



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

**INTERAÇÃO ENTRE OS SISTEMAS ENDOCANABINÓIDE E
GLICOCORTICÓIDE NA EXTINÇÃO DO
CONDICIONAMENTO AVERSIVO CONTEXTUAL EM RATOS.**

Rafael Mariano de Bitencourt

Florianópolis – SC

2012



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

**INTERAÇÃO ENTRE OS SISTEMAS ENDOCANABINÓIDE E
GLICOCORTICÓIDE NA EXTINÇÃO DO
CONDICIONAMENTO AVERSIVO CONTEXTUAL EM RATOS.**

Rafael Mariano de Bitencourt

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

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Naoto Takahashi

Florianópolis – SC

2012

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

B624i Bitencourt, Rafael Mariano de
Interação entre os sistemas endocanabinóide e
glicocorticóide na extinção do condicionamento aversivo
contextual em ratos [tese] / Rafael Mariano de Bitencourt ;
orientador, Reinaldo Naoto Takahashi. - Florianópolis, SC,
2012.
88 p.: il., grafs., tabs.

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

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Memória. 3. Extinção - (Biologia).
4. Medo. 5. Endocanabinóides. 6. Glicocorticóides. I.
Takahashi, Reinaldo Naoto. II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III.
Título.

CDU 615


**INTERAÇÃO ENTRE OS SISTEMAS CANABINÓIDE E
GLICOCORTICÓIDE NA EXTINÇÃO DO
CONDICIONAMENTO AVERSIVO CONTEXTUAL EM
RATOS**

RAFAEL MARIANO BITENCOURT

**Tese julgada e aprovada em sua forma final
pelos membros da Banca Examinadora,
composta pelos Professores Doutores:**



**Reinaldo Naoto Takahashi
Presidente (FMC/UFSC)**



**Antonio W. Zuardi
(FMUSP-RP)**



**Jorge Quillfeldt
(UFRGS)**



**Leandro Bertoglio
(FMC/UFSC)**



**André Ávila Ramos
(BEG/UFSC)**

**Profa. Dra. Thereza Christina Monteiro de Lima
Coordenadora do Programa de
Pós-Graduação em Farmacologia/UFSC**

Florianópolis, 13 de Abril de 2012

*Parece-me que foi agora
Que deitei na noite anterior
E cá estou deitado novamente.*

*Parece-me que um Eu nem levantou
Apenas esperou os outros Eus
Que voltassem a “ele” lentamente.*

*Parece-me o mesmo da noite anterior
Mas só Eu sei que o Eu de hoje
Já é um Eu completamente diferente*

“Eu”

Dedico este trabalho

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

*A minha esposa que me acompanhou durante toda
esta jornada.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Pedro Paulo e Maria da Conceição (Nina) que me deram muito mais do que a vida. Deram-me todas as oportunidades possíveis para que eu pudesse verdadeiramente vivê-la. Como eles próprios provavelmente não a tenham vivido.

À minha esposa Raquel pelo companheirismo incondicional, mesmo quando para isso tenha sido necessário se desprender de muitas coisas.

Aos meus irmãos que são os grandes amigos que tenho em “casa” e que poderei contar sempre que eu precisar.

Aos meus avôs que me ensinam mesmo que inconscientemente, através de um simples olhar, o valor que o tempo tem.

Ao meu sogro, sogra e cunhados que sempre me deram apoio inquestionável sobre quaisquer que fossem minhas decisões.

Ao Professor Reinaldo pela oportunidade, confiança e, principalmente, por todo conhecimento passado ao longo desses anos. Conhecimento este que transcende os limites do que é considerado científico.

Ao Professor e amigo Attila Köfalvi pela ótima receptividade em seu Laboratório de Neuromodulação e Metabolismo na Universidade de Coimbra-Portugal. Meu muito obrigado pela oportunidade, pelos conhecimentos passados e pela chance de ter tido esta grande experiência em minha vida.

Aos demais professores do Departamento de Farmacologia sempre muito solícitos a ajudar e ensinar em todos os momentos que eu tenha precisado.

Aos colegas de laboratório e amigos Pablo, Pamplona, Assini, Thiago, Sanmara, Cris, Marília, Lívia e Tati que fizeram do ambiente de trabalho um ambiente sempre amigável e prazeroso de se estar.

Aos colegas de doutorado e grandes amigos Rimenez e Gilliard pelos vários momentos em que se dispuseram a ouvir meus anseios, angustias e alegrias.

Aos integrantes da “família Juriti 301”. Irmãos que a vida me permitiu escolher e que fizeram desta minha jornada em Floripa algo fantástico e inesquecível, como a vida deve ser.

A todos os funcionários do Departamento de Farmacologia sempre muito prestativos e dispostos a facilitar o nosso dia a dia.

A Sanofi-Aventis, por ter gentilmente doado umas das drogas utilizadas neste estudo.

A CAPES e CNPq pelo suporte financeiro imprescindível para que eu pudesse desenvolver este trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	V
LISTA DE TABELAS.....	VII
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	VIII
RESUMO	IX
ABSTRACT	XI
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Processos de formação da memória	1
1.2. Sobre a extinção.....	2
1.3. Mecanismos neurais envolvidos na extinção de memórias aversivas	4
1.4. Sistema endocanabinóide e a extinção de memórias aversivas	8
1.5. Glicocorticóides e a extinção de memórias aversivas.....	12
1.6. Um suposto mecanismo para a extinção de memórias aversivas envolvendo a interação entre os sistemas endocanabinóide e glicocorticóide.....	14
2. OBJETIVOS.....	18
2.1. Objetivo geral	18
2.2. Objetivos específicos	18
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1. Animais.....	19
3.2. Drogas.....	19
3.3. Cirurgia estereotáxica	21
3.4. Procedimento de infusão.....	21

3.5. Procedimentos comportamentais	22
3.5.1. Condicionamento aversivo contextual	22
3.5.1.1. <i>Experimento 1: Efeitos da administração i.p. de dexametasona na extinção do CA contextual</i>	24
3.5.1.2. <i>Experimento 2: Efeitos da administração i.c.v. de dexametasona na extinção do CA contextual</i>	24
3.5.1.3. <i>Experimento 3: Participação dos receptores canabinóides CB₁ nos efeitos da dexametasona i.c.v.</i>	24
3.5.1.4. <i>Experimento 4: Influência da inibição da síntese de glicocorticóides endógenos nos efeitos facilitatórios já conhecidos do AM404 sobre a extinção do CA contextual</i> ...	25
3.5.1.5. <i>Experimento 5: Influência da inibição da síntese de glicocorticóides endógenos nos efeitos facilitatórios já conhecidos do agonista canabinóide WIN55212-2 sobre a extinção do CA contextual</i>	25
3.5.1.6. <i>Experimento 6: Participação dos receptores glicocorticóides nos efeitos da dexametasona</i>	26
3.5.1.7. <i>Experimento 7: Participação dos receptores glicocorticóides nos efeitos do AM404</i>	26
3.5.1.8. <i>Experimento 8: Participação dos receptores mineralocorticóides nos efeitos da dexametasona</i>	26
3.5.1.9. <i>Experimento 9: Participação dos receptores mineralocorticóides nos efeitos do AM404</i>	26
3.6. Procedimentos bioquímicos.....	27
3.6.1. <i>Experimento 10: Liberação de GABA e glutamato em sinaptossomas e fatias da região cortical do cérebro de ratos</i>	27
3.6.2. <i>Experimento 11: Imunohistoquímica para verificar as possibilidades neuroanatômicas de uma possível interação entre os sistemas eCB e glicocorticóides</i>	28
3.7. Perfusão e histologia.....	29
3.8. Análise gráfica e estatística	29

4. RESULTADOS.....	31
4.1. Condicionamento aversivo contextual	31
4.1.1. <i>Experimento 1: Efeitos da administração i.p. de dexametasona na extinção do CA contextual.....</i>	31
4.1.2. <i>Experimento 2: Efeitos da administração i.c.v. de dexametasona na extinção do CA contextual.....</i>	33
4.1.3. <i>Experimento 3: Participação dos receptores canabinóides CB₁ nos efeitos da dexametasona i.c.v.....</i>	35
4.1.4. <i>Experimento 4: Influência da inibição da síntese de glicocorticóides endógenos nos efeitos facilitatórios já conhecidos do AM404 sobre a extinção do CA contextual</i>	37
4.1.5. <i>Experimento 5: Influência da inibição da síntese de glicocorticóides nos efeitos facilitatórios já conhecidos do agonista canabinóide WIN55212-2 sobre a extinção do CA contextual</i>	39
4.1.6. <i>Experimento 6: Participação dos receptores glicocorticóides nos efeitos da dexametasona</i>	42
4.1.7. <i>Experimento 7: Participação dos receptores glicocorticóides nos efeitos do AM404</i>	43
4.1.8. <i>Experimento 8: Participação dos receptores mineralocorticóides nos efeitos da dexametasona.....</i>	45
4.1.9. <i>Experimento 9: Participação dos receptores mineralocorticóides nos efeitos do AM404.....</i>	47
4.2. Experimentos bioquímicos.....	49
4.2.1. <i>Experimento 10: Liberação de GABA e glutamato em sinaptossomas e fatias da região cortical do cérebro de ratos</i>	49
4.2.2. <i>Experimento 11: Imunohistoquímica para verificar as possibilidades neuroanatômicas de uma possível interação entre os sistemas eCB e glicocorticóides</i>	53
5. DISCUSSÃO.....	55
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	70

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
APÊNDICE 1.....	84
APÊNDICE 2.....	86

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Controle do córtex pré-frontal sobre a expressão e extinção do condicionamento aversivo.....	6
Figura 2: Representação esquemática do sistema endocanabinóide nos neurônios pré- e pós-sinápticos	9
Figura 3: Representação esquemática dos circuitos ativados em resposta ao estresse.....	12
Figura 4: Representação esquemática da interação entre os sistemas endocanabinóide e glicocorticóide	15
Figura 5: Modelo representativo da caixa de esQUIVA ativa	23
Figura 6: Representação esquemática do procedimento realizado nos experimentos comportamentais	24
Figura 7: Efeitos da administração i.p. do glicocorticóide sintético dexametasona (0,1; 0,5; 1,0 mg/kg) na extinção do CA contextual.....	33
Figura 8: Efeitos da administração i.c.v. do glicocorticóide sintético dexametasona (0,1; 0,5; 1,0 µg/µl) na extinção do CA contextual.	35
Figura 9: Efeitos do antagonista dos receptores canabinóides CB ₁ SR141716A (SR 0,2 mg/kg; i.p.) nos efeitos facilitatórios do glicocorticóide sintético dexametasona (DEX 0,5 µg/µl; i.c.v.) sobre a extinção do condicionamento aversivo contextual.....	37
Figura 10: Efeitos de um inibidor da síntese de corticosteróides, metirapona (MET 25 mg/kg; s.c.), nos efeitos facilitatórios do inibidor da recaptação e degradação de eCB, o AM404 (1,0 µg/µl; i.c.v.), sobre a extinção do condicionamento aversivo contextual.	39
Figura 11: Efeitos de um inibidor da síntese de corticosteróides, metirapona (MET 25 mg/kg; s.c.), nos efeitos facilitatórios do agonista canabinóide dos receptores CB ₁ , WIN55212-2 (WIN 0,1 µg/µl; i.c.v.), sobre a extinção do condicionamento aversivo contextual	41

Figura 12: Efeitos de um antagonista dos receptores glicocorticóides (GR), o mifepristone (MIF 100 ng/μl; i.c.v.), nos efeitos facilitatórios do glicocorticóide sintético dexametasona (DEX 0,5 μg/μl; i.c.v.) sobre a extinção do condicionamento aversivo contextual..... 43

Figura 13: Efeitos de um antagonista dos receptores glicocorticóides (GR), o mifepristone (MIF 100 ng/μl; i.c.v.), nos efeitos facilitatórios de um inibidor da recaptção e degradação de eCB, o AM404 (1,0 μg/μl; i.c.v.), sobre a extinção do condicionamento aversivo contextual 45

Figura 14: Efeitos de um antagonista dos receptores mineralocorticóides (MR), a espironolactona (SPI 100 ng/μl; i.c.v.), nos efeitos facilitatórios de um agonista glicocorticóide sintético, a dexametasona (0,5 μg/μl; i.c.v.), sobre a extinção do condicionamento aversivo contextual 47

Figura 15: Efeitos de um antagonista dos receptores mineralocorticóides (MR), a espironolactona (SPI 100 ng/μl; i.c.v.), nos efeitos facilitatórios do inibidor da recaptção e degradação de eCB, o AM404 (1,0 μg/μl; i.c.v.), sobre a extinção do condicionamento aversivo contextual 49

Figura 16: Liberação de GABA e glutamato em terminais nervosos (sinaptossomas) da região cortical do cérebro de ratos..... 51

Figura 17: Liberação de GABA e glutamato em terminais nervosos (fatias) da região cortical do cérebro de ratos 52

Figura 18: Imagens de imunohistoquímica para os receptores canabinóides CB₁ e glicocorticóides (GR), bem como para os transportadores GABAérgicos (VGAT) e glutamatérgicos (VGLUT1) em fatias do cérebro de ratos..... 54

Figura 19: Figura esquemática representando o mecanismo proposto de interação entre eCB e glicocorticóides no processo de extinção de uma memória aversiva 71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Efeitos da manipulação do sistema endocanabinóide na extinção do medo 11

Tabela 2: Efeitos da manipulação do sistema glicocorticóide na extinção do medo 14

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

TEPT	Transtorno de estresse pós-traumático
eCB	Endocanabinóide
NIMH	Instituto nacional de saúde mental dos Estados Unidos Análise de variância
CA	Condicionamento aversivo
EC	Estímulo condicionado
EI	Estímulo incondicionado
CPF	Córtex pré-frontal
IL	Infralímbico
PL	Pré límbico
CPFvm	Córtex pré-frontal ventromedial
BLA	Amígdala basolateral
PVN	Núcleos paraventriculares Transportador de
s.c.	Subcutânea
i.p.	Intraperitoneal
i.c.v.	Intracerebroventricular
EPM	Erro padrão da média
SNC	Sistema nervoso central
ITCs	Células intercalares da amígdala
CeL	Porção lateral dos núcleos centrais da amígdala
CeM	Núcleos centrais da amígdala

RESUMO

A regulação das respostas emocionais é essencial para a saúde mental e a forma mais simples de regulação destas respostas é a extinção, a qual a resposta condicionada a um estímulo diminui quando o reforço (estímulo) é omitido. Estudos recentes sugerem um papel importante dos sistemas endocanabinóide (eCB) e glicocorticóide na modulação de estados emocionais e extinção de memórias aversivas em animais. Evidências anteriores sugerem que os eCB são liberados no cérebro durante o processo de extinção de memórias de medo enquanto que os hormônios glicocorticóides são liberados pela glândula supra-renal durante eventos estressantes, como nas respostas de medo. Sugere-se que os glicocorticóides podem desencadear a liberação de eCB no cérebro. Por isso, nosso objetivo foi investigar se a interação entre estes sistemas neuromoduladores poderiam contribuir para as respostas de extinção de uma memória aversiva. Nós investigamos a possibilidade dessa interação através de experimentos comportamentais e bioquímicos em ratos. Nos procedimentos comportamentais utilizamos o modelo de extinção do condicionamento aversivo (CA) contextual. Neste modelo os animais foram colocados em uma caixa de condicionamento e passados 3 min. eles receberam um choque nas patas (1,5 mA, 1 s). Posteriormente, os animais foram re-expostos a caixa de condicionamento durante 9 min por três dias consecutivos. Os tratamentos foram realizados sempre antes de cada sessão de extinção. Um teste sem droga de 3 min foi conduzido 24 h após a última sessão de extinção para investigar possíveis efeitos duradouros. A porcentagem do tempo de congelamento foi utilizada como índice de memória. Nos procedimentos bioquímicos investigamos essa possível interação através de experimentos de liberação de GABA e glutamato (em sinaptossomas e fatias do cérebro de ratos) e ensaios de imunohistoquímica. Os resultados comportamentais mostraram que a ação do agonista glicocorticóide (dexametasona) depende dos receptores canabinóides CB₁, assim como o sistema eCB depende da síntese de glicocorticóides endógenos para que ambos exerçam seus efeitos facilitatórios sobre a extinção. Já os resultados bioquímicos mostraram que a dexametasona é capaz de reduzir a liberação de GABA e glutamato em fatias do córtex cerebral de forma semelhante ao agonista canabinóide em sinaptossomas. Curiosamente, este efeito da dexametasona foi antagonizado por um antagonista dos receptores canabinóides do

subtipo CB₁. As imagens obtidas dos ensaios imunohistoquímicos confirmaram a possibilidade de interação observada anteriormente. Com isso, nossos achados sugerem pela primeira vez uma interdependência entre os sistemas eCB e glicocorticóide como um mecanismo para a extinção do CA contextual. Sugere-se que a liberação de glicocorticóides relacionados ao estresse induz a liberação de eCB no cérebro que, por sua vez, atuam ao facilitar a extinção de memórias aversivas.

ABSTRACT

The regulation of the emotional responses is essential for mental health and the simplest form of regulation of emotional responses is extinction, in which the conditioned response to a stimulus decreases when reinforcement (stimulus) is omitted. Recent studies suggest an important role of the endocannabinoid (eCB) and glucocorticoid systems in the modulation of emotional states and extinction of aversive memories in animals. Previous evidence suggests that endocannabinoids are released in the brain during fear extinction. Glucocorticoid hormones are released by adrenal glands during stress events. It is suggested that glucocorticoids may trigger the release of endocannabinoids in the brain. Hence, our objective was to investigate whether the interaction between these neuromodulatory systems contributes to the contextual fear extinction. We investigated the possibility of this interaction using behavioral and biochemical experiments in rats. In the behavioral procedures we used the extinction of contextual fear conditioning model. In this model rats were placed into the conditioning chamber and 3 min later received an electric-footshock (1.5 mA, 1 s). Subsequently, they were re-exposed to the chamber for 9 min in 3 consecutive days. Treatments were performed before each extinction trial. A 3-min drug-free test of contextual memory was performed 24 h after the last extinction session to investigate lasting effects. The percentage of freezing was used as an index of fear memory. In addition we investigated this possible interaction through GABA and glutamate releasing experiments (in synaptosomes and slices from rat brain) and immunohistochemistry assays. Our behavioral results showed that glucocorticoid agonist (dexamethasone) needs the CB1 cannabinoid receptor in the same way as endocannabinoid system requires endogenous glucocorticoids synthesis to exert its facilitative effects on extinction of contextual fear conditioning. Biochemistry results demonstrate that dexamethasone reduces GABA and glutamate release in slices from brain cortex in a similar way to cannabinoid agonist in synaptosomes. Interestingly, this dexamethasone effect was antagonized by CB₁ cannabinoid antagonist. Immunohistochemistry images confirmed the possible interaction observed previously. Thus, our present findings suggest an interdependency of the glucocorticoid and endocannabinoid systems as a mechanism for contextual fear extinction. It is suggested that stress-related glucocorticoids drive the

release of endocannabinoid in the brain, with a final impact on the extinction of aversive memories.

1. INTRODUÇÃO

O aprendizado emocional é extremamente necessário para que o indivíduo possa sobreviver. Contudo, uma vez adquiridas, as associações emocionais nem sempre são manifestadas. Na verdade, a regulação das respostas emocionais sob diferentes condições ambientais é essencial para a saúde mental. Sendo assim, a forma mais simples de regulação das respostas emocionais é a extinção, no qual a resposta condicionada a um estímulo diminui quando o reforço (estímulo) é omitido. No entanto, em certos momentos este mecanismo de extinção pode não ocorrer de forma satisfatória e as respostas emocionais podem se tornar exageradas ou começarem a ocorrer em situações inapropriadas, caracterizando um distúrbio de ansiedade, como, por exemplo, o transtorno de estresse pós-traumático (TEPT) (Quirk e Mueller, 2008).

1.1. Processos de formação de memória

Podem existir tantas memórias quantas forem as experiências em um indivíduo. Em geral, o processo responsável pelo registro destas experiências pode ser distinto em duas grandes fases: *formação e evocação*. A *formação* da memória pode ainda ser dividida em três momentos distintos: *i*) a *aquisição* (adquirir, aprender), momento que ocorre durante a exposição à experiência formadora da memória. Trata-se da condução da informação ao cérebro via órgãos sensoriais e córtex sensorial primário. Esta etapa depende da atenção e da percepção. Fatores como fadiga, ansiedade e preocupação podem interferir neste processo; *ii*) a *consolidação* (adesão, fixação), momento mais instável e suscetível a modificações. Consiste na conversão do conhecimento através de uma representação significativa no cérebro. Esta etapa é reforçada pela repetição ou pela associação com outros dados já armazenados na memória; *iii*) o *armazenamento* (armazenar, guardar) onde ocorre a real internalização do traço de memória (Gold, Zornetzer *et al.*, 1974). Já a *evocação* ou recordação refere-se ao acesso à informação armazenada. Este processo pode ser espontâneo ou ocorrer pela busca voluntária, sendo influenciada por fatores internos (humor, motivação, interesse, etc.) e externos (local, ambiente, etc.). Além disso, a memória, às vezes, implica na mudança de comportamento, uma vez que a simples observação de aspectos anatômicos, bioquímicos ou eletrofisiológicos não permite detectar sua presença em um indivíduo.

Desta maneira, somente estaremos certos de que determinados conhecimentos ou habilidades foram adquiridos satisfatoriamente no momento em que os mesmos forem requeridos e, portanto, evocados para a realização de uma tarefa ou atividade. Se não é possível medir a evocação, isto é, a alteração do comportamento, não é possível detectar a existência de memória. Durante a evocação de uma determinada memória dois processos importantes podem acontecer: *i)* se a informação é importante esta memória será *re-consolidada*; *ii)* se a informação não agrega mais nenhum valor à sobrevivência do indivíduo esta memória será *extinta*. O sentido biológico da re-consolidação da memória é manter e acrescentar novas informações à memória antiga, enquanto que o da extinção, principal abordagem desta tese, é formar uma nova memória com significado distinto à memória original (Cammarota, Bevilacqua *et al.*, 2005).

1.2. Sobre a extinção

Como apontado inicialmente, o aprendizado emocional é de extrema importância para a sobrevivência do indivíduo e a forma mais simples da regulação destas respostas é a extinção. Porém, quando por algum motivo o processo de extinção é prejudicado, as respostas decorrentes do aprendizado emocional também são e, conseqüentemente, podemos ter uma extrapolação das mesmas. Neste caso, é bem possível que se desencadeiem alguns transtornos de ansiedade, como o TEPT, que nada mais é do que a rememoração indevida e exagerada do trauma frente a estímulos que foram previamente associados ao trauma, mas que já não mais representam perigo algum quando apresentados de forma isolada (Quirk e Mueller, 2008).

Para se ter uma ideia das dimensões que este transtorno é capaz de alcançar, nos Estados Unidos estudos vem mostrando que o TEPT possui uma prevalência de até 1,9% na população estudada. Através destes dados é possível concluir que cerca de 5,2 milhões de estadunidenses são acometidos por este transtorno de ansiedade (NIMH – National Institute of Mental Health) (Kessler, Chiu *et al.*, 2005). Por isso, cada vez mais se faz necessário o desenvolvimento de agentes farmacológicos que venham a promover a facilitação da extinção de memórias aversivas e que possam ser agregados às já existentes terapias cognitivo-comportamentais (Quirk e Mueller, 2008). Mas para que seja

possível o desenvolvimento de tais farmacoterapias é essencial que se compreenda cada vez melhor como o processo de extinção ocorre em seus mínimos detalhes. Neste sentido, os modelos animais têm contribuído de forma bastante importante na triagem deste tipo de composto farmacológico e, em contrapartida, vem melhorando consideravelmente nosso entendimento acerca dos mecanismos neurais que sustentam este processo mnemônico.

Dentre os modelos animais utilizados para se estudar a extinção de memórias aversivas, um dos mais requisitados é o modelo do condicionamento aversivo (CA) contextual. Este modelo tem sido utilizado para o estudo de memórias aversivas e da expressão de comportamentos defensivos que sucedem a recordação destas memórias, uma vez que a aquisição de comportamentos defensivos condicionados pode estar envolvida no desenvolvimento de patologias de ansiedade deflagradas pela exposição a experiências traumáticas (Brewin e Holmes, 2003). No modelo do CA contextual as memórias aversivas são estudadas através da exposição do animal a um contexto (ex.: caixa de condicionamento, estímulo condicionado-EC) onde um estímulo incondicionado (EI) nocivo (usualmente um choque nas patas) é liberado (Rudy, Huff *et al.*, 2004). Quando re-expostos ao mesmo contexto, o animal exhibe respostas comportamentais defensivas condicionadas como o congelamento (Blanchard e Blanchard, 1969). A extinção desta resposta condicionada se dá por repetidas ou prolongadas exposições ao contexto, na ausência do choque, de modo que se observa uma diminuição do tempo de congelamento, caracterizando o aprendizado de que o contexto não está mais associado ao choque nas patas (Pavlov, 1927). Sendo assim, a extinção de uma memória não é apenas um evento simples como um “esquecimento” ou um simples “apagar”, e sim um conjunto de flexibilidades comportamentais que caracterizam uma nova forma de aprendizado (Quirk e Mueller, 2008).

No entanto, é importante ressaltar que alguns autores têm sugerido que a extinção não é um mecanismo associativo (contexto vs ausência de choque), como mencionado acima, mas sim um mecanismo não-associativo. Então, ao invés de um novo aprendizado, a extinção seria um desaprender da associação original entre EC-EI. Nesta abordagem, a extinção provocaria um processo tipo-habituação com perda das informações relacionadas ao EC (Pearce e Hall, 1980) ou EI (Rescorla e Heth, 1975). De qualquer forma, vários estudos

comportamentais têm fornecido muitas evidências indicando que a extinção de uma memória aversiva reflete muito mais um novo aprendizado do que a eliminação do traço original vinculado ao componente aversivo. A maior evidência de que o processo de extinção envolve um novo aprendizado vem dos experimentos com reaquisição onde os resultados mostram que um pareamento adicional entre EC e EI após a extinção é capaz de reativar de forma mais rápida esta associação (EC-EI). Outra evidência vem do fato de que muitos estudos têm mostrado que com o passar do tempo parece haver certa taxa de recuperação da associação EC-EI que havia sido previamente extinta. Desta forma, o traço original de memória não foi apagado durante a extinção, mas apenas reprimido por uma nova memória que não faz mais a associação entre EC e EI (Bouton e Swartzentruber, 1989; Napier, Macrae *et al.*, 1992; Brooks e Bouton, 1993). Para uma melhor abordagem entre as diferenças de um mecanismo associativo e não-associativo (ver Riebe, Pamplona *et al.*, 2012)

1.3. Mecanismos neurais envolvidos na extinção de memórias aversivas

Diante da possibilidade de se estudar a extinção de memórias aversivas em modelos animais, muitos estudos têm sido feitos na tentativa de fornecer um melhor entendimento sobre como este processo estaria acontecendo em níveis neurobiológicos. Consequentemente, à medida que se tem um melhor entendimento acerca dos mecanismos neurais que sustentam este processo, temos também a possibilidade de sugerirmos compostos que possam interferir com estes mecanismos e, com isso, promover a facilitação da extinção destas memórias com potencial de desencadear transtornos de ansiedade como o TEPT.

