UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

**Efeitos do canabidiol e do 7-Nitroindazole na resposta de medo
condicionado contextual após exposição de ratos a um estresse intenso:
envolvimento dos sistemas nitrérgico, serotoninérgico e canabinoide**

CARLA VILA-VERDE

RIBEIRÃO PRETO

2019

CARLA VILA-VERDE

**Efeitos do canabidiol e do 7-Nitroindazole na resposta de medo
condicionado contextual após exposição de ratos a um estresse intenso:
envolvimento dos sistemas nitrérgico, serotoninérgico e canabinoide**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutora em Ciências.
Área de Concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Francisco Silveira
Guimarães
Coorientadora: Dr. Sabrina Francesca de Souza
Lisboa

RIBEIRÃO PRETO

2019

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Vila-Verde, Carla

Efeitos do canabidiol e do 7-Nitroindazole na resposta de medo condicionado contextual após exposição de ratos a um estresse intenso: envolvimento dos sistemas nitrérgico, serotoninérgico e canabinoide / Carla Vila-Verde; orientador: Prof. Dr. Francisco Silveira Guimarães. – Ribeirão Preto, 2010.

88 f.

Tese (Doutorado em Ciências – Área de Concentração: Farmacologia) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2019.

1. Estresse. 2. Estresse pós-traumático. 3. Medo condicionado ao contexto. 4. Canabidiol. 5. 7-Nitroindazole. 6. Sistema nitrérgico. 7. Sistema serotoninérgico. 8. Sistema Canabinóide.

FOLHA DE APROVAÇÃO

CARLA VILA-VERDE

**Efeitos do canabidiol e do 7-Nitroindazole na resposta de medo
condicionado contextual após exposição de ratos a um estresse intenso:
envolvimento dos sistemas nitrérgico, serotoninérgico e canabinoide**

**Tese apresentada à Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Doutora em
Ciências.**

Área de Concentração: Farmacologia

Aprovado em: ____ / ____ / 2019

Banca Examinadora

Prof. Dr. Francisco Silveira Guimarães

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP Assinatura:

Prof. Dr. Fernando Morgan de Aguiar Corrêa

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP Assinatura:

Prof. Dr. Antonio Waldo Zuardi

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP Assinatura:

Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza

Instituição: Universidade Estadual Paulista – UNESP Assinatura:

Prof. Dr. Leandro José Bertoglio

Instituição: Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC Assinatura:

**“A verdadeira medida de um homem não é como ele se comporta
em momentos de conforto e conveniências, mas como ele se mantém
em tempos de controvérsia e desafio.”**
Martin Luther King

DEDICATÓRIA

Aos meus pais,
Zenilda e Valdiney, que
sempre foram meu alicerce

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, pelas bênçãos derramadas e por me guiar ao longo da execução deste trabalho e toda minha caminhada.

Aos meus familiares que sempre me apoiaram nessa caminhada, me deram amor, respaldo e incentivo pra finalizar mais essa etapa.

Ao professor Francisco S. Guimarães, a quem tenho profunda admiração e respeito, pela primorosa orientação deste trabalho e pela profunda confiança, aprendizado constante e discussões científicas e culturais instigantes.

A Sabrina, minha amiga, coorientadora, inspiração e exemplo de resiliência.

Aos membros da banca examinadora que aceitaram o convite e dedicaram tempo à avaliação deste trabalho.

Aos técnicos Marcos, Eleni e Laura por me auxiliarem durante essa jornada, a qual foi imprescindível para a construção dessa história. A querida Inês por todo o auxílio no cuidado aos animais e imensa assistência durante todo esse período.

Aos amigos do laboratório, prof. Felipe, Manoela, Andreza, Alice, Nicole, Naielly e Isa, por todas as discussões produtivas, suporte experimental, intelectual e pelos momentos de descontração. A convivência com todos foi muito gratificante!

Aos amigos e colegas do laboratório do Prof. Leonardo Resstel pela atenção, apoio e auxílio durante todo o processo da minha dissertação, em especial, a Dani, Anna Barbara e Mayara.

Aos profissionais da secretaria, Gislaine e José Waldik Ramón, por sanarem minhas dúvidas, me auxiliarem nos aspectos administrativos e muitas vezes pessoais.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

Ao meu noivo pela companhia, dedicação e apoio inestimável. Com certeza, é uma das minhas principais forças impulsoras! Obrigada pela cumplicidade e por dividir comigo tantos sonhos.

A minha grande amiga Ju que recheia meus dias com grandes histórias me fazendo sair um pouco desse mundo louco! Conviver com alguém tão especial me faz criar forças pra seguir em frente e ser uma pessoa melhor a cada dia.

A todos os meus bons amigos de caminhada e meus familiares que, muitas vezes, apesar da distância, torceram e me incentivaram a cada passo e cada caminho escolhido. Muito obrigada por construírem essa conquista comigo e por me fazerem tão completa e feliz.

Resumo

RESUMO

VILA-VERDE, C. **Efeitos do canabidiol e do 7-Nitroindazole na resposta de medo condicionado contextual após exposição de ratos a um estresse intenso: envolvimento dos sistemas nitrérgico, serotoninérgico e canabinoide.** 2019. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

O transtorno de estresse pós-traumático (TEPT) é um transtorno incapacitante que pode se desenvolver após exposição a eventos estressantes e traumáticos intensos. A neurobiologia da doença ainda é pouco compreendida, mas parece envolver diversos neurotransmissores, como glutamato, GABA, serotonina (5-HT), endocanabinoides e óxido nítrico. Uma alteração importante observada em pacientes com TEPT é o processamento anormal de memórias aversivas, levando à persistência exacerbada destas (prejuízo na extinção), bem como generalização do medo. Atualmente, os fármacos de escolha prescritos para o TEPT são os inibidores seletivos de recaptção de 5-HT, como a paroxetina, entretanto, muitos, se não a maioria, dos pacientes não apresentam melhora significativa. Evidências pré-clínicas e clínicas sugerem que o canabidiol (CBD), derivado não-psicotomimético da *Cannabis sativa*, é eficaz em atenuar comportamentos relacionados à exposição a estressores, principalmente via facilitação da ativação de receptores 5-HT_{1A} e CB₁, podendo ser potencialmente utilizado no tratamento do TEPT. Alguns efeitos do tipo-ansiolítico, mediados por drogas que atuam via receptores 5-HT_{1A}, parecem depender da inibição da enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS). Além disso, o aumento da sinalização nitrérgica parece induzir várias alterações em componentes do sistema endocanabinoide. Portanto, o estresse pode induzir alterações importantes e promover modulações entre esses três sistemas: nitrérgico, serotoninérgico e canabinoide no SNC. Nosso objetivo foi avaliar se administrações agudas ou repetidas (7 dias) de CBD e 7-nitroindazole (7-NI - um inibidor preferencial da nNOS) poderiam prevenir a sensibilização das respostas de medo condicionado e os prejuízos nos processos de retenção da memória de extinção induzidas pela exposição a um estresse severo. Nós também investigamos se o efeito CBD envolveria os receptores 5-HT_{1A} e / ou CB₁. Além disso, testamos se o comprometimento induzido pelo estresse no processamento das respostas de medo condicionado (MC) estaria associado a modificações no sistema NO. Para isso Ratos Wistar (260g-280g) foram expostos ao estresse prolongado único (SPS – *Single Prolonged*

Stress), um modelo experimental de TEPT, que consiste em expor os animais a estressores sucessivos: estresse de restrição (2h); nado forçado (20 minutos) e perda de consciência pelo éter (avaliados pela perda do tônus postural). Uma semana depois foram avaliadas respostas de sensibilização ao MC e prejuízos nos processos de retenção da memória de extinção. Foram analisados, no hipocampo ventral (HV) e região pré-limbica do CPFvm (PL-CPFvm), níveis da isoforma fosforilada da enzima nNOS (pnNOS) em diferentes momentos após o estresse. Além disso, 2-3 horas após SPS os animais foram tratados com veículo, Paroxetina (5, 10 e 20 mg/kg), CBD (2,5, 5 e 10 mg/kg; 30mg/kg para tratamento agudo) ou 7-NI (15, 30 e 60 mg/Kg). As injeções foram administradas diariamente durante 7 dias. 7-NI (15, 30 e 60 mg/Kg) e CBD (30 mg/kg) foram administrados de forma aguda. Num grupo independente de animais, o antagonista do receptor 5-HT1A, WAY100635 (0,3 mg / kg) ou o antagonista do receptor CB1, AM281 (0,5 mg / kg) foram administrados 30 minutos antes do CBD (5 mg/kg). Vinte e quatro horas após a última injeção do fármaco (ou 7 dias depois para os tratamentos agudos) os ratos foram submetidos ao procedimento de medo condicionado contextual (MCC; três choques elétricos nas patas, 0,35 mA / 2s). A sensibilização das respostas de MC e déficits nos processos de consolidação da memória de extinção foram avaliadas em duas sessões distintas nas próximas 48 h. Verificou-se um aumento nos níveis de pnNOS no HV 1h após SPS, e no PL-CPFvm após a última avaliação comportamental (10°d – retenção da memória de extinção) ($p < 0,05$). Sugere-se que essas duas estruturas modulam os efeitos do estresse em momentos diferentes. O SPS também foi capaz de induzir sensibilização das repostas de MC, aumentando o comportamento de congelamento na primeira re-exposição ao contexto aversivo ($F(1,13) = 8,42$, $p < 0,05$) e prejudicou a retenção da memória de extinção ($F(1,13) = 14,53$, $p < 0,01$). Esses efeitos foram atenuados pelo tratamento repetido (7 dias) com paroxetina (10 mg / kg) ($p < 0,05$) e CBD (5 e 10 mg / kg) ($p < 0,05$). Os efeitos do CBD (5mg / kg) foram abolidos pelo pré-tratamento com WAY100635 (0,03mg / kg) ou AM281 (0,05mg / kg). Curiosamente, uma dose única de 7-NI (30 e 60 mg / Kg) 2-3 horas após o SPS preveniu todas as consequências tardias do estresse avaliados 7 dias após o SPS. Além disso, decidimos analisar uma dose maior de CBD para investigar um possível efeito agudo. Descobrimos que uma única injeção de CBD (30 mg / kg) 2 a 3 horas após a SPS também evitou consequências tardias do estresse ($p < 0,05$). Nossos resultados indicam que, em doses baixas, o CBD (5mg / kg) injetado sub-cronicamente (7 dias) é capaz de prevenir o aumento da sensibilização das respostas de medo condicionado, bem como atenuar os prejuízos nos processos de retenção da memória de extinção. Esses processos parecem acontecer via facilitação das

neurotransmissões mediada por 5-HT1A e CB1. Além disso, uma única injeção de CBD, utilizando uma dose 6x maior do que a utilizada no tratamento repetido (30mg / kg), administradas após o SPS também foi capaz de evitar os efeitos tardios do estresse. Ainda, nossos dados sugerem que as mudanças comportamentais induzidas pelo estresse podem estar relacionadas a uma complexa modulação entre o HV e o PL-CPFvm, com modificações precoces e tardias, respectivamente, no sistema nitrérgico. Por fim, uma única administração de um inibidor preferencial da sintase neuronal do óxido nítrico (7-NI) injetada 2-3 horas após a SPS evitou todas as consequências comportamentais desencadeadas pelo estresse.

Palavras-chave: Estresse; TEPT; estresse prolongado único, canabidiol, óxido nítrico; receptor 5-HT1A; receptor CB1.

Abstract

ABSTRACT

VILA-VERDE, C. **Effects of cannabidiol and 7-Nitroindazol in contextual fear conditioning responses in rats after exposure to intense stress: involvement of nitrenergic, serotonergic, and cannabinoid systems.** 2019. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Stress exposure can induce maladaptive changes that might contribute to the development of a variety of neuropsychiatry disorders, such a Post-Traumatic Stress Disorder (PTSD), a chronic psychiatric condition usually associated with abnormalities in fear processing and changes in stress-coping behaviors. Psychological stressors can activate the nitric oxide (NO) system, an effect that has been related to PTSD. The first-choice pharmacological treatment for PTSD (selective serotonin reuptake inhibitor) presents a low clinical efficacy and high levels of side effects, therefore the pursuit of new therapeutic alternatives is relevant. Cannabidiol (CBD), the main non-psychotomimetic component of the plant *Cannabis sativa*, exerts therapeutically promising effects on human mental health such as inhibition of anxiety- and depression- related responses. Multiple mechanisms are involved in these therapeutic effects of CBD, including facilitation of endocannabinoid (ECB)- and 5-HT_{1A}-mediated neurotransmission. Anxiolytic-like effects mediated by drugs acting via 5-HT_{1A} receptors seems to depend on inhibition of neuronal NO synthase (nNOS) enzyme in the brain. Moreover, augmentation of NO signaling appears to induce several alterations in components of the ECB system. Therefore, it seems that stress can induce an important cross-talk between the nitrenergic, serotonergic and endocannabinoid systems in the brain. We aimed at evaluating if, acute or repeated (7 days) injections of CBD and 7-nitroindazole (7-NI – a preferential inhibitor of neuronal nitric oxide synthase), could prevent the changes in fear processing induced by exposure to a severe stress. We also investigate if the CBD effect involves 5-HT_{1A} and/or CB₁ receptors. Furthermore, we tested if the stress-induced impairment of conditioned fear processing is associated with modifications in the NO system. Male Wistar rats (260g- 280g) were exposed to the single prolonged stress (SPS), a well-known model of PTSD, that consists of exposing animals to 3 stresses in sequence: restraint stress (2h); forced swim (20 minutes) and loss of consciousness by ether vapors (evaluated by loss of the postural tone). Fear sensitization and impaired extinction of

conditioned fear were evaluated one week later. In the ventral hippocampus, the levels of phosphorylated neuronal NO synthase enzyme (pnNOS) were measured at different time points after stress. Moreover, 2-3 hours after SPS the animals were treated with vehicle, Paroxetine (5, 10 and 20mg/kg), CBD (2.5, 5 and 10 mg/kg; 30mg/kg for acute treatment) or 7-NI (15, 30 and 60mg/Kg). The injections were administered daily for 7 days. 7-NI (15, 30 and 60mg/Kg) and CBD (30mg/kg) were single injected. In an independent group of animals, the 5-HT_{1A}-receptor antagonist WAY100635 (0.3 mg/kg) or the CB1-receptor antagonist AM281 (0.5 mg/kg) were administered 30 minutes before CBD (5 mg/kg). Twenty-four hours after the last drug injection (or 7 days later for acute treatments) the rats were submitted to a contextual conditioned fear procedure (three random electric footshocks, 0.35 mA/2s). Fear sensitization and extinction were assessed in two distinct sessions in the next 48 h. It was verified an increased pnNOS expression in the ventral hippocampus 1h after SPS, but not after the last behavioral evaluation (fear extinction consolidation) ($p < 0.05$), suggesting that an initial activation of the nitroergic system seems to be involved in the later consequences of stress. We also found that SPS-induced fear sensitization increased freezing behavior in the first re-exposure to the aversive context ($F_{(1,13)} = 8.42$, $p < 0.05$) and impaired fear extinction ($F_{(1,13)} = 14.53$, $p < 0.01$). These effects were attenuated by repeated treatment (7days) with paroxetine (10 mg/kg) ($p < 0.05$) and CBD (5 and 10 mg/kg) ($p < 0.05$). CBD (5mg/kg) effects were abolished by pre-treatment with WAY100635 (0.03mg/kg) or AM281 (0.05mg/kg). Interestingly, a single dose of 7-NI (30 and 60 mg/Kg) 2-3 hours after the SPS prevented the fear sensitization and fear extinction impairment evaluated 7 days after stress. Furthermore, we decided to analyze a higher dose of CBD to investigate a possible acute effect. We found that a single injection of CBD (30 mg/kg) 2-3h after SPS also prevented delayed consequences of the stress ($p < 0.05$). Our results indicate that, at low doses, CBD (5mg/kg) injected sub chronically (7 days) can attenuate stress-induced impairment in fear processing by facilitating 5-HT_{1A}- and CB1-mediated neurotransmission. Furthermore, a single injection of CBD in a high dose (30mg/kg) after SPS also prevented stress effects. Moreover, the data suggest that stress-induced changes in behavioral responses could be partially related to early modifications in the nitroergic system, reflected by increase pnNOS expression in the ventral hippocampus found 1h after SPS. Also, a single dose of a nitric oxide synthase inhibitor (7-NI) injected 2-3 h after SPS prevented delayed consequences of stress.

