

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

**Efeitos do antagonismo de receptores CB1 sobre a  
consolidação de uma memória de medo contextual em  
diferentes períodos do ritmo circadiano**

RAFAEL SCOZ SILVA

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

Orientador: Prof. Dr. Leandro José Bertoglio

Florianópolis – SC, 21 de fevereiro 2014

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

Scoz Silva, Rafael

Efeitos do antagonismo de receptores CB1 sobre a consolidação da memória de medo contextual em diferentes períodos do ritmo circadiano / Rafael Scoz Silva ; orientador, Leandro José Bertoglio - Florianópolis, SC, 2014.

99 p.

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

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Sistema endocanabinoide. 3. Consolidação. 4. Ritmo circadiano. 5. Glicocorticoide. I. José Bertoglio, Leandro. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.



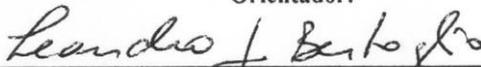
“Efeitos do antagonismo de receptores CB1 sobre a consolidação de uma memória de medo contextual em diferentes períodos do ritmo circadiano”

por

**Rafael Scoz Silva**

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (Port. 09/PPGFMC/2014) do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia - UFSC, composta pelos Professores Doutores:

**Orientador:**

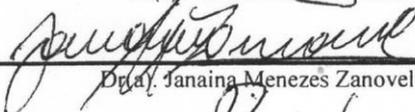


Dr(a). Leandro José Bertoglio (Presidente/Orientador/FMC/CCB/UFSC)

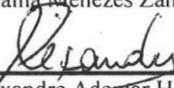
**Banca Examinadora:**



Dr(a). Geison de Souza Izídio (BEG/CCB/UFSC)

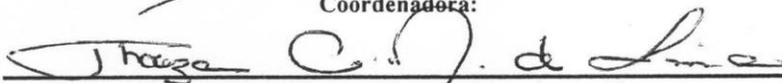


Dr(a). Janaina Menezes Zanoveli (Farmacologia/UFPR)



Dr(a). Alexandre Ademar Hoeller (PPGCM/CCS/UFSC)

**Coordenadora:**



Prof(a). Dr(a). Thereza Christina Monteiro De Lima  
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

Florianópolis, 21 de fevereiro de 2014.



**Dedico esse trabalho ao meu falecido  
e saudoso avô Antônio Rovedo Scoz.**



## AGRADECIMENTOS

Aos meus queridos pais Luiz Gonzaga e Jussara, pelo amor, carinho, atenção, e principalmente, pelo apoio incondicional em todas as horas, mesmo que para isso tenha sido necessário abdicar de muitos dos seus planos e sonhos, para que os meus fossem possíveis.

A minha amada irmã Leticia, pelas conversas, pelo amor, pelo apoio em todas as minhas decisões, até mesmo nas piores, e principalmente, por me tomar como exemplo a ser seguido, me fazendo querer sempre ser um pouco melhor.

Aos meus avôs maternos, Celyta e Rovedo, pelo amor, carinho, e dedicação integral na minha formação pessoal, e por me ensinarem que pequenas atitudes fazem uma grande diferença.

A minha afilhada Maria Fernanda, que a cada dia me mostra a importância e o valor das coisas simples e dos pequenos momentos.

A minha namorada Daniela, pelo carinho, atenção e amor dedicados a mim e a minha família, e por aguentar todo o estresse e nervosismo, principalmente nessa fase final.

A todos os meus tios, primos, parentes próximos e distantes, que de uma maneira ou outra, me auxiliaram à chegar até aqui.

Aos meus amigos, pelas conversas, desabafos e trocas de experiências.

Ao professor Leandro José Bertoglio pela orientação e dedicação a minha formação. E a todos os colegas do Laboratório de Neuropsicofarmacologia, que fizeram do ambiente de trabalho um local mais amigável e prazeroso.

Aos companheiros de laboratório Ana, Cris e Lucas, por esses 6 anos de amizade, carinho, apoio, orientação e dedicação a minha formação e diversão nos momentos extra laboratório.

Aos membros da banca professores Janaina Menezes, Geison de Souza Izidio e Reinaldo Takahashi e Doutor Alexandre Hoeller.

Aos demais professores e colegas do departamento de Farmacologia, pela amizade e troca de conhecimentos.

A todos os funcionários do Departamento de Farmacologia e Universidade Federal de Santa Catarina, sem eles esse trabalho seria praticamente impossível de ser realizado.

A Universidade Federal de Santa Catarina por toda a infraestrutura necessária para realização desse trabalho.

A CAPES, CNPq e FAPESP, pelo suporte financeiro para o desenvolvimento dessa pesquisa.

*“Não há assunto tão velho que não  
possa ser dito algo de novo sobre ele.”*  
*Fiodor Dostoievski*



## RESUMO

O ritmo circadiano sincroniza as fases inativa e ativa do organismo com a luminosidade do ambiente em ciclos de 24 horas, sendo por isso considerado um dos fatores que modula a liberação de endocanabinoides em condições fisiológicas e de estresse que, por sua vez, estão envolvidos no processo de aprendizado e memória. A possível influência do ritmo circadiano sobre o papel dos receptores canabinoides do tipo 1 (CB1) na etapa de consolidação de uma memória aversiva permanece por ser estabelecida. Assim, investigou-se, inicialmente, o efeito do antagonismo de receptores CB1 com AM 251 (0,1-1,0 mg/kg) sobre a consolidação de uma memória de medo contextual em ratos Wistar machos, testados durante o período diurno (7-8 h) ou noturno (19-20 h). Animais tratados com AM 251 (0,3 e 1,0 mg/kg) após o condicionamento e testados de noite, mas não de dia, expressaram uma resposta de medo potencializada, generalizada e persistente. Considerando que a variação circadiana de glicocorticoides poderia explicar os resultados supracitados, a concentração plasmática de corticosterona foi quantificada ao longo do dia em animais com e sem condicionamento. Observou-se uma concentração plasmática de corticosterona maior no período noturno do que no diurno em animais não condicionados, sendo que houve aumento nos grupos condicionados em ambos os períodos investigados. A seguir, investigamos se a supressão do eixo hipófise-pituitária-adrenal com dexametasona (DEXA) durante a noite seria capaz de reproduzir os efeitos que o AM 251 induziu sobre a consolidação de uma memória contextual pela manhã. O pré-tratamento com 0,3 mg/kg de DEXA foi capaz de prevenir os efeitos do AM 251 (0,3 mg/kg) sobre a memória de medo contextual. Para substanciar tais resultados, administrou-se corticosterona (CORT) pela manhã na tentativa de replicar os efeitos induzidos pelo AM 251 durante a noite. O pré-tratamento com 1,0 mg/kg de CORT não foi capaz de fazer com que o AM 251 (0,3 mg/kg) induzisse efeitos significativos sobre a consolidação de memória de medo contextual. Com base nos resultados desses experimentos, pode-se concluir que o ritmo circadiano pode influenciar a transmissão endocanabinoide, modulando o papel dos receptores CB1 na consolidação de uma memória aversiva, e que a oscilação dos níveis de corticosterona ao longo do dia explica, ao menos em parte, tal efeito.

**Palavras-Chaves: Consolidação, endocanabinoides e glicocorticoides.**



## ABSTRACT

The circadian rhythm synchronizes the inactive and active phases of the organism with the brightness of the environment, in cycles of 24 hours, and is thus considered one of the factors that modulate the release of endocannabinoids under physiological and stress conditions that, in turn, are involved in learning and memory processing. The possible influence of circadian rhythm on the role of type 1 cannabinoid receptor (CB1) during the consolidation phase in an aversive memory remains to be established. Thus, we investigated the effect of the antagonism of CB1 receptors with AM 251 (0.1-1.0 mg/kg) on the consolidation of a contextual fear memory in male Wistar rats tested during the diurnal (7-8h) or nocturnal (19-20h) period. Animals treated with AM 251 (0.3 and 1.0 mg/kg) and tested after conditioning at night, but not during the day, expressed a potentiated long-term fear response, which was also generalized. Considering that the circadian variation of glucocorticoids could explain the above results, the plasma concentration of corticosterone was quantified in animals with and without conditioning, either during daytime or night. We observed a higher plasma concentration of corticosterone in nocturnal than diurnal period in unconditioned animals, and this concentration was increased after the conditioning in both periods. Next, we investigated whether the suppression of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis with dexamethasone (DEXA) during the night would be able to reproduce the lack of effects that AM 251 induced on the consolidation of a contextual memory during the morning. Pretreatment with 0.3 mg/kg DEXA was able to prevent the effects of AM 251 (0.3 mg/kg) on contextual fear memory. To substantiate these findings, we administered corticosterone (CORT) during the morning in an attempt to replicate the effects induced by AM 251 during the night. Pretreatment with 1.0 mg/kg CORT was unable to modify the effects of AM 251 (0.3 mg/kg) on consolidation of contextual fear memory. Based on these results, it can be concluded that the circadian rhythm may influence the endocannabinoid system activity, modulating the role of CB1 receptors in the consolidation of aversive memory, and that the fluctuation in corticosterone levels throughout the day might explain, at least in part, this effect .

**Keywords: Memory consolidation, glucocorticoids, endocannabinoids.**



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Dinâmica do ritmo circadiano.....	<b>24</b>
<b>Figura 2.</b> Efeitos da ativação dos fotorreceptores da retina pela luz.....	<b>15</b>
<b>Figura 3.</b> Processo de consolidação da memória.....	<b>28</b>
<b>Figura 4.</b> Representação do condicionamento de medo contextual.....	<b>30</b>
<b>Figura 5.</b> Representação do eixo HPA.....	<b>32</b>
<b>Figura 6.</b> Liberação circadiana de glicocorticoides (corticosterona) em ratos.....	<b>34</b>
<b>Figura 7.</b> Representação das regiões do sistema nervoso central (SNC) responsáveis pela modulação dos processos de memória e suas ligações com o eixo HPA.....	<b>35</b>
<b>Figura 8.</b> Representação do sistema endocanabinoide.....	<b>38</b>
<b>Figura 9.</b> Sistema eCB inibindo a liberação de outros neurotransmissores.....	<b>39</b>
<b>Figura 10.</b> Representação do alívio da memória de medo causado pela ação dos eCB.....	<b>43</b>
<b>Figura 11.</b> Interação entre os sistema glicocorticoides e eCB....	<b>44</b>
<b>Figura 12.</b> Caixa de condicionamento.....	<b>49</b>
<b>Figura 13.</b> Contexto B.....	<b>50</b>
<b>Figura 14.</b> Labirinto em cruz elevado.....	<b>51</b>

