão dos receptores canabinóides CB₁ e a presença de endocanabinóides nas regiões cerebrais as quais se acredita desempenhar funções nos processos de extinção de memórias aversivas levaram a crer na participação deste sistema como possível modulador destas respostas. De fato, estudos recentes têm mostrado a participação indispensável dos receptores CB₁ nos processos de extinção de memórias aversivas (Marsicano, Wotjak *et al.*, 2002), e sugerido que o aumento dos níveis de eCB possa levar a efeitos tipo ansiolíticos e a facilitação da extinção do CA em animais (Kathuria, Gaetani *et al.*, 2003; Chhatwal, Davis *et al.*, 2005; Bortolato, Campolongo *et al.*, 2006). No entanto, pouco se sabe a respeito da

influência da administração de canabinóides exógenos, como os fitocanabinóides, sobre a extinção deste tipo de memória. Neste sentido, o presente trabalho propõe avaliar os efeitos do tratamento com o fitocanabinóide CBD, um hipotético inibidor da recaptação e/ou degradação de anandamida, sobre a extinção do CA contextual em ratos. A fim de melhor compreender o mecanismo de ação do CBD, comparações serão feitas com o já bem descrito inibidor da recaptação de anandamida, AM404. Além disso, serão analisados os efeitos destes compostos no modelo do LCE potencializado pelo medo, visando investigar possíveis efeitos ansiolíticos dos mesmos.

2 - OBJETIVOS

2.1 – OBJETIVO GERAL

- Investigar os efeitos da administração i.c.v. do CBD comparando com os efeitos induzidos pelo AM404, inibidor da recaptção de anandamida, na extinção de memórias aversivas em ratos utilizando o modelo animal de CA contextual.

2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a participação dos receptores canabinóides CB₁ nos efeitos do AM404 e do CBD sobre a extinção do CA contextual em ratos;
- Avaliar a participação dos receptores vanilóides TRPV₁ nos efeitos do AM404 e do CBD sobre a extinção do CA contextual em ratos;
- Verificar a sustentabilidade destes efeitos, persistentes ou agudos (dependente de droga), em uma sessão adicional, na ausência de tratamento farmacológico, realizado 24 h após a última sessão de extinção;
- Investigar possíveis efeitos ansiolíticos de doses selecionadas de AM404 e CBD através do modelo do LCE potencializado pelo medo.

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar machos com peso aproximado de 350 g e com cerca de 3 meses de idade na data de experimentação. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e mantidos por pelo menos uma semana antes dos experimentos no Biotério Setorial do Laboratório de Psicofarmacologia, para devida aclimatização. Os animais foram agrupados em caixas de polipropileno (42 x 34 x 17 cm), contendo 4 ou 5 animais por caixa e mantidos em condições controladas de umidade e temperatura (23 ± 2 °C), com ciclo claro-escuro de 12 horas (fase clara das 7:00 às 19:00 h), com água e ração *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais utilizados no presente estudo foram conduzidos de acordo com as normas do Comitê de Ética para o Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC).

3.2 – DROGAS

AM404, um inibidor da recaptção de anandamida (Tocris, USA), (-)-Canabidiol (CBD), o maior constituinte da planta *Cannabis Sativa* (Tocris, USA), Capsazepina (CPZ), um antagonista dos receptores vanilóides do tipo TRPV₁ (Tocris, USA), e Diazepam (DZP), um modulador alostérico positivo dos receptores GABA (Sanofi Winthrop, Brasil) foram dissolvidos em PBS 0,1M contendo 10% de dimetilsufóxido (DMSO) e 0,1% de Tween 80. SR141716A (SR), um antagonista dos receptores canabinóides do tipo CB₁ (Sanofi-Aventis, França) foi dissolvido em solução fisiológica (NaCl 0,9%) contendo 10% de DMSO e 0,1% de Tween 80. O veículo de dissolução foi utilizado como solução controle. AM404, CBD e

Diazepam foram injetados intracerebroventricularmente (i.c.v.) 5 min antes dos testes comportamentais. CPZ foi injetado i.c.v. 5 min antes da administração de AM404, CBD ou Controle. SR foi injetado intraperitonealmente (i.p.) 20 min antes da administração de AM404, CBD ou Controle. As drogas de administração i.c.v. foram injetadas em um volume de 1,0 µl por animal, e a droga de administração i.p. foi injetada em um volume de 0,2 ml/100 g de peso corporal. As doses das drogas utilizadas foram selecionadas baseadas em trabalhos prévios e estudos pilotos (Chhatwal, Davis *et al.*, 2005; Murillo-Rodriguez, Millan-Aldaco *et al.*, 2006; Pamplona, Prediger *et al.*, 2006).

3.3 – CIRURGIA ESTEREOTÁXICA

Os animais foram anestesiados com uma mistura de 1:1 de Ketamina (75 mg/kg) e xilazina (15 mg/kg) administradas num volume de 1,5 ml/kg via i.p. Após perda total dos reflexos os animais foram colocados em um aparelho estereotáxico (Kopf, modelo 957), mantendo o bregma e lâmbda no mesmo plano horizontal. Em seguida fez-se a tricotomia na cabeça seguida da administração via subcutânea de 0,2 ml de uma solução anestésica e vasoconstritora local (cloridrato de lidocaína 2% com norepinefrina 1:200.000, Lidocaína Geyer 2%, Brasil) e exposição da calota craniana por meio de uma incisão na pele, de aproximadamente 1,5 cm de diâmetro. O perióstio foi retirado e a calota craniana secada com H₂O₂ a 10%. Com o auxílio de uma broca ortodôntica (n° 6) foram feitos dois furos na calota craniana para fixação de parafusos. Posteriormente, um terceiro furo foi feito para implantação de uma cânula guia no ventrículo lateral direito, sendo o posicionamento da mesma, calculado por meios de estimativas em relação ao bregma (ponto de encontro entre as suturas sagital e lambdóide utilizado como referencial anatômico). As coordenadas utilizadas

(AP= -0,8 mm; ML= -1,6 mm; e DV= -3,6 mm) tiveram como referências parâmetros do Atlas de ratos (Paxinos e Watson, 2002).

Cânulas de aço inoxidável de 10 mm de comprimento e 0,7 mm de diâmetro externo, previamente confeccionadas a partir de agulhas 0,7 x 25 mm (Becton Dickinson - BD, Brasil), foram introduzidas no ventrículo cerebral direito. Após implantação, a cânula e os parafusos foram fixados ao crânio com resina acrílica autopolimerizável. Mandris de aço inox n° 26 de 0,35 mm de diâmetro (Comercial Rio Verde, Brasil) foram introduzidos nas cânulas para evitar a obstrução das mesmas durante o período da recuperação dos animais. Após o procedimento cirúrgico, os animais foram mantidos em local aquecido até a recuperação da anestesia, sendo posteriormente alojados em caixas moradias com água e comida *ad libitum* e acompanhados diariamente até a realização dos experimentos que ocorreu de 5 a 7 dias após a cirurgia estereotáxica.

3.4 – PROCEDIMENTO DE INFUSÃO

Uma agulha injetora de 11 mm de comprimento e 0,3 mm de diâmetro foi fixada a cânula guia e a administração i.c.v. foi realizada através de uma microseringa de 10 µl (Hamilton[®], USA) conectada a agulha injetora por um tubo de polietileno P10 (10 mm de diâmetro). As drogas foram injetadas com o auxílio de uma bomba de infusão automática (Insight, Brasil) num volume de 1µl, a uma taxa de 2µl/min. Após a retirada do mandril e introdução da agulha, o rato era alojado em uma caixa plástica (30 x 21 x 15 cm), permanecendo livre durante todo o processo de infusão. Um período de 30 segundos foi adotado como tempo necessário para a completa difusão da solução dentro do tecido cerebral e posterior retirada da agulha injetora. Por fim, um tempo de 5 min foi adotado entre a administração da solução e a exposição ao protocolo experimental.

3.5 – PROCEDIMENTOS COMPORTAMENTAIS

Todos os experimentos comportamentais descritos a seguir foram registrados com a utilização de um sistema de vídeo-câmera, permitindo ao experimentador observar os animais por um monitor de vídeo posicionado em uma sala adjacente à sala do experimento.

3.5.1 – Condicionamento aversivo contextual

Os experimentos de CA contextual foram realizados em uma caixa de esquiiva ativa modificada (Automatic Reflex Conditioner modelo 7531, Ugo Basile, Itália) dotada de chão gradeado conectado a um gerador de choques elétricos, devidamente configurado às condições experimentais. O mesmo compartimento da gaiola de condicionamento (22 x 22 x 25 cm) foi utilizado em todos os procedimentos experimentais. A sala de experimentação foi suavemente iluminada por uma luz vermelha, resultando em uma luminosidade ambiental de cerca de 10 Lux. O modelo de CA contextual utilizado neste trabalho foi baseado no método previamente descrito por Pamplona et al (2006). Neste modelo os animais foram colocados na gaiola de condicionamento e após 3 min receberam um choque elétrico nas patas de curta duração e intensidade moderada (1 s, 1,5 mA). Os animais permaneceram por mais um minuto na gaiola de condicionamento antes de serem retirados e levados novamente ao biotério. O teste comportamental neste modelo consistiu em re-expor o animal à gaiola de condicionamento durante 3 sessões de 9 min com um intervalo de 24 h entre cada sessão, sendo as drogas, administradas antes de cada sessão. Um teste adicional de 3 min, na ausência de drogas, foi realizado 24 h após a última sessão de extinção no intuito de verificar a persistência de um possível efeito sobre a extinção do CA. Quando re-expostos, os animais expressam respostas autonômicas e comportamentos defensivos, como congelamento, pilo-ereção, aumento da frequência cardíaca e liberação corticotrofina (Blanchard e Blanchard,

1969; Fanselow, 1980). No presente estudo, o congelamento, definido por Blanchard e Blanchard (1969) como imobilidade em uma posição estereotipada de agachamento, com exceção dos movimentos necessários para a respiração, e caracterizado como um comportamento condicionado por Fanselow (1980), foi registrado e utilizado como índice de memória durante as sessões de re-exposição ao contexto na ausência do EI (choque).

3.5.1.1 – Experimento 1: Efeitos da administração i.c.v. de AM404 na extinção do CA contextual.

Sucessivas exposições à caixa de condicionamento foram usadas para testar os efeitos do AM404 na extinção do CA contextual. Para este propósito, 24 h após o CA contextual os animais foram submetidos a 3 sessões consecutivas de extinção do CA, com 24 h de intervalo entre as sessões. Em cada sessão, os animais foram expostos à gaiola de condicionamento por 9 min e o comportamento de congelamento foi avaliado e registrado ao longo deste tempo. Os animais foram tratados com AM404 (0,2; 1,0 ou 2,0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, i.c.v.) ou solução controle 5 min antes de cada sessão de extinção. Um teste de 3 min, na ausência de tratamento farmacológico, foi realizado 24 h após a última sessão de extinção para investigar se os efeitos das drogas na extinção de memórias aversivas foram agudos (ex. dependente da droga) ou persistentes (Fig. 4).

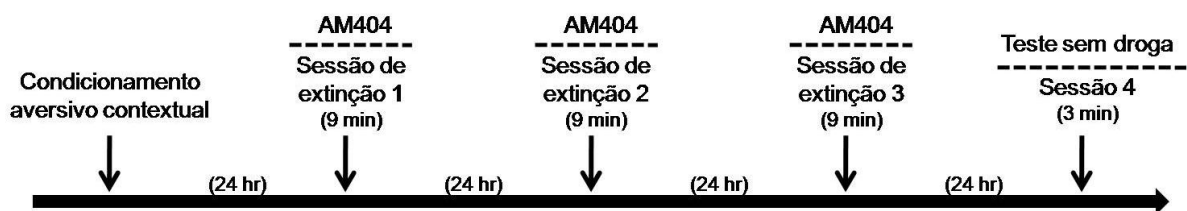


Figura 4 - Representação esquemática do procedimento realizado no experimento 1.

3.5.1.2 – *Experimento 2: Efeitos da administração i.c.v. de CBD na extinção do CA contextual.*

De maneira similar ao experimento anterior, sucessivas exposições à caixa de condicionamento foram desta vez usadas para testar os efeitos do CBD na extinção do CA contextual. O procedimento foi o mesmo utilizado no Experimento 1, com a diferença de que neste experimento os animais foram tratados com o CBD (0,2; 1,0 ou 2,0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, i.c.v.) ou solução controle 5 min antes de cada sessão de extinção (Fig. 5).

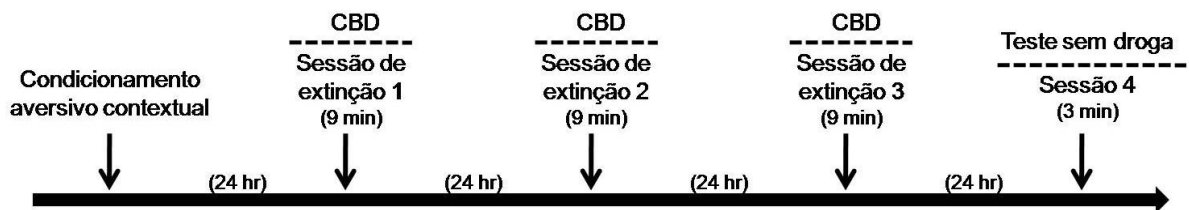


Figura 5 - Representação esquemática do procedimento realizado no experimento 2.

3.5.1.3 – *Experimento 3: Participação dos receptores canabinóides CB_1 nos efeitos do AM404.*

Este experimento foi realizado para investigar se os efeitos do AM404 na extinção do CA contextual estavam relacionados à ativação dos receptores canabinóides CB_1 . Neste procedimento, os animais foram pré-tratados i.p. com um antagonista dos receptores CB_1 SR141716A (0,2 mg/kg) ou solução controle 20 min antes de cada injeção de AM404 (1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) que, por sua vez, foi administrado i.c.v. 5 min antes de cada sessão de extinção. O procedimento utilizado para a extinção do CA contextual, foi o mesmo visto no experimento 1 (Fig. 6).

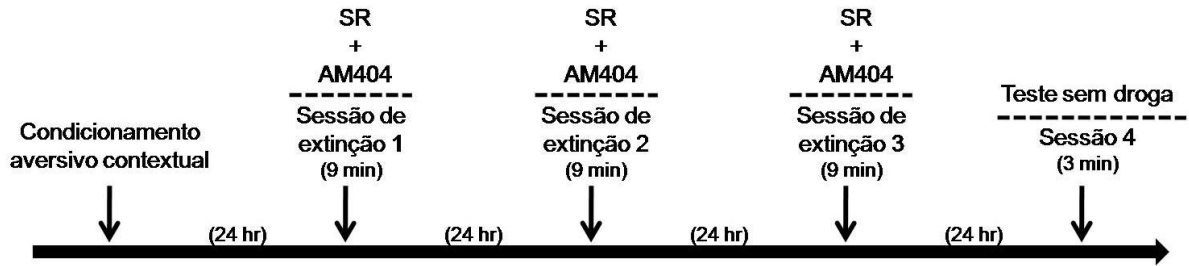


Figura 6 - Representação esquemática do procedimento realizado no experimento 3.

3.5.1.4 – Experimento 4: Participação dos receptores CB_1 nos efeitos do CBD.

De maneira similar ao experimento anterior, o envolvimento dos receptores CB_1 foi desta vez investigado nos efeitos do CBD sobre a extinção do CA contextual. Neste procedimento, os animais foram pré-tratados i.p. com SR (0,2 mg/kg) ou solução controle 20 min antes de cada injeção de CBD (2,0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; i.c.v.). Passados 5 min deste tratamento, os animais foram submetidos às respectivas sessões de extinção. O procedimento utilizado para a extinção do CA contextual, foi o mesmo visto no Experimento 1 (Fig. 7).