Keywords: Stress; PTSD; single prolonged stress, cannabidiol, nitric oxide; 5-HT
1A receptor; CB1 receptor.

Lista de Abreviaturas

LISTA DE ABREVIATURAS

2-AG – 2-araquidonoilglicerol

7NI- 7-Nitroindazole

AEA – anandamida

AMI - amídala

ANOVA – análise de variância

BSA – soro albumina bovina (do inglês *bovine serum albumin*)

CB1 – receptor canabinoide do tipo 1

CBD – canabidiol

CRH – hormônio liberador de controtrofina

CPF – córtex pré-frontal

CPFvm - córtex pré-frontal ventromedial

DMSO – dimetilsulfóxido

DSM V – Manual de Estatística e Diagnóstico de Transtornos Mentais V (do inglês *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders V*)

EPM – erro padrão da média

FMRP – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

HHA – eixo hipotálamo hipófise adrenal

HIP – hipocampo

HV – Hipocampo ventral

ISRS - inibidores seletivos da recaptação de serotonina

NO – óxido nítrico (do inglês *nitric oxide*)

nNOS – óxido nítrico sintase neuronal (do inglês *neuronal nitric oxide synthase*)

PBS – salina tamponada com fosfato (do inglês *phosphate buffered saline*)

PL-CPF_{vm} – região pré-límbica do córtex pré-frontal ventromedial

RNA_m – RNA mensageiro

SNC – sistema nervoso central

SPS – estresse prolongado único (do inglês *single prolonged stress*)

TBS – salina tamponada com tris (do inglês *tris buffered saline*)

TBST – TBS e Tween 20

TEPT – transtorno de estresse pós-traumático (do inglês *posttraumatic stress disorder*)

THC – Δ^9 -tetraidrocanabinol

V- veículo

Sumário

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
2 HIPÓTESE.....	33
3 OBJETIVOS	34
3.1. Objetivo Geral.....	35
3.2. Objetivos Específicos.....	35
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
4.1. Animais	37
4.2. Drogas	37
4.3. Estresse Prolongado Único - SPS.....	37
4.4. Medo condicionado ao contexto.....	38
4.5. Radioimunoensaio.....	38
4.6. Western Blot	38
4.7. Procedimento Experimental	39
4.7.1. <i>Experimento 1.....</i>	<i>39</i>
4.7.2. <i>Experimento 2.....</i>	<i>40</i>
4.7.3. <i>Experimento 3 e 5.....</i>	<i>40</i>
4.7.4. <i>Experimento 4, 10 e 13</i>	<i>42</i>
4.7.5. <i>Experimento 6 e 7.....</i>	<i>41</i>
4.7.6. <i>Experimento 11.....</i>	<i>42</i>
4.8. Análise Estatística	43
5 RESULTADOS.....	44
5.1. Análises da resposta emocional condicionada de animais submetidos ao SPS e testados 7 dias depois no MCC	45
5.2. Avaliação do processo de extinção (curta e longa duração: 10 e 15 min) e sua consolidação (após 24 horas) de animais submetidos ao SPS e testados após 7 dias no MCC	46
5.3. Efeito do tratamento repetido com paroxetina em animais submetidos ao SPS e testados 7 dias após no MCC	50
5.4. Efeito do tratamento agudo com o CBD, nas doses de 5 e 10mg/kg, em animais submetidos ao SPS e testados 7 dias após no MCC	52
5.5. Efeito do tratamento repetido com o CBD em animais submetidos ao SPS e testados 7 dias após no MCC	53

5.6. Avaliação da participação de receptores 5HT _{1A} sobre os efeitos do tratamento repetido com o CBD em animais submetidos ao SPS e testados 7 dias após no MCC	55
5.7. Avaliação da participação de receptores CB1 sobre os efeitos do tratamento repetido com o CBD em animais submetidos ao SPS e testados 7 dias após no MCC	58
5.8. Alteração temporal nos níveis de corticosterona plasmática de animais submetidos ao SPS e testados 7 dias após no MCC	60
5.9. Alteração temporal nos níveis de pnNOS (forma ativa) no hipocampo ventral e região pré-límbica do CPFvm de animais submetidos ao SPS e testados 7 dias após no MCC	61
5.10. Efeito do tratamento agudo com o 7-Nitroindazole (7-NI) em animais submetidos ao SPS e testados 7 dias após no MCC	63
5.11. Efeito do tratamento agudo com o 7-NI e repetido com o CBD em animais previamente estressados e avaliados no nado forçado (como um lembrete do estresse – <i>reminder</i>) e, 14 dias após o SPS, testados no MCC	65
5.12. Correlação entre o tempo de imobilidade e a porcentagem de congelamento (<i>freezing</i>) das duas sessões (processo de extinção e retenção)	69
5.13. Efeito de uma única administração de CBD na dose de 30 mg/Kg em animais submetidos ao SPS e testados 7 dias após no MCC	69
6 DISCUSSÃO	72
7 CONCLUSÃO	77
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
9 ANEXO	112

Introdução

1- INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O estresse pode ser caracterizado como uma resposta geral do organismo, que gera a mobilização de diferentes variáveis fisiológicas, com repercussão comportamental e cognitiva, frente a algum agente ou situação que represente ameaça à homeostasia. Todas essas alterações apropriadas culminariam no processo de adaptação (Selye, 1936; Cannon, 1932; McEwen et al., 1998; Graeff e Guimarães, 2012). A incapacidade de se adaptar ao estresse tem sido reconhecida como um dos principais fatores relacionados ao desenvolvimento de doenças psiquiátricas.

O transtorno de estresse pós-traumático (TEPT) é uma desordem psiquiátrica desencadeada por situações estressantes e traumáticas (DMS-V; APA, 2013). O TEPT pode ser definido como uma síndrome incapacitante, resultando em desordens fisiológicas, emocionais e cognitivas decorrentes de uma reação inicial após exposição única ou repetida à experiência traumática, tais como guerra, ataque terrorista, violência doméstica ou sexual, assalto, sequestro, entre outros. Este transtorno apresenta elevado grau de comorbidade com outras desordens psiquiátricas, como a depressão, além de estar associado a altos índices de incapacidade ocupacional e física (APA, 2013; VanElzakker et al., 2014; Lapidz-Bluhm & Peterson, 2014).

A neurobiologia do TEPT é bastante complexa e parece compreender diversos sistemas neurais. Várias evidências sugerem que experiências estressantes podem causar alterações em distintas regiões cerebrais, especialmente as relacionadas ao sistema límbico. A amígdala (AMI; centro de processamento e aprendizagem do medo), o hipocampo (HIP; aprendizado e consolidação da memória) e o córtex pré-frontal (CPF; execução, cognição e consolidação de memória) parecem estar intrinsecamente ligados ao controle e modulação de respostas comportamentais ao estresse por meio de uma série de conexões (Milad e Quirk, 2002; Miller e McEwen, 2006). Tem sido sugerido que em pacientes psiquiátricos uma hipofunção do CPF e do hipocampo levaria a maior ativação da amígdala após a apresentação de estímulos ameaçadores, o que poderia implicar ainda em déficits nos mecanismos de extinção das memórias aversivas. Estas irregularidades parecem se correlacionar com o aparecimento dos sintomas do TEPT e outros transtornos emocionais (Quirk et al., 2003; VanElzakker et al., 2014).

Alguns achados evidenciam que distúrbios no sistema nervoso autônomo e no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (eixo HHA) parecem estar associados ao desenvolvimento do TEPT (Yehuda, 1997; Kohda et al., 2007). Estudos mostram que pacientes com este

transtorno apresentam níveis aumentados do hormônio liberador de corticotrofina (CRH), redução do cortisol salivar e aumento da responsividade dos receptores de glicocorticoides (GR) (Bremner et al., 2004; Roheleder et al., 2004). Ademais, sabe-se que o estresse (agudo e/ou crônico) pode desencadear importantes mudanças morfológicas em estruturas límbicas, relacionadas a mecanismos de plasticidade. Esses processos neuroplásticos ainda não estão totalmente elucidados, mas observam-se alterações nos diversos sistemas de neurotransmissão, como glutamatérgico, GABAérgico, dopaminérgico, noradrenérgico, serotoninérgico, canabinoide, nitrérgico, entre outros (Miller e McEwen, 2006; Steckler e Risbrough, 2012). Assim, fármacos que atuem direta ou indiretamente na modulação desses sistemas são alternativas terapêuticas para o tratamento do TEPT.

Dentre os fármacos disponíveis para o tratamento deste transtorno, os antidepressivos pertencentes à classe dos inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS) são considerados como medicamentos de primeira escolha (Zohar et al., 2002; Davidson et al., 2004). Entretanto, a melhora clínica dos pacientes começa a ser observada somente após duas ou três semanas de tratamento, possivelmente pelas adaptações de longo prazo induzidas por estes compostos. Ademais, apenas cerca de 60% dos pacientes respondem ao tratamento, enquanto destes, somente 20-30% atingirão remissão completa (Stein et al., 2002; Zohar et al., 2002). Por esses motivos, pesquisas básicas e clínicas têm buscado outros fármacos que poderiam representar um tratamento mais efetivo, produzindo, por exemplo, uma menor latência e/ou maior eficácia. Nesse sentido, alguns estudos apontam os canabinoides como candidatos promissores no tratamento do TEPT, uma vez que foi demonstrada a capacidade dessas substâncias em atenuar respostas de estresse aguda e crônica em diversos modelos animais (Hill et al., 2011; Sarris et al., 2013; Campos et al., 2012a e b). Além disso, estes compostos parecem facilitar a extinção de memórias aversivas, processo que tem sido associado à patofisiologia do TEPT (Yehuda, et al., 2010), inclusive em modelo animal (Knox et al., 2012).

O sistema canabinoide, com os receptores (CB1 e CB2) e principais ligantes endógenos (anandamida – AEA e 2 araquidonilglicerol – 2AG), foi descrito no início da década de 90 (Matsuda et al., 1990; Devane et al., 1992; Mechoulam et al., 1995). Os endocannabinoides (ECBs) são neurotransmissores produzidos sob demanda, através da clivagem de fosfolipídeos de membrana e agem, muitas vezes, como mensageiros retrógrados em sinapses centrais. O término de seus efeitos se dá a partir da internalização neuronal seguida de degradação enzimática (FAAH – fatty-acide-amide-hydrolases degrada a AEA e MAGL – monoacil glicerol lipase o 2-AG) (Tsou et al., 1998; Moreira

et al., 2009; Marco et al., 2011). Além dos ECBs, vários fitocanabinóides (derivados da *Cannabis sativa*) desempenham importantes efeitos comportamentais. Dentre eles, o Δ^9 -tetra-hidrocanabinol (THC) é o principal composto responsável pelos efeitos psicotomiméticos da planta; e o canabidiol (CBD) que, além de carecer de propriedades psicotomiméticas, atenua comportamentos de medo, ansiedade e estresse em modelos animais (Mechoulam et al., 1970; Zuardi et al., 1982; Guimarães, 1990; Resstel et al., 2009; Campos e Guimarães, 2009).

O mecanismo de ação do CBD ainda não é totalmente elucidado, mas sabe-se que esse composto possui ação sobre diversos receptores, dentre eles o receptor CB1. Este é descrito como receptor metabotrópico mais abundante no SNC e está densamente expresso no CPF, HIP, AMI, substância cinzenta periaquedutal (SCP), entre outras estruturas envolvidas no controle comportamental (Tsou, et al., 1998). Localizam-se preferencialmente em neurônios pré-sinápticos, dessa forma interferindo na liberação de vários neurotransmissores e neuromoduladores como GABA, glutamato, 5-HT e óxido nítrico (NO) (Tsou et al., 1998; Marsicano e Lutz, 1999). Por outro lado, os receptores CB2 parecem atuar em processos proliferativos e respostas inflamatórias (Palazzuelos et al., 2006). Tanto o CB1 quanto o CB2 estão acoplados a uma proteína G inibitória (Gi) (Gonsiorek, Lunn et al., 2000). Diversos estudos indicam que a afinidade do CBD por estes receptores é baixa, mas parece que ele é capaz de facilitar a sinalização endocanabinoide por impedir a degradação enzimática da AEA através da inibição da FAAH ou seu transportador de membrana (Bisogno et al., 2001). Outro possível mecanismo de ação do CBD seria por interferência na transmissão serotonérgica (Russo et al., 2005), principalmente por facilitar os efeitos mediados por receptores 5-HT_{1A} (Resstel et al., 2009; Campos, Guimarães, 2008), o que parece ser bastante relevante em relação às alterações comportamentais e plásticas promovidas em resposta ao estresse (Resstel et al., 2009), considerando a estreita relação da neurotransmissão serotonérgica com os fenômenos comportamentais e adaptativos promovidos pela exposição a agentes estressores (McEwen, 1999).

Diversos trabalhos evidenciam o envolvimento do óxido nítrico (NO) na etiologia de distúrbios psiquiátricos, incluindo o TEPT (Guimarães et al., 2005; Joungh et al., 2012). Foi demonstrado que a exposição de roedores a um predador (gato) induziu comportamento ansiogênico e aumento da expressão da isoforma neuronal da sintase do NO (nNOS) e seus metabólitos no CPF medial (CPFm) sete dias após o estresse. Tais dados sugerem que as alterações sofridas pelo sistema nitrérgico, no CPFm estão relacionadas às alterações

comportamentais de longa duração induzidas por acontecimentos traumáticos, como a exposição ao predador (Campos, et al. 2013). De forma semelhante, recentemente, nosso grupo verificou que o estresse de restrição foi capaz de induzir efeitos ansiogênicos de longo prazo (24 horas e 7 dias) no labirinto em cruz elevado (LCE), possivelmente por modulação na expressão de nNOS na região pré-lobulocaudal (PL) do CPFm, pois, além de ter sido verificado um aumento do número de neurônios nNOS positivos, a inibição da nNOS, diretamente no CPFm-PL, foi capaz de prevenir os efeitos do estresse (Vila-Verde et al., 2016). Assim, o NO parece ser um importante neuromodulador na patofisiologia do TEPT (Oosthuizen, et al., 2005; Campos et al., 2013; Resstel et al., 2007).

O NO é um radical livre produzido endogenamente a partir do aminoácido L-arginina, pela ação de uma família de enzimas denominadas de óxido nítrico sintase (NOS). Existem três isoformas bem caracterizadas: a nNOS, a NOS endotelial (eNOS) e a NOS induzível (iNOS). A nNOS e eNOS são altamente dependentes das concentrações intracelulares de Ca^{2+} , enquanto a iNOS parece ser independente da flutuação dos níveis intracelulares deste íon, devido a sua ligação constitutiva à calmodulina (Cho, et al. 1992; Xie, et al., 1994; Guix, et al., 2005; Barreto, Correia, 2005; Zhou, Zhu, 2009; Steinert, Chernova, Forsythe, 2010). O NO é bastante reativo e pode desencadear seus efeitos fisiológicos e patológicos através de múltiplos mecanismos diretos e indiretos. Dentre eles, formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS), nitratação, S-nitrosilação de diversas proteínas, oxidação do DNA, dentre outros (Prast, Philippu, 2001; Fredstrom, 2002; Calabrese, V. et al., 2007; Zhou, 2009). A ativação da guanilato ciclase solúvel (sGC) parece ser o principal mecanismo de modulação da sinalização celular envolvendo o NO. Essa molécula ativa a sGC e induz a formação de cGMP (monofosfato de guanosina cíclico), o qual modula a atividade de proteínas kinases G (PKG) e de fosfodiesterases de nucleotídeos cíclicos (PDE) (Bellamy et al., 2002; Guix et al., 2005).

