

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

JOSÉ INÁCIO LEMOS MONTEIRO CARVALHO

**Efeitos do canabidiol sobre estruturas encefálicas envolvidas
com a resposta emocional condicionada contextual**

Ribeirão Preto – SP

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

JOSÉ INÁCIO LEMOS MONTEIRO CARVALHO

**Efeitos do canabidiol sobre estruturas encefálicas envolvidas
com a resposta emocional condicionada contextual**

Tese apresentada ao Departamento de Farmacologia
da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Farmacologia.

Área de Concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Francisco Silveira Guimarães

Ribeirão Preto – SP

2008

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR
QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO,
DESDE QUE CITADA A FONTE.

Carvalho, José Inácio Lemos Monteiro.

Efeitos do canabidiol sobre estruturas encefálicas envolvidas com a resposta emocional condicionada contextual./ José Inácio Lemos Monteiro Carvalho; orientador Francisco Silveira Guimarães. Ribeirão Preto, 2008.

116 f. fig. 25.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Farmacologia – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

1. Canabidiol, 2. Resposta emocional condicionada contextual, 3. c-Fos, 4. medo aprendido.

FOLHA DE APROVAÇÃO

José Inácio Lemos Monteiro Carvalho
Efeitos do canabidiol sobre estruturas encefálicas
envolvidas com a REC contextual.

Tese apresentada ao Departamento de
Farmacologia da Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de doutor.

Área de Concentração: Farmacologia.

Aprovado em: / /

Banca Examinadora

Prof. Dr. (orientador): Francisco Silveira Guimarães

Instituição: FMRP-USP Assinatura: _____

Prof. Dr. : Norberto Cysne Coimbra

Instituição: FMRP-USP Assinatura: _____

Prof. Dr. : José Alexandre Crippa

Instituição: FMRP-USP Assinatura: _____

Prof. Dr. : Marcus Lira Brandão

Instituição: FFCLRP-USP Assinatura: _____

Prof. Dr.: Reinaldo Naoto Takahashi

Instituição: UFSC Assinatura: _____

À minha família, que me ensinou, desde pequeno, que o “ser” e o “saber” são mais importantes que o “ter” e o “parecer”.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer a uma “Força Superior” que, quando pequeno, fui ensinado a chamar de Deus. Apesar de não acreditar algumas vezes, sempre que pedi ajuda e força, eu a recebi, muitas vezes sem saber de onde.

À minha querida mãe Isabel que sempre me ensinou, através de seus atos, a importância de buscar as coisas nas quais acredito e me dedicar para conquistá-las. Por me ensinar que o importante é “o ser” e não “o ter” e, que guardar rancor das pessoas é sempre mais prejudicial a mim mesmo. Pelo amor, pelo incentivo e por oferecer, mesmo com muito sacrifício, uma excelente educação.

À minha avó Izabel, pelo excelente exemplo de simplicidade e bondade, pelas palavras sábias e pelos ensinamentos.

À minha tia Isolina, que sempre foi uma mãe, por todo carinho e incentivo e por possibilitar que eu continuasse os estudos e fosse para Florianópolis e viesse para Ribeirão Preto.

Aos meus irmãos: Camila, Carina, Tarcisio, Jivago e Chiara, pelo enorme incentivo e pelas demonstrações de carinho.

Aos meus tios Zeca, Iraci, Ivanilde e Irene que, mesmo longe, sempre torceram pelo meu sucesso.

À minha querida Suélen pelo carinho e incentivo, importantíssimo para a conclusão da etapa final deste trabalho.

Ao meu orientador professor Francisco Guimarães pelo apoio e valorização do meu trabalho e do meu esforço.

À professora Gina Morato e ao professor Gustavo Ballejo, que foram essenciais na minha formação científica. Pela amizade e pelo exemplo de dedicação ao trabalho e prazer pelos estudos.

À professora Setsuko, por me dar acesso ao meio científico ao abrir as portas do Laboratório de Neurofisiologia da UFPA, quando todas as outras me tinham sido fechadas.

Aos colegas de laboratório, em especial Alline e Frederico, por me mostrarem que, apesar da minha personalidade forte, é possível trocar informações e trabalhar em conjunto.

A Eleni que não foi apenas uma técnica no laboratório, mas também foi uma “mãe” aqui em Ribeirão Preto, que sempre me ouviu e me ajudou nos momentos mais difíceis.

Ao amigo José Carlos Aguiar que sempre se dispôs a solucionar problemas no laboratório.

Aos amigos Joseane (Joice), Francisco (Chicão), Luiz, Ciro, Maristela, pelo incentivo, pelos momentos de descontração e pelas reflexões sobre Ciência.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia, em especial Sônia, Fátima e Ramon que sempre foram solícitos e dispostos a esclarecer dúvidas e ajudar no que fosse possível.

Aos amigos da “terrinha” Castanhal e do pensionato da Jô em Ribeirão Preto, pelo incentivo e pelos momentos de descontração.

Às pessoas que se dedicam à ciência, em especial pesquisadores que se dedicam ao estudo do Sistema Nervoso Central. Aos pesquisadores que estudam modelos de ansiedade, medo aprendido e/ou sistema endocanabinóide, por oferecerem o embasamento teórico para que objetivos fossem determinados, resultados interpretados e discutidos e, conclusões propostas.

À THC Pharma (Alemanha) pela doação do canabidiol utilizado neste estudo. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro.

Aos animais utilizados nesse estudo que, apesar de serem considerados por alguns seres inferiores a nós, nos auxiliam na compreensão de fenômenos biológicos que ocorrem também em humanos.

*“Você alcança seu objetivo e percebe
que ele não está mais lá”*

(Paulinho Moska)

RESUMO

CARVALHO, J.I.L.M. **Efeitos do canabidiol sobre estruturas cerebrais envolvidas com a resposta emocional condicionada contextual.** 2008. 116 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

Estudos prévios do laboratório mostraram que o tratamento sistêmico com canabidiol (CBD) atenuou as alterações cardiovasculares (pressão arterial e frequência cardíaca) bem como os efeitos comportamentais (congelamento) provocados pela reexposição ao contexto previamente pareado com choques nas patas (RESSTEL et al., 2006). Entretanto, pouco se sabe sobre quais áreas cerebrais podem estar envolvidas no efeito ansiolítico do CBD no modelo experimental presentemente estudado. Assim, o objetivo do presente estudo foi identificar, através da técnica de imunorreatividade à proteína c-Fos, quais áreas encefálicas ativadas pelo protocolo experimental poderiam ser alteradas pelo tratamento sistêmico com CBD antes da re-exposição ao contexto aversivo. Observou-se que os animais condicionados tratados com CBD apresentaram menor imunorreatividade à proteína c-Fos nas regiões pré-límbica (PL) e infralímbica (IL) do córtex pré-frontal medial (CPFm), bem como nas regiões medial anterior, lateral dorsal e ventral do leito do núcleo da estria terminal, sendo que houve correlação positiva entre o tempo de congelamento e a densidade de células marcadas para c-Fos apenas nas regiões medial anterior e ventral dessa estrutura. Em experimentos posteriores, observou-se que microinjeções de CBD diretamente no PL atenuaram o congelamento, enquanto que microinjeções no IL apresentaram efeito oposto. Portanto, os resultados do presente estudo sugerem que as regiões medial anterior e ventral do núcleo do leito da estria terminal e também a região pré-límbica do CPFm podem estar envolvidas no efeito do tratamento sistêmico do CBD sobre a resposta emocional condicionada (REC) contextual.

Palavras chaves: canabidiol, medo condicionado contextual, c-Fos, córtex pré-frontal, núcleo do leito da estria terminal.

ABSTRACT

CARVALHO, J.I.L.M. **Effects of cannabidiol in the brain structures involved in contextual conditioned emotional response.** 2008. 116 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

A previous result of our lab showed that the systemic administration of cannabidiol (CBD) attenuated the cardiovascular (blood pressure and heart rate) and the behavioral (freezing time) changes induced by the re-exposition to the context paired previously with footshocks (RESSTEL et al., 2006). However there is a paucity of data regarding which brain structures may be involved in the anxiolytic-like effect of CBD in this model. Thus, the aim of this study was to investigate, using c-Fos immunocytochemistry technique, which brain areas activated by experimental procedure could be affected by CBD given before the re-exposition to the aversive context. We found that the conditioned animals treated with CBD showed lower levels of c-Fos in the bed nucleus of stria terminalis (medial anterior, dorso lateral and ventral regions) and in the prefrontal cortex (prelimbic and infralimbic regions) compared to respective control group. The correlation analysis revealed a positive correlation between the freezing time and the density of Fos labeled cells in the medial anterior and ventral regions of the bed nucleus of stria terminalis. Additional experiments showed that the microinjection of CBD into the prelimbic prefrontal cortex reduced freezing time. On the other hand, injections of CBD into the infralimbic cortex increased this behavioral response. Therefore, the results of this study suggest that the bed nucleus of stria terminalis (anterior medial and ventral regions) and the prelimbic prefrontal cortex may be involved in the reduced fear expression induced by systemic injection of CBD.

Keywords: cannabidiol, contextual fear conditioning, c-Fos, prefrontal cortex, bed nucleus of stria terminalis.

Lista de figuras

Figura 1. Efeito ansiolítico do canabidiol sobre a REC.

Figura 2. Fotomicrografias representativas da expressão da proteína c-Fos em encéfalos de animais condicionados e tratados com veículo.

Figura 3. Imunorreatividade à proteína c-Fos no núcleo central do complexo amigdalóide.

Figura 4. Fotomicrografias representativas da expressão da proteína c-Fos no núcleo central do complexo amigdalóide dos diversos grupos experimentais.

Figura 5. Imunorreatividade à proteína c-Fos na região medial anterior do núcleo do leito da estria terminal.

Figura 6. Imunorreatividade à proteína c-Fos na região dorsolateral do núcleo do leito da estria terminal.

Figura 7. Imunorreatividade à proteína c-Fos na região ventral do núcleo do leito da estria terminal.

Figura 8. Fotomicrografias representativas da expressão da proteína c-Fos na região medial anterior do núcleo do leito da estria terminal dos diversos grupos experimentais.

Figura 9. Fotomicrografias representativas da expressão da proteína c-Fos na região dorsolateral do núcleo do leito da estria terminal dos diversos grupos experimentais.

Figura 10. Fotomicrografias representativas da expressão da proteína c-Fos na região ventral do núcleo do leito da estria terminal dos diversos grupos experimentais.

Figura 11. Imunorreatividade à proteína c-Fos na região Cg1 do córtex pré-frontal medial

Figura 12. Imunorreatividade à proteína c-Fos na região pré-límbica do córtex pré-frontal medial.

Figura 13. Imunorreatividade à proteína c-Fos na região infralímbica do córtex pré-frontal medial.

Figura 14. Fotomicrografias representativas da expressão da proteína c-Fos na região Cg1 do córtex pré-frontal medial dos diversos grupos experimentais.

Figura 15. Fotomicrografias representativas da expressão da proteína c-Fos na região pré-límbica do córtex pré-frontal medial dos diversos grupos experimentais.

Figura 16. Fotomicrografias representativas da expressão da proteína c-Fos na região infra-límbica do córtex pré-frontal medial dos diversos grupos experimentais.

Figura 17. Imunorreatividade à proteína c-Fos no núcleo paraventricular do hipotálamo.

Figura 18. Imunorreatividade à proteína c-Fos na coluna dorsomedial da substância cinzenta periaquedutal.

Figura 19. Imunorreatividade à proteína c-Fos na coluna dorsolateral da substância cinzenta periaquedutal.

Figura 20. Imunorreatividade à proteína c-Fos na coluna lateral da substância cinzenta periaquedutal.

Figura 21. Imunorreatividade à proteína c-Fos na coluna ventrolateral (rostral) da substância cinzenta periaquedutal.

Figura 22. Imunorreatividade à proteína c-Fos na coluna ventrolateral (caudal) da substância cinzenta periaquedutal.

Figura 23. Fotomicrografias representativas da expressão da proteína c-Fos na coluna dorsolateral da substância cinzenta periaquedutal dorsolateral dos diversos grupos experimentais.

Figura 24. Efeito da microinjeção de CBD no córtex pré-frontal pré-límbico sobre a REC.

Figura 25. Efeito da microinjeção de CBD no córtex pré-frontal infralímbico sobre a REC.

Lista de abreviaturas

- ABC** – complexo avidina-biotina
- ACTH** – hormônio adrenocorticotrófico
- AMPc** – monofosfato cíclico de adenosina
- BDNF** – fator de crescimento derivado do encéfalo
- CB1** – receptor canabinoide do tipo 1
- CBD** – canabidiol
- CeA** – núcleo central da complexo amigdalóide
- Cg1** – córtex cingulado anterior
- CPFm** – córtex pré-frontal medial
- CRE** – elemento de resposta do AMP cíclico
- CREB** – elemento de ligação em resposta ao AMP cíclico
- DNA** – ácido desoxirribonucléico
- EPM** – erro padrão da média
- IL** – córtex pré-frontal infralímbico
- IRF** – imunorreatividade à proteína c-Fos
- LTP** – potenciação a longo termo
- PBS** – tampão fosfato em salina
- PL** – córtex pré-frontal pré-límbico
- REC** – resposta emocional condicionada
- RNA** – ácido ribonucléico
- SCP** – substância cinzenta periaquedutal
- SCPVL** – substância cinzenta periaquedutal ventrolateral
- SER** – elemento sérico de resposta
- TBS** – tampão TRIS em salina

TRPV1 – receptor vanilóide tipo 1

Δ^9 -THC – delta-9-tetra-hidrocanabinol

5-HT-1A – receptor tipo 1A da serotonina

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1. Canabinóides e sistema endocanabinóide | 1 |
| 1.2. Efeitos de Canabinóides e drogas que atuam no sistema endocanabinóide na ansiedade e em modelos animais de ansiedade | 2 |
| 1.3. Medo condicionado e substratos neurais envolvidos com a resposta emocional condicionada contextual. | 4 |
| 1.4. Imunoistoquímica para visualização da proteína c-Fos como ferramenta para identificar áreas cerebrais envolvidas em modelos comportamentais. | 9 |
| 2. OBJETIVOS | 14 |
| 2.1. Objetivo geral: | 14 |
| 2.1. Objetivos específicos: | 14 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 15 |
| 3.1. Animais | 15 |
| 3.2. Protocolo de condicionamento ao contexto (resposta emocional condicionada contextual) | 15 |
| 3.3. Efeito do canabidiol na expressão da proteína c-Fos induzida pela Resposta Emocional Condicionada Contextual | 16 |
| 3.4. Processamento histológico e imunoistoquímica para detecção da proteína Fos | 16 |
| 3.5. Análise qualitativa da imunomarcção da proteína c-Fos induzida pela REC | 18 |
| 3.6. Análise quantitativa da imunorreatividade à proteína c-Fos nas estruturas cerebrais ativadas pela resposta emocional condicionada contextual (REC) | 18 |
| 3.7. Microinjeções de CBD no córtex pré-frontal medial | 19 |
| 3.8. Análise de dados e estatística | 20 |
| 4. RESULTADOS | 21 |
| 4.1. Efeito ansiolítico da administração sistêmica de canabidiol sobre a REC | 21 |
| 4.2. Resultados da análise qualitativa da imunomarcção da proteína c-Fos | 22 |
| 4.3. Análise quantitativa da imunomarcção da proteína c-Fos no núcleo central | 23 |

| | |
|--|-----------|
| do complexo amigdalóide | |
| 4.4. Análise quantitativa da imunomarcção da proteína c-Fos no “núcleo do leito da estria terminal” | 24 |
| 4.5. Análise quantitativa da imunomarcção da proteína c-Fos no córtex pré-frontal medial (porções Cg1, pré-límbica e infralímbica). | 30 |
| 4.6. Análise quantitativa da imunomarcção da proteína c-Fos no núcleo paraventricular do hipotálamo. | 35 |
| 4.7. Análise quantitativa da imunomarcção da proteína c-Fos na substância cinzenta periaquedutal (colunas dorsomedial, dorsolateral, lateral e ventrolateral). | 35 |
| 4.8. Efeito das microinjeções de canabidiol no córtex pré-frontal pré-límbico sobre a REC contextual. | 40 |
| 4.9. Efeito das microinjeções de canabidiol no córtex pré-frontal infralímbico sobre a REC contextual | 40 |
| 5. DISCUSSÃO | 42 |
| 6. CONCLUSÕES | 59 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 60 |
| ANEXO 1 – Primeira versão do artigo científico | 72 |

1- INTRODUÇÃO

1.1. Canabinóides e sistema endocanabinóide

Preparações de *Cannabis sativa* são usadas desde muitos séculos antes de Cristo no Egito e na Índia com fins recreativos e terapêuticos (AMERI, 1999). Entretanto, apenas em meados do século XX que os principais constituintes químicos da *Cannabis* foram isolados e identificados, sendo o Δ^9 -THC (delta-9-tetra-hidrocanabinol), composto responsável pela maioria dos seus efeitos psicotrópicos, isolado por Gaoni e Mechoulam em 1964 (DI MARZO et al., 1998). Posteriormente, receptores canabinóides foram identificados (DEVANE et al., 1988) e clonados (MATSUDA et al., 1990), sendo seus ligantes endógenos descobertos em 1992, por Devane et al. Muitos dos efeitos da *Cannabis* são mediados por receptores CB1 centrais que também podem ser ativados por ligantes endógenos (endocanabinóides) derivados de precursores lipídicos a partir da clivagem dos mesmos por fosfolipases específicas (DI MARZO et al., 1994).

O sistema de neurotransmissão endocanabinóide apresenta função neuromodulatória inibitória atuando como mensageiro retrógrado. Após a síntese pelos neurônios pós-sinápticos, que é promovida pela despolarização e entrada de Ca^{2+} nesses neurônios, os endocanabinóides se difundem passivamente pela membrana pós-sináptica, podendo agir em receptores pré-sinápticos e bloquear a entrada de Ca^{2+} no terminal pré-sináptico inibindo a fusão e liberação de vesículas de neurotransmissores (WILSON e NICOLL, 2002; para revisão consultar DI MARZO et al., 1998; PIOMELLI, 2003).

Além do Δ^9 -THC, diversos outros compostos biologicamente ativos estão presentes nos extratos da planta, sendo que alguns deles, o canabidiol (CBD), por exemplo, não exercem efeitos através de ligação a receptores canabinóides. Ao contrário do THC, os alvos moleculares do canabidiol ainda não foram completamente elucidados; porém, alguns estudos mostram evidências de uma ação antagonista em receptores CB1 e CB2 (PETITET et al.,

1998; THOMAS et al., 2007), agonista em receptores vanilóides (TRPV1), inibição do transporte e degradação do endocanabinóide anandamida (BISOGLIO et al., 2001), inibição do transporte de adenosina (CARRIER, AUCHAMPACH e HILLARD, 2006), bem como uma ação agonista em receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A} (RUSSO et al., 2005; MISHIMA et al., 2005) e modulador alostérico de receptores μ e delta opióides (KATHMANN et al., 2006).

Dentre as possíveis aplicações clínicas do canabidiol, destacam-se suas ações anticonvulsivantes (CARLINI e CUNHA, 1981), anti-reumáticas e antioxidantes (MECHOULAM et al., 2002), bem como antipsicóticas (MOREIRA e GUIMARÃES, 2005; ZUARDI, RODRIGUES e CUNHA, 1991; ZUARDI et al., 1995) e ansiolíticas (CAMPOS e GUIMARÃES, 2008, GUIMARÃES et al., 1990; MOREIRA, AGUIAR e GUIMARÃES, 2007; ZUARDI et al., 1982). Crippa et al. (2004) verificaram que a administração oral de canabidiol em humanos diminui os níveis de ansiedade em comparação com pacientes tratados com placebo e, através de uma técnica de neuroimagem funcional, verificaram que o canabidiol diminui o fluxo sanguíneo cerebral em regiões do complexo amigdalóide, hipocampo, hipotálamo e giro para-hipocampal, evidenciando ações inibitórias sobre áreas ativadas em distúrbios de ansiedade (GRAEFF, 1994).

1.2. Efeitos de Canabinóides e drogas que atuam no sistema endocanabinóide na ansiedade e em modelos animais de ansiedade

Diversos estudos com modelos animais de ansiedade têm verificado que agonistas do receptor CB₁ podem apresentar efeitos tanto ansiolíticos quanto ansiogênicos, dependendo da dose administrada (para revisão, ver VIVEROS et al., 2005). Ao contrário da diversidade de estudos com drogas que atuam em receptores canabinóides, poucos estudos têm sido feitos para se compreender os efeitos do canabidiol sobre a ansiedade. Alguns desses estudos revelam que o composto apresenta perfil similar ao de drogas ansiolíticas: aumentando o

número de pressionamentos da barra no modelo do beber punido de Vogel (MUSTY et al., 1984, MOREIRA, AGUIAR e GUIMARÃES, 2007) e aumentando o número de entradas e o tempo nos braços abertos no modelo do labirinto em cruz elevado (GUIMARÃES et al., 1990, CAMPOS e GUIMARÃES, 2008).

Com relação ao efeito de drogas que atuam no sistema endocanabinóide em modelos de medo aprendido, González, Karniol e Carlini (1972) mostraram que a administração sistêmica de extratos de *Canabis* atenua a resposta emocional condicionada. Anos mais tarde, Marsicano et al. (2002) verificaram que o sistema endocanabinóide está envolvido na extinção de memórias aversivas, sendo que a inativação genética ou farmacológica (bloqueio com antagonista) do receptor CB1 prejudica a extinção do medo condicionado ao som.

Reforçando um envolvimento do sistema endocanabinóide na extinção de memórias aversivas, Chhatwal et al. (2005) mostraram que a potencialização da neurotransmissão endocanabinóide facilita a extinção da resposta emocional condicionada contextual. Corroborando estes resultados, Pamplona et al. (2006) verificaram que a administração de um agonista canabinóide CB1 facilita a extinção de respostas condicionadas contextuais. Bitencourt et al. (2008), verificaram recentemente que a injeção intracérebroventricular do inibidor da recaptação de endocanabinóides (AM404) ou de canabidiol aumenta a extinção de respostas condicionadas contextuais, sendo o efeito de ambas as drogas bloqueado pelo tratamento prévio com o antagonista CB1 (SR141716).

Recentemente, Lin et al. (2008) mostraram que a microinjeção de agonista canabinóide (WIN55212-2) ou de drogas que potencializam a neurotransmissão endocanabinóide (AM404 ou URB597) diretamente no córtex infralímbico reduz respostas comportamentais associadas ao condicionamento aversivo utilizando a luz como estímulo condicionado. Entretanto, de maneira oposta, Laviolette e Grace (2006) mostraram que microinjeção de AM251 (antagonista CB1) no córtex-pré-frontal medial reduz a resposta de congelamento induzida por um estímulo condicionado olfatório, sendo que o tratamento com WIN (agonista CB1) foi

capaz de promover congelamento na presença de estímulos sublimiáres (intensidades de choque de apenas 0,4 mA) nesse tipo de condicionamento. Assim, a participação do sistema endocanabinóide na modulação da expressão de respostas condicionadas contextuais ainda não está completamente elucidada, sendo necessários mais estudos nessa área.

1.3. Medo condicionado e substratos neurais envolvidos com a resposta emocional condicionada contextual.

Um modelo animal bastante utilizado para se estudar ansiedade e memória aversiva é o medo condicionado. Neste modelo, o medo é provocado quando um estímulo neutro (luz, som, odor ou ambiente específico – contexto) é repetidamente pareado com estímulos aversivos como choques elétricos nas patas (KIM e JUNG, 2006; FENDT e FANSELOW, 1999; LEDOUX, 1996; MAREN, 2001).

Esses protocolos de condicionamento envolvem vários estágios de processamento e aprendizagem. Dentre eles é interessante destacar: as fases de **aquisição**, **consolidação** e **expressão** das respostas emocionais condicionadas.

Durante a fase de **aquisição**, que ocorre no dia do condicionamento aversivo, os animais aprendem a associar um estímulo inicialmente não aversivo (estímulo condicionado) a um estímulo naturalmente aversivo, como choques nas patas (estímulo incondicionado). Já a fase de **consolidação** ocorre após o término do treino (condicionamento), quando os animais irão processar a informação e armazená-la no encéfalo para poder ser evocada posteriormente durante a reexposição ao estímulo condicionado que passa, então, a desencadear respostas emocionais condicionadas, mesmo na ausência do estímulo aversivo (fase de **expressão**). Depois de repetidas reexposições ao estímulo condicionado na ausência do estímulo aversivo, a resposta condicionada pode ser perdida num processo chamado de **extinção** (QUIRK e MUELLER, 2008).

Durante a resposta emocional condicionada (REC), os ratos apresentam intensa imobilidade (congelamento) associada com vocalizações ultrasônicas, antinocicepção e alterações na atividade do sistema nervoso autônomo (aumentos da frequência respiratória, da pressão arterial e frequência cardíaca) (ANTONIADIS e MCDONALD, 1999; BLANCHARD e BLANCHARD, 1972; BLANCHARD et al., 1991; CARRIVE, 2000; IWATA et al., 1986; LEE et al., 2001; STIEDL e SPIESS, 1997).

Diversas estruturas encefálicas estão envolvidas na REC contextual. O estímulo aversivo incondicionado é transmitido ao tálamo sensorial e, após passar por áreas corticais atinge o hipocampo, estrutura responsável pela memória contextual. Essas informações são enviadas aos núcleos lateral e basolateral do complexo amigdalóide onde a informação aversiva é armazenada. Esses núcleos se conectam ao núcleo central do complexo amigdalóide a partir do qual são emitidas projeções para diversas áreas envolvidas na REC. Informações que atingem a porção ventrolateral da matéria cinzenta periaquedutal (SCPVL) resultam em respostas de congelamento, podendo também modular estruturas do tronco encefálico envolvidas na taquicardia e aumento da pressão arterial. Do núcleo central do complexo amigdalóide também partem projeções: a) ao hipotálamo lateral, que modula, via núcleos do tronco encefálico, as funções cardiovasculares, b) à área tegmentar ventral, que modula, via núcleo paraventricular do hipotálamo, a liberação de ACTH e corticosterona (para revisão, ver FENDT e FANSELOW, 1999).

Muitos trabalhos utilizando técnicas farmacológicas, neurofisiológicas e estudos de lesão, têm mostrado que o complexo amigdalóide é a estrutura chave para a aquisição e expressão de respostas condicionadas (DAVIS, 1997; FENDT e FANSELOW, 1999; LEDOUX, 1996; MAREN, 2001; MAREN e QUIRK, 2004). O envolvimento do complexo amigdalóide com a expressão de emoções iniciou-se com os trabalhos de Weiskrantz (1956), que observou que macacos com lesões no complexo amigdalóide eram incapazes de aprender a associar um estímulo luminoso (neutro) com um estímulo aversivo (choques).

Posteriormente, Blanchard e Blanchard (1972) observaram que ratos com lesões no complexo amigdalóide eram incapazes de expressar medo inato ou aprendido, sendo que a região mais medial do complexo amigdalóide estaria envolvida na expressão de medo do predador natural, enquanto que regiões mais corticais estariam envolvidas na expressão do medo aprendido.

Anatomicamente, o complexo amigdalóide recebe conexões sensoriais de diversas áreas do encéfalo (tálamo, neocórtex, córtex olfatório, hipocampo, por exemplo) e envia projeções para várias estruturas que modulam o sistema autônomo e/ou o sistema somatomotor. Dentre as estruturas que recebem aferência do complexo amigdalóide destacam-se o núcleo do leito da estria terminal, envolvido na liberação de hormônios relacionados ao estresse, como a corticosterona, a substância cinzenta periaquedutal, envolvida na resposta de congelamento e na analgesia induzida por estresse, e o hipotálamo lateral que promove ativação do tônus simpático (LEDOUX, 1996; FENDT e FANSELOW, 1999; MAREN, 2001).

Acredita-se que a informação sensorial chega aos núcleos basal e basolateral do complexo amigdalóide (LEDOUX, 1996), locais onde ocorre a associação entre o estímulo condicionado e o estímulo incondicionado. Esses núcleos apresentam conexões sinápticas com o núcleo central do complexo amigdalóide, que é a principal estrutura envolvida nas respostas emocionais condicionadas (LEDOUX, 1996, MAREN, 2004).

Vários estudos com lesões do complexo amigdalóide mostraram que essa estrutura é essencial para a aquisição e expressão de diversas respostas condicionadas, como aumento da pressão arterial (IWATA, LEDOUX e REIS, 1986), analgesia (HELMSTETTER, 1992), vocalizações ultrasônicas (GOLDSTEIN et al., 1996) e congelamento (BLANCHARD e BLANCHARD, 1972; COUSENS e OTTO, 1998; IWATA, LEDOUX e REIS, 1986).

Com relação à modulação das diferentes respostas emocionais condicionadas, LeDoux et al. (1988) verificaram que lesões de estruturas que recebem aferências do complexo amigdalóide modulam de maneira distinta as alterações autonômicas ou comportamentais

induzidas pelo condicionamento aversivo. Nesse estudo, os autores observaram que lesões do hipotálamo lateral bloqueiam os aumentos na pressão arterial e frequência cardíaca sem interferir na resposta de congelamento, já lesões da substância cinzenta periaquedutal (SCP) ventrolateral bloqueiam a resposta comportamental de congelamento sem, no entanto, interferir com as alterações cardiovasculares. Assim, segundo os autores, diferentes projeções do núcleo central do complexo amigdalóide poderiam estar envolvidas em diferentes tipos de respostas condicionadas.

Em estudo mais recente, Walker e Carrive (2003), injetando o agonista GABAérgico muscimol na SCP ventrolateral, verificaram que a inativação farmacológica dessa estrutura inibe a resposta de congelamento e bloqueia as vocalizações ultrasônicas induzidas pelo condicionamento, não tendo efeito nas alterações cardiovasculares de maneira similar ao observado por LeDoux et al. (1988).

Outra estrutura que recebe eferências do complexo amigdalóide é o núcleo do leito da estria terminal. Inicialmente, LeDoux et al. (1998) não observaram qualquer efeito de lesões dessa estrutura nas respostas induzidas por condicionamento ao som. Entretanto, estudos mais recentes, utilizando lesão ou inativação farmacológica dessa estrutura, mostraram que a mesma é importante para a expressão de respostas emocionais (congelamento, aumentos de pressão arterial e frequência cardíaca, bem como liberação de corticosterona) condicionadas quando o estímulo condicionado é o próprio contexto onde foi administrado o choque nas patas (SULLIVAN et al., 2004; RESSTEL et al., 2008).

O hipocampo também é uma estrutura cerebral bastante envolvida no medo condicionado contextual. Em ratos, a lesão do hipocampo bloqueia respostas condicionadas contextuais, mas não interfere com respostas emocionais induzidas por condicionamento auditivo (AGNOSTARAS, MAREN e FANSELOW, 1999; KIM e FANSELOW, 1992). Entretanto, se a lesão no hipocampo bem como a reexposição ao contexto aversivo ocorrer muitos dias após o condicionamento, os animais apresentam resposta emocional condicionada

contextual, mesmo na ausência de hipocampo. Dessa forma, têm sido sugerido que o hipocampo está envolvido de maneira transitória (curto período) no armazenamento da memória contextual, sendo essa memória redistribuída para outras regiões do encéfalo (córtex, por exemplo) com o passar dos dias (KIM e FANSELOW, 1992; PHILIPS e LEDOUX, 1992).