Em relação aos mecanismos neurais que estão envolvidos no processo de extinção, podemos dizer que nos últimos anos as pesquisas evoluíram relativamente bem no entendimento desta questão. Um crescente número de estudos tem caracterizado estruturas cerebrais como amígdala, hipocampo e, ultimamente, muito tem se falado no córtex pré-frontal (CPF) como estruturas chaves que sustentam este processo (para revisão ver Myers e Davis, 2007; Quirk e Mueller, 2008; Herry, Ferraguti *et al.*, 2010; Quirk, Pare *et al.*, 2010).

Embora as pesquisas sobre o medo tenham focado amplamente na amígdala, estudos recentes vêm mostrando cada vez mais a importância de um controle cortical sobre esta estrutura a fim de regular as respostas aversivas (para mais detalhes ver Sotres-Bayon e Quirk, 2010). Em modelos de roedores, têm sido bem estabelecido que a região infralímbica (IL) do CPF possui um papel chave no aprendizado da extinção (Quirk, Garcia *et al.*, 2006; Sotres-Bayon, Cain *et al.*, 2006). Estes estudos têm mostrado também alguns mecanismos moleculares envolvidos na plasticidade relacionada a este processo. Além do mais, um número crescente de estudos tem sugerido a região pré-límbica (PL) do CPF como fundamental na expressão das respostas de medo. Ambos, IL e PL estão intimamente conectados com a amígdala e outras estruturas através de projeções excitatórias e inibitórias que controlam a expressão do medo na amígdala (para mais detalhes ver Sotres-Bayon e Quirk, 2010).

O primeiro estudo a relatar a importância do CPF na expressão da extinção do condicionamento de medo foi publicado por Morgan e colaboradores no ano de 1993. Neste estudo, os autores mostraram que lesões na porção ventromedial do CPF (CPF_{vm}), incluindo áreas IL e PL, não têm efeitos na aquisição do condicionamento de medo a um som, mas prejudicam sua extinção (Morgan, Romanski *et al.*, 1993). Mais recentemente, um estudo publicado por Lebron e colaboradores confirmou a importância do CPF_{vm} na extinção de memórias aversivas ao mostrar que ratos que tiveram esta estrutura cerebral lesada podem, eventualmente, extinguir memórias aversivas, porém, necessitam duas vezes mais treinos para que este processo seja iniciado (Lebron, Milad *et al.*, 2004). Neste sentido o oposto também parece ser verdadeiro, já que a ativação da porção IL do CPF facilita a extinção de memórias aversivas (Milad e Quirk, 2002; Milad, Vidal-Gonzalez *et al.*, 2004; Mueller, Porter *et al.*, 2008). Sabe-se também que o CPF emite projeções neurais para a amígdala, inibindo a ativação neural nessa estrutura e reduzindo, conseqüentemente, as respostas de medo. Sendo assim, o CPF suprime as respostas de medo condicionado ao inibir a função da amígdala em desencadear tais respostas (para mais detalhes ver Pape e Pare, 2010).

A figura 1 nos mostra como as regiões PL e IL do CPF estariam hipoteticamente interagindo com a amígdala no controle da expressão e extinção do CA ao som. Durante a expressão (esquerda) e a extinção

(direita) do condicionamento de medo, as respostas vindas da amígdala são integradas pelas regiões PL e IL do CPF e convergem com informações vindas de diversas outras fontes como hipocampo, monoaminas do tronco cerebral, tálamo mediodorsal, e CPF orbital para determinar se devem ou não produzir uma resposta de medo. O aumento na expressão do medo envolve projeções que vão da região PL do CPF até a amígdala basal, enquanto que a inibição do medo envolve projeções que vão da região IL do CPF para as células intercalares da amígdala. Por sua vez, a amígdala basal estimula os neurônios dos núcleos centrais da amígdala que, conseqüentemente, produzem as respostas de medo, enquanto que as células intercalares, predominantemente GABAérgicas, inibem estes neurônios acarretando numa diminuição destas respostas. Assim, um mesmo estímulo condicionado pode sinalizar ambos os estados, de aumento ou diminuição na expressão do medo, dependendo da resposta que for mais apropriada para determinada circunstância (Sotres-Bayon e Quirk, 2010).

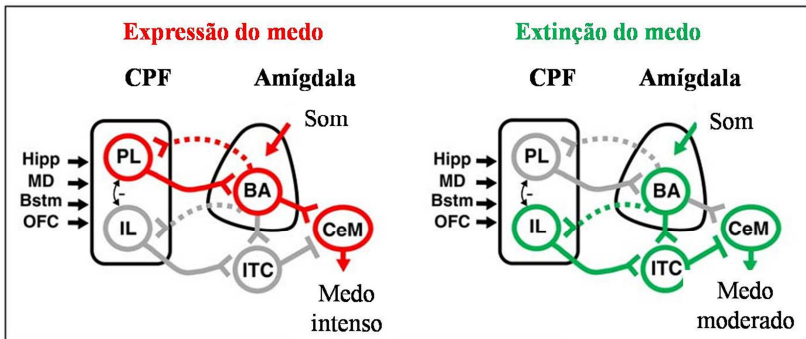


Figura 1 – Controle do córtex pré-frontal sobre a expressão e extinção do condicionamento aversivo. (Hipp) Hipocampo; (Bstm) monoaminas do tronco cerebral; (MD) tálamo médio dorsal; (OFC) Córtex pré-frontal orbital; (BA) Amígdala basal; (ITC) Células intercalares da amígdala; (CeM) núcleos centrais da amígdala; (PL) Córtex pré-frontal pré-límbico; (IL) Córtex pré-frontal infra-límbico (traduzido de Sotres-Bayon e Quirk, 2010).

Entender melhor quais estruturas cerebrais estão envolvidas no processo de extinção nos facilita em muito o entendimento de como este processo ocorre. Descobertas importantes já têm sido feitas neste campo e um bom exemplo é o estudo feito por Monfils e colaboradores,

publicado no ano de 2009. Neste estudo os autores não apenas contribuíram para um melhor esclarecimento de como funciona o processo, como também mostraram ser possível que este processo se torne persistente. Este é um grande achado se considerarmos que um dos principais problemas relacionados ao período “pós-extinção” se trata justamente da rememoração espontânea da resposta até então extinta. Para isso, os autores consideraram o fato de que a extinção reduz os valores emocionais relacionados ao estímulo condicionado e aplicaram este procedimento na “janela” de reconsolidação, que nada mais é do que o período em que a memória evocada se torna instável e suscetível a modificações. Desta forma, a extinção feita na “janela de reconsolidação” resultou em uma redução do medo de forma mais resistente e duradoura daquela que ocorre na extinção quando feita fora deste período instável. Este processo envolveu uma desestabilização do traço inicial da memória aversiva que, por sua vez, foi recodificado como um estímulo seguro (para maiores detalhes ver Monfils, Cowansage *et al.*, 2009).

Embora o estudo de Monfils e colaboradores não tenha utilizado tratamentos farmacológicos, a busca por compostos capazes de facilitar a extinção de memórias aversivas continua intensa e se mostra cada vez mais uma abordagem promissora no tratamento de transtornos relacionados à rememoração de eventos traumáticos. Dentro desta abordagem farmacológica para uma facilitação da extinção, vários estudos têm sugerido compostos capazes de promover esse tipo de resposta (no prelo Bitencourt, 2012 (no prelo)). Contudo, para trilhar o caminho que leva a estes compostos é fundamental que se entenda não apenas sobre as estruturas cerebrais envolvidas em tal processo, mas também quais os sistemas envolvidos e, a partir deste conhecimento, pressupor quais compostos interfeririam com tais sistemas a ponto de facilitar a extinção de uma memória aversiva. Dentre os sistemas cujo envolvimento parece ser primordial para que ocorram os processos de extinção, destacamos aqui o sistema endocanabinoide (eCB) e os glicocorticóides, que estão amplamente expressos nas regiões cerebrais conhecidas por desempenharem um importante papel neste tipo de resposta (Fuxe, Wikstrom *et al.*, 1985; Herkenham, Lynn *et al.*, 1990) e que foram os sistemas preferencialmente abordados durante o desenvolvimento desta tese. É claro que com isso não podemos descartar a importância de outros sistemas, como o sistema glutamatérgico, GABAérgico, noradrenérgico, colinérgico,

dopaminérgico e tantos outros que possuem, assim como os sistemas eCB e glicocorticóide, uma importante participação em todo e qualquer processo que envolva eventos mnemônicos (para maiores detalhes ver Kaplan e Moore, 2011).

1.4 – Sistema endocanabinóide e a extinção de memórias aversivas

Após a descoberta do sistema eCB (ver Fig. 2), o qual inclui receptores (CB1 e CB2), ligantes endógenos (anandamida, 2-AG, etc) e enzimas de síntese e degradação de eCB, o desafio foi procurar entender quais as funções fisiológicas deste “novo” sistema modulatório. Descobriu-se que o sistema eCB atua como modulador, regulando a liberação de vários neurotransmissores, tanto excitatórios (glutamato) como inibitórios (GABA). Desde então, é cada vez mais claro o papel importante que este sistema desempenha num número variado de funções neurofisiológicas como, por exemplo, a extinção de memórias aversivas (Pertwee, 2006; Kaplan e Moore, 2011).

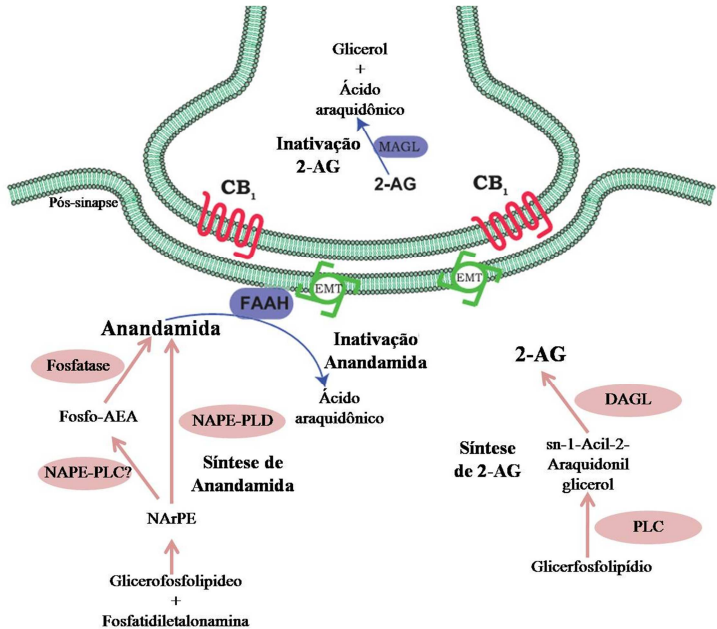


Figura 2 - Representação esquemática do sistema endocanabinóide nos neurônios pré- e pós-sinápticos. O terminal pré-sináptico está localizado no topo, enquanto que o terminal pós-sináptico está localizado na parte inferior da página. Os receptores CB₁ estão expressos predominantemente em terminais de neurônios pré-sinápticos (Katona, Sperlagh *et al.*, 2000). Devido a esta localização, aliado ao fato de atuarem inibindo a adenilato ciclase, estes receptores podem mediar à inibição da liberação de outros neurotransmissores como GABA e Glutamato (Marsicano e Lutz, 1999; Azad, Eder *et al.*, 2003). Os receptores CB₁ parecem estar crucialmente envolvidos no controle de diversos estados emocionais como na extinção de memórias aversivas. (EMT) transportador membrana de endocanabinóide; (MAGL) lipase de monoacilglicerol; (DAGL) lipase de diacilglicerol; (AEA) anandamida; (NArPE) N-araquidonil-fosfatidiletanolamina; (NAT) N-aciltransferase; (2-AG) 2-araquidonilglicerol. (figura traduzida de Pacher, Batkai *et al.*, 2006).

O primeiro trabalho a mostrar claramente a participação do sistema eCB na extinção de memórias aversivas foi um estudo publicado por Marsicano e colaboradores em 2002. Neste estudo, os autores mostraram haver liberação de eCB no complexo da amígdala basolateral (BLA) durante o processo de extinção. Mostraram também que ambos, camundongos com eliminação gênica dos receptores CB1 ou camundongos submetidos ao tratamento com antagonista para estes

receptores, tiveram um grande prejuízo na extinção do condicionamento auditivo de medo (Marsicano, Wotjak *et al.*, 2002). Mais tarde, outros estudos vieram a reforçar estes achados (Cannich, Wotjak *et al.*, 2004; Suzuki, Josselyn *et al.*, 2004; Chhatwal, Davis *et al.*, 2005; Kamprath, Marsicano *et al.*, 2006; Pamplona, Prediger *et al.*, 2006; Niyuhire, Varvel *et al.*, 2007; Pamplona, Bitencourt *et al.*, 2008; Abush e Akirav, 2009; Lin, Mao *et al.*, 2009; Dubreucq, Koehl *et al.*, 2010; Plendl e Wotjak, 2010).

Sabendo-se da importância do sistema eCB para a extinção de memórias aversivas e que o bloqueio, seja farmacológico ou por eliminação gênica, prejudica este processo, a lógica da próxima indagação foi a seguinte: o oposto, ou seja, a potencialização do sistema eCB, facilitaria o processo de extinção? Dadas as similaridades entre o procedimento de extinção e as psicoterapias baseadas em exposição, utilizadas para o tratamento de transtornos relacionados ao medo em humanos, o sistema eCB representaria um novo alvo farmacológico para o tratamento deste tipo de transtornos caso a resposta se mostrasse positiva (Ruehle, Aparisi Rey *et al.*, 2011).

De fato, as pesquisas têm mostrado que a resposta é positiva, ou seja, a ativação do sistema eCB, seja por meio de agonistas diretos (Pamplona, Prediger *et al.*, 2006; Pamplona, Bitencourt *et al.*, 2008; Abush e Akirav, 2009; Lin, Mao *et al.*, 2009) ou de compostos capazes de aumentar os níveis de eCB (Chhatwal, Davis *et al.*, 2005; Bitencourt, Pamplona *et al.*, 2008; Pamplona, Bitencourt *et al.*, 2008; Abush e Akirav, 2009; Lin, Mao *et al.*, 2009) ou ainda através da administração direta de anandamida (De Oliveira Alvares, Pasqualini Genro *et al.*, 2008), é capaz de promover a facilitação da extinção de memórias traumáticas (ver tabela 1). Ainda não está bem claro como a potencialização do sistema eCB pode promover a facilitação da extinção de memórias aversivas, porém, acredita-se que a ativação cortical dos receptores CB1 está associada com uma ativação inibitória retrograda nas sinapses GABAérgicas desta região (Bodor, Katona *et al.*, 2005; Wedzony e Chocyk, 2009). Assim, a ativação dos receptores CB1 resultaria em um aumento na atividade neural da região cortical que, por sua vez, regularia a expressão do medo mediada pela amígdala, como já mencionado anteriormente (Quirk, Likhtik *et al.*, 2003).

TABELA 1 – Efeitos da manipulação do sistema endocanabinoide na extinção do medo.

Modelo	Efeito na extinção	Intervenção	Referência
Condicionamento de medo auditivo	Prejudica	Deleção do receptor CB1	<i>Marsicano et al. (2002)</i>
		Deleção do receptor CB1	<i>Cannich et al. (2004)</i>
		Deleção do receptor CB1	<i>Kamprath et al. (2006)</i>
		Deleção do receptor CB1	<i>Dubreucq et al. (2010)</i>
		Deleção do receptor CB1	<i>Plendl et al. (2010)</i>
		SR141716A (3 mg/kg, s.c.)	<i>Marsicano et al. (2002)</i>
		SR141716A (3 mg/kg, i.p.)	<i>Niyuhire et al. (2007)</i>
		SR141716A (3 mg/kg, s.c.)	<i>Plendl et al. (2010)</i>
Condicionamento de medo contextual	Prejudica	SR141716A (10 mg/kg, i.p.)	<i>Suzuki et al. (2004)</i>
		SR141716A (1 mg/kg, i.p.)	<i>Pamplona et al. (2006)</i>
		SR141716A (1 mg/kg, i.p.)	<i>Pamplona et al. (2008)</i>
	Facilita	WIN55,212-2 (0,25 mg/kg, i.p.)	<i>Pamplona et al. (2006)</i>
		WIN55,212-2 (0,25 mg/kg, i.p.)	<i>Pamplona et al. (2008)</i>
		AM404 (10 mg/kg, i.p.)	<i>Pamplona et al. (2008)</i>
		AM404 (1 µg/µl, i.c.v.)	<i>Bitencourt et al. (2008)</i>
		CBD (2 µg/µl, i.c.v.)	<i>Bitencourt et al. (2008)</i>
AEA (0,17 ng, CA1)	<i>De Oliveira Alvares et al. (2008)</i>		
Sobressalto potencializado pelo medo	Prejudica	SR141716A (1,5-5 mg/kg i.p.)	<i>Chhatwal et al. (2005)</i>
		AM251 (2 µg, CPF-IL)	<i>Lin et al. (2009)</i>
		WIN55,212-2 (0,05 µg, CPF-IL)	<i>Lin et al. (2009)</i>
	Facilita	AM404 (10 mg/kg, i.p.)	<i>Chhatwal et al. (2005)</i>
		AM404 (0,2 µg, CPF-IL)	<i>Lin et al. (2009)</i>
		URB597 (0,3 µg, CPF-IL)	<i>Lin et al. (2009)</i>
Sem efeito	WIN55,212-2 (5 mg/kg, i.p.)	<i>Chhatwal et al. (2005)</i>	
Esquiva inibitória	Prejudica	AM251 (6 ng/0,5 µl; CA1)	<i>Abush et al. (2009)</i>
		WIN55,212-2 (5 µg/0,5 µl; CA1)	<i>Abush et al. (2009)</i>
	Facilita	AM404 (200 ng/0,5 µl CA1)	<i>Abush et al. (2009)</i>
Esquiva passiva	Prejudica	SR141716A (3 mg/kg, i.p.)	<i>Niyuhire et al. (2007)</i>
Condicionamento de medo no labirinto de Barnes	Prejudica	SR141716A (3 mg/kg, i.p.)	<i>Niyuhire et al. (2007)</i>

Efeitos de distintas manipulações do sistema eCB nos diferentes tipos de paradigmas comportamentais que envolvem extinção de memórias aversivas. (s.c.) subcutânea; (i.p.) intraperitoneal; (i.c.v.) intracerebroventricular; (CA1) região do hipocampo; (CPF-IL) córtex pré-frontal infra límbico; (SR141716A) antagonista dos receptores CB₁; (WIN55,212-2) agonista dos receptores CB₁; (AM404) inibidor da recaptção e degradação de eCB; (CBD) canabidiol; (AEA) anandamida; (AM251) antagonista dos receptores CB₁; (URB597) inibidor da degradação de anandamida.

1.5 – Glicocorticóides e a extinção de memórias aversivas

Outro sistema que parece estar crucialmente envolvido na extinção de memórias aversivas é o sistema glicocorticóide. Glicocorticóides são hormônios esteróides (corticosterona em animais e cortisol em humanos) liberados pela adrenal, geralmente em situações de estresse (ver Fig. 4). Uma vez liberados eles podem passar a barreira hematoencefálica e ligar-se aos receptores glicocorticóides (GR) localizados em diversas regiões cerebrais, inclusive naquelas estruturas que desempenham papel fundamental nos processos de extinção (Fuxe, Wikstrom *et al.*, 1985).

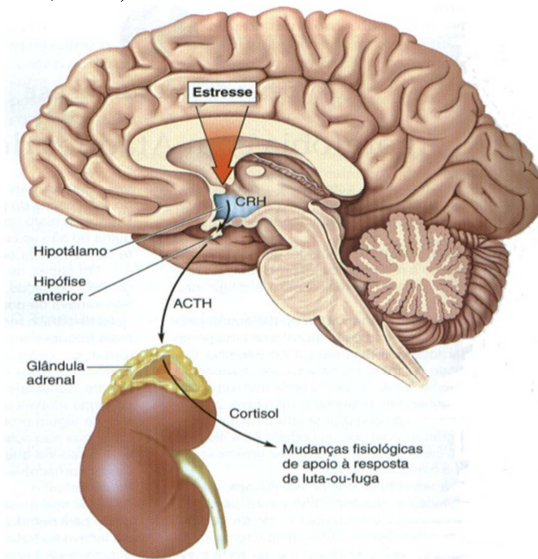


Figura 3 – Representação esquemática dos circuitos ativados em resposta ao estresse. O eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) regula a secreção de cortisol (em humanos) e corticosterona (em animais) da glândula adrenal em resposta ao estresse. O hormônio liberador de corticotrofina (CRH) é o mensageiro químico entre os núcleos paraventriculares do hipotálamo e a hipófise anterior. A liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) pela hipófise viaja pela circulação sanguínea até a glândula adrenal, localizada acima do rim, estimulando a liberação de cortisol/corticosterona. O cortisol/corticosterona contribui para a resposta fisiológica do organismo ao estresse e ao atravessarem a barreira hematoencefálica podem ligar-se nos receptores glicocorticóides presentes em estruturas cerebrais que desempenham papel importante em várias respostas emocionais como, por exemplo, naquelas envolvidas nos processos de extinção (Fuxe, Wikstrom *et al.*, 1985). (figura adaptada de Joels e Baram, 2009).

Nos últimos anos vários estudos têm evidenciado o importante papel dos glicocorticóides na extinção de memórias aversivas. Por exemplo, Barret e Gonzalez-Lima mostraram que a liberação de corticosterona é fundamental para a extinção do medo condicionado, visto que este processo pôde ser prejudicado pela inibição da síntese da mesma através da administração de metirapona (Barrett e Gonzalez-Lima, 2004). O mesmo foi observado em animais que passaram por adrenalectomia (remoção da adrenal), porém, a administração subcutânea (s.c.) ou intracerebroventricular (i.c.v.) de corticosterona normalizou o prejuízo provocado por esta intervenção (Bohus, De Kloet *et al.*, 1982). O tratamento com corticosterona também foi capaz de reverter o prejuízo na extinção provocado pelo tratamento com metirapona (Blundell, Blaiss *et al.*, 2011; Clay, Hebert *et al.*, 2011). Além disso, vários estudos têm mostrado a capacidade do glicocorticóide sintético dexametasona em promover a facilitação da extinção de memórias aversivas em diferentes tarefas comportamentais (ver tabela 2) (Yang, Chao *et al.*, 2006; Yang, Chao *et al.*, 2007; Ninomiya, Martynhak *et al.*, 2010; Blundell, Blaiss *et al.*, 2011).

Estudos clínicos também mostram a importância dos glicocorticóides na extinção de memórias aversivas. Pacientes com TEPT parecem ter níveis de cortisol reduzidos (Yehuda, Golier *et al.*, 2004) e a administração diária deste glicocorticóide foi capaz de amenizar os sintomas relacionados às memórias traumáticas destes pacientes (ver tabela 2) (Aerni, Traber *et al.*, 2004; De Quervain, Bentz *et al.*, 2011). Ambos os estudos mencionados acima encontraram evidências de efeitos prolongados da administração dos glicocorticóides mesmo após o fim do tratamento, sugerindo uma facilitação da extinção das memórias traumáticas muito mais do que uma redução temporária das respostas de ansiedade. Além do mais, o tratamento prolongado com altas doses de glicocorticóides administradas após o trauma parece reduzir os riscos de desenvolvimento de TEPT (Schelling, Kilger *et al.*, 2004).

TABELA 2 – Efeitos da manipulação do sistema glicocorticóide na extinção do medo

Modelo	Efeito na extinção	Intervenção	Referência
Condicionamento de medo auditivo	Prejudica	Metirapona (50 mg/kg, s.c.)	<i>Barrett et al. (2004)</i>
Condicionamento de medo contextual	Prejudica	Metirapona (50 mg/kg, s.c.)	<i>Blundell et al. (2011)</i>
		Corticosterona (10 mg/kg, i.p.)	<i>Blundell et al. (2011)</i>
	Facilita	Dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.)	<i>Ninomiya et al. (2010)</i>
		Espironolactona (10 mg/kg, s.c.)	<i>Ninomiya et al. (2010)</i>
Sobressalto potencializado pelo medo	Prejudica	Metirapona (25 mg/kg s.c.)	<i>Yang et al. (2006, 2007)</i>
		Mifepristona (5 ng, intra-AMI)	<i>Yang et al. (2006)</i>
	Facilita	Dexametasona (0,5-1 mg/kg, i.p.)	<i>Yang et al. (2006, 2007)</i>
		RU28362 (1-3 ng, intra-AMI)	<i>Yang et al. (2006)</i>
Exposição ao predador	Prejudica	Metirapona (50 mg/kg, s.c.)	<i>Clay et al. (2011)</i>
Psicoterapia baseada na extinção	Facilita	Cortisol (20 mg, oral)	<i>De Quervain et al. (2011)</i>
		Cortisol (10 mg, oral)	<i>Aerni et al. (2004)</i>

Efeitos de distintas manipulações do sistema glicocorticóide nos diferentes tipos de paradigmas comportamentais que envolvem extinção de memórias aversivas. (s.c.) subcutânea; (i.p.) intraperitoneal; (intra-AMI) intra amígdala; (metirapona) inibidor da síntese de glicocorticóides endógenos; (dexametasona) glicocorticóide sintético; (espironolactona) antagonista dos receptores mineralocorticóides MR; (mifepristona) antagonista dos receptores glicocorticóides GR; (RU28362) agonista dos receptores glicocorticóides.

1.6 - Um suposto mecanismo para a extinção de memórias aversivas envolvendo a interação entre os sistemas eCB e glicocorticóide

A primeira evidência de uma interação funcional entre os sistemas eCB e glicocorticóide partiu de um estudo de Di e colaboradores no ano de 2003. Este estudo revelou um mecanismo rápido de retroalimentação negativa de glicocorticóides via sistema eCB nos núcleos paraventriculares (PVN) do hipotálamo (Di, Malcher-Lopes *et al.*, 2003). Já um trabalho recente publicado por Hill e colaboradores (2011) propôs que os eCB modulam não apenas a retroalimentação negativa rápida dos glicocorticóides no PVN, mas também uma retroalimentação negativa lenta através do CPFm (Hill, Mclaughlin *et al.*, 2011). Portanto, estes dois estudos demonstram que o sistema eCB está envolvido em ambas, rápida e longa retroalimentação negativa dos glicocorticóides. Somadas a estas evidências, estudos têm reafirmado esta interação ao mostrar que tanto o estresse crônico, condição que induz a hipersecreção de glicocorticóides, como o tratamento crônico com corticosterona, são capazes de aumentar os níveis de eCB na

amígdala (Hill, Ho *et al.*, 2005; Patel, Roelke *et al.*, 2005). Em um comentário publicado no ano de 2009 na conceituada revista PNAS, Hill e McEwen mostraram de forma bastante didática como poderia ocorrer esta interação e como os glicocorticóides endógenos poderiam estar aumentando a produção e liberação de eCB e estes, por sua vez, inibindo a neurotransmissão GABAérgica via receptores CB₁ (ver Fig. 5 Hill e Mcewen, 2009).