Alguns estudos sugerem uma interação entre o sistema serotoninérgico e a via do NO na modulação de comportamentos relacionados ao estresse (Hiroaki-Sato et al., 2014; Zhang et al., 2010), bem como uma ligação funcional entre os sistemas canabinoide e serotoninérgico, e canabinoide e nitrérgico (Campos et al., 2012b; Lisboa et al., 2013). Foi demonstrado, por exemplo, que tanto um agonista seletivo de receptores 5HT-1A (5-HT_{1A}-R) quanto um ISRS promoveram redução da expressão de nNOS no hipocampo e comportamento do tipo ansiolítico no teste de supressão alimentar pela novidade, enquanto um antagonista seletivo de 5-HT_{1A}-R promoveu efeitos opostos (Zhang et al., 2010). Dados prévios do nosso laboratório (Lisboa et al. 2013) demonstraram que a combinação de doses

inefetivas de AEA com drogas que inibem a transmissão nitrérgica microinjetadas na substância cinzenta periaquedutal dorsolateral (SCPdl) desencadeou um comportamento ansiolítico no LCE. Em culturas de micróglia de ratos ativadas por endotoxina verificou-se que um potente agonista CB1, CP-55,940, foi capaz de reduzir a liberação de NO (Waksman et al., 1999). Além disso, foi demonstrado que a administração sistêmica repetida de CBD (5mg/Kg/dia) durante 7 dias após a exposição do rato ao seu predador, gato, (um modelo animal de TEPT) induziu efeito do tipo-ansiolítico no LCE via ativação de receptores 5-HT_{1A}-R (Campos et al., 2012a). Os autores sugerem que o CBD poderia prevenir os efeitos comportamentais de longa duração causados por eventos traumáticos, como a exposição prévia ao predador, indicando seu potencial terapêutico no TEPT.

Outro modelo animal validado para o estudo do TEPT e amplamente utilizado é o estresse prolongado único (SPS) proposto por Liberzon e colaboradores (1997, 1999). Este modelo mimetiza alterações neuroendócrinas, fisiológicas e comportamentais específicas observadas em pacientes com TEPT, como o aumento do *feedback* negativo (do eixo HHA) desencadeado pelos glicocorticóides (GC); disfunções no sistema glutamatérgico, relacionadas a toxicidade hipocampal (Chambers, 1999); redução dos níveis de GABA em regiões cerebrais chaves na etiologia do TEPT (córtex e hipocampo) (Geuze, 2008) e déficits nos mecanismos de extinção das memórias aversivas (Milad, 2008). Este modelo é constituído por 3 etapas: os animais são submetidos a 2 horas de restrição, seguido por 20 minutos de natação forçada, e após 15 minutos de recuperação, os animais são expostos ao éter até perda do tônus postural. Posteriormente, os animais são mantidos em suas caixas durante 7 dias, pois esse período parece ser necessário para produzir as manifestações típicas relacionadas ao TEPT (Yamamoto, 2009; Harvey, 2003). Alguns estudos verificaram que a exposição dos animais ao SPS desencadeia hipersensibilidade do eixo HHA, verificado pelo aumento da expressão de receptores de glicocorticóides (GR) e, consequentemente, redução acentuada dos níveis do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), induzido pelo pré-tratamento com GC (Liberzon, 1997, 1999). Além disso, foi observada uma diminuição de corticosterona plasmática 7 dias após o SPS, com redução da afinidade dos receptores 5-HT_{1A} no hipocampo e aumento da afinidade de 5-HT_{2C} no CPF (Harvey, 2003). Ainda, esse modelo animal parece causar intensas manifestações relacionadas a comportamentos defensivos, como ansiedade e medo (Imanaka et al., 2006).

O SPS é constituído por estresses de natureza física, psicossocial e fisiológica. Cada um dos componentes estressores é capaz de aumentar os níveis de corticosterona plasmáticos e suas combinações permitem, a este modelo animal, desencadear uma

severidade de sintomas que se assemelham aos sintomas clínicos do TEPT, como o aumento da sensibilidade do eixo HHA e consequente redução dos níveis de corticosterona plasmática (após 7 dias) (Yamamoto, 2009; Yehuda e Antelman, 1993; Liberzon, 1999). Essa característica endocrinológica é uma das principais vantagens do SPS em relação a outros modelos animais de TEPT, uma vez que evidencia uma sintomatologia característica deste transtorno na clínica. Além disso, o SPS é bem qualificado nos 3 critérios de validade. Em relação à validade de face, este modelo provoca uma acentuada resposta de sobressalto (Kahan e Liberzon, 2004), déficits na memória espacial com redução da corticosterona plasmática (Harvey, 2003), os animais apresentam elevada excitação e hipervigilância, refletindo em respostas emocionais condicionadas (REC) exacerbadas (Liberzon e Sripada, 2008), estes comportamentos assemelham-se às manifestações clínicas do TEPT. Em relação à validade teórica, diversos estudos, utilizando este modelo, descrevem alterações morfofuncionais no hipocampo e CPF, juntamente com modulações importantes em receptores GABAérgicos, glutamatérgicos e serotoninérgicos (Harvey, 2003), além da aumentada sensibilidade do eixo HHA (Yehuda e Antleman, 1993), estas alterações assemelham-se aos processos neurobiológicos mobilizados na patogenia do TEPT. E por fim, em relação à validade preditiva, a utilização de ISRS, como a fluoxetina e a paroxetina, parece reduzir comportamentos do tipo defensivos (Takahashi, 2006; Wang, 2008) e déficits na memória espacial (Harvey, 2003, 2004), dessa forma, esse modelo parece ser sensível aos agentes farmacológicos que atenuam as manifestações do TEPT.

Hipótese

2. HIPÓTESE

Considerando que o sistema nitrérgico está envolvido nas consequências comportamentais de modelos animais de TEPT, que o CBD é capaz de atenuar os efeitos desencadeados pelo estresse e que estes efeitos podem envolver os sistemas serotoninérgico e/ou canabinoide, o presente estudo investigou a hipótese de que o CBD seria capaz de prevenir/atenuar os efeitos comportamentais e moleculares desencadeados pelo SPS (modelo que parece representar melhor as alterações comportamentais, neuroquímicas e neuroanatômicas observadas em pacientes com TEPT) e que estes efeitos envolveriam a modulação dos sistemas nitrérgico, serotoninérgico e canabinoide.

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

Avaliar os efeitos do CBD sobre as alterações comportamentais e moleculares induzidas por um estresse agudo severo, o SPS - um modelo experimental de TEPT, bem como investigar o possível envolvimento dos sistemas nitrérgico, serotoninérgico e canabinoide sobre tais alterações.

3.2 Objetivos específicos

O presente estudo teve como objetivos específicos:

- Padronização do modelo experimental – SPS – no laboratório e verificar se o SPS induz comportamento do tipo-ansiosgênico, no teste do medo condicionado contextual (MCC), 7 dias após o estresse. Ainda, avaliar se esse modelo causa possíveis prejuízos nos processos de extinção da memória aversiva.
- Verificar se o tratamento repetido com um ISRS (paroxetina), medicamento de primeira escolha no tratamento do TEPT (Berger et al., 2006), seria capaz de atenuar as possíveis alterações comportamentais avaliadas no MCC.
- Avaliar se a administração única ou repetida (durante 7 dias) de CBD ou de um inibidor preferencial da nNOS, o 7-NI (*7-Nitroindazole*) previne/atenua o comportamento ansiosgênico no MCC, inclusive sobre prejuízos nos processos de extinção da memória aversiva, após o SPS. Ainda, avaliar se tais efeitos envolveriam modulações nos sistemas nitrérgico, serotoninérgico e canabinoide.
- Verificar se os efeitos do CBD poderiam ser mediados pelos receptores CB1 e ou 5-HT_{1A}, utilizando seus respectivos antagonistas, AM281 e WAY-100635.
- Investigar se o SPS induziria alterações na expressão (proteica e RNAm para o gene) da enzima nNOS, dos receptores CB1 e 5-HT_{1A}, além de alterar os níveis de pnNOS (forma ativa da isoforma neuronal), em regiões cerebrais relacionadas com a fisiopatologia do TEPT. E se os possíveis efeitos benéficos induzidos pelos tratamentos envolveriam alterações na expressão/nível desses fatores.
- Avaliar se a administração única ou repetida de CBD ou de 7-NI também seriam capazes de, além de prevenir, reverter as consequências comportamentais do SPS.

Materias e Métodos

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais:

Ratos Wistar (260-330 g), provenientes do Biotério Central do Campus da USP – Ribeirão Preto (FMRP-USP) foram alojados no Biotério do Departamento de Fisiologia e mantidos agrupados em caixas de polipropileno (39 x 32 x 17 cm), cerca de uma semana no biotério, até o início dos procedimentos experimentais. Após a exposição ao estresse, os animais foram alocados de forma isolada e mantidos no mesmo biotério em caixas de polipropileno (20cm X 30cm X 13cm), em ambiente monitorado, sob ciclo claro-escuro de 12 h (luzes acesas às 6:00h), temperatura ambiente controlada ($24\pm 2^{\circ}\text{C}$), com água e comida *ad libitum*.

Os procedimentos experimentais estavam em concordância com o guia de uso e cuidados de animais de laboratório da Sociedade Brasileira de Neurociência e Comportamento. As condições de habitação e procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal institucional (número do processo: 039 2016).

4.2. Drogas

Canabidiol (2.5, 5, 10 e 30 mg/kg, THC Pharma, Alemanha) foi dissolvido em Tween 80 3% em salina. O 7- Nitroindazole (15, 30 e 60 mg/kg - inibidor preferencial da nNOS - Sigma, St. Louis, MO, USA) foi dissolvido em Tween80 5% + DMSO 3% em salina e a Paroxetina (5, 10 e 20 mg/Kg – inibidor seletivo da recaptação de serotonina) dissolvida em Tween80 3% em salina. O AM281 (0,5 mg/kg, Tocris, USA) dissolvido em Tween80 4% em salina e o WAY-100635 (0,3 mg/kg, Sigma, St. Louis, MO, USA) dissolvido em salina. As drogas foram administradas por via intraperitoneal (ip.) com volume de 10 ml/kg e foram preparadas imediatamente antes do uso. Em relação aos antagonistas, foram utilizadas doses baseadas em estudos da literatura e do nosso laboratório (Campos et al., 2013b).

4.3. Estresse prolongado único – SPS

O protocolo de estresse consistiu em 2 horas de restrição, seguido por 20 minutos de natação forçada e após 15 minutos de recuperação, os animais são expostos ao éter até perda do tônus postural e reflexo podal. Após a sessão de estresse, os animais foram alocados isoladamente e foram testados no MCC após 7 dias.

4.4. Medo condicionado ao contexto (MCC)

Os animais foram expostos a caixa de condicionamento com assoalho capaz de deflagrar choques ($25 \times 22 \times 22 \text{ cm}^3$ Insight Instruments Ribeirão Preto, Brasil), por um período de 10 minutos (Habituação). Em uma segunda exposição à caixa eles receberam 3 choques elétricos inescapáveis nas patas (0,35 mA/2s), em intervalos randomizados, que consistiu na sessão de condicionamento contextual. Vinte e quatro horas após esta sessão, as respostas comportamentais (congelamento ou *freezing*) foram avaliadas continuamente durante 10 ou 15 minutos de reexposição a mesma caixa, sem a deflagração de choques (sessão de extinção). Para avaliar a retenção da memória de extinção, após 24 horas adicionais, os animais novamente foram expostos à caixa durante 10 minutos. O congelamento foi considerado como a ausência total de movimentos, exceto aqueles relacionados à respiração, em que o animal assume uma postura tensa (Fanselow 1980).

4.5. Radioimunoensaio

A corticosterona plasmática foi determinada por radioimunoensaio de acordo com a técnica empregada por de Mello et al., (2012).

4.6. Western Blotting

Foram realizadas análises para os níveis de pnNOS, nNOS, CB1 e 5-HT_{1A}, das amostras provenientes dos procedimentos experimentais.

Para isso, as proteínas das amostras foram separadas de acordo com o peso molecular por meio de eletroforese em gel gradiente (4-15%) de poliacrilamida (Bio-Rad, EUA) e, em seguida, transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Bio-Rad, EUA). Após o bloqueio com uma solução BSA 5% ou leite em pó desnatado 5% em salina tamponada com tris (TBS) 0,05% de Tween 20 (TBST), a membrana foi incubada com os anticorpos primários de coelho contra pnNOS (1:500 em BSA 3% e TBST, Abcam, EUA), HTR1A (1:10000 em BSA 3% e TBST, Thermo Fisher, EUA), CB1 (1:500 em BSA 3% e TBST, abcam, EUA), ou anticorpo primário de camundongo contra β -actina (1:1000 em BSA 3% e TBST, Santa Cruz, EUA), *overnight*, a 4°C. Em seguida, a membrana foi incubada com os anticorpos secundários anti-coelho e anti-camundongo (1:5000 em leite em pó desnatado 5% e TBST, Sigma, EUA), por 2 horas, a temperatura ambiente e, então, revelada com reagente quimioluminescente (ECL, ThermoFischer, EUA) em um aparelho ChemiDocTM XRS (Bio-Rad, EUA). Por fim, a densidade óptica

das amostras foi analisada pelo *software* ImageLab (Bio-Rad, EUA), sendo que os valores obtidos foram corrigidos pelos valores de densidade óptica encontrados para β -actina em cada amostra e expressos em relação ao controle, cuja média foi considerada 1.

4.7. Procedimento experimental

4.7.1. Experimento 1: Análises da resposta emocional condicionada de animais submetidos ao SPS e testados 7 dias depois no MCC

Experimento utilizado para a padronização do SPS no laboratório. Após aclimação de até uma semana, os animais foram randomicamente separados em grupos estressados e controles. No dia 1 o grupo estressado foi submetido ao SPS (2 horas de restrição, 20 minutos de nado forçado, 15 minutos de descanso e, logo após, perda de tônus postural e reflexo podal pelo éter), posteriormente foram alocados de forma isolada e retornaram ao biotério. O grupo controle foi retirado do biotério, sofreram breve manipulação e retornaram também em caixas isoladas, para o biotério.

Sete dias após o SPS, ou seja, no oitavo dia, os animais foram habituados na caixa de condicionamento durante 10 minutos. Vinte e quatro horas depois, eles voltaram para caixa, onde foram deflagrados 3 choques elétricos (0,35 mA/2s), em intervalos randomizados. Neste mesmo dia (9°) no período da tarde, os animais foram submetidos a um procedimento cirúrgico para a canulação da artéria femoral. No décimo dia, os procedimentos foram realizados em uma sala experimental diferente (para garantir que a resposta condicionada seja relacionada apenas a caixa experimental e não ao ambiente onde a mesma se encontra). Dessa forma, os animais foram conectados ao sistema de registro de atividade cardiovascular para obtenção de valores basais dos parâmetros cardiovasculares em suas caixas durante 5 minutos e, posteriormente, foram re-expostos a mesma caixa por 10 minutos sem deflagração de choques e foi medido o tempo total da resposta de congelamento e análise dos parâmetros cardiovasculares.

A Figura 1 mostra a representação esquemática do procedimento experimental realizado:

Figura 1 - Representação esquemática do primeiro protocolo experimental indicando o intervalo de tempo entre os procedimentos realizados: SPS (*Single Prolonged Stress* - estresse realizado no dia 1); H (habituação); C (condicionamento – período matutino); F (cirurgia femoral - período vespertino); REC (resposta emocional condicionada– avaliada no último dia).

4.7.2 Experimento 2: Avaliação do processo de extinção (curta e longa duração: 10 e 15 min) e sua retenção (após 24 horas) de animais submetidos ao SPS e testados após 7 dias no MCC

Foram realizados os mesmos procedimentos iniciais do protocolo anterior. Sendo que no oitavo dia, pela manhã, os animais foram habituados na caixa de condicionamento durante 10 minutos, no período vespertino, eles voltaram para caixa, onde foram deflagrados 3 choques elétricos (0,35 mA/2s), em intervalos randomizados. No nono dia, os animais foram re-expostos a mesma caixa por 10 ou 15 minutos sem deflagração de choques e foi medido o tempo total da resposta de congelamento. No décimo dia, para avaliar processos de retenção dessa memória de extinção, os animais foram re-expostos na mesma caixa durante 10 minutos. Logo após os testes comportamentais, os animais foram eutanasiados para a retirada do encéfalo.

A Figura 2 mostra a representação esquemática do procedimento experimental realizado:

Figura 2 - Representação esquemática do intervalo de tempo entre os procedimentos realizados: SPS (*Single Prolonged Stress* – estresse); H (Habituação– período matutino); C (Condicionamento – período vespertino); E (Sessão de extinção); R (Sessão de Retenção da extinção/Teste).

4.7.3. Experimento 3 e 5: Efeito do tratamento repetido com paroxetina e CBD em animais submetidos ao SPS e testados 7 dias após no MCC

Grupos independentes de animais receberam administração i.p. de veículo ou Prx (5, 10 e 20mg/kg) ou CBD (2.5, 5 e 10 mg/kg) durante 7 dias. No oitavo dia após o início do

tratamento, os animais foram submetidos ao mesmo protocolo do MCC mencionado previamente.