Estudos com animais transgênicos e nocautes também reforçam o papel do hipocampo no condicionamento contextual. Camundongos mutantes com prejuízos na LTP (potenciação de longo prazo) hipocampal apresentam prejuízos na expressão do medo contextual (ABELIOVICH et al., 1993; BOURTCHULADZE et al., 1994; HUERTA et al., 2000). Liu et al. (2004) mostraram uma intensa correlação entre a LTP hipocampal e a expressão do medo contextual. Nesse estudo, os autores mostraram que tanto a LTP no hipocampo quanto a expressão de memória aversiva contextual encontraram-se prejudicadas em animais nocautes para o fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF). Além disso, a microinjeção de BDNF no hipocampo desses animais nocautes poderia proporcionar expressão de medo contextual similar aos animais controles.

Alguns autores têm sugerido ainda, que diferentes regiões do hipocampo podem estar envolvidas em diferentes funções, considerando que a parte dorsal do hipocampo está mais envolvida com memória e com comportamentos relacionados a pistas espaciais (memória espacial), enquanto que a região ventral estaria mais envolvida com comportamentos relacionados à ansiedade (para revisão, ver BANNERMAN, 2004).

Atualmente muitos estudos têm verificado que diferentes sub-regiões do córtex pré-frontal exercem modulação diferenciada na expressão de respostas condicionadas. Vidal-Gonzales et al. (2006) mostraram que as regiões pré-límbica e infralímbica podem modular de maneira oposta a expressão do medo condicionado, sendo que a estimulação do córtex pré-límbico pode aumentar a REC enquanto que a estimulação do córtex infralímbico pode reduzir o congelamento. Outro trabalho recente mostrou que a inativação do córtex pré-

límbico com tetrodotóxina bloqueia a expressão do medo condicionado, sugerindo um envolvimento importante dessa estrutura na expressão de respostas emocionais condicionadas (CORCORAN e QUIRK, 2007).

Além das estruturas comentadas acima, diversas estruturas estão envolvidas no medo condicionado contextual; entretanto, não é oportuno aqui fazer uma descrição extensa de todas as áreas encefálicas que podem ser ativadas durante a evocação da resposta emocional condicionada contextual.

1.4. Imunoistoquímica para visualização da proteína c-Fos como ferramenta para identificar áreas cerebrais envolvidas em modelos comportamentais.

Uma maneira de se verificar a ativação de neurônios encefálicos é através da imunodeteção da proteína c-Fos que funciona como fator de transcrição controlando a transcrição de DNA a RNAm. Normalmente, a expressão de c-Fos é muito baixa nas células, exceto quando as mesmas são ativadas por um estímulo como o estresse, por exemplo. Após a ativação, os níveis de c-Fos aumentam, sendo possível detectar a proteína cerca de 90 a 120 minutos após a ativação (CHIASSON, 1997).

Existem duas características importantes da expressão do gene c-Fos que o fazem um excelente marcador de ativação neuronal frente a um estímulo: os baixos níveis de transcrição do gene em condições basais e sua capacidade de ser induzido frente a um estímulo sináptico. Em condições basais, os níveis de RNAm e da proteína c-Fos são reduzidos (HUGHES, LAWLOR e DRAGUNOW, 1992). Entretanto, os níveis de RNAm e da proteína c-Fos são rapidamente aumentados frente a um dado estímulo (30 a 60 min, para o RNAm e 1 a 3 h, para a proteína) (CHAN et al., 1993; CULLINAN et al., 1995; DING et al., 1994; IKEDA et al., 1994; IMAKI et al., 1993; KOVÁCS e SAWCHENKO, 1996; SONNENBERG et al., 1989).

Acredita-se que a indução de c-Fos reflete a atividade funcional de neurônios (DRAGUNOW e FAULL, 1989; DUNCAN, JOHNSON e BREESE, 1993; SAGAR, SHARP e CURRAN, 1988). Entretanto, áreas encefálicas com alta atividade neuronal, como o córtex visual, por exemplo, não apresentam expressão significativa da proteína c-Fos. Assim, acredita-se que a atividade neuronal normal não é suficiente para induzir a expressão de c-Fos (KACZMAREK e CHAUDHURI, 1997). Nesse sentido, Fields et al. (1997) mostraram que a expressão de c-Fos depende de características temporais dos potenciais de ação. Em neurônios dos glânglios da raiz dorsal do nervo espinal cultivados em cultura, aumentos elevados e persistentes na concentração intracelular de cálcio bem como altos níveis de Ca^{2+} separados por longos intervalos entre potenciais praticamente não alteram a expressão de c-Fos. Então, a produção da proteína c-Fos foi correlacionada de maneira inversa com os intervalos entre os potenciais de ação (FIELDS et al., 1997).

Alguns autores observaram ainda que diferentes estruturas cerebrais apresentam diferenças nos limiares de indução da expressão de c-Fos. Algumas áreas como os núcleos basolateral, medial e cortical do complexo amigdalóide, o tálamo ântero-dorsal e médio-dorsal bem como o córtex cingulado, infralímbico e piriforme expressam c-Fos em resposta a estímulos moderados, como a exploração de um ambiente novo, por exemplo. Essas estruturas normalmente são denominadas de áreas que expressam c-Fos constitutivamente (CULLINAN et al., 1995; DUNCAN, KNAPP e BREEZE, 1996; HUGHES, LAWLOR e DRAGUNOW, 1992).

Grande número de alterações celulares pode induzir a expressão de c-Fos: fatores neurotróficos, neurotransmissores, despolarização e influxo de cálcio, bem como elevação na concentração intracelular/intranuclear de cálcio (DOUCET, SQUINTO e BAZAN, 1990; GAIDDON, LOEFFLER e LARMET, 1996; GREENBERG e ZIFF, 1984; MORGAN e CURRAN, 1989; SHENG e GREENBERG, 1990; SHENG, MACFADDEN e GREENBERG, 1990; SZÉKELY, BARBACCIA e COSTA, 1987).

O gene c-fos possui dois detectores de cálcio funcionalmente distintos: o influxo de Ca^{2+} via canais do tipo L induz a fosforilação do CREB através de uma via calmodulina cinase e induz a expressão de c-fos via elemento de resposta do AMPc (CRE), já o influxo de cálcio pelo receptor NMDA resulta em ativação de uma MAP cinase que tem como alvo o elemento sérico de resposta (SRE) (BADING, GINTY e GREENBERG, 1993). CRE e SRE podem ser influenciados de maneira espacialmente distinta pelas concentrações de cálcio: aumento na concentração nuclear de Ca^{2+} promove a expressão de c-fos através da ativação de CRE enquanto que SRE é ativado por aumentos na concentração citoplasmática de Ca^{2+} , não necessitando aumento da concentração nuclear desse íon (HARDINGHAM et al., 1997; SANTANELLA e CARAFOLI, 1997). Assim, conexões sinápticas que influenciam de maneira diferenciada as concentrações nuclear e citoplasmática de Ca^{2+} podem regular distintos mecanismos envolvidos na expressão do gene c-fos.

De acordo com a hipótese da excitabilidade, proposta por Ginty (1997), a expressão do gene c-fos pode ser influenciada por aspectos espaciais da sinalização do Ca^{2+} . Sinapses excitatórias distais que promovem aumento local e citoplasmático de Ca^{2+} ativariam a expressão de c-fos via ativação de SRE enquanto que sinapses proximais capazes de aumentar a concentração de Ca^{2+} no interior do núcleo ativariam CRE e SRE aumentando a possibilidade de expressão de c-fos.

Diversos tipos de estresse promovem aumento do RNAm e da proteína c-Fos em várias áreas cerebrais envolvidas na modulação de respostas relacionadas a procedimentos estressantes. Assim, diversos autores têm utilizado a expressão do RNAm ou da proteína c-Fos para mapear áreas encefálicas ativadas por diversos tipos de estresse (BECK e FIBIGER, 1995; BULLIT, 1990; CAMPEAU e WATSON, 1997; CECCATELLI et al., 1989; CHEN e HERBERT, 1995; CULLINAN et al., 1995; DUNCAN, JOHNSON e BREEZE, 1993; DUNCAN, KNAPP e BREEZE, 1996; ERICSSON, KOVÁCS e SAWCHENKO, 1994; HAMAMURA et al., 1992; IMAKI et al., 1993; KOLLACK-WALKER, WATSON e AKIL,

1997; KOVÁCS e SAWCHENKO, 1996; LI, ERICSSON e SAWCHENKO, 1996; MELIA et al., 1994; PEZZONE et al., 1992; SHARP et al., 1991; WAN et al., 1993).

Apesar do uso bastante difundido da detecção de c-Fos para identificar áreas ativadas por procedimentos estressantes, existem algumas limitações que dificultam a interpretação dos resultados. Nesse sentido, ainda não está totalmente esclarecido se todos os neurônios são capazes de expressar c-Fos ao serem ativados e qual a sensibilidade dos mesmos para que ocorra a expressão de Fos. Áreas que expressam c-Fos em resposta a um estímulo estressante podem ser classificadas em três categorias: regiões que mostram aumentos de Fos após manipulação, áreas ativadas especificamente pelo tipo de evento estressor em questão que oferecem informações sobre a circuitaria relacionada àquele estresse e regiões que medeiam respostas autonômicas e comportamentais a diversos tipos de estresse (KOVÁCS, 1998).

Regiões encefálicas que expressam RNAm (c-fos) ou proteína (c-Fos) em resposta à manipulação ou ambientes novos, sem a necessidade de um agente estressante, incluem alguns núcleos talâmicos e amigdalóides, algumas regiões corticais e subcorticais, septo lateral, região anterior do núcleo do leito da estria terminal, hipocampo e substância cinzenta periaquedutal. O limiar necessário para induzir aumentos na expressão de c-Fos nessas áreas é bastante baixo, sendo que alguns autores as consideram como regiões de expressão constitutiva de c-fos (CAMPEAU e WATSON, 1997; CULLINAN et al., 1995; DUNCAN, KNAPP e BREEZE, 1996; KOLLACK-WALKER, WATSON e AKILL, 1997).

Com relação ao efeito do tratamento com canabinóides sobre a expressão de c-Fos no encéfalo, Arnold et al. (2001), comparando duas linhagens de ratos (Wistar e Lewis), verificaram que doses ansiogênicas do agonista CB1 CP 55,940 aumentam a expressão de c-Fos em várias das estruturas estudadas, sendo as alterações mais importantes presentes em áreas intensamente envolvidas em respostas emocionais (GRAEFF, 1994). Apenas um estudo foi feito para verificar alterações de c-Fos promovidas pelo canabidiol (GUIMARÃES et al., 2004), porém, o mesmo utilizou uma dose proposta como antipsicótica por Zuardi et al.

(1995) e verificou padrões de expressão da proteína similares aos induzidos pelo tratamento com antipsicóticos atípicos. No entanto, nenhum estudo foi feito para verificar possíveis alterações de expressão de c-Fos com doses ansiolíticas do composto.

Considerando que drogas com perfil ansiolítico alteram o padrão de expressão de c-Fos em estruturas encefálicas envolvidas na expressão da REC (BECK e FIBIGER, 1995; WISLOWSKA-STANEK et al., 2005; IZUMI et al., 2006) e que dados prévios do laboratório revelam que a administração sistêmica de canabidiol interfere com a expressão REC, diminuindo a frequência cardíaca e o tempo de congelamento (“freezing”), o presente projeto propôs como hipótese que o canabidiol modificaria a ativação de áreas cerebrais envolvidas na expressão da REC contextual, podendo essa regulação ser evidenciada por níveis alterados de imunorreatividade para a proteína c-Fos em animais tratados com a droga antes da reexposição ao local onde foi dado o choque. Além dessa, outra hipótese que foi testada foi verificar se a microinjeção desse composto em áreas com padrão de expressão de c-Fos alterada em relação ao grupo controle poderia atenuar a expressão da REC (tempo de congelamento) similarmente ao que ocorre após administração sistêmica do composto (RESSTEL et al., 2006).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral:

Identificar áreas cerebrais envolvidas nos efeitos do canabidiol sobre a expressão da resposta emocional condicionada contextual.

2.2. Objetivos específicos:

- Identificar estruturas cerebrais ativadas pela REC e verificar o efeito da administração sistêmica de canabidiol nessas áreas ativadas pela reexposição ao local onde o animal recebeu o choque.
- Verificar o efeito de microinjeções de canabidiol em estruturas com o padrão de imunorreatividade à proteína c-Fos alterado pelo tratamento sistêmico com a droga.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Ratos Wistar machos recém desmamados (21 dias de idade), provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo (Campus-Ribeirão Preto), foram trazidos para o biotério interno do laboratório, onde permaneceram acomodados em condições padronizadas de luz (12:12h de claro/escuro, com ciclo claro iniciando às 06:30h) e temperatura ($24\pm 1^\circ\text{C}$), acesso irrestrito a água e alimento. Os animais foram acompanhados e manipulados exclusivamente pelo experimentador, com objetivo de minimizar a expressão da proteína c-Fos pelo estresse devido à manipulação. Após dois meses da chegada dos animais (quando os mesmos apresentavam dois meses e meio de idade), foram realizados os experimentos comportamentais, conforme descrito abaixo. Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos em conformidade com o guia de manipulação de animal de laboratório da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento sendo o protocolo aprovado pelo Comitê de Ética local.

3.2. Protocolo de condicionamento ao contexto (resposta emocional condicionada contextual)

Ratos *Wistar* machos foram colocados por duas ocasiões em uma caixa com assoalho capaz de deflagrar choque (19x22x20 cm, Medical Agent, Japan) permanecendo na mesma por 10 minutos (habituação). Em uma terceira exposição à caixa, o grupo a ser condicionado recebeu 6 choques elétricos inescapáveis (0,5 mA com 1 s de duração cada, adaptado de WISLOWSKA-STANEK et al., 2005) com intervalo variável entre 20 s e 1 min. O grupo não-condicionado não recebeu nenhum choque.

No dia seguinte ao condicionamento, a imobilidade foi avaliada durante a resposta emocional condicionada (REC) por um período de 10 minutos de reexposição ao contexto

aversivo previamente pareado com o choque (RESSTEL et al., 2006). A imobilidade (congelamento) foi caracterizada como a ausência total de movimentos, exceto àqueles relacionados à respiração (INOUE et al., 1996).

3.3. Efeito do canabidiol na expressão da proteína c-Fos induzida pela Resposta Emocional Condicionada Contextual

O Canabidiol foi administrado por via intraperitoneal (i.p.) numa dose ansiolítica de 10 mg/Kg (GUIMARÃES et al., 1990) efetiva no bloqueio da REC (RESSTEL et al., 2006) com objetivo de avaliar os efeitos ansiolíticos durante a expressão da REC sobre a imunorreatividade para c-Fos em estruturas cerebrais ativadas pelo procedimento e possivelmente inibidas pelo canabidiol.

A REC (tempo de congelamento) foi avaliada e, após duas horas do procedimento experimental, seguiram-se as perfusões dos animais e processamento histológico para posterior marcação imunistoquímica, conforme descrito abaixo. A perfusão dos animais foi realizada duas horas após o procedimento experimental, pois nesse período ocorre o pico de expressão da proteína c-Fos (para revisão, ver KOVÁCS, 1998).

3.4. Processamento histológico e imunistoquímica para detecção da proteína Fos.

Duas horas após o término da exposição ao contexto, os animais usados no protocolo de estudo dos efeitos da administração sistêmica de canabidiol sobre a marcação de proteína Fos, foram sacrificados com injeção intraperitoneal (i.p.) de uretana (a 25%, 5 mL/Kg de peso) e perfundidos transcardiacamente com salina e paraformaldeído a 4% tamponado em PBS a 0,1 M, pH 7,4. Posteriormente, os cérebros foram removidos, pós-fixados em paraformaldeído por 3 h e crioprotetidos em sacarose a 30% em tampão TRIS (TBS) por um período de 48 h à temperatura de 4° C. Sendo depois processados conforme procedimento descrito por De

Oliveira (2001), com o objetivo de se obterem cortes representativos, em duplicata, contendo muitas regiões encefálicas envolvidas com respostas emocionais condicionadas contextuais.

As secções foram inicialmente pré-tratadas com H_2O_2 a 1% em TBS a 0,05M durante 10 minutos, para redução da atividade da peroxidase endógena. Após 4 lavagens de 5 minutos cada, em TBS a 0,1M (pH 7,4) as secções foram incubadas com soro albumina bovina (BSA) 1% em TBS a 0,05M acrescido de Triton-X a 0,02% (TBS-T), durante 20 minutos, para bloqueio dos sítios de ligações inespecíficas. Em seguida, as secções foram incubadas com o anticorpo primário policlonal de coelho anti-Fos (1:500, Santa Cruz Biotechnology). Após 24 h de incubação à temperatura ambiente, as secções foram novamente lavadas em TBS 0,05M (3 x 10 minutos) antes de serem incubadas com o anticorpo secundário biotinizado (1:1.500) por mais 1 hora. Os anticorpos foram diluídos em TBS-T + BSA, e todas as incubações realizadas à temperatura ambiente com agitação constante. Uma vez removido o anticorpo secundário, através de sucessivas lavagens em PBS 0.1M (3 x 5 minutos), as secções foram incubadas com o complexo ABC avidina-biotina-peroxidase (1:1.500, Vectastain ABC Kit, Vector Laboratories), por 1 hora. A atividade da peroxidase foi revelada usando o tetracloreto de 3'3'-diaminobenzidina (DAB) contendo H_2O_2 a 0,02%. Finalmente, após adequadamente lavadas, as lâminas foram desidratadas através de uma série de álcoois (70%, 80%, 95% e 100%, 5 minutos cada), clareadas no xilol (2 x 10 minutos) e cobertas com Permount e lamínulas.

A imunorreatividade para c-Fos (Fos-IR) foi visualizada como um produto marrom depositado no interior dos núcleos celulares, sendo os resultados expressos como a média de densidade celular de neurônios/ $0,1\text{ mm}^2$ em cada estrutura. A contagem e os cálculos foram realizados da maneira descrita por De Oliveira (2001).

3.5. Análise qualitativa da imunomarcação da proteína c-Fos induzida pela REC.

Após a realização dos experimentos de imunomarcação anti c-Fos, decidiu-se realizar uma análise qualitativa com o intuito de identificar áreas do cérebro com maior expressão desta proteína nos animais tratados com veículo e submetidos ao contexto (condicionados). Isso se fez importante para identificar áreas mais ativadas durante a REC e que possivelmente poderiam ser inibidas pelo tratamento com canabidiol.

Para essa análise qualitativa, lâminas de 3 animais (todos do grupo condicionado que receberam veículo) foram observadas ao microscópio óptico em objetiva de menor aumento (4X) e áreas com expressão de c-Fos muito elevada foram identificadas com o auxílio do Atlas Paxinos e Watson (1997).

3.6. Análise quantitativa da imunorreatividade da proteína c-Fos nas estruturas cerebrais ativadas pela resposta emocional condicionada contextual (REC)

Após a análise qualitativa, secções contendo o núcleo central do complexo amigdalóide, o núcleo do leito da estria terminal (*“bed nucleus”*), o córtex pré-frontal medial (regiões cingulada anterior (Cg1), pré-límbica (PL) e infralímbica (IL)), substância cinzenta periaquedutal (porções medial, dorsolateral, lateral e ventrolateral) e núcleo paraventricular do hipotálamo foram selecionadas para o início da quantificação. Os planos utilizados foram baseados em estudos prévios do laboratório (DE OLIVEIRA, 2000).

A quantificação foi feita utilizando um analisador de imagens digitalizadas (*“Image-Pro Plus, Media Cybernetics”*). A região de interesse foi localizada e uma câmera (DXC-107, Sony) acoplada ao microscópio fez a captura das imagens na objetiva de 10X, posteriormente analisadas no programa. Foi considerada imunorreatividade positiva à proteína c-Fos pontos com coloração marrom escura e área variando de 10 a 80 μm^2 . Objetos com coloração ou tamanho diferentes dos mencionados foram excluídos da contagem.

Para cada estrutura analisada, foi determinada uma área, em μm^2 , e o analisador de imagens realizou a contagem semi-automática dos objetos contidos dentro dos limites dessas áreas. Posteriormente, o número de neurônios positivos foi dividido pelo valor da área e multiplicado por 100.000 para obtenção da densidade (imunorreatividade por 0,1 mm^2 de área). A análise foi realizada de forma cega para os grupos experimentais.

3.7. Microinjeções de CBD no córtex pré-frontal medial.

Para verificar o efeito de microinjeções, os animais foram submetidos a uma cirurgia estereotáxica (descrita abaixo) para o implante de cânulas-guias na região pré-límbica ou infralímbica do córtex pré-frontal medial.

Os animais foram anestesiados com tribromoetanol 2,5% administrado num volume de 10 ml/Kg via intraperitoneal (i.p.). Após perda total dos reflexos, fez-se a tricotomia na cabeça seguida de imobilização dos animais em um aparelho estereotáxico, a calota craniana foi exposta por meio de uma incisão na pele. O periósteo foi retirado e a calota craniana secada com H_2O_2 a 10%. Com o auxílio de uma broca ortodôntica (nº 6) foi feito um furo na calota craniana para fixação de parafuso. Em seguida, dois outros furos foram feitos para implante das cânulas-guias na região pré-límbica ou infralímbica do córtex pré-frontal medial, sendo o posicionamento das mesmas calculado por meio de estimativas em relação ao bregma (ponto de encontro entre as suturas sagital e lambdóide utilizado como referencial anatômico). As coordenadas utilizadas (AP +3,2 mm, ML \pm 1,6 mm e DV -2,7 mm, ângulo de 14° para o PL e AP+3,2 mm, ML \pm 1,6 mm e DV -3,9 mm, ângulo de 10,5° para o IL) tiveram como referência parâmetros do Atlas de Paxinos e Watson (1997) e foram ajustadas ao peso do animal.

Cânulas de aço inoxidável de 11 mm de comprimento e 0,6 mm de diâmetro externo, previamente confeccionadas a partir de tubos de aço (Acerinox Ind. e Com. De Aço Inox S/A., São Paulo – SP), foram introduzidas na região pré-límbica ou infralímbica do córtex

pré-frontal medial. Após implante, as cânulas e o parafuso foram fixados ao crânio com resina acrílica autopolimerizável. Mandris de 0,3 mm de diâmetro foram introduzidos nas cânulas para evitar a obstrução das mesmas durante o período de recuperação dos animais. Após o procedimento cirúrgico, os animais foram mantidos em local aquecido até a recuperação da anestesia, posteriormente alojados em gaiolas específicas com água e ração *ad libitum* e acompanhados diariamente até a realização dos experimentos uma semana após a cirurgia estereotáxica.

Em todos os experimentos com microinjeções, o canabidiol (CBD, doses de 15, 30 e 60 nmol) foi diluído em óleo de uva, sendo a injeção realizada num volume de 0,2 μ L, 10 minutos antes da avaliação comportamental que seguiu o mesmo protocolo experimental dos experimentos anteriores, excluindo-se os grupos não condicionados.

3.8. Análise de dados e estatística:

Os dados foram expressos como a média \pm EPM. O congelamento foi medido como percentual do tempo total de exposição à caixa. A quantificação de imunomarcação para c-Fos assim como a imobilidade foi analisada utilizando a análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo pós-teste de Duncan. O nível de significância assumido foi de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Efeito ansiolítico da administração sistêmica de canabidiol sobre a REC

O gráfico abaixo ilustra o efeito do canabidiol sobre a REC. Observa-se que a administração sistêmica de canabidiol, 30 minutos antes da reexposição ao contexto, atenuou o tempo de congelamento (“*freezing*”) [$F(3,39) = 14,14, p < 0,01$].

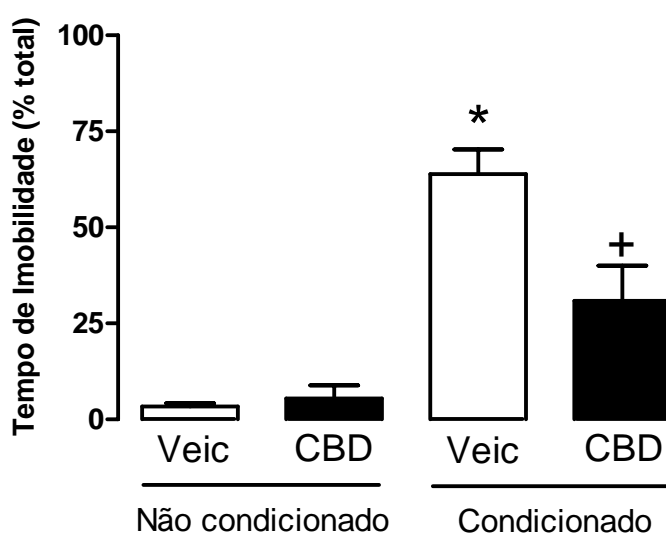


Fig.1. Efeito ansiolítico do canabidiol sobre a REC. CBD (canabidiol), * $p < 0,05$ em relação aos demais grupos, + $p < 0,05$ em relação ao grupo condicionado veículo ($n=6$ /grupo). As colunas e barras representam médias \pm E.P.M., respectivamente.

4.2. Resultados da análise qualitativa da imunomarcção da proteína c-Fos.

A análise qualitativa inicial revelou intensa imunomarcção à proteína c-Fos no cérebro de animais condicionados nas seguintes estruturas: córtex pré-frontal, núcleo piriforme, núcleo central do complexo amigdalóide, núcleo do leito da estria terminal, núcleo lateral e núcleo paraventricular do hipotálamo, núcleo pré-mamilar dorsal e ventral, núcleo mediano da rafe e substância cinzenta periaquedutal (principalmente as regiões dorsolateral e ventrolateral).

De maneira representativa, encontram-se ilustradas abaixo fotomicrografias da marcação anti-Fos em algumas dessas estruturas.

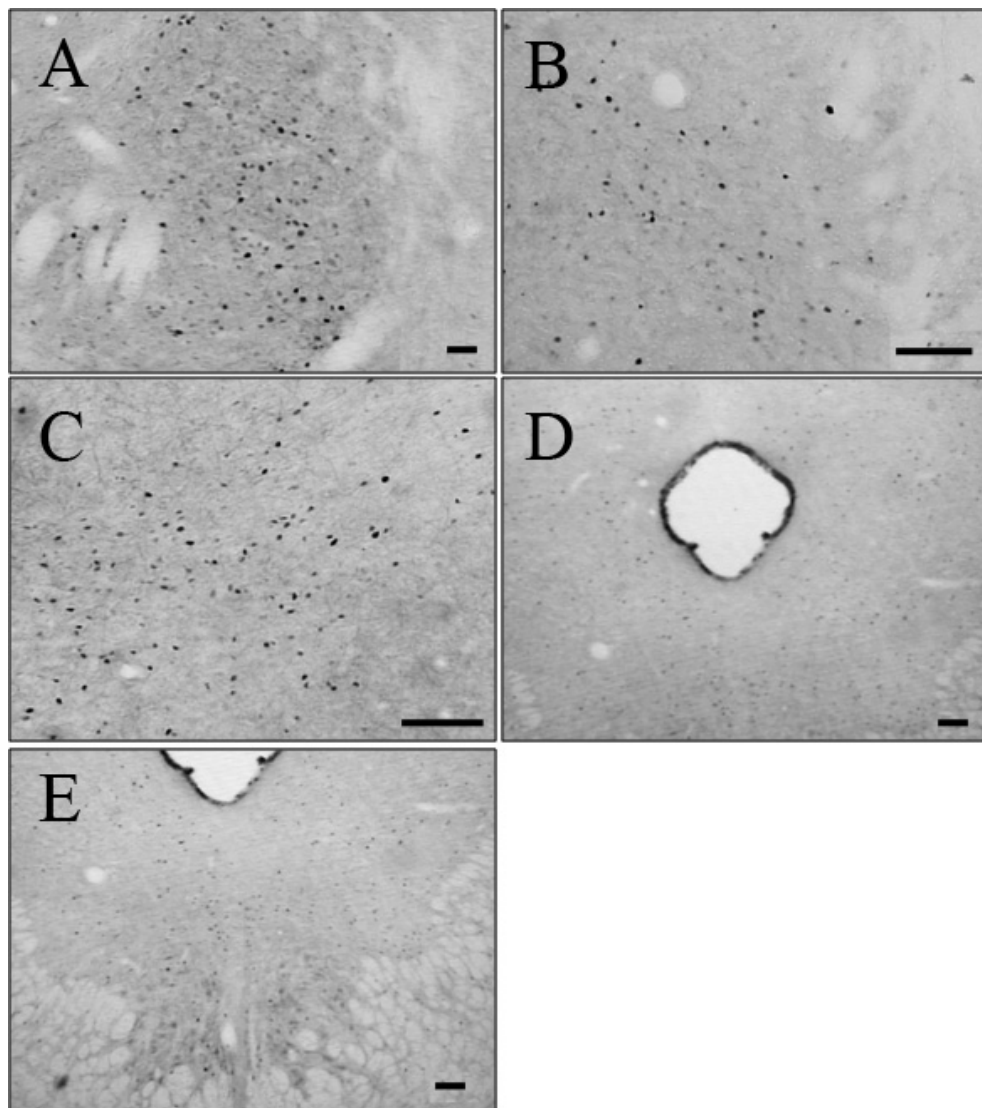


Fig.2. Fotomicrografias representativas da expressão da proteína c-Fos em encéfalos de animais condicionados e tratados com veículo. A. Núcleo central do complexo

amigdalóide **B.** Porção medial anterior do núcleo do leito da estria terminal, **C.** Porção ventrolateral do núcleo do leito da estria terminal, **D.** Substância cinzenta periaquedutal (colunas dorsolateral e ventrolateral), **E.** Núcleo dorsal da rafe (abaixo) e porção ventrolateral da substância cinzenta periaquedutal (abaixo). Escala = 100 μ m.

4.3. Análise quantitativa da imunomarcção da proteína c-Fos no núcleo central do complexo amigdalóide

Observa-se no gráfico (fig. 3) que não houve diferenças significativas [$F(4,26) = 5,11$, $p > 0,05$] na expressão da proteína c-Fos no núcleo central do complexo amigdalóide entre os grupos experimentais.

De maneira representativa, estão ilustradas abaixo fotomicrografias da imunorreatividade anti-Fos com animais de todos os grupos (fig. 4).

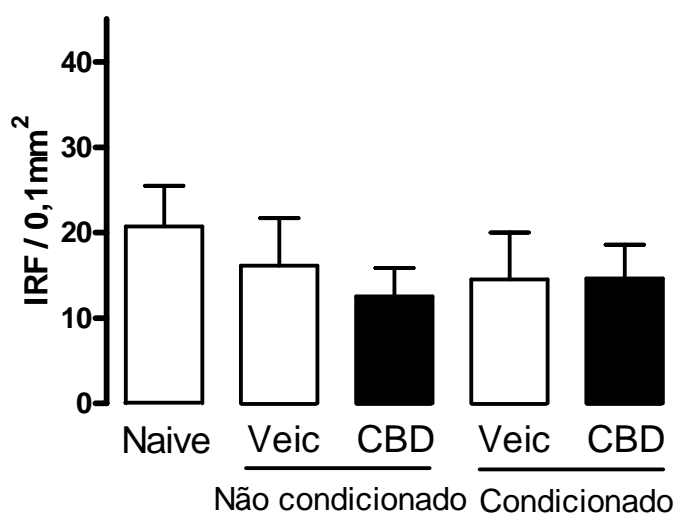


Fig.3. Imunorreatividade à proteína c-Fos no núcleo central do complexo amigdalóide. Dados estão expressos como média \pm EPM da densidade (imunorreatividade anti-Fos (IRF) por 0,1 mm²).