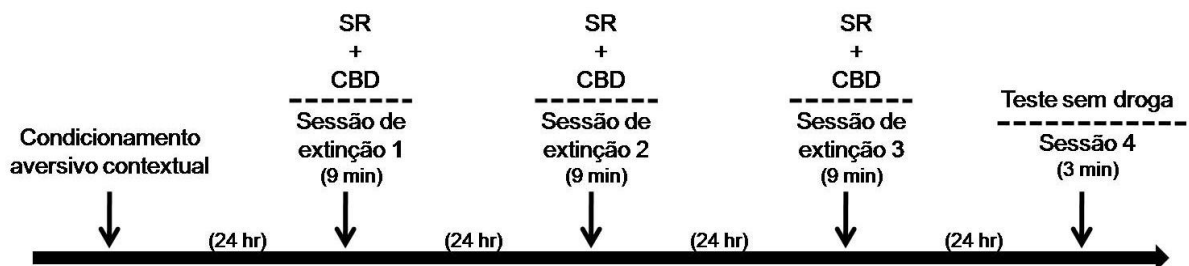


Figura 7 - Representação esquemática do procedimento realizado no experimento 4.

3.5.1.5 – Experimento 5: Participação dos receptores vanilóides VR_1 nos efeitos do AM404.

Este experimento foi realizado para investigar se os efeitos do AM404 na extinção do CA contextual estavam relacionados à ativação dos receptores vanilóides $TRPV_1$. Neste

procedimento, os animais foram pré-tratados i.c.v. com um antagonista dos receptores TRPV₁, a CPZ (5,0 µg/µl), ou solução controle 5 min antes de cada injeção de AM404 (1,0 µg/µl) que, por sua vez, foi da mesma forma administrado 5 min antes de cada sessão de extinção. O procedimento utilizado para a extinção do CA contextual, foi o mesmo visto no Experimento 1 (Fig. 8).

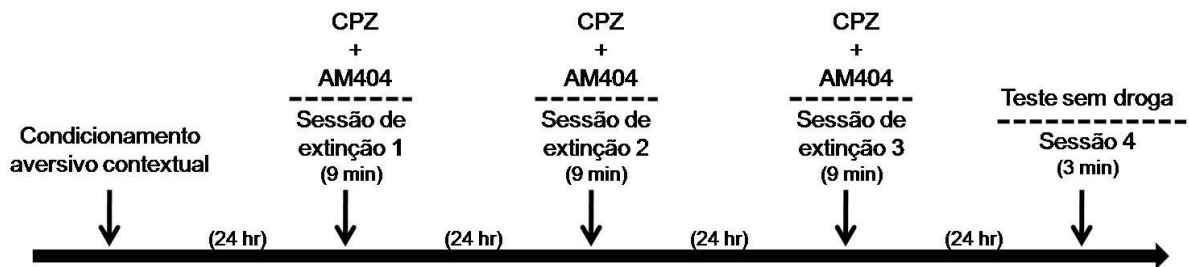


Figura 8 - Representação esquemática do procedimento realizado no experimento 5.

3.5.1.6 – Experimento 6: Participação dos receptores TRPV₁ nos efeitos do CBD.

Da mesma forma que no experimento anterior, o envolvimento dos receptores TRPV₁ foi desta vez investigado nos efeitos do CBD. Neste procedimento os animais foram pré-tratados i.c.v. com a CPZ (5,0 µg/µl), ou solução controle e, 5 min após, foram da mesma forma administrados com CBD (2,0 µg/µl). Cada sessão de extinção foi conduzida 5 min após este tratamento. O procedimento utilizado para a extinção do CA contextual, foi o mesmo visto no Experimento 1 (Fig. 9).

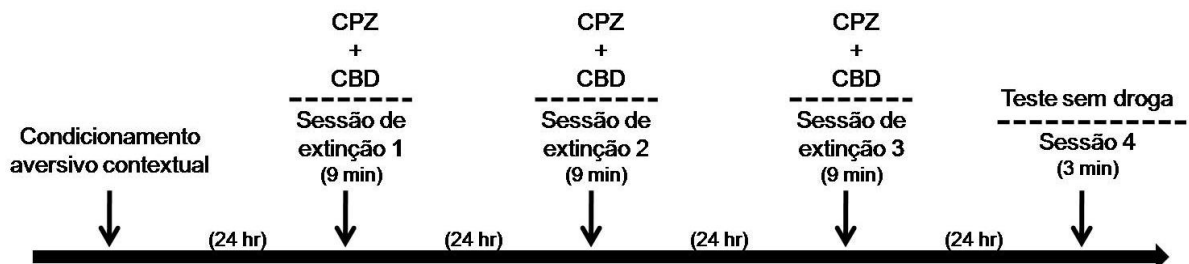


Figura 9 - Representação esquemática do procedimento realizado no experimento 6.

3.5.2 – Labirinto em Cruz Elevado

O teste do LCE foi usado em função de sua capacidade de detectar ambos, tanto efeitos do tipo ansiolítico como também efeitos do tipo ansiogênico em ratos (Pellow, Chopin *et al.*, 1985). O LCE foi confeccionado em madeira e coberto por uma camada de fórmica preta. O aparelho é constituído por quatro braços com 50 cm de comprimento, 10 cm de largura e posicionados a 50 cm de altura. Dois braços opostos são protegidos por paredes de 40 cm de altura e são chamados de braços fechados, os outros dois possuem apenas uma pequena proteção de 2,5 cm e são chamados de braços abertos. Os quatro braços são conectados por uma plataforma central (10 x 10 cm). A sala de experimento foi levemente iluminada por uma luz vermelha, resultando em uma luminosidade ambiental de cerca de 10 Lux. Cada animal foi colocado na plataforma central do LCE, voltados para um dos braços abertos, a fim de terem seus respectivos comportamentos avaliados e registrados por um período de 5 min. As entradas nos braços, abertos ou fechados, foram registradas apenas quando o animal se encontrava com as quatro patas em um dos respectivos braços. A porcentagem de entradas nos braços abertos (número de entradas nos braços abertos / número total de entrada nos braços) e a porcentagem de tempo nos braços abertos (tempo de permanência nos braços abertos / tempo de permanência nos braços) foram utilizadas como índice de comportamento tipo ansiedade e o número de entradas nos braços fechados foi utilizado como índice de locomoção geral (Cruz, Frei *et al.*, 1994).

3.5.2.1 – *Experimento 7: Efeitos do AM404, CBD e DZP no LCE potencializado pelo medo.*

A fim de se verificar os efeitos dos tratamentos com AM404, CBD ou DZP sobre a ansiedade provocada pela recordação de memórias aversivas, os animais foram avaliados no modelo LCE potencializado pelo medo, previamente descrito por Korte e De Boer (Mechiel

Korte e De Boer, 2003). Os animais foram colocados na gaiola de condicionamento e submetidos ao CA contextual, como descrito no Experimento 1, e re-expostos a gaiola de condicionamento 24 h depois. Cinco dias após a re-exposição ao contexto, estes animais foram testados no LCE. O período de 5 dias entre a re-exposição ao contexto e o teste no LCE foi definido em um estudo piloto, no qual mostrou que períodos menores que 24 h induziram uma diminuição na exploração do LCE, fato este que poderia influenciar de maneira errônea a interpretação dos resultados. Um grupo de animais não condicionado constituído por ratos “naïve” foi adicionado ao teste do LCE como grupo controle. Animais de ambos os grupos foram injetados i.c.v. com AM404 (1,0 µg/µl), CBD (2,0 µg/µl) ou solução controle 5 min antes do teste no LCE potencializado pelo medo. Um grupo adicional tratado i.c.v. com DZP (2,85µg/µl), droga conhecida por seus efeitos ansiolíticos, foi utilizado como controle positivo (Fig. 10).



Figura 10 - Representação esquemática do procedimento realizado no experimento 7.

3.6 – PERFUSÃO E HISTOLOGIA

Após a realização dos experimentos que fizeram uso de microinjeções cerebrais, os animais foram profundamente anestesiados com hidrato de cloral e perfundidos transcardiacamente com solução fisiológica (NaCl 0,9%) seguida de formaldeído a 10% para fixação dos tecidos. Ao término da perfusão, 5 µl de corante azul de Evans (0,1%) foram injetados pelas cânulas guias. Posteriormente a injeção do corante, os cérebros foram

removidos e fixados em formaldeído 10% por 24 h. Passadas as 24 h, com o auxílio de uma lâmina de bisturi, foram feitos cortes coronais nos locais de implante das cânulas para verificar o posicionamento correto das mesmas. Os acertos foram visualizados, sem o auxílio de qualquer equipamento de aumento, como um preenchimento completo do ventrículo lateral direito pelo corante administrado. Eventuais erros no posicionamento das cânulas implicaram em desconsideração dos resultados obtidos.

3.7 – ANÁLISE GRÁFICA E ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.). A confecção dos gráficos foi feita utilizando-se o programa Graph Pad Prism[®] 4.0 (Graph Pad Software, San Diego, CA, EUA). As análises estatísticas foram feitas no programa Statistica[®] para Windows 6.0 (Statsoft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA).

Nos experimentos realizados para demonstrar os efeitos facilitatórios do AM404 e CBD sobre a extinção do condicionamento aversivo contextual (Exp. 1 e 2) foi usada análise de variância (ANOVA) de duas vias, tendo os fatores tratamento e sessões como variáveis independentes.

Nos experimentos realizados para demonstrar a participação dos receptores canabinóides CB₁ e vanilóides TRPV₁ nos efeitos facilitatórios do AM404 e CBD sobre a extinção do condicionamento aversivo contextual (Exp. 3, 4, 5 e 6) foi usada ANOVA de três vias, tendo os fatores pré-tratamento, tratamento e sessões como variáveis independentes.

Nos resultados referentes aos experimentos do teste sem droga (sessão 4) realizados para demonstrar os efeitos persistentes do AM404 e CBD sobre a extinção do condicionamento aversivo contextual foi usada ANOVA de uma ou duas vias, com pré-

tratamento e tratamento como variáveis independentes. Em alguns casos foi utilizado o *teste t de student* no intuito de fazer comparações diretas entre grupos.

Por fim, nos resultados referentes ao teste do LCE potencializado pelo medo (Exp. 7) foi usada ANOVA de duas vias, com tratamento e condição (condicionado x não-condicionado) como variáveis independentes.

Posteriormente à ANOVA, os grupos foram comparados entre si utilizando o teste de *post hoc* LSD de Fisher. O nível de significância considerado para todos os testes foi $p < 0,05$.

4 – RESULTADOS

4.1 – CONDICIONAMENTO AVERSIVO CONTEXTUAL

Como descrito previamente na introdução, o princípio do CA contextual é a associação de um estímulo aversivo incondicionado (EI), geralmente doloroso, a um estímulo inócuo, chamado de estímulo condicionado (EC). A apresentação do EC após a associação com o EI provoca reações comportamentais defensivas no animal, similares às provocadas originalmente pela apresentação do EI. No modelo do CA contextual utilizado neste trabalho, o EC foi o ambiente onde o animal foi condicionado (a gaiola de condicionamento), com suas pistas cognitivas de múltiplas características sensoriais, e o EI foi um choque elétrico nas patas, gerado no chão gradeado da gaiola de condicionamento.

4.1.1 - *Experimento 1: Efeitos da administração i.c.v. de AM404 na extinção do CA contextual.*

A representação esquemática do procedimento experimental utilizada neste experimento encontra-se ilustrado na figura 11A. Os efeitos do AM404 (0,2; 1,0 ou 2,0 µg/µl i.c.v.) sobre extinção do CA contextual estão representados nas figuras 11B e 11C. A ANOVA de duas vias para os resultados da administração de AM404 nas três sessões de extinção, revelou efeito significativo para os fatores tratamento [$F(3,141)=3,94$; $p<0,01$] e sessões [$F(2,141)=12,78$; $p<0,01$], mas não para a interação entre estes dois fatores [$F(6,141)=0,25$; $p=0,95$]. A análise *post-hoc* destes dados demonstrou que o protocolo de extinção utilizado com três re-exposições (sessões) causou uma diminuição na % do tempo de congelamento através das sucessivas exposições do grupo controle à gaiola de

condicionamento ($p < 0,05$ 3ª sessão comparada a 1ª). O grupo tratado com a dose intermediária de AM404 ($1,0 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, i.c.v.) obteve uma extinção parcial já na 2ª sessão ($p < 0,05$ comparada à 1ª sessão do mesmo grupo) e exibiu uma diminuição na % do tempo de congelamento durante a 2ª e 3ª sessões comparadas às respectivas sessões do grupo controle ($p < 0,05$), sugerindo um efeito facilitatório sobre a extinção do CA contextual. O grupo tratado com a menor dose de AM404 ($0,2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, i.c.v.) também obteve uma extinção parcial já na 2ª sessão ($p < 0,05$ comparada à 1ª sessão do mesmo grupo), porém, não exibiu diferenças estatísticas na % do tempo de congelamento durante a 2ª e 3ª sessões quando comparadas às respectivas sessões do grupo controle. A maior dose de AM404 ($2,0 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, i.c.v.), por sua vez, aparentemente não interferiu na % do tempo de congelamento apresentada pelos animais (Fig. 11B).

A fim de investigar se os efeitos do AM404 na extinção de memórias aversivas foram agudos (ex. dependente da droga) ou persistentes, uma sessão adicional (sessão 4), na ausência de tratamento farmacológico, foi realizada 24 h após a última sessão de extinção. A ANOVA de uma via para estes dados não revelou efeito significativo para o fator tratamento [$F(3,47)=0,83$; $p=0,48$]. Contudo, o grupo tratado com a dose intermediária de AM404 ($1,0 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, i.c.v.) apresentou, na sessão 4 (sem droga), uma tendência na diminuição da % do tempo de congelamento quando comparada diretamente a respectiva sessão do grupo controle ($t=1,76$; $p=0,08$) (Fig. 11C).

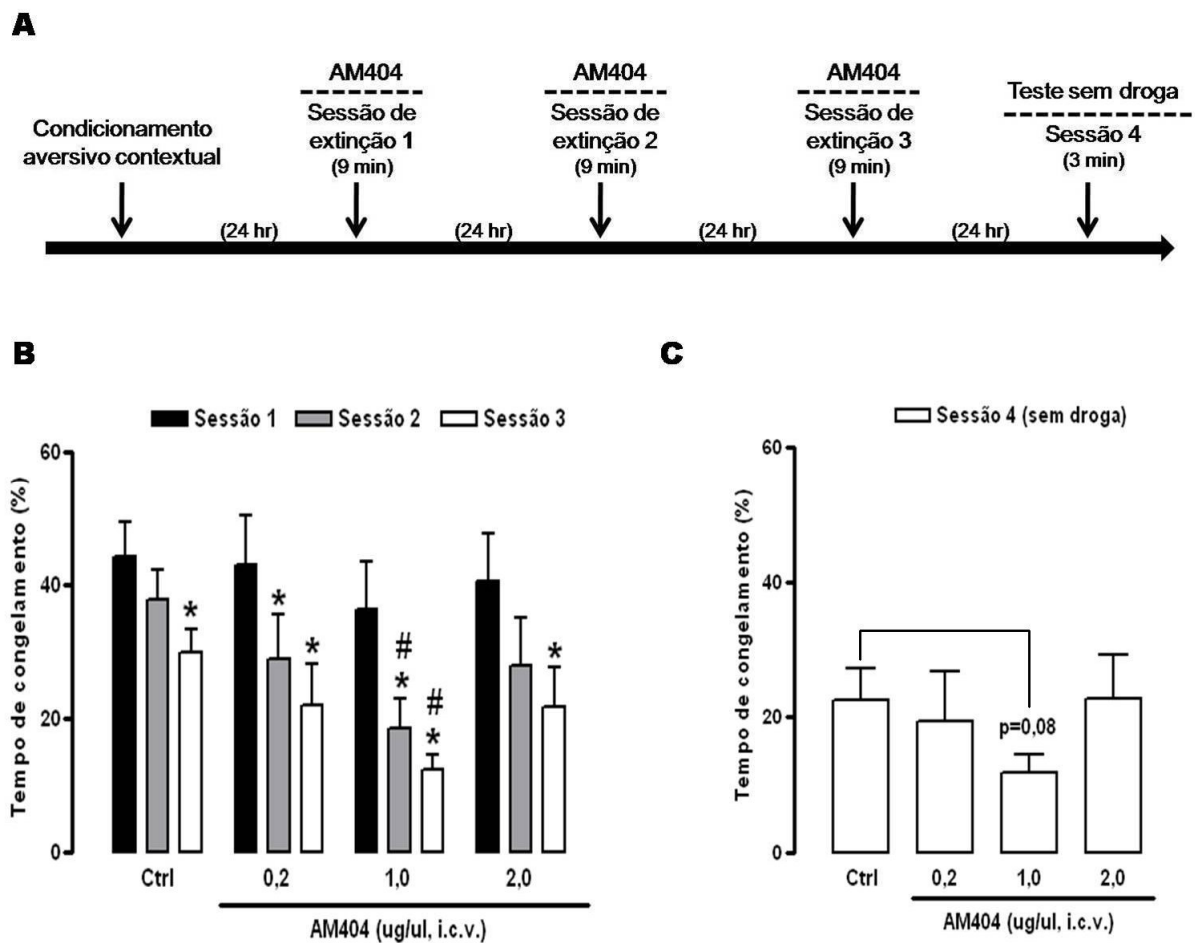


Figura 11 – Efeitos da administração i.c.v. de AM404 (0,2; 1,0; 2,0 µg/µl) na extinção do CA contextual. (A) Representação esquemática do procedimento utilizado no experimento 1. (B) Média ± E.P.M. da % de tempo de congelamento expressa pelos animais tratados com AM404 e submetidos a 3 exposições de 9 min à gaiola de condicionamento, com intervalo de 24 h (cada barra representa os dados de uma sessão). (C) Média e E.P.M. da % do tempo de congelamento expressa pelos mesmos grupos de animais durante uma única exposição de 3 min à gaiola de condicionamento, na ausência de tratamento farmacológico, 24 h após a última sessão de extinção. * $p < 0,05$ comparado à primeira sessão do respectivo grupo. # $p < 0,05$ comparado à respectiva sessão do grupo controle (teste LSD de Fisher). (Controle/ $n=16$, AM404 0,2/ $n=11$, AM404 1,0/ $n=12$, AM404 2,0/ $n=12$).