Figura 3 - Representação esquemática mostrando o período do tratamento e os dias em que foram realizados o MCC: SPS (*Single Prolonged Stress* – estresse); H (Habituação– período matutino); C (Condicionamento – período vespertino); E (Sessão de extinção); R (Sessão de Retenção da extinção/Teste).

4.7.4. *Experimento 6 e 7: Avaliação da participação de receptores 5HT_{1A} e CB1 sobre os efeitos do tratamento repetido com o CBD em animais submetidos ao SPS e testados 7 dias após no MCC.*

Num grupo independente de animais, o antagonista do receptor 5-HT_{1A}, WAY100635 (0,3 mg / kg) ou o antagonista do receptor CB1, AM281 (0,5 mg / kg) foram administrados 30 minutos antes do CBD (5 mg/kg) durante 7 dias. No oitavo dia após o início do tratamento, os animais foram submetidos ao mesmo protocolo do MCC mencionado previamente.

Figura 4 - Representação esquemática mostrando o período do tratamento e os dias em que foram realizados o MCC: SPS (*Single Prolonged Stress* – estresse); H (Habituação– período matutino); C (Condicionamento – período vespertino); E (Sessão de extinção); R (Sessão de Retenção da extinção/Teste).

4.7.5. *Experimento 4, 10 e 13: Efeito do tratamento agudo com CBD (5, 10 e 30 mg/kg) e 7-NI (15, 30 e 60 mg/kg) em animais submetidos ao SPS e testados 7 dias após no MCC*

Grupos independentes de animais receberam uma única administração i.p. de veículo ou CBD 5, 10 ou 30 mg/kg) ou 7-NI (15, 30 ou 60 mg/kg). No oitavo dia após o início do tratamento, os animais foram submetidos ao mesmo protocolo do MCC mencionado previamente.

Figura 5 - Representação esquemática mostrando o período do tratamento e os dias em que foram realizados o MCC: SPS (*Single Prolonged Stress* – estresse); H (Habituação– período matutino); C (Condicionamento – período vespertino); E (Sessão de extinção); R (Sessão de Retenção da extinção/Teste).

4.7.6. *Experimento 11: Efeito do tratamento agudo com o 7-NI e repetido com o CBD em animais previamente estressados e avaliados no nado forçado (como um lembrete do estresse – reminder) e, 14 dias após o SPS, testados no MCC.*

Os animais foram submetidos a uma situação de lembrança do estresse (*reminder*) 7 dias após o SPS. Os ratos foram submetidos ao nado forçado (NF) e logo após o *remider*, iniciaram-se os tratamentos com CBD (5 mg/kg – repetido) e 7-NI (30mg/kg- agudo). No oitavo dia após o NF/início do tratamento ou no 16 d após o SPS, os animais foram submetidos ao mesmo protocolo do MCC mencionado previamente.

Figura 6 - Representação esquemática mostrando o período do tratamento e os dias em que foram realizados o MCC: SPS (*Single Prolonged Stress* – estresse); H (Habituação–

período matutino); C (Condicionamento – período vespertino); E (Sessão de extinção); R (Sessão de Retenção da extinção/Teste).

4.8. Análise Estatística: Os dados serão expressos como a média $\pm$ EPM. Os dados serão analisados por teste de *t-student*., ANOVA de duas vias e ANOVA de três vias, considerando-se os fatores estresse, tratamento1 e em certas ocasiões tratamento 2. Se houver interações tratamento x estresse. Se houver interação entre os fatores, serão submetidos à ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste *Newman Keuls* O nível de significância estatístico utilizado será de 95% ($p < 0,05$).

Resultados

5 RESULTADOS

5.1. Análises da resposta emocional condicionada de animais submetidos ao SPS e testados 7 dias depois no MCC

O SPS intensificou a resposta emocional condicionada, promovendo aumento do tempo de congelamento, dos animais, durante a reexposição ao contexto aversivo quando comparados ao grupo controle (não exposto ao SPS), sete dias depois ($t= 4,059$; $df=8$; $p< 0,01$).

Figura 7 – Análise comportamental de animais submetidos ao SPS, e testados 7 dias após no MCC, expressos em % de congelamento (*freezing*). **A)** Representação esquemática do primeiro protocolo experimental indicando o intervalo de tempo entre os procedimentos realizados: SPS (*Single Prolonged Stress* - estresse realizado no dia 1); H (habituação); C (condicionamento – período matutino); F (cirurgia femoral - período vespertino); REC (resposta emocional condicionada– avaliada no último dia). **B)** Dados apresentados como a média e o erro padrão ($n=5$ /grupo). *Representa diferença estatística em relação ao grupo controle ($p=0,036$), obtida pelo teste de *t-student*.

O SPS também foi capaz de causar alterações nas respostas autonômicas, avaliadas pelo aumento da pressão arterial média ($F_{(14,98)}=5,559$, $p<0,0001$) sem alterações significativas da frequência cardíaca ($F_{(14,98)}=0,8906$, $p=0,571$). Interessantemente, a pressão arterial média basal dos animais submetidos ao SPS parece ser maior (uma tendência evidente), quando comparados ao grupo controle ($t= 2,011$; $df=7$; $p= 0,084$)

Figura 8 – Análise do efeito do SPS sobre a pressão arterial média basal, a variação da pressão arterial média (Δ PAM) e a frequência cardíaca (Δ FC) antes e durante a reexposição ao contexto aversivo, 7 dias após ao estresse. **A)** Os animais foram colocados na caixa de condicionamento no tempo 1. Os símbolos representam a média e as barras o erro padrão. *Representa diferença estatística em relação ao grupo controle ($p<0,0001$), two-way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni ($n_{\text{controle}}=4$; $n_{\text{SPS}}=5$). **B)** Dados apresentados como a média e o erro padrão ($p=0,0842$), obtida pelo teste de *t-student*.

5.2. Avaliação do processo de extinção (curta e longa duração: 10 e 15 min) e sua consolidação (após 24 horas) de animais submetidos ao SPS e testados após 7 dias no MCC

Os animais submetidos ao SPS apresentaram maior tempo total de congelamento ($F_{(1,15)}=11,07$, $p<0,05$)/($t= 3,329$; $df=14$; $p< 0,01$) durante a primeira reexposição à caixa, indicando uma sensibilização da resposta de medo condicionado. Provavelmente devido a curta exposição (10min) os animais submetidos ao SPS não conseguiram adquirir a memória de extinção, uma vez que não há diferença entre os pontos iniciais e finais da análise temporal

desse processo ($p > 0,05$). Uma exposição breve ao ambiente condicionado pode gerar processos de reconsolidação da memória aversiva. Vinte e quatro horas após, os animais estressados continuaram apresentado um elevado tempo de congelamento ($F_{(1,15)} = 16,412$, $p < 0,01$) / ($t = 4,051$; $df = 14$; $p < 0,01$).

Figura 9 - Análise comportamental de animais submetidos ao SPS, e testados 7 dias após no MCC, expressos em % de congelamento (*freezing*). Vinte e quatro horas após a sessão de

extinção (10 min), os animais foram re-expostos a caixa de condicionamento (10 min). Não houve aquisição da memória de extinção na primeira reexposição, pois não há diferença entre os minutos iniciais e finais da sessão para o grupo SPS(C). Pode ter ocorrido um processo de reconsolidação da memória aversiva devido a breve exposição. **A)** Representação esquemática do intervalo de tempo entre os procedimentos realizados: SPS (*Single Prolonged Stress* – estresse); H (Habituação– período matutino); C (Condicionamento – período vespertino); E (Sessão de extinção); R (Sessão de Retenção da extinção/Teste). **B)** Dados apresentados como a média e o erro padrão (n=8/grupo). *Representa diferença estatística em relação ao grupo controle (p=0,005 e p= 0,0012), respectivamente de cada sessão, obtida pelo teste de *t-student*. **C)** Sessão de extinção representada em dois momentos: 5 minutos iniciais e 5 minutos finais. Dados apresentados como a média e o erro padrão. *Representa diferença estatística em relação aos 5 minutos iniciais do grupo controle (p=0,0056), obtida pelo teste de *t-student*. **D)** Dados apresentados como a média (símbolos) e o erro padrão (n=8/grupo). *Representa diferença estatística em relação ao grupo controle (p=<0,05), obtida pelo teste de *t-student*.

Com uma exposição mais duradoura (15 min), durante a primeira reexposição à caixa (sessão de extinção), os animais submetidos ao SPS continuaram apresentando maior tempo total de congelamento ($F_{(1,13)} = 7,265$, $p<0,05$) / ($t=3,125$; $df=12$; $p<0,01$) , indicando uma sensibilização da resposta de medo condicionado. Vinte e quatro horas após, os animais estressados continuaram apresentado tal comportamento ($F_{(1,13)} = 10,555$, $p<0,01$) / ($t=3,249$; $df=12$; $p<0,01$). Por meio de uma análise temporal (comparando os minutos iniciais e finais da sessão de extinção) observou-se que ambos os grupos foram capazes de adquirir a memória de extinção ao longo da sessão (SPS: $t=2,619$, $df=12$, $p<0,05$; Controle: $t=4,053$, $df=12$, $p<0,01$). Assim, na segunda reexposição, para verificar a possível retenção desta memória, observamos que os animais SPS apresentaram congelamento elevado em relação aos animais controles ($p<0,01$), indicando déficits nos processos de retenção da memória de extinção.

Figura 10 - Análise comportamental de animais submetidos ao SPS, e testados 7 dias depois no MCC, expressos em % de congelamento (*freezing*). Vinte quatro horas após a sessão de extinção (15 min), os animais foram re-expostos a caixa de condicionamento (10 min) evidenciando prejuízos nos processos de consolidação da extinção. **A)** Dados apresentados como a média e o erro padrão (n=7/grupo). *Representa diferença estatística entre os grupos controle ($p=0,0088$ e $p=0,0025$), respectivamente de cada sessão, obtida pelo teste de *t-student*. **B)** Sessão de extinção representada em dois momentos: 5 minutos iniciais e 5 minutos finais. Dados apresentados como a média e o erro padrão. *Representa diferença estatística em relação aos 5 minutos iniciais de ambos os grupos (SPS; $p=0,0224$ e Controle; $p=0,0016$), obtida pelo

teste de *t-student*. C) Dados apresentados como a média (símbolos) e o erro padrão ($n=7$ /grupo).
 *Representa diferença estatística em relação ao grupo controle ($p<0,05$), obtida pelo teste de *t-student*.

5.3. Efeito do tratamento repetido com paroxetina em animais submetidos ao SPS e testados 7 dias após no MCC

A administração repetida (7 dias) de Paroxetina (10mg/kg) reduziu o efeito do estresse (com redução da resposta de congelamento - *freezing*) desencadeado pelo SPS, além de prevenir prejuízos no processo de consolidação dessa “nova” memória de extinção. Em relação à primeira reexposição a caixa, ou seja, durante a sessão de extinção, a ANOVA de duas vias revelou em efeito do estresse ($F_{1,56} = 11,23$; $p<0,01$), sem efeito no tratamento ($F_{3,56} = 1,129$; $p=0,3451$), e uma interação entre estresse e tratamento ($F_{3,56} = 7,718$; $p<0,001$). Vinte e quatro horas após, na segunda reexposição, para verificar o processo de retenção da memória de extinção, a ANOVA de duas vias revelou também um efeito do estresse ($F_{1,56} = 4,801$; $p<0,05$), sem efeito no tratamento ($F_{3,56} = 1,648$; $p=0,1887$), e por fim interação entre os dois fatores ($F_{3,56} = 4,997$; $p<0,01$). Adicionalmente, por meio da ANOVA de uma via, verificou-se, utilizando o pós-teste de *Newman Keuls*, que o grupo SPS (V) foi diferente do grupo Cont (V), evidenciando o efeito do estresse, além do prejuízo nos processos de consolidação da memória de extinção. Ademais, o grupo SPS (Prxt10) foi diferente do grupo SPS (V), indicando que nessa dose, a paroxetina inibiu os efeitos do estresse, além de prevenir déficits nos processos de retenção da memória de extinção.

Figura 11 - Efeito do tratamento repetido com a Paroxetina (5, 10 ou 20 mg/kg) ou Veículo sobre a resposta a comportamental de animais submetidos ao SPS e testados 7 dias após no MCC. O comportamento foi expresso em % de congelamento (*freezing*). A dose de 10 mg/kg foi capaz de prevenir o aumento da resposta de congelamento e prejuízos nos processos de consolidação da memória de extinção. **A)** Representação esquemática do intervalo de tempo entre os procedimentos realizados com adição do tratamento: Prxt (paroxetina); V (veículo); SPS (*Single Prolonged Stress* – estresse); H (Habituação – período matutino); C

(Condicionamento – período vespertino); E (Sessão de extinção); R (Sessão de Retenção da extinção/Teste). **B)** Dados representados como a média e o erro padrão (n=10, 7, 7, 7, 9, 7, 10, 7, respectivamente, em relação ao gráfico). **C)** Dados apresentados como a média (símbolos) e o erro padrão. *Representa diferença estatística em relação ao grupo Cont (V). # Representa diferença estatística entre o grupo SPS (V). ($p < 0,05$, ANOVA e pós-teste de *Newman Keuls*).

5.4. Efeito do tratamento agudo com o CBD, nas doses de 5 e 10mg/kg, em animais submetidos ao SPS e testados 7 dias após no MCC.

A injeção única de CBD (5 e 10 mg/kg) duas horas após o SPS não foi capaz de prevenir os efeitos do estresse avaliados no MCC, 7 dias depois ($p > 0,05$).

Figura 12 - Efeito do tratamento agudo com CBD (5 ou 10 mg/kg) sobre a resposta comportamental de animais submetidos ao SPS e testados 7 dias após no MCC. O comportamento foi expresso em % de congelamento (*freezing*). A doses de 5 e 10 mg/kg não foram capazes de prevenir os efeitos do estresse e os prejuízos nos processos de consolidação da memória de extinção. **A)** Representação esquemática do intervalo de tempo entre os procedimentos realizados com adição do tratamento: CBD (canabidiol); V (veículo); SPS (*Single Prolonged Stress* – estresse); H (Habituação – período matutino); C (Condicionamento – período vespertino); E (Sessão de extinção); R (Sessão de Retenção da extinção/Teste). **B)** Dados representados como a média e o erro padrão (n=4, 4, 4, 4, 5, 5, respectivamente, em relação ao gráfico). **C)** Dados apresentados como a média (símbolos) e o erro padrão. *Representa diferença estatística em relação ao grupo Cont (V) ($p < 0,05$, ANOVA de uma via seguida do pós-teste de *Newman Keuls*).

5.5. Efeito do tratamento repetido com o CBD em animais submetidos ao SPS e testados 7 dias após no MCC.

A administração repetida (7 dias) de CBD nas doses de 5 e 10mg/kg parecem atenuar o efeito do estresse durante a primeira reexposição à caixa (sessão de extinção), ainda, nestas

mesmas dosagens, o CBD foi capaz de prevenir prejuízos nos processos de retenção, da memória de extinção, desencadeados pelo SPS. Em relação à primeira reexposição a caixa, ou seja, durante a sessão de extinção, a ANOVA de duas vias revelou um efeito do estresse ($F_{1,42} = 8,356$; $p < 0,01$), efeito no tratamento ($F_{3,42} = 4,127$; $p < 0,05$), e uma interação entre estresse e tratamento ($F_{3,42} = 4,535$; $p < 0,05$). Vinte e quatro horas após, para avaliar o processo de retenção da memória de extinção, a ANOVA de duas vias revelou uma interação entre estresse e tratamento ($F_{3,42} = 7,307$; $p < 0,001$). Adicionalmente, a ANOVA de uma via seguida do pós-teste de *Newman Keuls* demonstrou que o grupo SPS (V) foi diferente do grupo Cont (V), em ambas as reexposições. Ainda, os grupos SPS (CBD5) e SPS (CBD10) foram diferentes do grupo SPS (V) durante a segunda reexposição à caixa, indicando que nessas dosagens, o CBD foi capaz de prevenir déficits no processo de consolidação da extinção.