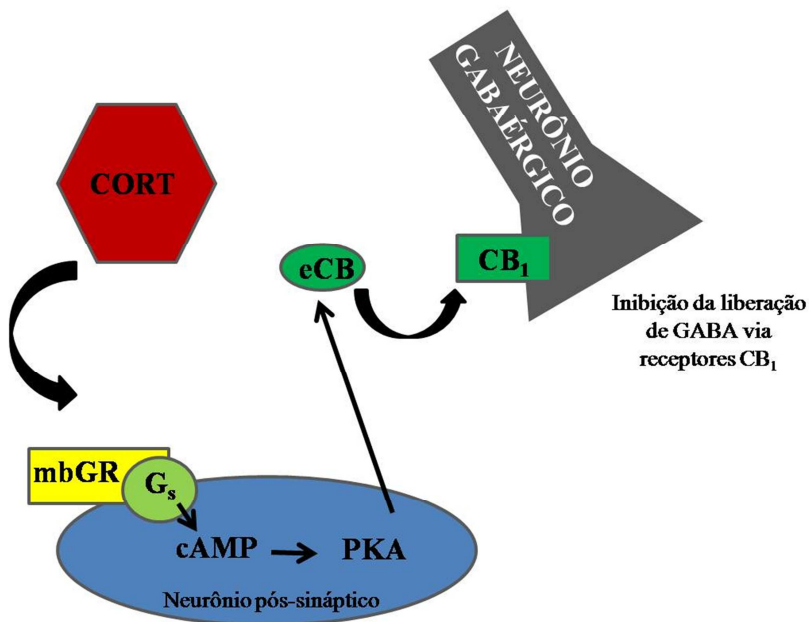


Figura 4 – Representação esquemática da interação entre os sistemas eCB e glicocorticóide. O glicocorticóide endógeno (CORT) liga-se a um receptor glicocorticóide de membrana ainda não caracterizado (mbGR) que ativa a via Gs-CAMP/PKA que, por sua vez, induz a síntese de eCB. Os eCB são liberados na sinapse onde irão se ligar aos receptores CB₁ nos terminais GABAérgicos inibindo a liberação de GABA. (figura traduzida de Hill e McEwen 2009).

Além do mais, esta interação entre eCB e glicocorticóides parece também ocorrer em processos de memória, tanto na amígdala como no hipocampo. Na amígdala, o agonista canabinóide WIN55,212-2 facilitou a consolidação de memória aversiva de forma similar ao tratamento com corticosterona e ambos os efeitos foram bloqueados pela administração do antagonista canabinóide CB1, o AM251 (Campolongo, Roozendaal *et al.*, 2009). Este estudo reafirma os efeitos modulatórios positivos dos receptores CB1 na consolidação de memórias com componente aversivo e sugere que os efeitos similares produzidos pela corticosterona possam ser mediados pelo sistema eCB. Resumindo, neste caso os glicocorticóides parecem recrutar o sistema eCB da amígdala para modular a consolidação de memórias aversivas. Já no hipocampo, a ativação do sistema eCB também parece depender dos glicocorticóides para que exerçam sua função modulatória na consolidação de memórias de medo. Um estudo publicado por De Oliveira Alvares e colaboradores mostrou que a ativação do sistema eCB hipocampal durante a consolidação deste tipo de memória requer certo nível de aversividade, o que, de certa forma, está associada a um aumento dos níveis de glicocorticóides endógenos. Esta foi a primeira demonstração de que o sistema eCB hipocampal pode interagir com os glicocorticóides ao modular a formação de uma memória aversiva contextual (De Oliveira Alvares, Engelke *et al.*, 2010). Por fim, um trabalho publicado recentemente por Atsak e colaboradores (2012), também foi capaz de mostrar uma interação entre eCB e glicocorticóides, porém, na etapa de evocação de memórias aversivas (Atsak, Hauer *et al.*, 2012).

Tendo em vista todas as interações descritas anteriormente entre eCB e glicocorticóides, principalmente aquelas vistas na modulação de memórias aversivas, nos perguntamos se não seria possível uma suposta interação entre estes dois sistemas também na extinção desse tipo de memória. Será que não estariam os glicocorticóides recrutando eCB também nesta etapa? A literatura com esta abordagem é bastante limitada e esta pergunta ainda não foi respondida. Foi então com o intuito de ao menos esclarecer estas questões que conduzimos o presente trabalho. Para este fim, nos propomos a avaliar a possibilidade de interação entre os sistemas eCB e glicocorticóides no processo de extinção de uma memória aversiva. Para um melhor esclarecimento desta questão lançamos mão de abordagens comportamentais, como o modelo do CA contextual em ratos, e abordagens bioquímicas, como

ensaios de liberação de GABA e glutamato em sinaptossomas e fatias do córtex cerebral, assim como técnicas de imunohistoquímica. Entender melhor como estes sistemas funcionam e possivelmente interagem entre si durante o processo de extinção seria um grande passo na busca por compostos capazes de facilitar este processo e assim nos fornecer mais alternativas terapêuticas que possam ser utilizadas como adjuvantes no tratamento de transtornos relacionados à rememoração de eventos traumáticos.

2 – OBJETIVOS

2.1 – Objetivo geral:

- ✓ Investigar possíveis interações entre os sistemas endocanabinóide (eCB) e glicocorticóide sobre a extinção de memórias aversivas em ratos.

2.2 – Objetivos específicos:

1. Investigar os efeitos das administrações i.p. e i.c.v. de um agonista glicocorticóide sintético, a dexametasona, sobre a extinção do CA contextual em ratos;
2. Investigar a participação dos receptores canabinóides do tipo CB₁ nos possíveis efeitos da dexametasona;
3. Verificar a influência da síntese de glicocorticóides endógenos nos efeitos facilitatórios já conhecidos de um inibidor da recaptação e degradação de eCB, o AM404, e de um agonista dos receptores CB₁, o WIN55212-2, sobre a extinção de memórias aversivas;
4. Investigar a participação dos receptores glicocorticóides e mineralocorticóides nos efeitos da dexametasona e do AM404 sobre a extinção do CA contextual;
5. Verificar a possibilidade de interação entre os sistemas eCB e glicocorticóide na liberação de GABA e glutamato, tanto em sinaptossomas como também em fatias da região cortical do cérebro de ratos;
6. Obter imagens de imunohistoquímica que possibilitem um melhor entendimento neuroanatômico desta eventual interação.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Animais

Para os procedimentos comportamentais foram utilizados aproximadamente 350 ratos Wistar machos com peso aproximado de 350 g e com cerca de 3 meses de idade na data de experimentação. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e mantidos por pelo menos uma semana antes dos experimentos no Biotério Setorial do Laboratório de Psicofarmacologia. Os animais foram agrupados em caixas de polipropileno (42 x 34 x 17 cm), contendo 4 ou 5 animais por caixa e mantidos em condições controladas de temperatura (23 ± 2 °C), com ciclo claro-escuro de 12 horas (fase clara das 7:00 às 19:00 h) e com água e ração *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais utilizados no protocolo comportamental foram conduzidos de acordo com as normas do Comitê de Ética para o Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC), registrados no processo número: 23080.011821/2010-12.

Para as análises bioquímicas, efetuadas no Laboratório de Neuromodulação e Metabolismo da Universidade de Coimbra-Portugal, foram utilizados aproximadamente 20 ratos Wistar machos com peso aproximado de 300 g e com cerca de 3 meses de idade. Os animais foram adquiridos junto ao Laboratório Charles-River (Barcelona-Espanha). Estes animais foram alojados em uma instalação SPF (30 x 19 x 13 cm) contendo 2 animais por caixa e mantidos em condições controladas de temperatura (23 ± 2 °C), com ciclo claro/escuro de 12 h (fase clara das 7:00 às 19:00 h) e com água e ração *ad libitum*. Todos os estudos utilizados nos ensaios bioquímicos foram conduzidos de acordo com os princípios e procedimentos definidos nas diretrizes da UE (86/609/CEE) e aprovados pelo comitê local de cuidados com os animais.

3.2 – Drogas e tratamento

Nos procedimentos de experimentação comportamental foram utilizados AM404, um inibidor da recaptção e degradação de anandamida (Tocris, USA); dexametasona, um glicocorticóide sintético (Tocris, USA); WIN55212-2 (WIN), um agonista dos receptores

canabinóides do tipo CB₁; mifepristona, um antagonista dos receptores glicocorticóides (Tocris, USA); e espirolactona, um antagonista dos receptores mineralocorticóides (Tocris, USA), dissolvidas em PBS 0,1M contendo 10 % de dimetilsulfóxido (DMSO). SR141716A (SR), um antagonista dos receptores canabinóides do tipo CB₁ (Sanofi-Aventis, França) e metirapona, um inibidor da síntese de corticosteróides (Sigma-Aldrich, USA), foram dissolvidos em solução fisiológica (NaCl 0,9 %) contendo 10 % de DMSO e 0,1 % de Tween 80. O veículo de dissolução foi utilizado como solução controle. AM404, dexametasona e WIN foram injetados intracerebroventricularmente (i.c.v.) 5 min. antes dos testes comportamentais. Mifepristona e espirolactona foram injetados i.c.v. 5 min. antes da administração de AM404, dexametasona ou solução controle. SR foi injetado intraperitonealmente (i.p.) 20 min. antes da administração de AM404, dexametasona ou solução controle. Por fim, a metirapona foi administrada subcutâneamente (s.c.) 90 min. antes da administração de AM404, WIN ou solução controle. As drogas de administração i.c.v. foram injetadas em um volume de 1,0 µl por animal. As drogas de administração i.p. e s.c. foram injetadas em um volume de 0,2 ml/100 g de peso corporal.

Nos procedimentos que envolveram ensaios bioquímicos foram utilizados dexametasona e O2050, um antagonista dos receptores canabinóides do tipo CB₁, ambos da Tocris, USA. WIN55212-2 e mifepristone foram adquiridos da AscentScientific (UK). HEPES, sacarose, ácido amino oxiacético mifepristone, pargilina, dimetilsulfóxido (DMSO) e a tetrahidrolipstatina (THL, orlistat) foram obtidos da Sigma (Saint Louis, MO, EUA). Os reagentes inorgânicos foram comprados da MerckBiosciences (Darmstadt, Alemanha). Todas as substâncias não solúveis em água foram alíquotadas e congeladas em várias concentrações sempre com uma diluição de 1:1000 (concentração final de DMSO 0,1%).

As doses das drogas utilizadas foram selecionadas baseadas em trabalhos prévios e estudos pilotos (Oitzl, Fluttert *et al.*, 1998; Rahmouni, Barthelmebs *et al.*, 2001; Van Acker, Fluttert *et al.*, 2001; Yang, Chao *et al.*, 2006; Yang, Chao *et al.*, 2007; Bitencourt, Pamplona *et al.*, 2008).

3.3 – Cirurgia estereotáxica

Os animais foram anestesiados com uma mistura de 1:1 de Cetamina (75 mg/kg) e xilazina (15 mg/kg) administradas num volume de 1,5 ml/kg via i.p. Após perda total dos reflexos, os animais foram colocados em um aparelho estereotáxico (Kopf, modelo 957), mantendo o Bregma e Lâmbda no mesmo plano horizontal. Em seguida fez-se a tricotomia na cabeça seguida da administração via s.c. de 0,2 ml de uma solução anestésica e vasoconstritora local (cloridrato de lidocaína 2% com norepinefrina 1:200.000, Lidocaína Geyer 2%, Brasil) e exposição da calota craniana por meio de uma incisão na pele, de aproximadamente 1,5 cm de diâmetro. O periósteo foi retirado e a calota craniana secada com H₂O₂ a 10%. Com o auxílio de uma broca ortodôntica (n° 6) foram feitos dois furos na calota craniana para fixação de parafusos. Posteriormente, um terceiro furo foi feito para implantação de uma cânula guia no ventrículo lateral direito, sendo o posicionamento da mesma, calculado por meios de estimativas em relação ao Bregma (ponto de encontro entre as suturas sagital e lambdóide utilizado como referencial anatômico). As coordenadas utilizadas (AP= -0,8 mm; ML= -1,6 mm; e DV= -3,6 mm) tiveram como referências parâmetros do Atlas de ratos (Paxinos e Watson, 2002).

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

3.4 – Procedimento de infusão

Uma agulha injetora de 11 mm de comprimento e 0,3 mm de diâmetro foi fixada a cânula guia e a administração i.c.v. foi realizada

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

3.5 – Procedimentos comportamentais

Todos os experimentos comportamentais descritos a seguir foram registrados com a utilização de um sistema de vídeo-câmera, permitindo ao experimentador observar os animais por um monitor de vídeo posicionado em uma sala adjacente à sala do experimento. Os experimentos foram realizados entre o período das 9 às 16 h e a escolha dos animais para cada tratamento obedeceu a uma ordem aleatória.

3.5.1 – Condicionamento aversivo contextual

Os experimentos de CA contextual foram realizados em uma caixa de esquiva ativa modificada (Automatic Reflex Conditioner modelo 7531, Ugo Basile, Itália) dotada de chão gradeado conectado a um gerador de choques elétricos, devidamente configurados às condições experimentais. O mesmo compartimento da gaiola de condicionamento (22 x 22 x 25 cm) foi utilizado em todos os procedimentos experimentais (ver Fig. 5).



Figura 5 – Modelo representativo da caixa de esquiva ativa. Esta caixa foi modificada e utilizada nos experimentos do condicionamento aversivo contextual.

A sala de experimentação foi suavemente iluminada por uma luz vermelha, resultando em uma luminosidade ambiental de cerca de 10 Lux. O modelo de CA contextual utilizado neste trabalho foi baseado no modelo de Pavlov (Pavlov, 1927). Neste modelo, os animais foram colocados na gaiola de condicionamento e após 3 min receberam um choque elétrico nas patas. A duração e intensidade do choque foram de 1 s e 1,5 mA, respectivamente. Os animais permaneceram por mais um min. na gaiola de condicionamento antes de serem retirados e levados novamente ao biotério. O teste comportamental neste modelo consistiu em re-expor o animal à gaiola de condicionamento durante 3 sessões de 9 min com um intervalo de 24 h entre cada sessão, sendo as drogas, administradas antes de cada sessão (ver Fig. 6). Um teste adicional de 3 min, na ausência de drogas, foi realizado 24 h após a última sessão de extinção no intuito de verificar a persistência de um possível efeito sobre a extinção do CA. Quando re-expostos, os animais expressam respostas autonômicas e comportamentos defensivos, como congelamento, pilo-ereção, aumento da frequência cardíaca e liberação de corticotrofina (Blanchard e Blanchard, 1969; Fanselow, 1980). No presente estudo, o congelamento, definido por Blanchard e Blanchard (1969) como imobilidade em uma posição estereotipada de agachamento, com exceção dos movimentos necessários para a respiração, e caracterizado como um comportamento condicionado por Fanselow (1980), foi registrado e utilizado como índice de memória durante as sessões de re-exposição ao contexto na ausência do EI (choque).

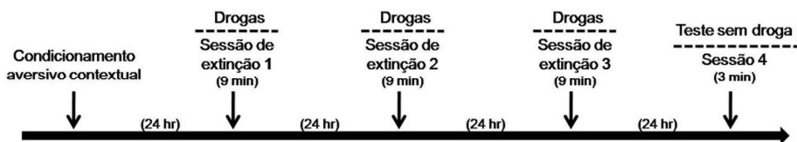


Figura 6 - Representação esquemática do procedimento realizado nos experimentos comportamentais.

3.5.1.1 – *Experimento 1: Efeitos da administração i.p. de dexametasona na extinção do CA contextual.*

Para este experimento os animais foram tratados com dexametasona (0,1; 0,5 ou 1,0 mg/kg, i.p.) ou solução controle 20 min. antes de cada sessão de extinção. Um teste de 3 min., na ausência de tratamento farmacológico, foi realizado 24 h após a última sessão de extinção para investigar se os efeitos das drogas na extinção de memórias aversivas foram agudos (ex. dependente da droga) ou persistentes (ver esquema na Fig. 6).

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

De maneira similar ao experimento anterior, sucessivas exposições à caixa de condicionamento foram desta vez utilizadas para testar os efeitos da dexametasona injetada i.c.v. previamente a sessão de extinção do CA contextual. O tratamento i.c.v. foi escolhido como uma alternativa ao tratamento i.p. no intuito de confirmar se eventuais efeitos da dexametasona seriam mesmo mediados pelo sistema nervoso central. O procedimento foi o mesmo utilizado no experimento 1, com a diferença de que neste experimento os animais foram tratados com dexametasona (0,1; 0,5 ou 1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, i.c.v.) ou solução controle 5 min. antes de cada sessão de extinção (ver esquema na Fig. 6).

3.5.1.3 – *Experimento 3: Participação dos receptores canabinóides CB₁ nos efeitos da dexametasona i.c.v.*

Este experimento foi realizado para investigar se possíveis efeitos da dexametasona i.c.v. na extinção do CA contextual estavam relacionados à ativação dos receptores canabinóides CB₁. Neste procedimento (ver esquema na Fig. 6) os animais foram pré-tratados i.p.

com um antagonista dos receptores CB₁ SR141716A (0,2 mg/kg) ou solução controle 20 min. antes de cada injeção de dexametasona (0,5 µg/µl) que, por sua vez, foi administrado i.c.v. 5 min. antes de cada sessão de extinção.

3.5.1.4 – *Experimento 4: Influência da inibição da síntese de glicocorticóides endógenos sobre os efeitos facilitatórios já conhecidos do AM404 sobre a extinção do CA contextual.*

Este experimento foi realizado para investigar se os efeitos já conhecidos de um inibidor da recaptação e degradação de eCB, o AM404, sobre a extinção do CA contextual (Bitencourt, Pamplona *et al.*, 2008), estariam relacionados à síntese de glicocorticóides endógenos. Neste procedimento (ver esquema na Fig. 6) os animais foram pré-tratados s.c. com um inibidor da síntese de glicocorticóides, a metirapona (25 mg/kg), ou solução controle, 90 min. antes de cada injeção de AM404 (1,0 µg/µl) que, por sua vez, foi administrado i.c.v. 5 min. antes de cada sessão de extinção.

3.5.1.5 – *Experimento 5: Influência da inibição da síntese de glicocorticóides endógenos nos efeitos facilitatórios já conhecidos do agonista canabinóide WIN55212-2 sobre a extinção do CA contextual.*

De forma semelhante ao experimento anterior este protocolo foi realizado para investigar se os efeitos já conhecidos do WIN sobre a extinção do CA contextual (Pamplona, Prediger *et al.*, 2006; Pamplona, Bitencourt *et al.*, 2008), estariam relacionados à síntese de glicocorticóides endógenos. Neste procedimento (ver esquema na Fig. 6) os animais foram pré-tratados s.c. com um inibidor da síntese de glicocorticóides, a metirapona (25 mg/kg) ou solução controle 90 min. antes de cada injeção de WIN (0,1 µg/µl) que, por sua vez, foi administrado i.c.v. 5 min antes de cada sessão de extinção. A dose efetiva de 0,1 µg/µl (i.c.v.) foi obtida a partir de um estudo piloto que avaliou uma curva dose resposta do agonista canabinóide WIN (ver resultado no apêndice N° 1).

3.5.1.6 – *Experimento 6: Participação dos receptores glicocorticóides nos efeitos da dexametasona.*

Com o intuito de investigar se os efeitos da dexametasona i.c.v. na extinção do CA contextual estariam relacionados à ativação dos receptores glicocorticóides (GR) conduzimos este experimento. Neste procedimento (ver esquema na Fig. 6), os animais foram pré-tratados i.p. com um antagonista dos receptores glicocorticóides, o mifepristona (100 ng/μl) ou solução controle 5 min. antes de cada injeção de dexametasona (1,0 μg/μl) que, por sua vez, foi administrado i.c.v. 5 min. antes de cada sessão de extinção.

3.5.1.7 – *Experimento 7: Participação dos receptores glicocorticóides nos efeitos do AM404.*

De maneira similar ao experimento anterior, o envolvimento dos receptores glicocorticóides foi desta vez investigado nos efeitos do AM404 sobre a extinção do CA contextual. Neste procedimento (ver esquema na Fig. 6), os animais foram pré-tratados i.c.v. com mifepristona (100 ng/μl) ou solução controle 5 min. antes de cada injeção de AM404 (1,0 μg/μl; i.c.v.). Passados 5 min. deste tratamento, os animais foram submetidos às respectivas sessões de extinção.

3.5.1.8 – *Experimento 8: Participação dos receptores mineralocorticóides nos efeitos da dexametasona.*

Este experimento foi realizado para investigar se os possíveis efeitos da dexametasona na extinção do CA contextual estavam relacionados à ativação dos receptores mineralocorticóides. Neste procedimento, os animais foram pré-tratados i.c.v. com um antagonista dos receptores mineralocorticóides, a espironolactona (100 ng/μl), ou solução controle 5 min. antes de cada injeção de dexametasona (1,0 μg/μl) que, por sua vez, foi da mesma forma administrada 5 min. antes de cada sessão de extinção.

3.5.1.9 – *Experimento 9: Participação dos receptores mineralocorticóides nos efeitos do AM404.*

Da mesma forma que no experimento anterior, o envolvimento dos receptores mineralocorticóides foi desta vez investigado nos efeitos

do AM404. Neste procedimento os animais foram pré-tratados i.c.v. com a espironolactona (100 ng/ μ l), ou solução controle e, 5 min. após, foram da mesma forma administrados com AM404 (1,0 μ g/ μ l). Cada sessão de extinção foi conduzida 5 min. após este tratamento.

3.6 – Procedimentos bioquímicos

3.6.1 – Experimento 10: Liberação de GABA e glutamato em sinaptossomas e fatias da região cortical do cérebro de ratos

Os experimentos em sinaptossomas e fatias foram conduzidos como descrito anteriormente (Kofalvi, Rodrigues *et al.*, 2005; Kofalvi, Pereira *et al.*, 2007). O córtex frontal e somatosensorial foram rapidamente removidos de acordo com o atlas de ratos (Paxinos e Watson, 2002). Para os experimentos em sinaptossomas, os tecidos foram recolhidos e colocados em 2 ml de solução de sacarose gelada (0,32 M, contendo 5 mM de HEPES, pH 7,4), homogeneizados instantaneamente e centrifugados a 5000 g por 5 min. Após, o sobrenadante formado foi mais uma vez centrifugado a 13000 g por 10 min. para se obter a fração sinaptossomal P2. Esta fração foi armazenada em gelo até ser utilizada dentro de 15 min. As fatias foram obtidas através de um fatiador de tecidos McIlwain em 450 μ m de espessura e equilibradas durante 60 min. à temperatura ambiente sob gaseificação com O₂ a 95% e CO₂ a 5% em tampão de bicarbonato de Krebs com ou sem tetrahidrolipstatina (THL 1 μ M). O tampão de Krebs utilizado ao longo do estudo teve a seguinte composição (em mM): NaCl 113; KCl 3; KH₂PO₄ 1,2; MgSO₄ 1,2; CaCl₂ 2,5; NaHCO₃ 25; glicose 10, HEPES 15, pH 7,4, 37 °C, e continha ainda glutamato descarboxilase e o inibidor da GABA transaminase, ácido amino óxiacético (100 μ M) para prevenir o metabolismo de [³H] GABA e [¹⁴C] glutamato.

Os sinaptossomas e as fatias foram incubados, respectivamente, em 0,5 e 1,0 ml de uma solução contendo [2,3-³H(N)]GABA (American Radiolabeled Chemicals, Inc, EUA; concentração final, 300 nM) e [¹⁴C]-U-glutamate (PerkinElmer, EUA; 20 μ M) por 10 min. Uma câmara de perfusão com 16 canais foi preenchida ao longo de todos os canais com os sinaptossomas que haviam sido previamente carregados e retidos nos filtros Whatman GF/C dispostos em cada canal. As fatias foram adicionadas manualmente, de duas em duas, ao longo dos filtros

dispostos em cada canal. Em seguida as preparações foram perfundidas continuamente a uma taxa de 0,8 ml/min à uma temperatura de 37°C até o final da experiência. Durante este processo de perfusão foram efetuados os tratamentos farmacológicos propostos, sendo estes feitos antes do segundo estímulo, para o experimento com sinaptossomas, e antes do primeiro (e único) estímulo, para os experimentos com fatias. As amostras foram colhidas em um líquido de cintilação a cada 2 min. Os filtros com sinaptossomas e fatias também foram colhidos a fim de se obter o teor de radioatividade total.

Depois de colhidas 4 amostras como linha basal, a liberação de neurotransmissores dos sinaptossomas foi estimulada duas vezes com 15 mM K⁺ com um intervalo de 10 min. entre cada estímulo. Antes do segundo estímulo se deu o tratamento farmacológico com dexametasona (0,1; 1,0; 10 e 30 µM) e WIN55212-2 (1 µM). Os experimentos com sinaptossomas foram feitos em duplicata. Já nos experimentos com fatias, foi feita uma única estimulação com 30 mM K⁺ por 5 min. O tratamento farmacológico com dexametasona (10 µM) + O2050 (0,5 mM), mifepristona (10 mM) ou THL (1 mM), foi realizado antes deste único estímulo. Neste experimento optamos por fazer um único estímulo porque os valores referentes a um estímulo foram muito mais consistentes quando comparados aos valores obtidos com dois estímulos. Os experimentos em fatias foram feitos em octuplicata. O conteúdo de [³H] de cada amostra foi contado utilizando um Tricarb β-counter (PerkinElmer) e os valores foram expressos como a fração de liberação (FR%), ou seja, o percentual de conteúdo no efluente em relação ao conteúdo total no sinaptossomas e nas fatias.

3.6.2 – *Experimento 11: Imunohistoquímica para verificar as possibilidades neuroanatômicas de uma possível interação entre os sistemas eCB e glicocorticóides*

Fatias coronais do cérebro de ratos contendo o CPF e somatosensorial foram selecionadas para este experimento (Paxinos e Watson, 2002). Estas fatias foram bloqueadas em 10 % de albumina sérica de cabra (Vector Laboratories, CA, USA)/ 5 % BSA/ 0,3 % Triton X-100 por 40 min. e incubadas durante a noite em um coquetel que continha os seguintes anticorpos primários: anti-CB₁R (coelho; 1:1000; Abcam, UK); anti-GR monoclonal (camundongo; 1:250; Abcam, UK); e anti-VGLUT1 policlonal (cobaia; 1:200; Synaptic

System, Alemanha); ou anti-VGAT (cobaia; 1:200; Abcam, UK). As fatias foram então lavadas em tampão de fosfato (PB; 0,1M) e incubadas por duas horas com um coquetel contendo os seguintes anticorpos secundários conjugados com fluoróforo: DyLight 594 anti-coelho; DyLight 488 anti-camundongo; e DyLight 650 anti-cobaia (todos na concentração de 1:200; Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc, EUA). Após a lavagem com PB 0,1M, as fatias foram montadas em lâminas utilizando Vectashield Hardest Mounting Medium (Vector Laboratories). Imagens de baixa ampliação foram tiradas em um microscópio Zeiss Axiovert 200M equipado com AxioVision software. Imagens confocais foram tiradas utilizando um microscópio confocal modelo Zeiss LSM510META.

Antes de captar tais imagens foram feitos testes para eliminar a possibilidade de auto-fluorescência em lâminas com fatias controles sem o tratamento de anticorpos primários.