<b>Figura 15.</b> Representação esquemática geral do protocolo experimental utilizado na realização dos experimentos comportamental.....	<b>53</b>
<b>Figura 16.</b> Representação esquemática dos procedimentos utilizados para a realização do experimento 1.....	<b>55</b>
<b>Figura 17.</b> Porcentagem de congelamento após a administração de controle ou antagonista dos receptores CB1 (AM 251 0,1; 0,3 ou 1,0 mg/kg) sobre o processo de consolidação de uma memória de medo contextual.....	<b>57</b>
<b>Figura 18.</b> Efeito do bloqueio farmacológico dos receptores CB1 pelo AM 251 0,1; 0,3 ou 1,0 mg/kg no labirinto em cruz elevado (LCE), em diferentes períodos do ritmo circadiano.....	<b>60</b>
<b>Figura 19.</b> Dosagem de corticosterona basal e após o condicionamento de medo contextual nos diferentes períodos do ritmo circadiano.....	<b>61</b>
<b>Figura 20.</b> Representação esquemática dos procedimentos utilizados na sessão de experimentos 3.....	<b>62</b>
<b>Figura 21.</b> Efeitos do pré-tratamento com dexametasona 0,3 mg/kg (Dexa 0,3) sobre o bloqueio farmacológico dos receptores CB1 pelo AM 251 0,3 mg/kg (AM 0,3) na consolidação da memória de medo contextual. Experimentos realizados no período noturno (19-20h).....	<b>64</b>
<b>Figura 22.</b> Efeitos do pré-tratamento com dexametasona 0,3 mg/kg (Dexa 0,3) sobre o bloqueio farmacológico dos receptores CB1 pelo AM 251 0,3 mg/kg (AM 0,3) no processo de sensibilização da memória em animais expostos ao labirinto em cruz elevado (LCE). Experimento realizado durante o período noturno (19-20h).....	<b>65</b>
<b>Figura 23.</b> Representação esquemática dos procedimentos utilizados na sessão de experimentos 4.....	<b>66</b>

**Figura 24.** Efeitos do pré-tratamento com corticosterona 1,0 mg/kg (Cort 1,0) sobre o bloqueio farmacológico dos receptores CB1 pelo AM 251 0,3 mg/kg (AM 0,3), na consolidação da memória de medo contextual. Experimentos realizados durante o período diurno (7-8h).....**67**

**Figura 25.** Efeitos do pré-tratamento com corticosterona 1,0 mg/kg (Cort 1,0) sobre o bloqueio farmacológico dos receptores CB1 pelo AM 251 0,3 mg/kg (AM 0,3) no processo de sensibilização da memória em animais expostos ao labirinto em cruz elevado (LCE). Experimento realizado durante o período diurno (7-8h).....**68**



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 2-AG:** 2- araquinoilglicerol  
**AEA:** N-araquidonoil etanolamina (Anandamida)  
**CORT:** Corticosterona  
**CTRL:** Solução controle  
**DEXA:** Dexametasona  
**EA:** Entradas nos braços abertos  
**EC:** Estímulo Condicionado  
**eCB:** Endocanabinoides  
**EF:** Entradas nos braços fechados  
**EI:** Estímulo Incondicionado  
**EN:** Estímulo Neutro  
**EPM:** Erro padrão da média  
**GR:** Receptores Glicocorticoides  
**HACT:** Hormônio Adrenocorticotrófico  
**HLC:** Hormônio Liberador de Corticotrofinas  
**HPA:** eixo Hipotálamo – Pituitária – Adrenal  
**I.C.V.:** Administração de drogas via intracerebroventricular  
**I.P.:** Administração de drogas via intraperitoneal  
**LCE:** Labirinto em Cruz Elevado  
**MR:** Receptores Mineralocorticoides  
**NPV:** Núcleo Paraventricular do Hipotálamo  
**NSQ:** Núcleo Supraquiasmático  
**PAR:** Postura de avaliação de risco ou Postura de estiramento  
**SNC:** Sistema Nervoso Central  
**TA:** Tempo nos braços abertos  
**TEPT:** Transtorno de estresse pós-traumático  
**TF:** Tempo nos braços fechados  
**TRH:** Trato Retino hipotalâmico



## SUMÁRIO

<b>1 Introdução.....</b>	<b>23</b>
1.1 Ritmo circadiano.....	23
1.2 O processo de consolidação da memória.....	27
1.2.1 <i>Influência do ritmo circadiano sobre o processo de consolidação da memória.....</i>	28
1.2.2 <i>O condicionamento de medo contextual.....</i>	29
1.3 Glicocorticoides.....	31
1.3.1 <i>Variação circadiana de glicocorticoides.....</i>	33
1.3.2 <i>Modulação do processo de consolidação da memória pelos glicocorticoides.....</i>	34
1.3.3 <i>Mecanismo de “feedback” dos glicocorticoides.....</i>	36
1.4 Sistema endocanabinoide.....	37
1.4.1 <i>Influência do ritmo circadiano sobre o sistema endocanabinoide.....</i>	41
1.4.2 <i>Importância do sistema endocanabinoide na consolidação da memória de medo contextual.....</i>	42
1.5 Interação dos sistemas glicocorticoide e endocanabinoide.....	43
<b>2 Objetivos.....</b>	<b>46</b>
2.1 Objetivos gerais.....	46
2.2 Objetivos específicos.....	46
<b>3 Materiais e métodos.....</b>	<b>47</b>
3.1 Considerações éticas.....	47
3.2 Animais.....	47
3.3 Drogas e tratamentos.....	47
3.4 Procedimentos experimentais.....	48
3.4.1 <i>Condicionamento de Medo Contextual.....</i>	48
3.4.2 <i>Labirinto em Cruz Elevado (LCE).....</i>	51
3.4.3 <i>Dosagem de corticosterona plasmática.....</i>	53
3.5 Análises estatísticas.....	53
<b>4 Resultados.....</b>	<b>55</b>

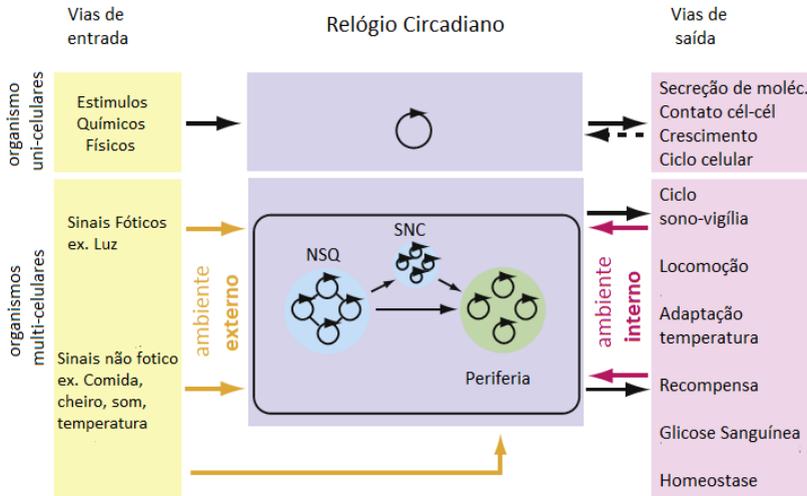
4.1 Experimento 1. Efeitos do antagonismo dos receptores CB1 sobre a consolidação de uma memória de medo contextual em diferentes períodos do ritmo circadiano.....	55
4.2 Experimento 2. Quantificação da concentração plasmática de corticosterona nas diferentes fases do ciclo circadiano.....	60
4.3 Experimento 3. Efeitos da dexametasona sobre o antagonismo de receptores CB1 na consolidação da memória de medo contextual durante a noite.....	62
4.4 Experimento 4. Efeitos da corticosterona sobre os efeitos do bloqueio farmacológico dos receptores CB1 na consolidação da memória de medo contextual durante o dia.....	66
<b>5 Discussão.....</b>	<b>70</b>
<b>6 Conclusões.....</b>	<b>86</b>
<b>REFERÊNCIA.....</b>	<b>87</b>



## 1 Introdução

### 1.1 Ritmo circadiano

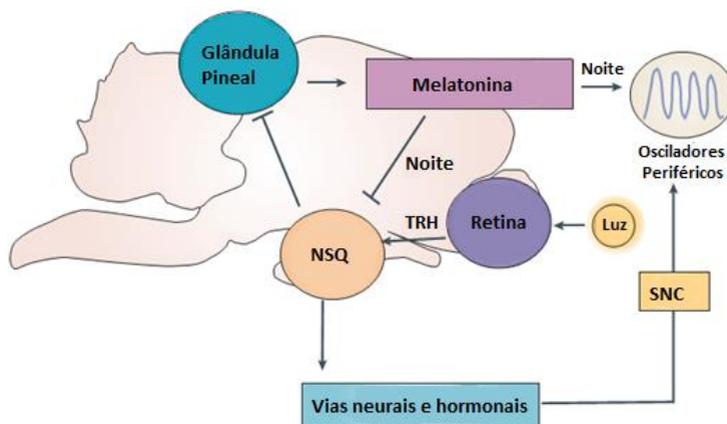
O ritmo circadiano auxilia o organismo a antecipar e responder às mudanças ambientais e ajustar-se corretamente a elas, participando da modulação de vários processos corporais (bioquímicos, fisiológicos, endócrinos e comportamentais) em ciclos de 24 horas. Devido à sua função essencial, é um processo mantido filogeneticamente (PANDA *et al.*, 2002). O ciclo circadiano é reconhecido por sincronizar as fases ativas e inativas do organismo, podendo causar alterações tanto em nível de sistema nervoso central (SNC), quanto periféricamente, participando do controle e modulação de várias funções fisiológicas: como termorregulação, metabolismo da glicose, secreção de diversos hormônios e controle de vários processos comportamentais e mnemônicos (ECKEL-MAHAN e STORM, 2009). Esse processo é controlado pelos “*zeitgebers*”, que por definição significa qualquer sinal ou pista ambiental, como a ocorrência da luz e escuridão, que ajude a regular os ciclos do relógio biológico de um organismo. O principal “*zeitgeber*” conhecido é a luz ou a variação diária de luminosidade. Entretanto, outros agentes ambientais podem participar dessa regulação, como, por exemplo, a busca por alimentos, aprendizado e memória, entre outros (PANDA *et al.*, 2002), como pode ser observado na figura 1.



**Figura 1.** Dinâmica do ritmo circadiano. Ativação por fatores externos levam a respostas fisiológicas internas. NSQ (núcleo supraquiasmático) e outras estruturas do SNC (sistema nervoso central). (Adaptado e traduzido de ALBRECHT, 2012).

Além de ajudar o organismo a se adaptar às mudanças do ciclo claro/escuro, causadas pela rotação da Terra em torno do sol, o ritmo circadiano também é responsável pela regulação de várias características fisiológicas e comportamentais, atuando em diversos tecidos, órgãos e células. Basicamente, as informações da variação do ciclo claro/escuro são transmitidas da retina via trato retino-hipotalâmico (TRH) para o núcleo supraquiasmático do hipotálamo (NSQ), uma pequena região hipotalâmica considerada o centro anatômico responsável por modular o ritmo circadiano (HASTINGS *et al.*, 2008; VAN DER ZEE *et al.*, 2009). Lesões ou ablação desse núcleo acabam demonstrando uma arritmicidade circadiana tanto comportamentalmente quanto fisiologicamente (MOORE e ELCHER, 1972; TSANG *et al.*, 2013). Anatomicamente, após ser ativado pelas projeções vindas da retina, o NSQ é capaz de ativar várias vias de sinalização que induzem à ativação de genes de expressão imediata e à remodelação de cromatina (HANKINS *et al.*, 2008; GOLOMBEK e ROSENSETEIN, 2010; ALBRECHT, 2012), promovendo a mudança de fase do ciclo circadiano e causando, como consequência, alterações fisiológicas e comportamentais (ANTLE *et al.*, 2009). Essas alterações são causadas, pois quando ativado o NSQ é capaz de modular outras regiões do

sistema nervoso central, especialmente o núcleo paraventricular (NPV) do hipotálamo. Essa região é responsável pela distribuição das informações circadianas, do NSQ, para o resto do corpo (SAEB-PARSY *et al.*, 2000). Dessa forma, as informações circadianas provenientes do NSQ são enviadas para o sistema nervoso autônomo (BUIJS *et al.*, 1999), para o núcleo dorsomedial do hipotálamo, núcleo accumbens e núcleos talâmicos paraventriculares (TSANG *et al.*, 2013). Todas essas projeções, diretas e indiretas, do NSQ (figura 2) acabam levando a informação “luminosa” para diversas regiões do SNC, por exemplo, a glândula pineal e hipófise; e órgãos periféricos como: fígado, rins, ovários, pulmões, glândulas adrenais, confirmando a participação do ritmo circadiano sobre vários processos fisiológicos (VAN DER ZEE *et al.*, 2009).