B)

Figura 13 - Efeito da administração repetida de CBD (2,5, 5 ou 10 mg/kg) ou veículo (V) sobre a resposta comportamental de animais submetidos ao SPS e testados 7 dias após no MCC. O comportamento foi expresso em % de congelamento (*freezing*). As doses de 5 e 10 mg/kg foram capazes de prevenir prejuízos nos processos de retenção da memória de extinção. **A)** Representação esquemática do intervalo de tempo entre os procedimentos realizados com adição do tratamento: CBD (canabidiol); V (veículo); SPS (*Single Prolonged Stress* – estresse); H (Habituação – período matutino); C (Condicionamento – período vespertino); E (Sessão de extinção); R (Sessão de Retenção da extinção/Teste). **B)** Dados representados como a média e o erro padrão (n=6, 6, 6, 6, 6, 6, 7, 7, respectivamente em relação ao gráfico). **C)** Dados apresentados como a média (símbolos) e o erro padrão *Representa diferença estatística entre o grupo Cont (V). # Representa diferença estatística entre o grupo SPS (V). (p<0,05, ANOVA de uma via seguida do pós-teste de *Newman Keuls*).

4.6. Avaliação da participação de receptores 5HT_{1A} sobre os efeitos do tratamento repetido com o CBD em animais submetidos ao SPS e testados 7 dias após no MCC.

A administração repetida (7 dias) de CBD na dose de 5 mg/kg conseguiu prevenir o efeito do estresse, durante a sessão de extinção, pois reduziu significativamente a porcentagem de tempo de congelamento, comparado ao grupo estressado tratado com veículo. Esse efeito

(anti-estresse) foi bloqueado pelo tratamento prévio com o antagonista de receptores serotoninérgicos do tipo 1A (5-HT_{1A}), WAY-100635. Além disso, corroborando com o experimento anterior, o CBD foi capaz prevenir déficits nos processos de consolidação da memória de extinção, desencadeadas pelo SPS, o qual também foi bloqueado pelo tratamento prévio com o WAY-100635. Em relação à primeira reexposição a caixa (sessão de extinção), a ANOVA de três vias revelou um efeito do estresse ($F_{1,58} = 52,413$; $p < 0,0001$), efeito da primeira e segunda injeção (1ª injeção: $F_{1,58} = 4,289$; $p < 0,05$ e 2ª injeção: $F_{1,58} = 7,777$; $p < 0,01$), como também, uma interação de cada injeção com o estresse (1ª injeção+estresse: $F_{1,58} = 4,630$; $p < 0,05$ e 2ª injeção+estresse: $F_{1,58} = 4,727$; $p < 0,05$). Não houve interação entre as injeções ($F_{1,58} = 2,615$; $p > 0,05$) e entre os três fatores ($F_{1,58} = 1,110$; $p > 0,05$). Dessa forma, quando isolamos a variável estresse e comparamos cada grupo separado, a ANOVA de duas vias revelou uma interação entre as injeções no grupo SPS ($F_{1,22} = 4,520$; $p < 0,05$) e não houve interação no grupo Controle ($F_{1,22} = 0,133$; $p > 0,05$).

Vinte e quatro horas após, para avaliar os processos de consolidação da memória de extinção, a ANOVA de três vias também revelou um efeito do estresse ($F_{1,58} = 53,288$; $p < 0,0001$), efeito da primeira e segunda injeção (1ª injeção: $F_{1,58} = 6,108$; $p < 0,05$ e 2ª injeção: $F_{1,58} = 7,659$; $p < 0,01$) e interação de cada injeção com o estresse (1ª injeção+estresse: $F_{1,58} = 4,073$; $p < 0,05$ e 2ª injeção+estresse: $F_{1,58} = 8,213$; $p < 0,01$). Não houve interação entre as injeções ($F_{1,58} = 2,662$; $p > 0,05$) e entre os três fatores ($F_{1,58} = 2,305$; $p > 0,05$). Quando isolamos a variável estresse e comparamos cada grupo separado, a ANOVA de duas vias revelou uma interação entre as injeções no grupo SPS ($F_{1,36} = 5,290$; $p < 0,05$) e não houve interação no grupo Controle ($F_{1,22} = 0,008$; $p > 0,05$).

Adicionalmente, a ANOVA de uma via seguida do pós-teste de *Newman-Keuls* demonstrou que os grupos SPS (V+V) e SPS (W+CBD) foram diferentes dos grupos Cont (V+V) e SPS (V+CBD) em ambas as reexposições, indicando que nessa dose (0,03 mg/Kg), o antagonismo de receptores 5-HT_{1A} foi capaz de bloquear os efeitos benéficos do CBD sobre o estresse.

Figura 14 – Envolvimento dos receptores 5-HT1A (WAY-100635 0,3 mg/kg) nos efeitos do CBD (5 mg/kg) sobre a resposta comportamental de animais submetidos ao SPS e testados 7 dias após no MCC. O comportamento foi expresso em % de congelamento (*freezing*). O WAY-100635 foi capaz de bloquear os efeitos do CBD durante as duas reexposições à caixa. **A)** Representação esquemática do intervalo de tempo entre os procedimentos realizados com adição do tratamento: CBD (canabidiol); Way (WAY-100635); V (veículo); SPS (*Single Prolonged Stress* – estresse); H (Habituação – período matutino); C (Condicionamento – período vespertino); E (Sessão de extinção); R (Sessão de Retenção da extinção/Teste). **B)**

Dados representados como a média e o erro padrão (n=8, 6, 6, 6, 10, 10, 10, 10, respectivamente em relação ao gráfico). C) Dados apresentados como a média (símbolos) e o erro padrão. *Representa diferença estatística em relação a todos os grupos controle (V+V; W+V; V+CBD; W+CBD). #Representa diferença estatística em relação aos demais grupos SPS (V+V; W+V; W+CBD). ANOVA de uma via seguida do pós-teste de *Newman-Keuls*.

5.7. Avaliação da participação de receptores CB1 sobre os efeitos do tratamento repetido com o CBD em animais submetidos ao SPS e testados 7 dias após no MCC.

A administração repetida (7 dias) de CBD na dose de 5 mg/kg continuou prevenindo o efeito do estresse, durante a sessão de extinção, pois reduziu significativamente a porcentagem de tempo de congelamento, comparado ao grupo estressado tratado com veículo. Este efeito também foi bloqueado pelo tratamento prévio com o antagonista de receptores CB1, AM281. Ainda, corroborando com os experimentos prévios, o CBD foi capaz prevenir prejuízos nos processos de retenção da memória de extinção, desencadeadas pelo SPS, o qual também foi bloqueado pelo tratamento prévio com o AM281. Em relação à primeira reexposição a caixa (sessão de extinção), a ANOVA de três vias revelou um efeito do estresse ($F_{1,58} = 55,760$; $p < 0,0001$), efeito na primeira e segunda injeção (1ª injeção: $F_{1,58} = 11,091$; $p < 0,01$; 2ª injeção: $F_{1,58} = 8,861$; $p < 0,01$), como também, interação da segunda injeção (CBD) com o estresse ($F_{1,58} = 12,964$; $p < 0,01$) e interação entre as duas injeções ($F_{1,58} = 6,318$; $p < 0,05$). Não houve interação entre os três fatores ($F_{1,58} = 1,071$; $p > 0,05$).

Vinte e quatro horas após, para avaliar os processos de retenção da memória de extinção, a ANOVA de três vias também revelou um efeito do estresse ($F_{1,58} = 55,652$; $p < 0,0001$), efeito na primeira e segunda injeção (1ª injeção: $F_{1,58} = 4,975$; $p < 0,05$; 2ª injeção: $F_{1,58} = 5,879$; $p < 0,05$). Também houve interação da segunda injeção (CBD) com o estresse ($F_{1,58} = 7,540$; $p < 0,01$) e interação entre as duas injeções ($F_{1,58} = 4,348$; $p < 0,05$). Neste caso, houve uma tendência de interação entre os três fatores ($F_{1,58} = 3,121$; $p = 0,08$).

A ANOVA de uma via seguida do pós-teste de *Newman-Keuls* demonstrou que os grupos SPS (V+V) e SPS (AM+CBD) foram diferentes dos grupos Cont (V+V) e SPS (V+CBD) em ambas as reexposições, indicando que nessa dose (0,05 mg/Kg), o antagonismo de receptores CB1 também foi capaz de bloquear os efeitos benéficos do CBD sobre o estresse.

Figura 15 - Envolvimento dos receptores CB1 (AM281 0,5 mg/kg) nos efeitos do CBD (5 mg/kg) sobre a resposta comportamental de animais submetidos ao SPS e testados 7 dias após no MCC. O comportamento foi expresso em % de congelamento (*freezing*). O AM281 foi capaz

de bloquear os efeitos do CBD durante as duas reexposições à caixa. **A)** Representação esquemática do intervalo de tempo entre os procedimentos realizados com adição do tratamento: CBD (canabidiol); AM (AM281); V (veículo); SPS (*Single Prolonged Stress* – estresse); H (Habituação – período matutino); C (Condicionamento – período vespertino); E (Sessão de extinção); R (Sessão de Retenção da extinção/Teste). **B)** Dados representados como a média e o erro padrão (n=10, 6, 6, 6, 11, 8, 8, 11, respectivamente, em relação ao gráfico). **C)** Dados apresentados como a média (símbolos) e o erro padrão. *Representa diferença estatística em relação a todos os grupos controle (V+V; AM+V; V+CBD; AM+CBD). #Representa diferença estatística em relação aos demais grupos SPS (V+V; AM+V; AM+CBD). ANOVA de uma via seguida do pós-teste de *Newman-Keuls*.

5.8. Alteração temporal nos níveis de corticosterona plasmática de animais submetidos ao SPS e testados 7 dias após no MCC.

O SPS causou aumento nos níveis de corticosterona plasmática logo após o estresse ($t=2,841$; $df=10$; $p<0,05$) e houve uma tendência desses níveis permanecerem maiores comparado aos animais controle, 24h após o SPS ($t=2,3$; $df=5$; $p=0,06$).

Verificou-se também uma tendência de níveis plasmáticos menores nos animais estressados, após a sessão de retenção/teste, 10d após o SPS ($t=2,03$; $df=9$; $p<0,07$).

Figura 16 – Avaliação temporal dos níveis plasmáticos de corticosterona. Os resultados foram expressos em ug/dl. O SPS causou um aumento nos níveis de corticosterona logo após o estresse e foi observada uma tendência de níveis mais elevados nestes mesmos animais, 24h depois. Após a sessão de retenção/teste também foi verificado uma tendência de níveis plasmáticos menores, comparado aos animais controles. Dados representados como a média e o erro padrão

(n=6, 6, 3, 4, 7, 6, 6, 5, respectivamente, em relação ao gráfico) *Representa diferença estatística entre o seu respectivo controle ($p \leq 0,05$), obtida pelo teste de *t-student*.

5.9. Alteração temporal nos níveis de pnNOS (forma ativa) no hipocampo ventral e região pré-límbica do CPFvm de animais submetidos ao SPS e testados 7 dias após no MCC.

O SPS foi capaz de induzir uma elevação nos níveis da pnNOS, logo após o estresse, sugerindo um aumento inicial da atividade dessa enzima, no hipocampo ventral de animais submetidos ao SPS ($t = 3,732$; $df=10$; $p < 0,01$). Não houve alteração da pnNOS nos outros momentos avaliados (24h, antes e depois dos testes comportamentais – $p > 0,05$). Ainda, 24h após o estresse houve um aumento na expressão da nNOS total ($t = 3,302$; $df=6$; $p < 0,05$).

Também foi observada uma elevação nos níveis da pnNOS no 10º dia, após a sessão de retenção/teste, na região pré-límbica do CPFvm, ($t = 2,551$; $df=6$; $p < 0,05$). Não houve alteração da pnNOS nos outros tempos avaliados ($p > 0,05$). Ainda, 24h após o estresse houve um aumento na expressão da nNOS total ($t = 3,302$; $df=6$; $p < 0,05$).

B)

Pré-Líbico CPFvm

Figura 17 – Efeito do SPS sobre os níveis de fosforilação (pnNOS) e expressão da nNOS no hipocampo ventral (A) e região pré-límbica do córtex pré-frontal ventromedial (PL- CPFvm) (B) de animais submetidos a esse modelo de estresse e testados 7 dias após no MCC. Os resultados foram expressão em % dos controles **A)** No hipocampo ventral o SPS foi capaz de aumentar os níveis de pnNOS e a expressão de nNOS, logo após e 24 após o estresse, respectivamente. **B)** No PL-CPFvm houve um aumento nos níveis de pnNOS 10d após o SPS, logo após a sessão de retenção/teste. AH (antes da habituação); DT (depois do teste). Os dados foram normalizados pela expressão de Actina e representados (média $\pm$ erro padrão) como porcentagem do grupo controle (n= 4-6 por grupo). *Representa diferença estatística entre o seu respectivo controle ($p < 0,05$), obtida pelo teste de *t-student*.

4.10. Efeito do tratamento agudo com o 7-Nitroindazole (7-NI) em animais submetidos ao SPS e testados 7 dias após no MCC.

Uma única administração de 7-Nitroindazole (7-NI) injetada 2-3h após o SPS nas doses de 30 e 60mg/kg parecem prevenir o efeito do estresse durante a primeira reexposição à caixa (sessão de extinção). Além disso, nestas mesmas doses, o 7-NI foi capaz de prevenir prejuízos nos processos de retenção da memória de extinção desencadeadas pelo SPS. Em relação à primeira reexposição a caixa, ou seja, durante a sessão de extinção, a ANOVA de duas vias revelou um efeito do estresse ($F_{1,41} = 21,724$; $p < 0,0001$), efeito no tratamento ($F_{3,41} = 5,331$; $p < 0,01$), e uma interação entre estresse e tratamento ($F_{3,41} = 3,310$; $p < 0,05$). Vinte e quatro horas após, para avaliar processos de retenção da memória de extinção, a ANOVA de duas vias revelou um efeito do estresse ($F_{1,41} = 24,321$; $p < 0,0001$), efeito no tratamento ($F_{3,41} = 6,326$; $p < 0,01$), e uma interação entre estresse e tratamento ($F_{3,41} = 4,575$; $p < 0,01$). Adicionalmente, a ANOVA de uma via seguida do pós-teste de *Newman-Keuls* demonstrou que o grupo SPS (V) foi diferente do grupo Cont (V), em ambas as reexposições. Ainda, os grupos SPS (30 7NI) e SPS (60 7NI) foram diferentes do grupo SPS (V) durante as duas reexposições, indicando que nessas doses, o 7NI foi capaz de prevenir a sensibilização da resposta de medo e prejuízos nos processos de retenção da “nova” memória de extinção.

B) Sessão de extinção

Retenção da extinção (teste)

Figura 18 - Efeito de uma única administração de 7-NI (7-Nitroindazole - 15, 30 e 60 mg/kg) ou veículo (V) sobre a resposta comportamental de animais submetidos ao SPS e testados 7 dias após no MCC. O comportamento foi expresso em % de congelamento (*freezing*). As doses de 30 e 60 mg/kg foram capazes de prevenir as respostas de sensibilização do medo e prejuízos nos processos de retenção da memória de extinção. **A)** Representação esquemática do intervalo de tempo entre os procedimentos realizados com adição do tratamento: 7-NI (7-Nitroindazole); V (veículo); SPS (*Single Prolonged Stress* – estresse); H (Habituação – período matutino); C (Condicionamento – período vespertino); E (Sessão de extinção); R (Sessão de Retenção da extinção/Teste). **B)** Dados representados como a média e o erro padrão (n=8, 3, 5, 5, 8, 4, 8, 8, respectivamente em relação ao gráfico). **C)** Dados apresentados como a média (símbolos) e o erro padrão *Representa diferença estatística entre o grupo Cont (V) e os demais controles (15 7NI; 30 7NI; 60 7NI). # Representa diferença estatística entre o grupo SPS (V). ($p < 0,05$, ANOVA de uma via seguida do pós-teste de *Newman-Keuls*).

5.11. Efeito do tratamento agudo com o 7-NI e repetido com o CBD em animais previamente estressados e avaliados no nado forçado (como um lembrete do estresse – *reminder*) e, 14 dias após o SPS, testados no MCC.

O SPS intensificou a resposta de estresse avaliadas no nado forçado. Foi observado um aumento no tempo de imobilidade ($t= 4,679$; $df=49$; $p< 0,001$), redução na frequência de mergulhos ($t= 6,074$; $df=49$; $p< 0,001$) e uma menor latência para o primeiro momento de imobilidade ($t= 6,074$; $df=49$; $p< 0,001$). Além disso, foi encontrada uma tendência na redução do tempo de nado ($t= 1,907$; $df=49$; $p= 0,06$) e não houve diferenças no tempo de escalada entre os dois grupos ($t= 1,355$; $df=49$; $p> 0,05$).