3.7 – Perfusão e histologia

Após a realização dos experimentos que fizeram uso de microinjeções cerebrais, os animais foram profundamente anestesiados com hidrato de cloral e perfundidos transcardiacamente com solução fisiológica (NaCl 0,9 %) seguida de formaldeído a 10% para fixação dos tecidos. Ao término da perfusão, 5 µl de corante azul de Evans (0,1 %) foram injetados pelas cânulas guias. Posteriormente à injeção do corante, os cérebros foram removidos e fixados em formaldeído 10 % por 24 h. Passadas as 24 h, com o auxílio de uma lâmina de bisturi, foram feitos cortes coronais nos locais de implante das cânulas para verificar o posicionamento correto das mesmas. Os acertos foram visualizados, sem o auxílio de qualquer equipamento de aumento, como um preenchimento completo do ventrículo lateral direito pelo corante administrado. Eventuais erros no posicionamento das cânulas implicaram em desconsideração dos resultados obtidos.

3.8 – Análise gráfica e estatística

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.). A confecção dos gráficos foi feita utilizando-se o programa Graph Pad Prism[®] 4.0 (Graph Pad Software, San Diego, CA, EUA). As

análises estatísticas foram feitas no programa Statistica[®] para Windows 6.0 (Statsoft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA).

A análise de variância para medidas repetidas seguidas de teste post hoc Newman-Keuls foi utilizada para detectar diferenças na porcentagem do tempo de congelamento durante as sessões de extinção entre os grupos farmacológicos, tratados sistemicamente ou microinjetados no ventrículo.

Nos resultados referentes aos experimentos do teste sem droga (sessão 4) realizados para demonstrar os efeitos persistentes ou não das drogas testadas sobre a extinção do CA contextual foi usada ANOVA de uma ou duas vias, com pré-tratamento e tratamento como variáveis independentes seguido pelo teste post hoc de Newman-Keuls.

Em relação aos resultados de liberação em sinaptossomas e fatias todos os dados representam a média \pm EPM de 4 animais em duplicata ou octuplicata. Os dados obtidos a partir dos tratamentos foram normalizados para o veículo controle de cada experimento. Estes dados foram normalizados utilizando os testes de normalidade D'Agostino & Pearson, Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov. Caso os dados sugerissem uma distribuição Gausiana, a significância estatística era calculada utilizando Teste-t para amostra simples. Quando mais de um teste ficava fora da normalidade, era feito teste de Wilcoxon contra um valor hipotético de 100.

O nível de significância considerado para todos os testes foi $p < 0,05$.

4 – RESULTADOS

4.1 – Condicionamento aversivo contextual

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

4.1.1 – *Experimento 1: Efeitos da administração i.p. de dexametasona na extinção do CA contextual.*

A representação esquemática do procedimento utilizado neste experimento encontra-se ilustrado na figura 7A. Os efeitos da dexametasona (0,1; 0,5 ou 1,0 mg/kg i.p.) sobre extinção do CA contextual estão representados nas figuras 7B e 7C. O teste de análise de variância com medidas repetidas para os resultados da administração de dexametasona i.p. nas três sessões de extinção revelou efeito significativo para os fatores tratamento [$F_{(3,36)} = 7,73$; $p < 0,0005$], sessão de extinção [$F_{(2,72)} = 92,48$; $p < 0,0001$] e para a interação entre estes fatores [$F_{(6,72)} = 3,34$; $p < 0,01$] em relação ao parâmetro porcentagem do tempo de congelamento nos grupos tratados com injeções repetidas de dexametasona i.p. ou solução controle antes do início de cada sessão de extinção do CA contextual (Fig. 7B).

Conforme ilustrado na figura 7B, a análise subsequente utilizando o teste *post hoc* de Newman-Keuls demonstrou que o protocolo de extinção utilizado com três re-exposições (sessões) causou uma diminuição na porcentagem do tempo de congelamento através das sucessivas exposições do grupo controle à gaiola de condicionamento ($p < 0,05$; 3ª sessão comparada a 1ª). O grupo tratado com a maior dose de dexametasona (1,0 mg/kg, i.p.) obteve uma extinção parcial já na 2ª sessão ($p < 0,05$ comparada à 1ª sessão do mesmo grupo) e exibiu uma

diminuição na % do tempo de congelamento durante a 2ª e 3ª sessões comparadas às respectivas sessões do grupo controle ($p < 0,05$), sugerindo um efeito facilitatório sobre a extinção do CA contextual. Os grupos tratados com as duas menores doses de dexametasona (0,1 e 0,5 mg/kg) também obtiveram uma extinção parcial já na 2ª sessão ($p < 0,05$ comparada à 1ª sessão do mesmo grupo), porém, não exibiram diferenças estatísticas na % do tempo de congelamento durante a 2ª e 3ª sessões quando comparadas às respectivas sessões do grupo controle (Fig. 7B).

A fim de investigar se os efeitos da dexametasona i.p. na extinção de memórias aversivas foram agudos (ex. dependente da droga) ou persistentes, uma sessão adicional (sessão 4), na ausência de tratamento farmacológico, foi realizada 24 h após a última sessão de extinção. A ANOVA de uma via para estes dados revelou efeito significativo para o fator tratamento [$F_{(3,36)} = 3,13$; $p < 0,05$]. Uma análise posterior através do teste de Newman-Keuls mostrou que o grupo tratado com a maior dose de dexametasona (1,0 mg/kg, i.p.) apresentou uma diminuição na porcentagem do tempo de congelamento em relação à respectiva sessão do grupo controle ($p < 0,05$) (Fig. 7C).

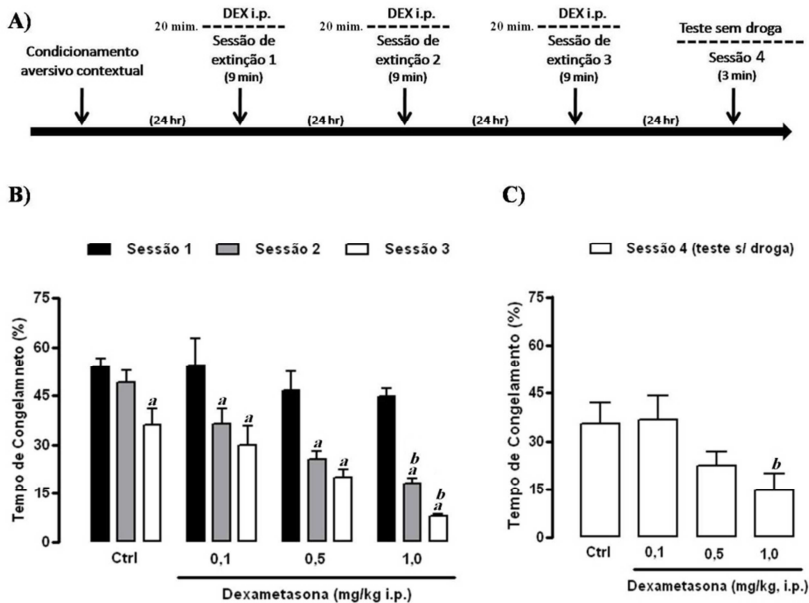


Figura 7 – Efeitos da administração i.p. do glicocorticoide sintético dexametasona (0,1; 0,5; 1,0 mg/kg) na extinção do CA contextual. (A) Representação esquemática do procedimento utilizado no experimento 1. (B) Média + E.P.M. da % de tempo de congelamento expressa pelos animais tratados com dexametasona i.p. e submetidos a 3 exposições de 9 min. à gaiola de condicionamento, com intervalo de 24 h (cada barra representa os dados de uma sessão). (C) Média + E.P.M. da % do tempo de congelamento expressa pelos mesmos grupos de animais durante uma única exposição de 3 min. à gaiola de condicionamento, na ausência de tratamento farmacológico, 24 h após a última sessão de extinção. (a) $p < 0,05$ comparado à primeira sessão do respectivo grupo. (b) $p < 0,05$ comparado à respectiva sessão do grupo controle (teste *post hoc* de Newman-Keuls). (Controle/ $n=10$, dexametasona 0,1/ $n=10$, dexametasona 0,5/ $n=10$, dexametasona 1,0/ $n=10$).

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

Os efeitos da dexametasona injetada i.c.v. sobre a extinção de memórias aversivas foram investigados utilizando o modelo do CA contextual da mesma forma como visto no experimento 1. A representação esquemática do procedimento utilizado no experimento 2 encontra-se ilustrado na figura 8A. Os efeitos da dexametasona (0,1; 0,5 ou 1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ i.c.v.) sobre extinção do CA contextual estão representados

nas figuras 8B e 8C. O teste de análise de variância com medidas repetidas para os resultados da administração de dexametasona i.c.v. nas três sessões de extinção revelou efeito significativo para os fatores tratamento [$F_{(3,32)} = 6,87$; $p < 0,005$], sessão de extinção [$F_{(2,64)} = 106,21$; $p < 0,00001$] e para a interação entre estes dois fatores [$F_{(6,64)} = 2,60$; $p < 0,05$]. A análise *post-hoc* destes dados demonstrou, de forma consistente com o experimento 1, que na 3ª sessão o grupo controle obteve uma extinção parcial do comportamento condicionado de congelamento quando comparada à 1ª sessão ($p < 0,05$). O tratamento com a menor dose de dexametasona ($0,1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ i.c.v.) não interferiu na % do tempo de congelamento apresentada pelos animais em relação ao grupo controle, embora tenha apresentado uma extinção parcial já na segunda sessão quando comparado a primeira sessão deste mesmo grupo. Já o grupo tratado com a dose intermediária de dexametasona ($0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ i.c.v.), além de obter uma extinção parcial já na segunda sessão ($p < 0,05$ comparada a 1ª sessão do mesmo grupo), exibiu também diferenças estatísticas na porcentagem do tempo de congelamento durante a 2ª e 3ª sessões quando comparadas as respectivas sessões do grupo controle ($p < 0,05$). O grupo tratado com a maior dose de dexametasona ($1,0 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ i.c.v.) voltou a apresentar um resultado semelhante ao observado com a administração da menor dose, ou seja, uma extinção parcial já na segunda sessão quando comparado com a primeira sessão deste mesmo grupo, porém não houve diferença em relação ao grupo controle. Este efeito facilitatório por parte da dose intermediária de dexametasona, também chamado de efeito em curva de “U” invertida, sugere, assim como no tratamento i.p., uma facilitação sobre a extinção do CA contextual por parte da dexametasona i.c.v. (Fig. 8B).

A ANOVA de uma via para os dados do teste sem droga (sessão 4) revelou um efeito significativo para o fator tratamento [$F_{(3,32)} = 7,93$; $p < 0,0005$]. O teste *post hoc* de Newman-Keuls mostrou uma diminuição na porcentagem do tempo de congelamento das duas maiores doses de dexametasona ($0,5$ e $1,0 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ i.c.v.) quando comparadas a respectiva sessão do grupo controle ($p < 0,05$) (Fig. 8C).

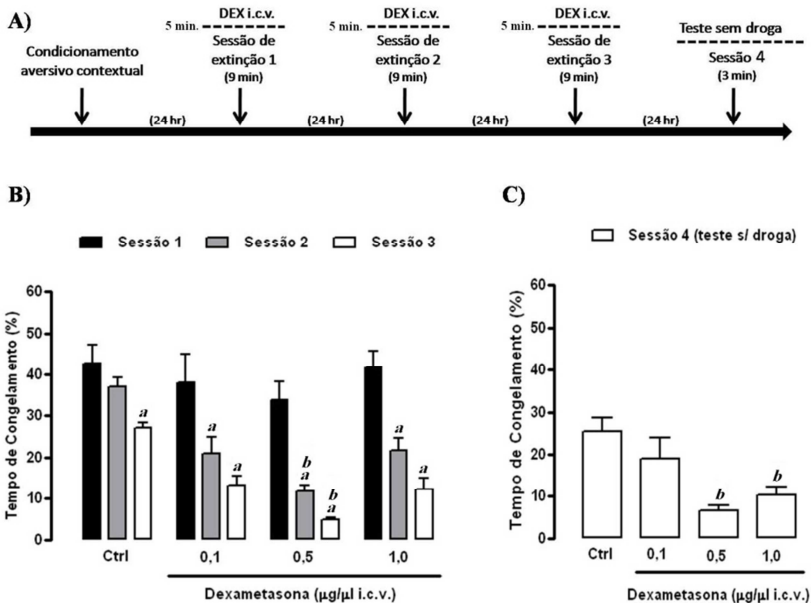


Figura 8 – Efeitos da administração i.c.v. do glicocorticoide sintético dexametasona (0,1; 0,5; 1,0 µg/µl) na extinção do CA contextual. (A) Representação esquemática do procedimento utilizado no experimento 2. (B) Média + E.P.M. da % de tempo de congelamento expressa pelos animais tratados com dexametasona i.c.v. e submetidos a 3 exposições de 9 min. à gaiola de condicionamento, com intervalo de 24 h (cada barra representa os dados de uma sessão). (C) Média + E.P.M. da % do tempo de congelamento expressa pelos mesmos grupos de animais durante uma única exposição de 3 min. à gaiola de condicionamento, na ausência de tratamento farmacológico, 24 h após a última sessão de extinção. (a) $p < 0,05$ comparado à primeira sessão do respectivo grupo. (b) $p < 0,05$ comparado à respectiva sessão do grupo controle (teste *post hoc* de Newman-Keuls). (Controle/n=8, dexametasona 0,1/n=8, dexametasona 0,5/n=9, dexametasona 1,0/n=11).

4.1.3 – Experimento 3: Participação dos receptores canabinóides CB₁ nos efeitos da dexametasona i.c.v.

A representação esquemática do procedimento experimental utilizado no experimento 3 encontra-se ilustrado na figura 9A. Os efeitos do pré-tratamento com um antagonista dos receptores canabinóides do tipo CB₁, o SR141716A (0,2 mg/kg, i.p.), e do tratamento com dexametasona (0,5 µg/µl, i.c.v.) sobre extinção do CA contextual estão representados nas figuras 9B e 9C. O teste de análise de

variância com medidas repetidas para os resultados da extinção do CA contextual revelou efeitos significativos para os fatores tratamento [$F_{(3,30)} = 12,28$; $p < 0,00005$], sessão de extinção [$F_{(2,60)} = 114,62$; $p < 0,00001$] e para a interação entre estes fatores [$F_{(6,60)} = 4,61$; $p < 0,001$]. A análise *post-hoc* destes dados demonstrou que o tratamento com dexametasona i.c.v. facilitou a extinção do CA contextual, reforçando os dados do experimento 2. Além disso, o tratamento com SR previamente à administração de dexametasona preveniu a ocorrência deste fenômeno ($p < 0,05$; 2ª e 3ª sessões comparadas ao grupo tratado com dexametasona) em uma dose que *per se* não exerceu influência sobre a extinção do CA contextual. Estes resultados evidenciam que a dexametasona facilita a extinção do CA contextual e que este efeito, de alguma forma, parece depender da ativação dos receptores canabinóides CB₁. Este resultado nos fornece os primeiros indícios da possibilidade de uma interação entre estes dois sistemas neste tipo de resposta (Fig. 9B).

A ANOVA de duas vias para o teste sem droga (sessão 4) revelou efeitos significativos para o fator tratamento [$F_{(1,30)} = 19,87$; $p < 0,0005$] e para a interação entre os fatores pré-tratamento x tratamento [$F_{(1,30)} = 15,21$; $p < 0,0005$]. O grupo tratado com dexametasona (0,5 µg/µl i.c.v.) apresentou uma diminuição na % do tempo de congelamento se comparado ao grupo controle ($p < 0,05$), confirmando mais uma vez os resultados obtidos no experimento 2. Além do mais, o SR antagonizou os efeitos facilitatórios provindos da administração de dexametasona, sendo que o grupo pré-tratado com SR e tratado com dexametasona mostrou um maior tempo de congelamento quando comparado ao grupo tratado apenas com dexametasona ($P < 0,05$) (Fig. 9C).

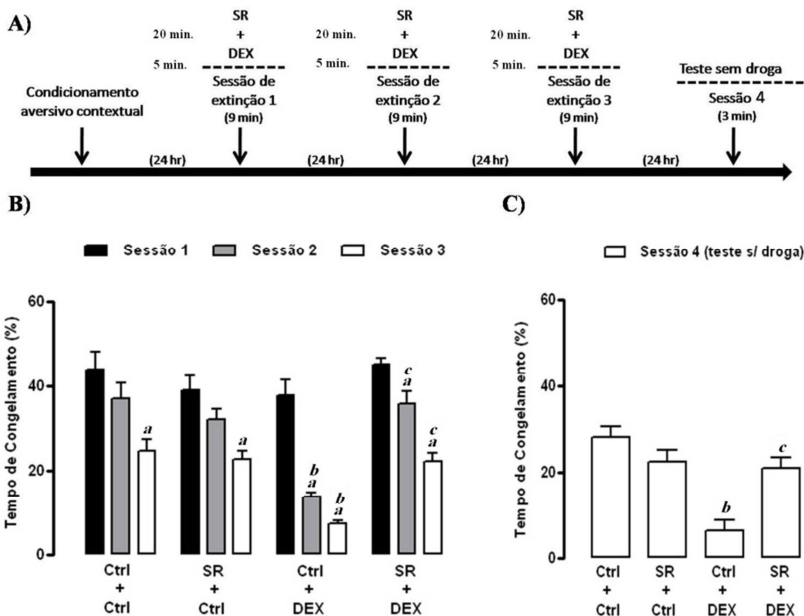


Figura 9 – Efeitos do antagonista dos receptores canabinóides CB₁ SR141716A (SR 0,2 mg/kg; i.p.) nos efeitos facilitatórios do glicocorticóide sintético dexametasona (DEX 0,5 µg/µl; i.c.v.) sobre a extinção do condicionamento aversivo contextual. (A) Representação esquemática do procedimento utilizado no experimento 3. (B) Média + E.P.M. da % de tempo de congelamento expressa pelos animais pré-tratados com SR e tratados com dexametasona e submetidos a 3 exposições de 9 min. à gaiola de condicionamento, com intervalo de 24 h (cada barra representa os dados de uma sessão). (C) Média + E.P.M. da % do tempo de congelamento expressa pelos mesmos grupos de animais durante uma única exposição de 3 min. à gaiola de condicionamento, na ausência de tratamento farmacológico, 24 h após a última sessão de extinção. (a) $p < 0,05$ comparado à primeira sessão do respectivo grupo. (b) $p < 0,05$ comparado à respectiva sessão do grupo controle. (c) $p < 0,05$ comparado à respectiva sessão do grupo Ctrl+DEX (teste *post hoc* de Newman-Keuls). (Ctrl+Ctrl/n=8, SR+Ctrl/n=8, Ctrl+DEX/n=9, SR+DEX/n=9).

4.1.4 – Experimento 4: Influência da inibição da síntese de glicocorticóides endógenos nos efeitos facilitatórios já conhecidos do AM404 sobre a extinção do CA contextual.

A representação esquemática do procedimento experimental utilizado no experimento 4 encontra-se ilustrado na figura 10A. Os efeitos do pré-tratamento com um inibidor da síntese de glicocorticóides

endógenos, a metirapona (25 mg/kg, s.c.), e do tratamento com AM404 (1,0 µg/µl, i.c.v.) sobre a extinção do CA contextual estão representados nas figuras 10B e 10C. O teste de análise de variância com medidas repetidas para estes resultados revelou efeitos significativos para os fatores tratamento [$F_{(3,39)}=6,85$; $p < 0,001$], sessão de extinção [$F_{(2,78)}=109,48$; $p < 0,00001$] e para interação entre estes fatores [$F_{(6,78)}=13,46$; $p < 0,00001$]. A análise *post-hoc* destes dados demonstrou que os animais do grupo pré-tratado com solução controle e tratados com AM404 (1,0 µg/µl, i.c.v.) tiveram uma diminuição no tempo de congelamento já na segunda sessão quando comparada a primeira sessão deste mesmo grupo e também mostraram uma redução neste tempo na segunda e terceira sessão quando comparadas as respectivas sessões do grupo controle ($p < 0,05$). Estes resultados apenas confirmam resultados prévios do nosso grupo onde o AM404 já se mostrava como um facilitador do processo de extinção do CA contextual (Bitencourt, Pamplona *et al.*, 2008; Pamplona, Bitencourt *et al.*, 2008). Já o pré-tratamento com metirapona, em uma dose que não exerceu nenhum efeito *per se*, foi capaz de bloquear estes efeitos facilitatórios por parte do AM404. Sendo assim, temos suporte para afirmar que os efeitos do AM404 sobre a facilitação da extinção de memórias aversivas parecem depender da síntese de glicocorticóides endógenos. Este dado reforça ainda mais a possibilidade de interação entre glicocorticóides e eCB neste tipo de processo (Fig. 10B).

A ANOVA de duas vias para o teste sem droga (sessão 4) revelou efeito significativo para os fatores tratamento [$F_{(1,39)}=38,54$; $p < 0,00001$], pré-tratamento [$F_{(1,39)}=17,05$; $p < 0,001$] e interação entre esses dois fatores [$F_{(1,39)}=11,79$; $p < 0,005$]. O teste *post hoc* apenas confirmou no teste sem droga o que já havia sido observado durante as sessões de extinção, ou seja, os animais que haviam sido tratados com AM404 continuavam mantendo uma diminuição no tempo de congelamento assim como os animais previamente tratados com metirapona continuavam a apresentar um bloqueio desta resposta facilitatória (Fig. 10C).

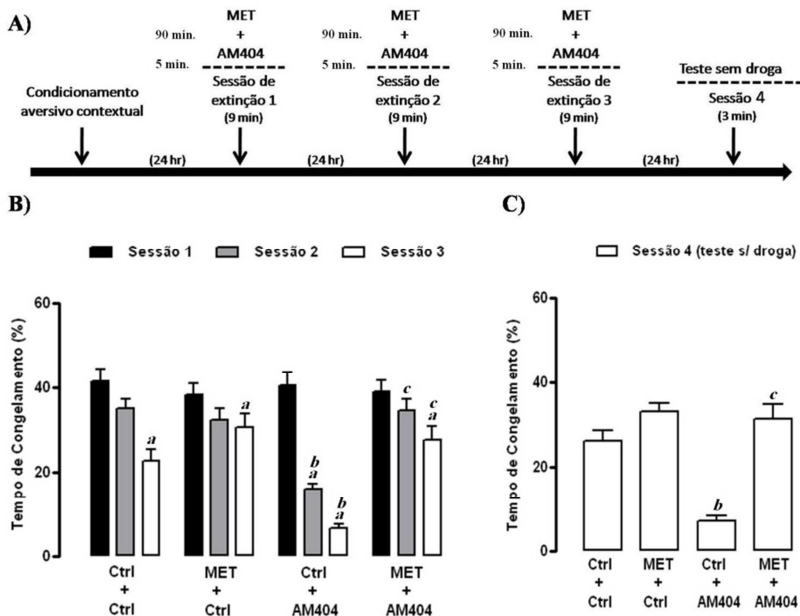


Figura 10 – Efeitos de um inibidor da síntese de corticosteróides, metirapona (MET 25 mg/kg; s.c.), nos efeitos facilitatórios do inibidor da recaptação e degradação de eCB, o AM404 (1,0 µg/µl; i.c.v.), sobre a extinção do condicionamento aversivo contextual. (A) Representação esquemática do procedimento utilizado no experimento 3. (B) Média + E.P.M. da % de tempo de congelamento expressa pelos animais pré-tratados com metirapona e tratados com AM404 e submetidos a 3 exposições de 9 min. à gaiola de condicionamento, com intervalo de 24 h (cada barra representa os dados de uma sessão). (C) Média + E.P.M. da % do tempo de congelamento expressa pelos mesmos grupos de animais durante uma única exposição de 3 min. à gaiola de condicionamento, na ausência de tratamento farmacológico, 24 h após a última sessão de extinção. (a) $p < 0,05$ comparado à primeira sessão do respectivo grupo. (b) $p < 0,05$ comparado à respectiva sessão do grupo controle. (c) $p < 0,05$ comparado a respectiva sessão do grupo Ctrl+AM404 (teste *post hoc* de Newman-Keuls). (Ctrl+Ctrl/n=12, MET+Ctrl/n=11, Ctrl+AM404/n=10, MET+AM404/n=10).

4.1.5 – Experimento 5: Influência da inibição da síntese de glicocorticóides nos efeitos facilitatórios já conhecidos do agonista canabinoide WIN55212-2 sobre a extinção do CA contextual.

Desta vez o inibidor da síntese de glicocorticóides endógenos, a metirapona, foi administrado previamente ao tratamento com o agonista

canabinóide WIN com a mesma finalidade do experimento anterior, ou seja, analisar a importância da síntese destes hormônios para os efeitos de um agonista canabinóide direto, sobre a extinção do CA contextual. A representação esquemática do procedimento experimental utilizado no experimento 5 encontra-se ilustrado na figura 11A. Os efeitos do pré-tratamento com metirapona (25 mg/kg, s.c.) e do tratamento com WIN (0,1 µg/µl, i.c.v.) sobre a extinção do CA contextual estão representados nas figuras 11B e 11C. O teste de análise de variância com medidas repetidas para estes resultados revelou efeitos significativos para os fatores tratamento [$F_{(3,32)}=13,46$; $p < 0,00001$] e sessão de extinção [$F_{(2,64)}=21,78$; $p < 0,00001$]. Esta análise não revelou efeitos para a interação entre os fatores tratamento e sessão de extinção, porém, a ausência de efeitos pode ser decorrente ao fato de que o agonista canabinóide foi capaz de induzir a facilitação da extinção já na primeira sessão. Como pode ser visto no apêndice número 2 desta tese, ao dividirmos a primeira sessão em blocos de 3 min. percebemos que os animais tratados com WIN diferem do grupo controle apenas nos segundo (3-6 min.) e terceiro (6-9 min.) blocos. Nesta última análise, inclusive, houveram efeitos significativos para a interação entre os fatores tratamento e sessão de extinção. Sendo assim, podemos dizer que há sim uma facilitação da extinção por parte do agonista canabinóide, contudo, esta facilitação ocorre de forma mais rápida, já na primeira sessão (ver apêndice 2). Resultados estes que confirmam estudos prévios do nosso grupo (Pamplona, Prediger *et al.*, 2006) os quais também mostraram que o WIN possui um efeito mais rápido sobre a extinção quando comparado ao AM404 (Pamplona, Bitencourt *et al.*, 2008). A análise *post hoc* destes dados confirmou a diminuição no tempo de congelamento observado pela administração da menor dose de WIN e mostrou não haver influência da síntese de corticosteróides neste resultado, visto que o pré-tratamento com metirapona não bloqueou este efeito facilitatório por parte do agonista canabinóide. Assim, podemos concluir que os agonistas canabinóides, ao agirem de forma direta nos seus respectivos receptores, não necessitariam da liberação de glicocorticóides para que exercessem seus efeitos facilitatórios sobre a extinção do CA contextual (Fig. 11B).

A ANOVA de duas vias para o teste sem droga (sessão 4) revelou efeito significativo para o fator tratamento [$F_{(1,33)}=74,16$; $p < 0,00001$]. O teste *post hoc* apenas confirmou no teste sem droga o que já havia sido observado durante as sessões de extinção, ou seja, os animais

que haviam sido tratados com WIN, independente de terem sido pré-tratados com metirapona ou solução controle, continuavam mantendo uma diminuição no tempo de congelamento em relação aos animais do grupo controle ($p < 0,05$) (Fig. 11C).