4.1.2 - Experimento 2: Efeitos da administração i.c.v. de CBD na extinção do CA contextual.

Os efeitos do CBD sobre a extinção de memórias aversivas foram investigados utilizando o modelo do CA contextual da mesma forma como visto no Experimento 1. A representação esquemática do procedimento experimental utilizado no Experimento 2 encontra-se ilustrado na figura 12A. Os efeitos do CBD (0,2; 1,0 ou 2,0 µg/µl i.c.v.) sobre extinção do CA contextual estão representados nas figuras 12B e 12C. A ANOVA de duas

vias para os resultados da administração de CBD nas três sessões de extinção, revelou efeito significativo para os fatores tratamento [$F(3,126)=3,74$; $p\leq 0,01$] e sessões [$F(2,126)=19,18$; $p<0,01$], mas não para a interação entre estes dois fatores [$F(6,126)=0,59$; $p=0,73$]. A análise *post-hoc* destes dados demonstrou, de forma consistente com o Experimento 1, que na 3ª sessão o grupo controle obteve uma extinção parcial do comportamento condicionado de congelamento quando comparada à 1ª sessão ($p<0,05$). O tratamento com a menor dose de CBD ($0,2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ i.c.v.) não interferiu na % do tempo de congelamento apresentada pelos animais em relação ao grupo controle. O grupo tratado com a dose intermediária de CBD ($1,0 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ i.c.v.) obteve uma extinção parcial já na segunda sessão ($p<0,05$ comparada a 1ª sessão do mesmo grupo), porém, não exibiu diferenças estatísticas na % do tempo de congelamento durante a 2ª e 3ª sessões quando comparadas as respectivas sessões do grupo controle. Já o grupo tratado com a maior dose de CBD ($2,0 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ i.c.v.), além de exibir uma extinção parcial na 2ª sessão ($p<0,05$ comparada a 1ª sessão do mesmo grupo), exibiu também uma diminuição na % do tempo de congelamento durante a 2ª e 3ª sessões comparadas às respectivas sessões do grupo controle ($p<0,05$). Este efeito dose dependente do CBD sugere, assim como o AM404, uma facilitação sobre a extinção do CA contextual (Fig. 12B).

A ANOVA de uma via para os dados do teste sem droga (sessão 4) revelou apenas uma tendência para o fator tratamento [$F(3,42)=2,33$; $p=0,08$]. Porém, se comparados diretamente através de *teste t*, o grupo tratado com CBD ($2,0 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ i.c.v.) apresentou uma diminuição na % do tempo de congelamento em relação à respectiva sessão do grupo controle ($t=2,66$; $p<0,05$) (Fig. 12C).

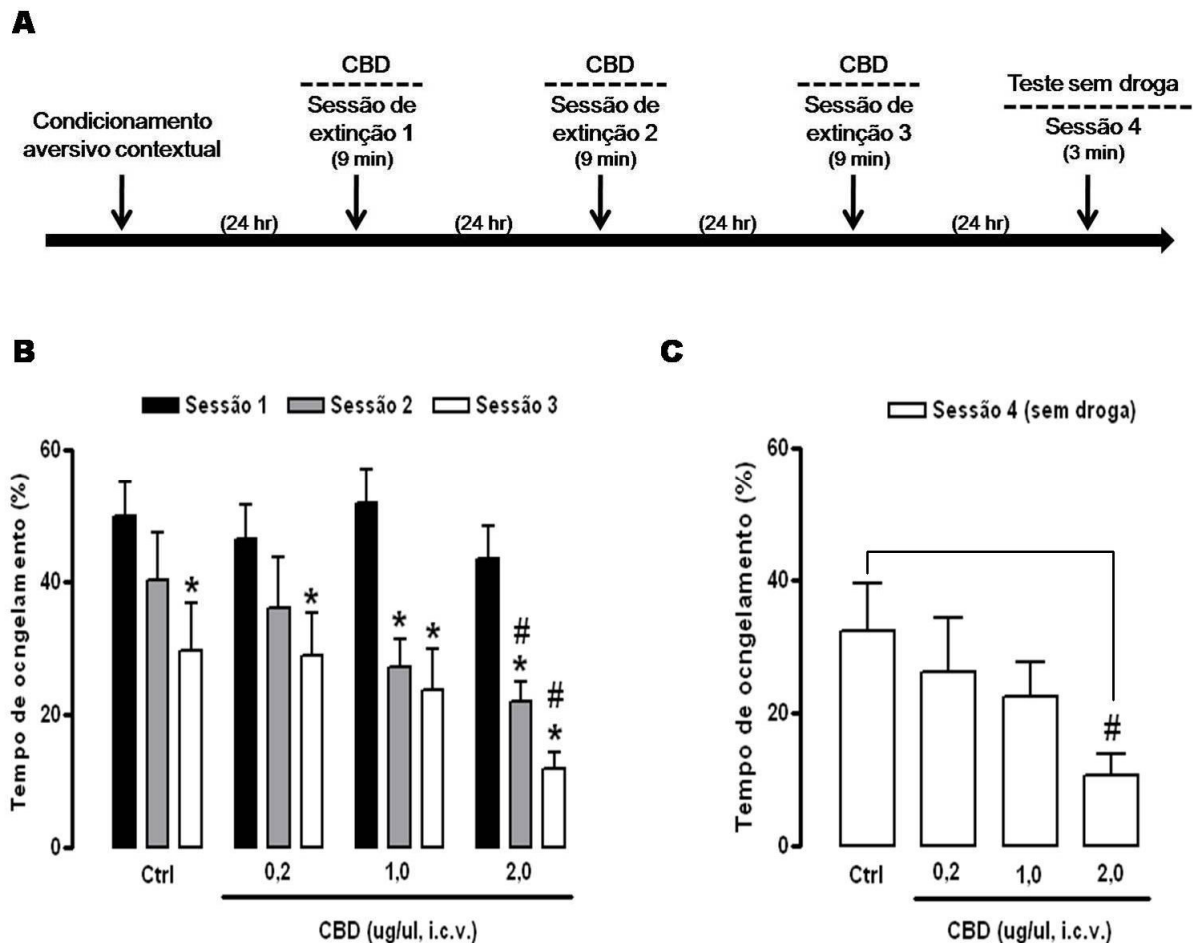


Figura 12 – Efeitos da administração i.c.v. de CBD (0,2; 1,0; 2,0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) na extinção do CA contextual. (A) Representação esquemática do procedimento utilizado no experimento 2. (B) Média \pm E.P.M. da % de tempo de congelamento expressa pelos animais tratados com CBD e submetidos a 3 exposições de 9 min à gaiola de condicionamento, com intervalo de 24 h (cada barra representa os dados de uma sessão). (C) Média e E.P.M. da % do tempo de congelamento expressa pelos mesmos grupos de animais durante uma única exposição de 3 min à gaiola de condicionamento, na ausência de tratamento farmacológico, 24 h após a última sessão de extinção. * $p < 0,05$ comparado à primeira sessão do respectivo grupo. # $p < 0,05$ comparado à respectiva sessão do grupo controle (teste LSD de Fisher). (Controle/ $n=13$, CBD 0,2/ $n=10$, CBD 1,0/ $n=11$, CBD 2,0/ $n=12$).

4.1.3 - Experimento 3: Participação dos receptores canabinóides CB_1 nos efeitos facilitatórios do AM404.

A representação esquemática do procedimento experimental utilizado no Experimento 3 encontra-se ilustrado na figura 13A. Os efeitos do pré-tratamento com SR (0,2 mg/kg, i.p.) e do tratamento com AM404 (1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, i.c.v.) sobre extinção do CA contextual estão

representados nas figuras 13B e 13C. A ANOVA de três vias para os resultados da extinção do CA contextual revelou efeitos significativos para os fatores tratamento [$F(1,117)=5,61$; $p<0,05$], sessões [$F(2,117)=17,27$; $p<0,001$] e para a interação entre os fatores pré-tratamento x tratamento [$F(1,117)=4,84$; $p<0,05$]. A análise *post-hoc* destes dados demonstrou que o tratamento com AM404 facilitou a extinção do CA contextual, reforçando os dados do Experimento 1. Por outro lado, o tratamento com SR previamente à administração de AM404 preveniu a ocorrência deste fenômeno ($p<0,05$; 2ª e 3ª sessões comparadas ao grupo tratado com AM404) em uma dose que *per se* não exerceu influência sobre a extinção do CA contextual. Estes resultados evidenciam que o AM404 facilita a extinção do CA contextual através da ativação dos receptores canabinóides CB₁ (Fig. 13B).

A ANOVA de duas vias para o teste sem droga (sessão 4) revelou efeitos significativos para os fatores tratamento [$F(1,39)=4,52$; $p<0,05$] e para a interação entre os fatores pré-tratamento x tratamento [$F(1,39)=5,03$; $p<0,05$]. O grupo tratado com AM404 (1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ i.c.v.) apresentou uma diminuição na % do tempo de congelamento se comparado ao grupo controle ($p<0,05$), confirmando a tendência observada no experimento 1. Além do mais, o SR antagonizou o efeito da administração de AM404, que por sua vez passou a não mais apresentar uma diminuição na % do tempo de congelamento se comparada ao grupo controle ($P>0,05$) (Fig. 13C).

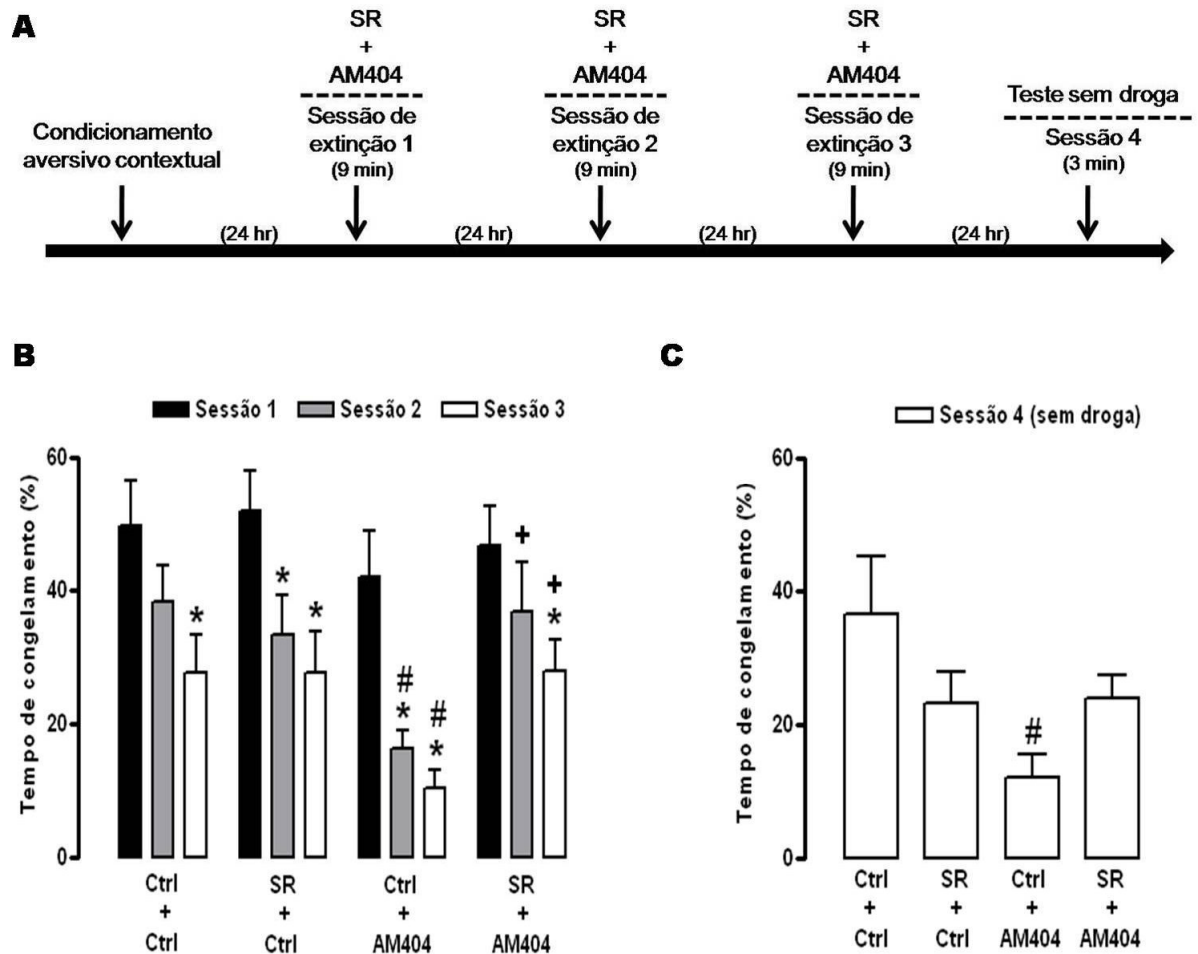


Figura 13 – Efeitos do antagonista dos receptores canabinóides CB_1 SR141716A (0,2 mg/kg; i.p.) nos efeitos facilitatórios do AM404 (1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; i.c.v.). (A) Representação esquemática do procedimento utilizado no experimento 3. (B) Média \pm E.P.M. da % de tempo de congelamento expressa pelos animais pré-tratados com SR e tratados com AM404 e submetidos a 3 exposições de 9 min à gaiola de condicionamento, com intervalo de 24 h (cada barra representa os dados de uma sessão). (C) Média e E.P.M. da % do tempo de congelamento expressa pelos mesmos grupos de animais durante uma única exposição de 3 min à gaiola de condicionamento, na ausência de tratamento farmacológico, 24 h após a última sessão de extinção. * $p < 0,05$ comparado à primeira sessão do respectivo grupo. # $p < 0,05$ comparado à respectiva sessão do grupo controle. + $p < 0,05$ comparado a respectiva sessão do grupo Ctrl+AM404 (teste LSD de Fisher). (Ctrl+Ctrl/ $n=11$, SR+Ctrl/ $n=12$, Ctrl+AM404/ $n=9$, SR+AM404/ $n=11$).