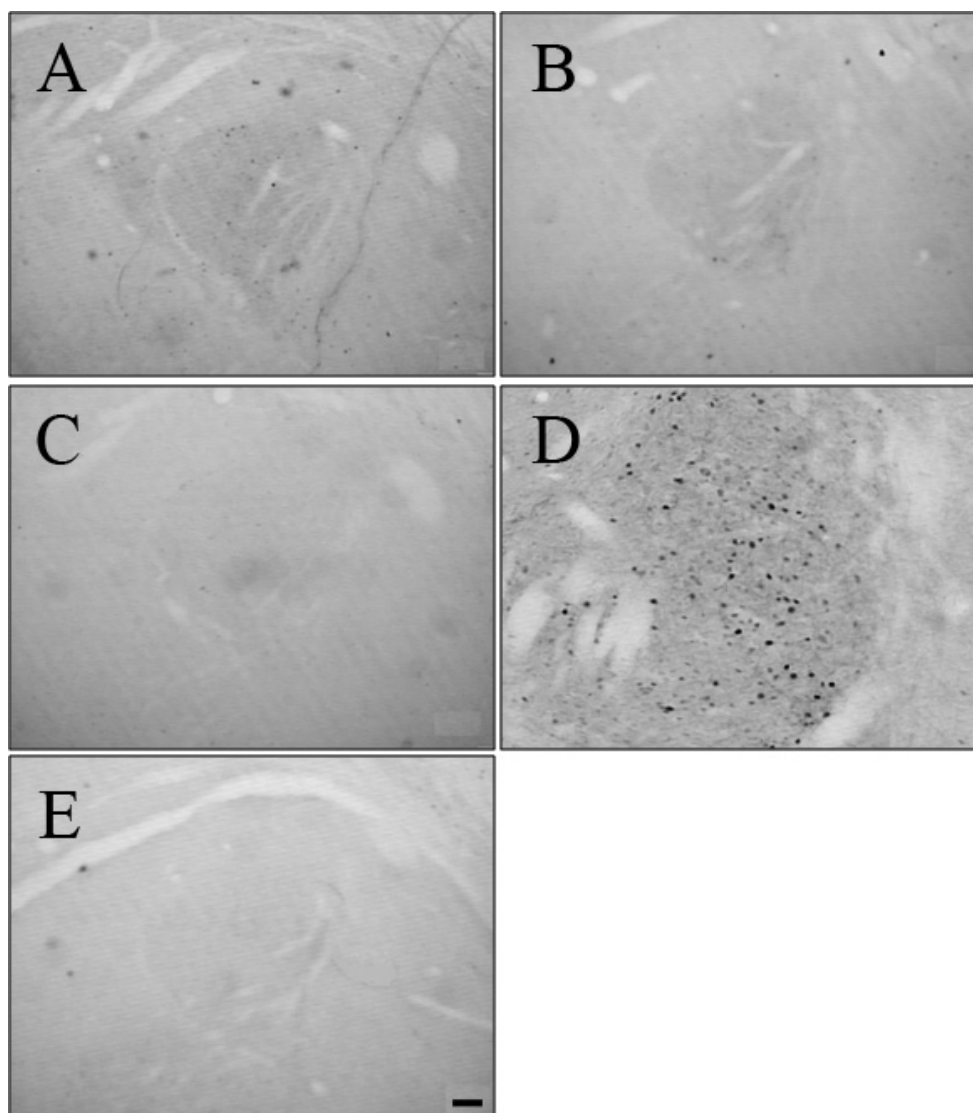


Fig.4. Fotomicrografias representativas da expressão da proteína c-Fos no núcleo central do complexo amigdalóide dos diversos grupos experimentais. A. Animal sem exposição ao modelo (naive), **B.** Animal não condicionado tratado com veículo, **C.** Animal não condicionado tratado com canabidiol no dia do teste, **D.** Animal condicionado tratado apenas com veículo no dia do teste, **E.** Animal condicionado tratado com canabidiol no dia do teste. Escala = 100 μ m.

4.4. Análise quantitativa da imunomarcção da proteína c-Fos no “núcleo do leito da estria terminal”

Conforme ilustrado abaixo (figuras 5 a 10), a expressão da proteína c-Fos foi maior nas sub-regiões do núcleo do leito da estria terminal (medial anterior, lateral dorsal, ventrolateral) no grupo condicionado tratado com veículo. Além disso, observou-se também que o tratamento prévio com canabidiol (10 mg/Kg) reduziu a expressão de c-Fos nessa

estrutura [$F(4,26) = 9,18$ $p < 0,05$; $F(4,26) = 5,11$ $p < 0,05$; $F(4,26) = 7,68$, para as regiões medial anterior, lateral dorsal e ventral, respectivamente].

De maneira representativa, estão ilustradas abaixo fotomicrografias da imunorreatividade anti-Fos com animais de todos os grupos (figuras 8, 9 e 10).

A análise de correlação (figuras 5B, 6B e 7B) revelou que existe correlação positiva entre o tempo de congelamento e a imunorreatividade à proteína c-Fos na região medial anterior [$R = 0,685$, $p < 0,05$, teste de Spearman] e na região ventral [$R = 0,786$, $p < 0,05$ teste de Spearman], mas não na região lateral dorsal dessa estrutura [$R = 0,499$, $p > 0,05$, teste de Spearman].

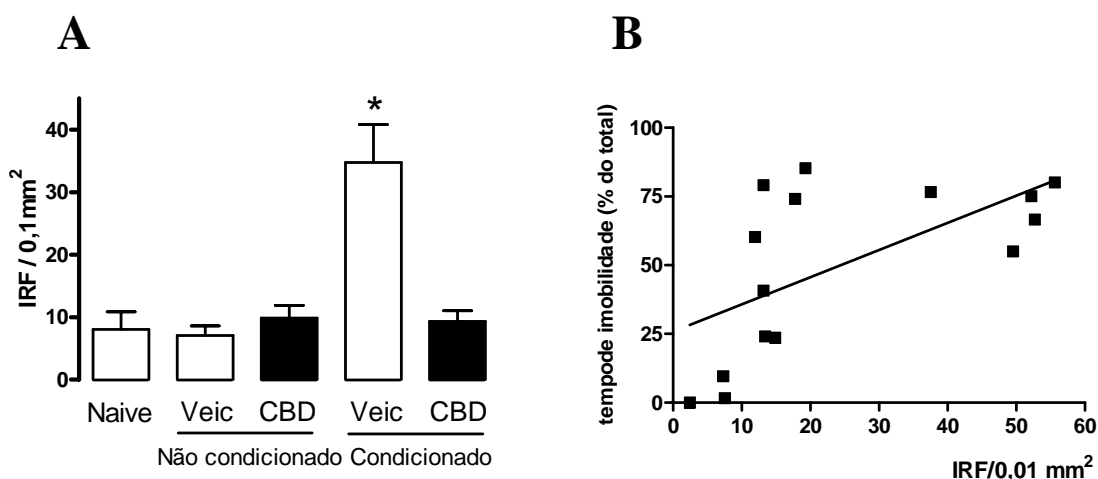


Fig.5. A. Imunorreatividade à proteína c-Fos na região medial anterior do núcleo do leito da estria terminal. Dados estão expressos como média \pm EPM da densidade (imunorreatividade à proteína c-Fos (IRF) por 0,1 mm²) * $p < 0,05$ em relação aos demais grupos. **B.** Correlação positiva entre a imunorreatividade à proteína c-Fos e o tempo de congelamento ($R = 0,685$, $p < 0,05$, teste de Spearman).

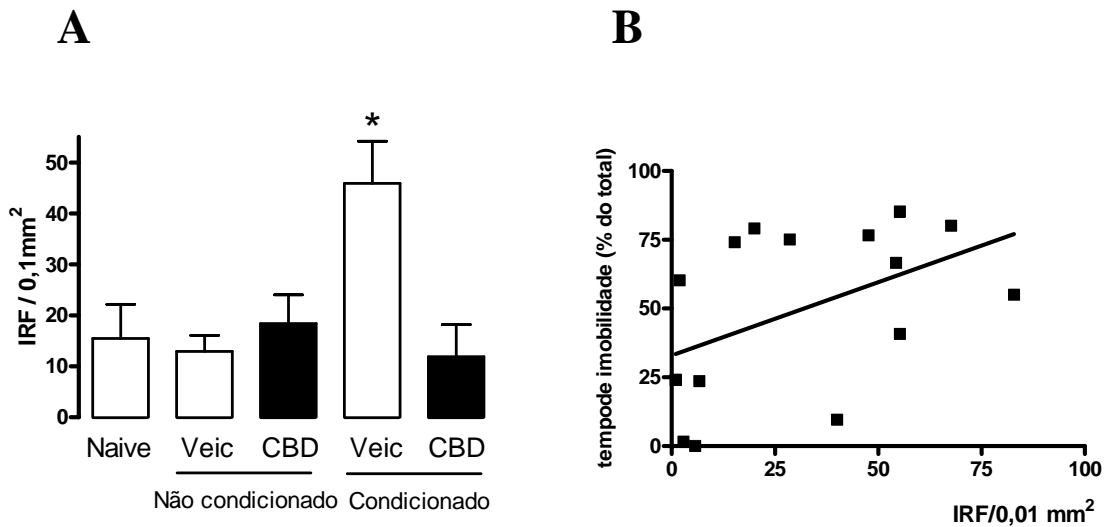


Fig.6. A. Imunorreatividade à proteína c-Fos na região dorsolateral do núcleo do leito da estria terminal. Dados estão expressos como média \pm EPM da densidade (imunorreatividade à proteína c-Fos (IRF) por 0,1 mm²) * $p < 0,05$ em relação aos demais grupos. **B.** Ausência de correlação positiva entre a imunorreatividade à proteína c-Fos e o tempo de congelamento ($R = 0,499$, $p > 0,05$, teste de Spearman).

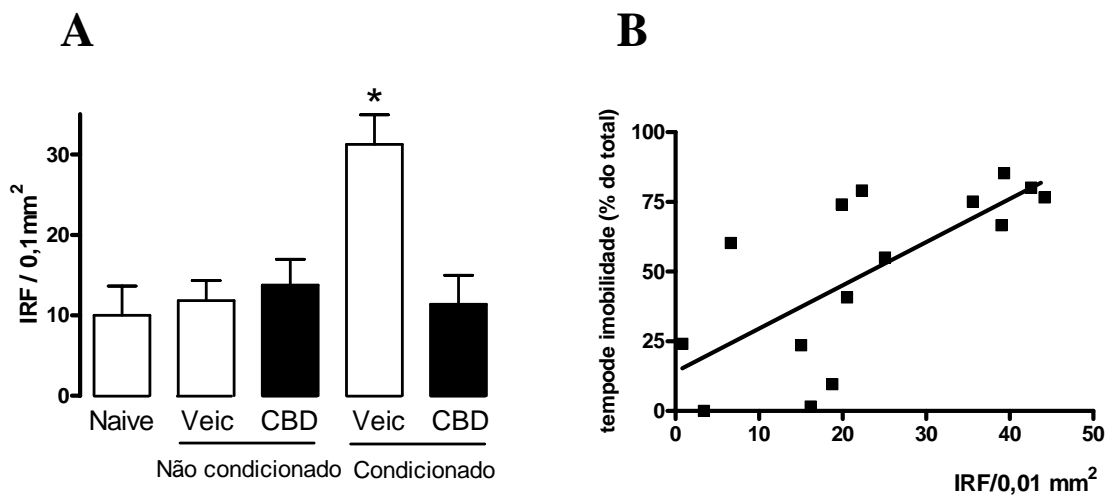


Fig.7. A. Imunorreatividade à proteína c-Fos na região ventral do núcleo do leito da estria terminal. Dados estão expressos como média \pm EPM da densidade (imunorreatividade à proteína c-Fos (IRF) por 0,1 mm²), * $p < 0,05$ em relação aos demais grupos. **B.** Correlação positiva entre a imunorreatividade à proteína c-Fos e o tempo de congelamento ($R = 0,786$, $p < 0,05$, teste de Spearman).

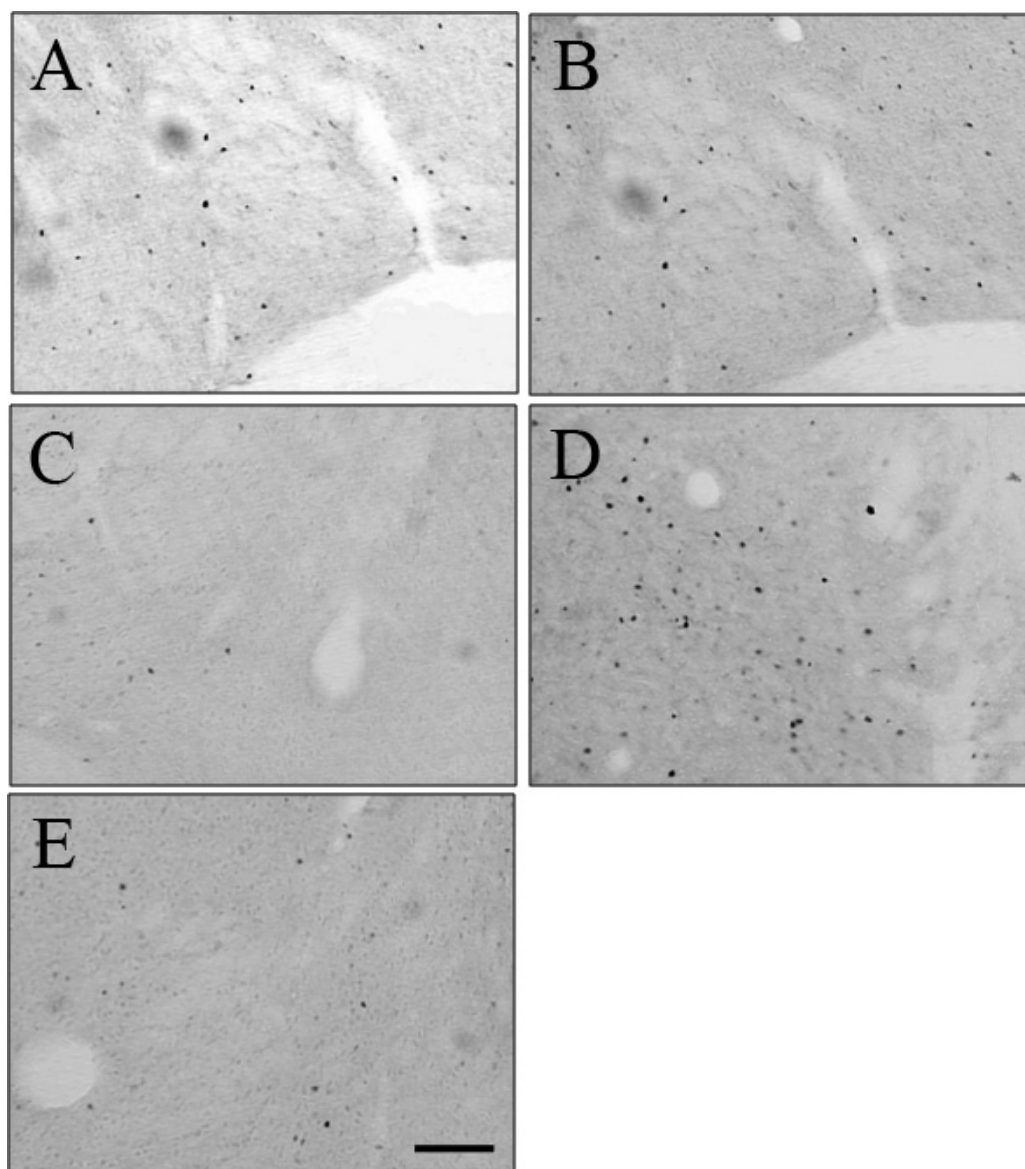


Fig.8. Fotomicrografias representativas da expressão da proteína c-Fos na região medial anterior do núcleo do leito da estria terminal dos diversos grupos experimentais. **A.** Animal sem exposição ao modelo (naive), **B.** Animal não condicionado tratado com veículo, **C.** Animal não condicionado tratado com CBD, **D.** Animal condicionado tratado com veículo, **E.** Animal condicionado tratado com CBD. Escala = 100 μ m.

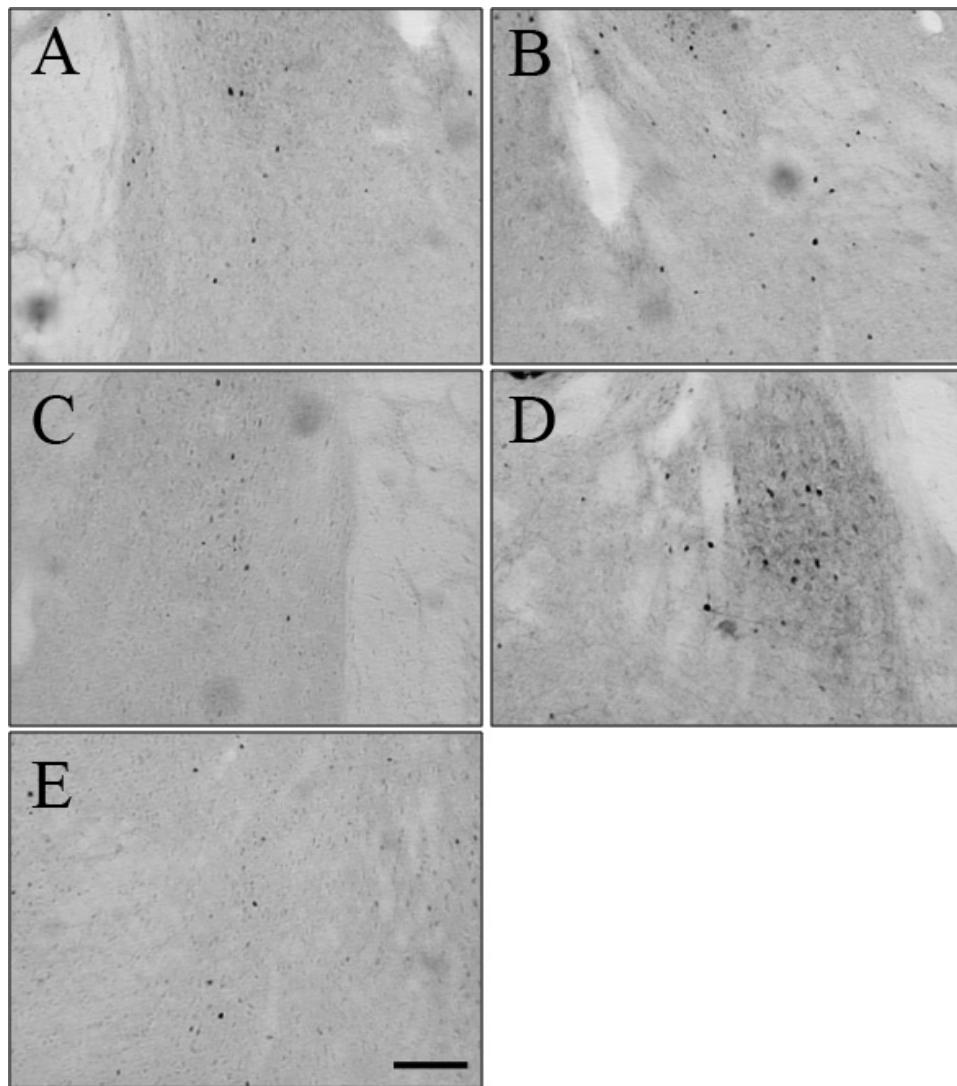


Fig.9. Fotomicrografias representativas da expressão da proteína c-Fos na região dorsolateral do núcleo do leito da estria terminal dos diversos grupos experimentais. A . Animal sem exposição ao modelo (naive), B. Animal não condicionado tratado com veículo, C. Animal não condicionado tratado com CBD, D. Animal condicionado tratado com veículo, E. Animal condicionado tratado com CBD. Escala = 100 μ m.

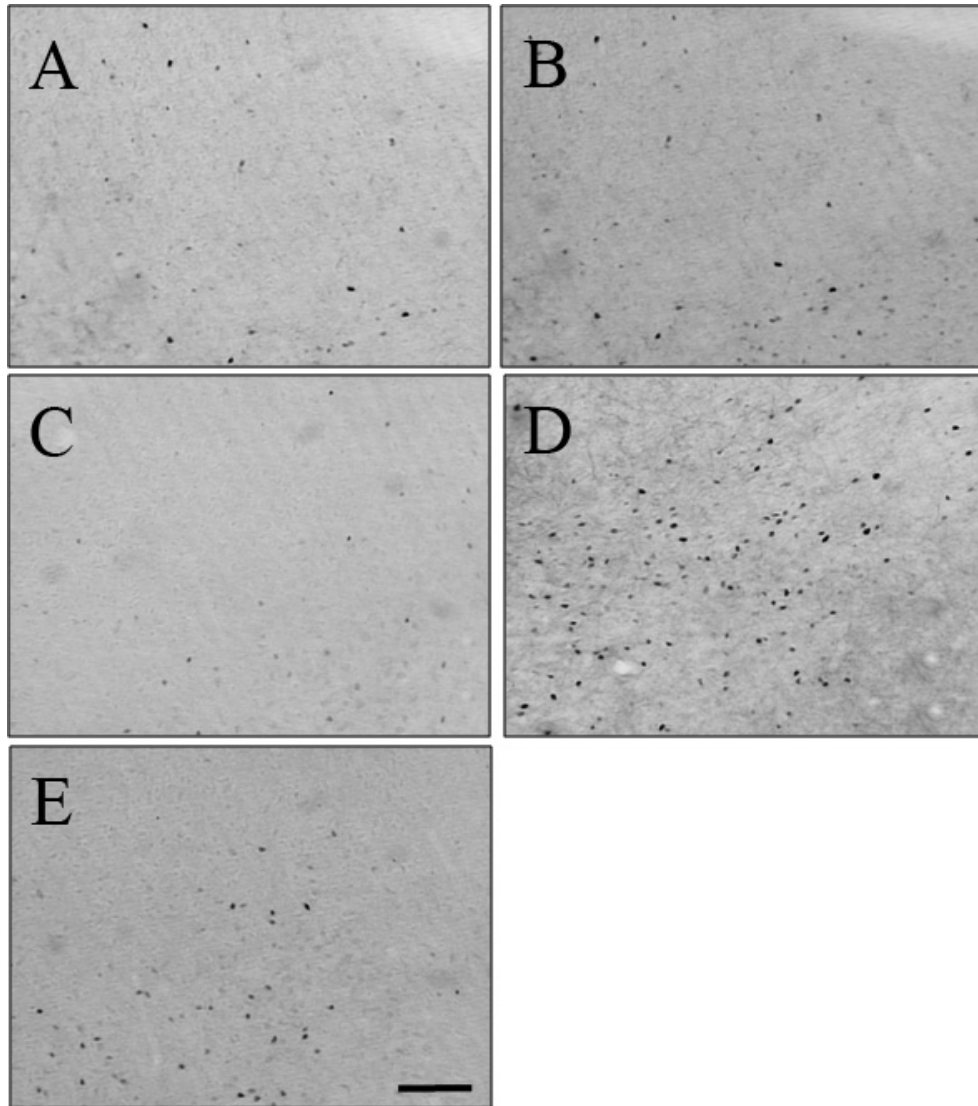


Fig.10. Fotomicrografias representativas da expressão da proteína c-Fos na região ventral do núcleo do leito da estria terminal dos diversos grupos experimentais. **A.** Animal sem exposição ao modelo (naive), **B.** Animal não condicionado tratado com veículo, **C.** Animal não condicionado tratado com CBD, **D.** Animal condicionado tratado com veículo, **E.** Animal condicionado tratado com CBD. Escala = 100 μ m.

4.5. Análise quantitativa da imunomarcação da proteína c-Fos no córtex pré-frontal medial (porções Cg1, pré-límbica e infralímbica).

Observou-se que a resposta emocional condicionada contextual (REC) induziu uma intensa imunorreatividade para a proteína c-Fos nas regiões pré-límbica e infralímbica do córtex pré-frontal, sendo que o tratamento sistêmico com CBD atenuou de maneira significativa a expressão da proteína c-Fos nas regiões pré-límbica [$F(4,23) = 2,80, p < 0,05$] e infralímbica [$F(4,23) = 3,22, p < 0,05$] (figuras 12, 13, 15 e 16). A REC não foi capaz de induzir intensa expressão de c-Fos na região Cg1 (figuras 11 e 14), [$F(4,23) = 1,10, p = 0,38$].

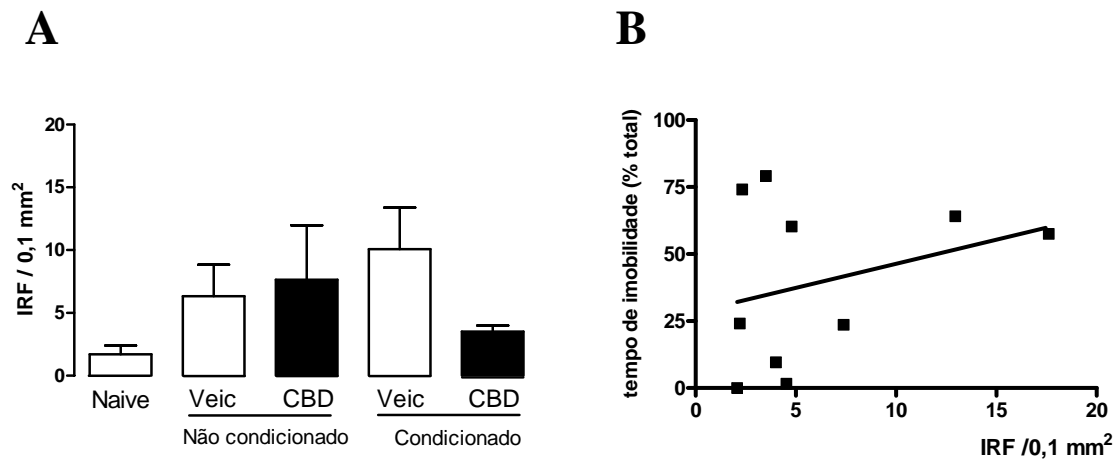


Fig.11. A. Imunorreatividade à proteína c-Fos na região Cg1 do córtex pré-frontal medial. Dados estão expressos como média \pm EPM da densidade (imunorreatividade à proteína c-Fos (IRF) por 0,1 mm²). **B.** Análise de correlação entre a imunorreatividade à proteína c-Fos e o tempo de congelamento ($R = 0,188, p > 0,05$, teste de Spearman). $N = 5-6$ por grupo.

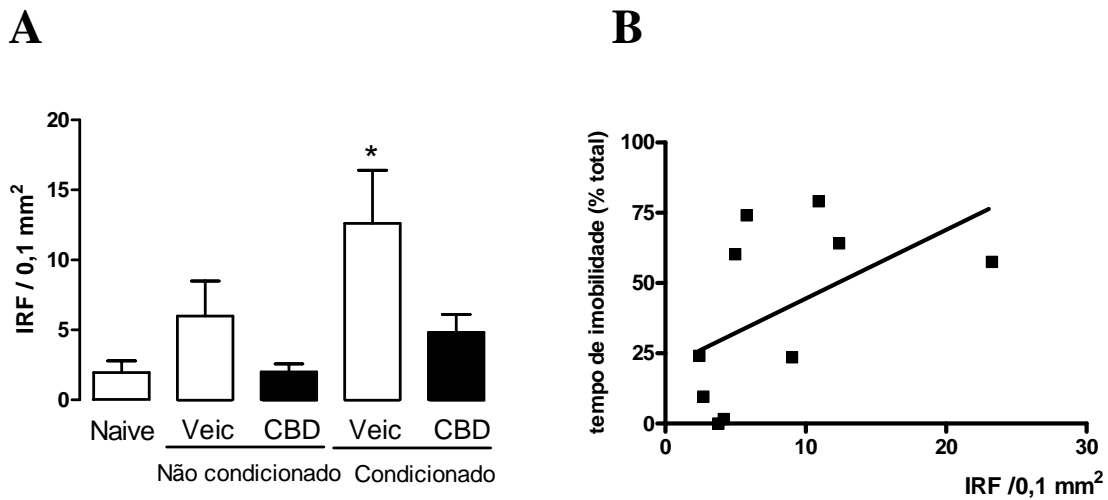


Fig.12. A. Imunorreatividade à proteína c-Fos na região pré-límbica do córtex pré-frontal medial. Dados estão expressos como média \pm EPM da densidade (imunorreatividade à proteína c-Fos (IRF) por 0,1 mm²). **B.** Análise de correlação entre a imunorreatividade à proteína c-Fos e o tempo de congelamento ($R = 0,588$, $p > 0,05$, teste de Spearman). * $p < 0,05$ em relação ao grupo naive. $N=5-6$ por grupo.

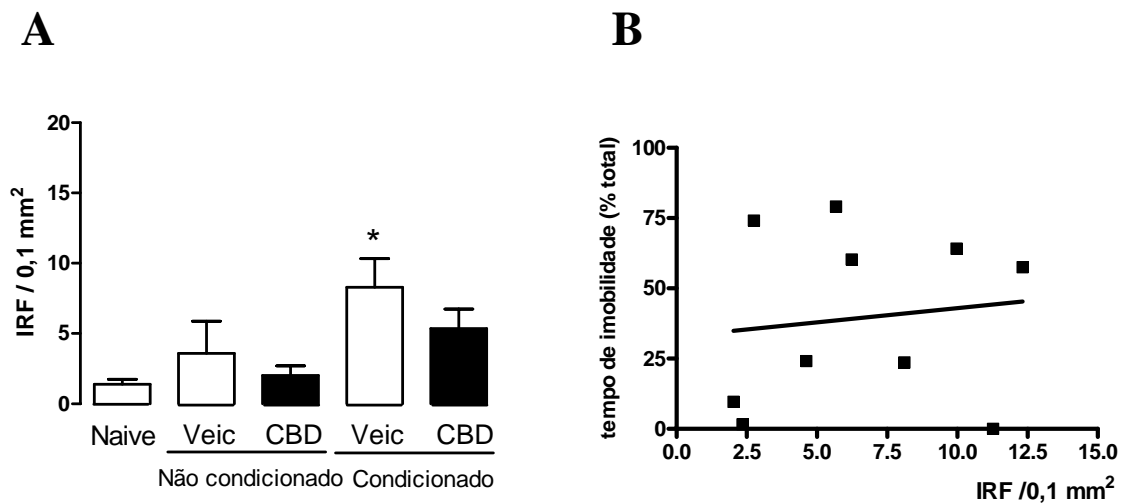


Fig.13. A. Imunorreatividade à proteína c-Fos na região infralímbica do córtex pré-frontal medial. Dados estão expressos como média \pm EPM da densidade (imunorreatividade à proteína c-Fos (IRF) por 0,1 mm²). **B.** Análise de correlação entre a imunorreatividade à proteína c-Fos e o tempo de congelamento ($R = 0,055$, $p > 0,05$, teste de Spearman). * $p < 0,05$ em relação ao grupo naive. $N=5-6$ por grupo.