**Figura 2.** Efeitos da ativação dos fotorreceptores da retina pela luz. TRH (Trato retino-hipotalâmico), NSQ (Núcleo Supraquiasmático) e SNC (Sistema nervoso central). (Traduzido de BELL-PEDERSEN *et al.*, 2005).

A informação fóptica pode alcançar órgãos periféricos, principalmente as glândulas adrenais, modulando, assim, a liberação dos hormônios glicocorticoides responsável por transmitir a informação rítmica para o resto do organismo (BUIJS *et al.*, 1998), e principalmente em humanos, facilitar a adaptação a uma mudança brusca de fuso horário. Além disso, o ritmo circadiano pode participar da modulação da liberação, ação e/ou resposta de alguns neurotransmissores, entres eles os endocanabinoides (VALENTI *et al.*, 2004).

Devido à importância do ritmo circadiano no controle e manutenção de várias funções fisiológicas, muitos estudos revelam que a desregulação do ritmo pode ocasionar várias doenças, sendo um grande fator de risco para a sociedade moderna (DALLMANN *et al.*, 2012). Por esse motivo, a sincronização do ciclo é importante para um ótimo funcionamento do organismo. O oposto dessa situação, conhecido como de-sincronização do ritmo circadiano pode ocorrer frente a vários fatores, como viagens transmeridionais, estresse excessivo, privação de sono, exposição a longos períodos de luminosidade ou escuridão, entre outros (VAN DER ZEE *et al.*, 2009; TSANG *et al.*, 2013). Alguns pesquisadores defendem que a de-sincronização é capaz de ocasionar, ou ser um possível fator de risco, no desenvolvimento de várias doenças, principalmente aquelas induzidas por uma disfunção metabólica, como obesidade, diabetes, doenças cardiovasculares, doença psiquiátricas, transtornos neurológicos e doenças neurodegenerativas, tanto em animais quanto em humanos (GALLOU-KABANI *et al.*, 2007). Os malefícios causados pela de-sincronização do ciclo acontecem pela incapacidade do organismo em manter uma liberação balanceada dos hormônios (ex: glicocorticoides, melatonina e insulina) e neurotransmissores.

Outro fator importante influenciado e/ou modulado pelo ritmo circadiano é o processo de aprendizado e memória. Alguns grupos de pesquisa afirmam que alterações no ritmo circadiano levam a sérios prejuízos cognitivos (VAN DER ZEE *et al.*, 2009; GERSTNER e YIN, 2010). Anatomicamente, várias regiões do SNC responsáveis pela regulação dos processos de aprendizado e memória estão ligadas direta ou indiretamente ao NSQ (RAWASHDEH *et al.*, 2007; VAN DER ZEE *et al.*, 2009), tais como o hipocampo, córtex pré-frontal e amígdala (VAN DER ZEE *et al.*, 2009). Segundo Gerstner e Yin (2010) a disfunção do ritmo circadiano e das suas cascatas de sinalização específicas, seja por ferramentas farmacológicas, genéticas, ambientais ou comportamentais, acaba levando a consequências negativas sobre os processos mnemônicos (GERSTNER e YIN, 2010). Por exemplo, no trabalho realizado por Ruby e colaboradores (2008), a arritmicidade do ciclo, em hamsters, prejudicou o aprendizado de um novo objeto. Dessa forma, é possível sugerir que o ritmo circadiano participa da modulação das várias fases da memória, entre elas a consolidação.

## 1.2. O processo de consolidação da memória

O termo consolidação significa “tornar firme”, ou seja, esse processo refere-se à estabilização progressiva da memória após a aquisição, formando o que se chama de memória de longo prazo (DUDAI, 2002). O processo de consolidação da memória tem sido documentado desde o Império Romano, em que o estudioso relata que após um pequeno intervalo de tempo, por exemplo, uma noite, era observado o fortalecimento da memória previamente adquirida (DUDAI, 2004). Esse processo só passou a ser empiricamente estudado no século XIX, quando o termo consolidação (do alemão “*konsolidierung*”) foi cunhado por Müller e Pilzecker no trabalho publicado em 1900. Nesse trabalho, os autores propõem que o aprendizado não induz a uma memória permanente de forma instantânea, mas que essa memória levaria um determinado tempo para ser fixada, um período em que a memória ficaria vulnerável a interferentes (LECHNER *et al.*, 1999). Anos mais tarde, Donald Hebb (1949) propôs que, após ser adquirida, a memória passaria por um processo chamado de ‘reverberação’, o qual causaria alterações sinápticas nas vias ativadas, permitindo que a memória fosse “guardada” permanentemente. Estudos revelam que o processo de consolidação envolve tanto alterações de eventos moleculares como celulares, além de interações entre estruturas encefálicas, por exemplo, o hipocampo e o córtex cerebral (McGAUGH, 2000; DUDAI, 2004). Sendo esse, o processo pelo qual novas memórias (lábeis) são estabilizadas em memórias duradoras (DUDAI, 1996; McGAUGH, 2000)

Segundo Nadel e colaboradores (2012), quando um organismo passa por uma experiência ou por um evento, alguns aspectos desse evento são codificados (figura 3), desencadeando uma série de processos responsáveis por formar um traço de memória “permanente”. O conjunto desses eventos é conhecido como processo de consolidação da memória, que ocorre dentro de uma determinada janela de tempo, aproximadamente 6h (FURINI *et al.* 2010), onde vários interferentes podem auxiliar ou prejudicar a formação da memória, entre eles agentes amnésicos, tratamento farmacológico pós-treino, lesões de áreas do SNC responsáveis pela consolidação, entre outros (McGAUGH, 1983; 1989; McGAUGH *et al.*, 1996; DUDAI, 2004).



**Figura 3.** Processo de consolidação da memória. (Traduzido de NADEL *et al.*, 2012).

Nem todos os eventos pelo qual o organismo passa geram memórias com a mesma intensidade, algumas experiências e/ou eventos, principalmente os que possuem uma valência emocional elevada, são armazenadas e, conseqüentemente, lembradas, de forma mais intensa. Uma vez que, um evento com uma carga emocional elevada é capaz de gerar várias respostas fisiológicas como a liberação de hormônios (ex. glicocorticoides) e neurotransmissores (ex. endocanabinoides) e a ativação de regiões cerebrais, responsáveis pela consolidação da memória (ex. amígdala, hipocampo). Por esse motivo, é relevante investigar quais os mecanismos fisiológicos e neurobiológicos por trás da consolidação de uma memória, principalmente no caso das memórias aversivas, que, dependendo da intensidade com a qual são formadas, podem levar ao desenvolvimento de doenças psiquiátricas, como o transtorno do estresse pós-traumático (ROOZENDAAL e McGAUGH, 2011).

### 1.2.1 Influência do ritmo circadiano sobre o processo de consolidação da memória

A ligação entre o ritmo circadiano e a consolidação da memória está presente em várias espécies, desde *Aplysia* até humanos, todavia, os mecanismos que conectam esses dois processos fisiológicos ainda necessitam de investigação (ECKEL-MAHAN, 2009). Vários mecanismos por trás dos processos de consolidação da memória sofrem uma variação circadiana, ou são modulados pelo ritmo circadiano, entre eles os processos de transcrição e tradução gênica, liberação de neurotransmissores (endocanabinoides) e hormônios (glicocorticoides), excitabilidade sináptica e ativação neuronal (GERSTNER e YIN, 2010). Evidências recentes revelam que a atividade de algumas vias de sinalização intracelulares necessárias para a formação de uma memória de longo prazo, entre elas *MAPK* e *AMPC*, oscilam no hipocampo de forma circadiana (BEKISCHEITEIN *et al.*, 2007; TRIFILLIEFF *et al.*, 2006). A remodelação de cromatina no NSQ, processo modulado pelo ritmo circadiano é observado durante a consolidação da memória

(BORRELLI *et al.*, 2008). Outro fator que pode conectar a variação circadiana à consolidação da memória é a potencialização de longo prazo, um processo fisiológico essencial para a consolidação da memória, que ocorre em sincronia com o ritmo circadiano (CHAUDHURY *et al.*, 2005). Posteriormente, essa ligação entre potencialização de longo prazo e ritmo circadiano foi demonstrada por outros grupos de pesquisa, principalmente nas regiões corticais e hipocampais do sistema nervoso central (VYAZOVSKIY *et al.*, 2008). Em 1977, foi demonstrado que a excitabilidade sináptica em células do giro denteado (hipocampo) exibe uma variação circadiana (BARNES *et al.*, 1977), sendo esse processo relevante na formação (consolidação) de uma memória de longo prazo. Stephan e Kovacevic (1978) foram pioneiros em propor que, lesionando o NSQ, a formação e manutenção de uma memória hipocampo-dependente seria prejudicada. Da mesma forma, alterações forçadas das fases do ciclo circadiano geram uma amnésia retrógrada, evento no qual o indivíduo é incapaz de se lembrar dos eventos imediatamente anteriores à interferência (DEVAN *et al.*, 2001). Todos esses fatores sugerem uma interação entre ritmo circadiano e a formação e manutenção de uma nova memória. No entanto, essa interação é de certa forma, muito complexa e está longe de ser completamente entendida até o momento (ECKEL-MAHAN, 2009).

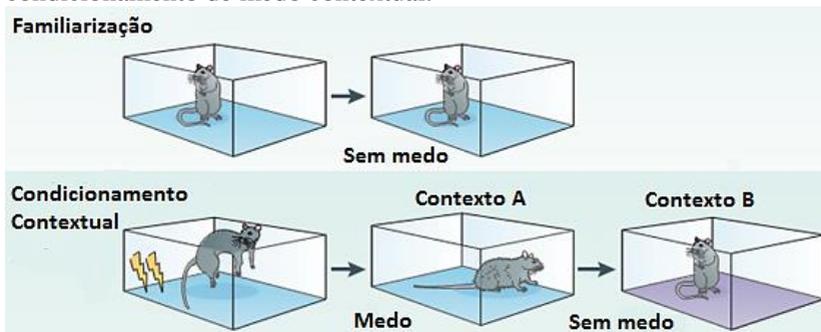
### 1.2.2 O condicionamento de medo contextual

O condicionamento de medo contextual gera respostas biológicas e fisiológicas de defesa, levando o organismo a lançar mão de vários processos fisiológicos com objetivo de auxiliar a resposta do indivíduo frente a uma situação de estresse, como o recrutamento de vias de neurotransmissão e o aumento da liberação, hormônios e neuromoduladores, por exemplo, uma maior liberação de glicocorticoides pelo córtex das glândulas adrenais (RODRIGUES *et al.*, 2009; ATSAK *et al.*, 2012; McINTYRE *et al.*, 2012; AKIRAV, 2013), e um aumento da funcionalidade do sistema endocanabinoide (RIEBE *et al.*, 2012). Esses dois sistemas ainda podem interagir entre si e estão amplamente envolvidos na consolidação (RIEBE *et al.*, 2012; AKIRAV, 2013).