Figura 19 - Análise comportamental de animais previamente estressados (SPS) e submetidos 7 dias após ao nado forçado (*reminder*). Foram avaliados 5 parâmetros: % do tempo de imobilidade, nado e escalada; frequência de mergulhos e latência (em segundos) para o primeiro momento de imobilidade. **A)** Representação esquemática do intervalo de tempo entre os procedimentos realizados: SPS (*Single Prolonged Stress* – estresse); NF (nado forçado); CBD (canabidiol); 7-NI (7-nitroindazole); V (veículo); H (habituação – período matutino); C (condicionamento – período vespertino); E (sessão de extinção); R (sessão de Retenção da extinção/teste). **B)** Dados apresentados como a média e o erro padrão ($n_{\text{controle}}=22$; $n_{\text{SPS}}=29$). *Representa diferença estatística em relação ao grupo controle ($p>0,05$), obtida pelo teste de *t-student*.

Logo após a exposição ao nado forçado (*reminder*), os tratamentos foram iniciados e 7 dias após os animais foram testados no MCC. O tratamento agudo com o 7-NI (30mg/kg) e repetido (7 dias) com o CBD (5 mg/kg) reverteram o efeito do estresse. Durante a sessão de extinção, os animais tratados apresentaram uma redução na porcentagem de tempo de congelamento, comparado ao grupo estressado tratado com veículo. Ainda, ambos tratamentos foram capazes de reduzir prejuízos nos processos de consolidação da memória de extinção, desencadeadas pelo SPS. Em relação à sessão de extinção, a ANOVA de duas vias revelou um efeito do estresse ($F_{1,45} = 9,329$; $p<0,01$), efeito no tratamento ($F_{2,45} = 10,748$; $p<0,001$), e uma interação entre estresse e tratamento ($F_{2,45} = 11,009$; $p<0,001$). Vinte e quatro horas após, para avaliar processos de retenção da memória de extinção, a ANOVA de duas vias revelou um efeito do estresse ($F_{1,45} = 5,581$; $p<0,05$), efeito no tratamento ($F_{2,45} = 12,653$; $p<0,001$) e uma interação entre estresse e tratamento ($F_{2,45} = 9,691$; $p<0,001$). Adicionalmente, a ANOVA de uma via seguida do pós-teste de *Newman-Keuls* demonstrou que o grupo SPS (V) foi diferente

dos demais grupos, em ambas as reexposições. Dessa forma, ambos os tratamentos (agudo 7-NI – 30mg/kg e repetido CBD – 5mg/kg) foram capazes de reverter os efeitos do estresse verificados na exposição ao nado forçado (*reminder*) e assim prevenir o aumento da sensibilização da resposta de medo e prejuízos nos processos de retenção da memória de extinção.

A)

B)

Figura 20 - Efeitos de uma única administração de 7-NI (30 mg/kg) ou administração repetida de CBD (5 mg/kg) ou veículo (V) sobre a resposta comportamental de animais estressados pelo SPS, submetidos ao nado forçado (*reminder*) e testados 14 dias após o estresse no MCC. O comportamento foi expresso em % de congelamento (*freezing*). Ambos os tratamentos foram capazes de reverter o efeito do estresse e, assim, prevenir as respostas de sensibilização do medo e prejuízos nos processos de retenção da memória de extinção. **A)** Dados representados como a média e o erro padrão (n=8, 7, 7, 9, 10, 10 respectivamente em relação ao gráfico). *Representa diferença estatística em relação aos demais grupos ($p < 0,05$, ANOVA de uma via seguida do pós-teste de *Newman-Keuls*). **B)** Sessão de extinção representada em dois momentos para cada grupo: 5 minutos iniciais e 5 minutos finais. Dados apresentados como a média e o erro padrão. *Representa diferença estatística em relação aos 5 minutos iniciais de cada grupo ($p < 0,05$, obtida pelo teste de *t-student*). **C)** Dados apresentados como a média (símbolos) e o erro padrão. *Representa diferença estatística em relação aos demais grupos ($p < 0,05$, ANOVA de uma via seguida do pós-teste de *Newman-Keuls*).

5.12. Correlação entre o tempo de imobilidade e a porcentagem de congelamento (*freezing*) das duas sessões (processo de extinção e retenção).

Houve uma correlação positiva entre o tempo de imobilidade, avaliado durante o nado forçado, e a % de congelamento em ambas a reexposições no MCC dos animais estressados e não-estressados tratados com veículo (Cont(V) e SPS(V)). O coeficiente de correlação de Pearson revelou uma correlação positiva (% de congelamento x tempo de imobilidade) na sessão de extinção ($r = 0,697$, $p = 0,0019$) e na sessão de retenção ($r = 0,7205$, $p = 0,0011$).

Figura 21 – Correlação positiva entre a % de congelamento da sessão de extinção (A) e da sessão de retenção (B) em relação ao tempo de imobilidade dispendido durante o nado forçado de animais estressados e não-estressados tratados apenas com veículo. ($p < 0,05$, Teste de correção de Spearman, $n_{\text{controle}} = 8$; $n_{\text{SPS}} = 9$)

5.13. Efeito de uma única administração de CBD na dose de 30 mg/Kg em animais submetidos ao SPS e testados 7 dias após no MCC.

Uma administração única de CBD injetada 2-3h após o SPS, com uma dose 6 vezes maior do que a utilizada no tratamento repetido (30 mg/kg), preveniu o efeito do estresse durante a primeira reexposição à caixa (sessão de extinção). Ainda, essa única administração foi capaz de prevenir prejuízos nos processos de consolidação da memória de extinção, desencadeadas pelo SPS. Em relação à primeira reexposição a caixa, ou seja, durante a sessão de extinção, a ANOVA de duas vias revelou um efeito do estresse ($F_{1,18} = 8,365$; $p < 0,01$), efeito no tratamento ($F_{1,18} = 4,816$; $p < 0,05$), e uma interação entre estresse e tratamento ($F_{1,18} = 6,029$;

$p < 0,05$). Vinte e quatro horas após, para avaliar processos de retenção da memória de extinção, a ANOVA de duas vias revelou um efeito do estresse ($F_{1,18} = 7,35$; $p < 0,05$), uma tendência de efeito no tratamento ($F_{1,18} = 4,33$; $p = 0,052$), e uma interação entre estresse e tratamento ($F_{1,18} = 5,95$; $p < 0,01$). Adicionalmente, a ANOVA de uma via seguida do pós-teste de *Newman-Keuls* demonstrou que o grupo SPS (V) foi diferente dos demais grupos, em ambas as reexposições. Dessa forma, uma única injeção de CBD na dose de 30 mg/Kg, 2-3h após o SPS, foi capaz de prevenir os efeitos do estresse: o aumento da sensibilização da resposta de medo e prejuízos nos processos de retenção da memória de extinção.

Figura 22 - Efeito de uma única administração de CBD (30 mg/kg) ou veículo (V) sobre a resposta comportamental de animais submetidos ao SPS e testados 7 dias após no MCC. O comportamento foi expresso em % de congelamento (*freezing*). A dose de 30mg/Kg injetada uma única vez foi capaz de prevenir as respostas de sensibilização do medo e prejuízos nos processos de retenção da memória de extinção. **A)** Representação esquemática do intervalo de tempo entre os procedimentos realizados com adição do tratamento: CBD (canabidiol); V (veículo); SPS (*Single Prolonged Stress* – estresse); H (Habituação – período matutino); C (Condicionamento – período vespertino); E (Sessão de extinção); R (Sessão de Retenção da extinção/Teste). **B)** Dados representados como a média e o erro padrão (n=5, 5, 6, 6, respectivamente em relação ao gráfico). **C)** Dados apresentados como a média (símbolos) e o erro padrão *Representa diferença estatística em relação aos demais grupos ($p < 0,05$, ANOVA de uma via seguida do pós-teste de *Newman-Keuls*).

6 DISCUSSÃO

Corroborando a proposta de que o estresse prolongado único (SPS) pode ser um bom modelo animal para o estudo da fisiopatogenia do transtorno de estresse pós-traumático (TEPT), nossos resultados, referente à padronização do modelo, vão ao encontro de dados prévios da literatura (Takahashi et al., 2006; Imanaka et al., 2006; Wang et al., 2008; Yamamoto et al. 2009; Knox et al., 2012). Foi observado que o SPS aumentou o comportamento ansiogênico dos animais no teste do medo condicionado ao contexto, pois desencadeou um aumento na porcentagem de congelamento (freezing), evidenciando, assim, uma intensificação da resposta emocional condicionada. Além disso, essa alteração comportamental foi acompanhada de alterações nas respostas autonômicas, em específico da pressão arterial média. De forma bastante interessante, a pressão arterial média basal destes animais também pareceu estar um pouco elevada, estudos mostram que pacientes com TEPT, geralmente, possuem alterações autonômicas evidentes, inclusive na pressão arterial média basal (Bedi e Arora, 2007; Brudey et al., 2015).

Nossos resultados também sugerem que quando os animais são submetidos a uma curta sessão de extinção (10 min – *short retrieval*), eles não conseguem adquirir essa nova memória (aquisição da memória de extinção), dessa forma, 24h após, quando os mesmos são reexpostos a caixa de condicionamento (sem nenhuma deflagração de choques), é possível observar provavelmente um processo de reconsolidação da memória aversiva, somente nos animais estressados. É provável que uma curta exposição ao contexto condicionado, torne a memória aversiva lábil, desencadeando a reconsolidação, que leva a uma resposta de medo exagerada (aumento do comportamento ansiogênico). Sabe-se que o TEPT possui uma sintomatologia característica, como a excitação, reatividade, hipervigilância e a revivência persistente do evento traumático (Lapiz-Bluhm e Peterson, 2014), fatores que poderiam facilitar a reconsolidação da memória aversiva.

Além disso, os resultados do presente estudo são consistentes com evidências da literatura mostrando que animais submetidos ao SPS possuem déficits na extinção da memória aversiva (Milad e Quirk, 2002; Milad et al., 2006 e 2008; Yamamoto et al., 2008). O processo de extinção ocorre quando uma nova memória (segura) substitui a associação entre um estímulo neutro e um estímulo aversivo ou esta nova memória enfraquece essa associação (“esquecer”). Os animais passaram por uma sessão de extinção de 15 minutos, após 24 horas, foram reexpostos à caixa e os animais submetidos ao SPS, exibiram uma elevada resposta de congelamento. Por outro lado, o grupo controle foi capaz de consolidar essa nova memória – não aversiva. Déficits na extinção de memórias aversivas parecem contribuir para a

fisiopatologia do TEPT (Milad et al., 2007). Orr e colaboradores (2000) evidenciaram que pacientes com TEPT exibiam dificuldades em “extinguir” memórias aversivas, após serem condicionados a um estímulo elétrico desagradável. As principais regiões envolvidas na neurocircuitaria dos mecanismos de extinção são o CPF, hipocampo e amígdala basolateral (Sotres-Bayon et al., 2004), que são exatamente as regiões relacionadas a neurobiologia do TEPT (Milad e Quirk, 2002). Dentre elas, o IL e o PL (que constituem o CPF) parecem exercer atividades opostas sobre a expressão do medo apreendido. Enquanto o IL aumenta a aquisição da extinção (Milad e Quirk, 2002), o PL aumenta a expressão do medo condicionado (Vidal-Gonzales et al., 2006).

Apesar de vários neurotransmissores estarem relacionados com a fisiopatologia do TEPT, a serotonina (5-HT) se destaca, pois, os ISRS são padrão ouro no tratamento deste transtorno (Davidson et al., 2003; Tucker et al., 2004). O tratamento repetido com paroxetina (10mg/kg) preveniu os efeitos ansiogênicos, desencadeados pelo SPS e avaliados no teste do medo condicionado ao contexto. Ademais, a droga foi capaz de prevenir os déficits de extinção da memória aversiva. Assim, esse composto foi capaz de reduzir a resposta emocional condicionada e auxiliou na consolidação da nova memória de extinção. Diferentemente, no estudo de Lin e colaboradores 2016, o Ecitalopram, apesar de ter reduzido os efeitos pró-depressivos e ansiogênicos do estresse (SPS), não foi capaz de reverter os déficits de extinção da memória aversiva. A utilização de ISRS é um importante critério de validade preditiva para os modelos animais de TEPT. Nesse sentido, Campos e colaboradores 2012b, similarmente aos nossos achados, mostraram que o tratamento repetido com paroxetina reduziu comportamentos defensivos avaliados no LCE, resultados semelhantes também foram encontrados com a sertralina, outro ISRS (Matar et al. 2006). Apesar dos antidepressivos inibidores da recaptação de serotonina, atualmente, serem o tratamento farmacológico de primeira escolha para o TEPT, sua eficiência clínica não é satisfatória, cerca de um terço dos pacientes não respondem ao tratamento. Nesse sentido, estudos clínicos e pré-clínicos têm se direcionado na busca de tratamentos alternativos mais promissores. Diversos estudos evidenciam a vasta eficiência dos canabinoides no tratamento do TEPT (Campos et al., 2012b; Ganon-Elazar et al., 2012; Korem et al., 2015). Esses compostos parecem facilitar a extinção de memórias aversivas, além de atenuar efeitos comportamentais deletérios a longo-prazo (Ganon-Elazar et al., 2013; Papini et al., 2015).

Verificamos que o tratamento repetido, mas não agudo, com o CBD (5 e 10 mg/kg) foi capaz de prevenir e/ou atenuar os efeitos do estresse causados pelo SPS. Além de atenuar a

resposta emocional condicionada facilitando a extinção de memórias aversivas, o CBD foi capaz de prevenir os déficits de consolidação dessa nova memória de extinção. Diversos estudos, já demonstraram que o CBD é capaz de reduzir comportamentos defensivos de forma aguda (Guimaraes et al., 1990; Campos and Guimarães, 2008). Este fitocanabinoide foi capaz de reduzir a expressão do medo condicionado em animais tratados agudamente em dois momentos: antes da primeira reexposição a caixa (24h após o condicionamento – Resstel et al., 2006; Lemos et al., 2010) e antes da aquisição da memória aversiva (Levin et al., 2012). Nestes estudos o CBD foi administrado pouco tempo antes da avaliação comportamental. Em contrapartida, o nosso tratamento repetido com o CBD iniciou-se 2 horas após o SPS e terminou 24h antes do MCC. Assim, nossos resultados sugerem que, além dos efeitos ansiolíticos agudos, o CBD poderia também causar alterações neurolásticas, responsáveis pelos seus efeitos tardios (anti-estresse - Campos et al., 2012b).

O CBD é capaz de prevenir e/ou atenuar respostas de estresse aguda e crônica (Campos et al., 2012 a e b). Além disso, esse composto parece ter um importante papel na extinção de memórias aversivas (Bitencourt et al., 2008; Stern et al., 2012; Gazarini et al., 2015), processo que tem sido bastante relacionado com a gênese do TEPT. Nossos achados demonstram, pela primeira vez que o tratamento repetido, mas não único, com o CBD após a exposição ao SPS, um evento traumático, previne os efeitos tardios do estresse, relacionados aos déficits de extinção da memória aversiva e consolidação dessa nova memória.

A serotonina e seus receptores exercem um papel importante na modulação de eventos aversivos. A exposição aguda ou crônica a estressores aumenta os níveis de 5HT em várias regiões cerebrais (Kaehler et al., 2000). Diversos estudos verificaram que os efeitos anti-estresse e ansiolíticos do CBD parecem ser mediados por alterações no sistema serotoninérgico, possivelmente por facilitar a sinalização serotoninérgica via receptores 5HT-1A (Campos et al., 2012b; Gomes et al., 2012; Fogaça et al., 2014). Reforçando o envolvimento destes receptores na fisiopatologia do TEPT, o pré-tratamento com o WAY – 100535 (antagonista dos receptores 5HT-1A) foi capaz de prevenir os efeitos anti-estresse desencadeados pelo CBD, avaliados no MCC. O WAY foi capaz de bloquear o efeito do CBD na redução da resposta emocional condicionada (durante a primeira reexposição à caixa – sessão de extinção), além de, prejudicar a retenção dessa nova memória de extinção.