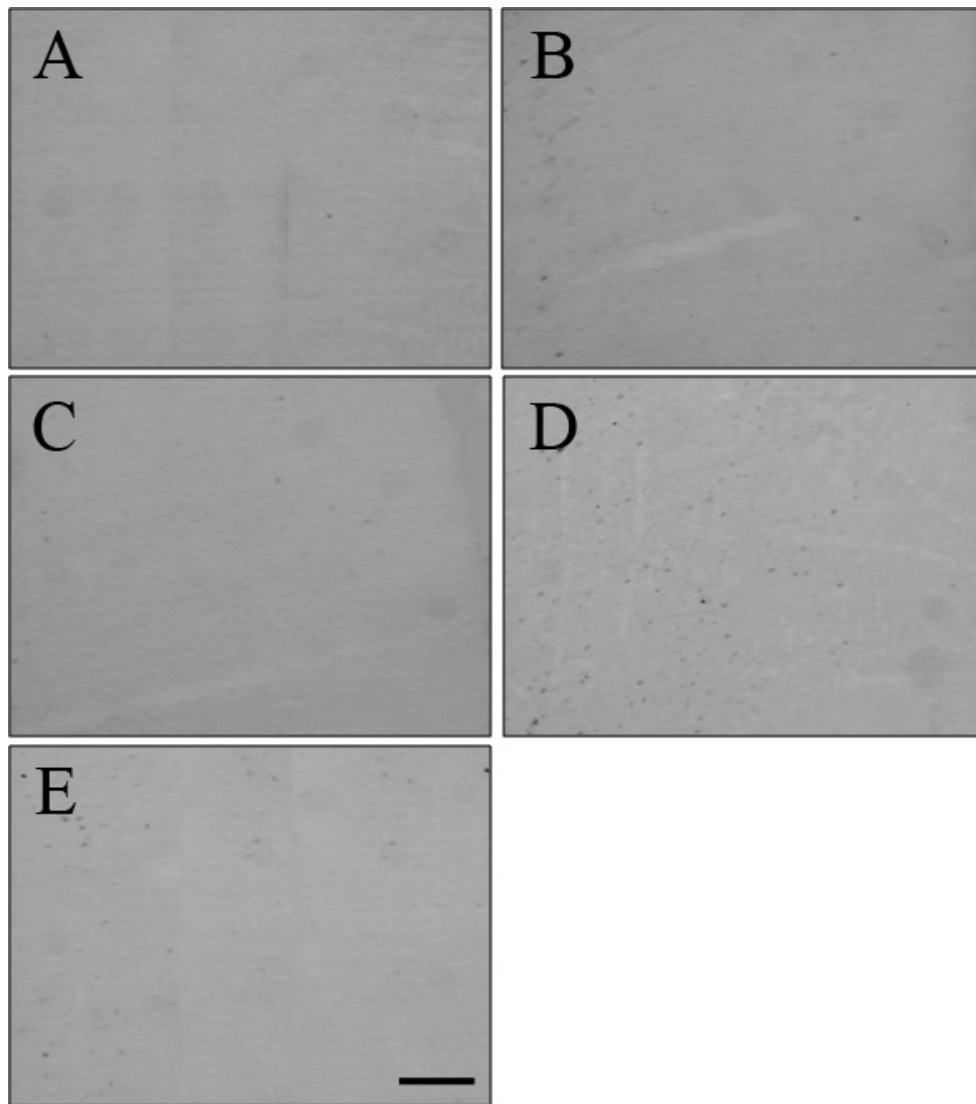


Fig.14. Fotomicrografias representativas da expressão da proteína c-Fos na região Cg1 (cingulado anterior) do córtex pré-frontal medial dos diversos grupos experimentais. A. Animal sem exposição ao modelo (naive), **B.** Animal não condicionado tratado com veículo, **C.** Animal não condicionado tratado com CBD, **D.** Animal condicionado tratado com veículo, **E.** Animal condicionado tratado com CBD. Escala = 100 μ m.

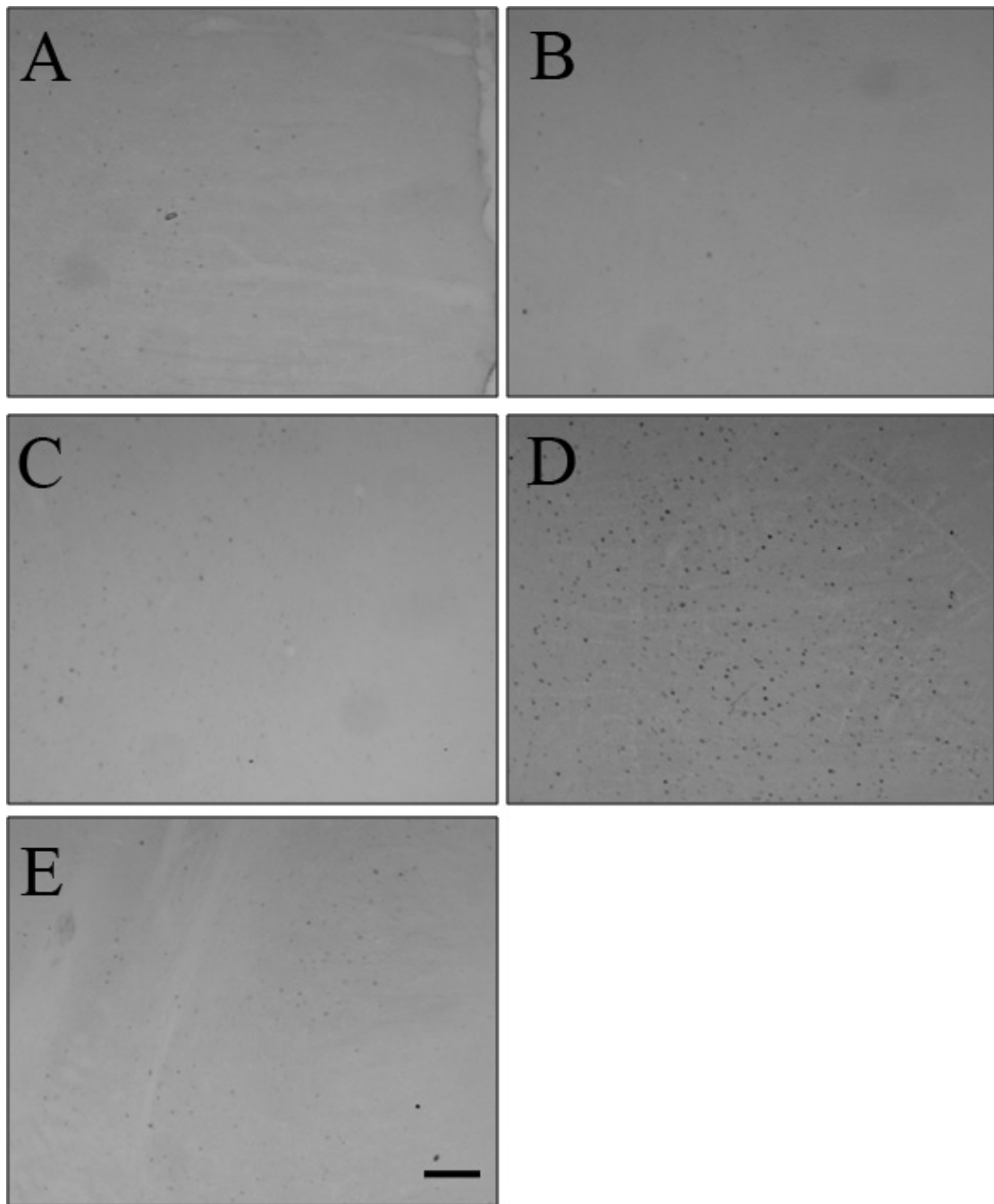


Fig.15. Fotomicrografias representativas da expressão da proteína c-Fos na região pré-límbica do córtex pré-frontal medial dos diversos grupos experimentais. A. Animal sem exposição ao modelo (naive), **B.** Animal não condicionado tratado com veículo, **C.** Animal não condicionado tratado com CBD, **D.** Animal condicionado tratado com veículo, **E.** Animal condicionado tratado com CBD. Escala = 100 μ m.

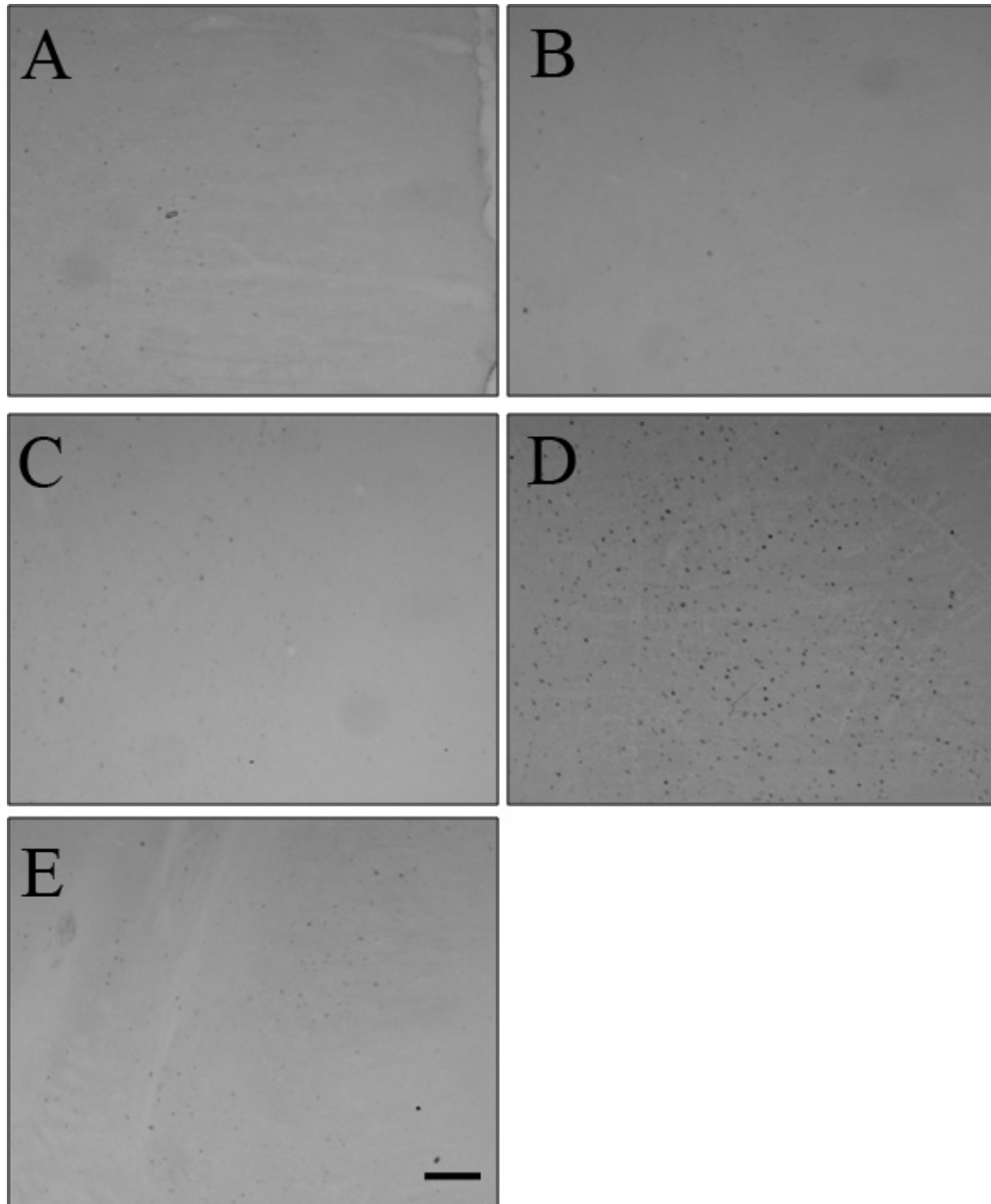


Fig.16. Fotomicrografias representativas da expressão da proteína c-Fos na região infralímbica do córtex pré-frontal medial dos diversos grupos experimentais. A. Animal sem exposição ao modelo (naive), **B.** Animal não condicionado tratado com veículo, **C.** Animal não condicionado tratado com CBD, **D.** Animal condicionado tratado com veículo, **E.** Animal condicionado tratado com CBD. Escala = 100 μ m.

4.6. Análise quantitativa da imunomarcção da proteína c-Fos no núcleo paraventricular do hipotálamo.

Conforme ilustrado no gráfico abaixo, observou-se que a REC não promoveu alterações significativas na expressão da proteína c-Fos no núcleo paraventricular do hipotálamo em relação aos grupos controles [F(4,21) = 0,44, p>0,05].

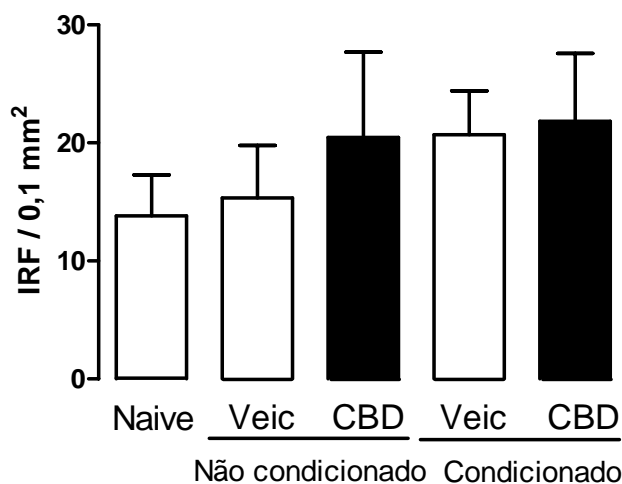


Fig.17. Imunorreatividade à proteína c-Fos no núcleo paraventricular do hipotálamo. Dados estão expressos como média ± EPM da densidade (imunorreatividade à proteína c-Fos (IRF) por 0,1 mm²). N=3-6 por grupo.

4.7. Análise quantitativa da imunomarcção da proteína c-Fos na substância cinzenta periaquedutal (colunas dorsomedial, dorsolateral, lateral e ventrolateral).

Conforme ilustrado nos gráficos abaixo, observou-se que o protocolo de condicionamento ao contexto não promoveu alterações significativas, em relação ao grupo habituado, na expressão da proteína c-Fos em nenhuma das regiões analisadas da substância cinzenta periaquedutal (SCP) (ver figuras 18 a 23) [F(4,22) = 2,32, p=0,08; F(4,23) = 1,80, p=0,16; F(4,24) = 0,98, p>0,05; F(4,22) = 2,90, p=0,06, respectivamente para as regiões dorsomedial, lateral, ventrolateral (parte rostral) e ventrolateral (parte caudal)].

De maneira interessante, observou-se que o tratamento com CBD atenuou a expressão

de c-Fos na porção dorsolateral da SCP [F(4,23) = 2,34, p = 0,085], mesmo esse efeito não sendo diferente dos grupos tratados com veículo (figuras 19 e 23).

Na parte caudal da SCP ventrolateral, observou-se que os animais do grupo “naive” apresentaram baixa imunorreatividade à proteína c-Fos em relação aos demais grupos experimentais (figura 22).

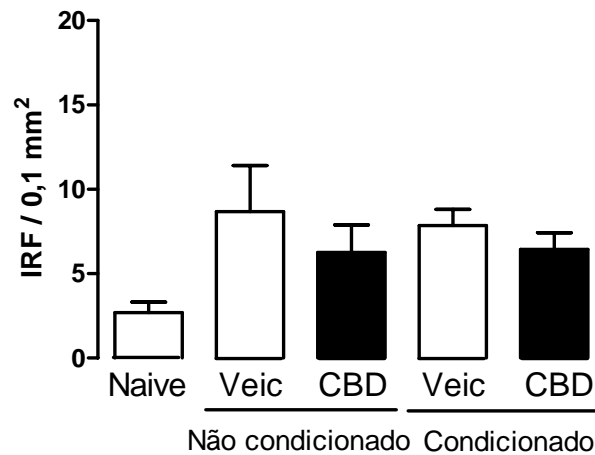


Fig.18. Imunorreatividade à proteína c-Fos na coluna dorsomedial da substância cinzenta periaquedutal. Dados estão expressos como média ± EPM da densidade (imunorreatividade à proteína c-Fos (IRF) por 0,1 mm²). N=5-6 por grupo.

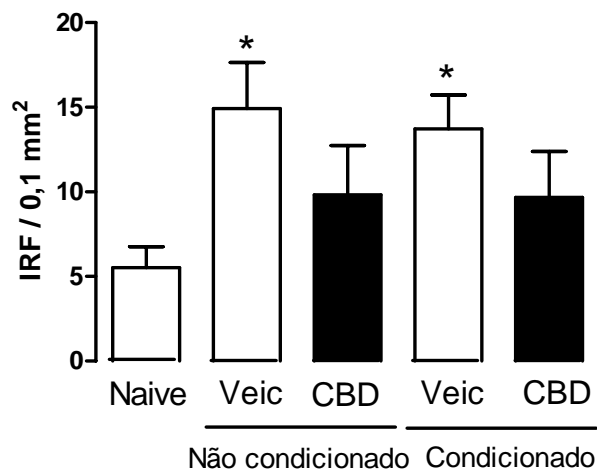


Fig.19. Imunorreatividade à proteína c-Fos na coluna dorsolateral da substância cinzenta periaquedutal. Dados estão expressos como média ± EPM da densidade (imunorreatividade à proteína c-Fos (IRF) por 0,1 mm²). * p<0,05 em relação ao grupo naive. N=5-6 por grupo.

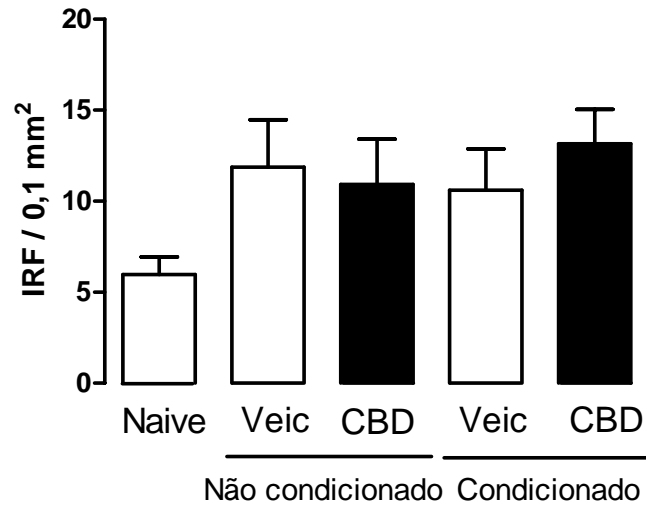


Fig.20. Imunorreatividade à proteína c-Fos na porção lateral da substância cinzenta periaquedutal. Dados estão expressos como média \pm EPM da densidade (imunorreatividade à proteína c-Fos (IRF) por 0,1 mm²). N=5-6 por grupo.

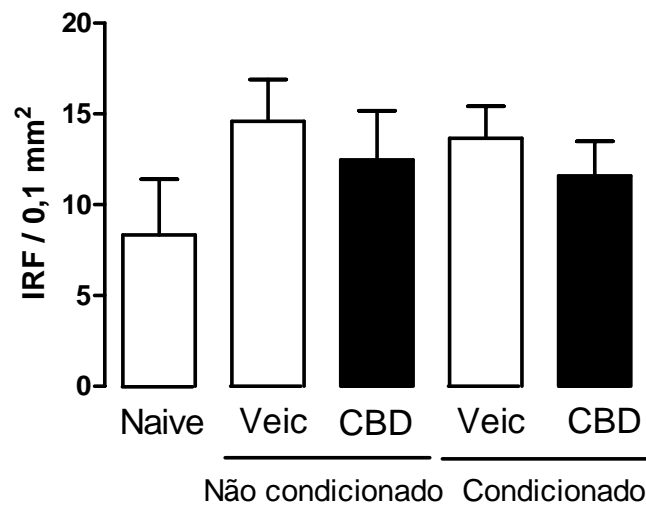


Fig.21. Imunorreatividade à proteína c-Fos na coluna ventrolateral (rostral) da substância cinzenta periaquedutal. Dados estão expressos como média \pm EPM da densidade (imunorreatividade à proteína c-Fos (IRF) por 0,1 mm²). N=5-6 por grupo.

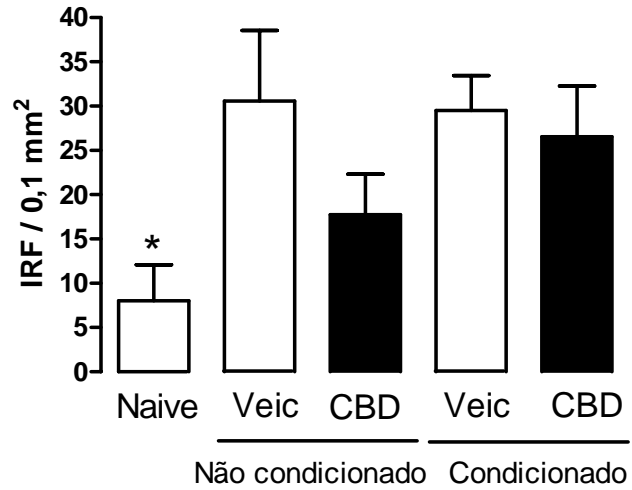


Fig.22. Imunorreatividade à proteína c-Fos na porção ventrolateral (caudal) da substância cinzenta periaqueductal. Dados estão expressos como média \pm EPM da densidade (imunorreatividade à proteína c-Fos (IRF) por 0,1 mm²). * $p < 0,05$ em relação aos demais grupos. N=5-6 por grupo.

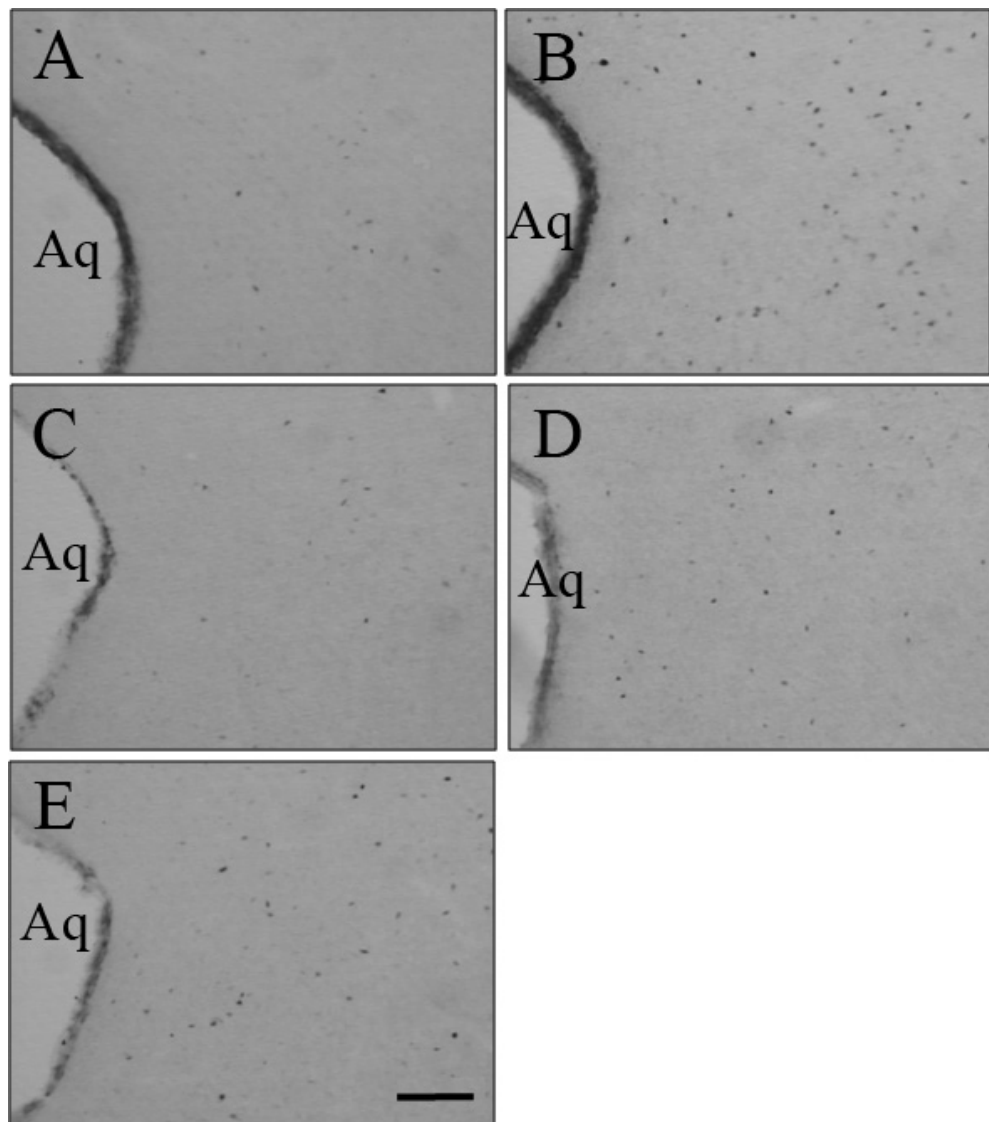


Fig.23. Fotomicrografias representativas da expressão da proteína c-Fos na coluna dorsolateral da substância cinzenta periaquedutal dorsolateral dos diversos grupos experimentais. **A** . Animal sem exposição ao modelo (naive), **B**. Animal não condicionado tratado com veículo, **C**. Animal não condicionado tratado com CBD, **D**. Animal condicionado tratado com veículo, **E**. Animal condicionado tratado com CBD. Escala = 100 μ m. **Aq**. aqueduto.

4.8. Efeito das microinjeções de canabidiol no córtex pré-frontal pré-límbico sobre a REC contextual.

Conforme ilustrado abaixo, observou-se que a microinjeção de 30 nmol de CBD na região pré-límbica do córtex pré-frontal medial reduziu significativamente a expressão da REC em relação aos demais grupos condicionados [$F(3,13) = 5,22, p < 0,05$].

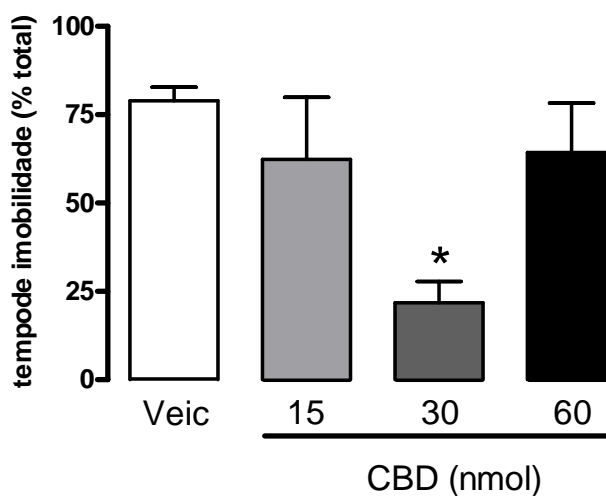


Fig.24. Efeito da microinjeção de CBD no córtex pré-frontal pré-límbico sobre a REC (n=5). O asterisco indica diferença significativa entre os demais grupos, $p < 0,05$.

4.9. Efeito das microinjeções de canabidiol no córtex pré-frontal infralímbico sobre a REC contextual.

Conforme ilustrado abaixo, observou-se que a microinjeção de 15 ou 30 nmol de CBD na região pré-límbica do córtex pré-frontal medial aumentou significativamente a expressão da REC em relação aos demais grupos condicionados [$F(3,13) = 4,35, p < 0,05$].

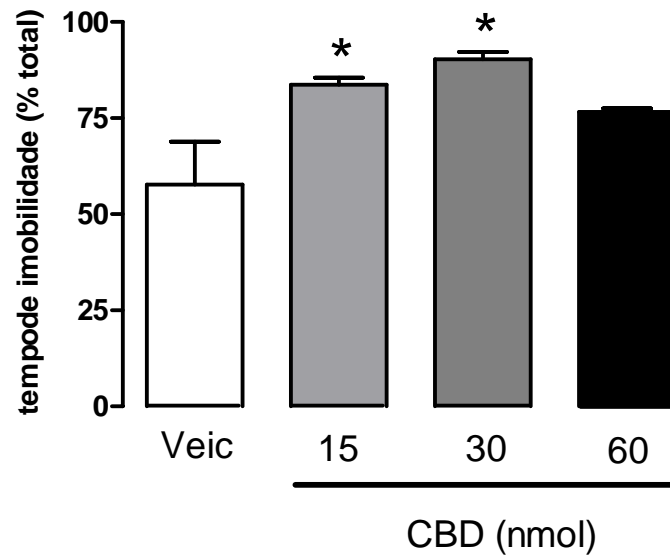


Fig.25. Efeito da microinjeção de CBD no córtex pré-frontal infralímbico sobre a REC (n=4-5). O asterisco indica diferença significativa entre os demais grupos, $p < 0,05$.

5. DISCUSSÃO

O presente estudo investigou o efeito do tratamento sistêmico com canabidiol sobre a imunorreatividade à proteína c-Fos no encéfalo de animais submetidos ao modelo de medo condicionado contextual, bem como o efeito de microinjeções de CBD em estruturas que apresentaram a expressão de c-Fos alterada pelo tratamento sistêmico com a droga.

Observou-se que a administração de 10 mg/Kg de canabidiol atenuou a expressão da REC contextual, reduzindo o tempo de imobilidade em comparação com o grupo controle (ver figura 1). Estes resultados estão compatíveis com os observados por Resstel et al. (2006), que observaram este mesmo efeito num protocolo experimental mais aversivo (choques de 2,5 mA, com 3s de duração cada). Dessa forma, é possível concluir que o efeito do canabidiol sobre a REC é similar mesmo em uma condição menos aversiva.

Inicialmente, decidiu-se fazer uma análise qualitativa com o intuito de determinar quais estruturas cerebrais expressavam número elevado de células imunopositivas para a proteína c-Fos. Este procedimento foi realizado apenas em cortes histológicos de animais condicionados e tratados com veículo, uma vez que essa análise qualitativa objetivou determinar apenas os efeitos do condicionamento aversivo contextual na indução de c-Fos.

A análise qualitativa evidenciou que diversas estruturas cerebrais apresentaram imunorreatividade positiva para c-Fos. Entretanto, destacaram-se as seguintes estruturas: córtex pré-frontal medial, núcleo piriforme, “*núcleo do leito da estria terminal*”, núcleo central do complexo amigdalóide, núcleo paraventricular do hipotálamo e substância cinzenta periaquedutal (colunas dorsolateral e ventrolateral).

Estes resultados, em sua quase totalidade, são compatíveis com os observados por Beck e Fibiger (1995) que utilizaram a técnica de imunistoquímica anti c-Fos para verificar áreas cerebrais envolvidas na REC.

Com relação às estruturas ativadas (positivas para imunomarcção anti-Fos), identificadas pela análise qualitativa, é interessante comentar alguns resultados. Sabe-se que

dentre as diversas estruturas cerebrais envolvidas com a expressão da REC contextual, o hipocampo desempenha um papel importante uma vez que essa estrutura está envolvida no processamento de informações contextuais e memória espacial envolvidos nesse modelo. Entretanto, ao contrário do que seria esperado, a densidade de células positivas para Fos no hipocampo dorsal foi muito reduzida. Esses resultados estão consistentes com os dados de Beck e Fibiger (1995), que observaram expressão de c-Fos apenas na sub-região CA1 do hipocampo ventral, motivo pelo qual se faz interessante analisar mais detalhadamente essa sub-região do hipocampo.