A base do condicionamento clássico ou Pavloviano serve para vários tipos de condicionamento, o condicionamento de medo olfatório, auditivo e contextual. Esse processo consiste na associação entre dois estímulos, sendo um estímulo que gera resposta *per se* chamado de estímulo incondicionado (EI), e o estímulo incapaz de gerar alguma

resposta denominado estímulo neutro (EN). Entretanto, após as sessões de exposição concomitante aos dois estímulos (sessões de condicionamento), o EN passa a gerar respostas semelhantes ao EI, confirmando o condicionamento, o EN passa a ser chamado de estímulo condicionado (EC) (PAVLOV, 1927).

No presente trabalho, foi utilizado o condicionamento de medo contextual: nele o EI é um estímulo aversivo (choque) e o EN é o contexto. Após a sessão de condicionamento, os animais passam a apresentar medo frente ao contexto (EC) (FANSELOW *et al.*, 1990; FANSELOW, 2010). Nessa situação, o medo é expresso pelo comportamento de congelamento, ou seja, a ausência de qualquer estímulo aversivo (choque), já que o contexto adquiriu uma conotação aversiva (PAVLOV, 1927; FANSELOW, 1980), sendo essa abordagem experimental muito utilizada pelo nosso grupo de pesquisa (STERN *et al.*, 2012; GAZARINI *et al.*, 2013). A figura 4 mostra como ocorre o condicionamento de medo contextual.



**Figura 4.** Representação do condicionamento de medo contextual. Na figura de cima, observa-se o processo de familiarização, no qual animais são expostos somente ao contexto. No condicionamento de medo contextual, choques nas patas são aplicados no contexto A, logo após é observado comportamento de medo nesse mesmo contexto sem a presença do choque, e não apresentam medo no contexto B, sendo essa resposta de medo tende a ser restrita ao contexto pareado ao choque. (Traduzido de MAREN *et al.*, 2013).

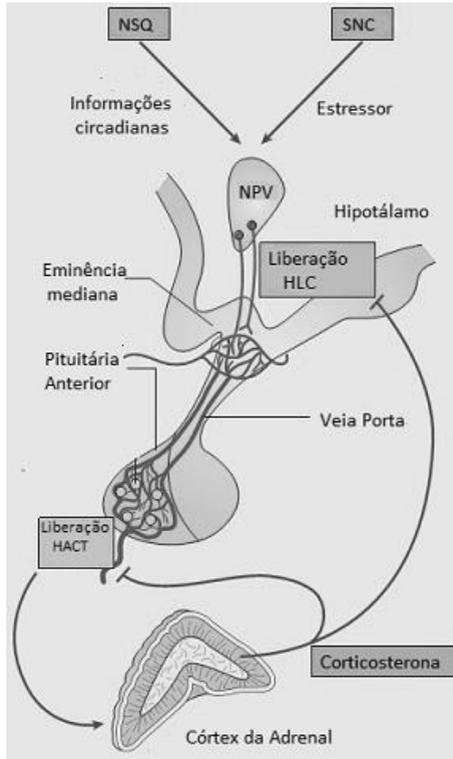
Durante o condicionamento de medo contextual, várias regiões do sistema nervoso central estão envolvidas, dentre elas o hipocampo e a amígdala. Alguns estudos revelam que a formação hipocampal é responsável pela configuração contextual do condicionamento, ou seja, os neurônios hipocampais respondem a localizações específicas, tornando os animais capazes de distinguir um contexto aversivo de um

contexto neutro (LEUTGEB *et al.*, 2006) e a amígdala seria a região responsável por ligar a valência emocional do teste ao contexto no qual ocorreu o condicionamento de medo (BLANCHARD e BLANCHARD, 1972; FENDT e FANSELOW, 1999). Entretanto, essas duas regiões cerebrais estão interconectadas, uma vez que o hipocampo projeta-se à amígdala. Principalmente no núcleo conhecido como amígdala basolateral, a inibição ou destruição da região hipocampal, ou da projeção hipocampo-amígdala gera um prejuízo do condicionamento de medo contextual (FANSELOW, 2010).

### 1.3. Glicocorticoides

Os hormônios glicocorticoides (cortisol em humanos e corticosterona em roedores) são secretados fisiologicamente, ou após uma situação aversiva, pelo eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA). Após serem secretados, os hormônios glicocorticoides se ligam dois tipos de receptores, os mineralocorticoides (MR) e os glicocorticoides (GR). Os GR's estão expressos amplamente no sistema nervoso central, já a expressão dos MR fica restrita aos neurônios das regiões límbicas responsáveis pelos processos de aprendizagem e memória (HERMAN *et al.*, 2003): córtex, amígdala e altamente expresso na região hipocampal (REUL e DE KLOET, 1985), sendo os dois receptores coexpressos nessas regiões. Esses receptores possuem características funcionais diferentes, o GR possui uma baixa afinidade pelo cortisol (ou corticosterona), cerca de dez vezes menor que o MR (LIGHTMANN e CONWAY-CAMPBELL, 2010; SARABDJITSINGH *et al.*, 2011), sendo ativado somente em condições de altas concentrações plasmáticas de glicocorticoides. Esse aumento pode ser ocasionado por uma situação aversiva, pela administração de agonistas exógenos ou fase de pico de liberação de glicocorticoides do ritmo circadiano. Já receptores MR estão ativos durante todo o tempo, mesmo em condições basais de liberação de glicocorticoides (ROOZENDAAL, 1999; SARABDJITSINGH *et al.*, 2011). O aumento na liberação de corticosterona ocorre pela ativação do núcleo paraventricular do hipotálamo, que recebe aferentes do NSQ (ENGELAND e ARNHOLD, 2005) e acaba propiciando a liberação do hormônio liberador de corticotrofinas (HLC). Após liberado, esse hormônio age sobre a glândula pituitária, que secreta o hormônio adrenocorticotrófico (HACT), esse, por sua vez, estimula o córtex das glândulas adrenais a liberar cortisol/corticosterona na circulação sanguínea (SARABDJITSINGH *et al.*, 2011). A figura 5 resume a resposta do eixo

HPA frente a um evento estressor ou informações circadianas (SMITH, 1973; DE BOER *et al.*, 1990; ROOZENDALL *et al* 1996; ROOZENDALL, 1999; LIGHTMANN e CONWAY-CAMPBELL, 2010).



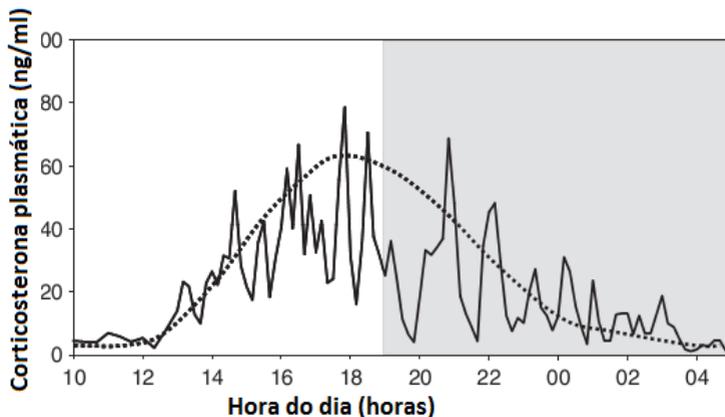
**Figura 5.** Representação do eixo HPA. Ativado tanto pelo NSQ (núcleo supraquiasmático) como por outras regiões do SNC (sistema nervoso central) em resposta ao estresse. HLC (hormônio liberador de corticotrofinas) e HACT (hormônio adenocorticotrófico). (Traduzido de LIGHTMANN e CONWAY-CAMPBELL, 2010).

A secreção de glicocorticoides pelas glândulas adrenais é responsável pela regulação do metabolismo energético do organismo, portanto, uma falha na liberação desses hormônios pode induzir o aparecimento de vários transtornos, por exemplo, síndrome de Cushing (excesso de cortisol), hipertensão, transtornos no sono, ganho de peso, depressão, ansiedade, síndrome de Addison (falta de cortisol), desenvolvimento de diabetes, irritabilidade (CARROL e FINDLING,

2010; TSANG *et al.*, 2013), em menor grau, doença de Parkinson e Alzheimer, síndrome de Huntington, síndrome do pânico e uma maior susceptibilidade do indivíduo em desenvolver transtorno do estresse pós-traumático são relatadas após alterações na característica pulsátil do eixo HPA (ABELSON e CURTIS, 1996; HARTMANN *et al.*, 1997).

### *1.3.1. Variação circadiana de glicocorticoides.*

Os glicocorticoides são liberados em sincronia com o ritmo circadiano, a regulação da liberação desses hormônios é uma das principais funções do NSQ sobre o sistema periférico. A variação de luminosidade pode controlar indiretamente a liberação de glicocorticoides pelas glândulas adrenais via projeções do NSQ sobre eixo HPA, de forma que o padrão de liberação desses hormônios varia de acordo com o padrão de atividade do organismo. Nesse caso, em espécies mais ativas durante o período diurno, como é o caso de humanos, o pico de liberação de glicocorticoides vai ocorrer logo ao amanhecer (entre 7 e 8h) (MOORE e EICHLER 1972; TSANG *et al.*, 2013). Já em animais de hábitos noturnos, como é o caso dos roedores noturnos (figura 6), padrão oposto é observado, ou seja, o pico de liberação ocorre ao anoitecer (19 e 20h) (OSTER *et al.*, 2006; LISTON *et al.*, 2013; TSANG *et al.*, 2013). O controle exercido pelo ritmo circadiano sobre a liberação e concentração plasmática de glicocorticoides é confirmado em trabalhos onde a retirada cirúrgica e/ou lesões do NSQ, acaba ocasionando a inibição da liberação circadiana de glicocorticoides (STEPHAN e ZUCKER, 1972; SARABDJITSINGH *et al.*, 2011).