4.1.4 - Experimento 4: Participação dos receptores CB_1 nos efeitos facilitatórios do CBD.

Os efeitos do pré-tratamento com SR e do tratamento com CBD, sobre a extinção de memórias aversivas, foram investigados utilizando o modelo do CA contextual da mesma forma como mostrado no experimento anterior. A representação esquemática do procedimento experimental utilizado no Experimento 4 encontra-se ilustrado na figura 14A.

Os resultados deste experimento estão representados nas figuras 14B e 14C. A ANOVA de três vias para estes resultados revelou efeitos significativos para os fatores tratamento [$F(1,105)=7,66$; $p<0,01$], sessões [$F(2,105)=16,32$; $p<0,001$] e para interação entre os fatores pré-tratamento x tratamento [$F(1,105)=3,87$; $p<0,05$]. A análise *post-hoc* destes dados demonstrou que o tratamento com CBD mais uma vez foi capaz de facilitar a extinção do CA contextual. De maneira interessante, o pré-tratamento com SR, em uma dose que *per se* mostrou-se ineficaz, foi capaz de prevenir a ocorrência deste fenômeno ($p<0,05$; 2ª e 3ª sessões comparadas ao grupo tratado com CBD). Estes resultados evidenciam a ativação dos receptores canabinóides CB₁ nos efeitos facilitatórios promovidos pelo CBD (Fig. 14B).

A ANOVA de duas vias para o teste sem droga (sessão 4) revelou efeito significativo para a interação entre os fatores pré-tratamento x tratamento [$F(1,35)=4,72$; $p<0,05$]. O grupo tratado com CBD (2,0 µg/µl i.c.v.) apresentou uma diminuição na % do tempo de congelamento se comparado ao grupo controle ($p<0,05$). Este resultado vem a reforçar as evidências sugeridas pela comparação direta (através de teste T) realizada no experimento 2. O efeito observado foi antagonizado pelo pré-tratamento com o SR ($p<0,05$) (Fig. 14C).

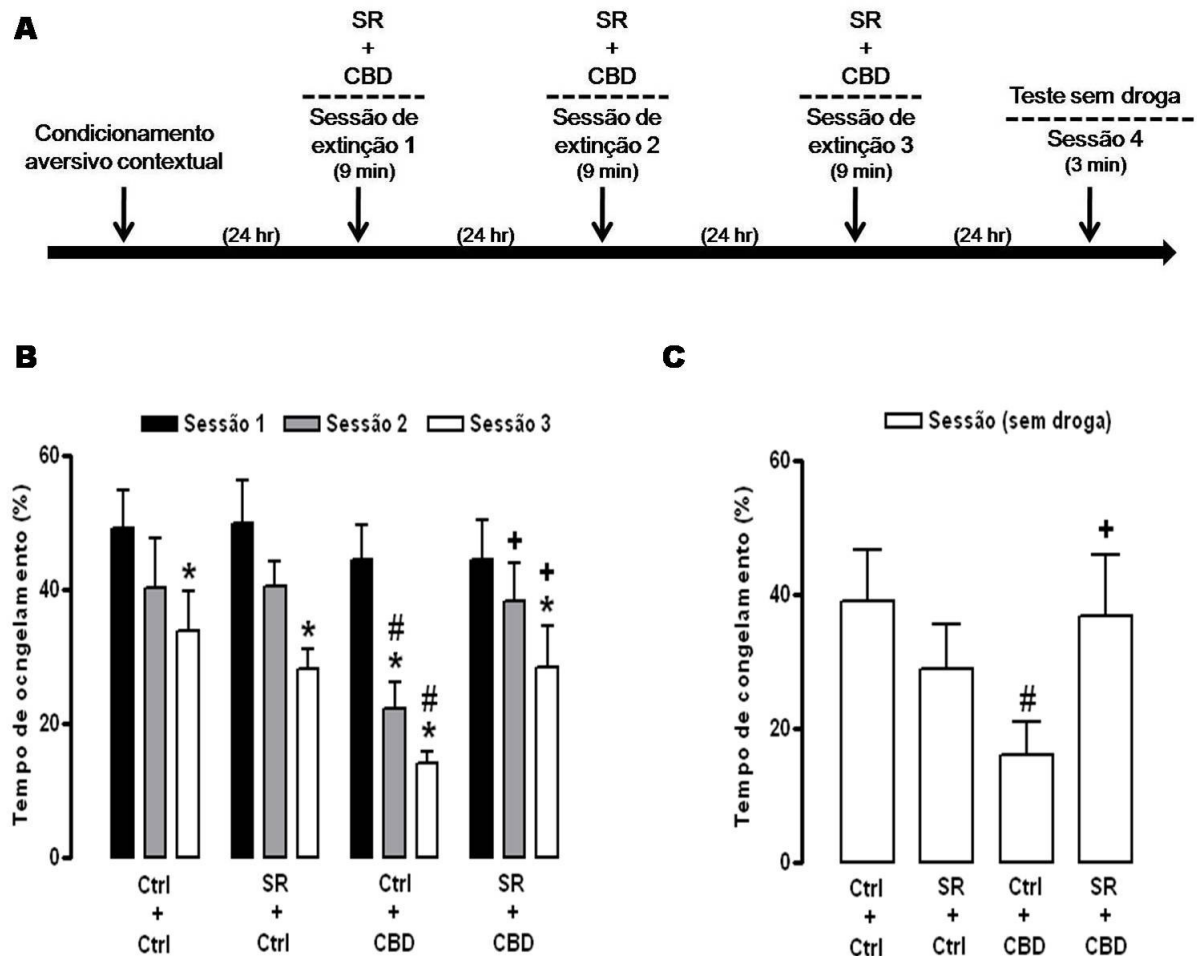


Figura 14 - Efeitos do antagonista SR141716A (0,2 mg/kg; i.p.) nos efeitos facilitatórios do CBD (2,0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; i.c.v.). (A) Representação esquemática do procedimento utilizado no experimento 4. (B) Média \pm E.P.M. da % de tempo de congelamento expressa pelos animais pré-tratados com SR e tratados com CBD e submetidos a 3 exposições de 9 min à gaiola de condicionamento, com intervalo de 24 h (cada barra representa os dados de uma sessão). (C) Média e E.P.M. da % do tempo de congelamento expressa pelos mesmos grupos de animais durante uma única exposição de 3 min à gaiola de condicionamento, na ausência de tratamento farmacológico, 24 h após a última sessão de extinção. * $p < 0,05$ comparado à primeira sessão do respectivo grupo. # $p < 0,05$ comparado à respectiva sessão do grupo controle. + $p < 0,05$ comparado a respectiva sessão do grupo Ctrl+CBD (teste LSD de Fisher). (Ctrl+Ctrl/ $n=9$, SR+Ctrl/ $n=10$, Ctrl+CBD/ $n=11$, SR+CBD/ $n=9$).

4.1.5 - Experimento 5: Participação dos receptores vanilóides TRPV_1 nos efeitos facilitatórios do AM404.

A representação esquemática do procedimento experimental utilizado no Experimento 5 encontra-se ilustrado na figura 15A. Os efeitos do pré-tratamento com CPZ (5,0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, i.c.v.) e do tratamento com AM404 (1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, i.c.v.) sobre a extinção do CA contextual estão

representados nas figuras 15B e 15C. A ANOVA de três vias para estes resultados revelou efeitos significativos para os fatores tratamento [$F(1,90)=16,97$; $p<0,001$], sessões [$F(2,90)=39,22$; $p<0,001$] e para interação entre estes fatores [$F(2,90)=7,02$; $p<0,01$]. A análise *post-hoc* destes dados demonstrou que o tratamento com AM404 mais uma vez foi capaz de facilitar a extinção do CA contextual. O pré-tratamento com CPZ, em uma dose que *per se* não exerceu nenhum efeito, não antagonizou este efeito. Ao que parecem, os efeitos facilitatórios do AM404 sobre a extinção do CA, não estão relacionados à ativação dos receptores vanilóides TRPV₁ (Fig. 15B).

A ANOVA de duas vias para o teste sem droga (sessão 4) revelou efeito significativo para o fator tratamento [$F(1,30)=14,23$; $p<0,001$]. Os animais tratados com AM404 (1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, i.c.v.), mesmo aqueles que receberam o pré-tratamento com CPZ, continuaram apresentando uma diminuição na % do tempo de congelamento quando comparado ao grupo controle ($p<0,05$) (Fig. 15C).

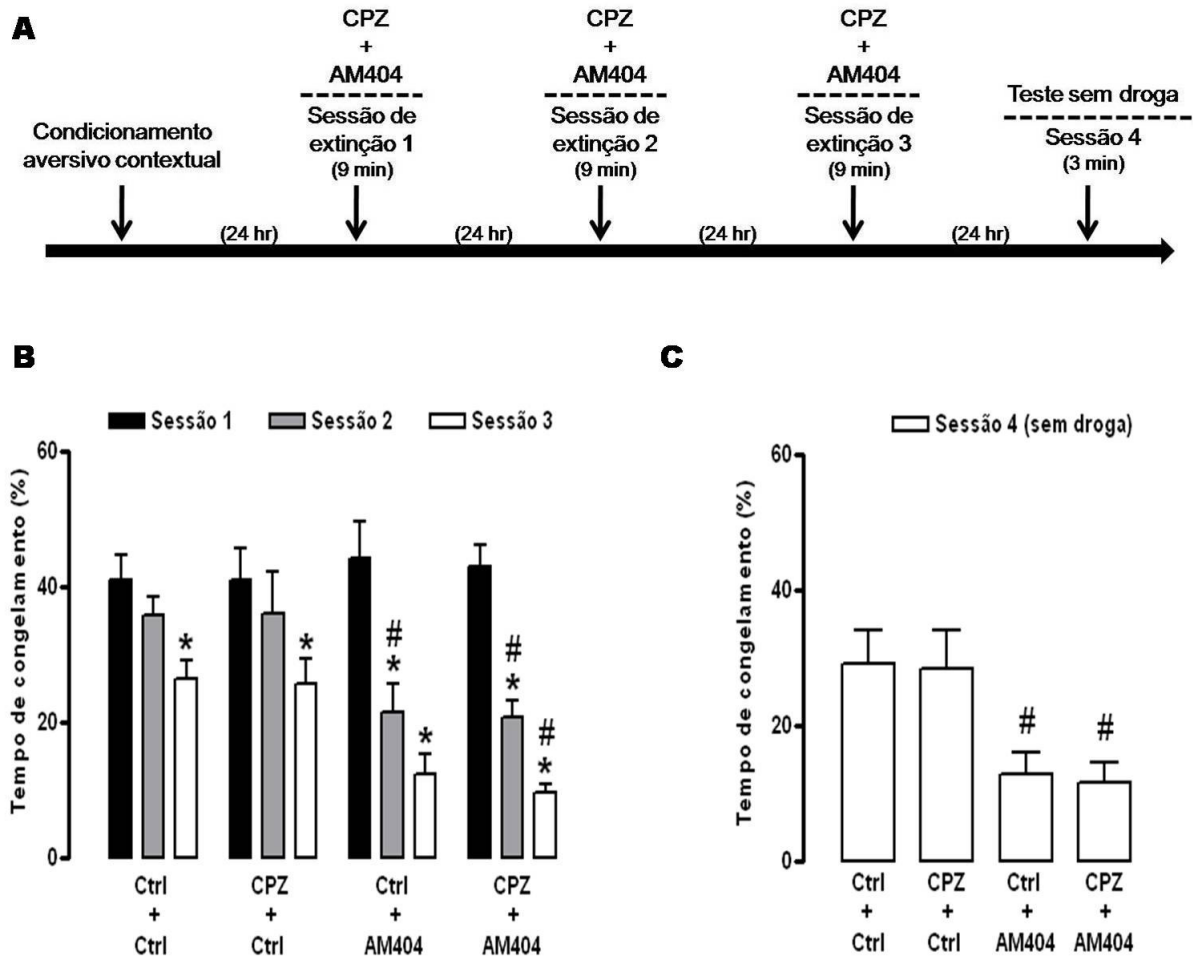


Figura 15 - Efeitos do antagonista dos receptores vanilóides VR_1 CPZ (5,0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; i.c.v.) nos efeitos facilitatórios do AM404 (1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; i.c.v.). (A) Representação esquemática do procedimento utilizado no experimento 5. (B) Média \pm E.P.M. da % de tempo de congelamento expressa pelos animais pré-tratados com CPZ e tratados com AM404 e submetidos a 3 exposições de 9 min à gaiola de condicionamento, com intervalo de 24 h (cada barra representa os dados de uma sessão). (C) Média e E.P.M. da % do tempo de congelamento expressa pelos mesmos grupos de animais durante uma única exposição de 3 min à gaiola de condicionamento, na ausência de tratamento farmacológico, 24 h após a última sessão de extinção. * $p < 0,05$ comparado à primeira sessão do respectivo grupo. # $p < 0,05$ comparado à respectiva sessão do grupo controle (teste LSD de Fisher). (Ctrl+Ctrl/n=8, CPZ+Ctrl/n=9, Ctrl+AM404/n=8, CPZ+AM404/n=9).

4.1.6 - Experimento 6: Participação dos receptores $TRPV_1$ nos efeitos facilitatórios do CBD.

A representação esquemática do procedimento experimental utilizado no Experimento 6 encontra-se ilustrado na figura 16A. Os efeitos do pré-tratamento com CPZ (5,0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, i.c.v.) e do tratamento com CBD (2,0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, i.c.v.) sobre a extinção do CA contextual estão representados nas figuras 16B e 16C. A ANOVA de três vias para estes resultados revelou

efeitos significativos para os fatores tratamento [$F(1,99)=23,00$; $p<0,001$], sessões [$F(2,99)=30,01$; $p<0,001$] e para interação entre estes fatores [$F(2,99)=3,56$; $p<0,05$]. A análise *post-hoc* destes dados mostrou que ambos os grupos tratados com CBD, que receberam o pré-tratamento com CPZ e os que não receberam, mostraram uma diminuição na % do tempo de congelamento ($p<0,05$; 2ª e 3ª sessões comparadas ao grupo controle). Isso implica em dizer que os efeitos facilitatórios do CBD sobre a extinção do CA não parecem estar relacionado à ativação dos receptores vanilóides TRPV₁ (Fig. 16B).

A ANOVA de duas vias para o teste sem droga (sessão 4) revelou efeito significativo para o fator tratamento [$F(1,33)=27,80$; $p<0,001$]. A análise *post-hoc* destes dados mostrou que os efeitos facilitatórios do CBD, anteriormente observados em ambos os grupos, permaneceram mesmo no teste sem droga (Fig. 16C).