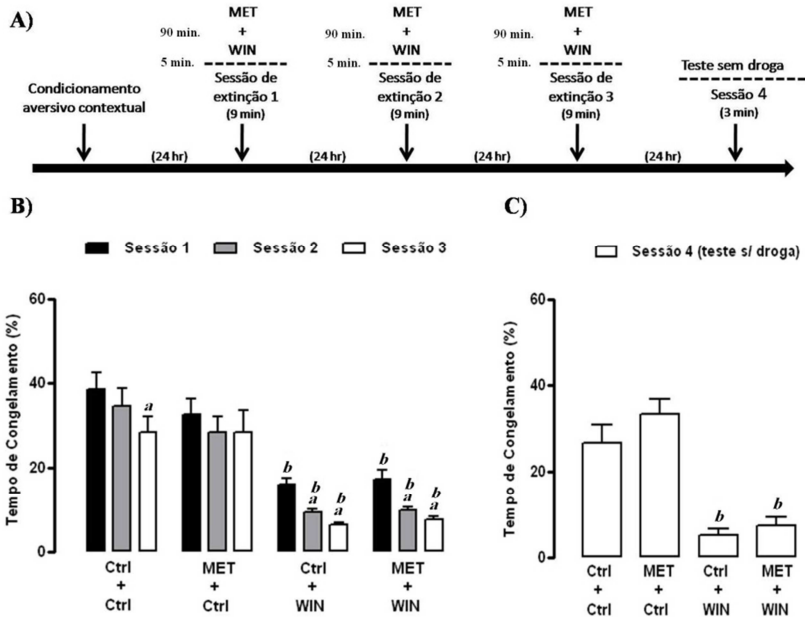


Figura 11 – Efeitos de um inibidor da síntese de corticosteróides, metirapona (MET 25 mg/kg; s.c.), nos efeitos facilitatórios do agonista canabinóide dos receptores CB_1 , WIN55212-2 (WIN 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; i.c.v.), sobre a extinção do condicionamento aversivo contextual. (A) Representação esquemática do procedimento utilizado no experimento 5. (B) Média + E.P.M. da % de tempo de congelamento expressa pelos animais pré-tratados com metirapona e tratados com WIN e submetidos a 3 exposições de 9 min. à gaiola de condicionamento, com intervalo de 24 h (cada barra representa os dados de uma sessão). (C) Média + E.P.M. da % do tempo de congelamento expressa pelos mesmos grupos de animais durante uma única exposição de 3 min. à gaiola de condicionamento, na ausência de tratamento farmacológico, 24 h após a última sessão de extinção. (a) $p < 0,05$ comparado à primeira sessão do respectivo grupo. (b) $p < 0,05$ comparado à respectiva sessão do grupo controle (teste *post hoc* de Newman-Keuls). (Ctrl+Ctrl/n=8, MET+Ctrl/n=9, Ctrl+WIN/n=10, MET+WIN/n=10).

4.1.6 – Experimento 6: Participação dos receptores glicocorticóides nos efeitos da dexametasona.

A representação esquemática do procedimento experimental utilizado no experimento 6 encontra-se ilustrado na figura 12A. Os efeitos do pré-tratamento com um antagonista dos receptores glicocorticóides (GR), o mifepristone (100 ng/μl, i.c.v.), e do tratamento com dexametasona (1,0 μg/μl, i.c.v.) sobre extinção do CA contextual estão representados nas figuras 12B e 12C. O teste de análise de variância com medidas repetidas para os resultados da extinção do CA contextual revelou efeitos significativos para os fatores tratamento [$F_{(3,28)} = 9,08$; $p < 0,0005$], sessão de extinção [$F_{(2,56)} = 58,49$; $p < 0,00001$] e para a interação entre estes fatores [$F_{(6,56)} = 4,48$; $p < 0,001$]. A análise *post-hoc* destes dados demonstrou que o tratamento com dexametasona i.c.v. facilitou a extinção do CA contextual. Em contrapartida, o tratamento com mifepristone previamente à administração de dexametasona preveniu a ocorrência deste fenômeno ($p < 0,05$; 2ª e 3ª sessões comparadas ao grupo tratado com dexametasona) em uma dose que *per se* não exerceu influência sobre a extinção do CA contextual. Estes resultados reafirmam a capacidade da dexametasona em facilitar a extinção do CA contextual e nos mostram que este efeito depende da ativação dos receptores glicocorticóides (GR) (Fig. 12B).

A ANOVA de duas vias para o teste sem droga (sessão 4) revelou efeitos significativos para o fator tratamento [$F_{(1,28)} = 7,25$; $p < 0,05$], para o fator pré-tratamento [$F_{(1,28)} = 15,45$; $p < 0,0005$] e para a interação entre estes fatores [$F_{(1,28)} = 10,19$; $p < 0,005$]. O grupo tratado com dexametasona (0,5 μg/μl i.c.v.) apresentou uma diminuição na % do tempo de congelamento se comparado ao grupo controle ($p < 0,05$) e este efeito foi bloqueado pelo pré-tratamento com o antagonista glicocorticóide (GR) mifepristone ($P < 0,05$). Estes resultados, obtidos no teste sem droga confirmam os resultados obtidos durante as sessões de extinção (Fig. 12C).

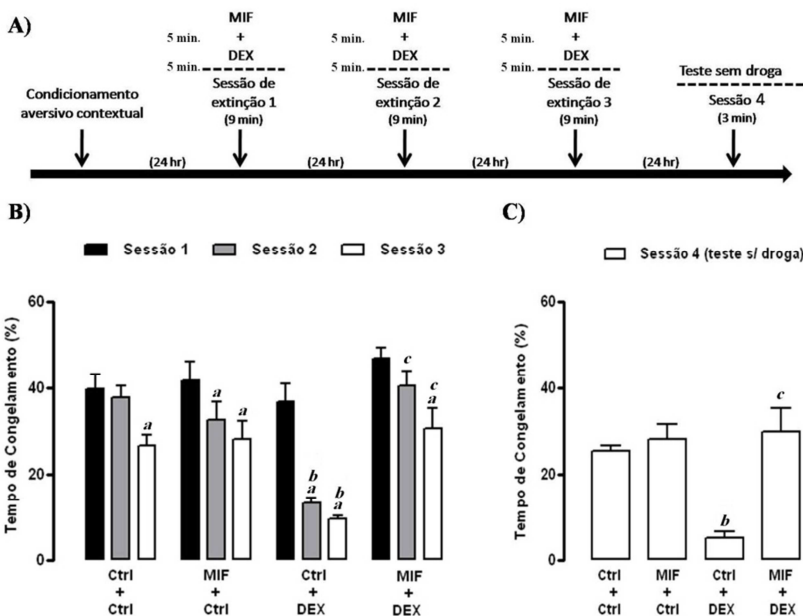


Figura 12 – Efeitos de um antagonista dos receptores glicocorticóides (GR), o mifepristone (MIF 100 ng/ μ l; i.c.v.), nos efeitos facilitatórios do glicocorticóide sintético dexametasona (DEX 0,5 μ g/ μ l; i.c.v.) sobre a extinção do condicionamento aversivo contextual. (A) Representação esquemática do procedimento utilizado no experimento 3. (B) Média + E.P.M. da % de tempo de congelamento expressa pelos animais pré-tratados com mifepristone e tratados com dexametasona e submetidos a 3 exposições de 9 min. à gaiola de condicionamento, com intervalo de 24 h (cada barra representa os dados de uma sessão). (C) Média + E.P.M. da % do tempo de congelamento expressa pelos mesmos grupos de animais durante uma única exposição de 3 min. à gaiola de condicionamento, na ausência de tratamento farmacológico, 24 h após a última sessão de extinção. (a) $p < 0,05$ comparado à primeira sessão do respectivo grupo. (b) $p < 0,05$ comparado à respectiva sessão do grupo controle. (c) $p < 0,05$ comparado a respectiva sessão do grupo Ctrl+DEX (teste *post hoc* de Newman-Keuls). (Ctrl+Ctrl/n=8, MIF+Ctrl/n=8, Ctrl+DEX/n=8, MIF+DEX/n=8).

4.1.7 – Experimento 7: Participação dos receptores glicocorticóides nos efeitos do AM404.

O pré-tratamento com mifepristone (100 ng/ μ l, i.c.v.) desta vez foi conduzido para analisar uma possível influência da ativação dos receptores glicocorticóides (GR) nos efeitos facilitatórios sobre a

extinção do CA por parte do AM404. A representação esquemática do procedimento experimental utilizado no experimento 7 encontra-se ilustrado na figura 13A. Os resultados deste experimento estão representados nas figuras 13B e 13C. O teste de análise de variância com medidas repetidas para estes resultados revelou efeitos significativos para os fatores tratamento [$F_{(3,28)}=7,33$; $p < 0,001$], sessão de extinção [$F_{(2,56)}=96,21$; $p < 0,00001$] e para interação entre estes fatores [$F_{(6,56)}=7,15$; $p < 0,00001$]. A análise *post-hoc* destes dados demonstrou que o tratamento com AM404 mais uma vez foi capaz de facilitar a extinção do CA contextual. De maneira interessante, o pré-tratamento com mifepristone, em uma dose que *per se* mostrou-se ineficaz, foi capaz de prevenir a ocorrência deste fenômeno ($p < 0,05$; 2ª e 3ª sessões comparadas ao grupo tratado com AM404). Estes resultados reforçam uma interação entre glicocorticóides e os eCB nos efeitos facilitatórios promovidos pelo AM404 (Fig. 13B).

A ANOVA de duas vias para o teste sem drogas (sessão 4) revelou efeitos significativos para os fatores tratamento [$F_{(1,28)}=18,96$; $p < 0,0005$], para o fator pré-tratamento [$F_{(1,28)}=21,12$; $p < 0,0001$] e para a interação entre estes fatores [$F_{(1,28)}=12,11$; $p < 0,005$]. O grupo pré-tratado com solução controle e tratado com AM404 durante as sessões de extinção (1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ i.c.v.) apresentou, no teste sem droga, uma diminuição na % do tempo de congelamento quando comparado ao grupo controle ($p < 0,05$). Já quando o tratamento com AM404 foi subsequente ao pré-tratamento com mifepristone, os efeitos facilitatórios anteriormente observados foram completamente bloqueados pelo antagonista em questão ($p < 0,05$ quando comparado ao grupo Ctrl+AM404). Estes resultados reforçam aqueles obtidos durante as sessões de extinção (Fig. 13C).

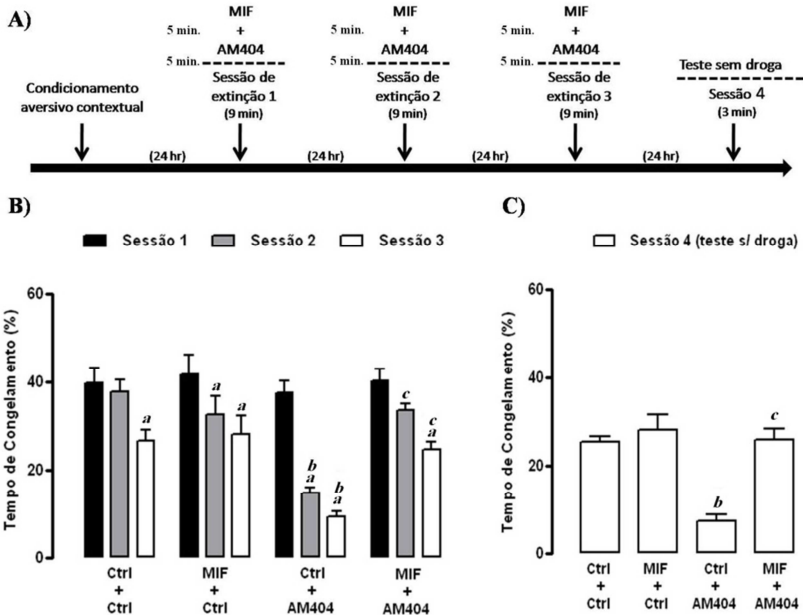


Figura 13 – Efeitos de um antagonista dos receptores glicocorticóides (GR), o mifepristone (MIF 100 ng/μl; i.c.v.), nos efeitos facilitatórios de um inibidor da recaptação e degradação de eCB, o AM404 (1,0 μg/μl; i.c.v.), sobre a extinção do condicionamento aversivo contextual. (A) Representação esquemática do procedimento utilizado no experimento 3. (B) Média + E.P.M. da % de tempo de congelamento expressa pelos animais pré-tratados com mifepristone e tratados com AM404 e submetidos a 3 exposições de 9 min. à gaiola de condicionamento, com intervalo de 24 h (cada barra representa os dados de uma sessão). (C) Média + E.P.M. da % do tempo de congelamento expressa pelos mesmos grupos de animais durante uma única exposição de 3 min. à gaiola de condicionamento, na ausência de tratamento farmacológico, 24 h após a última sessão de extinção. (a) $p < 0,05$ comparado à primeira sessão do respectivo grupo. (b) $p < 0,05$ comparado à respectiva sessão do grupo controle. (c) $p < 0,05$ comparado a respectiva sessão do grupo Ctrl+AM404 (teste *post hoc* de Newman-Keuls). (Ctrl+Ctrl/n=8, MIF+Ctrl/n=8, Ctrl+AM404/n=8, MIF+AM404/n=8).

4.1.8 – Experimento 8: Participação dos receptores mineralocorticóides nos efeitos da dexametasona.

A representação esquemática do procedimento experimental utilizado no experimento 8 encontra-se ilustrado na figura 14A. Os efeitos do pré-tratamento com um antagonista dos receptores

mineralocorticóides (MR), a espironolactona (100 ng/μl, i.c.v.), e do tratamento com dexametasona (0,5 μg/μl, i.c.v.) sobre a extinção do CA contextual estão representados nas figuras 14B e 14C. O teste de análise de variância com medidas repetidas para estes resultados revelou efeitos significativos para os fatores tratamento [$F_{(3,30)} = 13,67$; $p < 0,00001$], sessão de extinção [$F_{(2,60)} = 142,21$; $p < 0,00001$] e para interação entre estes fatores [$F_{(6,60)} = 4,84$; $p < 0,0005$]. A análise *post-hoc* destes dados demonstrou que o tratamento com dexametasona facilitou a extinção do CA contextual sem que o pré-tratamento com espironolactona antagonizasse este efeito. Ao que parecem, os efeitos facilitatórios da dexametasona sobre a extinção do CA não estão relacionados à ativação dos receptores mineralocorticóides (Fig. 14B).

A ANOVA de duas vias para o teste sem droga (sessão 4) revelou efeito significativo para o fator tratamento [$F_{(1,30)} = 88,06$; $p < 0,00001$]. Os animais tratados com dexametasona (0,5 μg/μl, i.c.v.), mesmo aqueles que receberam o pré-tratamento com espironolactona, continuaram apresentando uma diminuição na % do tempo de congelamento quando comparado ao grupo controle ($p < 0,05$) (Fig. 14C).

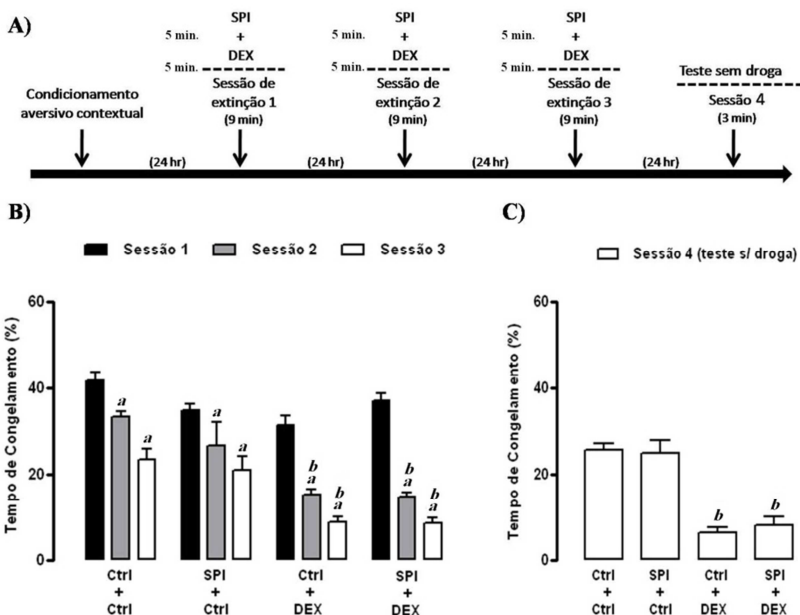


Figura 14 – Efeitos de um antagonista dos receptores mineralocorticóides (MR), a espironolactona (SPI 100 ng/μl; i.c.v.), nos efeitos facilitatórios de um agonista glicocorticóide sintético, a dexametasona (0,5 μg/μl; i.c.v.), sobre a extinção do condicionamento aversivo contextual. (A) Representação esquemática do procedimento utilizado no experimento 8. (B) Média + E.P.M. da % de tempo de congelamento expressa pelos animais pré-tratados com espironolactona e tratados com dexametasona e submetidos a 3 exposições de 9 min. à gaiola de condicionamento, com intervalo de 24 h (cada barra representa os dados de uma sessão). (C) Média + E.P.M. da % do tempo de congelamento expressa pelos mesmos grupos de animais durante uma única exposição de 3 min. à gaiola de condicionamento, na ausência de tratamento farmacológico, 24 h após a última sessão de extinção. (a) $p < 0,05$ comparado à primeira sessão do respectivo grupo. (b) $p < 0,05$ comparado à respectiva sessão do grupo controle. (teste *post hoc* de Newman-Keuls). (Ctrl+Ctrl/n=9, SPI+Ctrl/n=8, Ctrl+DEX/n=8, SPI+DEX/n=9).

4.1.9 – Experimento 9: Participação dos receptores mineralocorticóides nos efeitos do AM404.

Desta vez o antagonista dos receptores mineralocorticóides (MR) foi utilizado para analisar a participação destes receptores nos efeitos facilitatórios do AM404 sobre a extinção do CA contextual. A representação esquemática do procedimento experimental utilizado no

experimento 9 encontra-se ilustrado na figura 15A. Os efeitos do pré-tratamento com espironolactona (100 ng/ μ l, i.c.v.) e do tratamento com AM404 (1,0 μ g/ μ l, i.c.v.) sobre a extinção do CA contextual estão representados nas figuras 15B e 15C. O teste de análise de variância com medidas repetidas para estes resultados revelou efeitos significativos para os fatores tratamento [$F_{(3,30)} = 12,78$; $p < 0,00001$], sessão de extinção [$F_{(2,60)} = 119,98$; $p < 0,00001$] e para interação entre estes fatores [$F_{(6,60)} = 4,34$; $p < 0,0005$]. A análise *post-hoc* destes dados confirmou que o tratamento com AM404 facilita a extinção do CA contextual ($p < 0,05$), contudo o pré-tratamento com espironolactona, assim como ocorrido no experimento com dexametasona, não antagonizou este efeito. Ao que parecem, os efeitos facilitatórios do AM404 sobre a extinção do CA também não estão relacionados à ativação dos receptores mineralocorticóides (Fig. 15B).

A ANOVA de duas vias para o teste sem droga (sessão 4) revelou efeito significativo para o fator tratamento [$F_{(1,30)} = 90,42$; $p < 0,00001$]. Os animais tratados com AM404 (1,0 μ g/ μ l, i.c.v.) apresentaram uma diminuição na % do tempo de congelamento quando comparados ao grupo controle ($p < 0,05$), mesmo quando pré-tratados com o antagonista dos receptores mineralocorticóides espironolactona ($p < 0,05$) (Fig. 15C).

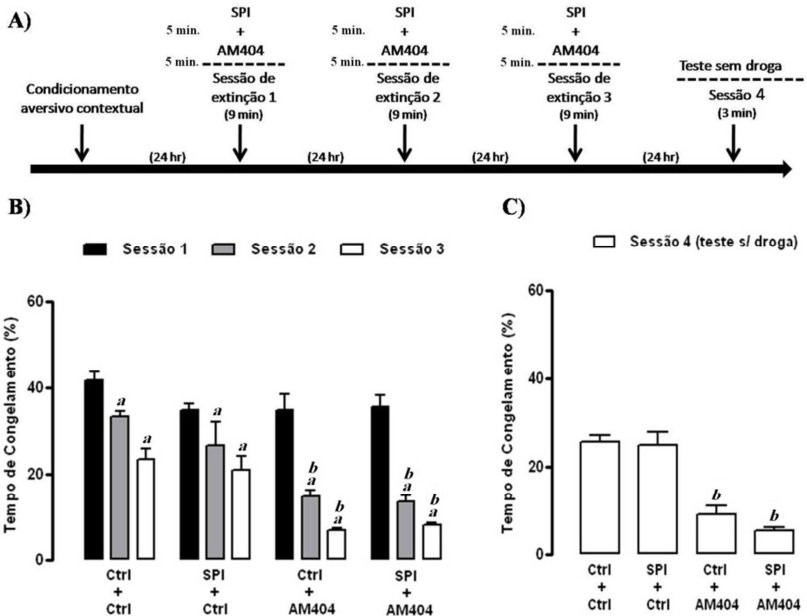


Figura 15 – Efeitos de um antagonista dos receptores mineralocorticóides (MR), a espironolactona (SPI 100 ng/μl; i.c.v.), nos efeitos facilitatórios do inibidor da recaptação e degradação de eCB, o AM404 (1,0 μg/μl; i.c.v.), sobre a extinção do condicionamento aversivo contextual. (A) Representação esquemática do procedimento utilizado no experimento 9. (B) Média + E.P.M. da % de tempo de congelamento expressa pelos animais pré-tratados com espironolactona e tratados com AM404 e submetidos a 3 exposições de 9 min. à gaiola de condicionamento, com intervalo de 24 h (cada barra representa os dados de uma sessão). (C) Média + E.P.M. da % do tempo de congelamento expressa pelos mesmos grupos de animais durante uma única exposição de 3 min. à gaiola de condicionamento, na ausência de tratamento farmacológico, 24 h após a última sessão de extinção. (a) $p < 0,05$ comparado à primeira sessão do respectivo grupo. (b) $p < 0,05$ comparado à respectiva sessão do grupo controle. (teste *post hoc* de Newman-Keuls). (Ctrl+Ctrl/n=9, SPI+Ctrl/n=8, Ctrl+AM404/n=9, SPI+AM404/n=8).

4.2 - Experimentos bioquímicos

4.2.1 – Experimento 10: Liberação de GABA e glutamato em sinaptossomas e fatias da região cortical do cérebro de ratos

Este experimento foi conduzido no intuito verificar se as interações entre eCB e glicocorticóides observadas nos resultados

referentes aos procedimentos comportamentais se refletiam também na liberação de GABA e glutamato em sinaptossomas e fatias obtidos a partir da região cortical do cérebro de ratos. Os resultados obtidos neste experimento encontram-se ilustrados nas figuras 16 e 17. Como podemos observar nos resultados referentes à liberação em sinaptossomas (Fig. 16), o agonista dos receptores CB₁, o WIN55212-2 (1 μM), foi capaz de inibir a liberação de ambos, GABA e glutamato ($p < 0,05$; teste-t comparado a um hipotético valor de 100%). Já o tratamento com o glicocorticóide sintético dexametasona mostrou-se ineficiente em alterar a liberação destes neurotransmissores em três das quatro doses testadas (0,1; 1,0 e 30 μM) ($p > 0,05$). O único efeito observado por parte da dexametasona neste experimento com sinaptossomas, e ainda sim um efeito bastante sutil, foi na dose de 10 μM. Nesta dose a dexametasona mostrou uma pequena diminuição na liberação de GABA ($p < 0,05$; teste-t comparado a um hipotético valor de 100%), mas não glutamato (Fig. 16 C e D).

LIBERAÇÃO DE GABA E GLUTAMATO EM SINAPTOSSOMAS

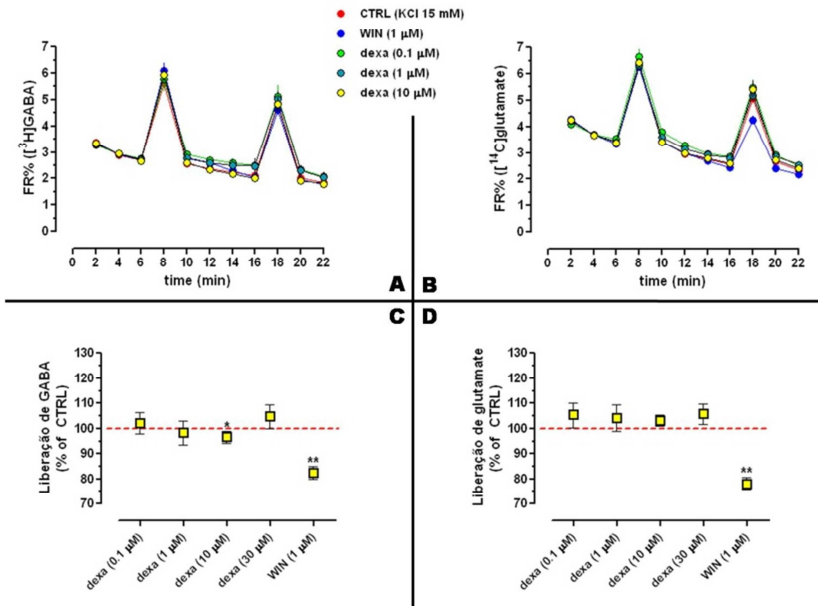


Figura 16 – Liberação de GABA e glutamato em terminais nervosos (sinaptossomas) da região cortical do cérebro de ratos. As figuras A e B ilustram a curva de liberação de GABA ou glutamato em sinaptossomas ao longo de 22 min frente a dois estímulo com KCl 15 mM. As figuras C e D representam a média \pm E.P.M. do percentual da fração de GABA ou glutamato liberados em relação ao conteúdo total nos sinaptossomas. Os dados foram analisados com teste T de uma amostra (one-sample t-test) contra o grupo controle (representado como 100%). * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ comparado ao grupo controle (linha pontilhada em vermelho).

Na segunda parte deste experimento, ou seja, no procedimento envolvendo a liberação de GABA e glutamato em fatias, os resultados se mostraram um pouco diferentes daqueles observados no procedimento com liberação em sinaptossomas. Os resultados obtidos nesse experimento encontram-se ilustrados na figura 17 e, como podemos observar, a dexametasona na dose de 10 μM em fatias foi capaz de causar uma inibição muito mais acentuada do que aquela observada nos experimentos com sinaptossomas. Neste caso a inibição foi observada não apenas na liberação de GABA, mas também no glutamato ($p < 0,05$; teste-t comparado a um hipotético valor de 100%),

embora neste último neurotransmissor a inibição tenha sido bem mais discreta. Este efeito da dexametasona foi prevenido pelo antagonista dos receptores glicocorticóides (GR), o mifepristone. Contudo, o efeito mais importante ficou por parte do antagonista dos receptores CB₁, o O2050, que preveniu os efeitos inibitórios da dexametasona sobre a liberação de GABA e glutamato ($p>0,05$). Por último, o THL, um inibidor da síntese de eCB, não apenas antagonizou, mas reverteu os efeitos inibitórios da dexametasona sobre a liberação dos neurotransmissores abordados ($p<0,05$) (Fig. 17 C e D).