O CBD também parece modular seus efeitos via facilitação da neurotransmissão endocanabinoide, culminando na ativação dos receptores CB1. Estudos prévios demonstraram que o antagonismo de receptores CB1 foi capaz de prevenir os efeitos do CBD sobre o aumento da extinção de memórias aversivas, bem como sobre o prejuízo na reconsolidação dessas

memórias (Bitencourt et al., 2008; Stern et al., 2012). Já é bem estabelecido que o sistema endocanabinoide tem um papel central no processo de extinção de memórias aversivas (Marsicano et al., 2002), dessa forma sugere-se que o CBD possa interferir com esses processos via facilitação da neurotransmissão endocanabinoide. De forma bastante interessante e corroborando com dados prévios da literatura, o tratamento prévio com o AM281 (antagonista dos receptores CB1) também foi capaz de prevenir os efeitos anti-estresse desencadeados pelo CBD no MCC. O antagonista bloqueou o efeito do CBD em reduzir as respostas de congelamento tanto durante a sessão de extinção quanto durante a avaliação da retenção dessa memória (24h depois). Dessa forma, os efeitos do CBD na redução da sensibilização do medo e consolidação da extinção de memórias aversivas parecem envolver a ativação de receptores 5-HT1A e CB1.

O NO parece exercer importante papel modulatório nas reações defensivas, uma vez que neurônios nNOS-positivos estão localizados em regiões relacionadas a estas respostas (Vicent, Kimura, 1992). Em relação ao envolvimento do NO nas reações defensivas, embora existam resultados contraditórios (Quock, Nguyen, 1992; Massod, et al., 2003), a maior parte das pesquisas sugere que esse radical livre possui um papel facilitador da ansiedade (Morato et al., 2004; Guimarães et al., 2005; Joung et al., 2012).

Como relatado na introdução, alguns estudos sugerem uma interação entre o sistema serotoninérgico e a via do NO na modulação de comportamentos relacionados ao estresse (Hiroaki-Sato et al., 2014; Zhang et al., 2010). Foi demonstrado, por exemplo, que tanto um agonista seletivo de receptores 5HT-1A (5-HT_{1A}-R) quanto um ISRS promoveram redução da expressão de nNOS no hipocampo (Zhang et al., 2010). O SPS foi capaz de aumentar os níveis NOS1 fosforilada (pNOS1) no hipocampo ventral, 1 hora após os animais serem submetidos ao estresse, sugerindo que uma ativação inicial do sistema nitrérgico poderia estar envolvida nas consequências tardias do estresse.

Além disso, foi avaliado o efeito do tratamento agudo com um inibidor preferencial da nNOS, o 7- *Nitroindazole* (7-NI), administrado 2 a 3h após a exposição ao SPS. Verificamos que uma única injeção de 7-NI (30 e 60 mg/kg) foi capaz de prevenir os efeitos do estresse ao reduzir as respostas de sensibilização do medo (verificadas na sessão de extinção) e prevenir os déficits na consolidação dessa nova memória de extinção.

Num modelo similar de estresse, Harvey e col. 2005 verificaram que o tratamento agudo com o 7-NI e um antagonista NF-kB Pyrrolidinedithiocarbamate (PDTC) foram capazes de prevenir o aumento dos níveis de NOx (nitrito e nitrato) no hipocampo de animais

submetidos ao estresse, sugerindo um papel fundamental do NO nas consequências do estresse (Harvey et al., 2005).

Conclusão

7. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que a o SPS, modelo experimental de TEPT, foi capaz de desencadear aumento da sensibilização das respostas de medo condicionado e prejuízos nos processos de retenção da memória de extinção. Nossos resultados indicam que, em doses baixas, o CBD (5mg / kg) injetado sub-cronicamente (7 dias) é capaz de prevenir o aumento da sensibilização das respostas de medo condicionado, bem como atenuar os prejuízos nos processos de retenção da memória de extinção. Esses processos parecem acontecer via facilitação das neurotransmissões mediada por 5-HT1A e CB1. Além disso, uma única injeção de CBD, utilizando uma dose 6x maior do que a utilizada no tratamento repetido (30mg / kg), administradas após o SPS também foi capaz de evitar os efeitos tardios do estresse. Ainda, nossos dados sugerem que as mudanças comportamentais induzidas pelo estresse podem estar relacionadas a uma complexa modulação entre o HV e o PL-CPFvm, com modificações precoces e tardias, respectivamente, no sistema nitrérgico. Por fim, uma única administração de um inibidor preferencial da sintase neuronal do óxido nítrico (7-NI) injetada 2-3 horas após a SPS evitou todas as consequências comportamentais desencadeadas pelo estresse.

Referências Bibliográficas

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN PSYCHIATRY ASSOCIATION – APA. DMS-V - Diagnostic and statistical manual of mental disorders, 5th edition. Washington DC: APA, 2013.

AGUIAR, D.C.; GUIMARÃES, F.S. Blockade of NMDA receptors and nitric oxide synthesis in the dorsolateral periaqueductal gray attenuates behavioral and cellular responses of rats exposed to a live predator. *J Neurosci Res.* v. 87, p. 2418-2429, 2009.

BARRETO, R.; CORREIA, C.; Muscará, M.N. Óxido nítrico: propriedades e potenciais usos terapêuticos. *Química Nova*, v.28, p.9, 2005.

BEDI, U.S.; ARORA, R. Cardiovascular manifestations of posttraumatic stress disorder. *J Natl Med Assoc*, v.99, p.642-649, 2007.

BELLAMY, T.C.; WOOD, J.; GARTHWAITE, J. On the activation of soluble guanylyl cyclase by nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences - P.N.A.S. (USA)*, v. 99, p. 507–510, 2002.

BERGER, W., MENDLOWICZ, M.V., MARQUES-PORTELLA, C., KINRYS, G., FONTENELLE, L.F., MARMAR, C.R., . . . FIGUEIRA, I. Pharmacologic alternatives to antidepressants in posttraumatic stress disorder: A systematic review. *Progress in Neuropsychopharmacology. Biological Psychiatry*, v.33(2), p. 169-180, 2009.

BISOGNO, T. 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, p. 845-852, 2001.

BITENCOURT R. M., PAMPLONA F. A., TAKAHASHI R. N. Facilitation of contextual fear memory extinction and anti anxiogenic effects of AM404 and cannabidiol in conditioned rats. *Eur.Neuropsychopharmacol.* **18**, 849–859, 2008. doi: 10.1016/j.euroneuro.2008.07.001

BREMNER, J.D.; VYTHILINGAM, M., VERMETTEN, E., AFZAL, N., NAZZER, A., NEWCOMER, J.W., CHARNEY, D.S Effects of dexamethasone on declarative memory function in posttraumatic stress disorder. *Psychiatry Res.* v. 129, p. 1-10, 2004.

BRUDEY, C.; PARK, J.; WIADERKIEWICZ, J.; KOBAYASHI, I.; MELLMAN, T.A.; MARVAR, P.J. Autonomic and inflammatory consequences of posttraumatic stress disorder and the link to cardiovascular disease. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v.309, p.315-321, 2015.

CALABRESE, V.; MANCUSO C, CALVANI M, RIZZARELLI E, BUTTERFIELD DA, STELLA AM. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nature Reviews Neuroscience.* v. 8, p. 766-775, 2007.

CAMPOS, A. C.; GUIMARÃES, F. S. Involvement of 5HT1A receptors in the anxiolytic-like effects of cannabidiol injected into the dorsolateral periaqueductal gray of rats. *Psychopharmacology (Berl)*, v. 199, p. 223-230, 2008.

CAMPOS, A. C.; GUIMARÃES, F. S. Evidence for a potential role for TRPV1 receptors in the dorsolateral periaqueductal gray in the attenuation of the anxiolytic effects of cannabinoids. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 33, n. 8, p. 1517-21, 2009.

CAMPOS, A. C. et al. Multiple mechanisms involved in the large-spectrum therapeutic potential of cannabidiol in psychiatric disorders. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 367, p. 3364-3378, 2012a.

CAMPOS, A. C.; FERREIRA, F. R.; GUIMARÃES, F. S. Cannabidiol blocks long-lasting behavioral consequences of predator threat stress: possible involvement of 5HT1A receptors. **J Psychiatr Res**, v. 46, p. 1501-1510, 2012b.

CAMPOS, A. C.; PIORINO, E. M. S.; FERREIRA, F. R.; GUIMARÃES, F. S. Increased nitric oxide-mediated neurotransmission in the medial prefrontal cortex is associated with the long lasting anxiogenic-like effect of predator exposure. **Behavioural Brain Research**, v.256, p. 391– 397, 2013a.

CAMPOS, A. C.; FERREIRA, F. R.; da SILVA, W.A. Jr.; GUIMARÃES, F. S. Predator threat stress promotes long lasting anxiety-like behaviors and modulates synaptophysin and CB1 receptors expression in brain areas associated with PTSD symptoms. **Neuroscience Letters**, v.533, p.34-38, 2013b.

CANNON, W. A. On the variation of the oxygen content of cultural solutions. **Science**, v.75, p.108-109, 1932.

CASAROTTO, P.C., TERZIAN, A.L., AGUIAR, D.C., ZANGROSSI, H., GUIMARÃES, F.S., WOTJAK, C.T., MOREIRA, F.A. Opposing roles for cannabinoid receptor type-1 (CB₁) and transient receptor potential vanilloid type-1 channel (TRPV1) on the modulation of panic-like responses in rats. **Neuropsychopharmacology**, v.37, p.478-486, 2011.

CHAMBERS RA, BREMNER JD, MOGHADDAM B, et al. Glutamate and post-traumatic stress disorder: toward a psychobiology of dissociation. **Semin Clin Neuropsychiatry**, v.4, p.274–281, 1999.

CHO, H.J., XIE, Q.W., CALAYCAY, J., MUMFORD, R.A., SWIDEREK, K.M., LEE, T.D., NATHAN, C. Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 176, p. 599–604, 1992.

DAVIDSON J.R. Treatment of posttraumatic stress disorder: the impact of paroxetine **Psychopharmacology Bulletin**, v.37 (Suppl. 1), pp. 76–88, 2003.

DAVIDSON, J., LANDERMAN, L.R., CLARY, C.M. Improvement of anger at one week predicts the effects of sertraline and placebo in TEPT. **J. Psychiatr Res**, v. 38, p. 497-502, 2004.

DE MELLO, WG, DE MORAIS, SR, DORNELLES, RC, KAGOHARA ELIAS, LL, ANTUNES-RODRIGUES, J, BEDRAN DE CASTRO, JC. Effects of neonatal castration

and androgenization on sexual dimorphism in bone, leptin and corticosterone secretion. *Bone*, v. 4, p.893- 900, 2012.

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

FANSELOW, M.S.; Conditioned and unconditional components of postshock freezing. **The Pavlovian Journal of Biological Science : Official Journal of the Pavlovian**, v.15, p.177-182, 1980.

FOGAÇA, M. V., REIS, F. M., CAMPOS, A. C., GUIMARÃES, F. S. Effects of intra-prelimbic prefrontal cortex injection of cannabidiol on anxiety-like behavior: involvement of 5HT1A receptors and previous stressful experience. *Eur. Neuropsychopharmacol.* v. 24, p.410–419, 2014.

FREDSTROM, S. Nitric oxide, Oxidative stress, and Dietary Antioxidants. *Nutrition*, v.18, p. 537-539, 2002.

GANON-ELAZAR E, AKIRAV I. Cannabinoids and traumatic stress modulation of contextual fear extinction and GR expression in the amygdala-hippocampal-prefrontal circuit. *Psychoneuroendocrinology*. v.38, p.1675-1687, 2013.

GAZARINI, L., STERN, C. A., PIORNEDO, R. R., TAKAHASHI, R. N., BERTOGLIO, L. J. PTSD-like memory generated through enhanced noradrenergic activity is mitigated by a dual step pharmacological intervention targeting its reconsolidation. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 18, 2015

GEUZE E, VAN BERCKEL BN, LAMMERTSMA AA, et al. Reduced GABA_A benzodiazepine receptor binding in veterans with post-traumatic stress disorder. *Mol Psychiatry*, v.13, p.74–83, 2008.

GOMES, F. V., REIS, D. G., ALVES, F. H., CORRÊA, F. M., GUIMARÃES, F. S., RESSTEL, L. B. Cannabidiol injected into the bed nucleus of the stria terminalis reduces the expression of contextual fear conditioning via 5-HT1A receptors. *J. Psychopharmacol.* v.26, p.104–113, 2012.

GONSIOREK, W. et al., Endocannabinoid 2-arachidonyl glycerol is a full agonist through human type 2 cannabinoid receptor: antagonism by anandamide. *Mol Pharmacol*, v.57, p. 1045-1050, 2000.

GRAEFF F.G. Medicamentos antiansiedade. Em: GRAEFF, F.G, GUIMARÃES FS. Fundamentos de Psicofarmacologia. 2^a. Edição. Editora Atheneu: São Paulo, p. 165-204, 2012.

GUIMARÃES, F. S. et al. Antianxiety effect of cannabidiol in the elevated plus-maze. *Psychopharmacology (Berl)*, v. 100, n. 4, p. 558-9, 1990.

GUIMARÃES, F. S.; BEIJAMINI, V.; MOREIRA, F. A.; AGUIAR, D. C.; DE LUCCA, A. C. B. Role of nitric oxide in brain regions related to defensive reactions. *Neuroscience and Behavioral Reviews*, v. 29, p. 1313-1322, 2005.

GUIMARÃES, F.G. Medicamentos utilizados no tratamento dos transtornos afetivos. Em: GRAEFF, F.G, GUIMARÃES, F.S. Fundamentos de Psicofarmacologia. 2ª. Edição. Editora Atheneu: São Paulo, p. 121-164, 2012.

GUIX, F. S. et al. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. **Prog neurobiol**, v.76, p. 126-152, 2005.

HARVEY, B.H.; NACITI, C., BRAND, L., STEIN, D.J. Endocrine, cognitive and hippocampal/cortical 5HT 1A/2A receptor changes evoked by a time-dependent sensitisation (TDS) stress model in rats. **Brain Research**, v.983, p.97-107, 2003.

HARVEY BH, OOSTHUIZEN F, BRAND L, et al. Stress-restress evokes sustained iNOS activity and altered GABA levels and NMDA receptors in rat hippocampus. **Psychopharmacology** , v. 175, p.494–502, 2004.

HARVEY, B. H., BOTHMA, T., NEL, A., WEGENER, G., & STEIN, D. J. Involvement of the NMDA receptor, NO-cyclic GMP and nuclear factor K-beta in an animal model of repeated trauma. **Human Psychopharmacology**, 20, 367–373., 2005.

HILL, M.N.; GORZALKA, B.B. Enhancement of anxiety-like responsiveness to the cannabinoid CB(1) receptor agonist HU-210 following chronic stress. **European Journal of Pharmacology**, 499, pp. 291–295, 2004.

HILL, M.N.; GORZALKA, B.B. Increased sensitivity to restraint stress and novelty-induced emotionality following long-term, high dose cannabinoid exposure. **Psychoneuroendocrinology**, 31, pp. 526–536, 2006.

HILL, A. J. et al. Phytocannabinoids as novel therapeutic agents in CNS disorders. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 133, p. 79-97, 2011.

HIROAKI-SATO, V.A. et al. Hippocampal nNOS inhibition induces an antidepressant-like effect: involvement of 5HT-1A receptors. **Behavioural Pharmacology**, 2014. DOI: 10.1097/FBP.0000000000000035.

HOTT, S.C.; GOMES, F.V.; ULIANA, D.L.; VALE, G.T.; TIRAPELLI, C.R.; RESSEL, L.B.M. Bed nucleus of the *stria terminalis* NMDA receptors and nitric oxide modulate contextual fear conditioning in rats. **Neuropharmacology**, v.112, p.135-143, 2017.

IMANAKA, A., MORINOBU, S., TOKI, S., YAMAWAKI, S. Importance of early environment in the development of post-traumatic stress disorder-like behaviors. **Behav Brain Res**, v.173, p.129 – 137, 2006.

JOUNG, H. Y.; JUNG, E. Y.; KIM, K.; LEE, M. S.; HER, S.; SHIM, I. The differential role of NOS inhibitors on stress-induced anxiety and neuroendocrine alterations in the rat. **Behavioural Brain Research**, v. 235, p. 176-181, 2012.

KAHN S, LIBERZON I. Topiramate attenuates exaggerated acoustic startle in an animal model of PTSD. **Psychopharmacology**, v.72, p. 225–229, 2004.