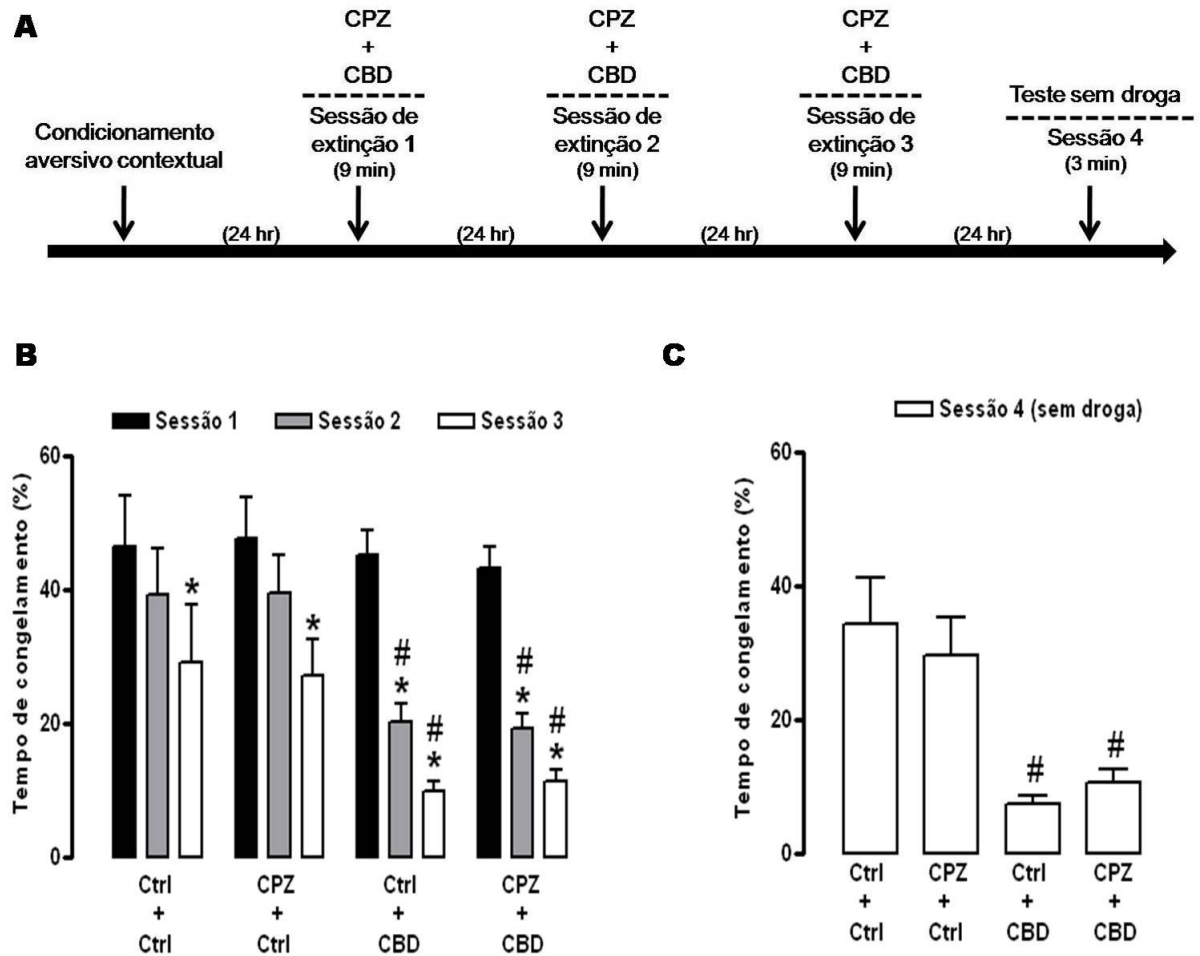


Figura 16 - Efeitos do antagonista CPZ (5,0 µg/µl; i.c.v.) nos efeitos facilitatórios do CBD (2,0 µg/µl; i.c.v.). (A) Representação esquemática do procedimento utilizado no experimento 6. (B) Média ± E.P.M. da % de tempo de congelamento expressa pelos animais pré-tratados com CPZ e tratados com CBD e submetidos a 3 exposições de 9 min à gaiola de condicionamento, com intervalo de 24 h (cada barra representa os dados de uma sessão). (C) Média e E.P.M. da % do tempo de congelamento expressa pelos mesmos grupos de animais durante uma única exposição de 3 min à gaiola de condicionamento, na ausência de tratamento farmacológico, 24 h após a última sessão de extinção. * $p < 0,05$ comparado à primeira sessão do respectivo grupo. # $p < 0,05$ comparado à respectiva sessão do grupo controle (teste LSD de Fisher). (Ctrl+Ctrl/n=8, CPZ+Ctrl/n=9, Ctrl+CBD/n=10, CPZ+CBD/n=10).

4.2 – LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO POTENCIALIZADO PELO MEDO

Existem evidências de que a manipulação do sistema canabinoide pode influenciar o comportamento tipo ansiedade de animais avaliados no LCE (Haller, Varga *et al.*, 2004). Por este motivo, e para investigar a possível influência do sistema canabinoide no comportamento tipo ansiedade provocados pela recordação de memórias aversivas, os animais foram

avaliados no modelo do LCE potencializado pelo medo, previamente proposto por Mechiel Korte e De Boer (Mechiel Korte e De Boer, 2003).

4.2.1 - Experimento 7: Efeitos do AM404, CBD e DZP no LCE potencializado pelo medo.

Os efeitos do AM404, CBD e do DZP sobre a ansiedade provocada pela recordação de memórias aversivas foram investigados utilizando o modelo do LCE potencializado pelo medo. A representação esquemática do procedimento experimental utilizado no Experimento 7 encontra-se ilustrado na figura 17A. Os efeitos do AM404, CBD e DZP no teste do LCE potencializado pelo medo estão representados nas figuras 17B, 17C e 17D. A ANOVA de duas vias para o parâmetro % de tempo de permanência nos braços abertos revelou efeito significativo para o fator condição (submetidos e não submetidos ao CA) [$F(1,42)=5,74$; $p<0,05$] e para interação entre os fatores tratamento x condição [$F(2,42)=3,50$; $p<0,05$]. A análise *post-hoc* demonstrou que o grupo controle condicionado exibiu uma menor % de tempo nos braços abertos quando comparado ao grupo controle não condicionado ($p<0,05$), sugerindo um efeito tipo ansiogênico como resultado do procedimento do CA contextual. O grupo tratado com AM404 (1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, i.c.v.), previamente submetido ao condicionamento, mostrou um aumento na % de tempo nos braços abertos quando comparados ao grupo controle condicionado ($p<0,05$). Já o grupo tratado com CBD (2,0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, i.c.v.), previamente submetido ao condicionamento, demonstrou apenas uma tendência para este aumento ($p=0,09$). O tratamento com AM404 ou CBD não afetou a % de tempo nos braços abertos dos animais não condicionados. A ANOVA de duas vias para os efeitos do tratamento com o controle positivo DZP (2,85 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, i.c.v.) revelou efeito significativo para o fator tratamento [$F(1,31)=11,38$; $p<0,01$] no parâmetro % de tempo nos braços abertos. A análise *post-hoc*

indicou que o diazepam (2,85 µg/µl, i.c.v.) aumentou a % de tempo nos braços abertos em ambos os grupos, condicionado e não condicionado ($p < 0,05$) (Fig. 17B).

A ANOVA de duas vias para o parâmetro número de entradas nos braços abertos revelou efeito significativo para os fatores tratamento [$F(2,42)=5,20$; $p < 0,01$], condição [$F(1,42)=5,65$; $p < 0,05$] e interação entre estes dois fatores [$F(2,42)=5,04$; $p < 0,05$]. A análise *post-hoc* demonstrou que o grupo controle condicionado exibiu reduzida % de entradas nos braços abertos quando comparados ao grupo controle não condicionado ($p < 0,05$), reforçando o efeito tipo ansiogênico observado no parâmetro % de tempo nos braços abertos. O tratamento com AM404 (1,0 µg/µl, i.c.v.) ou CBD (2,0 µg/µl, i.c.v.) aumentou a % de entrada nos braços abertos dos animais submetidos ao condicionamento ($p < 0,05$) sem afetar a % de entrada nos braços abertos dos animais não condicionados. A ANOVA de duas vias para os efeitos do tratamento com o controle positivo DZP (2,85 µg/µl, i.c.v.) revelou efeitos significativos para os fatores tratamento [$F(1,31)=34,35$; $p < 0,001$], condição [$F(1,31)=9,46$; $p < 0,01$] e interação entre estes dois fatores [$F(1,31)=5,81$; $p < 0,05$] no parâmetro % de entrada nos braços abertos. A análise *post-hoc* indicou que o diazepam (2,85 µg/µl, i.c.v.) aumentou a % de entrada nos braços abertos em ambos os grupos, condicionado e não condicionado ($p < 0,05$) (Fig. 17C).

Não houve efeitos significantes para os fatores tratamento ou condição no parâmetro número de entradas nos braços fechados (Fig. 17D).

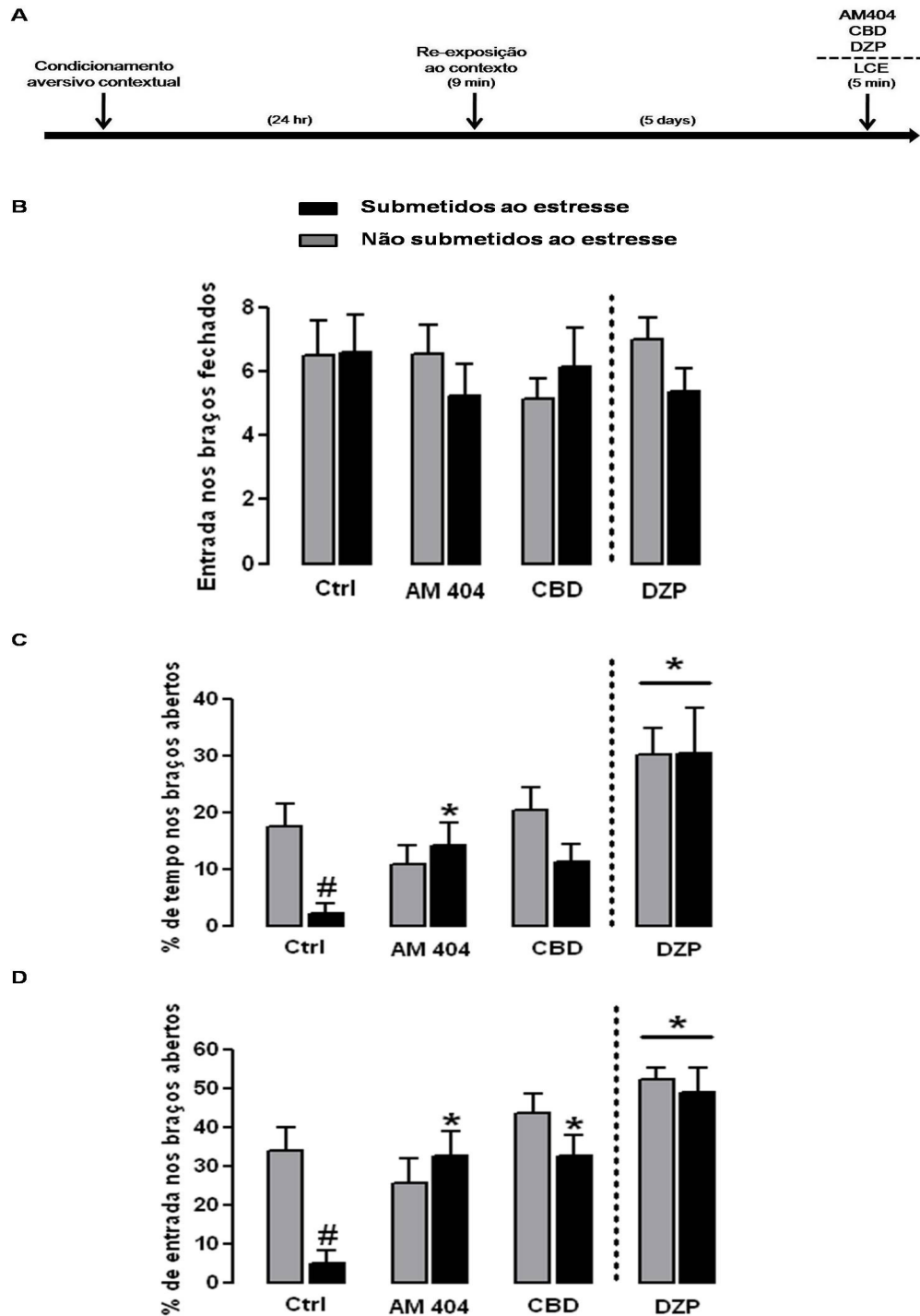


Figura 17 – Efeitos da administração i.c.v. de AM404 (1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), CBD (2,0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) e DZP (2,85 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) no LCE potencializado pelo medo. (A) Representação esquemática do procedimento utilizado no experimento 7. (B) Média \pm E.P.M. da % de tempo nos braços abertos expressa pelos animais tratados com AM404, CBD ou DZP e expostos por 5 min ao teste do LCE potencializado pelo medo. (C) Média \pm E.P.M. da % de entradas nos braços abertos expressa pelos mesmos grupos de animais durante a mesma exposição ao teste do LCE potencializado pelo medo. (D) Média \pm E.P.M. do número de entradas nos braços fechados expressa pelos mesmos grupos de animais durante a mesma exposição ao teste do LCE potencializado pelo medo. * $p < 0,05$ comparado a respectiva condição do grupo controle. # $p < 0,05$ comparado ao grupo controle não submetido ao CA (teste LSD de Fisher). (submetidos ao CA: Ctrl/n=7, AM404/n=8, CBD/n=8, DZP/n=11; não submetidos ao CA: Ctrl/n=8, AM404/n=9, CBD/n=8, DZP/n=9).

5 - DISCUSSÃO

O presente estudo demonstra que a apresentação de um estímulo condicionado, neste caso o contexto, concomitante a um componente aversivo, o choque, induz a formação de uma memória aversiva associativa, em um processo denominado CA contextual. A administração i.c.v. do inibidor da recaptação de anandamida, o AM404, facilitou a extinção do CA contextual em ratos, reforçando a idéia de outros estudos os quais mostram que o aumento dos níveis de eCB pode levar a facilitação da extinção do CA em animais. De forma mais interessante, a administração i.c.v. do fitocanabinóide CBD também foi capaz de facilitar a extinção do CA contextual em ratos de maneira dose dependente. Estes resultados mostram de forma pioneira a facilitação da extinção do CA contextual sendo promovida pelo AM404 e por um fitocanabinóide (CBD). Ambos os efeitos encontrados para o AM404 e o CBD sobre a extinção do CA contextual foram revertidos pela administração prévia do antagonista dos receptores canabinóides CB₁, o SR141716A, mas não pelo antagonista seletivo dos receptores vanilóides TRPV₁, a CPZ. O efeito antagônico apenas por parte do SR nos permite sugerir farmacologicamente que os efeitos facilitatórios aqui encontrados estão relacionados à ativação dos receptores canabinóides CB₁. Além do mais, estes efeitos facilitatórios do AM404 e do CBD parecem ser persistentes, visto que os mesmos permaneceram inalterados quando avaliado em um teste livre de droga, realizado 24 h após a última sessão de extinção. Efeitos do tipo ansiolítico não parecem ter contribuído de forma direta para os efeitos facilitatórios destas drogas sobre a extinção do CA contextual, visto a ausência de efeitos sobre os animais “naïve” expostos ao modelo do LCE. De qualquer forma, é importante ressaltar que estes efeitos podem ter contribuído de uma forma indireta, como

sugerida pelos efeitos anti-ansiolíticos do AM404 e do CBD observados no teste do LCE potencializado pelo medo.

A facilitação da extinção do CA contextual promovida pela administração i.c.v. de AM404 (1,0 µg/µl) (Figura 11) evidencia a participação do sistema eCB na regulação de estados emocionais induzidos pela evocação de memórias aversivas. Estes resultados reforçam achados de estudos recentes os quais mostram a importância do sistema eCB no processo de extinção destas memórias. Alguns destes estudos têm mostrado que a administração de baixas doses de agonistas canabinóides exógenos são capazes tanto de facilitar a flexibilidade comportamental (Hill, Froese *et al.*, 2006) como também a extinção do CA contextual em ratos, mostrado recentemente de forma pioneira em um trabalho desenvolvido pelo nosso grupo (Pamplona, Prediger *et al.*, 2006). Neste mesmo sentido, um estudo de Chhatwal e colaboradores (2005) mostrou que a potencialização da transmissão eCB facilita a extinção do sobressalto potencializado pelo medo em ratos, estando este achado diretamente relacionado aos resultados aqui obtidos com o AM404. Embora estes resultados sejam oriundos de modelos comportamentais diferentes, ambos evidenciam o efeito facilitatório promovido pela potencialização do sistema eCB sobre a extinção de memórias aversivas.