LIBERAÇÃO DE GABA E GLUTAMATO EM FATIAS

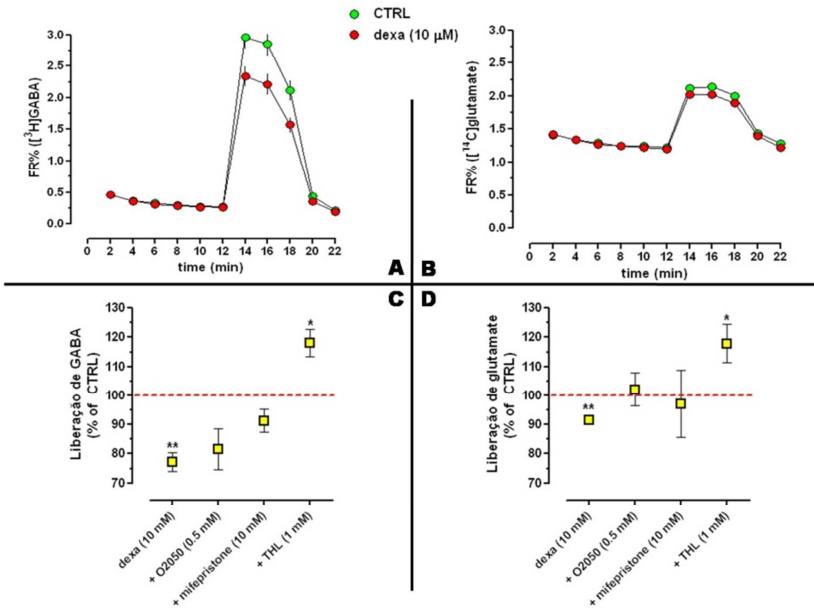


Figura 17 - Liberação de GABA e glutamato em terminais nervosos (fatias) da região cortical do cérebro de ratos. As figuras A e B ilustram a curva de liberação de GABA ou glutamato em sinaptossomas ao longo de 22 min frente a um estímulo com KCl 30 mM. As figuras C e D representam a média \pm E.P.M. do percentual da fração de GABA ou glutamato liberados em relação ao conteúdo total nas fatias. Os dados foram analisados com teste T de uma amostra (one-sample t-test) contra o grupo controle (representado como 100%). * $P<0,05$ e ** $P<0,01$ comparado ao grupo controle (linha pontilhada em vermelho).

4.2.2 – *Experimento 11: Imunohistoquímica para verificar as possibilidades neuroanatômicas de uma possível interação entre os sistemas eCB e glicocorticóides*

Este experimento foi conduzido a fim de analisar se as interações até então observadas seriam realmente possíveis diante das disposições neuroanatômicas dos elementos até aqui abordados. As imagens obtidas deste experimento encontram-se ilustradas na figura 18. Como podemos observar em uma imagem mais ampla destacada na figura 18 A, os receptores canabinóides do tipo CB₁ (em azul), os receptores glicocorticóides (GR) (em vermelho), bem como os transportadores de glutamato (VGLUT1) (em verde) encontram-se amplamente distribuídos na região cerebral que vai do estriado até o córtex somatosensorial. Já em uma imagem aumentada podemos observar a co-localização (indicação feita por setas) dos receptores CB₁ (em azul) com o transportador glutamatérgico (em verde) na porção pré-sináptica dos neurônios (figura 18B). Percebemos também nesta mesma figura uma presença dominante de marcação para os receptores GR (em vermelho) no corpo celular dos neurônios principais. Já nas imagens obtidas do CPF percebemos que os receptores GR (em verde) continuam predominantemente expressos no corpo celular dos neurônios principais, com a diferença de que nesta região cerebral os receptores CB₁ (em azul) parecem estar co-localizados (indicação feita por setas) com os transportadores GABAérgicos (VGAT) (em vermelho) e não com os transportadores glutamatérgicos como observados no córtex somatopsensorial (Fig. 18C). O mesmo padrão de presença dos receptores GR (em vermelho) nos corpos celulares de neurônios (indicado por asterisco) e de receptores CB₁ (em azul) na porção pré-sináptica foi observada também na região CA1 do hipocampo (Fig. 18D). Na região do giro denteado as imagens mostram mais uma vez a co-localização (indicada por setas) dos receptores CB₁ (em azul) com o transportador glutamatérgico (VGLUT1) (em verde), assim como a presença de receptores GR (em vermelho) no corpo de neurônios (Fig. 18E).

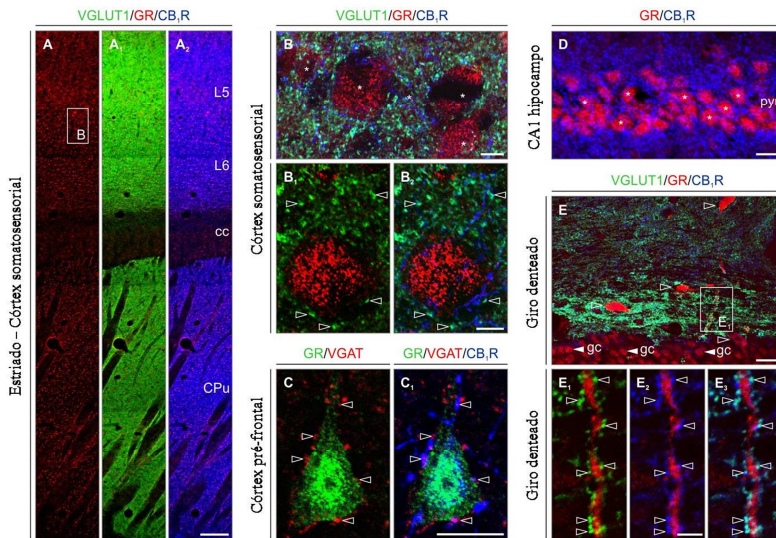


Figura 18 – Imagens de imunohistoquímica para os receptores canabinóides CB₁ e glicocorticóides (GR), bem como para os transportadores GABAérgicos (VGAT) e glutamatérgicos (VGLUT1) em fatias do cérebro de ratos. (A_{1/2}) imagens da região do estriado até o córtex somatosensorial; (B_{1/2}) imagens do córtex somatosensorial; (C₁) córtex pré-frontal; (D) região CA1 do hipocampo; (E_{1/2/3}) giro denteado. VGLUT1, transportador de glutamato; VGAT, transportador de GABA; CB₁, receptor canabinóide; GR, receptor glicocorticóide; (▶) setas indicam colocalização; (*) asteriscos indicam o corpo celular.

5 – DISCUSSÃO

Esta tese teve como principal hipótese a existência de uma interação entre os sistemas eCB e glicocorticóides na extinção de memórias aversivas. Para este propósito lançamos mão do modelo comportamental do CA contextual, bem como análises bioquímicas que envolveram experimentos de liberação de GABA e glutamato em sinaptossomas e fatias, e técnicas de imunohistoquímica. Os resultados obtidos a partir destas abordagens reafirmam achados da literatura os quais mostram uma participação importante tanto do sistema eCB como do sistema glicocorticóide na extinção de memórias aversivas. Sobretudo, estes resultados mostram, pela primeira vez, uma interação entre estes sistemas no processo de extinção deste tipo de memória, interação esta que parece revelar certa interdependência entre a funcionalidade de ambos os sistemas para que o processo de extinção ocorra de forma satisfatória. Este achado, como será discutido a seguir, foi evidenciado tanto pelos resultados oriundos dos procedimentos comportamentais como também pelos resultados obtidos através das análises bioquímicas.

Como mencionado na introdução, existem vários trabalhos mostrando a participação tanto do sistema eCB como dos glicocorticóides na extinção de memórias aversivas (ver tabelas 1 e 2). Estes trabalhos mostram que um bloqueio dos receptores canabinóides do subtipo CB₁, seja por eliminação gênica ou por ferramentas farmacológicas, é capaz de prejudicar os processos de extinção de uma memória de medo. Já o contrário, ou seja, uma potencialização deste sistema, seja por agonistas diretos ou substâncias que aumentam os níveis de eCB, são capazes de promover uma facilitação neste tipo de resposta. O mesmo parece acontecer com os glicocorticóides, onde a administração de inibidores da síntese de glicocorticóides endógenos bem como a remoção da adrenal parece prejudicar o processo de extinção tal qual acontece no bloqueio dos receptores canabinóides. Além do mais, assim como este processo pode ser revertido com a potencialização do sistema eCB, no caso dos glicocorticóides isso também é verdade, ou seja, a administração de corticosterona, assim como do glicocorticóide sintético dexametasona, é capaz de facilitar o processo de extinção. Com isso, podemos ver algumas similaridades entre as respostas mediadas pelo sistema eCB e pelo sistema glicocorticóide no que diz respeito ao processo de extinção, mas nada

além de similaridades. Ainda que trabalhos já tenham mostrado uma interação funcional entre estes dois sistemas (Di, Malcher-Lopes *et al.*, 2003; Hill, McLaughlin *et al.*, 2011), até mesmo interações envolvendo processos de memória (Campolongo, Roozendaal *et al.*, 2009; De Oliveira Alvares, Engelke *et al.*, 2010; Atsak, Hauer *et al.*, 2012), nenhum destes trabalhos mostrou especificamente uma interação na etapa de extinção. Sabendo-se das similaridades entre as respostas destes dois sistemas frente ao processo de extinção, assim como das interações funcionais já observadas entre canabinóides e glicocorticóides em outras abordagens, partimos para investigar a possibilidade de interação também nos processos que envolvem extinção de memórias com componentes traumáticos.

Em um primeiro momento, decidimos analisar os efeitos de um glicocorticóide sintético, a dexametasona, quando injetada i.p. em ratos que foram posteriormente submetidos a um protocolo de extinção de memórias aversivas já padronizado em nosso laboratório (Bitencourt, Pamplona *et al.*, 2008). Neste primeiro experimento, confirmamos dados de outros estudos (Yang, Chao *et al.*, 2006; Yang, Chao *et al.*, 2007; Ninomiya, Martynhak *et al.*, 2010), ou seja, a dexametasona, mesmo quando injetada i.p., é capaz de facilitar a extinção do CA (Fig. 7B). Este foi um efeito dose dependente, visto que apenas a maior dose, dentre as três doses utilizadas (0,1; 0,5 e 1,0 mg/kg), foi capaz de promover tal facilitação. O perfil desta resposta se manteve quando os mesmos grupos de animais foram novamente testados 24 h após a última sessão de extinção, porém desta vez sem tratamento farmacológico (Fig. 7C). Este teste realizado 24 h após a última sessão de extinção nos confirma ser este um efeito mnemônico muito mais do que um eventual efeito do tipo ansiolítico por parte desta droga, afinal, a resposta se mantém mesmo na ausência de tratamento farmacológico. Embora saibamos que a dexametasona possui um tempo de meia-vida relativamente longo (Meikle e Tyler, 1977) e que seus efeitos podem ter consequências no decorrer de dias (Belkebir-Mesbah, Bonnefont-Rousselot *et al.*, 1999), neste caso, uma droga com características tipo ansiolítica, teria provavelmente diminuído o tempo de congelamento já na primeira sessão de extinção tal qual como aconteceu no tratamento com diazepam feito em um estudo publicado anteriormente pelo nosso grupo (Bitencourt, Pamplona *et al.*, 2008). Todavia, mesmo com a manutenção do padrão comportamental de diminuição nas respostas de congelamento 24 h após a última sessão de extinção, é impossível

afirmar com base apenas nestes resultados que este é um efeito duradouro. Como sabemos, a rememoração de eventos traumáticos pode ocorrer muito tempo após o trauma, sendo esta recorrência espontânea um fenômeno bastante comum. Diante destas circunstâncias, não é possível precisar se os efeitos aqui observados 24 h após a última sessão de extinção seriam efeitos duradouros ou não. Mesmo que o teste fosse feito com um período maior de tempo, seria difícil tal precisão haja mostrado que o restabelecimento espontâneo deste tipo memória não parece obedecer a um padrão de tempo (Quirk, Pare *et al.*, 2010).

Diante deste primeiro resultado, no qual a dexametasona i.p. foi capaz de facilitar a extinção do CA contextual, o nosso próximo passo foi no sentido de responder se este efeito continuaria caso a dexametasona fosse administrada centralmente (i.c.v.). Gostaríamos de ter a certeza que o efeito facilitatório sobre a extinção foi um efeito mediado por respostas do sistema nervoso central (SNC) e não um efeito decorrente meramente de ações periféricas em virtude do tratamento i.p. com dexametasona. Através do mesmo protocolo experimental, testamos três doses de dexametasona injetadas i.c.v. (0,1; 0,5 e 1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 5 min. antes de cada sessão de extinção. Mais uma vez a dexametasona foi capaz de promover a facilitação da extinção do CA contextual, porém, ao contrário de como aconteceu no tratamento i.p., onde tivemos um efeito dose resposta, neste caso o tratamento i.c.v. se mostrou mais eficaz através da administração da dose intermediária (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) (Fig. 8B). Esta resposta, como já mencionado anteriormente, é conhecida como curva em “U” invertido. Este efeito de curva em “U” invertido, onde apenas a dose intermediária tem efeito, é frequentemente encontrado em respostas comportamentais obtidas a partir de experimentos que envolvam a administração de canabinóides (Moreira, Aguiar *et al.*, 2009). De qualquer forma, ainda era cedo para apontarmos qualquer forma de interação entre os sistemas canabinóide e glicocorticóide baseando-se apenas nessa única similaridade. Todavia, ao observar os efeitos facilitatórios da dexametasona i.c.v. sobre a extinção, confirmávamos mais uma vez outros estudos os quais mostraram que os efeitos de agonistas glicocorticóides sobre este tipo de resposta eram mesmo efeitos mediados pelo SNC (Yang, Chao *et al.*, 2006).

Tendo confirmado os efeitos facilitatórios da dexametasona sobre a extinção de memórias aversivas decidimos, enfim, analisar uma

suposta interação deste sistema com o sistema eCB neste tipo de resposta. Para isso, selecionamos a dose efetiva da dexametasona injetada i.c.v. (0,5 µg/µl) para darmos continuidade aos experimentos. Este terceiro experimento foi conduzido nos mesmos moldes do experimento anterior, porém, com a diferença de que antes do tratamento com dexametasona (0,5 µg/µl; i.c.v.) foi feito um pré-tratamento com o antagonista dos receptores canabinóide do subtipo CB₁, o SR141716A (0,2 mg/kg, i.p.). Através desta abordagem seria possível analisar se os efeitos facilitatórios observados por parte da dexametasona i.c.v. eram ou não dependentes deste tipo de receptor canabinóide. Como podemos observar na figura 9 referente aos resultados do terceiro experimento, o antagonista canabinóide foi capaz de reverter os efeitos facilitatórios da dexametasona sem que exercesse um efeito *per se*. Embora não seja novidade a interação entre estes sistemas (Di, Malcher-Lopes *et al.*, 2003; Campolongo, Roozendaal *et al.*, 2009; De Oliveira Alvares, Engelke *et al.*, 2010; Hill, McLaughlin *et al.*, 2011; Atsak, Hauer *et al.*, 2012), esta foi a primeira evidência de que nossa hipótese poderia estar correta, ou seja, de que os sistemas eCB e glicocorticóide poderiam interagir também na extinção de memórias aversivas. Com isso sabemos que este glicocorticóide sintético, ao que parece, depende da ativação dos receptores CB₁ para exercer seus efeitos sobre a extinção do CA contextual. Como a dexametasona não é capaz de se ligar diretamente aos receptores canabinóides, coube a nós pensar que esta ligação deve estar ocorrendo de forma indireta. Neste caso, o aumento dos níveis deste glicocorticóide estaria aumentando a produção e liberação de eCB (Hill, Ho *et al.*, 2005) que, por sua vez, em níveis aumentados, atuariam facilitando a extinção ao se ligarem nos receptores CB₁ (Marsicano, Wotjak *et al.*, 2002; Chhatwal, Davis *et al.*, 2005; Bitencourt, Pamplona *et al.*, 2008). Este resultado é reforçado por um trabalho publicado no ano de 2009 onde Campolongo e colaboradores mostraram que um antagonista CB₁, o AM251, foi capaz de bloquear os efeitos da corticosterona sobre a consolidação de memórias aversivas (Campolongo, Roozendaal *et al.*, 2009). Mais recentemente, Atsak e colaboradores (2012) também mostraram esta dependência dos efeitos da corticosterona pelos receptores canabinóides, porém, desta vez, na etapa de evocação de uma memória aversiva (Atsak, Hauer *et al.*, 2012). Embora as abordagens sejam diferentes (consolidação e evocação VS extinção) o princípio das respostas é o mesmo, ou seja, antagonistas canabinóides bloqueando os efeitos de agonistas glicocorticóides.

Mesmo que com o experimento anterior tenhamos conseguido mostrar uma primeira evidência de interação entre os sistemas eCB e glicocorticóide através do bloqueio das respostas da dexametasona com um antagonista CB₁, ainda assim não tínhamos argumentos suficientes para afirmar que os efeitos deste glicocorticóide sintético estariam mesmo relacionados a um aumento nos níveis de eCB. A fim de esclarecer este ponto, decidimos, por meio de outro experimento (experimento número 4), analisar se os glicocorticóides eram mesmo essenciais para os efeitos já conhecidos dos eCB neste tipo de resposta (ver tabela 1 para os efeitos já conhecidos). Para esta etapa resolvemos tratar os animais com um inibidor da síntese de glicocorticóides endógenos, a metirapona (25 mg/kg; s.c.), previamente ao tratamento com AM404, um inibidor da recaptação e degradação de anandamida (eCB). Para este experimento utilizamos uma dose de AM404 já conhecida por facilitar a extinção neste mesmo protocolo experimental (1,0 µg/µl, i.c.v.) (Bitencourt, Pamplona *et al.*, 2008). Sabíamos que o AM404 facilitava a extinção de memórias aversivas ao aumentar os níveis de eCB e estes, por sua vez, ao se ligarem nos receptores CB₁. Sendo assim, os efeitos do AM404 só são possíveis diante da presença de uma quantidade mínima de eCB já pré-existente, não sendo possível que o AM404 se ligue diretamente nos receptores CB₁. Sabendo disso, e partindo do pressuposto de que nesta situação de extinção de uma memória aversiva os eCB parecem ser cruciais para os efeitos facilitatórios dos glicocorticóides, gostaríamos de saber se os glicocorticóides endógenos não seriam também cruciais para os efeitos facilitatórios dos eCB, ou seja, do AM404. Assim, uma inibição na síntese de glicocorticóides endógenos poderia interferir ao anular os efeitos já conhecidos do AM404. Os resultados deste experimento não deixaram dúvidas. Como podemos observar na figura 10, a metirapona foi capaz de bloquear os efeitos facilitatórios promovidos pelo AM404 em uma dose que *per se* não exerceu efeito algum. Este padrão de resposta se manteve mesmo quando os animais foram testados na ausência de tratamento farmacológico 24 h após a última sessão de extinção. Com isso podemos dizer que não apenas os glicocorticóides dependem dos receptores CB₁, como também os eCB parecem depender da síntese de glicocorticóides para que exerçam seus efeitos de facilitação sobre a extinção do CA contextual. Evidência esta que já havia sido levantada pelo trabalho de De Oliveira e colaboradores, porém, abordando o processo de consolidação e não de extinção (De Oliveira Alvares, Engelke *et al.*, 2010). Estes últimos resultados, além

de fortalecerem a hipótese levantada por alguns trabalhos os quais dizem que os glicocorticóides podem aumentar a produção e liberação de eCB (Di, Malcher-Lopes *et al.*, 2003; Hill, Ho *et al.*, 2005; Malcher-Lopes, Di *et al.*, 2006; Hill, Mclaughlin *et al.*, 2011), reforçam também a hipótese de interação entre eCB e glicocorticóides proposta no presente trabalho.

Mesmo diante da consistência de interação observada nos resultados anteriores, ainda sim era possível que a metirapona estivesse de alguma forma diminuindo a ligação dos eCB aos seus respectivos receptores canabinóides e com isso impedindo o AM404 de exercer seus efeitos. Assim teríamos uma falsa conclusão de que os efeitos do AM404 estariam sendo dependentes da síntese de glicocorticóides endógenos quando, na verdade, a interação poderia estar ocorrendo diretamente no receptor. Embora esta possibilidade de interação do inibidor da síntese de glicocorticóides, a metirapona, diretamente com os receptores CB₁ fosse remota, decidimos analisá-la com mais cautela no experimento seguinte (experimentos 5). Para tal finalidade resolvemos administrar a metirapona previamente ao tratamento com um agonista dos receptores CB₁, o WIN55212-2, que se liga diretamente nos receptores CB₁, ao contrário do AM404 que atua de forma indireta ao aumentar os níveis de eCB. Trabalhos do nosso próprio grupo já haviam mostrado que este agonista canabinóide é capaz de facilitar a extinção de uma memória aversiva e que este era um efeito mediado pelos receptores CB₁ (Pamplona, Prediger *et al.*, 2006; Pamplona, Bitencourt *et al.*, 2008). Sendo assim, caso a metirapona estivesse anulando os efeitos facilitatórios do AM404 por uma interação direta com os receptores CB₁ e não por uma conseqüência da diminuição da síntese de glicocorticóides endógenos, este inibidor também seria capaz de interferir com os efeitos já conhecidos do WIN. Caso contrário, ou seja, caso os efeitos antagônicos da metirapona sobre o AM404 não tenham sido em decorrência de uma suposta interação com os receptores CB₁, o WIN, que não depende da liberação de eCB para que exerça seus efeitos, iria manter o padrão de resposta observado nos estudos anteriores. Para dar segmento ao padrão de administração dos experimentos anteriores decidimos injetar o WIN i.c.v., diferentemente das publicações anteriores nas quais o WIN foi injetado i.p. Por este motivo um experimento piloto (apêndice número 1) foi conduzido com a única finalidade de achar uma dose de WIN que facilitasse a extinção do CA contextual quando injetado i.c.v. Com base neste primeiro

experimento com WIN selecionamos a menor dose (0,1 µg/µl, i.c.v.), que foi a que mostrou uma facilitação bastante efetiva já na primeira sessão de extinção, quando comparada ao grupo controle. O fato de o agonista canabinoide ter diminuído a % do tempo de congelamento já na primeira sessão poderia ser um indicativo de efeito tipo-ansiolítico ao invés de facilitação da extinção, contudo, ao analisarmos a primeira sessão em blocos de 3 min. (3 + 3 + 3 = 9), vimos que a facilitação ocorre já nesta primeira sessão. O WIN foi capaz de diminuir o tempo de congelamento, quando comparado ao grupo controle, no segundo (3-6) e terceiro (6-9) bloco de 3 min (ver apêndice número 2). Por isso não foi possível observar a facilitação da extinção por parte do WIN ao longo das sessões de extinção, visto que essa facilitação se dava já durante a primeira sessão. Outro indicativo de que não se tratava de um efeito tipo-ansiolítico foi o resultado do teste sem droga, feito 24 h após a última sessão de extinção. Neste teste vimos que a % do tempo de congelamento dos animais tratados com WIN manteve-se significativamente abaixo da % do tempo de congelamento dos animais do grupo controle (ver apêndice 1). Do contrário, caso o efeito do WIN fosse um efeito ansiolítico, é bem provável que a % do tempo de congelamento durante o teste sem droga ficasse igual ou superior aos animais do grupo controle. Da mesma forma que aconteceu em um trabalho publicado no ano de 2008 pelo nosso grupo, onde os animais tratados com um ansiolítico bastante conhecido, o dizepam, apresentaram uma redução na % do tempo de congelamento durante as sessões de extinção, porém, no teste sem droga, esta diminuição em relação ao grupo controle desapareceu (Bitencourt, Pamplona *et al.*, 2008). Além do mais, outros trabalhos já haviam mostrado os efeitos facilitatórios do WIN sobre a extinção, sobretudo nos primeiros 9 min. do procedimento (Pamplona, Prediger *et al.*, 2006; Pamplona, Bitencourt *et al.*, 2008), da mesma forma como observado no presente estudo. Portanto, com a dose efetiva em mãos, partimos para o experimento seguinte que foi praticamente idêntico ao experimento número quatro (MET+AM404), com a única diferença de que ao invés de AM404 utilizamos o WIN como tratamento subsequente ao pré-tratamento com metirapona.

Como pode ser observado na figura 11, a metirapona não foi capaz de reverter os efeitos facilitatórios do WIN, diferentemente do que havia acontecido quando administrada previamente ao tratamento com AM404. Com isso, podemos concluir que os efeitos antagônicos da

metirapona em relação aos efeitos do AM404 devem mesmo ter sido por uma diminuição na síntese dos glicocorticóides endógenos muito mais do que qualquer eventual efeito sobre os receptores CB₁. Este resultado reafirma a capacidade que um agonista dos receptores CB₁ possui em promover a facilitação da extinção de uma memória aversiva (Pamplona, Prediger *et al.*, 2006; Lin, Mao *et al.*, 2009), bem como estende as informações em relação a este achado ao mostrar que este efeito facilitatório por parte do WIN não parece depender da síntese de glicocorticóides endógenos.

Embora os resultados anteriores tenham nos mostrado que a dexametasona provavelmente atue ao induzir a produção e liberação de eCB e que estes, por sua vez, são responsáveis por promover os efeitos falitatórios sobre a extinção ao se ligarem nos receptores CB₁, ainda não sabemos ao certo onde se daria esta interação. Uma questão primordial seria, por exemplo, saber através de quais receptores a dexametasona estaria se ligando para que induzisse um aumento nos níveis de eCB. Como mencionado na introdução, as principais ações dos glicocorticóides endógenos são mediadas por receptores específicos dos quais existem dois tipos já descritos: os receptores mineralocorticóides (MR) e glicocorticóides (GR). Mesmo que muitos destes sejam receptores nucleares, vários estudos têm mostrado que estes também podem estar localizados em membranas, mediando assim as ações rápidas dos glicocorticóides endógenos como, por exemplo, as resposta de extinção (Fulford e Harbuz, 2005; Prager e Johnson, 2009). Ainda que um trabalho anterior tenha nos mostrado que os efeitos facilitatórios da dexametasona sobre a extinção sejam provavelmente por ação específica nos receptores glicocorticóides (Yang, Chao *et al.*, 2006), decidimos, mesmo assim, analisar se os efeitos aqui observados, tanto por parte da dexametasona como também do AM404, seriam efeitos mediados por receptores glicocorticóides ou mineralocorticóides. Assim, saberíamos não apenas se os receptores glicocorticóides/mineralocorticóides são os mediadores dos efeitos da dexametasona ao supostamente aumentar os níveis de eCB, como saberíamos também se estes receptores não teriam papel fundamental nos efeitos do AM404 por si só. Primeiramente, resolvemos testar a participação dos receptores glicocorticóides nos efeitos falicitatórios da dexametasona (experimento 6). Para isso administramos o antagonista destes receptores, o mifepristone (100 ng/ μ l; i.c.v.), previamente ao tratamento com dexametasona. Como podem ser observados no gráfico

da figura 12, os resultados com a dexametasona (0,5 ng/μl; i.c.v.) continuam apontando para uma facilitação da extinção por parte desta droga, replicando os achados anteriores. Já o pré-tratamento com mifepristone foi capaz de bloquear este efeito facilitatório da dexametasona, reforçando a idéia de que os receptores glicocorticóides são fundamentais para estes efeitos da dexametasona (Yang, Chao *et al.*, 2006). De forma ainda mais interessante, o mifepristone também foi capaz de antagonizar os efeitos facilitatórios observados em decorrência do tratamento com AM404 (Fig. 13). Assim podemos dizer que os receptores glicocorticóides são fundamentais, não apenas para que ocorram os efeitos facilitatórios da dexametasona, mas também para os efeitos do AM404. Provavelmente a situação de estresse gerada durante o processo de extinção leva a uma elevação dos níveis de glicocorticóides endógenos (hormônios do estresse) e estes, por sua vez, ao se ligarem nos receptores glicocorticóides, aumentem os níveis de eCB (como exemplificado na Fig. 4 da introdução) (Hill e McEwen, 2009). Com estes receptores antagonizados, teríamos uma conseqüente diminuição no aumento dos níveis de eCB e, com isso, o AM404 não teria aporte suficiente destes mediadores endógenos para que exercesse seus efeitos facilitatórios. Este fato também foi observado no experimento 4, todavia, com a diferença de que naquele experimento uma possível diminuição dos níveis de eCB e conseqüente perda dos efeitos facilitatórios do AM404 tenha se dado através da inibição da síntese de glicocorticóides endógenos e não pelo bloqueio de seus receptores. Portanto, como já demonstrado recentemente no trabalho de De Oliveira Alvares e colaboradores (2010), esta primeira resposta de estresse, bem como todas as conseqüências fisiológicas que esta resposta pode acarretar, parecem ser cruciais para as respostas dos eCB no que diz respeito a facilitação dos processos de extinção. Esta constatação fica ainda mais evidente ao percebermos que se antagonizarmos os receptores glicocorticóides bloqueamos também os efeitos facilitatórios por parte do AM404.