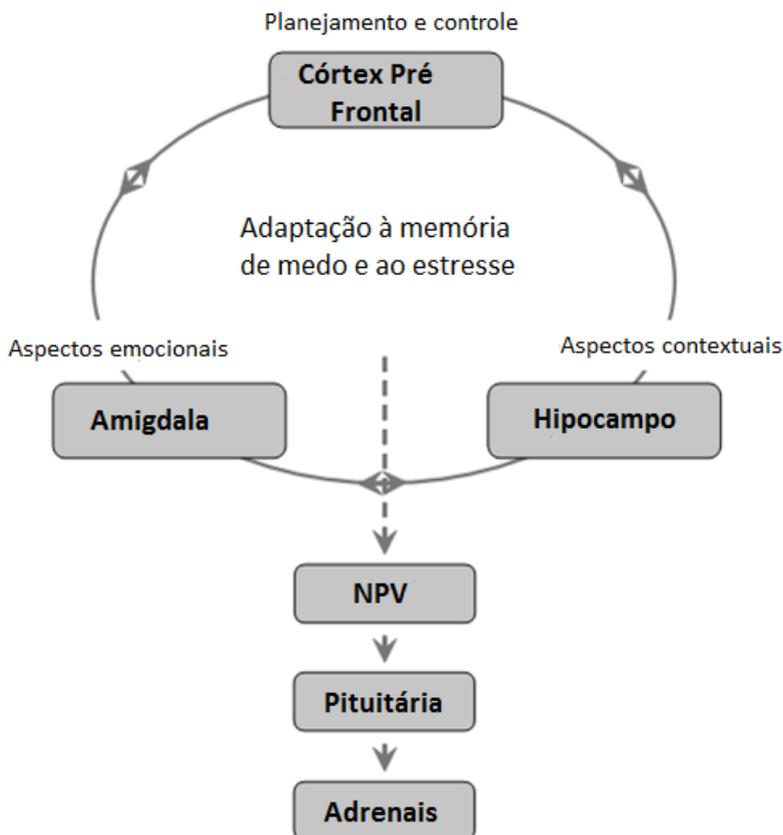


**Figura 6.** Liberação circadiana de glicocorticoides (corticosterona) em ratos. (Traduzido de SARABDJITSINGH *et al.*, 2012).

### 1.3.2. Modulação do processo de consolidação da memória pelos glicocorticoides.

Está bem descrito na literatura, que após uma situação de estresse ou frente um estímulo emocionalmente relevante ocorre uma maior liberação de glicocorticoides (McGAUGH *et al.*, 1996; CAHILL e MCGAUGH, 1998; MCGAUGH, 2003; AKIRAV, 2013). Os glicocorticoides podem participar da regulação da consolidação de uma memória principalmente pela ativação dos GR, que segundo de Kloet (1991), são responsáveis pelos efeitos dos glicocorticoides sobre a consolidação após eventos aversivos ou durante o pico de liberação desse hormônio. Liston e colaboradores (2013) propõem que para uma boa consolidação são necessárias concentrações ótimas de corticosterona plasmática, as quais levariam à eliminação de espinhas dendríticas desnecessárias e a formação de novas espinhas. Porém, para que essa memória seja mantida ao longo da vida, faz-se necessária a variação (pico e depressão) circadiana de corticosterona, por esse motivo a manutenção de altos níveis de glicocorticoides por um longo período de tempo é capaz de gerar prejuízos na consolidação da memória (LISTON *et al.*, 2013). Além disso, sugere-se que os receptores MR são responsáveis pela interpretação do estímulo ambiental e pela seleção da melhor estratégia comportamental a ser tomada frente determinada situação (OITZL *et al.*, 1994; ROOZENDAAL, 1999). Os glicocorticoides secretados naturalmente ou

após uma situação de estresse podem atuar diretamente sobre regiões do sistema nervoso central, importante para a formação da memória de longo prazo e ricas em receptores glicocorticoides, como o hipocampo, amígdala e córtex pré-frontal, fato observado na figura 7 (CHEN *et al.*, 2012).



**Figura 7.** Representação das regiões do sistema nervoso central (SNC) responsáveis pela modulação dos processos de memória e suas ligações com o eixo HPA. NPV (núcleo paraventricular) (Traduzido de GROENEWEG *et al.*, 2011).

Vários grupos de pesquisa têm avaliado a participação da corticosterona na modulação da consolidação de uma memória (OITZL

e DE KLOET, 1992; DE KLOET *et al.*, 1998; McGAUGH, 2000; ROOZENDAAL e McGAUGH 1996; 2011; AKIRAV, 2013), demonstrando que experiências e/ou eventos traumáticos são relembrados de forma vívida e completa. Enquanto isso, eventos com uma carga emocional baixa são remotamente lembrados, sugerindo que existe um mecanismo endógeno capaz de causar o fortalecimento de determinadas memórias (GOLD e McGAUGH, 1975), ou seja, o fortalecimento da memória está envolvido com a carga emocional da experiência vivida, que acaba levando a uma maior liberação de neurotransmissores e hormônios.

Dessa forma, a presença de uma concentração de corticosterona dita ótima é essencial para a formação da memória, ou seja, dentro de uma determinada faixa de concentração plasmática de glicocorticoides o organismo é capaz de beneficiar-se, ocorrendo assim, um melhor desempenho realização de determinada tarefa (YERKES e DODSON, 1908; PUGH *et al.*, 1997; ROOZENDAAL, 1999). Por esse motivo certos níveis de estresse são benéficos durante os processos de aquisição, consolidação e evocação da memória (AKIRAV, 2013; LISTON *et al.*, 2013).

### 1.3.3. Mecanismo de “feedback” do sistema glicocorticoide

Como mencionado anteriormente, não é fisiologicamente interessante que os níveis de glicocorticoides permaneçam elevados por um período de tempo muito longo (AKIRAV, 2013). Por esse motivo, após o aumento da concentração de glicocorticoides, é necessário um mecanismo para finalizar a ação do cortisol/corticosterona, conhecido como mecanismo de auto regulação negativa (*feedback*), podendo ocorrer de forma não-genômica (rápida) ou genômica (lenta) (HINZ e HIRSCHMANN, 2000; LIGHTMANN *et al.*, 2008). Sugere-se que os mecanismos de *feedback* negativos são os responsáveis pela geração dos diversos picos de secreção de glicocorticoides durante o dia, entrando em ação logo após um pico de liberação e dando início à fase inibitória do pulso (LIGHTMANN *et al.*, 2008). O mesmo padrão de resposta ocorre frente a uma situação de estresse, em que o aumento dos níveis de corticosterona plasmática ativam o mecanismo de autorregulação, com objetivo de manter os níveis de glicocorticoides sempre no nível ideal correspondente ao período do ritmo circadiano no qual o indivíduo encontra-se (DI *et al.*, 2003; RIEBE *et al.*, 2012).

Os efeitos genômicos dos glicocorticoides são mediados pelos seus próprios receptores (DE KLOET *et al.*, 1990), que exercem uma

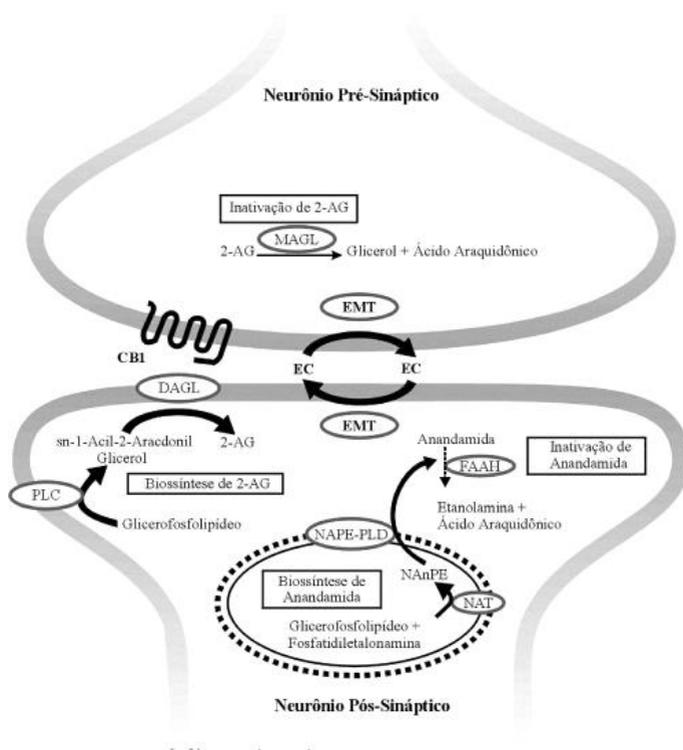
efeito inibitório sobre o eixo HPA (HERMAN *et al.*, 1996; DE KLOET, 2000). Essa resposta é dependente de transcrição gênica, por esse motivo a resposta inibitória do eixo HPA ocorre de forma lenta. Esse mecanismo visa re-estabelecer a homeostase do organismo (FALKENSTEIN *et al.*, 2000; DI *et al.*, 2003). Segundo de Kloet e colaboradores (1998) a diferença de expressão dos dois receptores é necessário, pois eles modulam diferentes respostas, enquanto os receptores MR são responsáveis por prevenir distúrbios na homeostase, os GR são essenciais na recuperação do organismo após uma situação de estresse, por esse motivo em alguns casos, o mecanismos de *feedback* lento ocasiona a ativação dos dois receptores.

Já os efeitos não genômicos (ou lentos) dos glicocorticoides não são necessariamente induzidos pela ação direta dos glicocorticoides sobre seus receptores (DI *et al.*, 2003; HINZ e HIRSCHMANN, 2010), e sim, sua ação sobre a sinalização de canais iônicos, receptores, hormônios e neurotransmissores (endocanabinóides), responsáveis tanto pela ativação rápida, quanto pelo *feedback* negativo rápido. O processo de *feedback* negativo rápido ocorre cerca de 10 a 15 min após a liberação dos hormônios pelo eixo HPA, essa inibição ocorre de forma não genômica por não envolver síntese de proteína, síntese mRNA e outros fatores genômicos e necessita da sinalização endocanabinoide, um dos principais sistemas de neuromodulação no sistema nervoso central (PATEL *et al.*, 2004; EVANSON *et al.*, 2010).

#### 1.4. Sistema endocanabinoide

A planta *Cannabis sativa*, popularmente conhecida como maconha ou *marijuana*, é usada para fins recreativos e medicinais há séculos. Os principais efeitos do uso dessa planta são: a indução de um estado de euforia, relaxamento, sensação de bem estar e felicidade, aumento da sociabilidade, fome excessiva, entre outros fatores (MOREIRA e WOJTAK, 2009). Porém, nem todos os efeitos da maconha sobre o organismo são prazerosos, o uso frequente de *Cannabis*, pode causar transtornos psiquiátricos, como ansiedade, transtorno do pânico, esquizofrenia, entre outros (ZUARDI *et al.*, 1982; D'SOUZA *et al.*, 2004). O principal componente de *Cannabis* foi descoberto, isolado e caracterizado em meados dos anos 60, sendo um composto lipídico denominado  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC) (GAONI e MECHOULAM, 1964). Alguns anos depois, o receptor canabinoide do subtipo 1 (CB1) foi clonado e caracterizado como membro da família dos receptores acoplados à proteína G (MATSUDA

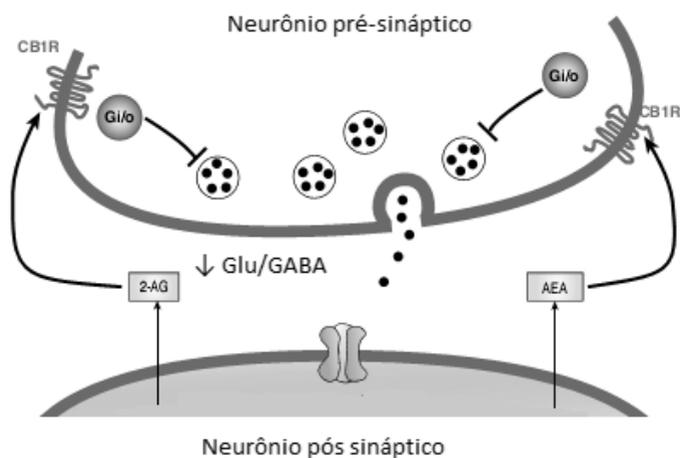
*et al.*, 1990). Logo após foi realizada a identificação e caracterização de dois compostos com estrutura química semelhante ao  $\Delta^9$ -THC, denominados endocanabinoides (eCB), o 2-araquinoilglicerol (2-AG) e N-araquidonoil etanolamina, mais conhecida como anandamida (AEA) (DEVANE *et al.*, 1992; MECHOULAM *et al.*, 1995). Munro e colaboradores (1993) identificaram, clonaram e classificaram os receptores canabinoides do subtipo 2 (CB2) também acoplado à proteína G. Por fim, para fechar os constituintes do sistema endocanabinoides, as enzimas de síntese e degradação dos eCB foram descobertas (MOREIRA e LUTZ, 2008). A representação esquemática do sistema endocanabinoide pode ser observada na figura 9 (abaixo).