Nossos resultados reforçam o importante papel dos receptores canabinóides CB₁ (Figura 13), mas não dos receptores vanilóides TRPV₁ (Figura 15), na extinção do medo condicionado em roedores. Isso condiz com estudos anteriores os quais mostram que tanto a deleção gênica para o receptor CB₁ quanto o bloqueio farmacológico destes receptores induzem um enfático prejuízo na extinção do medo condicionado, ou seja, mostram a participação indispensável destes receptores no processo de extinção de memórias aversivas (Marsicano, Wotjak *et al.*, 2002; Suzuki, Josselyn *et al.*, 2004; Kamprath, Marsicano *et al.*, 2006). Adicionalmente, Marsicano e colaboradores (2002) mostraram também a participação

dos eCB no processo de extinção de memórias aversivas. Através de experimentos de microdiálise, estes pesquisadores puderam perceber a liberação de ambos, anandamida e 2-AG na amígdala basolateral (BLA) durante o protocolo de extinção do CA. Esta região está intensamente envolvida com o processamento de informações emocionais neste modelo comportamental e estima-se que alterações de plasticidade sináptica na BLA estejam envolvidas com os processos de extinção de memórias aversivas (Quirk e Mueller, 2008). Seguindo este pensamento, é bastante provável que o AM404, mesmo que administrado i.c.v., tenha exercido grande parte dos seus efeitos facilitatórios através da inibição da recaptação de anandamida na região da BLA. Os possíveis mecanismos celulares que viriam a sustentar estes efeitos nesta estrutura serão discutidos mais adiante.

Ainda que o presente estudo esteja mais voltado para a extinção de memórias aversivas, é importante salientar que os efeitos da manipulação do sistema canabinóide sobre a extinção de memórias não se restringem apenas a este tipo de memória. Resultados semelhantes também foram observados na tarefa reversa do labirinto aquático (Varvel e Lichtman, 2002; Varvel, Anum *et al.*, 2005; Pamplona, Prediger *et al.*, 2006) e na preferência condicionada de lugar (Parker, Burton *et al.*, 2004), mas não em tarefas de condicionamento operante como, por exemplo, a obtenção de alimentos (Holter, Kallnik *et al.*, 2005; Niyuhire, Varvel *et al.*, 2007).

Como objetivo principal, investigamos os efeitos do fitocanabinóide CBD sobre a extinção do CA e comparamos estes efeitos aos efeitos anteriormente obtidos com o já conhecido inibidor da recaptação de anandamida AM404. De forma bastante interessante o CBD (2,0 µg/µl, i.c.v) facilitou a extinção do CA contextual em ratos (Figura 12) de maneira similar aos animais tratados com AM404 (1,0 µg/µl, i.c.v.). Embora, até então, não existisse nenhum trabalho mostrando os efeitos do CBD sobre a extinção de memórias aversivas, um trabalho feito por Parker e colaboradores (2004) mostrou que o CBD, assim como o Δ^9 -THC,

facilita a extinção da preferência condicionada de lugar para cocaína e anfetamina. Este trabalho, mesmo que não tenha abordando especificamente memórias aversivas, nos forneceu os primeiros indícios da possibilidade de facilitação da extinção de memórias através da utilização do CBD.

De forma ainda mais interessante, o efeito facilitatório do CBD, assim como os efeitos do AM404, foi prevenido pela administração prévia de um antagonista seletivo para os receptores canabinóides CB₁, SR141716A (0,2 mg/kg, i.p.), em uma dose que *per se* provou-se ineficaz (Figura 14). Curiosamente, a facilitação da extinção em curto prazo (já na primeira sessão), observado após a administração de baixas doses do agonista canabinóide WIN55212-2 em um protocolo comportamental semelhante (Pamplona, Prediger *et al.*, 2006), não foi observada após a administração de AM404 ou CBD. Os efeitos mais a longo prazo (apenas na 2ª sessão) do AM404 e do CBD, sugerem que estas drogas podem estar atuando de forma indireta sobre os receptores CB₁. Considerando estudos prévios *in vitro*, os quais indicam que o CBD tem apenas uma baixa afinidade pelos receptores CB₁ (Petitet, Jeantaud *et al.*, 1998; Thomas, Gilliam *et al.*, 1998) mas podem atuar inibindo a recaptação e degradação da anandamida (Watanabe, Kayano *et al.*, 1996; Bisogno, Hanus *et al.*, 2001), nós sugerimos que o aumento dos níveis endógenos de anandamida poderia ser um mecanismo de ação em comum para o AM404 e CBD sobre o sistema eCB (Beltramo, Stella *et al.*, 1997; Giuffrida, Rodriguez De Fonseca *et al.*, 2000; Freund, Katona *et al.*, 2003). Este possível mecanismo de ação viria em parte explicar o motivo pelo qual o AM404 e o CBD, ao contrário do WIN55212-2, não promovem uma extinção a curto prazo. O WIN55212-2, como agonista canabinóide, age diretamente nos receptores CB₁, ao contrário do AM404 e do CBD, que necessitariam de um tempo para que a anandamida fosse produzida, liberada e só então, após este período de tempo, passariam a exercer suas ações sobre a recaptação e degradação deste eCB. Estudos realizados em nosso laboratório, num protocolo de extinção do CA com uma

única sessão de 30 minutos onde o comportamento de congelamento foi analisado a cada 3 minutos, mostram que o AM404 passa a exercer seus efeitos facilitatórios sobre a extinção apenas no 12º minuto, enquanto que o WIN55212-2 passa a exercer este efeito já no 6º minuto (Pamplona, Bitencourt *et al.*, 2008). Considerando estes resultados, uma única sessão de 9 minutos não teria tempo o suficiente (12 minutos) para que a anandamida fosse produzida, liberada e, conseqüentemente, sofresse a ação do AM404 e supostamente do CBD. Entretanto, estudos adicionais seriam necessários para se confirmar tal hipótese.

Considerando a discussão anterior, uma pergunta que nos vem em mente é a seguinte: o que estaria acontecendo neste período que antecede a liberação dos eCB? Uma idéia inovadora, que tem surgido na tentativa de responder esta pergunta e até mesmo explicar o envolvimento do sistema eCB na extinção de memórias aversivas, é a idéia da participação do estresse no processo de extinção deste tipo de memória. Esta idéia parte do principio de que a primeira exposição ao EC (neste caso contexto, previamente pareado com o choque) desencadeie uma situação de estresse que, por conseqüência, aumentaria a liberação de hormônios do estresse como a corticosterona (Cordero, Merino *et al.*, 1998; Cordero e Sandi, 1998) e estes, por sua vez, estariam promovendo o aumento da produção e liberação de endocanabinóides na amígdala (Hill, Ho *et al.*, 2005). Se assim for, a situação de estresse, neste caso caracterizada principalmente pela primeira exposição, torna-se imprescindível para que haja a extinção de uma memória aversiva. Prova disto é que ansiolíticos clássicos como os benzodiazepínicos, os quais são capazes de bloquear esta situação de estresse, podem prejudicar a extinção de memórias de medo quando utilizados clinicamente (Otto, Bruce *et al.*, 2005). Outros estudos, por sua vez, têm mostrado que a administração sistêmica ou intra-amígdala de glicocorticóides é capaz de facilitar a extinção do medo condicionado (Yang, Chao *et al.*, 2006; Yang, Chao *et al.*, 2007), porém estes estudos não deixam claro de que forma os glicocorticóides estariam desempenhando esta função. Pensando nisso, podemos

supor que no período que antecede os efeitos facilitatórios do AM404 e do CBD ocorra uma situação de estresse que leve ao aumento da produção de corticosteróides. Consecutivamente, tem-se o aumento na produção e liberação de anandamida que, por sua vez, será passível da ação do AM404 e supostamente do CBD.

Outra possível explicação farmacológica para os efeitos do AM404 e do CBD poderia ser uma interação com os receptores vanilóides TRPV₁ (Bisogno, Hanus *et al.*, 2001). Isto porque se sabe, que assim como o CBD (Bisogno, Hanus *et al.*, 2001), o próprio AM404 ou até mesmo a anandamida podem atuar ligando-se de forma direta a este tipo de receptor (Zygmunt, Petersson *et al.*, 1999; Rawls, Ding *et al.*, 2006). Portanto, o AM404 e o CBD poderiam estar exercendo seus efeitos de forma direta, ao se ligarem a estes receptores, ou de forma indireta, através da inibição da liberação de anandamida. Além do mais, estudos têm mostrado uma densa expressão destes receptores em regiões cerebrais conhecidas por desempenhar um importante papel nos processos de aprendizado e memória, como hipocampo e amígdala (Cortright, Crandall *et al.*, 2001; Szabo, Biro *et al.*, 2002; Roberts, Davis *et al.*, 2004; Toth, Boczan *et al.*, 2005). Outro estudo mostrou também a co-expressão de receptores vanilóides TRPV1 e canabinóides CB1 no SNC, sugerindo uma possível interação entre estes receptores nesta região (Cristino, De Petrocellis *et al.*, 2006). No entanto, esta possível interação parece improvável nos resultados aqui observados visto que o antagonista dos receptores TRPV₁, CPZ (5,0 µg/µl, i.c.v.), não foi capaz de antagonizar os efeitos do AM404 (Figura 15) e do CBD (Figura 16) sobre a extinção do medo condicionado. Contudo, o papel dos receptores vanilóides TRPV₁ no medo condicionado está apenas começando a ser esclarecido, e muitas outras implicações importantes do sistema vanilóide na formação de memórias poderão ainda ser reveladas (Marsch, Foeller *et al.*, 2007).

Até o momento, discutiram-se basicamente os possíveis mecanismos que antecedem a liberação dos eCB, momento no qual o AM404 e o CBD passam a exercer seus efeitos.

Discutimos também como estas drogas estariam, supostamente, exercendo seus efeitos através de uma ação em comum sobre a inibição da recaptação de anandamida. Porém, tão importante quanto esta discussão, é a discussão acerca dos eventos posteriores a estes efeitos, ou seja, o que estaria acontecendo após a potencialização do sistema eCB. A nível celular, evidências têm sugerido de que a liberação de eCB e a indução de LTD (depressão de longa duração) nos interneurônios GABAérgicos, localizados na BLA e que co-expressam receptores CB₁, estão envolvidos na extinção do medo condicionado (Marsicano, Wotjak *et al.*, 2002; Azad, Monory *et al.*, 2004). Sabe-se que ao aumentar a atividade da BLA através da administração de um antagonista GABA-A, bicuculina, tem-se uma facilitação na extinção de memórias. Este efeito sugere que a atividade na amígdala está envolvida no processo de extinção de uma memória (revisado em Quirk e Mueller, 2008). Como exposto na introdução, os eCB quando liberados de seus sítios pós-sinápticos ligam-se em seus respectivos receptores a nível pré-sináptico e estes, ao atuarem de forma negativa sobre a adenilato ciclase, podem mediar à inibição da liberação de outros neurotransmissores. Dadas estas informações e considerando que o AM404 e o CBD possuem mecanismos de ação em comum, estas drogas poderiam inibir a neurotransmissão GABAérgica amígdalar através da potencialização do sistema eCB e, de forma indireta, promover o aumento da atividade nesta estrutura. Como consequência, teríamos a facilitação na extinção de memórias aversivas, similarmente ao aumento da atividade observado com a administração de bicuculina. No entanto no hipocampo, o sistema eCB pode desempenhar um papel na consolidação de memória, como mostrado pelo bloqueio farmacológico dos receptores CB₁ *in vitro* que culminou no bloqueio da LTP (potenciação de longa duração) nesta estrutura cerebral (De Oliveira Alvares, Genro *et al.*, 2006). De nosso conhecimento, a única evidência da participação do sistema vanilóide em memórias aversivas publicada recentemente, sugere que os receptores TRPV₁ também são importantes para a consolidação destas memórias no hipocampo (Marsch, Foeller *et al.*, 2007). De toda forma,

apesar de diversas evidências terem sido apresentadas sobre a participação do sistema eCB no processo de extinção de memórias, é importante salientar que diferentes mecanismos celulares e moleculares devem estar envolvidos na extinção de memórias de naturezas distintas.

No intuito de investigar se os efeitos até então discutidos do AM404 e do CBD sobre a extinção de memórias aversivas foram agudos (dependente de droga) ou persistentes, uma sessão adicional (sessão 4), na ausência de tratamento farmacológico, foi realizada 24 h após a última sessão de extinção. De forma interessante, mas não surpreendente, pois existem outros trabalhos mostrando os efeitos persistentes dos canabinóides sobre a extinção de memórias aversivas (Chhatwal, Davis *et al.*, 2005; Pamplona, Prediger *et al.*, 2006; Pamplona, Bitencourt *et al.*, 2008), os efeitos do AM404 e do CBD persistiram mesmo quando testados na ausência destas drogas 24 h após as sessões de extinção (Figuras 11C a 16C). Ao considerar que a extinção de uma memória é um processo semelhante ao de um aprendizado, cabe-nos aceitar que esta, como toda forma de aprendizado, poderia estar envolvendo de forma duradoura vários processos de plasticidade sináptica (Toni, Buchs *et al.*, 1999; Segal e Andersen, 2000; Malinow, 2003; Takahashi, Svoboda *et al.*, 2003; Lamprecht, Farb *et al.*, 2006). Sabendo-se que estes processos podem ser modulados, igualmente de forma duradoura, pela manipulação do sistema eCB (Sullivan, 2000; Kim e Thayer, 2001; Cannich, Wotjak *et al.*, 2004; Chevalyere, Takahashi *et al.*, 2006; Marsicano e Lutz, 2006), podemos atribuir a estas modulações os efeitos persistentes do AM404 e do CBD sobre a extinção do CA contextual.

Apesar de existirem evidências bastante contundentes de que os efeitos do AM404 e do CBD até aqui observados sejam de fato sobre a facilitação da extinção de memórias aversivas como, por exemplo, não haver diferença entre os grupos na primeira sessão e a permanência de efeito mesmo num teste livre de drogas, é pertinente o questionamento sobre a influência de um possível efeito ansiolítico por parte destas drogas. Então, finalmente, na

tentativa de investigar se um possível efeito ansiolítico estaria contribuindo para os efeitos facilitatórios das doses selecionadas de AM404 (1,0 µg/µl i.c.v.) e CBD (2,0 µg/µl i.c.v.) sobre a extinção das memórias aversivas, o teste do LCE potencializado pelo medo foi realizado. Este modelo permite, além de observar possíveis efeitos ansiolíticos ou ansiogênicos das drogas em questão, a observação de um possível efeito destas drogas nos níveis de comportamento tipo ansiedade provocada pela evocação de uma memória aversiva. Apesar de evidências anteriores descreverem um efeito ansiolítico para baixas doses de agonistas canabinóides (Berrendero e Maldonado, 2002; Marco, Perez-Alvarez *et al.*, 2004), bem como para o AM404 (Bortolato, Campolongo *et al.*, 2006) e o CBD (Moreira, Aguiar *et al.*, 2006; Resstel, Joca *et al.*, 2006), este experimento indica que o efeito facilitatório destas duas últimas drogas não está diretamente relacionado a um efeito ansiolítico. Como pode ser visto nos resultados, o tratamento com estas doses não alterou o número de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos para os animais “naïve” (Figura 17). Já os animais que passaram pelo procedimento do CA, claramente mostraram um aumento do estado tipo ansiogênico. Este estado ficou evidente pela diminuição no número de entradas, bem como no tempo de permanência nos braços abertos por parte destes animais quando comparados aos animais “naïve” (Figura 17). O presente resultado deixa claro também a eficácia de um estresse agudo, como o protocolo de CA, em induzir um estado tipo ansiogênico nos animais. Inclusive, vai de acordo com uma série de estudos os quais mostraram que a indução de estresse agudo ou crônico é capaz de desencadear tal estado em diferentes modelos comportamentais tanto em animais como também em humanos (Vyas e Chattarji, 2004; Goyal e Anil, 2007; Grillon, Duncko *et al.*, 2007; Bondi, Rodriguez *et al.*, 2008). Contudo, curiosamente, ambas as drogas (AM404 e CBD) revertem o estado tipo ansiogênico dos ratos previamente submetidos ao procedimento de CA sem afetar o comportamento dos animais “naïve” (Figura 17). Dentre os vários fatores que poderiam estar propiciando este