Outros autores (WISŁOWSKA-STANEK et al., 2005; HUFF et al., 2006), entretanto, observaram a expressão da proteína c-Fos no hipocampo dorsal após a reexposição ao contexto previamente pareado com o choque, sugerindo que é possível detectar a imunorreatividade à proteína c-Fos nessa estrutura cerebral. Nesse sentido é interessante comentar que diferenças no protocolo experimental podem explicar a ausência de expressão de c-Fos no nosso estudo. Primeiramente é interessante comentar que no presente estudo os animais foram habituados duas vezes (10 min cada) 24 horas antes do condicionamento, assim é possível que a expressão de c-Fos no hipocampo, devida ao estímulo contextual, seria reduzida uma vez que os animais foram expostos muitas vezes à caixa (dois períodos de habituação, um período de condicionamento e a reexposição). Essa hipótese corrobora outros estudos mostrando que expor os animais muitas vezes a pistas espaciais (contexto, por exemplo) implica na ausência de imunorreatividade à proteína c-Fos no período de reexposição (MILANOVIC et al., 1998; PAPA et al., 1993; PEREZ-VILLALBA et al., 2005; RADULOVIC, KAMMERMEIER e SPIESS, 1998; SOTTY, SANDNER e GOSSELIN, 1996). Além disso, os trabalhos que mostraram marcação positiva anti-Fos utilizaram protocolos de condicionamento com única habituação no mesmo dia do condicionamento (alguns minutos antes dos choques nas patas) (WISŁOWSKA-STANEK et al., 2005; HUFF et al., 2006).

Além do hipocampo, o complexo amigdalóide (principalmente os núcleos basolateral e central) é outra estrutura de extrema importância para a expressão de respostas condicionadas contextuais. Entretanto, no presente estudo não foram encontradas diferenças entre os grupos experimentais na densidade de células positivas para c-Fos em nenhum dos núcleos do complexo amigdalóide. Esse resultado é divergente de vários trabalhos que observaram expressão elevada de c-Fos no complexo amigdalóide após a resposta emocional condicionada (BECK e FIBIGER, 1995; CAMPEAU et al., 1991; PEZZONE et al., 1992). No entanto, em um trabalho recente, Scicli et al. (2004) observaram que a expressão de c-Fos no complexo amigdalóide e no hipocampo ocorreu apenas quando os animais foram re-expostos por 30 min ao contexto, não sendo detectada imunorreatividade à proteína c-Fos quando os animais foram reexpostos apenas por oito minutos. Sendo assim, é possível que o protocolo experimental de apenas 10 minutos de reexposição (utilizado neste estudo), não tenha sido suficiente para aumentar os níveis da proteína c-Fos no hipocampo e no complexo amigdalóide.

Além disso, é importante comentar que alguns estudos têm sugerido que a expressão de c-Fos nos núcleos do complexo amigdalóide não está diretamente relacionada ao congelamento (CAMPEAU et al., 1997; RADULOVIC, KAMMERMEIER e SPIESS, 1998; ROSEN et al., 1998; SMITH et al., 1992) nem ao efeito ansiolítico de drogas, uma vez que drogas ansiolíticas podem aumentar, ao invés de inibir, a expressão de c-Fos nessa estrutura do cérebro (MORALES et al., 1998; SALMINEN, LAHTINEN e AHTEE, 1996; THOMPSON e ROSEN, 2006). Alguns estudos, utilizando dupla marcação, têm mostrado que o aumento de c-Fos no núcleo central do complexo amigdalóide, induzido por drogas ansiolíticas, ocorre principalmente em neurônios GABAérgicos inibitórios (MORALES et al., 1998).

Em estudo interessante, Milanovic et al. (1998) mostraram que camundongos re-expostos pela segunda vez ao contexto previamente pareado com choques nas patas não

apresentaram diferenças em relação ao grupo controle na imunorreatividade à proteína c-Fos no hipocampo e núcleo central do complexo amigdalóide. Entretanto, o tempo de congelamento foi da mesma magnitude que os animais expostos apenas uma vez ao contexto nos quais os níveis de c-Fos foram elevados. Assim, os autores concluíram, diferentemente do sugerido por Sandner et al. (1993), que não há relação direta entre os níveis de c-Fos (no hipocampo e núcleo central do complexo amigdalóide) e a resposta comportamental de congelamento.

Reijmers et al. (2007), em estudo recente, utilizando animais modificados geneticamente que podem manter os níveis de expressão de c-Fos por cinco dias na presença do antibiótico doxicilina, mostraram que o congelamento devido à REC contextual correlaciona-se com o número de neurônios do complexo amigdalóide basolateral que foram ativados no dia do condicionamento e reativados no dia do teste (reexposição). Assim, os autores sugerem que o congelamento depende da ativação de neurônios envolvidos na aquisição e expressão do medo contextual. Essa hipótese é compatível em parte com outros estudos sugerindo que existem populações diferenciadas de neurônios envolvidas na aquisição e/ou armazenamento da memória aversiva (REPA et al., 2001).

Apesar de não terem sido observadas diferenças na expressão de c-Fos nos núcleos do complexo amigdalóide entre os grupos experimentais, a análise da imunorreatividade à proteína c-Fos em outras áreas cerebrais é útil na tentativa de elucidar áreas encefálicas possivelmente envolvidas no efeito ansiolítico do tratamento sistêmico com CBD neste modelo.

Nesse sentido, é importante comentar os efeitos do tratamento com canabidiol na expressão de c-Fos nas outras estruturas cerebrais analisadas. Conforme observado acima, a imunorreatividade à proteína c-Fos não foi distinta no núcleo paraventricular do hipotálamo (ver figura 17). Também não foram observadas diferenças na expressão de c-Fos nas regiões dorsomedial, lateral e ventrolateral da substância cinzenta periaquedutal (ver figuras 18, 20,

21 e 22) entre os grupos não condicionado e condicionado. Entretanto, observou-se que o tratamento sistêmico com CBD atenuou a expressão de c-Fos na porção dorsolateral da SCP tanto no grupo não condicionado quanto no grupo condicionado, mesmo lembrando que a expressão de c-Fos não foi diferente nesses grupos quando os animais foram tratados com veículo (figuras 19 e 23).

Diante disso, alguns comentários são pertinentes de serem feitos. Primeiramente, os resultados observados aqui foram divergentes de dados da literatura que mostraram uma expressão elevada de c-Fos, especialmente na região ventrolateral da SCP (porção caudal), estrutura que tem sido bastante relacionada à expressão do medo condicionado (CARRIVE et al., 1997). Outro fato interessante que podemos ressaltar, é que apesar da parte dorsolateral da SCP não ter sido tão implicada à expressão do medo condicionado, sendo importante, segundo alguns autores, apenas na fase de aquisição de respostas condicionadas ou expressão de medos inatos (incondicionados) (DE OCA et al., 1998), estudos recentes têm evidenciado uma modulação importante de receptores serotoninérgicos do subtipo 5-HT-1A da SCP dorsolateral na expressão do medo condicionado ao contexto (BROIZ, OLIVEIRA e BRANDÃO, 2008).

Vale ressaltar, ainda, que muitas estruturas encefálicas modulam a REC e que outras estruturas cerebrais podem estar mais relacionadas ao efeito ansiolítico da administração sistêmica de CBD.

Observou-se no presente estudo que a injeção sistêmica de CBD promoveu redução significativa na expressão de Fos nas sub-regiões medial anterior, lateral dorsal e ventral do núcleo do leito da estria terminal. Essa estrutura cerebral parece ser importante na expressão da REC contextual, uma vez que lesões dessa estrutura, de maneira similar às lesões do núcleo central do complexo amigdalóide, inibem o congelamento e o aumento nos níveis de corticosterona causados pela reexposição ao contexto onde foi dado o choque (SULLIVAN et al., 2004).

A análise de correlação entre a densidade de células positivas para c-Fos e o tempo de congelamento (ver figuras 5B e 7B) mostrou que o tempo de congelamento está correlacionado com a marcação anti-c-Fos nas regiões medial anterior e ventral, sugerindo que essas duas sub-regiões podem estar envolvidas no efeito sistêmico do CBD sobre a REC. Apesar de não termos investigado no presente estudo os parâmetros cardiovasculares, é possível que os efeitos do CBD sobre as alterações cardiovasculares (pressão arterial e frequência cardíaca) induzidas pela reexposição ao contexto previamente pareado com o choque nas patas (RESSTEL et al., 2006) sejam devidas, pelo menos em parte, a uma inibição da atividade do núcleo do leito da estria terminal. Essa hipótese corrobora trabalho recente de Resstel et al. (2008) mostrando que o bloqueio de sinapses nessa estrutura encefálica atenua as repostas comportamentais (congelamento) e cardiovasculares induzidas pela reexposição ao contexto aversivo.

Alguns estudos têm sugerido que as diferentes sub-regiões do “*bed nucleus*” podem modular de maneira distinta as funções cardiovasculares, sendo que a estimulação elétrica da região medial promove aumentos na pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC), enquanto que estimulação da região lateral promove queda de PA e não altera a FC (DUNN e WILIAMS, 1995). Considerando que não houve correlação positiva entre a imunorreatividade à proteína c-Fos na região lateral dorsal do *bed nucleus* e o tempo de congelamento, é plausível sugerir que essa região pode não estar envolvida nas repostas comportamentais induzidas pelo condicionamento contextual. Estudos complementares, utilizando microinjeções de CBD nas diferentes sub-regiões do núcleo do leito da estria terminal, são necessários para testar essa hipótese.

Em estudo anterior, Sullivan et al. (2004) mostraram que lesões eletrolíticas do núcleo do leito da estria terminal bloqueiam o congelamento e liberação de corticosterona induzidos pelo condicionamento contextual sem interferir nas repostas induzidas pelo condicionamento ao som. Assim, tem sido sugerido que o *bed nucleus* está envolvido apenas em repostas

emocionais que envolvem pistas contextuais. Essa hipótese é consistente com estudos neuroanatômicos indicando densas conexões entre o *bed nucleus* e a região subicular do hipocampo, extremamente relacionada à REC contextual (CULLINAN et al., 1993; DONG et al., 2001; KIM e FANSELOW, 1992; PHILLIPS e LEDOUX, 1992).

Outra estrutura encefálica que teve a imunorreatividade à proteína c-Fos atenuada pelo tratamento sistêmico com o CBD foi o córtex pré-frontal medial. Conforme ilustrado acima, observou-se que a injeção sistêmica de CBD atenuou a expressão de c-Fos nas regiões pré-límbica e infralímbica do córtex pré-frontal medial, sugerindo que o efeito sistêmico do CBD pode ser devido a uma ação nessas estruturas cerebrais (figuras 12A, 13A, 15 e 16).

Não foram observadas diferenças significativas na imunomarcação para c-Fos entre os grupos experimentais no córtex cingulado anterior (Cg1). Esses dados são compatíveis com os mostrados por Frankland et al. (2004) que observaram aumento de c-Fos nessa estrutura encefálica apenas em animais expostos ao contexto 36 dias (mas não 24h) após o condicionamento. A inativação reversível da área Cg1 com lidocaína bloqueou a resposta de congelamento quando injetada antes de reexpor os animais 36 dias após o condicionamento. Dessa forma, Frankland et al. (2004) sugeriram que o córtex cingulado anterior está envolvido na expressão de memórias contextuais aversivas remotas.

Frankland et al. (2004) verificaram ainda que a reexposição ao contexto 24 h após o condicionamento induziu aumento na expressão de c-Fos no córtex pré-frontal pré-límbico. Esse estudo em conjunto com a observação feita por Corcoran e Quirk (2007), de que a inativação do PL antes da reexposição bloqueia a expressão da REC contextual no dia seguinte ao condicionamento, sugere que o PL é importante na expressão de memórias aversivas recentes ao contrário da área Cg1 que parece ser importante apenas para a expressão de memórias antigas. Além disso, é pertinente citar estudo mais antigo realizado por Seamans, Floresco e Phillips (1995), no qual foi verificado que a inativação do córtex pré-límbico, mas não da área Cg1, prejudica a expressão de memórias espaciais recentes, reforçando um papel

diferenciado dessas sub-regiões na expressão de memórias recentes.

Conforme comentado acima, o presente estudo mostrou que o condicionamento contextual aumentou o número de núcleos positivos para c-Fos nas regiões pré-límbica e infralímbica do CPFm corroborando estudo anterior de Beck e Fibiger (1995), que observaram aumento na imunomarcação para a proteína c-Fos nessas regiões do encéfalo, após a REC contextual. Entretanto, estudos recentes têm sugerido que a expressão elevada de c-Fos no córtex pré-frontal está relacionada à extinção de respostas condicionadas, sendo que a elevada expressão de Fos nessa estrutura tem sido relacionada ao reduzido tempo de congelamento após protocolos experimentais de extinção (HERRY e MONS, 2004; SANTINI et al., 2004).

Os resultados do presente estudo contrastam com a proposta comentada acima sugerindo que níveis aumentados de c-Fos no CPFm estariam relacionados ao baixo tempo de congelamento, uma vez que sugerimos, no presente estudo, que o efeito do CBD de atenuar a REC contextual estaria relacionado, pelo menos em parte, à reduzida marcação para c-Fos no CPFm. Entretanto, é necessária uma discussão mais aprofundada especialmente no que se refere a diferenças entre as sub-regiões do CPFm na modulação de respostas comportamentais induzidas por condicionamentos aversivos.

Muitos estudos têm investigado o papel do CPFm na modulação de respostas emocionais condicionadas, seja na expressão ou na extinção dessas respostas. Morgan, Romanski e LeDoux (1993) verificaram que lesões do córtex pré-frontal prejudicou a extinção da REC contextual, sem diferenciar entretanto qual sub-região estava sendo lesada. Em estudo posterior, Morgan e LeDoux (1995) verificaram que lesões da parte dorsal do CPFm prejudicaram a extinção de respostas emocionais utilizando o contexto ou som como estímulo condicionado, sendo que lesões na região ventral dessa estrutura prejudicaram apenas a extinção de respostas condicionadas ao som, sugerindo que a parte dorsal do córtex pré-frontal medial está mais envolvida que a ventral com o medo contextual. Em estudo mais

recente, Sierra-Mercado et al. (2006) mostraram que inativação do CPFm ventral prejudica não apenas a extinção como também a expressão de respostas condicionadas induzidas por som previamente pareado com o estímulo aversivo.

Atualmente, muitos estudos têm verificado que as diferentes sub-regiões do córtex pré-frontal exercem modulação diferenciada na extinção e expressão de respostas condicionadas.

No presente estudo, observou-se que a microinjeção de 30 nmol de CBD diretamente no córtex pré-límbico (figura 24) reduziu a REC contextual, sugerindo um possível envolvimento dessa estrutura no efeito ansiolítico observado após o tratamento sistêmico.

Os efeitos do tratamento intracerebral com CBD corroboram resultados prévios da literatura que evidenciaram envolvimento importante do córtex pré-frontal medial na expressão de respostas emocionais condicionadas. Vidal-Gonzales et al. (2006) mostraram que as regiões pré-límbica e infralímbica podem modular de maneira oposta a expressão do medo condicionado, sendo que a estimulação do córtex pré-límbico pode aumentar a REC enquanto que a estimulação do córtex infralímbico pode reduzir o congelamento. Outro trabalho recente mostrou que a inativação do córtex pré-límbico (PL) com tetrodotoxina bloqueia a expressão do medo condicionado, sugerindo um envolvimento importante dessa estrutura na expressão de respostas emocionais condicionadas (CORCORAN e QUIRK, 2007). Diante desses dados, é plausível propor que o tratamento sistêmico com CBD pode atenuar a REC por inibir a atividade do córtex pré-límbico.

Em experimentos posteriores verificamos que a microinjeção de CBD (15 e 30 nmol) no córtex infralímbico aumentou o congelamento, ao contrário do efeito da injeção na região pré-límbica. Assim, é possível sugerir que o CBD, talvez por inibir neurônios excitatórios, poderia estar inibindo a atividade do córtex pré-frontal infralímbico (IL), aumentando o congelamento. Essa hipótese é compatível com estudos prévios da literatura (VIDAL-GONZALES et al., 2006) mostrando que a estimulação do IL atenua o congelamento. Assim, é plausível propor que a inibição do IL, de maneira oposta à estimulação do PL, aumentaria a

REC contextual.

A modulação diferenciada de respostas condicionadas pelas regiões pré-límbica e infralímbica do CPFm pode ser explicada, pelo menos em parte, por diferenças neuroanatômicas e funcionais entre essas duas estruturas (CONDÉ et al., 1995; HURLEY et al., 1991; VERTES, 2004). Nesse sentido, é interessante comentar que Quirk et al. (2003) observaram que a estimulação elétrica da região infralímbica do CPFm diminuiu a atividade dos neurônios eferentes do núcleo central do complexo amigdalóide (CeA), assim os autores concluíram que o córtex pré-frontal exerce controle inibitório sobre esse núcleo do complexo amigdalóide. Entretanto, Likhtik et al. (2005) observaram que a estimulação do CPFm excita, ao contrário de inibir, os neurônios do núcleo basolateral do complexo amigdalóide (estrutura que emite projeções excitatórias para o CeA). Além disso, o mesmo grupo tem sugerido que a diminuição da atividade do CeA induzida pela estimulação do córtex infralímbico seja devida a um aumento na atividade de células intercaladas do complexo amigdalóide via projeções glutamatérgicas (BERRETTA et al., 2005, QUIRK et al., 2003), uma vez que bloqueio do tônus inibitório do IL com picrotoxina aumenta a imunorreatividade para c-Fos nessas células intercaladas (BERRETTA et al., 2005).

Considerando as diferenças mencionadas entre o córtex pré e infralímbico, é importante discutir com cautela os resultados na imunomarcagem de c-Fos e sua possível relação com a expressão da REC. Beck e Fibiger (1995), de maneira similar ao encontrado no presente estudo, mostraram aumentos nos níveis de c-Fos tanto no PL quanto no IL após a REC, entretanto Herry e Mons (2004), utilizando diferentes protocolos de extinção, mostraram que os níveis de c-Fos nessas estruturas são reduzidos ou aumentados em animais com resposta de congelamento elevada ou diminuída, respectivamente.

Nesse sentido, é plausível propor que a ativação do PL ou IL durante a REC pode apresentar papéis distintos: enquanto que a atividade do PL estaria associada com o congelamento, a atividade do IL poderia atuar como um controle inibitório sobre o PL e sobre

a REC. Essa hipótese é compatível com trabalhos mostrando que a atividade do PL aumenta o congelamento (CORCORAN e QUIRK, 2007; VIDAL-GONZALEZ et al., 2006) enquanto que a atividade do IL diminui essa resposta comportamental (IZQUIERDO, WELLMAN e HOLMES, 2006; SANTINI, QUIRK e PORTER, 2008; VIDAL-GONZALEZ et al., 2006). Portanto, é possível que o CBD, ao inibir a atividade do córtex pré-límbico, reduza também a ativação do córtex infralímbico que exerce tônus inibitório sobre o PL.

Apesar de não ter sido investigado no presente estudo, o mecanismo farmacológico pelo qual o CBD promove seu efeito sobre a REC, é interessante especular algumas possibilidades que podem ser investigadas em estudos posteriores. Nesse sentido, é interessante discutir os três principais alvos farmacológicos da droga (inibição do transporte de canabinóides endógenos, agonismo de receptores 5-HT-1A da serotonina e agonismo de receptores vanilóides do subtipo TRPV1), bem como os efeitos de drogas que agem nesses alvos farmacológicos em respostas condicionadas.

Com relação ao primeiro alvo farmacológico do CBD, alguns estudos têm mostrado que a administração sistêmica (CHHATWAL et al., 2005) ou intracerebroventricular (icv) (BITENCOURT, PAMPLONA e TAKAHASHI, 2008) de AM404, um inibidor da recaptação de endocanabinóides, facilita a extinção de respostas condicionadas contextuais, entretanto nesses estudos não foi observado efeito ansiolítico (redução do congelamento na primeira reexposição ao contexto).

Bitencourt, Pamplona e Takahashi (2008) também administraram CBD por via icv e observaram efeito similar ao AM404 sendo o efeito de ambas as drogas atenuado pelo tratamento prévio com antagonista de receptores canabinóides CB1. Entretanto, diferentemente do observado nos estudos do nosso grupo, não observaram efeito ansiolítico do CBD no modelo do medo contextual. Uma possível explicação para a ausência de efeito ansiolítico no estudo de mencionado acima seria que o tratamento com uma dose muito menor, em comparação com as doses utilizadas em administrações cerebrais no presente

estudo, não teria efeito ansiolítico. Assim, é plausível especular que doses baixas de CBD facilitem a extinção de memórias aversivas e que doses mais altas promovam efeito ansiolítico.

Com relação ao efeito das microinjeções de CBD no córtex pré-frontal medial (CPFm) é importante discutir alguns possíveis mecanismos envolvendo um efeito sobre a neurotransmissão endocanabinóide. Em estudo recente, Rubino et al. (2008) mostraram que a microinjeção de metanandamida (agonista não seletivo CB1/TRPV1) no CPFm promove efeito ansiolítico ou ansiogênico no modelo do labirinto em cruz elevado de maneira dose-dependente, sendo o efeito ansiolítico atenuado pelo pré-tratamento com antagonista CB1 e o efeito ansiogênico atenuado pelo tratamento prévio com antagonista TRPV1 nessa estrutura cerebral. Apesar de se tratar de outro modelo, é possível que os receptores CB1 localizados na porção pré-límbica do córtex pré-frontal medial contribuam, pelo menos em parte, para o efeito ansiolítico do CBD na REC contextual uma vez que essa droga pode potencializar a ação de agonistas endógenos deste receptor por inibir a recaptação e degradação dos mesmos (BISOGNO et al., 2001).

Recentemente, Lin et al. (2008) mostraram que a microinjeção de agonista canabinóide (WIN55212-2) ou de drogas que potencializam a neurotransmissão endocanabinóide (AM404 ou URB597) diretamente no córtex infralímbico reduz respostas comportamentais associadas ao condicionamento aversivo utilizando a luz como estímulo condicionado. Entretanto, de maneira oposta, Laviolette e Grace (2006) mostraram que microinjeção de AM251 (antagonista CB1) no CPFm reduz a resposta de congelamento induzida por um estímulo condicionado olfatório, sendo que o tratamento com WIN (agonista CB1) foi capaz de promover congelamento na presença de estímulos sublimiares (intensidades de choque de apenas 0,4 mA) nesse tipo de condicionamento.

Assim, não se pode descartar que receptores CB1 tanto da sub-região pré quanto infralímbica do CPFm possam estar envolvidos nos dois efeitos (ansiolítico ou ansiogênico)

do CBD, lembrando que as duas sub-regiões modulam de maneira oposta a expressão da REC contextual (VIDAL-GONZALES et al., 2006).

Com relação a um possível efeito do CBD mediado por receptores vanilóides é possível que o efeito ansiogênico observado com a administração do composto na porção infralímbica seja devido, pelo menos em parte, a ativação de receptores TRPV1. Nesse sentido, dados não publicados do nosso grupo têm mostrado que o tratamento prévio com antagonista TRPV1 na SCP dorsolateral juntamente com dose alta de CBD, que *per se* não apresenta efeito, promove aumento da exploração dos braços abertos do labirinto em cruz elevado. Assim, têm sido sugerido pelo nosso grupo que a ausência de efeito ansiolítico de doses altas de CBD pode ser mediada pela ativação de receptores TRPV1 na SCP dorsolateral (Terzian et al., dados não publicados).

Ainda com relação ao envolvimento dos receptores TRPV1 sobre a expressão da REC contextual, apenas um estudo investigou o envolvimento desses receptores utilizando animais nocautes para o receptor. Nesse estudo, os autores observaram que na ausência do receptor TRPV1 os animais apresentavam maior exploração dos braços abertos no labirinto em cruz elevado e diminuída expressão de medo condicionado (MARSCH et al., 2007). Outro estudo, utilizando administração sistêmica de agonista e antagonista TRPV1, observou que o tratamento sistêmico com capsazepina (antagonista TRPV1) apresenta efeito tipo ansiolítico no labirinto em cruz elevado (KASCKOW, MULCHAHEY e GERACIOTI, 2004), reforçando a hipótese de que a ativação de receptores TRPV1 apresenta efeito pró-aversivo. Diante do exposto, é plausível especular que o efeito ansiolítico do CBD não seja devido à ativação de receptores TRPV1 pelo composto.

Considerando um possível envolvimento de receptores 5-HT-1A da serotonina no efeito ansiolítico do CBD sobre a REC contextual, é interessante comentar que a administração sistêmica de inibidores do transporte de serotonina ou de agonistas 5-HT-1A antes da reexposição ao contexto atenua o congelamento, bem como a ativação de áreas cerebrais

envolvidas nessa resposta (HASHIMOTO, INOUE e KOYAMA, 1999; INOUE, TSUCHIYA e KOYAMA, 1994; IZUMI et al., 2006; WISŁOWSKA-STANEK et al., 2005).

Com relação ao envolvimento de receptores 5-HT-1A do córtex pré-frontal em respostas condicionadas contextuais, apenas um estudo foi conduzido microinjetando dose única de agonista desse receptor no CPFm (LI et al., 2006). Os autores concluíram que os receptores 5-HT-1A nessa área do cérebro não estão envolvidos na modulação da expressão da REC contextual. Entretanto, é interessante comentar outros estudos que verificaram aumentos nos níveis extracelulares de serotonina durante a REC contextual, sendo que os níveis aumentados de serotonina nessa estrutura ocorreram nos instantes que a resposta de congelamento encontrou-se bastante diminuída em comparação com o início do teste quando os níveis de serotonina no CPFm foram baixos e o congelamento intenso. Além disso, no mesmo estudo, os autores mostraram que administração sistêmica de citalopram (um inibidor da recaptação de serotonina) apresentou efeito ansiolítico atenuando o congelamento desde os minutos iniciais do teste e este efeito ocorreu simultaneamente aos níveis aumentados de serotonina no CPFm desde os momentos iniciais (HASHIMOTO, INOUE e KOYAMA, 1999; YOSHIOKA et al., 1995). Assim, Hashimoto, Inoue e Koyama (1999) propuseram que o neurotransmissor serotonina no córtex pré-frontal teria um efeito antiaversivo e que o efeito ansiolítico do citalopram no modelo poderia estar relacionado aos níveis aumentados de serotonina no CPFm.

Considerando a hipótese de que os níveis aumentados de serotonina no CPFm exerçam papel antiaversivo sobre a REC contextual e considerando ainda que há necessidade de estudos mais conclusivos utilizando outras doses de agonistas 5-HT-1A nessa estrutura, seria interessante verificar se o efeito ansiolítico da microinjeção de CBD no córtex pré-límbico poderia ser atenuado pelo pré-tratamento com antagonistas 5-HT-1A, uma vez que se sabe que o CBD pode atuar como agonista desses receptores (MISHIMA et al., 2005; RUSSO et al., 2005).

Conforme mencionado acima, observou-se que o tratamento sistêmico com CBD atenuou a expressão de c-Fos na substância cinzenta periaquedutal dorsolateral tanto em animais habituados quanto condicionados. Apesar dessa região da SCP não ter sido tão implicada à expressão do medo condicionado, sendo importante, segundo alguns autores, apenas na fase de aquisição de respostas condicionadas ou expressão de medos inatos (incondicionados) (DE OCA et al., 1998), estudos recentes têm evidenciado uma modulação importante de receptores serotoninérgicos do subtipo 5-HT-1A da SCP dorsolateral na expressão do medo condicionado ao contexto (BROIZ, OLIVEIRA e BRANDÃO, 2008).

Nesse sentido, é interessante ressaltar que existem dados do laboratório (CAMPOS e GUIMARÃES, 2008) mostrando que microinjeções de CBD na região dorsolateral da SCP promove efeito ansiolítico no modelo do labirinto em cruz elevado, similar ao observado após administração sistêmica do composto (GUIMARÃES et al., 1990), sugerindo, assim, que essa estrutura está envolvida no efeito ansiolítico observado após administração sistêmica. Além disso, esse efeito tipo ansiolítico parece ser mediado por receptores 5-HT-1A nessa estrutura (CAMPOS e GUIMARÃES, 2008). Com as devidas ressalvas, por se tratar de outro modelo, é plausível que a substância cinzenta periaquedutal seja uma estrutura envolvida no efeito ansiolítico do CBD não apenas no labirinto em cruz elevado como também sobre a REC contextual.

Outro estudo recente do grupo mostrou que a administração de AM404 diretamente na SCP dorsolateral antes da reexposição ao contexto reduz a resposta de congelamento (RESSTEL et al., 2008), efeito atenuado pelo tratamento prévio com antagonista CB1. Assim, seria interessante testar a hipótese de que o tratamento com CBD nessa estrutura também apresentaria efeito ansiolítico no modelo e se esse efeito poderia ser mediado por receptores CB1 e/ou 5-HT-1A.

De acordo com o comentado acima, no presente estudo observou-se que o tratamento com CBD atenuou a expressão de c-Fos no córtex pré-frontal medial, no núcleo do leito da

estria terminal e na região dorsolateral da substância cinzenta periaquedutal. Entretanto, não se pode descartar o envolvimento de outras estruturas cerebrais no efeito ansiolítico do CBD sobre a REC contextual.

Considerando novamente que receptores 5-HT-1A da serotonina podem estar envolvidos no efeito ansiolítico do CBD sobre a REC contextual, é interessante comentar que a administração sistêmica de buspirona (um agonista 5-HT-1A) antes da reexposição ao contexto atenua o congelamento, bem como a expressão de c-Fos no hipocampo, área cerebral envolvida nessa resposta (WISŁOWSKA-STANEK et al., 2005). Além disso, outros estudos mostraram que a administração de agonista 5-HT-1A diretamente no hipocampo ou no complexo amigdalóide atenua a expressão de respostas contextuais (LI et al., 2006). Considerando que tanto o hipocampo quanto o complexo amigdalóide são estruturas de extrema importância para a expressão da REC contextual, outra hipótese que não pode ser descartada é que o CBD pode inibir o congelamento ao contexto por ativar receptores 5-HT-1A dessas estruturas (hipocampo e/ou complexo amigdalóide).

Estudos recentes em humanos têm verificado, utilizando técnicas de neuroimagem funcional, que estruturas límbicas (como o complexo amigdalóide esquerdo) ou para-límbicas (giro parahipocampal e córtex cingulado anterior e posterior) ativadas em modelos de ansiedade experimental ou em pacientes com transtornos de ansiedade, têm sua ativação reduzida pelo tratamento sistêmico com doses ansiolíticas de canabidiol, sugerindo que o efeito ansiolítico dessa droga pode envolver, pelo menos em parte, essas estruturas encefálicas (Bogwardt et al., 2008; Zuardi, 2008; Fusar-Poli et al., artigo no prelo; Crippa et al.; Bhattacharyya et al., dados não publicados).

É importante ressaltar que o presente trabalho apresenta contribuições importantes na tentativa de elucidar estruturas encefálicas envolvidas no efeito do tratamento sistêmico do CBD sobre a REC contextual, especialmente no que diz respeito ao possível envolvimento do córtex pré-límbico e do núcleo do leito da estria terminal.