**Figura 8.** Representação do sistema endocanabinoide. (Adaptado de PACHER *et al.*, 2006).

Os principais efeitos psicoativos da *Cannabis* são mediados pela sua ação sobre os receptores CB1, sendo esses receptores densamente

expressos no sistema nervoso central (MOREIRA e WOTJAK, 2009), e também na periferia, células imunes, tecidos vasculares, retina, células pancreáticas, trato gastrointestinal e adipócitos (PACHER *et al.*, 2006). Enquanto os receptores CB2 são encontrados, principalmente em tecidos e células responsáveis pela função de combater alguma agressão exógena ao organismo, por exemplo, células do sistema imune periféricos, órgãos em geral, micróglias de regiões cerebrais lesionadas, e em várias regiões do SNC (ex. hipocampo) (MURNO *et al.*, 1993; HOWLETT *et al.*, 2002; BENITO *et al.*, 2008).



**Figura 9.** Sistema eCB inibindo a liberação de outros neurotransmissores (ex. glutamato e GABA). 2-Araquidonoil-glicerol (2-AG), Anandamida (AEA), Receptor canabinoide do tipo 1 (CB1R), Glutamato (Glu). (adaptado de SAITO *et al.*, 2012).

Como pode ser observado na figura 10, os eCB são considerados neurotransmissores atípicos, pois não são armazenados em vesículas, sendo liberados sobre demanda, ou seja, sintetizados e liberados somente quando necessário, pelo neurônio pós-sináptico em resposta ao influxo de cálcio ou ativação de receptores glutamatérgicos ou colinérgicos presentes na pós-sinapse. Após liberados, os eCB agem sobre o neurônio pré-sináptico, causando uma supressão da atividade neuronal (OHNO-SHOSAKU *et al.*, 2001; WILSON e NICOLI, 2001; MARSICANO e LUTZ, 2006; MOREIRA e LUTZ, 2008; ALGER E

KIM, 2011). A ativação dos receptores canabinoides da pré-sinapse causa a inibição da liberação de outros neurotransmissores, principalmente glutamato e GABA (MARSICANO e LUTZ, 2006) e a possível inibição da liberação de serotonina e noradrenalina (SCHLINCKER e KATHMANN, 2001; FREUND *et al.*, 2003). A modulação da liberação desses neurotransmissores, principalmente GABA e glutamato, explica o fato do sistema eCB apresentar um efeito dual sobre vários comportamentos (MARSICANO e LUTZ, 2006; MOREIRA e LUTZ, 2008), por exemplo em processos como aprendizado e memória, ansiedade e depressão (MILLAN, 2003; MILLAN, 2006; MOREIRA e WOTJAK, 2009).

Após uma situação de estresse físico ou psicológico, é possível observar uma maior liberação de eCB em várias regiões do SNC (RIEBE *et al.*, 2012). O aumento dessa sinalização funciona como um mecanismo defensivo e de contra-ataque à situação de estresse, levando a um “alívio” da memória de medo, ou seja, reduzindo o caráter aversivo dessa experiência (RIEBE *et al.*, 2012). Por esse motivo, o bloqueio farmacológico ou genético dos receptores CB1 é capaz de gerar uma maior resposta de medo frente a uma situação aversiva (HALLER *et al.*, 2004; RIEBE *et al.*, 2012). Esse processo de redução ou alívio de uma memória aversiva pode ocorrer pela interação do sistema eCB com o sistema glicocorticoide e será discutida de forma mais ampla e detalhada posteriormente.

O sistema eCB participa da regulação de várias funções biológicas, fisiológicas e patológicas no nível de SNC e periférico (FRIDE, 2002), por exemplo, o controle das funções básicas do organismo, como temperatura corporal, ingestão de alimentos, ciclos sono-vigília, liberação de hormônios (ex. glicocorticoides), reprodução, percepção de dor e inflamação (COTA *et al.*, 2003; DI-MARZO 2003; VALENTI *et al.*, 2004). Ademais, auxiliando na regulação de vários processos fisiopatológicos, como cognição, depressão, dependência, estresse pós-traumático, ansiedade, fobias, entre outros (MOREIRA e LUTZ 2008; MOREIRA e WOTJAK, 2009). Assim o uso de canabinoides na clínica para o tratamento destes transtornos psicofisiológicos tem sido bastante abordado (WOTJAK, 2005; MALDONADO, VALVERDE e BERRENDERO, 2006). Segundo Moreira e Lutz (2008), o receptor CB1 é um dos receptores mais expressos no SNC. Várias regiões cerebrais ligadas ao processo de aprendizado e memória expressam altas densidades desses receptores, por exemplo, hipocampo, amígdala, córtex pré-frontal, hipotálamo e substância cinzenta periqueductal (GRAEFF, 1994; GALLER e

MOKLER, 2005; MOREIRA e LUTZ, 2008), além do NSQ, região responsável pela manutenção do ritmo circadiano (MARTINEZ-VARGAS *et al.*, 2005), podendo, assim, sugerir uma modulação do sistema eCB pelo ritmo circadiano, ou vice-versa.

#### *1.4.1 Influência do ritmo circadiano sobre o sistema endocanabinoide*

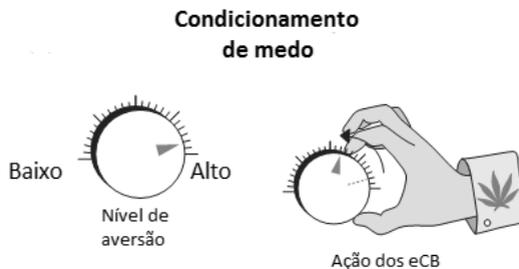
De acordo com Valenti e colaboradores (2004), é observada a variação circadiana do sistema eCB, revelando que em diferentes períodos do dia ocorre uma menor ou maior liberação de 2-AG e AEA em várias regiões do sistema nervoso central (ex. hipocampo, hipotálamo, estriado, córtex, entre outras), sendo essa variação circadiana da concentração plasmática dos eCB regulada, pelo próprio sistema eCB, através das suas enzimas de síntese e degradação, as quais também sofrem uma variação circadiana. A densidade e expressão de receptores CB1 também pode sofrer variação circadiana (MARTINEZ-VARGAS *et al.*, 2003). A densidade desses receptores está elevada durante a fase inativa do ritmo circadiano, fase onde é observada uma menor liberação de eCB em roedores (VALENTI *et al.*, 2004; VAUGHN *et al.*, 2010). Além disso, os eCB modulam vários processos fisiológicos controlados pelo ciclo circadiano, como o processo de sono-vigília, a liberação de hormônios (glicocorticóides), a modulação dos processos de aprendizado e memória, atividade locomotora, entre outros (VAUGHN *et al.*, 2010). Isso sugere que o sistema eCB pode regular ou ser regulado pelo ritmo circadiano, e servir como uma ponte de ligação entre os reguladores oscilatórios (NSQ) e os processos fisiológicos.

Como já foi abordado, é observado em animais a presença de receptores CB1 no NSQ (WITTMANN *et al.*, 2007; SANFORD *et al.*, 2008), sugerindo que os eCB podem alterar as respostas desse núcleo frente ao estímulo luminoso, levando a alterações do ritmo circadiano. Isso seria causado pela ação do sistema eCB sobre os sistemas de neurotransmissão glutamatérgico e GABAérgico do NSQ (MORIN e ALLEN 2006; VAUGHN *et al.*, 2010). Dessa forma, as possíveis interações entre o sistema eCB e o ritmo circadiano podem contribuir para o tratamento e/ou o entendimento da etiologia de várias doenças neuropsiquiátricas (SANFORD *et al.*, 2008) e participar da modulação de vários processos mnemônicos, por exemplo, a consolidação da memória.

#### 1.4.2 Importância do sistema endocanabinoide na consolidação da memória de medo contextual

Vários estudos têm demonstrado que o  $\Delta^9$ -THC e outros canabinoides são capazes de gerar prejuízos nos processos de aprendizado e memória, em roedores, primatas e humanos, fato que pode ser explicado pela alta densidade de receptores CB1 nas regiões límbicas principalmente na região hipocampal (LEDOUX, 2000; KATONA *et al.*, 2001; CASTELLANO *et al.*, 2003; RODRIGUES *et al.*, 2009). Respostas opostas são obtidas pelo bloqueio da sinalização eCB sobre os receptores CB1 através de antagonismo, deleção gênica ou degradação dos eCB; manipulações capazes de gerar uma melhora dos processos mnemônicos, por exemplo, uma melhor consolidação da memória (TERRANOVA *et al.*, 1996 ; MOREIRA e LUTZ, 2008; MOREIRA e WOTJAK, 2009; RIEBE *et al.*, 2012).

O papel do sistema eCB sobre a modulação de memórias aversivas, como é o caso da memória de medo contextual, é muito relevante para o nosso trabalho. A lembrança de uma situação aversiva, como já abordado, é importante para a sobrevivência e adaptação do animal ao ambiente, já que indivíduos que facilmente aprendem a evitar lugares pouco seguros possuem uma maior chance de sobrevivência (MARSICANO e LAFENÊTRE, 2009). Segundo, Riebe e colaboradores (2012), quanto maior a aversividade da experiência, maior será a liberação de eCB, principalmente 2-AG, visando diminuir a valência aversiva do evento e auxiliando na retomada rápida do organismo ao seu estado de equilíbrio. Está bem caracterizado na literatura que o bloqueio dos receptores CB1 é capaz de gerar respostas de medo exageradas e persistentes. Esta afirmação é explicada pelo fato do antagonismo (ex. AM 251) ou deleção dos receptores CB1, ser capaz de melhorar a aquisição (CANNICH *et al.*, 2004) e, principalmente, a consolidação de uma memória aversiva (CHHATWAL *et al.*, 2005; TAKAHASHI *et al.*, 2005; ARENOS *et al.*, 2006; ROCHE *et al.*, 2007; REICH *et al.*, 2008; SINK *et al.*, 2010) e bloquear os processos de extinção de memórias (MARSICANO *et al.*, 2002; MARSICANO e LUTZ, 2006; NIYUHIRE *et al.*, 2007). O papel do sistema eCB em reduzir as respostas de medo frente a uma experiência aversiva está esquematizada na figura 11.