efeito seletivo do AM404 e do CBD, talvez o mais plausível seja a possibilidade de o estresse agudo (CA) proporcionar o aumento da síntese de eCB no sistema límbico, o que, inclusive, sugeriria que a atividade eCB possa desempenhar um papel importante na modulação do estresse e ansiedade (Hill e Gorzalka, 2004). Desta forma, as doses selecionadas de AM404 e CBD, que em níveis normais de anandamida não foram o suficiente para exercer algum efeito, passariam a exercer seus efeitos quando estes níveis estivessem supostamente aumentados, o que implicaria nos efeitos tipo anti-ansiofênicos observados pelo uso destas drogas no teste do LCE potencializado pelo medo. Em adição, esta seria mais uma evidência comportamental de que ambas as drogas, AM404 e CBD, estariam desempenhando um mecanismo de ação em comum. Em contraste, o DZP (2,85 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, i.c.v.), droga utilizada como controle positivo, exerceu efeitos tipo-ansiolíticos em ambos os animais, “naïve” e condicionados (Figura 17). Somados aos resultados obtidos com o DZP, poderíamos até dizer que drogas capazes de aumentarem os níveis de eCB no cérebro, como o AM404 e supostamente o CBD, representariam uma classe original de drogas ansiolíticas. A vantagem estaria na capacidade que estas drogas têm de agirem de forma discriminada apenas em indivíduos com níveis de ansiedade aumentados, ao contrário de ansiolíticos padrões, como o DZP, que agem de forma indiscriminada em qualquer indivíduo, esteja este com alterações nas respostas tipo ansiedade ou não. Além do mais, a capacidade do AM404 e do CBD promoverem a extinção de memórias aversivas sem causarem efeitos tipo ansiofênicos está em desacordo com um estudo (Cain, Blouin *et al.*, 2004) que diz serem potencialmente ansiofênicas as drogas capazes de facilitarem a extinção de memórias aversivas. Lembrando da necessidade de um estado de ansiedade para que se tenha a extinção de uma memória aversiva, é plausível pensar que drogas com a característica de facilitar a extinção destas memórias sejam realmente ansiofênicas. No entanto, o AM404 e o CBD foram capazes de desempenhar esta função mais uma vez de forma diferenciada, sem elevar a ansiedade a níveis ansiofênicos. Finalizando, ao

analisarmos o parâmetro número de entradas nos braços fechados não foram observadas nenhuma diferença entre os tratamentos e suas respectivas condições, submetidos e não submetidos ao condicionamento (Figura 17). Sendo este um parâmetro locomotor (Cruz, Frei *et al.*, 1994), podemos dizer que os tratamentos utilizados, principalmente as doses selecionadas de AM404 e CBD, não afetaram a locomoção dos animais, ou seja, a permanência dos animais em uma posição de imobilidade devido à expressão de comportamento de congelamento não estava relacionada a uma redução da locomoção. Revisando, temos dois compostos (AM404 e CBD) capazes de facilitar a extinção de memórias aversivas, além de reverterem o estado tipo ansiogênico de animais previamente submetidos a uma forma de estresse sem afetar as respostas tipo ansiedade dos animais “naïve”.

Concluindo, o presente trabalho evidencia o papel da manipulação farmacológica do sistema eCB através do AM404 e do CBD sobre a extinção do CA em ratos, utilizado como um modelo animal para o estudo de memórias com motivação aversiva. Juntos, nossos resultados complementam outras linhas de evidências as quais sugerem uma função do sistema eCB na modulação de estados emocionais. Neste sentido, o aumento dos níveis de eCB pela inibição de sua recaptção pode constituir uma abordagem farmacológica interessante para reduzir os efeitos ansiogênicos causados pelo estresse, e ainda promover a extinção de memórias aversivas. Como se sabe, a extinção de memórias aversivas em animais constitui um procedimento experimental análogo ao realizado durante a terapia cognitivo-comportamental, utilizado com sucesso em seres humanos. Estas terapias visam reduzir gradualmente as respostas de ansiedade frente ao motivo gerador de um trauma; contribuindo, por exemplo, para o tratamento de fobias e do estresse pós-traumático (Rothbaum e Schwartz, 2002). Além disso, existem evidências de que uma terapia farmacológica que facilite a extinção do CA em animais pode ser utilizada com sucesso para o tratamento das

mencionadas patologias em seres humanos (Walker e Huang, 2002; Ressler, Rothbaum *et al.*, 2004). Sabendo-se disso e com base nos resultados aqui apresentados, sugerimos que o CBD, um fitocanabinóide abundante que já foi testado com eficácia e segurança em humanos (Zuardi, Shirakawa *et al.*, 1982; Zuardi, Morais *et al.*, 1995), possa ser considerado em estudos futuros que visam avaliar a utilidade dos canabinóides como adjuvantes em psicoterapias para patologias de ansiedade relacionadas à lembrança de eventos traumáticos.

6 - CONCLUSÕES

- A extinção de memórias aversivas no modelo do CA contextual foi facilitada pelo tratamento i.c.v. do fitocanabinóide CBD de forma dose dependente (2,0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$);
- De forma semelhante ao CBD, a extinção do CA contextual foi facilitada pelo tratamento i.c.v. do inibidor da recaptção de anandamida, o AM404, na dose de (1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$);
- Ambos os efeitos facilitatórios descritos anteriormente foram revertidos pela administração prévia de um antagonista dos receptores canabinóides CB₁, o SR141716A, mas não pelo antagonista dos receptores vanilóides TRPV₁, a CPZ, sugerindo farmacologicamente a participação destes receptores canabinóides como mediadores destes efeitos;
- Os efeitos observados do AM404 e do CBD durante as sessões de extinção permaneceram mesmo quando analisados em um teste sem droga, realizado 24 h após a última sessão de extinção, sugerindo que estes foram efeitos persistentes e não apenas efeitos agudos (dependente de drogas);
- Testes realizados no modelo do LCE potencializado pelo medo mostraram que as doses selecionadas de AM404 e CBD foram capazes de reverter o estado tipo ansiogênico de animais previamente submetidos ao modelo do condicionamento aversivo sem afetar as respostas tipo ansiedade dos animais “naïve”.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abel, E. L. Marihuana, the first twelve thousand years. New York: Plenum Press. 1980. xi, 289 p. p.
- Azad, S. C., M. Eder, *et al.* Activation of the cannabinoid receptor type 1 decreases glutamatergic and GABAergic synaptic transmission in the lateral amygdala of the mouse. Learn Mem, v.10, n.2, Mar-Apr, p.116-28. 2003.
- Azad, S. C., K. Monory, *et al.* Circuitry for associative plasticity in the amygdala involves endocannabinoid signaling. J Neurosci, v.24, n.44, Nov 3, p.9953-61. 2004.
- Beltramo, M., E. Di Tomaso, *et al.* Inhibition of anandamide hydrolysis in rat brain tissue by (E)-6-(bromomethylene) tetrahydro-3-(1-naphthalenyl)-2H-pyran-2-one. FEBS Lett, v.403, n.3, Feb 24, p.263-7. 1997.
- Beltramo, M., N. Stella, *et al.* Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. Science, v.277, n.5329, Aug 22, p.1094-7. 1997.
- Berrendero, F. e R. Maldonado. Involvement of the opioid system in the anxiolytic-like effects induced by Delta(9)-tetrahydrocannabinol. Psychopharmacology (Berl), v.163, n.1, Aug, p.111-7. 2002.
- Bisogno, T., L. Hanus, *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. Br J Pharmacol, v.134, n.4, Oct, p.845-52. 2001.
- Blanchard, R. J. e D. C. Blanchard. Crouching as an index of fear. J Comp Physiol Psychol, v.67, n.3, Mar, p.370-5. 1969.
- Bondi, C. O., G. Rodriguez, *et al.* Chronic unpredictable stress induces a cognitive deficit and anxiety-like behavior in rats that is prevented by chronic antidepressant drug treatment. Neuropsychopharmacology, v.33, n.2, Jan, p.320-31. 2008.
- Borsini, F., J. Podhorna, *et al.* Do animal models of anxiety predict anxiolytic-like effects of antidepressants? Psychopharmacology (Berl), v.163, n.2, Sep, p.121-41. 2002.
- Bortolato, M., P. Campolongo, *et al.* Anxiolytic-like properties of the anandamide transport inhibitor AM404. Neuropsychopharmacology, v.31, n.12, Dec, p.2652-9. 2006.
- Breivogel, C. S., D. E. Selley, *et al.* Cannabinoid receptor agonist efficacy for stimulating [35S]GTPgammaS binding to rat cerebellar membranes correlates with agonist-induced decreases in GDP affinity. J Biol Chem, v.273, n.27, Jul 3, p.16865-73. 1998.
- Brewin, C. R. e E. A. Holmes. Psychological theories of posttraumatic stress disorder. Clin Psychol Rev, v.23, n.3, May, p.339-76. 2003.

- Cain, C. K., A. M. Blouin, *et al.* Adrenergic transmission facilitates extinction of conditional fear in mice. Learn Mem, v.11, n.2, Mar-Apr, p.179-87. 2004.
- Cammarota, M., L. R. Bevilaqua, *et al.* Retrieval and the extinction of memory. Cell Mol Neurobiol, v.25, n.3-4, Jun, p.465-74. 2005.
- Cannich, A., C. T. Wotjak, *et al.* CB1 cannabinoid receptors modulate kinase and phosphatase activity during extinction of conditioned fear in mice. Learn Mem, v.11, n.5, Sep-Oct, p.625-32. 2004.
- Carlini, E. A., J. R. Leite, *et al.* Letter: Cannabidiol and Cannabis sativa extract protect mice and rats against convulsive agents. J Pharm Pharmacol, v.25, n.8, Aug, p.664-5. 1973.
- Chalsma, A. L., D. Boyum, *et al.* Marijuana situation assessment. [Washington, D.C.: Office of National Drug Control Policy. 1994. 71 p. p. (ONDCP paper.)
- Chevalyere, V., K. A. Takahashi, *et al.* Endocannabinoid-Mediated Synaptic Plasticity in the CNS. Annu Rev Neurosci, Mar 15. 2006.
- Chhatwal, J. P., M. Davis, *et al.* Enhancing cannabinoid neurotransmission augments the extinction of conditioned fear. Neuropsychopharmacology, v.30, n.3, Mar, p.516-24. 2005.
- Childers, S. R. e C. S. Breivogel. Cannabis and endogenous cannabinoid systems. Drug Alcohol Depend, v.51, n.1-2, Jun-Jul, p.173-87. 1998.
- Childers, S. R., T. Sexton, *et al.* Effects of anandamide on cannabinoid receptors in rat brain membranes. Biochem Pharmacol, v.47, n.4, Feb 11, p.711-5. 1994.
- Consroe, P. e A. Wolkin. Cannabidiol--antiepileptic drug comparisons and interactions in experimentally induced seizures in rats. J Pharmacol Exp Ther, v.201, n.1, Apr, p.26-32. 1977.
- Cordero, M. I., J. J. Merino, *et al.* Correlational relationship between shock intensity and corticosterone secretion on the establishment and subsequent expression of contextual fear conditioning. Behav Neurosci, v.112, n.4, Aug, p.885-91. 1998.
- Cordero, M. I. e C. Sandi. A role for brain glucocorticoid receptors in contextual fear conditioning: dependence upon training intensity. Brain Res, v.786, n.1-2, Mar 9, p.11-7. 1998.
- Cortright, D. N., M. Crandall, *et al.* The tissue distribution and functional characterization of human VR1. Biochem Biophys Res Commun, v.281, n.5, Mar, p.1183-9. 2001.
- Crippa, J. A., A. W. Zuardi, *et al.* Effects of cannabidiol (CBD) on regional cerebral blood flow. Neuropsychopharmacology, v.29, n.2, Feb, p.417-26. 2004.
- Cristino, L., L. De Petrocellis, *et al.* Immunohistochemical localization of cannabinoid type 1 and vanilloid transient receptor potential vanilloid type 1 receptors in the mouse brain. Neuroscience, v.139, n.4, p.1405-15. 2006.

- Cruz, A. P., F. Frei, *et al.* Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. Pharmacol Biochem Behav, v.49, n.1, Sep, p.171-6. 1994.
- De Oliveira Alvares, L., B. P. Genro, *et al.* AM251, a selective antagonist of the CB1 receptor, inhibits the induction of long-term potentiation and induces retrograde amnesia in rats. Brain Res, v.1075, n.1, Feb 23, p.60-7. 2006.
- Deutsch, D. G. e S. A. Chin. Enzymatic synthesis and degradation of anandamide, a cannabinoid receptor agonist. Biochem Pharmacol, v.46, n.5, Sep 1, p.791-6. 1993.
- Devane, W. A., F. A. Dysarz, 3rd, *et al.* Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. Mol Pharmacol, v.34, n.5, Nov, p.605-13. 1988.
- Devane, W. A., L. Hanus, *et al.* Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. Science, v.258, n.5090, Dec 18, p.1946-9. 1992.
- Dewey, W. L. Cannabinoid pharmacology. Pharmacol Rev, v.38, n.2, Jun, p.151-78. 1986.
- Di Marzo, V., C. S. Breivogel, *et al.* Levels, metabolism, and pharmacological activity of anandamide in CB(1) cannabinoid receptor knockout mice: evidence for non-CB(1), non-CB(2) receptor-mediated actions of anandamide in mouse brain. J Neurochem, v.75, n.6, Dec, p.2434-44. 2000.
- Di Marzo, V., A. Fontana, *et al.* Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. Nature, v.372, n.6507, Dec 15, p.686-91. 1994.
- Di Marzo, V., D. Melck, *et al.* Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. Trends Neurosci, v.21, n.12, Dec, p.521-8. 1998.
- Di Marzo, V. e L. D. Petrocellis. Plant, synthetic, and endogenous cannabinoids in medicine. Annu Rev Med, v.57, p.553-74. 2006.
- Fanselow, M. S. Conditioned and unconditional components of post-shock freezing. Pavlov J Biol Sci, v.15, n.4, Oct-Dec, p.177-82. 1980.
- Felder, C. C., E. M. Briley, *et al.* Anandamide, an endogenous cannabimimetic eicosanoid, binds to the cloned human cannabinoid receptor and stimulates receptor-mediated signal transduction. Proc Natl Acad Sci U S A, v.90, n.16, Aug 15, p.7656-60. 1993.
- Ferrari, F., A. Ottani, *et al.* Learning impairment produced in rats by the cannabinoid agonist HU 210 in a water-maze task. Pharmacol Biochem Behav, v.64, n.3, Nov, p.555-61. 1999.
- Freund, T. F., I. Katona, *et al.* Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. Physiol Rev, v.83, n.3, Jul, p.1017-66. 2003.
- Giuffrida, A., F. Rodriguez De Fonseca, *et al.* Elevated circulating levels of anandamide after administration of the transport inhibitor, AM404. Eur J Pharmacol, v.408, n.2, Nov 17, p.161-8. 2000.

Goyal, R. e K. Anil. Protective effect of alprazolam in acute immobilization stress-induced certain behavioral and biochemical alterations in mice. Pharmacol Rep, v.59, n.3, May-Jun, p.284-90. 2007.

Grillon, C., R. Duncko, *et al.* Acute stress potentiates anxiety in humans. Biol Psychiatry, v.62, n.10, Nov 15, p.1183-6. 2007.

Haller, J., B. Varga, *et al.* CB1 cannabinoid receptors mediate anxiolytic effects: convergent genetic and pharmacological evidence with CB1-specific agents. Behav Pharmacol, v.15, n.4, Jul, p.299-304. 2004.

Herkenham, M., A. B. Lynn, *et al.* Cannabinoid receptor localization in brain. Proc Natl Acad Sci U S A, v.87, n.5, Mar, p.1932-6. 1990.

Hill, M. N., L. M. Froese, *et al.* Alterations in behavioral flexibility by cannabinoid CB1 receptor agonists and antagonists. Psychopharmacology (Berl), v.187, n.2, Aug, p.245-59. 2006.