Mesmo tendo confirmado o importante papel dos receptores glicocorticóides nos efeitos da dexametasona e do AM404 sobre a extinção de memórias aversivas, ainda não poderíamos descartar completamente a possibilidade de participação dos receptores mineralocorticóides neste processo. Para isso os experimentos 8 e 9 foram conduzidos no intuito de esclarecer melhor essa questão. Nestes experimentos (8 e 9), ao invés do pré-tratamento com o antagonista

glicocorticóide mifepristone antes da dexametasona e AM404, nós administramos o antagonista dos receptores mineralocorticóides, a espironolactona (100 ng/μl; i.c.v.). Como podemos observar nos gráficos expressos nas figuras 14 e 15 referentes a estes experimentos, o pré-tratamento com espironolactona não foi capaz de prevenir os efeitos facilitatórios tanto da dexametasona como do AM404 sobre a extinção do CA contextual. Estas duas drogas, por sua vez, continuaram apresentando a característica de facilitar a extinção (da mesma forma como observado nos experimentos anteriores). Assim podemos concluir que pelo menos neste tipo de resposta que aborda a extinção de memórias aversivas, os receptores mineralocorticóides parecem não ter uma grande participação. Estes resultados estão de acordo com outros estudos os quais mostraram serem os receptores glicocorticóides os mais importantes para esta interação (Di, Malcher-Lopes *et al.*, 2003; Tasker, Di *et al.*, 2006; Hill e Mcewen, 2009) bem como serem estes os principais receptores envolvidos nas respostas dos glicocorticóides endógenos diante de um processo de extinção (Yang, Chao *et al.*, 2006).

Ao analisar todos os resultados comportamentais aqui apresentados podemos concluir que ambos os sistemas, eCB e glicocorticóide, parecem depender um do outro no que diz respeito à facilitação da extinção de memórias aversivas. Tanto os efeitos observados através da administração do glicocorticóide exógeno dependem dos receptores canabinóides CB₁ como também os efeitos decorrentes do aumento dos níveis de eCB parecem depender da síntese de glicocorticóides endógenos. Sem falar que ambos os efeitos necessitam da ativação dos receptores do tipo glicocorticóide (GR). Sendo assim, com base nestes e em outros estudos já citados, podemos supor que, em um primeiro momento do processo de extinção, há um aumento na resposta de estresse que, conseqüentemente, gera uma elevação nos níveis de glicocorticóides endógenos e estes, através dos receptores glicocorticóides, proporcionam um aumento nos níveis de eCB que, ao se ligarem nos receptores CB₁, promovem a facilitação deste processo. Entretanto, estes resultados ainda não nos permitem prever quais os eventos neurobiológicos estariam acontecendo após a ativação dos receptores CB₁ pelos eCB. Foi com o intuito de esclarecer o que estaria acontecendo após a ativação dos receptores CB₁, bem como reafirmar esta interação observada nos procedimentos comportamentais, que os procedimentos bioquímicos foram conduzidos.

Nos últimos anos, trabalhos têm mostrado a importância do CPF na extinção de memórias aversivas (Myers e Davis, 2007; Quirk e Mueller, 2008; Peters, Kalivas *et al.*, 2009; Sotres-Bayon e Quirk, 2010). Tem sido aceito que a inibição desta região prejudica a extinção e que o oposto é verdadeiro, ou seja, a estimulação é capaz de facilitar este processo (Morgan, Romanski *et al.*, 1993; Milad e Quirk, 2002; Lebron, Milad *et al.*, 2004; Milad, Vidal-Gonzalez *et al.*, 2004; Mueller, Porter *et al.*, 2008). Sabemos também que tanto os receptores canabinóides como os glicocorticóides são amplamente distribuídos nesta região cortical (Fuxe, Wikstrom *et al.*, 1985; Aronsson, Fuxe *et al.*, 1988; Herkenham, Lynn *et al.*, 1990; Egertova, Giang *et al.*, 1998) e possivelmente tem participação em várias respostas controladas por esta estrutura inclusive, por exemplo, nas respostas de extinção. Neste caso, os efeitos dos canabinóides sobre a extinção, quando injetados no CPF, já vem sendo explorados (Lin, Mao *et al.*, 2009) e é possível que estes compostos facilitem a extinção ao modular de forma inibitória, via receptores CB1, a neurotransmissão GABAérgica nesta estrutura (Lafenetre, Chaouloff *et al.*, 2007). Inibindo um sistema inibitório, temos indiretamente uma estimulação que, quando ocorrida no CPF, já sabemos ter por consequência efeitos facilitatórios sobre a extinção (Sotres-Bayon e Quirk, 2010). Mas além dos canabinóides, os glicocorticóides também podem modular a liberação de neurotransmissores excitatórios e inibitórios (Di, Maxson *et al.*, 2009). Desta forma, tanto os canabinóides como os glicocorticóides poderiam estar promovendo a facilitação da extinção de uma memória aversiva ao estimularem indiretamente o CPF através da inibição da neurotransmissão GABAérgica nesta região. Por isso, o passo seguinte aos experimentos comportamentais foi analisar os efeitos, tanto de canabinóides como glicocorticóides, sobre a liberação de GABA e glutamato na região cortical do cérebro de ratos. Mais especificamente, utilizamos as regiões que compreendem o córtex somatossensorial e o pré-frontal. Esta região mais ampla foi necessária para que tivéssemos tecido suficiente para ambos os experimentos de liberação, em sinaptossomas e em fatias.

Nos experimentos feitos com sinaptossomas, onde temos apenas a fração pré-sináptica do neurônio, utilizamos como tratamento diferentes doses de dexametasona com a finalidade de observar se este glicocorticóide sintético poderia interferir na liberação de GABA e glutamato das regiões corticais aqui utilizadas. Utilizamos também um

agonista dos receptores CB₁, o WIN55212-2, como controle positivo por já sabermos que este composto é capaz de diminuir a liberação tanto de GABA como glutamato (Kofalvi, Rodrigues *et al.*, 2005). Desta forma, caso a dexametasona também mostrasse essa característica de diminuir a liberação destes neurotransmissores, poderíamos analisar uma possível interação entre os sistemas eCB e glicocorticóide neste tipo de resposta, a exemplo da interação observada nos procedimentos comportamentais. Neste experimento, os resultados obtidos confirmaram a característica do agonista canabinóide em diminuir a liberação de GABA e glutamato (Katona, Sperlagh *et al.*, 1999; Kofalvi, Vizi *et al.*, 2003), porém, não foram observados grandes efeitos por parte da dexametasona (Fig. 16). O único efeito por parte da dexametasona, e ainda sim muito sutil, foi na dose de 10 µM, onde houve uma pequena diminuição na liberação de GABA, o que não se repetiu diante da liberação de glutamato. De toda maneira, essa ausência de efeitos mais contundentes por parte da dexametasona pode ser explicada, em parte, pelo fato de termos escolhido utilizar sinaptossomas ao invés de fatias nessa técnica (Ioannou, Liapi *et al.*, 2003). Se isso for verdade, ou seja, se a ausência de efeitos se dever a utilização de sinaptossomas, nós teríamos aí mais um indício de interação entre glicocorticóides e eCB. Tudo isso porque, como mencionado anteriormente, os sinaptossomas mantêm apenas a porção pré-sináptica dos neurônios, o que eliminaria qualquer efeito da dexametasona mediado pelo aumento na liberação de eCB, visto que estas substâncias endógenas, ao contrário dos neurotransmissores clássicos, são liberados da pós-sinapse (revisado em Pertwee, 2006). Neste caso, o efeito sutil observado pela dose de 10 µM de dexametasona pode ter sido decorrente de frações pós-sinápticas dos neurônios que eventualmente ficam misturadas aos sinaptossomas.

Para averiguar então se uma eventual interação entre eCB e glicocorticóides na liberação de GABA e glutamato estaria ocorrendo nos terminais pós-sinápticos, resolvemos repetir os experimentos de liberação em fatias. As fatias, ao contrário dos sinaptossomas, mantêm todas as sinapses como se estivessem “embaladas”, permanecendo intactas tanto estruturas pré- como pós-sinápticas. Assim, seria mais fácil verificar a possibilidade da interação proposta entre eCB e glicocorticóides sobre a liberação de GABA e glutamato na região cortical selecionada, caso esta interação realmente exista. Para estes experimentos em fatias, resolvemos utilizar apenas a dose de 10 µM de dexametasona, que se mostrou uma dose promissora no experimento

anterior. Como podemos observar nos resultados referentes a este experimento e representados na figura 17, a dexametasona na dose de 10 μ M foi capaz de inibir a liberação tanto de glutamato como de GABA da mesma forma que o agonista canabinóide WIN inibiu nos experimentos com sinaptossomas. Podemos observar também que esta inibição foi mais contundente na neurotransmissão GABAérgica, a exemplo do trabalho publicado recentemente por Hill e colaboradores, o qual mostrou haver uma inibição mais específica pra este tipo de neurotransmissor (Hill, Mclaughlin *et al.*, 2011). Esse dado só vem a reforçar a hipótese de que os efeitos de facilitação sobre a extinção, observados no protocolo comportamental, podem estar mesmo relacionados a uma inibição predominantemente GABAérgica na região cortical, que indiretamente seria estimulada e, conseqüentemente, iria promover a diminuição na expressão do medo (Sotres-Bayon e Quirk, 2010). Além do mais, este resultado também reforça a hipótese levantada anteriormente para a ausência de efeitos da dexametasona nos experimentos com sinaptossomas, ou seja, a falta de terminais pós-sinápticos pode mesmo ter sido fundamental para um “falso negativo”.

Sabendo que a dexametasona diminuiu a liberação de glutamato e, principalmente, GABA, resolvemos então verificar a participação dos receptores que se mostraram fundamentais para os efeitos comportamentais deste composto. Testamos então o antagonista para os receptores glicocorticóides (GR), o mifepristone, e o antagonista dos receptores canabinóides (CB₁), o O2050. Testamos também um composto capaz de bloquear uma enzima responsável por uma etapa da produção do eCB 2-AG, a tetrahidrolipstatina (THL). O antagonista dos receptores glicocorticóides foi capaz de bloquear os efeitos inibitórios da dexametasona sobre a liberação de GABA e glutamato, confirmando estudos anteriores (Wang e Wang, 2009) e mostrando, a exemplo dos resultados comportamentais, a importância deste tipo de receptor para as respostas deste composto (Fig. 17 C e D). Entretanto, o mais interessante ficou por parte do antagonista dos receptores CB₁, que também foi capaz de bloquear os efeitos inibitórios da dexametasona sobre a liberação de GABA e glutamato (Fig. 17 C e D). Este último resultado nos mostra que a dexametasona parece recrutar eCB não apenas durante a facilitação da extinção, observada nos experimentos comportamentais, mas também durante a inibição da liberação de GABA e glutamato. Este resultado vai ao encontro do trabalho publicado por Hill e colaboradores no ano de 2011, o qual mostra que o

antagonista canabinóide é capaz de bloquear os efeitos inibitórios da corticosterona sobre a liberação de GABA no CPF (Hill, McLaughlin *et al.*, 2011). Todavia, ainda mais surpreendente que o bloqueio dos efeitos inibitórios da dexametasona pelo antagonista CB₁, foi o fato de THL reverter este efeito (Fig. 17 C e D). A dexametasona, que antes inibia a liberação destes neurotransmissores, quando na presença de THL, passou a aumentar esta liberação. Ao que parece, o 2-AG atua modulando os efeitos da dexametasona no sentido de inibir a liberação dos neurotransmissores analisados. Este resultado, além de mostrar mais uma vez esta interdependência entre glicocorticóides e eCB, atribui também uma importância até então não muito comentada em relação ao eCB 2-AG, importância esta que pode, inclusive, refletir-se nos resultados comportamentais. Porque embora o AM404, que foi utilizado no protocolo de extinção, seja uma droga que aparentemente aumente os níveis apenas de anandamida por inibir a enzima responsável pela degradação deste eCB, não podemos esquecer que este composto inibe também o transportador de eCB (Pacher, Batkai *et al.*, 2006), transportador este que ainda não está bem elucidado (Di Marzo, Fontana *et al.*, 1994; Giuffrida, Beltramo *et al.*, 2001) e que eventualmente pode transportar ambos, anandamida e 2-AG (Beltramo, Stella *et al.*, 1997).

Feitos os experimentos comportamentais e de liberação, ainda precisávamos saber, neuroanatômicamente falando, se toda esta interação observada anteriormente era possível. Para isso, optamos por fazer alguns experimentos de imagens os quais poderiam nos permitir, de forma mais confiável, concluir sobre a real possibilidade desta interação. Neste caso, os experimentos de imunohistoquímica envolvendo anticorpos para receptores CB₁ e glicocorticóides, bem como anticorpos para os transportadores de GABA e glutamato, foram imprescindíveis para que tal conclusão fosse possível. Como podemos observar na figura 18, as imagens nos mostram uma densa expressão de receptores CB₁ e glicocorticóides (GR) na região cortical do cérebro de ratos. Estes receptores parecem estar predominantemente acompanhados pelo transportador glutamatérgico no córtex somatosensorial (Fig. 18A e B) e por transportadores GABAérgicos no CPF (Fig. 18C). Se olharmos as imagens de forma mais detalhada, veremos que no córtex somatosensorial (Fig. 18B), temos uma co-localização de receptores CB₁ com o transportador glutamatérgico em células pré-sinápticas enquanto que os receptores GR parecem estar predominantemente localizados no corpo celular dos neurônios principais. Já quando

olhamos pra o CPF (Fig. 18C), notamos uma pequena mudança em relação ao padrão observado no córtex somatosensorial. No CPF os receptores GR continuam predominantemente expressos no corpo celular dos neurônios principais e o receptores CB₁ continuam aparecendo em terminais pré-sinápticos, entretanto, nesta região, estes últimos aparecem co-localizados com transportadores GABAérgicos. Esta co-localização vai ao encontro dos resultados achados no estudo de Hill e colaboradores (Hill, McLaughlin *et al.*, 2011). A co-localização encontrada, dos receptores CB₁ com o transportador GABAérgico no CPF, bem como a presença de receptores GR no corpo celular, reforça ainda mais as hipóteses até aqui levantadas. Os receptores GR do corpo celular, quando ocupados por glicocorticóides, possivelmente aumentam a liberação de eCB (Hill, Ho *et al.*, 2005) que, por sua vez, ao se ligarem nos receptores CB₁ pré-sinápticos que co-localizam-se com o transportador de GABA, promovem uma diminuição na liberação deste neurotransmissor inibitório. Uma vez este processo acontecendo no CPF, temos a já mencionada ativação desta região que levaria aos efeitos facilitatórios sobre a extinção, explicando como a interação entre eCB e glicocorticóides poderia estar levando a facilitação desta resposta. Além do mais, estas imagens reforçam a proposta de interação entre estes dois sistemas (Di, Malcher-Lopes *et al.*, 2005; Hill, Ho *et al.*, 2005; Campolongo, Roozendaal *et al.*, 2009; De Oliveira Alvares, Engelke *et al.*, 2010; Hill, McLaughlin *et al.*, 2011).

Sem maiores pretensões que possam ir além da curiosidade, vimos também que o padrão de presença de receptores GR no corpo celular e de receptores CB₁ na pré-sinapse se mantém quando analisamos outras estruturas, como o hipocampo (Fig. 18D) e o giro dentado (Fig. 18E). Nesta última, inclusive, observamos mais uma vez a co-localização dos receptores CB₁ com o transportador de glutamato.

Analisando estes três grupos de resultados, comportamentais, de liberação e de imagens, observamos fortes evidências de interação entre eCB e glicocorticóides. Uma interação que mostra certa interdependência entre estes sistemas e que pode refletir, por exemplo, no comportamento de extinção de uma memória aversiva. Observamos também que esta interação pode estar sendo mediada por alterações na liberação de GABA na região cortical frontal do cérebro de ratos.

6 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base em nossos resultados comportamentais, onde os glicocorticóides parecem recrutar eCB para os efeitos facilitatórios sobre a extinção de uma memória aversiva, e com base nos resultados bioquímicos, onde este tipo de interação também parece ocorrer nos efeitos inibitórios da dexametasona sobre a liberação de glutamato e, principalmente GABA na região cortical do cérebro de ratos, supomos o seguinte: durante o processo de extinção o animal é re-exposto ao local onde ele foi previamente condicionado e, conseqüentemente, isto evoca respostas de estresse relacionadas ao ambiente que passou a ser aversivo. Em resposta a esta situação de estresse, tem-se um aumento na liberação de glicocorticóides na corrente sanguínea que, ao chegarem no SNC, podem induzir a produção e liberação de eCB (2-AG?) via receptores GR. Os eCB, por sua vez, irão agir inibindo alguns sistemas de neurotransmissão em diferentes estruturas cerebrais como, por exemplo, o sistema GABAérgico da região cortical do cérebro (CPF?). Esta inibição resultaria em uma desinibição (de forma indireta ao “inibir uma inibição”) da estrutura em questão. Através da estimulação desta região cortical do cérebro (CPF?), teríamos como consequência uma facilitação da extinção de memórias aversivas. Esta facilitação na extinção em decorrência desta estimulação poderia estar ocorrendo porque a porção IL do córtex, como levantado no trabalho de Sotres-Bayon e Quirk (2010), ao ser estimulada, envia projeções excitatórias (glutamatérgicas) para as células intercalares da amígdala (ITCs) e para a porção lateral da amígdala central (CeL). Estas duas regiões, que possuem neurotransmissão predominantemente GABAérgicas, inibem o núcleo centrais da amígdala (CeM), reduzindo desta forma as respostas de medo (ver esquema na Fig. 19) (para maiores detalhes em relação a interação entre CPF e amígdala nas respostas de medo ver Sotres-Bayon e Quirk, 2010).

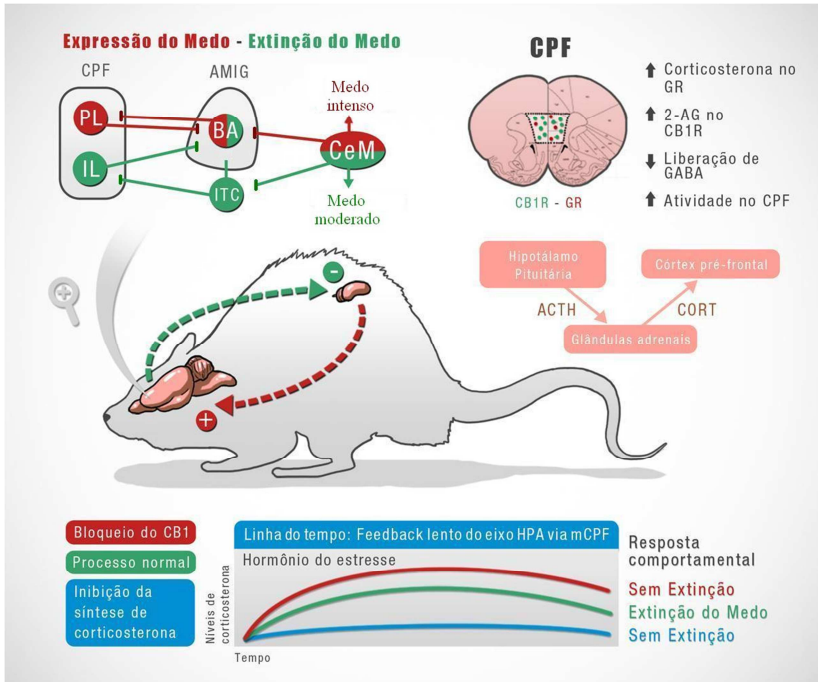


Figura 19 – Figura esquemática representando o mecanismo proposto de interação entre eCB e glicocorticóides no processo de extinção de uma memória aversiva. Em um primeiro momento (figura do rato) tem-se um aumento dos níveis de glicocorticóides endógenos atuando nos receptores glicocorticóides que, por sua vez, aumentam a produção e liberação de eCB. O aumento nos níveis de eCB contribuirá para um feedback negativo e conseqüente diminuição na liberação de glicocorticóides endógenos. Em uma projeção dos efeitos decorrentes do aumento dos níveis de eCB (2-AG?) no CPF(?) (esquema “Expressão do medo – Extinção do medo”) tem-se uma estimulação desta região que, por sua vez, através das células intercalares, inibe os núcleos centrais da amígdala responsáveis pela expressão do medo. CPF=Córtex Pré-frontal; PL=pré-límbico; IF=infra-límbico AMÍG=amígdala; BA=amígdala basolateral; CeM=núcleos centrais da amígdala; ITC=células intercalares da amígdala; CB1R=receptores canabinóides do tipo CB1; GR=receptores glicocorticóides. (Figura adaptada de Sotres-Bayon e Quirk, 2010; Hill, McLaughlin *et al.*, 2011).

Ainda estamos longe de entender todos os processos neurobiológicos que envolvem a extinção de uma memória aversiva, porém, importantes passos já foram dados nesse sentido. Hoje sabemos que a extinção deste tipo de memória é muito mais do que um simples

esquecimento ou um simples apagar e envolve, na verdade, todo um processo de reaprendizado. Para que isso ocorra, sabemos também que o nosso cérebro recruta locais anatômicos específicos bem como uma variedade de neurocircuitarias e sistemas capazes de desempenharem esta resposta da melhor maneira possível. Entender este processo é apenas o primeiro passo para que possamos modificá-lo. Os eventuais sucessos ou insucessos que venhamos a ter em nossas pretensões de modificá-lo serão apenas uma consequência do quanto realmente entendemos deste processo. Para isso, nossos estudos têm contribuído em apenas uma parte deste “quebra-cabeça” e só o futuro dirá o quanto importante foi esta contribuição. Se um dia entenderemos todos os detalhes envolvidos nos processos que envolvem a extinção de uma memória traumática não sabemos, mas é certo que cada contribuição pode ser uma alternativa a mais na triagem por terapias direcionadas àqueles que sofrem de algum transtorno relacionado à rememoração de memórias de medo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abush, H. e I. Akirav. Cannabinoids modulate hippocampal memory and plasticity. Hippocampus, v.20, n.10, Oct, p.1126-38. 2009.

Aerni, A., R. Traber, C. Hock, B. Roozendaal, G. Schelling, A. Papassotiropoulos, R. M. Nitsch, U. Schnyder e D. J. De Quervain. Low-dose cortisol for symptoms of posttraumatic stress disorder. Am J Psychiatry, v.161, n.8, Aug, p.1488-90. 2004.

Aronsson, M., K. Fuxe, Y. Dong, L. F. Agnati, S. Okret e J. A. Gustafsson. Localization of glucocorticoid receptor mRNA in the male rat brain by in situ hybridization. Proc Natl Acad Sci U S A, v.85, n.23, Dec, p.9331-5. 1988.

Atsak, P., D. Hauer, P. Campolongo, G. Schelling, J. L. Mcgaugh e B. Roozendaal. Glucocorticoids interact with the hippocampal endocannabinoid system in impairing retrieval of contextual fear memory. Proc Natl Acad Sci U S A, v.109, n.9, Feb 28, p.3504-9. 2012.

Azad, S. C., M. Eder, G. Marsicano, B. Lutz, W. Zieglansberger e G. Rammes. Activation of the cannabinoid receptor type 1 decreases glutamatergic and GABAergic synaptic transmission in the lateral amygdala of the mouse. Learn Mem, v.10, n.2, Mar-Apr, p.116-28. 2003.

Barrett, D. e F. Gonzalez-Lima. Behavioral effects of metyrapone on Pavlovian extinction. Neurosci Lett, v.371, n.2-3, Nov 23, p.91-6. 2004.

Belkebir-Mesbah, D., D. Bonnefont-Rousselot, V. Frey-Fressart, C. Moinard, J. Delattre e M. P. Vasson. Consequences of treatment with dexamethasone in rats on the susceptibility of total plasma and isolated lipoprotein fractions to copper oxidation. Endocrine, v.10, n.3, Jun, p.233-42. 1999.

Beltramo, M., N. Stella, A. Calignano, S. Y. Lin, A. Makriyannis e D. Piomelli. Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. Science, v.277, n.5329, Aug 22, p.1094-7. 1997.

Bitencourt, R. M., F. A. Pamplona e R. N. Takahashi. Facilitation of contextual fear memory extinction and anti-anxiogenic effects of AM404

and cannabidiol in conditioned rats. Eur Neuropsychopharmacol, Aug 13. 2008.

Bitencourt, R. M. P., F.A. Takahashi, R.N. A current overview of cannabinoids and glucocorticoids in facilitating extinction of aversive memories: potential extinction enhancers. Neuropharmacology. 2012 (no prelo).

Blanchard, R. J. e D. C. Blanchard. Crouching as an index of fear. J Comp Physiol Psychol, v.67, n.3, Mar, p.370-5. 1969.

Blundell, J., C. A. Blaiss, D. C. Lagace, A. J. Eisch e C. M. Powell. Block of glucocorticoid synthesis during re-activation inhibits extinction of an established fear memory. Neurobiol Learn Mem, v.95, n.4, May, p.453-60. 2011.

Bodor, A. L., I. Katona, G. Nyiri, K. Mackie, C. Ledent, N. Hajos e T. F. Freund. Endocannabinoid signaling in rat somatosensory cortex: laminar differences and involvement of specific interneuron types. J Neurosci, v.25, n.29, Jul 20, p.6845-56. 2005.

Bohus, B., R. E. De Kloet e H. D. Veldhuis. Adrenal Steroids and Behavioral Adaptation: Relationship to Brain Corticoid Receptors. Adrenal Actions on Brain. Springer-Verlag: Berlin, p.107-148. 1982.