Diante dos trabalhos com neuroimagem funcional citados acima e dos resultados do presente estudo é interessante enfatizar que mais estudos são necessários para investigar um possível envolvimento de outras estruturas cerebrais no efeito ansiolítico do CBD nos diversos tipos de ansiedade experimental ou transtornos de ansiedade. Além disso, estudos adicionais são necessários com o intuito de, uma vez identificados sítios de ação do composto, tentar esclarecer os mecanismos farmacológicos envolvidos nesse efeito ansiolítico.

6. CONCLUSÕES

- Os resultados do presente estudo sugerem que as regiões do núcleo do leito da estria terminal podem estar envolvidas no efeito do tratamento sistêmico do canabidiol (CBD) sobre a resposta emocional condicionada (REC) contextual, uma vez que o tratamento com CBD atenuou a imunorreatividade à proteína c-Fos nessa estrutura e os níveis de imunorreatividade nessa área do cérebro correlacionaram-se com a resposta comportamental (congelamento).
- Também é possível sugerir, no presente estudo, que a região pré-límbica do córtex pré-frontal medial também pode estar envolvida no efeito do CBD sobre a REC contextual uma vez que o tratamento sistêmico com a droga reduziu os níveis de expressão de c-Fos nessa estrutura e, além disso, a microinjeção de CBD diretamente no córtex pré-límbico atenuou a REC de maneira similar ao efeito do tratamento sistêmico.
- Pode-se sugerir ainda, que o córtex infralímbico parece não estar envolvido no efeito ansiolítico do CBD no modelo estudado, pois, apesar do tratamento sistêmico com CBD ter atenuado a expressão de c-Fos nessa região do cérebro, os estudos posteriores com microinjeções promoveram aumento ao invés de redução no tempo de congelamento (efeito oposto ao promovido pelo tratamento sistêmico).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abeliovich, A., R. Paylor, C. Chen, J. J. Kim, J. M. Wehner e S. Tonegawa. PKC gamma mutant mice exhibit mild deficits in spatial and contextual learning. Cell, v.75, n.7, p.1263-71. 1993.
- Ameri, A. The effects of cannabinoids on the brain. Prog Neurobiol, v.58, n.4, p.315-48. 1999.
- Anagnostaras, S. G., S. Maren e M. S. Fanselow. Temporally graded retrograde amnesia of contextual fear after hippocampal damage in rats: within-subjects examination. J Neurosci, v.19, n.3, p.1106-14. 1999.
- Antoniadis, E. A. e R. J. McDonald. Discriminative fear conditioning to context expressed by multiple measures of fear in the rat. Behav Brain Res, v.101, n.1, p.1-13. 1999.
- Arnold, J. C., A. N. Topples, P. E. Mallet, G. E. Hunt e I. S. McGregor. The distribution of cannabinoid-induced Fos expression in rat brain: differences between the Lewis and Wistar strain. Brain Res, v.921, n.1-2, p.240-55. 2001.
- Bading, H., D. D. Ginty e M. E. Greenberg. Regulation of gene expression in hippocampal neurons by distinct calcium signaling pathways. Science, v.260, n.5105, p.181-6. 1993.
- Bannerman, D. M., J. N. Rawlins, S. B. Mchugh, R. M. Deacon, B. K. Yee, T. Bast, W. N. Zhang, H. H. Pothuisen e J. Feldon. Regional dissociations within the hippocampus--memory and anxiety. Neurosci Biobehav Rev, v.28, n.3, p.273-83. 2004.
- Beck, C. H. e H. C. Fibiger. Conditioned fear-induced changes in behavior and in the expression of the immediate early gene c-fos: with and without diazepam pretreatment. J Neurosci, v.15, n.1 Pt 2, p.709-20. 1995.
- Berretta, S., H. Pantazopoulos, M. Caldera, P. Pantazopoulos e D. Pare. Infralimbic cortex activation increases c-Fos expression in intercalated neurons of the amygdala. Neuroscience, v.132, n.4, p.943-53. 2005.
- Bhattacharyya, S., P. Fusar-Poli, S. Borgwardt, R. Martins-Santos, C. Nosarti, C. O'Carroll, P. Allen, M. L. Seal, P. Fletcher, J. A. Crippa, V. Giampietro, A. Mechelli, Z. Atakan, P. McGuire. Delta-9-tetrahydrocannabinol modulates medial temporal and striatal functions: a neural basis for the effects of cannabis on learning & psychosis. Artigo no prelo, 2008.
- Bisogno, T., L. Hanus, L. De Petrocellis, S. Tchilibon, D. E. Ponde, I. Brandi, A. S. Moriello, J. B. Davis, R. Mechoulam e V. Di Marzo. Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. Br J Pharmacol, v.134, n.4, p.845-52. 2001.
- 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. 2008.
- Blanchard, D. C. e R. J. Blanchard. Innate and conditioned reactions to threat in rats with amygdaloid lesions. J Comp Physiol Psychol, v.81, n.2, p.281-90. 1972.
- Blanchard, R. J., D. C. Blanchard, R. Agullana e S. M. Weiss. Twenty-two kHz alarm cries to

presentation of a predator, by laboratory rats living in visible burrow systems. Physiol Behav, v.50, n.5, p.967-72. 1991.

Borgwardt SJ, Allen P, Bhattacharyya S, Fusar-Poli P, Crippa JA, Seal ML, Fraccaro V, Atakan Z, Martin-Santos R, O'Carroll C, Rubia K, McGuire PK. Neural Basis of Delta-9-Tetrahydrocannabinol and Cannabidiol: Effects During Response Inhibition. Biol Psychiatry., no prelo, 2008.

Bourtchuladze, R., B. Frenguelli, J. Blendy, D. Cioffi, G. Schutz e A. J. Silva. Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding protein. Cell, v.79, n.1, p.59-68. 1994.

Broiz, A. C., L. C. Oliveira e M. L. Brandao. Regulation of conditioned and unconditioned fear in rats by 5-HT1A receptors in the dorsal periaqueductal gray. Pharmacol Biochem Behav, v.89, n.1, p.76-84. 2008.

Bullitt, E. Expression of c-fos-like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat. J Comp Neurol, v.296, n.4, p.517-30. 1990.

Campeau, S., M. D. Hayward, B. T. Hope, J. B. Rosen, E. J. Nestler e M. Davis. Induction of the c-fos proto-oncogene in rat amygdala during unconditioned and conditioned fear. Brain Res, v.565, n.2, p.349-52. 1991.

Campeau, S. e S. J. Watson. Neuroendocrine and behavioral responses and brain pattern of c-fos induction associated with audiogenic stress. J Neuroendocrinol, v.9, n.8, p.577-88. 1997.

Campos, A. C. e F. S. Guimaraes. Involvement of 5HT1A receptors in the anxiolytic-like effects of cannabidiol injected into the dorsolateral periaqueductal gray of rats. Psychopharmacology (Berl), v.199, n.2, p.223-30. 2008.

González SC, Karniol IG, Carlini EL. Effects of Cannabis sativa extract on conditioned fear. Behav Biol, v. 7, n.7, p.83-94. 1972.

Carlini, E. A. e J. M. Cunha. Hypnotic and antiepileptic effects of cannabidiol. J Clin Pharmacol, v.21, n.8-9 Suppl, p.417S-427S. 1981.

Carrier, E. J., J. A. Auchampach e C. J. Hillard. Inhibition of an equilibrative nucleoside transporter by cannabidiol: a mechanism of cannabinoid immunosuppression. Proc Natl Acad Sci U S A, v.103, n.20, p.7895-900. 2006.

Carrive, P. Conditioned fear to environmental context: cardiovascular and behavioral components in the rat. Brain Res, v.858, n.2, p.440-5. 2000.

Carrive, P., P. Leung, J. Harris e G. Paxinos. Conditioned fear to context is associated with increased Fos expression in the caudal ventrolateral region of the midbrain periaqueductal gray. Neuroscience, v.78, n.1, p.165-77. 1997.

Ceccatelli, S., M. J. Villar, M. Goldstein e T. Hokfelt. Expression of c-Fos immunoreactivity in transmitter-characterized neurons after stress. Proc Natl Acad Sci U S A, v.86, n.23, p.9569-73. 1989.

Chan, R. K., E. R. Brown, A. Ericsson, K. J. Kovacs e P. E. Sawchenko. A comparison of two

immediate-early genes, c-fos and NGFI-B, as markers for functional activation in stress-related neuroendocrine circuitry. J Neurosci, v.13, n.12, p.5126-38. 1993.

Chen, X. e J. Herbert. Regional changes in c-fos expression in the basal forebrain and brainstem during adaptation to repeated stress: correlations with cardiovascular, hypothermic and endocrine responses. Neuroscience, v.64, n.3, p.675-85. 1995.

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, p.516-24. 2005.

Chiasson, B. J., M. G. Hong e H. A. Robertson. Putative roles for the inducible transcription factor c-fos in the central nervous system: studies with antisense oligonucleotides. Neurochem Int, v.31, n.3, p.459-75. 1997.

Conde, F., E. Maire-Lepoivre, E. Audinat e F. Crepel. Afferent connections of the medial frontal cortex of the rat. II. Cortical and subcortical afferents. J Comp Neurol, v.352, n.4, p.567-93. 1995.

Corcoran, K. A. e G. J. Quirk. Activity in prelimbic cortex is necessary for the expression of learned, but not innate, fears. J Neurosci, v.27, n.4, p.840-4. 2007.

Cousens, G. e T. Otto. Both pre- and posttraining excitotoxic lesions of the basolateral amygdala abolish the expression of olfactory and contextual fear conditioning. Behav Neurosci, v.112, n.5, p.1092-103. 1998.

Crippa, J.A., G. Derenusson, L. Wichert-Ana, F. Duran, R. Martin-Santos, M. V. Simões, A. W. Zuardi, P. K. McGuire, G. Busatto Filho, J. E. C. Hallak. Cannabidiol (CBD), a *cannabis sativa* constituent, is anxiolytic in generalized social anxiety disorder: A regional cerebral blood flow study. Artigo submetido, 2008.

Crippa, J. A., A. W. Zuardi, G. E. Garrido, L. Wichert-Ana, R. Guarnieri, L. Ferrari, P. M. Azevedo-Marques, J. E. Hallak, P. K. McGuire e G. Filho Busatto. Effects of cannabidiol (CBD) on regional cerebral blood flow. Neuropsychopharmacology, v.29, n.2, p.417-26. 2004.

Cullinan, W. E., J. P. Herman, D. F. Battaglia, H. Akil e S. J. Watson. Pattern and time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress. Neuroscience, v.64, n.2, p.477-505. 1995.

Cullinan, W. E., J. P. Herman e S. J. Watson. Ventral subicular interaction with the hypothalamic paraventricular nucleus: evidence for a relay in the bed nucleus of the stria terminalis. J Comp Neurol, v.332, n.1, p.1-20. 1993.

Davis, M. Neurobiology of fear responses: the role of the amygdala. J Neuropsychiatry Clin Neurosci, v.9, n.3, p.382-402. 1997.

De Oca, B. M., J. P. Decola, S. Maren e M. S. Fanselow. Distinct regions of the periaqueductal gray are involved in the acquisition and expression of defensive responses. J Neurosci, v.18, n.9, p.3426-32. 1998.

De Oliveira, R. M., E. A. Del Bel e F. S. Guimaraes. Effects of excitatory amino acids and nitric oxide on flight behavior elicited from the dorsolateral periaqueductal gray. Neurosci

Biobehav Rev, v.25, n.7-8, p.679-85. 2001.

De Oliveira, R. W., E. A. Del Bel e F. S. Guimaraes. Behavioral and c-fos expression changes induced by nitric oxide donors microinjected into the dorsal periaqueductal gray. Brain Res Bull, v.51, n.6, p.457-64. 2000.

Devane, W. A., F. A. Dysarz, 3rd, M. R. Johnson, L. S. Melvin e A. C. Howlett. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. Mol Pharmacol, v.34, n.5, p.605-13. 1988.

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, p.686-91. 1994.

Di Marzo, V., D. Melck, T. Bisogno e L. De Petrocellis. Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. Trends Neurosci, v.21, n.12, p.521-8. 1998.

Ding, J. M., W. C. Carver, L. Terracio e J. Buggy. Proto-oncogene c-fos and the regulation of vasopressin gene expression during dehydration. Brain Res Mol Brain Res, v.21, n.3-4, p.247-55. 1994.

Dong, H. W., G. D. Petrovich, A. G. Watts e L. W. Swanson. Basic organization of projections from the oval and fusiform nuclei of the bed nuclei of the stria terminalis in adult rat brain. J Comp Neurol, v.436, n.4, p.430-55. 2001.

Doucet, J. P., S. P. Squinto e N. G. Bazan. Fos-jun and the primary genomic response in the nervous system. Possible physiological role and pathophysiological significance. Mol Neurobiol, v.4, n.1-2, p.27-55. 1990.

Dragunow, M. e R. Faull. The use of c-fos as a metabolic marker in neuronal pathway tracing. J Neurosci Methods, v.29, n.3, p.261-5. 1989.

Duncan, G. E., K. B. Johnson e G. R. Breese. Topographic patterns of brain activity in response to swim stress: assessment by 2-deoxyglucose uptake and expression of Fos-like immunoreactivity. J Neurosci, v.13, n.9, p.3932-43. 1993.

Duncan, G. E., D. J. Knapp e G. R. Breese. Neuroanatomical characterization of Fos induction in rat behavioral models of anxiety. Brain Res, v.713, n.1-2, p.79-91. 1996.

Dunn, J. D. e T. J. Williams. Cardiovascular responses to electrical stimulation of the bed nucleus of the stria terminalis. J Comp Neurol, v.352, n.2, p.227-34. 1995.

Ericsson, A., K. J. Kovacs e P. E. Sawchenko. A functional anatomical analysis of central pathways subserving the effects of interleukin-1 on stress-related neuroendocrine neurons. J Neurosci, v.14, n.2, p.897-913. 1994.

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

Fendt, M. e M. S. Fanselow. The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. Neurosci Biobehav Rev, v.23, n.5, p.743-60. 1999.

Fields, R. D., F. Eshete, B. Stevens e K. Itoh. Action potential-dependent regulation of gene expression: temporal specificity in ca^{2+} , cAMP-responsive element binding proteins, and mitogen-activated protein kinase signaling. J Neurosci, v.17, n.19, p.7252-66. 1997.

Frankland, P. W., B. Bontempi, L. E. Talton, L. Kaczmarek e A. J. Silva. The involvement of the anterior cingulate cortex in remote contextual fear memory. Science, v.304, n.5672, p.881-3. 2004.

Fusar-Poli, P., J. A. Crippa, S. Bhattacharyya, S. Borgwardt, P. Allen, R. Martin-Santos, M. Seal, C. O'Carroll, J. Dalton, Z. Atakan, A. W. Zuardi, P. McGuire. Distinct effects of Δ^9 -Tetrahydrocannabinol and cannabidiol on neural activation during emotional processing. In press Archives Gen Psychiatry. Revision completed on April 25th 2008.

Gaiddon, C., J. P. Loeffler e Y. Larmet. Brain-derived neurotrophic factor stimulates AP-1 and cyclic AMP-responsive element dependent transcriptional activity in central nervous system neurons. J Neurochem, v.66, n.6, p.2279-86. 1996.

Goldstein, L. E., A. M. Rasmusson, B. S. Bunney e R. H. Roth. Role of the amygdala in the coordination of behavioral, neuroendocrine, and prefrontal cortical monoamine responses to psychological stress in the rat. J Neurosci, v.16, n.15, p.4787-98. 1996.

Graeff, F. G. Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviors and related emotions in mammals. Braz J Med Biol Res, v.27, n.4, p.811-29. 1994.

Greenberg, M. E. e E. B. Ziff. Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-fos proto-oncogene. Nature, v.311, n.5985, p.433-8. 1984.

Guimaraes, F. S., T. M. Chiaretti, F. G. Graeff e A. W. Zuardi. Antianxiety effect of cannabidiol in the elevated plus-maze. Psychopharmacology (Berl), v.100, n.4, p.558-9. 1990.

Guimaraes, V. M., A. W. Zuardi, E. A. Del Bel e F. S. Guimaraes. Cannabidiol increases Fos expression in the nucleus accumbens but not in the dorsal striatum. Life Sci, v.75, n.5, p.633-8. 2004.

Hamamura, M., D. J. Nunez, G. Leng, P. C. Emson e H. Kiyama. c-fos may code for a common transcription factor within the hypothalamic neural circuits involved in osmoregulation. Brain Res, v.572, n.1-2, p.42-51. 1992.

Hardingham, G. E., S. Chawla, C. M. Johnson e H. Bading. Distinct functions of nuclear and cytoplasmic calcium in the control of gene expression. Nature, v.385, n.6613, p.260-5. 1997.

Hashimoto, S., T. Inoue e T. Koyama. Effects of conditioned fear stress on serotonin neurotransmission and freezing behavior in rats. Eur J Pharmacol, v.378, n.1, p.23-30. 1999.

Helmstetter, F. J. The amygdala is essential for the expression of conditional hypoalgesia. Behav Neurosci, v.106, n.3, p.518-28. 1992.

Herry, C. e N. Mons. Resistance to extinction is associated with impaired immediate early gene induction in medial prefrontal cortex and amygdala. Eur J Neurosci, v.20, n.3, p.781-90. 2004.

Huerta, P. T., L. D. Sun, M. A. Wilson e S. Tonegawa. Formation of temporal memory

- requires NMDA receptors within CA1 pyramidal neurons. Neuron, v.25, n.2, p.473-80. 2000.
- Huff, N. C., M. Frank, K. Wright-Hardesty, D. Sprunger, P. Matus-Amat, E. Higgins e J. W. Rudy. Amygdala regulation of immediate-early gene expression in the hippocampus induced by contextual fear conditioning. J Neurosci, v.26, n.5, p.1616-23. 2006.
- Hughes, P., P. Lawlor e M. Dragunow. Basal expression of Fos, Fos-related, Jun, and Krox 24 proteins in rat hippocampus. Brain Res Mol Brain Res, v.13, n.4, p.355-7. 1992.
- Hurley, K. M., H. Herbert, M. M. Moga e C. B. Saper. Efferent projections of the infralimbic cortex of the rat. J Comp Neurol, v.308, n.2, p.249-76. 1991.
- Ikeda, J., T. Nakajima, O. C. Osborne, G. Mies e T. S. Nowak, Jr. Coexpression of c-fos and hsp70 mRNAs in gerbil brain after ischemia: induction threshold, distribution and time course evaluated by in situ hybridization. Brain Res Mol Brain Res, v.26, n.1-2, p.249-58. 1994.
- Imaki, T., T. Shibasaki, M. Hotta e H. Demura. Intracerebroventricular administration of corticotropin-releasing factor induces c-fos mRNA expression in brain regions related to stress responses: comparison with pattern of c-fos mRNA induction after stress. Brain Res, v.616, n.1-2, p.114-25. 1993.
- Inoue, T., K. Tsuchiya e T. Koyama. Regional changes in dopamine and serotonin activation with various intensity of physical and psychological stress in the rat brain. Pharmacol Biochem Behav, v.49, n.4, p.911-20. 1994.
- Inoue, T., K. Tsuchiya e T. Koyama. Serotonergic activation reduces defensive freezing in the conditioned fear paradigm. Pharmacol Biochem Behav, v.53, n.4, p.825-31. 1996.
- Iwata, J., J. E. Ledoux e D. J. Reis. Destruction of intrinsic neurons in the lateral hypothalamus disrupts the classical conditioning of autonomic but not behavioral emotional responses in the rat. Brain Res, v.368, n.1, p.161-6. 1986.
- Izquierdo, A., C. L. Wellman e A. Holmes. Brief uncontrollable stress causes dendritic retraction in infralimbic cortex and resistance to fear extinction in mice. J Neurosci, v.26, n.21, p.5733-8. 2006.
- Izumi, T., T. Inoue, Y. Kitaichi, S. Nakagawa e T. Koyama. Target brain sites of the anxiolytic effect of citalopram, a selective serotonin reuptake inhibitor. Eur J Pharmacol, v.534, n.1-3, p.129-32. 2006.
- Kaczmarek, L. e A. Chaudhuri. Sensory regulation of immediate-early gene expression in mammalian visual cortex: implications for functional mapping and neural plasticity. Brain Res Brain Res Rev, v.23, n.3, p.237-56. 1997.
- Kasckow, J. W., J. J. Mulchahey e T. D. Geraciotti, Jr. Effects of the vanilloid agonist olvanil and antagonist capsazepine on rat behaviors. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, v.28, n.2, p.291-5. 2004.
- Kathmann, M., K. Flau, A. Redmer, C. Trankle e E. Schlicker. Cannabidiol is an allosteric modulator at mu- and delta-opioid receptors. Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol, v.372, n.5, p.354-61. 2006.
- Kim, J. J. e M. S. Fanselow. Modality-specific retrograde amnesia of fear. Science, v.256,

n.5057, p.675-7. 1992.

Kim, J. J. e M. W. Jung. Neural circuits and mechanisms involved in Pavlovian fear conditioning: a critical review. Neurosci Biobehav Rev, v.30, n.2, p.188-202. 2006.

Kollack-Walker, S., S. J. Watson e H. Akil. Social stress in hamsters: defeat activates specific neurocircuits within the brain. J Neurosci, v.17, n.22, p.8842-55. 1997.

Kovacs, K. J. c-Fos as a transcription factor: a stressful (re)view from a functional map. Neurochem Int, v.33, n.4, p.287-97. 1998.

Kovacs, K. J. e P. E. Sawchenko. Regulation of stress-induced transcriptional changes in the hypothalamic neurosecretory neurons. J Mol Neurosci, v.7, n.2, p.125-33. 1996a.

Kovacs, K. J. e P. E. Sawchenko. Sequence of stress-induced alterations in indices of synaptic and transcriptional activation in parvocellular neurosecretory neurons. J Neurosci, v.16, n.1, p.262-73. 1996b.

Laviolette, S. R. e A. A. Grace. Cannabinoids Potentiate Emotional Learning Plasticity in Neurons of the Medial Prefrontal Cortex through Basolateral Amygdala Inputs. J Neurosci, v.26, n.24, p.6458-68. 2006.

Ledoux, J. Emotional networks and motor control: a fearful view. Prog Brain Res, v.107, p.437-46. 1996.

Ledoux, J. E., J. Iwata, P. Cicchetti e D. J. Reis. Different projections of the central amygdaloid nucleus mediate autonomic and behavioral correlates of conditioned fear. J Neurosci, v.8, n.7, p.2517-29. 1988.

Lee, H. J., J. S. Choi, T. H. Brown e J. J. Kim. Amygdalar nmda receptors are critical for the expression of multiple conditioned fear responses. J Neurosci, v.21, n.11, p.4116-24. 2001.

Li, H. Y., A. Ericsson e P. E. Sawchenko. Distinct mechanisms underlie activation of hypothalamic neurosecretory neurons and their medullary catecholaminergic afferents in categorically different stress paradigms. Proc Natl Acad Sci U S A, v.93, n.6, p.2359-64. 1996.

Li, X., T. Inoue, T. Abekawa, S. Weng, S. Nakagawa, T. Izumi e T. Koyama. 5-HT1A receptor agonist affects fear conditioning through stimulations of the postsynaptic 5-HT1A receptors in the hippocampus and amygdala. Eur J Pharmacol, v.532, n.1-2, p.74-80. 2006.

Likhtik, E., J. G. Pelletier, R. Paz e D. Pare. Prefrontal control of the amygdala. J Neurosci, v.25, n.32, p.7429-37. 2005.

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. 2008.

Liu, I. Y., W. E. Lyons, L. A. Mamounas e R. F. Thompson. Brain-derived neurotrophic factor plays a critical role in contextual fear conditioning. J Neurosci, v.24, n.36, p.7958-63. 2004.

Maren, S. Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. Annu Rev Neurosci, v.24, p.897-931. 2001.

Maren, S. e G. J. Quirk. Neuronal signalling of fear memory. Nat Rev Neurosci, v.5, n.11, p.844-52. 2004.

Marsch, R., E. Foeller, G. Rammes, M. Bunck, M. Kossel, F. Holsboer, W. Zieglgansberger, R. Landgraf, B. Lutz e C. T. Wotjak. Reduced anxiety, conditioned fear, and hippocampal long-term potentiation in transient receptor potential vanilloid type 1 receptor-deficient mice. J Neurosci, v.27, n.4, p.832-9. 2007.

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

Matsuda, L. A., S. J. Lolait, M. J. Brownstein, A. C. Young e T. I. Bonner. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. Nature, v.346, n.6284, p.561-4. 1990.

Mechoulam, R., L. A. Parker e R. Gallily. Cannabidiol: an overview of some pharmacological aspects. J Clin Pharmacol, v.42, n.11 Suppl, p.11S-19S. 2002.

Melia, K. R., A. E. Ryabinin, R. Schroeder, F. E. Bloom e M. C. Wilson. Induction and habituation of immediate early gene expression in rat brain by acute and repeated restraint stress. J Neurosci, v.14, n.10, p.5929-38. 1994.

Milanovic, S., J. Radulovic, O. Laban, O. Stiedl, F. Henn e J. Spiess. Production of the Fos protein after contextual fear conditioning of C57BL/6N mice. Brain Res, v.784, n.1-2, p.37-47. 1998.

Mishima, K., K. Hayakawa, K. Abe, T. Ikeda, N. Egashira, K. Iwasaki e M. Fujiwara. Cannabidiol prevents cerebral infarction via a serotonergic 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor-dependent mechanism. Stroke, v.36, n.5, p.1077-82. 2005.

Morales, M., J. R. Criado, P. P. Sanna, S. J. Henriksen e F. E. Bloom. Acute ethanol induces c-fos immunoreactivity in GABAergic neurons of the central nucleus of the amygdala. Brain Res, v.798, n.1-2, p.333-6. 1998.

Moreira, F. A., D. C. Aguiar e F. S. Guimaraes. Anxiolytic-like effect of cannabidiol in the rat Vogel conflict test. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, v.30, n.8, p.1466-71. 2006.

Moreira, F. A. e F. S. Guimaraes. Cannabidiol inhibits the hyperlocomotion induced by psychotomimetic drugs in mice. Eur J Pharmacol, v.512, n.2-3, p.199-205. 2005.

Morgan, J. I. e T. Curran. Stimulus-transcription coupling in neurons: role of cellular immediate-early genes. Trends Neurosci, v.12, n.11, p.459-62. 1989.

Morgan, M. A. e J. E. Ledoux. Differential contribution of dorsal and ventral medial prefrontal cortex to the acquisition and extinction of conditioned fear in rats. Behav Neurosci, v.109, n.4, p.681-8. 1995.

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, p.109-13. 1993.

- Musty RE, Conti LH e Mechoulam R. Anxiolytic properties of cannabidiol. *In: Harvey DJ (eds) Marijuana '84*. Proceedings of the Oxford Symposium on Cannabis. IRL Press Limited: Oxford. pp 713–719, 1984.
- Pamplona FA, Prediger RD, Pandolfo P e Takahashi RN. The cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 facilitates the extinction of contextual fear memory and spatial memory in rats. Psychopharmacology, v.188, n.4, p.641-9. 2006.
- Papa, M., M. P. Pellicano, H. Welzl e A. G. Sadile. Distributed changes in c-Fos and c-Jun immunoreactivity in the rat brain associated with arousal and habituation to novelty. Brain Res Bull, v.32, n.5, p.509-15. 1993.
- Paxinos G. e Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, New York, 1997.
- Perez-Villalba, A., V. Teruel-Marti, A. Ruiz-Torner e F. Olucha-Bordonau. The effect of long context exposure on cued conditioning and c-fos expression in the rat forebrain. Behav Brain Res, v.161, n.2, p.263-75. 2005.
- Petit, F., B. Jeantaud, M. Reibaud, A. Imperato e M. C. Dubroeuq. Complex pharmacology of natural cannabinoids: evidence for partial agonist activity of delta9-tetrahydrocannabinol and antagonist activity of cannabidiol on rat brain cannabinoid receptors. Life Sci, v.63, n.1, p.PL1-6. 1998.
- Pezzone, M. A., W. S. Lee, G. E. Hoffman e B. S. Rabin. Induction of c-Fos immunoreactivity in the rat forebrain by conditioned and unconditioned aversive stimuli. Brain Res, v.597, n.1, p.41-50. 1992.
- Phillips, R. G. e J. E. Ledoux. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. Behav Neurosci, v.106, n.2, p.274-85. 1992.
- Piomelli, D. The molecular logic of endocannabinoid signalling. Nat Rev Neurosci, v.4, n.11, p.873-84. 2003.
- 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, p.8800-7. 2003.
- Quirk, G. J. e D. Mueller. Neural mechanisms of extinction learning and retrieval. Neuropsychopharmacology, v.33, n.1, p.56-72. 2008.
- Radulovic, J., J. Kammermeier e J. Spiess. Relationship between fos production and classical fear conditioning: effects of novelty, latent inhibition, and unconditioned stimulus preexposure. J Neurosci, v.18, n.18, p.7452-61. 1998.
- Reijmers, L. G., B. L. Perkins, N. Matsuo e M. Mayford. Localization of a stable neural correlate of associative memory. Science, v.317, n.5842, p.1230-3. 2007.
- Repa JC, Muller J, Apergis J, Desrochers TM, Zhou Y e LeDoux JE. Two different lateral amygdala cell populations contribute to the initiation and storage of memory. Nat Neurosci, v. 4, n.7, p.724-31.2001.