Hill, M. N. e B. B. Gorzalka. Enhancement of anxiety-like responsiveness to the cannabinoid CB(1) receptor agonist HU-210 following chronic stress. Eur J Pharmacol, v.499, n.3, Sep 24, p.291-5. 2004.

Hill, M. N., W. S. Ho, *et al.* Chronic corticosterone treatment increases the endocannabinoid 2-arachidonylglycerol in the rat amygdala. Eur J Pharmacol, v.528, n.1-3, Dec 28, p.99-102. 2005.

Hillard, C. J. e W. B. Campbell. Biochemistry and pharmacology of arachidonylethanolamide, a putative endogenous cannabinoid. J Lipid Res, v.38, n.12, Dec, p.2383-98. 1997.

Hillard, C. J., R. A. Harris, *et al.* Effects of the cannabinoids on physical properties of brain membranes and phospholipid vesicles: fluorescence studies. J Pharmacol Exp Ther, v.232, n.3, Mar, p.579-88. 1985.

Hoffman, A. F. e C. R. Lupica. Mechanisms of cannabinoid inhibition of GABA(A) synaptic transmission in the hippocampus. J Neurosci, v.20, n.7, Apr 1, p.2470-9. 2000.

Holter, S. M., M. Kallnik, *et al.* Cannabinoid CB1 receptor is dispensable for memory extinction in an appetitively-motivated learning task. Eur J Pharmacol, v.510, n.1-2, Mar 7, p.69-74. 2005.

Howlett, A. C. Inhibition of neuroblastoma adenylate cyclase by cannabinoid and nantradol compounds. Life Sci, v.35, n.17, Oct 22, p.1803-10. 1984.

_____. Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Biochemistry of the response in neuroblastoma cell membranes. Mol Pharmacol, v.27, n.4, Apr, p.429-36. 1985.

Howlett, A. C., F. Barth, *et al.* International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. Pharmacol Rev, v.54, n.2, Jun, p.161-202. 2002.

- Howlett, A. C. e R. M. Fleming. Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Pharmacology of the response in neuroblastoma cell membranes. Mol Pharmacol, v.26, n.3, Nov, p.532-8. 1984.
- Howlett, A. C., J. M. Qualy, *et al.* Involvement of Gi in the inhibition of adenylate cyclase by cannabimimetic drugs. Mol Pharmacol, v.29, n.3, Mar, p.307-13. 1986.
- Izquierdo, I., O. A. Orsingher, *et al.* Effect of cannabidiol and of other cannabis sativa compounds on hippocampal seizure discharges. Psychopharmacologia, v.28, n.1, p.95-102. 1973.
- Kamprath, K., G. Marsicano, *et al.* Cannabinoid CB1 receptor mediates fear extinction via habituation-like processes. J Neurosci, v.26, n.25, Jun 21, p.6677-86. 2006.
- Kathuria, S., S. Gaetani, *et al.* Modulation of anxiety through blockade of anandamide hydrolysis. Nat Med, v.9, n.1, Jan, p.76-81. 2003.
- Katona, I., B. Sperlagh, *et al.* GABAergic interneurons are the targets of cannabinoid actions in the human hippocampus. Neuroscience, v.100, n.4, p.797-804. 2000.
- Kim, D. e S. A. Thayer. Cannabinoids inhibit the formation of new synapses between hippocampal neurons in culture. J Neurosci, v.21, n.10, May 15, p.RC146. 2001.
- Lamprecht, R., C. R. Farb, *et al.* Fear conditioning drives profilin into amygdala dendritic spines. Nat Neurosci, v.9, n.4, Apr, p.481-3. 2006.
- Leite, J. R., E. A. Carlini, *et al.* Anticonvulsant effects of the (-) and (+)isomers of cannabidiol and their dimethylheptyl homologs. Pharmacology, v.24, n.3, p.141-6. 1982.
- Mackie, K., W. A. Devane, *et al.* Anandamide, an endogenous cannabinoid, inhibits calcium currents as a partial agonist in N18 neuroblastoma cells. Mol Pharmacol, v.44, n.3, Sep, p.498-503. 1993.
- Malinow, R. AMPA receptor trafficking and long-term potentiation. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, v.358, n.1432, Apr 29, p.707-14. 2003.
- Marco, E. M., L. Perez-Alvarez, *et al.* Involvement of 5-HT1A receptors in behavioural effects of the cannabinoid receptor agonist CP 55,940 in male rats. Behav Pharmacol, v.15, n.1, Feb, p.21-7. 2004.
- Marsch, R., E. Foeller, *et al.* Reduced anxiety, conditioned fear, and hippocampal long-term potentiation in transient receptor potential vanilloid type 1 receptor-deficient mice. J Neurosci, v.27, n.4, Jan 24, p.832-9. 2007.
- Marsicano, G. e B. Lutz. Expression of the cannabinoid receptor CB1 in distinct neuronal subpopulations in the adult mouse forebrain. Eur J Neurosci, v.11, n.12, Dec, p.4213-25. 1999.
- _____. Neuromodulatory functions of the endocannabinoid system. J Endocrinol Invest, v.29, n.3 Suppl, p.27-46. 2006.

- Marsicano, G., C. T. Wotjak, *et al.* The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. Nature, v.418, n.6897, Aug 1, p.530-4. 2002.
- Matsuda, L. A., S. J. Lolait, *et al.* Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. Nature, v.346, n.6284, Aug 9, p.561-4. 1990.
- Mechiel Korte, S. e S. F. De Boer. A robust animal model of state anxiety: fear-potentiated behaviour in the elevated plus-maze. Eur J Pharmacol, v.463, n.1-3, Feb 28, p.163-75. 2003.
- Mechoulam, R. e L. Hanus. A historical overview of chemical research on cannabinoids. Chem Phys Lipids, v.108, n.1-2, Nov, p.1-13. 2000.
- Mechoulam, R., A. Shani, *et al.* Chemical basis of hashish activity. Science, v.169, n.945, Aug 7, p.611-2. 1970.
- Mikics, E., T. Dombi, *et al.* The effects of cannabinoids on contextual conditioned fear in CB1 knockout and CD1 mice. Behav Pharmacol, v.17, n.3, May, p.223-30. 2006.
- Mishima, K., N. Egashira, *et al.* Characteristics of learning and memory impairment induced by delta9-tetrahydrocannabinol in rats. Jpn J Pharmacol, v.87, n.4, Dec, p.297-308. 2001.
- Moreira, F. A., D. C. Aguiar, *et al.* Anxiolytic-like effect of cannabidiol in the rat Vogel conflict test. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, v.30, n.8, Dec 30, p.1466-71. 2006.
- Murillo-Rodriguez, E., D. Millan-Aldaco, *et al.* Cannabidiol, a constituent of Cannabis sativa, modulates sleep in rats. FEBS Lett, v.580, n.18, Aug 7, p.4337-45. 2006.
- Myers, K. M. e M. Davis. Behavioral and neural analysis of extinction. Neuron, v.36, n.4, Nov 14, p.567-84. 2002.
- Niyuhire, F., S. A. Varvel, *et al.* The disruptive effects of the CB1 receptor antagonist rimonabant on extinction learning in mice are task-specific. Psychopharmacology (Berl), v.191, n.2, Apr, p.223-31. 2007.
- Otto, M. W., S. E. Bruce, *et al.* Benzodiazepine use, cognitive impairment, and cognitive-behavioral therapy for anxiety disorders: issues in the treatment of a patient in need. J Clin Psychiatry, v.66 Suppl 2, p.34-8. 2005.
- Pacher, P., S. Batkai, *et al.* The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. Pharmacol Rev, v.58, n.3, Sep, p.389-462. 2006.
- Pamplona, F. A., R. M. Bitencourt, *et al.* Short- and long-term effects of cannabinoids on the extinction of contextual fear memory in rats. Neurobiol Learn Mem, in press. 2008.
- Pamplona, F. A., R. D. Prediger, *et al.* The cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 facilitates the extinction of contextual fear memory and spatial memory in rats. Psychopharmacology (Berl), v.188, n.4, Nov, p.641-9. 2006.

- Pamplona, F. A. e R. N. Takahashi. WIN 55212-2 impairs contextual fear conditioning through the activation of CB1 cannabinoid receptors. Neurosci Lett, v.397, n.1-2, Apr 10-17, p.88-92. 2006.
- Pare, D., G. J. Quirk, *et al.* New vistas on amygdala networks in conditioned fear. J Neurophysiol, v.92, n.1, Jul, p.1-9. 2004.
- Parker, L. A., P. Burton, *et al.* Effect of low doses of delta9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol on the extinction of cocaine-induced and amphetamine-induced conditioned place preference learning in rats. Psychopharmacology (Berl), v.175, n.3, Sep, p.360-6. 2004.
- Paxinos, G. e C. Watson. The rat brain in stereotaxic coordinates. San Diego, Calif.: Academic Press. 2002. 256 s. p.
- Pellow, S., P. Chopin, *et al.* Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. J Neurosci Methods, v.14, n.3, Aug, p.149-67. 1985.
- Pellow, S. e S. E. File. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. Pharmacol Biochem Behav, v.24, n.3, Mar, p.525-9. 1986.
- Pertwee, R. G. Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. Pharmacol Ther, v.74, n.2, p.129-80. 1997.
- _____. Pharmacological actions of cannabinoids. Handb Exp Pharmacol, n.168, p.1-51. 2005.
- _____. Cannabinoid pharmacology: the first 66 years. Br J Pharmacol, v.147 Suppl 1, Jan, p.S163-71. 2006.
- Petitot, F., B. Jeantaud, *et al.* Complex pharmacology of natural cannabinoids: evidence for partial agonist activity of delta9-tetrahydrocannabinol and antagonist activity of cannabidiol on rat brain cannabinoid receptors. Life Sci, v.63, n.1, p.PL1-6. 1998.
- Quirk, G. J. e D. Mueller. Neural mechanisms of extinction learning and retrieval. Neuropsychopharmacology, v.33, n.1, Jan, p.56-72. 2008.
- Rawls, S. M., Z. Ding, *et al.* Role of TRPV1 and cannabinoid CB1 receptors in AM 404-evoked hypothermia in rats. Pharmacol Biochem Behav, v.83, n.4, Apr, p.508-16. 2006.
- Ressler, K. J., B. O. Rothbaum, *et al.* Cognitive enhancers as adjuncts to psychotherapy: use of D-cycloserine in phobic individuals to facilitate extinction of fear. Arch Gen Psychiatry, v.61, n.11, Nov, p.1136-44. 2004.
- Resstel, L. B., S. R. Joca, *et al.* Effects of cannabidiol and diazepam on behavioral and cardiovascular responses induced by contextual conditioned fear in rats. Behav Brain Res, v.172, n.2, Sep 25, p.294-8. 2006.
- Rinaldi-Carmona, M., F. Barth, *et al.* SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. FEBS Lett, v.350, n.2-3, Aug 22, p.240-4. 1994.

- Roberts, J. C., J. B. Davis, *et al.* [3H]Resiniferatoxin autoradiography in the CNS of wild-type and TRPV1 null mice defines TRPV1 (VR-1) protein distribution. Brain Res, v.995, n.2, Jan 9, p.176-83. 2004.
- Ross, R. A. Anandamide and vanilloid TRPV1 receptors. Br J Pharmacol, v.140, n.5, Nov, p.790-801. 2003.
- Rothbaum, B. O. e A. C. Schwartz. Exposure therapy for posttraumatic stress disorder. Am J Psychother, v.56, n.1, p.59-75. 2002.
- Segal, M. e P. Andersen. Dendritic spines shaped by synaptic activity. Curr Opin Neurobiol, v.10, n.5, Oct, p.582-6. 2000.
- Shen, M., T. M. Piser, *et al.* Cannabinoid receptor agonists inhibit glutamatergic synaptic transmission in rat hippocampal cultures. J Neurosci, v.16, n.14, Jul 15, p.4322-34. 1996.
- Sullivan, J. M. Cellular and molecular mechanisms underlying learning and memory impairments produced by cannabinoids. Learn Mem, v.7, n.3, May-Jun, p.132-9. 2000.
- Suzuki, A., S. A. Josselyn, *et al.* Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. J Neurosci, v.24, n.20, May 19, p.4787-95. 2004.
- Szabo, T., T. Biro, *et al.* Pharmacological characterization of vanilloid receptor located in the brain. Brain Res Mol Brain Res, v.98, n.1-2, Jan 31, p.51-7. 2002.
- Takahashi, T., K. Svoboda, *et al.* Experience strengthening transmission by driving AMPA receptors into synapses. Science, v.299, n.5612, Mar 7, p.1585-8. 2003.
- Thomas, B. F., A. F. Gilliam, *et al.* Comparative receptor binding analyses of cannabinoid agonists and antagonists. J Pharmacol Exp Ther, v.285, n.1, Apr, p.285-92. 1998.
- Toni, N., P. A. Buchs, *et al.* LTP promotes formation of multiple spine synapses between a single axon terminal and a dendrite. Nature, v.402, n.6760, Nov 25, p.421-5. 1999.
- Toth, A., J. Boczan, *et al.* Expression and distribution of vanilloid receptor 1 (TRPV1) in the adult rat brain. Brain Res Mol Brain Res, v.135, n.1-2, Apr 27, p.162-8. 2005.
- Varvel, S. A., E. A. Anum, *et al.* Disruption of CB(1) receptor signaling impairs extinction of spatial memory in mice. Psychopharmacology (Berl), v.179, n.4, Jun, p.863-72. 2005.
- Varvel, S. A., R. J. Hamm, *et al.* Differential effects of delta 9-THC on spatial reference and working memory in mice. Psychopharmacology (Berl), v.157, n.2, Sep, p.142-50. 2001.
- Varvel, S. A. e A. H. Lichtman. Evaluation of CB1 receptor knockout mice in the Morris water maze. J Pharmacol Exp Ther, v.301, n.3, Jun, p.915-24. 2002.
- Viveros, M. P., E. M. Marco, *et al.* Endocannabinoid system and stress and anxiety responses. Pharmacol Biochem Behav, v.81, n.2, Jun, p.331-42. 2005.

Vogel, Z., J. Barg, *et al.* Anandamide, a brain endogenous compound, interacts specifically with cannabinoid receptors and inhibits adenylate cyclase. J Neurochem, v.61, n.1, Jul, p.352-5. 1993.

Vyas, A. e S. Chattarji. Modulation of different states of anxiety-like behavior by chronic stress. Behav Neurosci, v.118, n.6, Dec, p.1450-4. 2004.

Walker, J. M. e S. M. Huang. Cannabinoid analgesia. Pharmacol Ther, v.95, n.2, Aug, p.127-35. 2002.

Watanabe, K., Y. Kayano, *et al.* Inhibition of anandamide amidase activity in mouse brain microsomes by cannabinoids. Biol Pharm Bull, v.19, n.8, Aug, p.1109-11. 1996.

Yang, Y. L., P. K. Chao, *et al.* Systemic and intra-amygdala administration of glucocorticoid agonist and antagonist modulate extinction of conditioned fear. Neuropsychopharmacology, v.31, n.5, May, p.912-24. 2006.

_____. Glutamate NMDA receptors within the amygdala participate in the modulatory effect of glucocorticoids on extinction of conditioned fear in rats. Neuropsychopharmacology, v.32, n.5, May, p.1042-51. 2007.

Yaniv, D., A. Desmedt, *et al.* The amygdala and appraisal processes: stimulus and response complexity as an organizing factor. Brain Res Brain Res Rev, v.44, n.2-3, Mar, p.179-86. 2004.

Zuardi, A. W., S. L. Morais, *et al.* Antipsychotic effect of cannabidiol. J Clin Psychiatry, v.56, n.10, Oct, p.485-6. 1995.

Zuardi, A. W., I. Shirakawa, *et al.* Action of cannabidiol on the anxiety and other effects produced by delta 9-THC in normal subjects. Psychopharmacology (Berl), v.76, n.3, p.245-50. 1982.

Zygmunt, P. M., J. Petersson, *et al.* Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. Nature, v.400, n.6743, Jul 29, p.452-7. 1999.