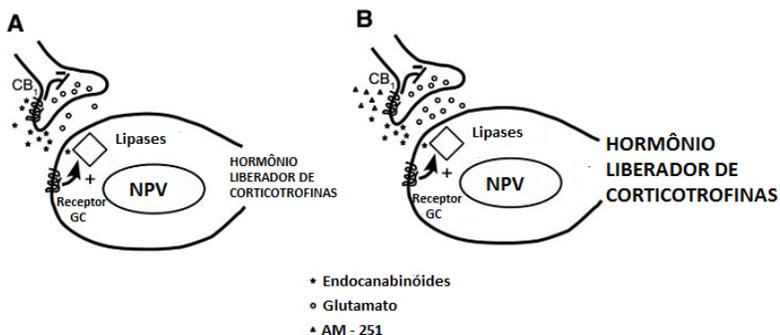
**Figura 10.** Representação do alívio da memória de medo causado pela ação dos eCB (Adaptado RIEBE *et al.*, 2012).

### 1.5. Interação dos sistemas glicocorticoide e endocanabinoide

Retomando assuntos anteriormente abordados, é conhecido que o sistema eCB é capaz de modular respostas emocionais em humanos, auxiliando no alívio das respostas frente a uma situação aversiva, por exemplo, respostas de ansiedade e medo (MORENA e CAMPOLONGO, 2013). A falta de funcionalidade do sistema eCB pode contribuir para o aparecimento de doenças neuropsiquiátricas ligadas à resposta de medo exagerada, como fobias, transtorno do pânico e transtorno de estresse pós-traumático (MOREIRA e WOTJAK, 2009; RIEBE *et al.*, 2012). Sugerindo um possível papel do sistema eCB na manutenção de respostas de medo baixas ou moderadas frente a eventos ou experiências aversivas, uma vez que a ativação do sistema eCB leva a alterações fisiológicas (diminuição da liberação de glicocorticoides) e comportamentais, e acabaria auxiliando na tomada da estratégia comportamental correta para enfrentar determinado evento aversivo (MOREIRA e WOTJAK, 2009; RIEBE *et al.*, 2012).

O alívio das respostas de medo pode ocorrer pela ação do sistema eCB sobre o eixo HPA. Nesse momento, é importante ressaltar que a ativação do eixo HPA pode ser controlada pelo NSQ em resposta à variação circadiana e/ou ser solicitada após uma situação emocionalmente relevante (aversiva ou não) (FINN, 2010; TSANG *et al.*, 2013). Em contrapartida, o sistema endocanabinoide é capaz de suprimir a atividade do eixo HPA através do mecanismo de *feedback* não genômico (rápido) (DI *et al.*, 2003; COTA *et al.*, 2007; VAUGHN *et al.*, 2010). Segundo Di e colaboradores (2003) e outros pesquisadores (COTA *et al.*, 2007; HILL e McEWEN, 2010), um aumento de concentração plasmática de glicocorticoides, causada por uma situação

de estresse (ex. choque nas patas) ou pela variação fisiológica do ritmo circadiano, pode favorecer a liberação de endocanabinoides, principalmente na região do núcleo paraventricular, resultando na inibição do eixo HPA e funcionando assim como um auto limitador de liberação de glicocorticoides (PATEL *et al.*, 2004; FINN, 2010), fato observado em animais (HOHMANN *et al.*, 2005) e humanos (HILL *et al.*, 2009). Nesse processo, ocorre à supressão da inibição da liberação de glutamato sobre os neurônios liberadores do HLC do núcleo paraventricular do hipotálamo, em resposta à ativação dos receptores canabinoides na pré-sinapse, levando a uma supressão do eixo HPA, e, conseqüentemente, a diminuição da liberação de glicocorticoides (DI *et al.*, 2003; GROENEWEG *et al.*, 2011). Pode-se observar a interação entre esses dois sistemas na figura 12 a seguir.



**Figura 11.** Interação entre os sistemas glicocorticoides e endocanabinoide (eCB). (A) Ação dos endocanabinóides na inibição da liberação de glutamato pelo neurônio pré-sináptico, levando à diminuição da liberação de corticosterona. (B) Mecanismo de inibição do eixo HPA pela sinalização endocanabinoide, através do bloqueio farmacológico dos receptores CB1, pelo AM-251, suprime a inibição de glutamato e causa um aumento da liberação de glicocorticoides. Receptor GC (receptor glicocorticóide), NPV (núcleo paraventricular) e CB1 (receptor canabinoide subtipo 1). (Traduzido de EVANSON *et al.*, 2010).

De acordo com vários estudos e com base na figura acima, é sugerida a participação do sistema eCB na regulação do eixo HPA, pois o antagonismo dos receptores CB1 leva ao aumento da resposta do eixo HPA frente ao evento aversivo, ou seja, uma maior liberação de

glicocorticoides, mesmo resultado observado em animais nocautes para CB1 (CB1R<sub>KO</sub>) (EVANSON *et al.*, 2010). Além disso, a capacidade do eixo HPA em modular e/ou influenciar os processos de plasticidade sináptica e consolidação da memória por meio da liberação de glicocorticoides na circulação sanguínea, está sob controle intenso do ritmo circadiano (MOORE e EICHLER 1972; TSANG *et al.*, 2013). A modulação do eixo HPA necessita da sinalização endocanabinoide, que também sofre influência do ritmo circadiano, e participa amplamente da modulação dos processos de consolidação da memória (DI *et al.*, 2003; PATEL *et al.*, 2004; FINN, 2010; HINZ e HIRSCHMANN, 2010).

Dessa forma, a hipótese deste trabalho é que ocorra um efeito do ritmo circadiano sobre o bloqueio do receptor endocanabinoide, podendo levar a alterações no processo de consolidação de uma memória de medo contextual, sendo essas alterações causadas, possivelmente pela variação circadiana de glicocorticoides, já que é possível observar uma interação entre os sistemas eCB e glicocorticoide.

## **2. Objetivos**

### **2.1 Objetivos gerais**

- Investigar se, e como, o ritmo circadiano influencia os efeitos do antagonismo farmacológico de receptores CB1 durante a consolidação de uma memória de medo contextual em ratos.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Avaliar o papel do receptor canabinoide do subtipo 1 na consolidação da memória de medo contextual em dois períodos do ciclo circadiano em ratos.

- Quantificar a concentração plasmática de corticosterona em dois períodos do ciclo circadiano em ratos com e sem condicionamento ao contexto.

- Investigar através da administração de corticosterona (dia) e dexametasona (noite) a influência do sistema glicocorticoide sobre o bloqueio farmacológico dos receptores CB1 durante a consolidação da memória de medo contextual em dois períodos do ritmo circadiano.

### 3. Materiais e métodos

#### 3.1 Considerações éticas

Todos os procedimentos realizados durante a elaboração desse estudo foram conduzidos de acordo com o Comitê de Ética para o Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC), sobre o processo número: Ofício 71/CEUA/PRPE/2012. Foi utilizado o número mínimo de animais para a obtenção de análises estatísticas confiáveis.

#### 3.2 Animais

Foram utilizados 222 ratos da linhagem Wistar, com idade entre 3-4 meses (300-400 g). Os animais foram disponibilizados pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (BIC-UFSC). Os animais foram agrupados em caixas de polipropileno (36 x 30 x 15 cm), contendo de 4-5 animais, em ambiente com temperatura controlada ( $22 \pm 1$  °C), com ciclo claro/escuro de 12 horas (fase clara das 7h às 19h) e água e ração *ad libitum*.

#### 3.3 Drogas e tratamentos

Durante a realização dos protocolos experimentais foram utilizadas as seguintes drogas:

**AM 251**, antagonista de receptores canabinoides do subtipo 1 (Tocris, USA) dissolvido em solução salina (NaCl 0,9%) contendo 5% de Tween 80 e administrado intraperitonealmente (i.p.) nas doses de 0,1 mg/kg; 0,3 mg/kg ou 1,0 mg/kg. As doses utilizadas foram baseadas em estudos prévios (não publicados) do laboratório desta instituição.

**Corticosterona**, agonista de receptores glicocorticoides (Sigma-aldrich USA) dissolvido em solução salina (NaCl 0,9%) contendo 5% de Tween 80 e administrado intraperitonealmente (i.p.) na dose de 1 mg/kg. Sendo essa dose padronizada em estudos prévios do nosso grupo.

**Dexametasona**, um agonista sintético do receptor glicocorticoide (Sigma-aldrich, USA), dissolvido em solução salina (NaCl 0,9%) contendo 5% de Tween 80 e administrado i.p. na dose de 0,1 mg/kg e

0,3 mg/kg. Essa dose foi baseada em trabalhos de outros grupos (ROOZENDAAL, 1999; SOUZA, 2011; CAVALLI, 2013).

**Solução controle**, o veículo de dissolução das drogas foi utilizado como solução controle, ou seja, solução salina 0,9% contendo 5% de Tween 80 e administrada intraperitonealmente (i.p.).

### **3.4 Procedimentos experimentais**

Todos os testes comportamentais descritos abaixo foram registrados através de um sistema de câmera/vídeo (DVD), o qual permitiu a gravação de todos os experimentos para uma posterior análise dos dados. Os experimentos foram realizados em dois períodos distintos, com início por volta das 7-8h, durante o dia (fase clara e inativa dos animais), ou iniciando entre 19-20 h, durante a noite (fase escura e ativa dos roedores). A escolha dos animais para cada tratamento seguiu uma ordem aleatória.

Em todas as sessões os animais foram retirados do Biotério do Laboratório de Neuropsicofarmacologia e levados para a sala de experimentação 30-45 min antes do início do procedimento experimental, visando uma ambientação ao local no qual os testes foram realizados. A sala de ambientação foi suavemente iluminada por um lâmpada incandescente de 40 lux para experimento durante o dia ou 4 lux para experimentos realizados durante a noite, a temperatura nessa sala foi mantida em torno de  $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , através de uma aparelho de ar-condicionado. Os experimentos foram conduzidos em uma sala conjugada com iluminação (40 lux para todos os experimentos) e temperatura controlada.

#### *3.4.1 Condicionamento de Medo Contextual*

Os experimentos de condicionamento de medo contextual foram realizados em uma caixa de condicionamento (Insight Ltda, SP, Brasil) dotada de piso gradeado conectado a um gerador de choque elétrico (Figura 13), sendo a amplitude e o tempo do choque configurado previamente dependendo do grupo experimental e do objetivo do estudo.