Bouton, M. E. e D. Swartzentruber. Slow Reacquisition Following Extinction - Context, Encoding, and Retrieval Mechanisms. Journal of Experimental Psychology-Animal Behavior Processes, v.15, n.1, Jan, p.43-53. 1989.

Brewin, C. R. e E. A. Holmes. Psychological theories of posttraumatic stress disorder. Clin Psychol Rev, v.23, n.3, May, p.339-76. 2003.

Brooks, D. C. e M. E. Bouton. A Retrieval Cue for Extinction Attenuates Spontaneous-Recovery. Journal of Experimental Psychology-Animal Behavior Processes, v.19, n.1, Jan, p.77-89. 1993.

Cammarota, M., L. R. Bevilaqua, D. M. Barros, M. R. Vianna, L. A. Izquierdo, J. H. Medina e I. Izquierdo. Retrieval and the extinction of memory. Cell Mol Neurobiol, v.25, n.3-4, Jun, p.465-74. 2005.

Campolongo, P., B. Roozendaal, V. Trezza, D. Hauer, G. Schelling, J. L. McGaugh e V. Cuomo. Endocannabinoids in the rat basolateral amygdala enhance memory consolidation and enable glucocorticoid modulation of memory. Proc Natl Acad Sci U S A, v.106, n.12, Mar 24, p.4888-93. 2009.

Cannich, A., C. T. Wotjak, K. Kamprath, H. Hermann, B. Lutz e G. Marsicano. CB1 cannabinoid receptors modulate kinase and phosphatase activity during extinction of conditioned fear in mice. Learn Mem, v.11, n.5, Sep-Oct, p.625-32. 2004.

Chhatwal, J. P., M. Davis, K. A. Maguschak e K. J. Ressler. Enhancing cannabinoid neurotransmission augments the extinction of conditioned fear. Neuropsychopharmacology, v.30, n.3, Mar, p.516-24. 2005.

Clay, R., M. Hebert, G. Gill, L. A. Stapleton, A. Pridham, M. Coady, J. Bishop, R. E. Adamec e J. J. Blundell. Glucocorticoids are required for extinction of predator stress-induced hyperarousal. Neurobiol Learn Mem, v.96, n.2, Sep, p.367-77. 2011.

De Oliveira Alvares, L., D. S. Engelke, F. Diehl, R. Scheffer-Teixeira, J. Haubrich, L. De Freitas Cassini, V. A. Molina e J. A. Quillfeldt. Stress response recruits the hippocampal endocannabinoid system for the modulation of fear memory. Learn Mem, v.17, n.4, Apr, p.202-9. 2010.

De Oliveira Alvares, L., B. Pasqualini Genro, F. Diehl, V. A. Molina e J. A. Quillfeldt. Opposite action of hippocampal CB1 receptors in memory reconsolidation and extinction. Neuroscience, v.154, n.4, Jul 17, p.1648-55. 2008.

De Quervain, D. J., D. Bentz, T. Michael, O. C. Bolt, B. K. Wiederhold, J. Margraf e F. H. Wilhelm. Glucocorticoids enhance extinction-based psychotherapy. Proc Natl Acad Sci U S A, v.108, n.16, Apr 19, p.6621-5. 2011.

Di Marzo, V., A. Fontana, H. Cadas, S. Schinelli, G. Cimino, J. C. Schwartz e D. Piomelli. Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. Nature, v.372, n.6507, Dec 15, p.686-91. 1994.

Di, S., R. Malcher-Lopes, K. C. Halmos e J. G. Tasker. Nongenomic glucocorticoid inhibition via endocannabinoid release in the hypothalamus: a fast feedback mechanism. J Neurosci, v.23, n.12, Jun 15, p.4850-7. 2003.

Di, S., R. Malcher-Lopes, V. L. Marcheselli, N. G. Bazan e J. G. Tasker. Rapid glucocorticoid-mediated endocannabinoid release and opposing regulation of glutamate and gamma-aminobutyric acid inputs to hypothalamic magnocellular neurons. Endocrinology, v.146, n.10, Oct, p.4292-301. 2005.

Di, S., M. M. Maxson, A. Franco e J. G. Tasker. Glucocorticoids regulate glutamate and GABA synapse-specific retrograde transmission via divergent nongenomic signaling pathways. J Neurosci, v.29, n.2, Jan 14, p.393-401. 2009.

Dubreucq, S., M. Koehl, D. N. Abrous, G. Marsicano e F. Chaouloff. CB1 receptor deficiency decreases wheel-running activity: consequences on emotional behaviours and hippocampal neurogenesis. Exp Neurol, v.224, n.1, Jul, p.106-13. 2010.

Egertova, M., D. K. Giang, B. F. Cravatt e M. R. Elphick. A new perspective on cannabinoid signalling: complementary localization of fatty acid amide hydrolase and the CB1 receptor in rat brain. Proc Biol Sci, v.265, n.1410, Nov 7, p.2081-5. 1998.

Fanselow, M. S. Conditioned and unconditional components of post-shock freezing. Pavlov J Biol Sci, v.15, n.4, Oct-Dec, p.177-82. 1980.

Fulford, A. J. e M. S. Harbuz. An introduction to the HPA axis. Elsevier (Handbook of Stress and the Brain). 2005.

Fuxe, K., A. C. Wikstrom, S. Okret, L. F. Agnati, A. Harfstrand, Z. Y. Yu, L. Granholm, M. Zoli, W. Vale e J. A. Gustafsson. Mapping of glucocorticoid receptor immunoreactive neurons in the rat tel- and diencephalon using a monoclonal antibody against rat liver glucocorticoid receptor. Endocrinology, v.117, n.5, Nov, p.1803-12. 1985.

Giuffrida, A., M. Beltramo e D. Piomelli. Mechanisms of endocannabinoid inactivation: biochemistry and pharmacology. J Pharmacol Exp Ther, v.298, n.1, Jul, p.7-14. 2001.

Gold, P. E., S. F. Zornetzer e J. L. Mcgaugh. Electrical stimulation of the brain: effects on memory storage. Adv Psychobiol, v.2, p.193-224. 1974.

- Herkenham, M., A. B. Lynn, M. D. Little, M. R. Johnson, L. S. Melvin, B. R. De Costa e K. C. Rice. Cannabinoid receptor localization in brain. Proc Natl Acad Sci U S A, v.87, n.5, Mar, p.1932-6. 1990.
- Herry, C., F. Ferraguti, N. Singewald, J. J. Letzkus, I. Ehrlich e A. Luthi. Neuronal circuits of fear extinction. Eur J Neurosci, v.31, n.4, Feb, p.599-612. 2010.
- Hill, M. N., W. S. Ho, S. E. Meier, B. B. Gorzalka e C. J. Hillard. Chronic corticosterone treatment increases the endocannabinoid 2-arachidonylglycerol in the rat amygdala. Eur J Pharmacol, v.528, n.1-3, Dec 28, p.99-102. 2005.
- Hill, M. N. e B. S. Mcewen. Endocannabinoids: The silent partner of glucocorticoids in the synapse. Proc Natl Acad Sci U S A, v.106, n.12, Mar 24, p.4579-80. 2009.
- Hill, M. N., R. J. Mclaughlin, B. Pan, M. L. Fitzgerald, C. J. Roberts, T. T. Lee, I. N. Karatsoreos, K. Mackie, V. Viau, V. M. Pickel, B. S. Mcewen, Q. S. Liu, B. B. Gorzalka e C. J. Hillard. Recruitment of Prefrontal Cortical Endocannabinoid Signaling by Glucocorticoids Contributes to Termination of the Stress Response. J Neurosci, v.31, n.29, Jul 20, p.10506-10515. 2011.
- Ioannou, N., C. Liapi, C. E. Sekeris e G. Palaiologos. Effects of dexamethasone on K(+)-evoked glutamate release from rat hippocampal slices. Neurochem Res, v.28, n.6, Jun, p.875-81. 2003.
- Joels, M. e T. Z. Baram. The neuro-symphony of stress. Nat Rev Neurosci, v.10, n.6, Jun, p.459-66. 2009.
- Kamprath, K., G. Marsicano, J. Tang, K. Monory, T. Bisogno, V. Di Marzo, B. Lutz e C. T. Wotjak. Cannabinoid CB1 receptor mediates fear extinction via habituation-like processes. J Neurosci, v.26, n.25, Jun 21, p.6677-86. 2006.
- Kaplan, G. B. e K. A. Moore. The use of cognitive enhancers in animal models of fear extinction. Pharmacol Biochem Behav, Jan 20. 2011.
- Katona, I., B. Sperlagh, Z. Magloczky, E. Santha, A. Kofalvi, S. Czirjak, K. Mackie, E. S. Vizi e T. F. Freund. GABAergic interneurons are the targets of cannabinoid actions in the human hippocampus. Neuroscience, v.100, n.4, p.797-804. 2000.

Katona, I., B. Sperlagh, A. Sik, A. Kafalvi, E. S. Vizi, K. Mackie e T. F. Freund. Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons. J Neurosci, v.19, n.11, Jun 1, p.4544-58. 1999.

Kessler, R. C., W. T. Chiu, O. Demler, K. R. Merikangas e E. E. Walters. Prevalence, severity, and comorbidity of 12-month DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. Arch Gen Psychiatry, v.62, n.6, Jun, p.617-27. 2005.

Kofalvi, A., M. F. Pereira, N. Rebola, R. J. Rodrigues, C. R. Oliveira e R. A. Cunha. Anandamide and NADA bi-directionally modulate presynaptic Ca²⁺ levels and transmitter release in the hippocampus. Br J Pharmacol, v.151, n.4, Jun, p.551-63. 2007.

Kofalvi, A., R. J. Rodrigues, C. Ledent, K. Mackie, E. S. Vizi, R. A. Cunha e B. Sperlagh. Involvement of cannabinoid receptors in the regulation of neurotransmitter release in the rodent striatum: a combined immunochemical and pharmacological analysis. J Neurosci, v.25, n.11, Mar 16, p.2874-84. 2005.

Kofalvi, A., E. S. Vizi, C. Ledent e B. Sperlagh. Cannabinoids inhibit the release of [3H]glutamate from rodent hippocampal synaptosomes via a novel CB1 receptor-independent action. Eur J Neurosci, v.18, n.7, Oct, p.1973-8. 2003.

Lafenetre, P., F. Chaouloff e G. Marsicano. The endocannabinoid system in the processing of anxiety and fear and how CB1 receptors may modulate fear extinction. Pharmacol Res, v.56, n.5, Nov, p.367-81. 2007.

Lebron, K., M. R. Milad e G. J. Quirk. Delayed recall of fear extinction in rats with lesions of ventral medial prefrontal cortex. Learn Mem, v.11, n.5, Sep-Oct, p.544-8. 2004.

Lin, H. C., S. C. Mao, C. L. Su e P. W. Gean. The role of prefrontal cortex CB1 receptors in the modulation of fear memory. Cereb Cortex, v.19, n.1, Jan, p.165-75. 2009.

Malcher-Lopes, R., S. Di, V. S. Marcheselli, F. J. Weng, C. T. Stuart, N. G. Bazan e J. G. Tasker. Opposing crosstalk between leptin and

glucocorticoids rapidly modulates synaptic excitation via endocannabinoid release. J Neurosci, v.26, n.24, Jun 14, p.6643-50. 2006.

Marsicano, G. e B. Lutz. Expression of the cannabinoid receptor CB1 in distinct neuronal subpopulations in the adult mouse forebrain. Eur J Neurosci, v.11, n.12, Dec, p.4213-25. 1999.

Marsicano, G., C. T. Wotjak, S. C. Azad, T. Bisogno, G. Rammes, M. G. Cascio, H. Hermann, J. Tang, C. Hofmann, W. Zieglgansberger, V. Di Marzo e B. Lutz. The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. Nature, v.418, n.6897, Aug 1, p.530-4. 2002.

Meikle, A. W. e F. H. Tyler. Potency and duration of action of glucocorticoids. Effects of hydrocortisone, prednisone and dexamethasone on human pituitary-adrenal function. Am J Med, v.63, n.2, Aug, p.200-7. 1977.

Milad, M. R. e G. J. Quirk. Neurons in medial prefrontal cortex signal memory for fear extinction. Nature, v.420, n.6911, Nov 7, p.70-4. 2002.

Milad, M. R., I. Vidal-Gonzalez e G. J. Quirk. Electrical stimulation of medial prefrontal cortex reduces conditioned fear in a temporally specific manner. Behav Neurosci, v.118, n.2, Apr, p.389-94. 2004.

Monfils, M. H., K. K. Cowansage, E. Klann e J. E. Ledoux. Extinction-reconsolidation boundaries: key to persistent attenuation of fear memories. Science, v.324, n.5929, May 15, p.951-5. 2009.

Moreira, F. A., D. C. Aguiar, A. C. Campos, S. F. Lisboa, A. L. Terzian, L. B. Resstel e F. S. Guimaraes. Antiaversive effects of cannabinoids: is the periaqueductal gray involved? Neural Plast, v.2009, p.625469. 2009.

Morgan, M. A., L. M. Romanski e J. E. Ledoux. Extinction of emotional learning: contribution of medial prefrontal cortex. Neurosci Lett, v.163, n.1, Nov 26, p.109-13. 1993.

Mueller, D., J. T. Porter e G. J. Quirk. Noradrenergic signaling in infralimbic cortex increases cell excitability and strengthens memory for fear extinction. J Neurosci, v.28, n.2, Jan 9, p.369-75. 2008.

Myers, K. M. e M. Davis. Mechanisms of fear extinction. Mol Psychiatry, v.12, n.2, Feb, p.120-50. 2007.

Napier, R. M., M. Macrae e E. J. Kehoe. Rapid Reacquisition in Conditioning of the Rabbits Nictitating-Membrane Response. Journal of Experimental Psychology-Animal Behavior Processes, v.18, n.2, Apr, p.182-192. 1992.

Ninomiya, E. M., B. J. Martynhak, J. M. Zanello, D. Correia, C. Da Cunha e R. Andreatini. Spironolactone and low-dose dexamethasone enhance extinction of contextual fear conditioning. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, v.34, n.7, Oct 1, p.1229-35. 2010.

Niyuhire, F., S. A. Varvel, A. J. Thorpe, R. J. Stokes, J. L. Wiley e A. H. Lichtman. The disruptive effects of the CB1 receptor antagonist rimonabant on extinction learning in mice are task-specific. Psychopharmacology (Berl), v.191, n.2, Apr, p.223-31. 2007.

Oitzl, M. S., M. Fluttert, W. Sutanto e E. R. De Kloet. Continuous blockade of brain glucocorticoid receptors facilitates spatial learning and memory in rats. Eur J Neurosci, v.10, n.12, Dec, p.3759-66. 1998.

Pacher, P., S. Batkai e G. Kunos. The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. Pharmacol Rev, v.58, n.3, Sep, p.389-462. 2006.

Pamplona, F. A., R. M. Bitencourt e R. N. Takahashi. Short- and long-term effects of cannabinoids on the extinction of contextual fear memory in rats. Neurobiol Learn Mem, v.90, n.1, Jul, p.290-3. 2008.

Pamplona, F. A., R. D. Prediger, P. Pandolfo e R. N. Takahashi. The cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 facilitates the extinction of contextual fear memory and spatial memory in rats. Psychopharmacology (Berl), v.188, n.4, Nov, p.641-9. 2006.

Pape, H. C. e D. Pare. Plastic synaptic networks of the amygdala for the acquisition, expression, and extinction of conditioned fear. Physiol Rev, v.90, n.2, Apr, p.419-63. 2010.

Patel, S., C. T. Roelke, D. J. Rademacher e C. J. Hillard. Inhibition of restraint stress-induced neural and behavioural activation by endogenous cannabinoid signalling. Eur J Neurosci, v.21, n.4, Feb, p.1057-69. 2005.

Pavlov, I. P. Conditioned Reflexes. London: Oxford University Press. 1927

Paxinos, G. e C. Watson. The rat brain in stereotaxic coordinates. San Diego, Calif.: Academic Press. 2002. 256 s. p.

Pearce, J. M. e G. Hall. A model for Pavlovian learning: variations in the effectiveness of conditioned but not of unconditioned stimuli. Psychol Rev, v.87, n.6, Nov, p.532-52. 1980.

Pertwee, R. G. Cannabinoid pharmacology: the first 66 years. Br J Pharmacol, v.147 Suppl 1, Jan, p.S163-71. 2006.

Peters, J., P. W. Kalivas e G. J. Quirk. Extinction circuits for fear and addiction overlap in prefrontal cortex. Learn Mem, v.16, n.5, May, p.279-88. 2009.

Plendl, W. e C. T. Wotjak. Dissociation of within- and between-session extinction of conditioned fear. J Neurosci, v.30, n.14, Apr 7, p.4990-8. 2010.

Prager, E. M. e L. R. Johnson. Stress at the synapse: signal transduction mechanisms of adrenal steroids at neuronal membranes. Sci Signal, v.2, n.86, p.re5. 2009.

Quirk, G. J., R. Garcia e F. Gonzalez-Lima. Prefrontal mechanisms in extinction of conditioned fear. Biol Psychiatry, v.60, n.4, Aug 15, p.337-43. 2006.

Quirk, G. J., E. Likhtik, J. G. Pelletier e D. Pare. Stimulation of medial prefrontal cortex decreases the responsiveness of central amygdala output neurons. J Neurosci, v.23, n.25, Sep 24, p.8800-7. 2003.

Quirk, G. J. e D. Mueller. Neural mechanisms of extinction learning and retrieval. Neuropsychopharmacology, v.33, n.1, Jan, p.56-72. 2008.

Quirk, G. J., D. Pare, R. Richardson, C. Herry, M. H. Monfils, D. Schiller e A. Vicentic. Erasing fear memories with extinction training. J Neurosci, v.30, n.45, Nov 10, p.14993-7. 2010.

Rahmouni, K., M. Barthelmebs, M. Grima, J. L. Imbs e W. De Jong. Involvement of brain mineralocorticoid receptor in salt-enhanced hypertension in spontaneously hypertensive rats. Hypertension, v.38, n.4, Oct, p.902-6. 2001.

Rescorla, R. A. e C. D. Heth. Reinstatement of fear to an extinguished conditioned stimulus. J Exp Psychol Anim Behav Process, v.1, n.1, Jan, p.88-96. 1975.

Riebe, C. J., F. Pamplona, K. Kamprath e C. T. Wotjak. Fear relief-toward a new conceptual frame work and what endocannabinoids gotta do with it. Neuroscience, v.204, Mar 1, p.159-85. 2012.

Rudy, J. W., N. C. Huff e P. Matus-Amat. Understanding contextual fear conditioning: insights from a two-process model. Neurosci Biobehav Rev, v.28, n.7, Nov, p.675-85. 2004.

Ruehle, S., A. Aparisi Rey, F. Remmers e B. Lutz. The endocannabinoid system in anxiety, fear memory and habituation. J Psychopharmacol, Aug 11. 2011.

Schelling, G., E. Kilger, B. Roozendaal, D. J. De Quervain, J. Briegel, A. Dage, H. B. Rothenhausler, T. Krauseneck, G. Nollert e H. P. Kapfhammer. Stress doses of hydrocortisone, traumatic memories, and symptoms of posttraumatic stress disorder in patients after cardiac surgery: a randomized study. Biol Psychiatry, v.55, n.6, Mar 15, p.627-33. 2004.

Sotres-Bayon, F., C. K. Cain e J. E. Ledoux. Brain mechanisms of fear extinction: historical perspectives on the contribution of prefrontal cortex. Biol Psychiatry, v.60, n.4, Aug 15, p.329-36. 2006.

Sotres-Bayon, F. e G. J. Quirk. Prefrontal control of fear: more than just extinction. Curr Opin Neurobiol, v.20, n.2, Apr, p.231-5. 2010.

Suzuki, A., S. A. Josselyn, P. W. Frankland, S. Masushige, A. J. Silva e S. Kida. Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. J Neurosci, v.24, n.20, May 19, p.4787-95. 2004.

Tasker, J. G., S. Di e R. Malcher-Lopes. Minireview: rapid glucocorticoid signaling via membrane-associated receptors. Endocrinology, v.147, n.12, Dec, p.5549-56. 2006.

Van Acker, S. A., M. F. Fluttert, R. M. Sibug e E. R. De Kloet. Intracerebroventricular administration of a glucocorticoid receptor antagonist enhances the cardiovascular responses to brief restraint stress. Eur J Pharmacol, v.430, n.1, Oct 26, p.87-91. 2001.

Wang, C. C. e S. J. Wang. Modulation of presynaptic glucocorticoid receptors on glutamate release from rat hippocampal nerve terminals. Synapse, v.63, n.9, Sep, p.745-51. 2009.

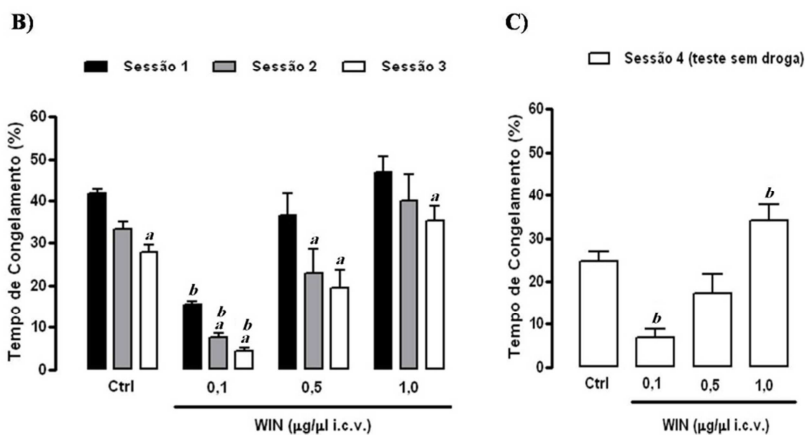
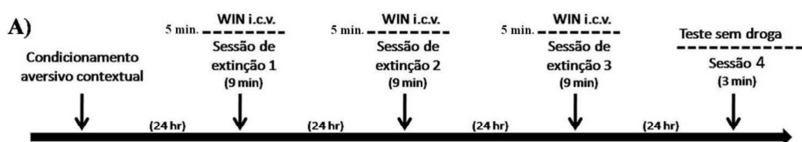
Wedzony, K. e A. Chocyk. Cannabinoid CB1 receptors in rat medial prefrontal cortex are colocalized with calbindin- but not parvalbumin- and calretinin-positive GABA-ergic neurons. Pharmacol Rep, v.61, n.6, Nov-Dec, p.1000-7. 2009.

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

Yang, Y. L., P. K. Chao, L. S. Ro, Y. Y. Wo e K. T. Lu. Glutamate NMDA receptors within the amygdala participate in the modulatory effect of glucocorticoids on extinction of conditioned fear in rats. Neuropsychopharmacology, v.32, n.5, May, p.1042-51. 2007.

Yehuda, R., J. A. Golier, S. L. Halligan, M. Meaney e L. M. Bierer. The ACTH response to dexamethasone in PTSD. Am J Psychiatry, v.161, n.8, Aug, p.1397-403. 2004.

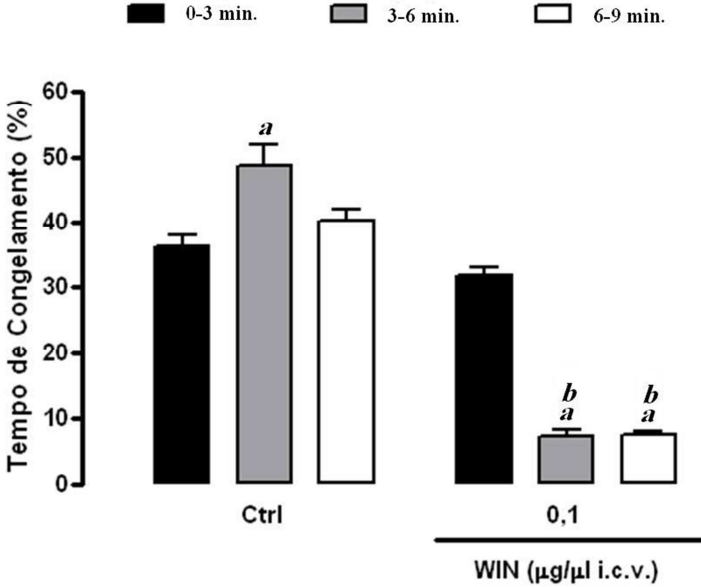
Apêndice 1



Apêndice 1 – Efeitos da administração i.c.v. do agonista dos receptores canabinóides do tipo CB₁, o WIN55212-2 (WIN 0,1; 0,5; 1,0 µg/µl), na extinção do CA contextual. (A) Representação esquemática do procedimento utilizado neste experimento. (B) Média + E.P.M. da % de tempo de congelamento expressa pelos animais tratados com WIN i.c.v. e submetidos a 3 exposições de 9 min. à gaiola de condicionamento, com intervalo de 24 h (cada barra representa os dados de uma sessão). (C) Média + E.P.M. da % do tempo de congelamento expressa pelos mesmos grupos de animais durante uma única exposição de 3 min. à gaiola de condicionamento, na ausência de tratamento farmacológico, 24 h após a última sessão de extinção. A ANOVA com medidas repetidas para os resultados da administração de WIN nas três sessões de extinção revelou efeito significativo para os fatores tratamento [$F_{(3,25)}=19,75$; $p < 0,0001$] e sessão de extinção [$F_{(2,50)}=30,55$; $p < 0,0001$]. A ANOVA de uma via para os dados do teste sem droga (sessão 4) revelou um efeito significativo para o fator tratamento [$F_{(3,25)}=12,91$; $p < 0,0001$]. (a) $p < 0,05$ comparado à primeira sessão do respectivo grupo. (b) $p < 0,05$ comparado à respectiva sessão do grupo controle (teste *post hoc* de Newman-Keuls). (Controle/n=7, WIN 0,1/n=7, WIN 0,5/n=7, WIN 1,0/n=8).

Apêndice 2

SESSÃO 1



Apêndice 2 – Efeitos da administração i.c.v. do agonista dos receptores canabinóides do tipo CB_1 , o WIN55212-2 (WIN 0,1; 0,5; 1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), na primeira sessão de extinção do CA contextual dividida em blocos de 3 min. Média + E.P.M. da % de tempo de congelamento expressa pelos animais tratados com WIN i.c.v. e submetidos a primeira exposição de 9 min. à gaiola de condicionamento dividida em blocos de 3min. (cada barra representa os dados de um destes blocos de 3 min.). A ANOVA de duas vias para os resultados da administração de WIN na primeira sessão de extinção revelou efeito significativo para os fatores tratamento [$F_{(1,36)} = 311,64$; $p < 0,0001$], blocos de 3 min. na primeira sessão [$F_{(2,36)} = 15,58$; $p < 0,0001$] e para a interação entre estes fatores [$F_{(2,36)} = 56,18$; $p < 0,00001$] (a) $p < 0,05$ comparado ao primeiro bloco de 3min (0-3) do respectivo grupo. (b) $p < 0,05$ comparado ao respectivo bloco de 3 min. do grupo controle (teste *post hoc* de Newman-Keuls). (Controle/ $n=7$, WIN 0,1/ $n=7$, WIN 0,5/ $n=7$, WIN 1,0/ $n=8$).

“Tudo vale a pena se a alma não é pequena.”

Fernando Pessoa