KOEK, R. J., SCHWARTZ, H. N., SCULLY, S., LANGEVIN, J.P., SPANGLER, S., KOROTINSKY, A., JOU, K., LEUCHTER, A. Treatment-refractory posttraumatic stress disorder (TRPTSD): a review and framework for the future, **Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry** doi: 10.1016/j.pnpbp.2016.01.015, 2016.

KOHDA, K., HARADA, K., KATO, K., HOSHINO, A., MOTOHASHI, J., YAMAJI, T., MORINOBU, S., MATSUOKA, N., KATO, N. Glucocorticoid receptor activation is involved in producing abnormal phenotypes of single-prolonged stress rats: a putative post-traumatic stress disorder model. **Neuroscience**, v.148, p. 22–33, 2007.

KOREM, N, ZER-AVIV, TM, GANON-ELAZAR, E, ABUSH, H, AKIRAV, I. Targeting the endocannabinoid system to treat anxiety-related disorders. **J Basic Clin Physiol Pharmacol**. 2015, doi: 10.1515/jbcpp-2015-0058

KNOX, D., GEORGE, S.A., FITZPATRICK, C.J., RABINAK, C.A., MAREN, S., LIBERZON, I. Single prolonged stress disrupts retention of extinguished fear in rats. **Learn. Mem.**, v.19, p. 43–49, 2012.

LAPIZ-BLUHM, M. D.; PETERSON, A.L. Neurobehavioral Mechanisms of Traumatic Stress in Post-traumatic Stress Disorder. *Curr Top Behav Neurosci*, 2014.

LEMOES, J. I., RESSTEL, L. B., GUIMARÃES, F. S. Involvement of the prelimbic prefrontal cortex on cannabidiol-induced attenuation of contextual conditioned fear in rats. **Behav. Brain Res.** v. 207, p.105–111, 2010.

LEVIN, R., ALMEIDA, V., PERES, F.F., CALZAVARA, M.B., DA SILVA, N.D., SUIAMA, M.A., et al. Antipsychotic profile of cannabidiol and rimonabant in an animal model of emotional context processing in schizophrenia. **Curr.Pharm.Des.** v.18, p.4960–4965, 2012.

LIBERZON, I., KRSTOV, M., YOUNG, E. A Stress-restress: effects on ACTH and fast feedback. **Psychoneuroendocrinology**, v. 22, p.443– 453, 1997.

LIBERZON, I., LÓPEZ, J. F., FLAGEL, S. B., VÁZQUEZ, D. M., YOUNG, E.A. Differential regulation of hippocampal glucocorticoid receptors mRNA and fast feedback: relevance to post- traumatic stress disorder. **J Neuroendocrinol**, v. 11, p.11 –17, 1999.

LIBERZON I, SRIPADA CS. The functional neuroanatomy of PTSD: a critical review. **Prog Brain Res**, v.167, p.151–169, 2008.

LIN, C.C., TUNG, C.S., LIU, Y.P. Escitalopram reversed the traumatic stress-induced depressed and anxiety-like symptoms but not the deficits of fear memory. **Psychopharmacology (Berl)**. 2016, DOI 10.1007/s00213-015-4194-5.

LISBOA, S.F., MAGESTO, A.C., AGUIAR, J.C., RESSTEL, L.B., GUIMARÃES, F.S. Complex interaction between anandamide and the nitric system in the dorsolateral periaqueductal gray to modulate anxiety-like behavior in rats. **Neuropharmacology**, v.75, p.86-94, 2013.

MARCO, E. M. et al. Endocannabinoid system and psychiatry: in search of a neurobiological basis for detrimental and potential therapeutic effects. **Front Behav Neurosci**, v. 5, n. 65, 2011. doi: 10.3389/fnbeh.2011.00063.

MARSICANO, G., et al. The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. **Nature** 418, 530–534, 2002. doi:10.1038/nature00839.

MARSICANO, G.; LUTZ, B. Expression of the cannabinoid receptor CB1 in distinct neuronal subpopulations in the adult mouse forebrain. **Eur. J. Neurosci.** v.11, p.4213-4225.

MASSOD, A.; BANERJEE, B.; VIJAYAN, V.K; RAY, A. Modulation of stress-induced neurobehavioral changes by nitric oxide in rats. **European Journal of Pharmacology**, v.458, p. 135-139, 2003.

MATSUDA, L.A, et al., Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. **Nature**, v. 346, p. 561-564, 2005.

McEWEN, B. S. Stress, adaptation, and disease. Allostasis and allostatic load. **Annals of the New York Academy of Science**, v. 840, p. 33-44, 1998.

McEWEN, B. S. Stress and hippocampal plasticity. **Annu Rev Neurosci.** v. 22, p. 105-122, 1999.

McLEOD, T.M., LOPEZ-FIGUEROA, A.L., LOPEZ-FIGUEROA, M.O. Nitric oxide, stress, and depression, **Psychopharmacol Bull**, v. 35, p. 24-41, 2001.

MECHOULAM, R. et al., Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds do cannabinoid receptors. **Biochem Pharmacol**, v. 50, p. 83-90, 1995.

MECHOULAM, R. Marihuana chemistry. *Science*, v. 168, p. 1159-1166, 1970.

MILAD, M.R.; QUIRK, G.J. Neurons in medial prefrontal cortex signal memory for fear extinction. **Nature**, v. 420, n. 6911, p.70-4, 2002.

MILAD, M.R.; RAUCH, S.L.; PITMAN, R.K., et al. Fear extinction in rats: implications for human brain imaging and anxiety disorders. **Biol Psychol**, v.73, p.61–71, 2006.

MILAD MR, ORR SP, LASKO NB, et al. Presence and acquired origin of reduced recall for fear extinction in PTSD: results of a twin study. **J Psychiatr Res**, v.42, p.515–520, 2008.

MILLER, M.M and McEWEN, B.S. Establishing an agenda for translational research on PTSD. **Annual N Y Academy Science**, v. 1071, p. 294-312, 2006.

MOLCHANOV, M.L., GUIMARÃES, F.S. Anxiolytic-like effects of AP7 injected into the dorsolateral or ventrolateral columns of the periaqueductal gray of rats. **Psychopharmacology (Berl)**. v. 160, p.30-38, 2002.

MORATO, G.S.; ORTIGA, R.M.; FERREIRA, V.M. Involvement of nitric oxide-dependent pathways of dorsolateral periaqueductal gray in the effects of ethanol in rats submitted to the elevated plus-maze test. **Behavioral Brain Research**, v. 153, p. 341–349, 2004.

MOREIRA, F.A. et al. Antiaversive effects of cannabinoids: Is the periaqueductal grey involved? **Neural Plasticity**, Article ID 625469, 11 pages, 2009.

OOSTHUIZEN, F., WEGENER, G. HARVEY, B.H. Nitric oxide as inflammatory mediator in post-traumatic stress disorder (PTSD): evidence from an animal model. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v.1, p. 109–123, 2005.

ORR, SP, METZGER LJ, LASKO NB, MACKLIN ML, PERI T, PITMAN RK. De novo conditioning in trauma-exposed individuals with and without posttraumatic stress disorder, **J Abnorm Psychol**. v.109, p.290-8, 2000.

QUIRK, G.J. LIKHTIK, E., PELLETIER, J.G., PARÉ, D. Stimulation of medial prefrontal cortex decreases the responsiveness of central amygdala output neurons. **Journal of Neuroscience**, v.23, p.8800-8807, 2003.

QUOCK, R. M.; NGUYEN, E. Possible involvement of nitric oxide in chlordiazepoxide-induced anxiolysis in mice. **Life Sciences**, v. 51, p. 255–260, 1992.

PALAZUELOS, J.; AGUADO, T.; EGIA, A.; MECHOULAM, R.; GUZMÁN, M.; GALVE-ROPERH, I. Non-psychoactive CB2 cannabinoid agonists stimulate neural progenitor proliferation. **FASEB J**. v. 20, p. 2405-2407, 2006.

PAPINI S, SULLIVAN GM, HIEN DA, SHVIL E, NERIA Y Toward a translational approach to targeting the endocannabinoid system in posttraumatic stress disorder: a critical review of preclinical research, **Biol Psychol**, v.104, p.8-18, 2015.

PRAST, H.; PHILIPPU, A. Nitric oxide as modulator of neuronal function. **Progress in Neurobiology**, v. 64, p. 51–68, 2001.

RESSTEL, L. B., JOCA, S. R., MOREIRA, F. A., CORRÊA, F. M., GUIMARÃES, F. S. Effects of cannabidiol and diazepam on behavioral and cardiovascular responses induced by contextual conditioned fear in rats. **Behav. Brain Res**. v.172, p. 294–298, 2006.

RESSTEL, L. B. M.; CORRÊA, F. M. A.; GUIMARÃES, F. S. The Expression of Contextual Fear Conditioning Involves Activation of an NMDA Receptor - Nitric Oxide Pathway in the Medial Prefrontal Cortex. **Cerebral Cortex**, v.18, p. 2027 - 2035, 2007.

RESSTEL, L. B. et al. 5-HT_{1A} receptors are involved in the cannabidiol-induced attenuation of behavioural and cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. **Br J Pharmacol**, v. 156, n. 1, p. 181-8, 2009.

ROHLEDER, N.; JOKSIMOVIC, L.; WOLF, J. M., KIRSCHBAUM, C. Hypocortisolism and increased glucocorticoid sensitivity of pro-Inflammatory cytokine production in Bosnian war refugees with posttraumatic stress disorder. **Biol. Psychiatry**. v.55, p.745-75, 2004.

RUSSO, E. B. et al. Agonistic properties of cannabidiol at 5-HT_{1A} receptors. **Neurochem Res**, v. 30, p. 1037-1043, 2005.

SARRIS, J.; MCINTYRE, E.; CAMFIELD, D. A. Plant-based medicines for anxiety disorders, part 2: a review of clinical studies with supporting preclinical evidence. **CNS Drugs**, v. 27, p. 301-19, 2013.

SELYE, H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. **Nature**, v. 138, p. 32, 1936.

SOTRES-BAYON, F., BUSH, D.E., LEDOUX, J.E. Emotional perseveration: an update on prefrontal-amygdala interactions in fear extinction, **Learn Mem.**, v.11, p.525-535, 2004.

SPIACCI, G.B.L.; ANTERO, L.S.; REIS, D.G.; LISBOA, S. F.; RESSTEL, L. B. M. Dorsal hippocampus CB1 receptors modulate conditioned emotional response in rats. **European Neuropsychopharmacology**, v. 26, p. 1579–1589, 2016.

STECKLER, T.; RISBROUGH, V. Pharmacological treatment of PTSD- established and new approaches. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 2, p. 617-27, 2012.

STEIN, M. B.; KLINE, N. A.; MATLOFF, J. L. Adjunctive olanzapine for SSRI-resistant combat-related PTSD: a double-blind, placebo-controlled study. **Am J Psychiatry**, v. 159, p. 1777-1779, 2002.

STEINERT, J. R.; CHERNOVA, T.; FORSYTHE, I. D. Nitric oxide signaling in brain, function, dysfunction and dementia. **The Neuroscientist**, v. 16, p. 435-452, 2010.

STERN, C. A., GAZARINI, L., TAKAHASHI, R. N., GUIMARÃES, F. S., BERTOGLIO, L. J. On disruption of fear memory by reconsolidation blockade: evidence from cannabidiol treatment. **Neuropsychopharmacology** v.37, p. 2132–2142, 2012.

SZABO, S.; TACHE, Y.; SOMOGYI, A. The legacy of Hans Selye and the origins of stress research: A retrospective 75 years after his landmark brief “Letter” to the Editor of *Nature*. **Stress**, v.15, p. 472–478, 2012.

TAKAHASHI T, MORINOBU S, IWAMOTO Y, et al. Effect of paroxetine on enhanced contextual fear induced by single prolonged stress in rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v.189, p.165–173, 2006.

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

VANELZAKKER, M.B. et al. From Pavlov to PTSD: the extinction of conditioned fear in rodents, humans, and anxiety disorders. **Neurobiol Learn Mem**, v.113, p. 3-18, 2014.

VIDAL-GONZALEZ I., VIDAL-GONZALEZ, B., RAUCH, S.L., QUIRK, G.J. Microstimulation reveals opposing influences of prelimbic and infralimbic cortex on the expression of conditioned fear. **Learn Mem.** v. 13, p. 728-733, 2006.

VILA-VERDE, C., MARINHO, A.L.Z., LISBOA, S.F., GUIMARÃES, F.S. Nitric oxide in the prelimbic medial prefrontal cortex is involved in the anxiogenic-like effect induced by acute restraint stress in rats, **Neuroscience**, v.320, p. 30-42, 2016

VICENT, S.; KIMURA, H. Histochemical mapping of nitric oxide synthases in the rat brain. **Neuroscience**, v.46, p. 755-784, 1992.

WANG W, LIU Y, ZHENG H, et al. A modified single-prolonged stress model for post-traumatic stress disorder. **Neurosci Lett**, v.441, p.237–241, 2008.

WAKSMAN, Y. et al. The central cannabinoid receptor (CB1) mediates inhibition of nitric oxide production by rat microglial cells. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 288, p. 1357-1366, 1999.

XIE, Q.W., KASHIWABARA, Y., NATHAN, C., Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase. **The Journal of Biological Chemistry**, v.269, p. 4705–4708, 1994.

YAMAMOTO, S., MORINOBU, S., FUCHIKAMI, M., et al. Effects of single prolonged stress and D-cycloserine on contextual fear extinction and hippocampal NMDA receptor expression in a rat model of PTSD. **Neuropsychopharmacology**, v.33, p.2108–2116, 2008.

YAMAMOTO, S., MORINOBU, S., TAKEI, S., FUCHIKAMI, M., MATSUKI, A., YAMAWAKI, S., LIBERZON, I. Single prolonged stress: toward an animal model of posttraumatic stress disorder. **Depress Anxiety**, v. 26, p.1110 –1117, 2009.

YEHUDA R, ANTELMAN SM. Criteria for rationally evaluating animal models of posttraumatic stress disorder. **Biol Psychiatry**, v.33, p.479–486, 1993.

YEHUDA R., JOËLS M., MORRIS, R.G. The memory paradox. **Nat. Rev. Neurosci.** v.11, p. 837–839, 2010.

YILDIZ, F.; ERDEN, B.F., ULAK, G., UTKAN, T., GACAR, N. Antidepressant-like effect of 7-nitroindazole in the forced swimming test in rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 149, p.41-44, 2000.

ZHANG et al. Neuronal nitric oxide synthase alteration accounts for the role of 5-HT1A receptor in modulating anxiety-related behaviors. **The Journal of Neuroscience**, v. 30, p.2433–2441, 2010.

ZHOU, L.; ZHU, D.Y. Neuronal nitric oxide synthase: Structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. **Nitric Oxide**, v. 20, p. 223-230, 2009.

ZOHAR, J. et al. Double-blind placebo-controlled pilot study of sertraline in military veterans with posttraumatic stress disorder. **J Clin Psychopharmacol**, v. 22, p. 190-195, 2002.

ZUARDI, A.W., SHIRAKAWA, I., FINKELFARB, E., KARNIOL, I.G. Action of cannabidiol on the anxiety and other effects produced by delta 9-THC in normal subjects. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 76, p. 245-250, 1982.

ZUARDI, A. W.; RODRIGUES, J. A.; CUNHA, J. M. Effects of cannabidiol in animal models predictive of antipsychotic activity. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 104, n. 2, p. 260-4, 1991.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo intitulado “*Envolvimento do sistema nitrérgico sobre os efeitos do canabidiol em um modelo de estresse pós-traumático*”, registrado com o número **039/2016**, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Francisco Silveira Guimarães**, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *filo Chordata*, *subfilo Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo em reunião de 27 de junho de 2016.

Este Protocolo prevê a utilização de 410 ratos Wistar machos pesando 250g, oriundos do Serviço de Biotério da Prefeitura do *Campus* de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Vigência da autorização: 27/06/2016 a 01/09/2018.

We certify that the Protocol nº 039/2016, entitled “*Involvement of the nitrergic system on the effects of cannabidiol in a post-traumatic stress model*”, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 06/27/2016. This protocol involves the production, maintenance or use of animals from *phylum Chordata*, *subphylum Vertebrata* (except humans) for research purposes, and includes the use of 410 male Wistar rats weighing 250g from the Central Animal House of Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo. This certificate is valid until 09/01/2018.

Ribeirão Preto, 27 de junho de 2016

Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho
Presidente da CEUA – FMRP – USP