- Resstel, L. B., F. H. Alves, D. G. Reis, C. C. Crestani, F. M. Correa e F. S. Guimaraes. Anxiolytic-like effects induced by acute reversible inactivation of the bed nucleus of stria terminalis. Neuroscience, v.154, n.3, p.869-76. 2008.
- Resstel, L. B., S. R. Joca, F. A. Moreira, F. M. Correa e F. S. Guimaraes. Effects of cannabidiol and diazepam on behavioral and cardiovascular responses induced by contextual conditioned fear in rats. Behav Brain Res, v.172, n.2, p.294-8. 2006.
- Resstel, L. B., S. F. Lisboa, D. C. Aguiar, F. M. Correa e F. S. Guimaraes. Activation of CB1 cannabinoid receptors in the dorsolateral periaqueductal gray reduces the expression of contextual fear conditioning in rats. Psychopharmacology (Berl), v.198, n.3, p.405-11. 2008.
- Rosen, J. B., M. S. Fanselow, S. L. Young, M. Sitcoske e S. Maren. Immediate-early gene expression in the amygdala following footshock stress and contextual fear conditioning. Brain Res, v.796, n.1-2, p.132-42. 1998.
- Rubino, T., N. Realini, C. Castiglioni, C. Guidali, D. Vigano, E. Marras, S. Petrosino, G. Perletti, M. Maccarrone, V. Di Marzo e D. Parolaro. Role in anxiety behavior of the endocannabinoid system in the prefrontal cortex. Cereb Cortex, v.18, n.6, p.1292-301. 2008.
- Russo, E. B., A. Burnett, B. Hall e K. K. Parker. Agonistic properties of cannabidiol at 5-HT1a receptors. Neurochem Res, v.30, n.8, p.1037-43. 2005.
- Sagar, S. M., F. R. Sharp e T. Curran. Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. Science, v.240, n.4857, p.1328-31. 1988.
- Salminen, O., S. Lahtinen e L. Ahtee. Expression of Fos protein in various rat brain areas following acute nicotine and diazepam. Pharmacol Biochem Behav, v.54, n.1, p.241-8. 1996.
- Sandner, G., P. Oberling, M. C. Silveira, G. Di Scala, B. Rocha, A. Bagri e R. Depoortere. What brain structures are active during emotions? Effects of brain stimulation elicited aversion on c-fos immunoreactivity and behavior. Behav Brain Res, v.58, n.1-2, p.9-18. 1993.
- Santini, E., H. Ge, K. Ren, S. Pena De Ortiz e G. J. Quirk. Consolidation of fear extinction requires protein synthesis in the medial prefrontal cortex. J Neurosci, v.24, n.25, p.5704-10. 2004.
- Santini, E., G. J. Quirk e J. T. Porter. Fear conditioning and extinction differentially modify the intrinsic excitability of infralimbic neurons. J Neurosci, v.28, n.15, p.4028-36. 2008.
- Scicli, A. P., G. D. Petrovich, L. W. Swanson e R. F. Thompson. Contextual fear conditioning is associated with lateralized expression of the immediate early gene c-fos in the central and basolateral amygdalar nuclei. Behav Neurosci, v.118, n.1, p.5-14. 2004.
- Seamans, J. K., S. B. Floresco e A. G. Phillips. Functional differences between the prelimbic and anterior cingulate regions of the rat prefrontal cortex. Behav Neurosci, v.109, n.6, p.1063-73. 1995.
- Sharp, F. R., S. M. Sagar, K. Hicks, D. Lowenstein e K. Hisanaga. c-fos mRNA, Fos, and Fos-related antigen induction by hypertonic saline and stress. J Neurosci, v.11, n.8, p.2321-31. 1991.
- Sheng, M. e M. E. Greenberg. The regulation and function of c-fos and other immediate early

- genes in the nervous system. Neuron, v.4, n.4, p.477-85. 1990.
- Sheng, M., G. Mcfadden e M. E. Greenberg. Membrane depolarization and calcium induce c-fos transcription via phosphorylation of transcription factor CREB. Neuron, v.4, n.4, p.571-82. 1990.
- Sierra-Mercado, D., Jr., K. A. Corcoran, K. Lebron-Milad e G. J. Quirk. Inactivation of the ventromedial prefrontal cortex reduces expression of conditioned fear and impairs subsequent recall of extinction. Eur J Neurosci, v.24, n.6, p.1751-8. 2006.
- Smith, M. A., S. Banerjee, P. W. Gold e J. Glowa. Induction of c-fos mRNA in rat brain by conditioned and unconditioned stressors. Brain Res, v.578, n.1-2, p.135-41. 1992.
- Sonnenberg, J. L., C. Mitchelmore, P. F. Macgregor-Leon, J. Hempstead, J. I. Morgan e T. Curran. Glutamate receptor agonists increase the expression of Fos, Fra, and AP-1 DNA binding activity in the mammalian brain. J Neurosci Res, v.24, n.1, p.72-80. 1989.
- Sotty, F., G. Sandner e O. Gosselin. Latent inhibition in conditioned emotional response: c-fos immunolabelling evidence for brain areas involved in the rat. Brain Res, v.737, n.1-2, p.243-54. 1996.
- Stiedl, O. e J. Spiess. Effect of tone-dependent fear conditioning on heart rate and behavior of C57BL/6N mice. Behav Neurosci, v.111, n.4, p.703-11. 1997.
- Sullivan, G. M., J. Apergis, D. E. Bush, L. R. Johnson, M. Hou e J. E. Ledoux. Lesions in the bed nucleus of the stria terminalis disrupt corticosterone and freezing responses elicited by a contextual but not by a specific cue-conditioned fear stimulus. Neuroscience, v.128, n.1, p.7-14. 2004.
- Szekely, A. M., M. L. Barbaccia e E. Costa. Activation of specific glutamate receptor subtypes increases C-fos proto-oncogene expression in primary cultures of neonatal rat cerebellar granule cells. Neuropharmacology, v.26, n.12, p.1779-82. 1987.
- Thomas, A., G. L. Baillie, A. M. Phillips, R. K. Razdan, R. A. Ross e R. G. Pertwee. Cannabidiol displays unexpectedly high potency as an antagonist of CB1 and CB2 receptor agonists in vitro. Br J Pharmacol, v.150, n.5, p.613-23. 2007.
- Thompson, B. L. e J. B. Rosen. Immediate-early gene expression in the central nucleus of the amygdala is not specific for anxiolytic or anxiogenic drugs. Neuropharmacology, v.50, n.1, p.57-68. 2006.
- Vertes, R. P. Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. Synapse, v.51, n.1, p.32-58. 2004.
- Vidal-Gonzalez, I., B. Vidal-Gonzalez, S. L. Rauch e G. J. Quirk. Microstimulation reveals opposing influences of prelimbic and infralimbic cortex on the expression of conditioned fear. Learn Mem, v.13, n.6, p.728-33. 2006.
- Viveros, M. P., E. M. Marco e S. E. File. Endocannabinoid system and stress and anxiety responses. Pharmacol Biochem Behav, v.81, n.2, p.331-42. 2005.
- Walker, P. e P. Carrive. Role of ventrolateral periaqueductal gray neurons in the behavioral and cardiovascular responses to contextual conditioned fear and poststress recovery.

Neuroscience, v.116, n.3, p.897-912. 2003.

Wan, W., L. Janz, C. Y. Vriend, C. M. Sorensen, A. H. Greenberg e D. M. Nance. Differential induction of c-Fos immunoreactivity in hypothalamus and brain stem nuclei following central and peripheral administration of endotoxin. Brain Res Bull, v.32, n.6, p.581-7. 1993.

Weiskrantz, L. Behavioral changes associated with ablation of the amygdaloid complex in monkeys. J Comp Physiol Psychol, v.49, n.4, p.381-91. 1956.

Wilson, R. I. e R. A. Nicoll. Endocannabinoid signaling in the brain. Science, v.296, n.5568, p.678-82. 2002.

Wisłowska-Stanek, A., M. Zienowicz, M. Lehner, E. Taracha, A. Bidzinski, P. Maciejak, A. Skorzewska, J. Szyndler e A. Plaznik. Buspirone attenuates conditioned fear-induced c-Fos expression in the rat hippocampus. Neurosci Lett, v.389, n.2, p.115-20. 2005.

Yoshioka, M., M. Matsumoto, H. Togashi e H. Saito. Effects of conditioned fear stress on 5-HT release in the rat prefrontal cortex. Pharmacol Biochem Behav, v.51, n.2-3, p.515-9. 1995.

Zuardi AW. Cannabidiol: from an inactive cannabinoid to a drug with wide spectrum of action. Rev Bras Psiquiatr, v.30, n. 3, p.271-80, 2008.

Zuardi, A. W., S. L. Morais, F. S. Guimaraes e R. Mechoulam. Antipsychotic effect of cannabidiol. J Clin Psychiatry, v.56, n.10, p.485-6. 1995.

Zuardi, A. W., J. A. Rodrigues e J. M. Cunha. Effects of cannabidiol in animal models predictive of antipsychotic activity. Psychopharmacology (Berl), v.104, n.2, p.260-4. 1991.

Anexo 1 – Primeira Versão do artigo científico**Title Page**

Involvement of the prelimbic prefrontal cortex on cannabidiol-induced attenuation of contextual conditioned fear.

José Inácio Lemos, Francisco Silveira Guimarães

Department of Pharmacology, School of Medicine of Ribeirão Preto

Campus USP, 14049-900, Ribeirão Preto, SP, Brazil

Corresponding author: Dr. Francisco Silveira Guimarães

Av. Bandeirantes 3900. Postal code:14049-900- Monte Alegre.

Ribeirão Preto- SP, Brazil. Phone: +55-16-36023209, Fax: +55-16-36332301, E-mail:

fsguimar@fmrp.usp.br

Abstract

Rationale: Systemic administration of cannabidiol (CBD), a non-psychotomimetic component of *Cannabis sativa*, is able to attenuate cardiovascular (blood pressure and heart rate) and behavioral (freezing time) changes induced by re-exposition to a context that had been previously paired with footshocks. The brain sites of this effect, however, remain unknown. The medial prefrontal cortex (mPFC), particularly the prelimbic (PL) region, has been related to contextual fear conditioning.

Objectives: 1. To verify, using c-Fos immunocytochemistry, if the mPFC is involved in the attenuation of contextual fear induced by systemic administration of CBD; 2. to investigate if direct microinjections of CBD into mPFC regions would also attenuate contextual fear. *Results:* Confirming previous results systemic administration of CBD (10 mg/kg) decreased contextual fear and associated c-Fos expression in the prefrontal cortex (prelimbic and infralimbic regions). The drug also attenuated c-Fos expression in the bed nucleus of the stria terminalis (BNST). Direct CBD (30 nmol) microinjection into the prelimbic (PL) reduced freezing induced by re-exposure to the aversively conditioned context. Opposite results, however, were found when the drug was injected into the infralimbic (IL) prefrontal cortex. *Conclusion:* These results suggest that the PL prefrontal cortex may be involved in the attenuation of contextual fear induced by systemic injection of CBD. They also support the proposition that the IL and PL play opposite roles in fear conditioning. A possible involvement of the BNST in CBD effects needs to be further investigated.

Keywords Cannabidiol, contextual fear conditioning, c-Fos, prefrontal cortex

Introduction

Extracts made from *Cannabis sativa* have been used since several years before Christ due to its recreational and therapeutic effects. However, Δ^9 -THC (delta-9-tetrahydrocannabinol), the main cannabinoid responsible for the plant psychotropic effects, was only isolated in 1964 by Gaoni and Mechoulam (Di Marzo et al. 1998). Some years later cannabinoid receptors were identified (Devane et al. 1988) and cloned (Matsuda et al. 1990). The first endogenous ligand was discovered in 1992 by Devane et al. It is now well recognized that most effects of *Cannabis* are mediated by activation of CB1 receptors, which are also activated by endocannabinoids (Di Marzo et al. 1994, for review see Piomelli 2003).

Another biological active compound present in *Cannabis* extracts is cannabidiol (CBD). Different from THC, the molecular targets of CBD are not completely elucidated. Among its proposed mechanism we have antagonism of CB1 and CB2 receptors (Petitet et al. 1998; Thomas et al. 2007), agonism action at TRPV1 vanilloid receptors, inhibition of uptake and metabolism of endocannabinoids (Bisogno et al. 2001), inhibition of adenosine uptake (Carrier et al. 2006), agonism at 5HT1A receptors (Russo et al. 2005; Mishima et al. 2005) and allosteric modulation of mu and kappa opioid receptors (Kathmann et al. 2006).

CBD systemic administration produces several pharmacological effects such as anticonvulsant (Carlini and Cunha 1981), antirheumatic and antioxidant (Mechoulam et al. 2002), antipsychotic (Moreira and Guimarães 2005; Zuardi et al. 1991; Zuardi et al. 1995) and anxiolytic (Guimarães et al. 1990; Moreira et al. 2007, Crippa et al. 2004.). Regarding the latter, these anxiolytic effects have been detected in different animal models such as the elevated plus-maze, Vogel punished licking test (Moreira et al. 2007, Campos and Guimarães 2008) and fear contextual conditioning (Resstel et al. 2006).

Fear contextual conditioning is a useful animal model for studying anxiety and fear memory. In this model, fear responses are evocated when the animals are re-exposed to a context previously paired with footshocks (Fendt and Fanselow 1999; LeDoux 1996; Maren

2001). During this conditioned emotional response (CER) the animals show freezing behavior, ultrasonic vocalizations, analgesia, defecation and increases in heart rate and blood pressure (Antoniadis and McDonald 1999; Blanchard and Blanchard 1972; Blanchard et al. 1991; Carrive 2000; Iwata et al. 1986; Lee et al. 2001; Stiedl and Spiess 1997).

Many brain structures are involved in contextual CER. The aversive (unconditioned stimulus) is transmitted to the sensorial thalamus and, after synapses in cortical areas, is processed by the hippocampus – structure involved with contextual memory – which sends this information to the lateral and basolateral nuclei of amygdala where the aversive characteristic of the procedure is stored. The lateral and basolateral nuclei are connected to the central nucleus which sends projections to areas involved in contextual CER expression. The ventrolateral column of periaqueductal gray matter has been involved in freezing behavior and can also modulate brainstem structures responsible for heart rate and blood pressure regulation. The central amygdala also sends projections to the lateral hypothalamus, which modulates cardiovascular functions, and to the paraventricular nucleus, which modulates ACTH and corticosterone release (for review see Fendt and Fanselow 1999).

c-Fos immunocytochemistry is a useful technique to study brain areas activated by several stimuli (for review see Kovács 1998), including contextual fear conditioning. This latter effect is attenuated by anxiolytic drugs (Beck and Fibiger 1995; Wislowska-Stanek et al. 2005; Izumi et al. 2006).

A previous study showed that CBD, at doses that induce antipsychotic-like effects in animal models (Zuardi et al., 1991), is able to increase c-Fos expression in the medial prefrontal cortex (Zuardi et al., 2002). This brain area, particularly the prelimbic region (PL), has also been related to fear conditioning (Corcoran and Quirk 2007). Considering these pieces of evidence and our previous results showing that systemic administration of CBD reduces behavioral (freezing time) and cardiovascular responses (blood pressure and heart rate increases) induced by contextual fear, this study was conducted to verify if CBD

treatment would be able to modify Fos expression in mPFC areas activated by contextual CER. We will also verify if microinjection of CBD into these areas could also reduce contextual conditioned fear.

Material and Methods

Animals

Male Wistar rats weighing 230-270 g were housed in individual home cages three days before experimental manipulations (habituation period in the conditioning box). They were maintained in a temperature-controlled room ($24\pm 1^\circ\text{C}$) under standard laboratory conditions with free access to food and water and a 12h light/12h dark cycle (lights on at 06:30h a.m.). Procedures were conducted in conformity with the Brazilian Society of Neuroscience and Behavior guidelines for the care and use of laboratory animals, which are in compliance with international laws and policies. The experiment protocols were approved by the local Ethical Committee. All efforts were made to minimize animal suffering.

Drugs

Cannabidiol (kindly supplied by THC Pharm, Germany) was dissolved in tween 80 1 % and propilenoglycol 10% for systemic injections or grape seed oil for intracerebral microinjections (Campos and Guimarães 2008). The solutions were prepared immediately before the tests and administered in a volume of 2 ml per kilogram for systemic or 0.2 μL per side for intracerebral injections.

Stereotaxic Surgery

Male wistar rats weighing 230-270g were anesthetized with 2.5% 2,2,2-tribromoethanol (10 mg/kg, i.p.) and fixed in a stereotaxic frame. Two stainless steel guide cannulae (0.6 mm OD) were implanted bilaterally aimed at the prelimbic (coordinates: AP: +3.2 mm, ML: ± 1.6 mm and DV: -2.7 mm, from bregma, angle 14° , Paxinos and Watson 1997) or infralimbic prefrontal cortex (AP: +3.2 mm, ML: ± 1.6 mm and DV: -3.9 mm, angle 10.5°). They were attached to the bones with stainless steel screws and acrylic cement. Two obturators inside the guide cannulae prevented obstruction.

Fear conditioning

Habituation, conditioning and testing were carried out in a 25x22x22 cm footshock chamber. The chamber had a grid floor composed of 18 stainless steel rods (2 mm in diameter), spaced 1.5 cm apart and wired to a shock generator (Automatic Reflex Conditioner, model 8572; Ugo Basile, Comerio, VA, Italy). It was cleaned with 70% ethanol before and after use. Habituation consisted of two 10-min-long pre-exposures to the footshock chamber (with 2 h between them). In the conditioning shock session, performed 24 h after the first habituation session, animals were divided into two experimental groups: habituated and conditioned. The habituated animals were exposed to the footshock chamber for 10 min but did not receive any footshocks. The conditioned animals were submitted to six electrical footshocks (0.5 mA/1 s each) delivered at 20 s to 1 min intervals. The test session was performed 24 h after conditioning and consisted of a 10 min-long re-exposure to the footshock chamber without shock delivery. Freezing responses evoked by re-exposure to aversively conditioned context were defined as the complete absence of movement while the animal assumed a characteristic tense posture (Inoue et al. 1996).

Immunohistochemistry

Animals were anesthetized (with urethane (1.25 g/kg, i.p.) and transcardially perfused with saline followed by 4% paraformaldehyde in 0.1M phosphate buffer (pH 7.4). Brains were removed and post fixed over 2 h in paraformaldehyde (4%) and stored for at least 48 h in 30% sucrose for cryoprotection. Coronal sections (30 μ m) were obtained in a cryostat (Criocut 1800, Reichert-Jung, Heidelberg, Germany) and processed for c-Fos immunohistochemistry, as described by Lino-de-Oliveira et al. (2001). Briefly, tissue sections were successively washed and incubated overnight at room temperature with rabbit polyclonal immunoglobulin G (1:1,000 into TBS, sc-52, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), which was raised against an amino acid sequence of the N-terminal region of the peptide and specifically

recognizes c-Fos protein. Sections were then processed by the avidin–biotin immunoperoxidase method (Vectastain ABC kit, Vector Lab, Burlingame, CA, USA). The product of the reaction was revealed by adding the chromogen 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma Chemical, St Louis, USA) and visualized as a brown product inside neuronal nuclei. For each brain region analyzed the number of c-Fos-positive nuclei (or Fos-like immunoreactivity, FLI) was counted from a fixed area size (0.1mm^2) using a computerized image analysis system (Image-Pro Plus) as previously described by (Lino-de-Oliveira et al. 2001). A fixed area size was employed in order to avoid changes in the FLI resulting from changes in region dimensions (Lino-de-Oliveira et al. 2001). Darker objects with areas between 10 and $80\ \mu\text{m}^2$ were identified as c-Fos-positive nuclei. The system was calibrated to ignore background staining. The whole analysis was performed by a trained observer that was blind to the treatment groups. Positive objects visually recognized as spurious were eliminated from the analysis. Neuroanatomical sites were identified using the Paxinos and Watson's atlas (Paxinos and Watson 1997). In addition to the mPFC, other brain regions that showed, in a preliminary qualitative analysis, increased c-Fos expression, were also analyzed.

Taking the bregma as the reference point from the Paxinos and Watson's Stereotaxic rat brain atlas (1997), c-Fos expression was analyzed at the following structures: dorsomedial periaqueductal gray (dmPAG), dorsolateral PAG (dlPAG), lateral PAG (lPAG), ventrolateral PAG (vlPAG), analyzed at level -8.72mm ; hypothalamic paraventricular nucleus (PVN), at level -1.80mm ; bed nucleus of stria terminalis (BNST), at level -0.30mm , central nucleus of the amygdala (Cea), at level -0.40mm ; and the mPFC, cingulate cortex area 1 (Cg1), PL and infralimbic (IL) regions, at level $+3.20\text{mm}$. The results are expressed as the number of positive cells in each area.

Experimental design

Experiment 1. The habituated and conditioned animals received intraperitoneal (i.p.) injections of vehicle (Tween 80 1% plus Propylene Glycol 10%, 2 ml/Kg) or CBD (10 mg/Kg, same dose used by Resstel et al., 2006) thirty minutes before re-exposition to the aversive box. Freezing time was measure for ten minutes and the animals returned to their home cages until perfusion (2 h after test). After perfusion the brains were processed for c-Fos immunohistochemistry as described before.

Experiment 2.

Animals received bilateral injections of vehicle or CBD (15, 30 or 60 nmol; 200 nL per site, dose range used by Campos and Guimarães, 2008) into the prelimbic (PL) prefrontal cortex ten minutes before the re-exposition to the conditioning box. For microinjections, we used a 33G needle (Small Parts, Miami Lakes, FL, USA) 1 mm longer than the guide cannula, connected to a 10 µl syringe (7001 KH, Hamilton, USA) through a PE-10 tubing. The needles were carefully inserted into the guide cannulae, and the solutions were infused over a 30-s period with a rate of 400 nl/min. They remained in place for an additional 30-s period to prevent reflux.

Experiment 3.

The procedure was similar to experiment two except that CBD was injected into the IL.

Histology

After the behavioral tests the rats were sacrificed under deep urethane anesthesia and perfused through the left ventricle of the heart with isotonic saline followed by 10% formalin solution. The brains were removed and, after a minimum period of 5 days immersed in a 10 % formalin solution, 50 µm sections were obtained in a Cryostat (Cryocut 1800). The injection sites were identified in diagrams from the Paxinos and Watson's atlas (Paxinos and Watson 1997).

Animals with injection sites outside the PL (1 animal in experiment 2) or IL (3 animals in experiment 3) were excluded from analysis.

Data analysis

Fos-like immunoreactivity and behavioral data were analyzed by one-way ANOVA followed by the Duncan test for multiple comparisons. The significance level was set at $p < 0.05$.

Results

Compared to vehicle-treated animals, systemic treatment with CBD significantly decreased freezing time [$F(3,39) = 14.14$, Duncan's test, $p < 0.01$, figure 1] in conditioned rats. Fos-like immunoreactivity (FLI) of the analyzed brain structures is showed in table 1. As depicted in figures 2 to 4, FLI was higher in the PL [$F(4,23) = 2.80$, Duncan's test, $p < 0.05$] and IL [$F(4,23) = 3.22$, Duncan's test, $p < 0.05$] prefrontal cortex of conditioned vehicle-treated animals compared to naïve animals. In addition, we also observed that CBD systemic injection was able to reduce the number of c-Fos positive nuclei in the BNST [see table 1, $F(4,26) = 9.18$, $p < 0.05$ for medial anterior; $F(4,26) = 5.11$, $p < 0.05$ for dorsolateral and $F(4,26) = 7.68$, Duncan's test, $p < 0.05$, for ventral regions of the BNST, respectively]. As showed in figure 5, the microinjection of CBD into the PL prefrontal cortex reduced freezing time ($F(3,13) = 5.22$, Duncan's test, $p < 0.05$). However, in an opposite manner, injections of CBD into the IL cortex ($F = 4.35$, Duncan's test, $p < 0.05$) increased this behavioral response.

Discussion

The present work investigated the effects of systemic administration of CBD in FLI in the brain of animals submitted to a contextual CER. We also investigated the effects of intracerebral administration of CBD into mPFC regions where CBD treatment attenuated FLI.

Systemic administration of CBD reduced freezing time when the rats were re-exposed to aversive box paired previously with footshocks (see Fig. 1). These results corroborate recent data reported by Resstel et al. (2006) showing that CBD was able to reduce contextual fear in more aversive conditions (shocks of 2.5 mA, 3 s each).

CBD systemic injection also reduced FLI in the PL and IL prefrontal cortex regions (figures 2-4), suggesting that these regions could be involved in behavioral effect of systemic CBD injection. However, no difference was found in the Cg1 region. These data corroborate results reported by Frankland et al. (2004). They observed that c-Fos increases in Cg1 region when the animals were re-exposed to the aversive context 36 days, but not 24 h, after conditioning. Since reversible blockade of this region with lidocaine abolished freezing response, the authors suggested that Cg1 is involved in contextual fear expression of remote memories.

There are conflicting results regarding the role of prefrontal cortex on fear extinction. For example, c-Fos expression in prefrontal cortex was reported to be inversely related to extinction of fear conditioned memories, with high Fos levels in prefrontal cortex of animals with low freezing time (Herry and Mons 2004; Santini et al. 2004).

In accordance with the proposal that the PL is important for the expression of contextual fear and similar to our results, Frankland et al. (2004) also observed that c-Fos increases in the PL when the animals were re-exposed to the aversive conditioned chamber 24 h after conditioning. Moreover, Corcoran and Quirk (2007) showed that reversible inactivation of this region is able to abolish contextual fear expression.

In the present study we observed that microinjections of CBD into the PL (30 nmol) or

IL (15 and 30 nmol) prefrontal cortex caused opposite effects in contextual fear expression. CBD microinjection into the PL reduced freezing time while those made into the IL increased this behavioral response. Although unexpected, these results agree with the recent proposal that distinct regions of the prefrontal cortex play different roles in contextual fear. In this way, Vidal-González et al. (2006) showed that whereas PL electrical stimulation increased freezing time, stimulation of the IL produced opposite effect.

The differential modulation of fear expression by the PL and IL prefrontal cortex may be explained by distinct functions and neuroanatomical connections of these two structures (Condé et al. 1995; Hurley et al. 1991; Vertes 2004). Although there are some contradictory data (Likhtik et al., 2005), Quirk et al. (2003) verified that electrical stimulation of the IL prefrontal cortex reduced the activity of efferent neurons in the central nucleus of amygdala (CeA), probably by increasing the activity of intercalated cells activity which, in turn, would inhibit CeA neurons (Berreta et al. 2005; Quirk et al. 2003).

The opposite effects produced by CBD in the PL and IL prefrontal cortices, in addition to corroborate the proposed differential roles of these nuclei in fear conditioning, also suggest that the PL, but not the IL, could be a site related to the effects of systemically administered CBD on this process. The IL has been particularly related to consolidation of extinction of fear memories. This process can be strengthened by manipulations that augment IL function (Quirk and Mueller, 2007). It remains to be tested if the IL could be a site for the recent described facilitation of extinction induced by i.c.v. administration of CBD (Bitencourt et al. 2008).

The pharmacological mechanisms involved in CBD effects are still poorly understood, although several possibilities have been proposed. CBD can inhibit endocannabinoid uptake and metabolism (Bisogno et al. 2001). Recently, Rubino et al. (2008) reported that methanandamide (CB1/TRPV1 non-selective agonist) microinjection into the medial prefrontal cortex caused anxiolytic or anxiogenic-like effects in the elevated plus maze. The anxiolytic

effect was prevented by pretreatment with a CB1 antagonism whereas the injection of TRPV1 antagonism prevented the anxiogenic effect. These effects agree with the results reported by Lin et al. (2008), showing that the microinjections into the prefrontal cortex of a CB1 agonist (WIN55212-2) or inhibitors of uptake and metabolism of endocannabinoids (AM404 or URB597) reduced behavioral responses induced by aversive conditioning. Then, it is possible that endocannabinoid system can be involved in the anxiolytic effect of CBD injection into the PL prefrontal cortex. On the other hand, Laviolette and Grace (2006) reported that microinjection of CB1 antagonist (AM251) into the prefrontal cortex reduces freezing response induced by olfactory conditioning procedure and treatment with CB1 agonist (WIN) was able to promote freezing using subliminal stimuli (0.4 mA). The reasons for these conflicting results are not know, but may involve CB1-mediated inhibitory effects on two neurotransmitter systems (glutamate and GABA) that usually play opposite roles in defensive responses (for review, see Moreira and Lutz, 2008, Vidal-González et al. 2006). These opposite effects may well be involved in the distinct actions of CBD in the PL and IL. CBD could also act as a TRPV1 vanilloid receptor agonist (Bisogno et al. 2001) that would oppose its anxiolytic effects at high doses. In agreement with this proposal, Marsch et al. (2007) reported that TRPV1 deficient mice show reduced contextual fear expression and spent more time in the open arms of the elevated plus maze (EPM). Kasckow et al. (2004) verified that systemic treatment with capsazepine (a TRPV1 antagonist) produces anxiolytic-like effect in the EPM, reinforcing the hypothesis that TRPV1 receptor activation has pro-aversive effects.

Another mechanism proposed to explain CBD effects is activation of 5-HT-1A receptors (Mishima et al. 2005; Russo et al. 2005). The possible involvement of 5-HT-1A prefrontal cortex receptors in contextual fear expression has been poorly examined. Only one study conducted by Li et al. (2006) investigated the effects of a 5-HT-1A agonist microinjection into the prefrontal cortex on contextual fear, with negative results. However, serotonin levels increase in the prefrontal cortex during contextual fear, with higher levels

associated with decreased freezing behavior. Moreover, systemic administration of citalopram (an inhibitor of serotonin uptake) reduced fear expression and increased serotonin levels in the prefrontal cortex, suggesting that freezing behavior is inversely related to serotonergic activation in prefrontal cortex (Hashimoto et al. 1999). A recent study showed that a 5HT1A receptor antagonist was able to block the anxiolytic effects of CBD microinjected into the dorsolateral periaqueductal gray (Campos and Guimarães 2008). Moreover, systemic administration of buspirone (a partial 5-HT-1A agonist) reduced freezing behavior and Fos expression in the hippocampus (Wislowka-Stanek et al. 2005) and microinjection of 5-HT-1A agonists into the hippocampus or amygdala attenuated contextual fear expression (Li et al. 2006). Considering that all these structures have also been related to contextual fear expression, they could be a possible site for CBD action. Future experiments are needed to address this question.

In the present study we also observed that CBD systemic treatment reduced FLI induced by fear contextual conditioning in the BNST (medial anterior, lateral dorsal and ventral regions). Sullivan et al. (2004) showed that lesions of this nucleus blocked freezing behavior and the increase in corticosterone levels induced by CER. Similar effects were reported after reversible synaptic blockade of this region (Resstel et al. 2008). Together, these results indicate that the BNST is involved in the behavioral and cardiovascular responses observed in the contextual fear conditioning model. Distinct regions of this nucleus, however, could play different roles. Electrical stimulation of the medial BNST region increases blood pressure (BP) and heart rate (HR). On the other hand, stimulation of the lateral region reduces BP and has no effect in HR (Dunn and Williams 1995). Considering that CBD systemic injection was able to reduce cardiovascular changes induced by contextual fear (Resstel et al. 2006), it is possible that the BNST is involved in the effects of this drug. Further studies are necessary to test this possibility.

In conclusion, the present findings confirmed that systemic administration of CBD is

able to block the expression of contextual conditioned fear. They also suggest that this effect could involve CBD action in the PL prefrontal cortex.

Acknowledgments: We thank Dr. Eleni T. Gomes and José Carlos de Aguiar for technical support. This research was supported by grants from FAPESP and CNPq. José Inácio Lemos was a recipient of a FAPESP fellowship.

References

- Antoniadis EA, McDonald RJ (1999) Discriminative fear conditioning to context expressed by multiple measures of fear in the rat. *Behav Brain Res* 101: 1-13
- Beck CH, Fibiger HC (1995) Conditioned fear-induced changes in behavior and in the expression of the immediate early gene c-fos: with and without diazepam pretreatment. *J Neurosci* 15: 709-20
- Berretta S, Pantazopoulos H, Caldera M, Pantazopoulos P, Pare D (2005) Infralimbic cortex activation increases c-Fos expression in intercalated neurons of the amygdala. *Neuroscience* 132: 943-53
- Bisogno T, Hanus L, De Petrocellis L, Tchilibon S, Ponde DE, Brandi I, Moriello AS, Davis JB, Mechoulam R, Di Marzo V (2001) Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. *Br J Pharmacol* 134: 845-52
- Bitencourt RM, Pamplona FA, Takahashi RN (2008) Facilitation of contextual fear memory extinction and anti-anxiogenic effects of AM404 and cannabidiol in conditioned rats. *Eur Neuropsychopharmacol*
- Blanchard DC, Blanchard RJ (1972) Innate and conditioned reactions to threat in rats with amygdaloid lesions. *J Comp Physiol Psychol* 81: 281-90
- Blanchard RJ, Blanchard DC, Agullana R, Weiss SM (1991) Twenty-two kHz alarm cries to presentation of a predator, by laboratory rats living in visible burrow systems. *Physiol Behav* 50: 967-72
- Campos AC, Guimaraes FS (2008) Involvement of 5HT1A receptors in the anxiolytic-like effects of cannabidiol injected into the dorsolateral periaqueductal gray of rats. *Psychopharmacology (Berl)* 199: 223-30
- Carlini EA, Cunha JM (1981) Hypnotic and antiepileptic effects of cannabidiol. *J Clin Pharmacol* 21: 417S-427S
- Carrier EJ, Auchampach JA, Hillard CJ (2006) Inhibition of an equilibrative nucleoside transporter by cannabidiol: a mechanism of cannabinoid immunosuppression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 7895-900
- Carrive P (2000) Conditioned fear to environmental context: cardiovascular and behavioral components in the rat. *Brain Res* 858: 440-5
- Conde F, Maire-Lepoivre E, Audinat E, Crepel F (1995) Afferent connections of the medial frontal cortex of the rat. II. Cortical and subcortical afferents. *J Comp Neurol* 352: 567-93
- Corcoran KA, Quirk GJ (2007) Activity in prelimbic cortex is necessary for the expression of learned, but not innate, fears. *J Neurosci* 27: 840-4
- Crippa JA, Zuardi AW, Garrido GE, Wichert-Ana L, Guarnieri R, Ferrari L, Azevedo-Marques PM, Hallak JE, McGuire PK, Filho Busatto G (2004) Effects of cannabidiol (CBD) on regional cerebral blood flow. *Neuropsychopharmacology* 29: 417-26
- Cullinan WE, Herman JP, Watson SJ (1993) Ventral subicular interaction with the hypothalamic paraventricular nucleus: evidence for a relay in the bed nucleus of the stria terminalis. *J Comp Neurol* 332: 1-20

- Devane WA, Dysarz FA, 3rd, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC (1988) Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol* 34: 605-13
- Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz JC, Piomelli D (1994) Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature* 372: 686-91
- Di Marzo V, Melck D, Bisogno T, De Petrocellis L (1998) Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. *Trends Neurosci* 21: 521-8
- Dunn JD, Williams TJ (1995) Cardiovascular responses to electrical stimulation of the bed nucleus of the stria terminalis. *J Comp Neurol* 352: 227-34
- Fanselow MS (1980) Conditioned and unconditional components of post-shock freezing. *Pavlov J Biol Sci* 15: 177-82
- Fendt M, Fanselow MS (1999) The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. *Neurosci Biobehav Rev* 23: 743-60
- Frankland PW, Bontempi B, Talton LE, Kaczmarek L, Silva AJ (2004) The involvement of the anterior cingulate cortex in remote contextual fear memory. *Science* 304: 881-3
- Guimaraes FS, Chiaretti TM, Graeff FG, Zuardi AW (1990) Antianxiety effect of cannabidiol in the elevated plus-maze. *Psychopharmacology (Berl)* 100: 558-9
- Guimaraes VM, Zuardi AW, Del Bel EA, Guimaraes FS (2004) Cannabidiol increases Fos expression in the nucleus accumbens but not in the dorsal striatum. *Life Sci* 75: 633-8
- Hashimoto S, Inoue T, Koyama T (1999) Effects of conditioned fear stress on serotonin neurotransmission and freezing behavior in rats. *Eur J Pharmacol* 378: 23-30
- Herry C, Mons N (2004) Resistance to extinction is associated with impaired immediate early gene induction in medial prefrontal cortex and amygdala. *Eur J Neurosci* 20: 781-90
- Huff NC, Frank M, Wright-Hardesty K, Sprunger D, Matus-Amat P, Higgins E, Rudy JW (2006) Amygdala regulation of immediate-early gene expression in the hippocampus induced by contextual fear conditioning. *J Neurosci* 26: 1616-23
- Hurley KM, Herbert H, Moga MM, Saper CB (1991) Efferent projections of the infralimbic cortex of the rat. *J Comp Neurol* 308: 249-76
- Inoue T, Tsuchiya K, Koyama T (1996) Serotonergic activation reduces defensive freezing in the conditioned fear paradigm. *Pharmacol Biochem Behav* 53: 825-31
- Iwata J, LeDoux JE, Reis DJ (1986) Destruction of intrinsic neurons in the lateral hypothalamus disrupts the classical conditioning of autonomic but not behavioral emotional responses in the rat. *Brain Res* 368: 161-6
- Izumi T, Inoue T, Kitaichi Y, Nakagawa S, Koyama T (2006) Target brain sites of the anxiolytic effect of citalopram, a selective serotonin reuptake inhibitor. *Eur J Pharmacol* 534: 129-32
- Kasckow JW, Mulchahey JJ, Geraciotti TD, Jr. (2004) Effects of the vanilloid agonist olvanil and antagonist capsazepine on rat behaviors. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 28: 291-5
- Kathmann M, Flau K, Redmer A, Trankle C, Schlicker E (2006) Cannabidiol is an allosteric modulator at mu- and delta-opioid receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 372: 354-61
- Kovacs KJ (1998) c-Fos as a transcription factor: a stressful (re)view from a functional map.

Neurochem Int 33: 287-97

Laviolette SR, Grace AA (2006) Cannabinoids Potentiate Emotional Learning Plasticity in Neurons of the Medial Prefrontal Cortex through Basolateral Amygdala Inputs. *J Neurosci* 26: 6458-68

LeDoux J (1996) Emotional networks and motor control: a fearful view. *Prog Brain Res* 107: 437-46

LeDoux JE, Iwata J, Cicchetti P, Reis DJ (1988) Different projections of the central amygdaloid nucleus mediate autonomic and behavioral correlates of conditioned fear. *J Neurosci* 8: 2517-29

Lee HJ, Choi JS, Brown TH, Kim JJ (2001) Amygdalar nmda receptors are critical for the expression of multiple conditioned fear responses. *J Neurosci* 21: 4116-24

Li X, Inoue T, Abekawa T, Weng S, Nakagawa S, Izumi T, Koyama T (2006) 5-HT_{1A} receptor agonist affects fear conditioning through stimulations of the postsynaptic 5-HT_{1A} receptors in the hippocampus and amygdala. *Eur J Pharmacol* 532: 74-80

Likhtik E, Pelletier JG, Paz R, Pare D (2005) Prefrontal control of the amygdala. *J Neurosci* 25: 7429-37

Lin HC, Mao SC, Su CL, Gean PW (2008) The Role of Prefrontal Cortex CB₁ Receptors in the Modulation of Fear Memory. *Cereb Cortex*

Lino-de-Oliveira C, Sales AJ, Del Bel EA, Silveira MC, Guimaraes FS (2001) Effects of acute and chronic fluoxetine treatments on restraint stress-induced Fos expression. *Brain Res Bull* 55: 747-54

Maren S (2001) Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. *Annu Rev Neurosci* 24: 897-931

Maren S, Quirk GJ (2004) Neuronal signalling of fear memory. *Nat Rev Neurosci* 5: 844-52

Marsch R, Foeller E, Rammes G, Bunck M, Kossl M, Holsboer F, Zieglgansberger W, Landgraf R, Lutz B, Wotjak CT (2007) Reduced anxiety, conditioned fear, and hippocampal long-term potentiation in transient receptor potential vanilloid type 1 receptor-deficient mice. *J Neurosci* 27: 832-9

Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI (1990) Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 346: 561-4

Mechoulam R, Parker LA, Gallily R (2002) Cannabidiol: an overview of some pharmacological aspects. *J Clin Pharmacol* 42: 11S-19S

Milanovic S, Radulovic J, Laban O, Stiedl O, Henn F, Spiess J (1998) Production of the Fos protein after contextual fear conditioning of C57BL/6N mice. *Brain Res* 784: 37-47

Mishima K, Hayakawa K, Abe K, Ikeda T, Egashira N, Iwasaki K, Fujiwara M (2005) Cannabidiol prevents cerebral infarction via a serotonergic 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor-dependent mechanism. *Stroke* 36: 1077-82

Moreira FA, Aguiar DC, Guimaraes FS (2006) Anxiolytic-like effect of cannabidiol in the rat Vogel conflict test. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 30: 1466-71

Moreira FA, Guimaraes FS (2005) Cannabidiol inhibits the hyperlocomotion induced by psychotomimetic drugs in mice. *Eur J Pharmacol* 512: 199-205

Moreira FA, Lutz B (2008) The endocannabinoid system: emotion, learning and addiction. *Addict Biol* 13: 196-212

- Paxinos G. and Watson C (1997) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, New York
- Perez-Villalba A, Teruel-Marti V, Ruiz-Torner A, Olucha-Bordonau F (2005) The effect of long context exposure on cued conditioning and c-fos expression in the rat forebrain. *Behav Brain Res* 161: 263-75
- Petitot F, Jeantaud B, Reibaud M, Imperato A, Dubroeuq MC (1998) Complex pharmacology of natural cannabinoids: evidence for partial agonist activity of delta9-tetrahydrocannabinol and antagonist activity of cannabidiol on rat brain cannabinoid receptors. *Life Sci* 63: PL1-6
- Piomelli D (2003) The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci* 4: 873-84
- Quirk GJ, Likhtik E, Pelletier JG, Pare D (2003) Stimulation of medial prefrontal cortex decreases the responsiveness of central amygdala output neurons. *J Neurosci* 23: 8800-7
- Quirk GJ, Mueller D (2008) Neural mechanisms of extinction learning and retrieval. *Neuropsychopharmacology* 33: 56-72
- Resstel LB, Alves FH, Reis DG, Crestani CC, Correa FM, Guimaraes FS (2008) Anxiolytic-like effects induced by acute reversible inactivation of the bed nucleus of stria terminalis. *Neuroscience* 154: 869-76
- Resstel LB, Joca SR, Moreira FA, Correa FM, Guimaraes FS (2006) Effects of cannabidiol and diazepam on behavioral and cardiovascular responses induced by contextual conditioned fear in rats. *Behav Brain Res* 172: 294-8
- Rubino T, Realini N, Castiglioni C, Guidali C, Vigano D, Marras E, Petrosino S, Perletti G, Maccarrone M, Di Marzo V, Parolaro D (2008) Role in anxiety behavior of the endocannabinoid system in the prefrontal cortex. *Cereb Cortex* 18: 1292-301
- Russo EB, Burnett A, Hall B, Parker KK (2005) Agonistic properties of cannabidiol at 5-HT1a receptors. *Neurochem Res* 30: 1037-43
- Santini E, Ge H, Ren K, Pena de Ortiz S, Quirk GJ (2004) Consolidation of fear extinction requires protein synthesis in the medial prefrontal cortex. *J Neurosci* 24: 5704-10
- Seamans JK, Floresco SB, Phillips AG (1995) Functional differences between the prelimbic and anterior cingulate regions of the rat prefrontal cortex. *Behav Neurosci* 109: 1063-73
- Sierra-Mercado D, Jr., Corcoran KA, Lebron-Milad K, Quirk GJ (2006) Inactivation of the ventromedial prefrontal cortex reduces expression of conditioned fear and impairs subsequent recall of extinction. *Eur J Neurosci* 24: 1751-8
- Sotty F, Sandner G, Gosselin O (1996) Latent inhibition in conditioned emotional response: c-fos immunolabelling evidence for brain areas involved in the rat. *Brain Res* 737: 243-54
- Stiedl O, Spiess J (1997) Effect of tone-dependent fear conditioning on heart rate and behavior of C57BL/6N mice. *Behav Neurosci* 111: 703-11
- Sullivan GM, Apergis J, Bush DE, Johnson LR, Hou M, Ledoux JE (2004) Lesions in the bed nucleus of the stria terminalis disrupt corticosterone and freezing responses elicited by a contextual but not by a specific cue-conditioned fear stimulus. *Neuroscience* 128: 7-14
- Thomas A, Baillie GL, Phillips AM, Razdan RK, Ross RA, Pertwee RG (2007) Cannabidiol displays unexpectedly high potency as an antagonist of CB1 and CB2 receptor agonists in vitro. *Br J*

Pharmacol 150: 613-23

Vertes RP (2004) Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. *Synapse* 51: 32-58

Vidal-Gonzalez I, Vidal-Gonzalez B, Rauch SL, Quirk GJ (2006) Microstimulation reveals opposing influences of prelimbic and infralimbic cortex on the expression of conditioned fear. *Learn Mem* 13: 728-33

Viveros MP, Marco EM, File SE (2005) Endocannabinoid system and stress and anxiety responses. *Pharmacol Biochem Behav* 81: 331-42

Wilson RI, Nicoll RA (2002) Endocannabinoid signaling in the brain. *Science* 296: 678-82

Wisłowska-Stanek A, Zienowicz M, Lehner M, Taracha E, Bidzinski A, Maciejak P, Skorzewska A, Szyndler J, Plaznik A (2005) Buspirone attenuates conditioned fear-induced c-Fos expression in the rat hippocampus. *Neurosci Lett* 389: 115-20

Yoshioka M, Matsumoto M, Togashi H, Saito H (1995) Effects of conditioned fear stress on 5-HT release in the rat prefrontal cortex. *Pharmacol Biochem Behav* 51: 515-9

Zuardi AW, Guimaraes FS, Guimaraes VMC, Del Bel EA (2002) Cannabidiol: possible therapeutic applications. In: Grotenhermen F, Russo E (editors). *Cannabis and Cannabinoids*. Howorth Int Healing Press, New York. Pp.359-369.

Zuardi AW, Morais SL, Guimaraes FS, Mechoulam R (1995) Antipsychotic effect of cannabidiol. *J Clin Psychiatry* 56: 485-6

Zuardi AW, Rodrigues JA, Cunha JM (1991) Effects of cannabidiol in animal models predictive of antipsychotic activity. *Psychopharmacology (Berl)* 104: 260-4

Legends for figures

Figure 1- Effects of CBD (10 mg/Kg) or vehicle (Veh) systemically injected in rats re-exposed to the conditioning box where they had received (Conditioned) or not (Habituated) electrical footshocks 24 h before. Bars represent the mean (\pm SEM) percent of freezing in relation to total time in the 10 minutes session. * indicates significant difference from habituated group, + indicates difference from conditioned group treated with vehicle ($p < 0.05$, ANOVA followed by the Duncan test, $n = 6-9$ / group).

Figure 2- Effects of systemic injection of CBD (10mg/Kg) in Fos-like immunoreactivity (FLI) in rats re-exposed to the conditioning box where they had received (Conditioned) or not (Habituated) electrical footshocks 24 h before. Naïve animals remained in their home cage. FLI was measured in the Cingulate cortex area 1 (**Cg1**), prelimbic (**PL**) or infralimbic (**IL**) prefrontal cortex. Columns represent means \pm SEM. * indicates significant difference from naïve animals ($p < 0.05$, ANOVA followed by the Duncan test; $n = 5-6$ / group).

Figure 3- Representatives Fos-like immunoreactivity photomicrographs in the PL prefrontal cortex of experimental groups. **A.** naïve, **B, C.** habituated animals treated with vehicle or CBD, respectively. **D, E.** conditioned animals treated with vehicle or CBD, respectively. Bar = 50 μ m.

Figure 4- Representatives Fos-like immunoreactivity photomicrographs in the IL prefrontal cortex of experimental groups. **A.** naïve, **B, C.** habituated animals treated with vehicle or CBD, respectively. **D, E.** conditioned animals treated with vehicle or CBD, respectively. Bar = 50 μ m.

Figure 5- Effects of CBD injections into PL (**A**) or IL (**B**) prefrontal cortex of rats re-exposed to the conditioning box where they had received electrical footshocks 24 h before. Bars represent the mean (\pm SEM) freezing percent of total time in the 10 minutes session. * indicates significant difference from vehicle treated group, (* $p < 0.05$, ANOVA followed by the Duncan test; $n = 5-6$ / group).

Figure 1

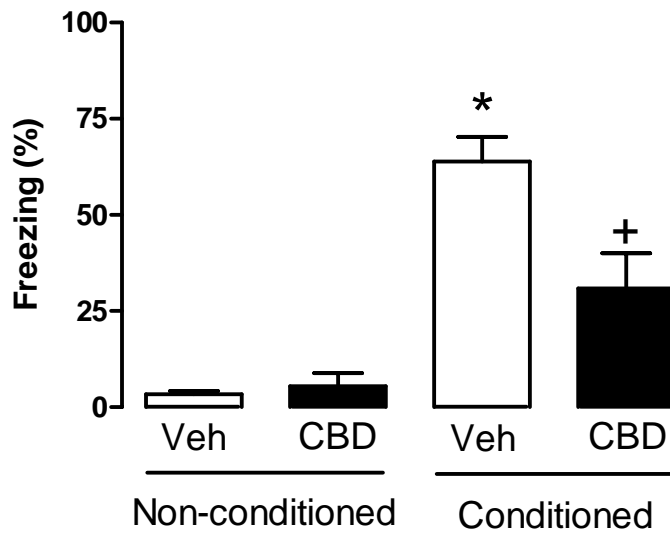


Figure 2

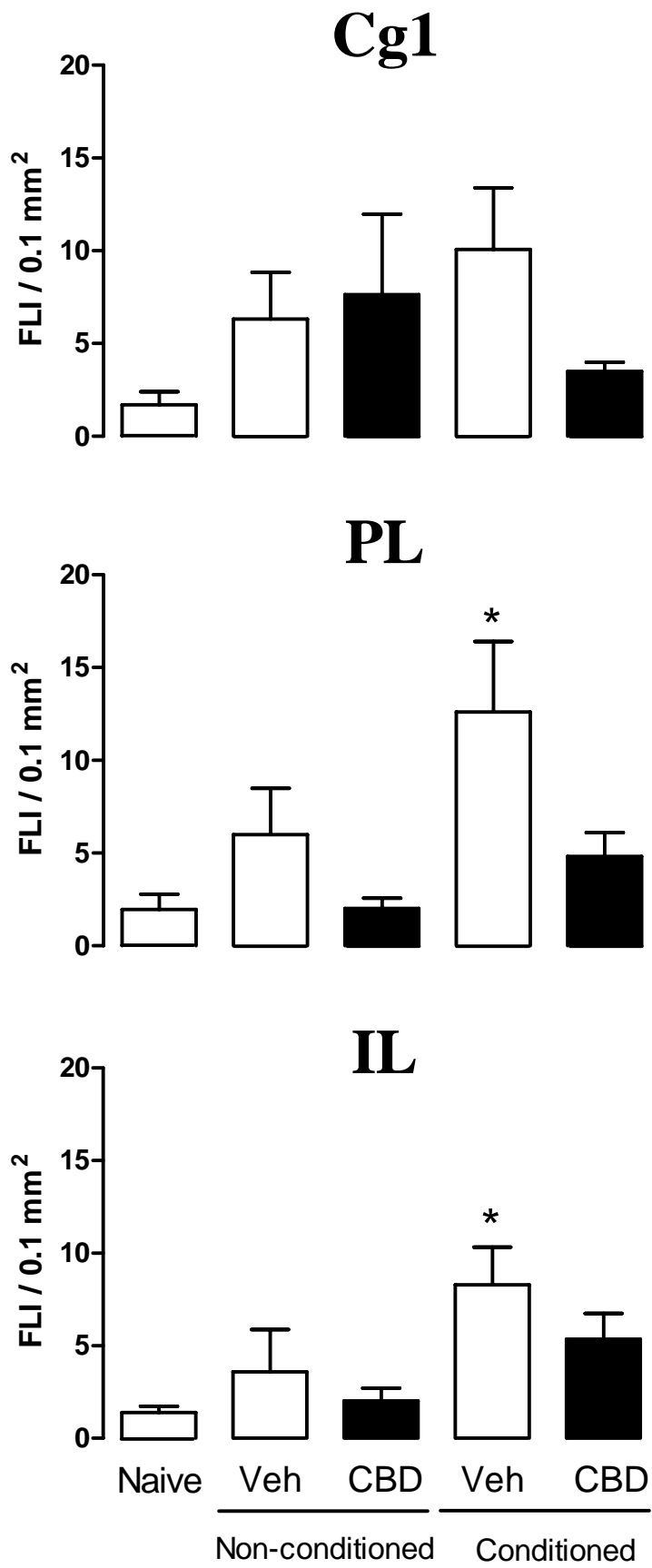


Figure 3

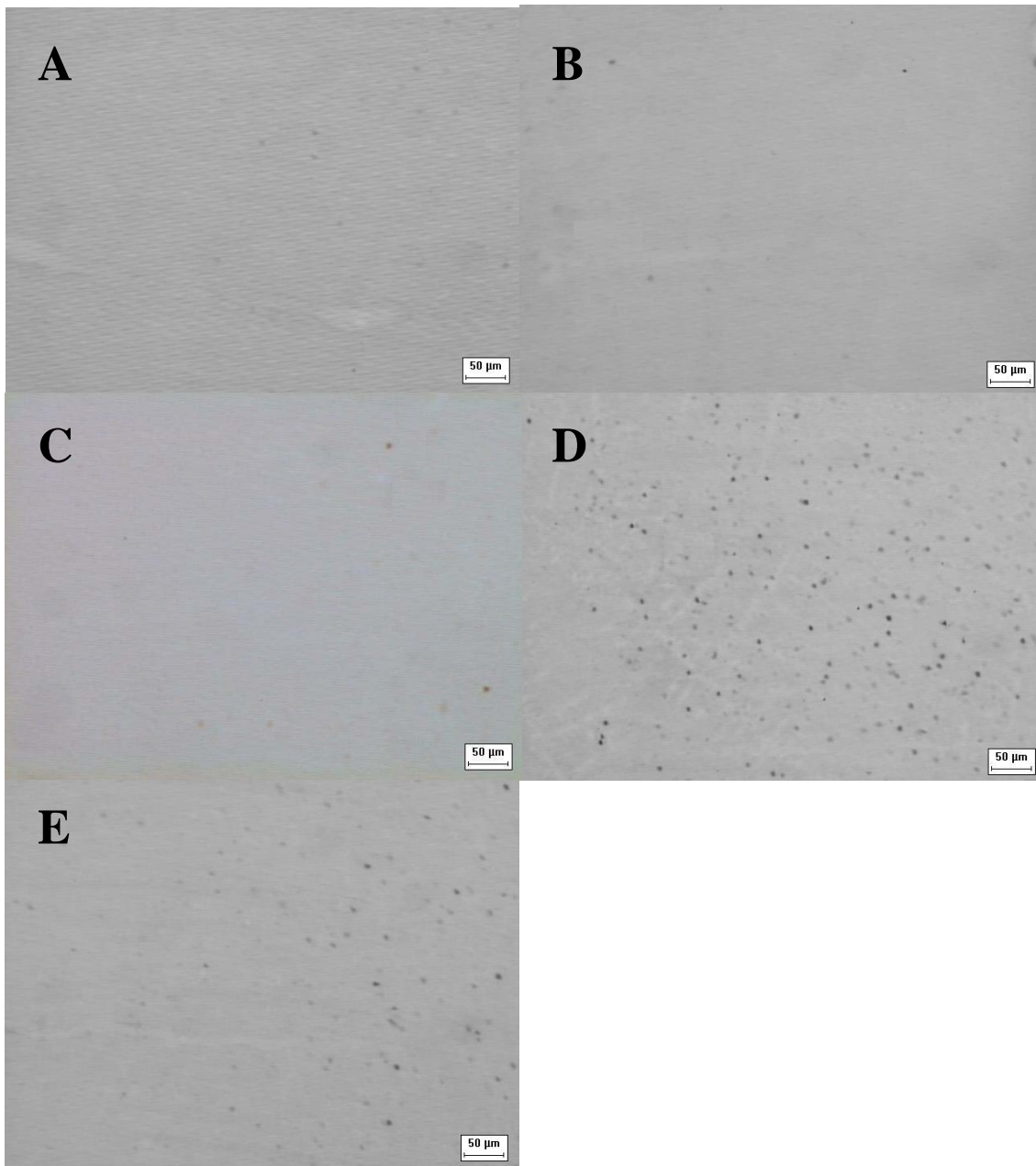


Figure 4

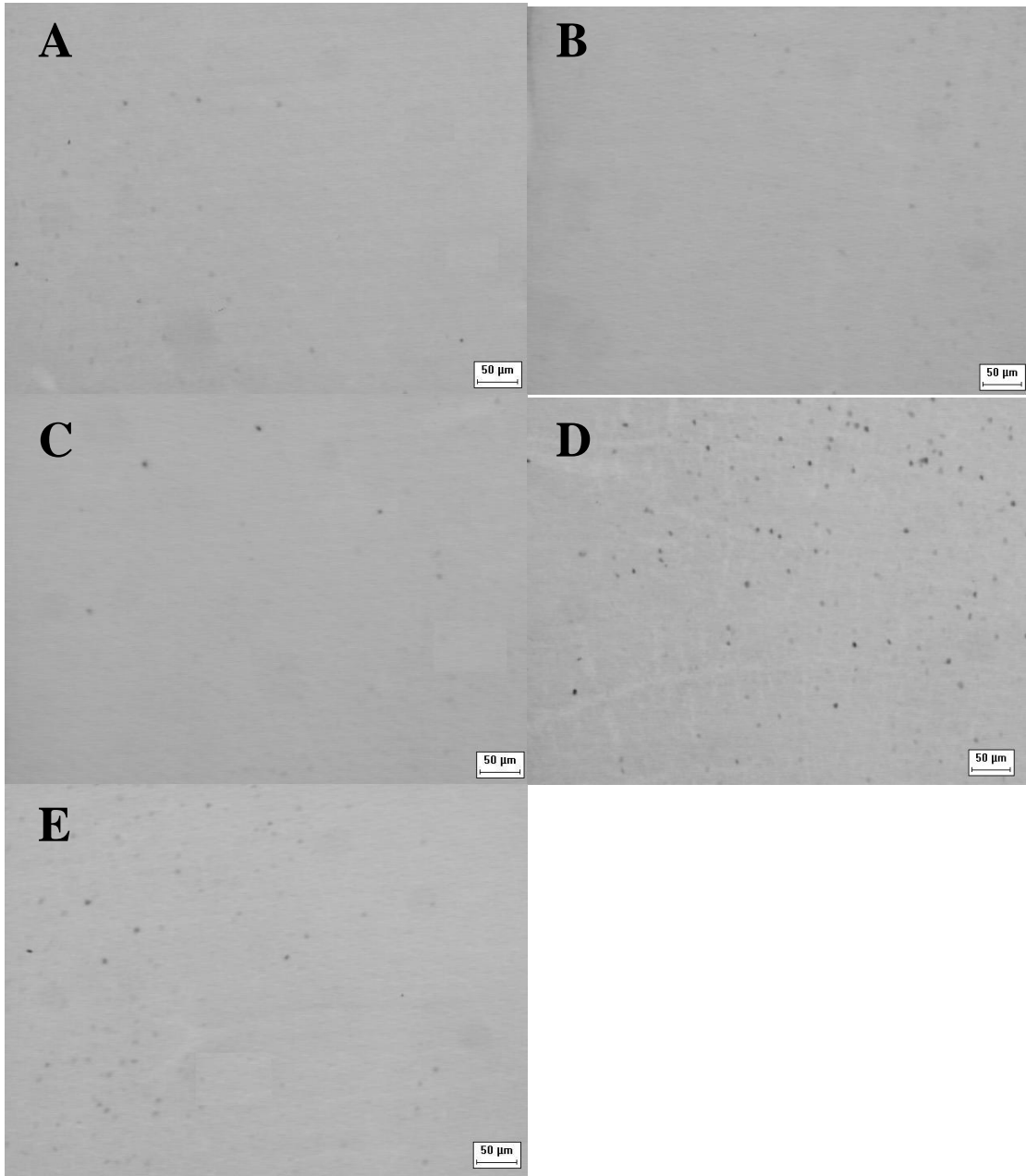


Figure 5

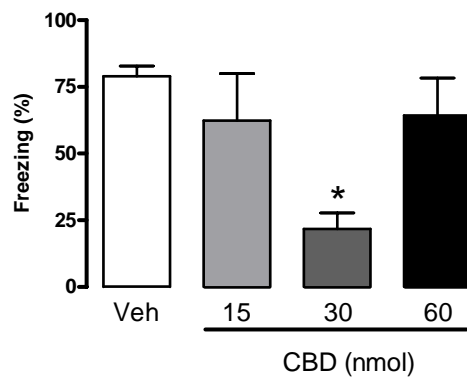
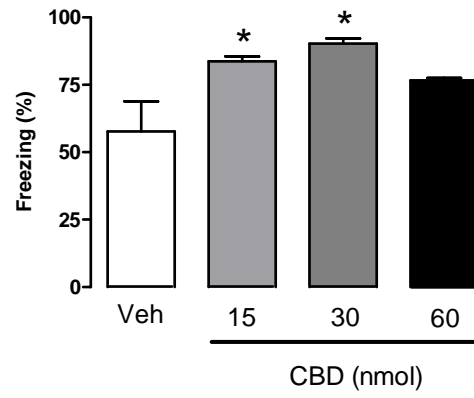
A**B**

Table 1. Fos-like immunoreactivity in the brain of rats treated with CBD (10 mg/kg) or vehicle (Veh) and re-exposed to the conditioning box where they had received (Cond) or not (Hab) electrical footshocks 24 h before.

| Brain region | Naïve | Hab Veh | Hab CBD | Cond Veh | Cond CBD |
|---------------------|--------------|----------------|----------------|-----------------|-----------------|
| Cg1 | 1.70±0.71 | 6.32±2.52 | 7.62±4.31 | 10.07±3.32 | 3.52±0.47 |
| PL | 1.96±0.82 | 5.99±2.49 | 2.00±0.57 | 12.61±3.79* | 4.83±1.28 |
| IL | 1.39±0.35 | 3.58±2.29 | 2.02±0.69 | 8.29±2.04* | 5.36±1.37 |
| BSTMA | 8.05±2.82 | 7.06±1.54 | 9.84±2.02 | 34.74±6.09* | 9.31±1.76 |
| BSTD L | 15.50±6.69 | 12.95±3.11 | 18.41±5.61 | 45.93±8.22* | 11.90±6.31 |
| BSTV | 10.00±3.63 | 11.84±2.47 | 13.75±3.22 | 31.25±3.69* | 11.35±3.63 |
| CeA | 20.73±4.75 | 16.14±5.57 | 12.54±7.46 | 14.54±5.48 | 14.65±3.95 |
| PVN | 13.81±3.48 | 15.33±4.48 | 20.45±7.24 | 20.69±3.73 | 21.84±5.74 |
| dmPAG | 2.69±1.23 | 8.67±2.74 | 6.25±1.64 | 7.86±0.95 | 6.44±0.99 |
| dIPAG | 5.53±1.23 | 14.93±2.71* | 9.83±2.91* | 13.73±1.99* | 9.68±2.72* |
| IPAG | 5.98±0.96 | 11.88±2.60 | 10.92±2.49 | 10.61±2.27 | 13.16±1.89 |
| vIPAG (rostral) | 8.34±3.07 | 14.59±2.30 | 12.47±2.71 | 13.66±1.75 | 11.60±1.90 |
| vIPAG (caudal) | 8.02±4.10 | 30.57±7.98* | 17.75±4.57* | 29.53±3.92* | 26.56±5.71* |

Data are expressed as mean ± SEM, n = 5-9/group. * Different from naïve animals. Cg1 – Cingulate cortex area 1, PL and IL – prelimbic and infralimbic prefrontal cortex, BSTMA, BSTDL and BSTV – medial anterior, dorsolateral and ventral regions of the bed nucleus of stria terminalis, CeA – central nucleus of amygdala, PVN – hypothalamic paraventricular nucleus, dmPAG, dIPAG, IPAG and vIPAG – dorsomedial, dorsolateral, lateral and ventrolateral periaqueductal gray regions.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)