**Figura 12.** Caixa de condicionamento

O modelo de condicionamento de medo contextual utilizado é baseado no modelo de condicionamento clássico desenvolvido por Ivan Pavlov. Como descrito na figura 16, o referido procedimento experimental foi desenvolvido em várias sessões. No primeiro dia, os animais foram expostos por 3 min à caixa de condicionamento em um processo chamado familiarização, tendo como objetivo o reconhecimento do aparato experimental (FANSELOW, 1990). Discute-se que os animais precisam de um tempo de exploração ao contexto (2-3 min) com objetivo de formar uma representação interna desse contexto. Isso só seria necessário durante um condicionamento de medo contextual e a ausência dessa sessão de familiarização impede a contextualização do evento aversivo (FRANKLAND *et al.*, 2004; LANDEIRA-FERNANDEZ *et al.*, 2006; RIEBE *et al.*, 2012). Após a sessão de familiarização, animais foram retirados e levados para uma caixa permanência até o fim de todo o experimento quando todos foram reagrupados, em suas respectivas caixas moradias, e levados novamente ao biotério. No dia seguinte, os animais passaram pela sessão de condicionamento na qual foram expostos a caixa de condicionamento e após 30 s receberam 3 choques de 0,7 mA por 3 s nas patas com intervalo entre os choques de 30 s, após os choques animais permaneceram por mais 30 s nesse aparato experimental.

O teste comportamental consistiu em re-expor o animal à caixa de condicionamento (contexto A) no teste  $A_1$  (dia 3) em uma sessão de 3 min, visando avaliar o comportamento de medo condicionado apresentado pelo animal. A resposta comportamental avaliada foi a resposta de congelamento (em porcentagem de tempo), que foi definido por Blanchard e Blanchard (1969) como imobilidade em uma posição de agachamento, com ausência total de movimentos com exceção dos movimentos necessários para a respiração, sendo considerado um comportamento de medo condicionado (FANSELOW, 1980).

No dia 4, animais foram expostos a uma caixa de vidro, totalmente diferente do contexto no qual o animal foi condicionado (contexto neutro, Contexto B, figura 14). A exposição ao contexto B durou 3 min, sendo chamada de teste  $B_1$ , com objetivo de avaliar a generalização da memória de medo, ou seja, se o animal passa a apresentar congelamento significativo em um contexto neutro, que não possui nenhum grau de aversividade.



**Figura 13.** Contexto B. Caixa de vidro.

Com objetivo de investigar a persistência da memória de medo formada, foi realizada uma segunda sessão de teste A (teste  $A_2$  – 3 min), uma semana após o condicionamento, e no dia seguinte uma segunda sessão de teste B (teste  $B_2$  – 3 min), a fim de avaliar a durabilidade da

memória associativa e/ou generalização do medo. 48 h após o teste B os animais foram expostos ao labirinto em cruz elevado (LCE). Após cada exposição, os aparatos experimentais foram limpos com solução de etanol (10% v/v).

### 3.4.2 Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

O labirinto em cruz elevado foi realizado com objetivo de investigar a ocorrência do processo de sensibilização do medo. O processo de sensibilização da memória é considerado um aprendizado não associativo, ou seja, um aumento da resposta de medo a um estímulo que é aversivo, embora não esteja associado à memória de medo (RIEBE *et al.*, 2012).

O LCE (figura 15) um teste que consiste em um aparato de MDF branco (EP-151, Insight, SP, Brasil), com quatro braços, sendo dois abertos, de 50 x 10 cm, com uma proteção de 1 cm de altura em todo o braço e dois fechados, com medidas de 50 x 10 x 40 cm, disposto de maneira oposta e uma plataforma central (10 x 10 cm).

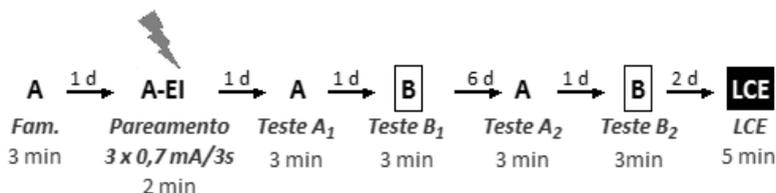


**Figura 14.** Labirinto em cruz elevado (LCE).

Os animais foram colocados na plataforma central do labirinto com a cabeça voltada para os braços fechados e exploraram livremente durante 5 minutos, ao fim da sessão animal foi retirado e levado para um caixa permanência até o fim de todo o experimento quando todos foram levados em suas respectivas caixas moradias, novamente ao biotério. Após cada exposição, o labirinto foi limpo com solução de etanol (10% v/v). Os seguintes parâmetros foram avaliados:

- Números de entradas nos braços abertos (EA) do LCE, considerados apenas quando animal colocava as quatro patas em um dos braços abertos.
- Número de entradas nos braços fechados (EF) do LCE, consideradas apenas quando animais colocavam as quatro patas em um dos braços fechados.
- Tempo de permanência nos braços abertos (TA) do LCE, considerado desde a entrada do roedor no braço aberto até que uma das patas fosse colocada em outra parte do LCE.
- Tempo de permanência nos braços fechados (TF) do LCE, considerado desde a entrada do rato no braço fechado até que uma das patas fosse colocada em outra parte do LCE.
- Postura de estiramento (PAR), comportamento relacionado à avaliação de risco, e foi registrado o número de tentativas de entradas nos braços abertos, considerada quando o animal colocou pelo menos uma das patas em um dos braços abertos e voltou à posição original.

Os dados desses parâmetros foram usados para calcular a frequência de ocorrência de determinado comportamento. São eles, a porcentagem de tempo nos braços abertos {%TA; [(tempo nos braços abertos/300) x 100]} e a porcentagem de entradas nos braços abertos {%EA; [número de entradas nos braços abertos/número total de entradas (aberto + fechado) x 100]}. Os outros parâmetros são plotados na forma bruta.



**Figura 15.** Representação esquemática geral do protocolo experimental utilizado durante a realização dos experimentos comportamentais.

### 3.4.3 Dosagem de corticosterona plasmática

A dosagem de corticosterona foi realizada pelo método de quimiluminescência. O seguinte protocolo foi adotado para a coleta de amostra de sangue destinado a posterior dosagem de corticosterona plasmática: animais foram sacrificados por decapitação, utilizada uma guilhotina e cerca de 4 ml de sangue foi coletado e separado em 2 eppendorfs, um deles encaminhado para posterior análise e outro armazenado em freezer -80 °C caso fosse necessária a realização de uma nova análise, evitando assim o sacrifício de outros animais. As análises foram realizadas pelo Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias – Petlabor®.

Para avaliar a concentração basal de corticosterona durante o dia ou noite os animais foram divididos em dois grupos, retirados do biotério aproximadamente às 7h e 30 min ou às 19h e 30 min e levados à sala de perfusão, não sendo submetidos a nenhum procedimento experimental e nenhum tratamento, e foram decapitados conforme o experimento já explicado. O protocolo utilizado para avaliar o efeito do condicionamento sobre a liberação de corticosterona foi o seguinte: animais passaram por uma sessão de condicionamento (3 choques de 0,7 mA/3s) durante o dia ou noite e após 30 min, período necessário para se alcançar concentração plasmática elevada de corticosterona após uma situação de estresse e foram sacrificados como descrito acima.

### 3.5 Análises estatísticas

Os dados obtidos foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Para a análise estatísticas dos dados utilizou-se o programa Statistica® 6.0 (Statsoft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA). Na

confeção dos gráficos, usou-se o programa Graph Pad Prism® 4.0 (Graph Pad Software, San Diego, Califórnia, USA). O nível de significância considerado para todos os testes foi de  $P \leq 0,05$ .

No experimento 1, nos experimentos envolvendo condicionamento de medo contextual recorreu-se à análise de variância de duas vias seguidas de teste *post hoc* de Newman-Keuls, sendo utilizada para detectar diferenças na porcentagem de tempo de congelamento durante os testes A<sub>1</sub>, B<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> (7dias) e B<sub>2</sub> (7 dias), usando o tratamento e o período no qual os animais foram submetidos aos procedimentos experimentais durante o dia (8 h) ou durante a noite (20h), como variáveis independentes. Os dados obtidos no LCE foram analisados pela ANOVA de duas vias seguida de teste de *post hoc* de Newman-Keuls, usando o tratamento e o período de tempo como variáveis independentes.

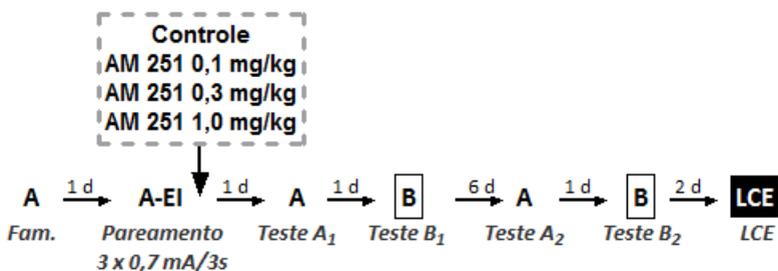
No experimento 2, analisou-se a dosagem de corticosterona por ANOVA de duas vias, seguida de teste de *post hoc* de Newman-Keuls, usando o período de tempo e o condicionamento como variáveis independentes.

Nos experimentos 3 e 4 foi realizada a análise de variância de duas vias seguida de teste *post hoc* de Newman-Keuls, nos experimentos envolvendo condicionamento de medo contextual, sendo utilizada para detectar diferenças na porcentagem de tempo de congelamento durante o teste A<sub>1</sub>, B<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> (7dias) e B<sub>2</sub> (7 dias), usando o pré-tratamento e o tratamento como variáveis independentes. Os dados obtidos no LCE foram analisados usando ANOVA de duas vias seguida de teste de *post hoc* de Newman-Keuls, usando o pré-tratamento e o tratamento como variáveis independentes.

## 4. Resultados

### 4.1 Experimento 1. Efeitos do antagonismo dos receptores CB1 sobre a consolidação de uma memória de medo contextual em diferentes períodos do ritmo circadiano

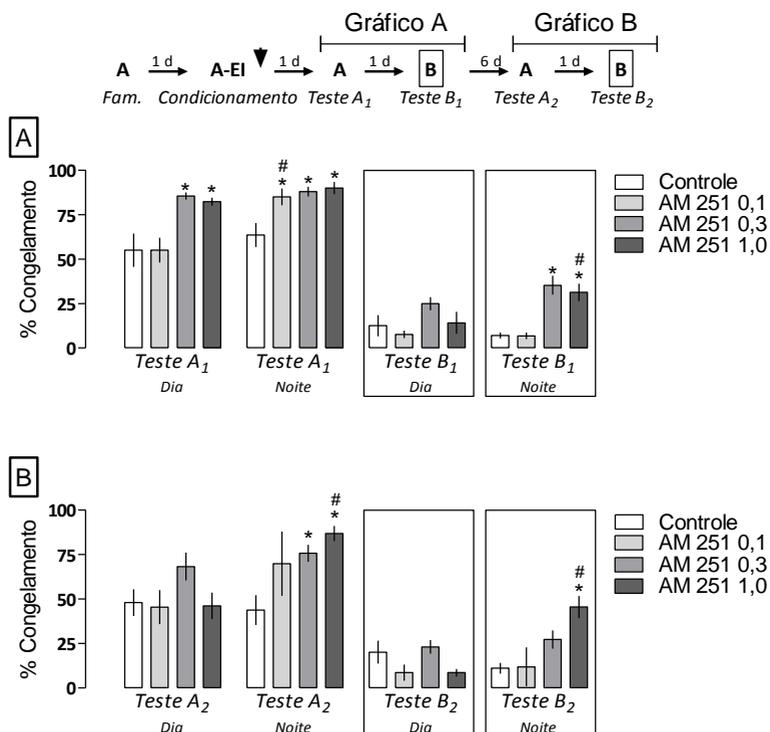
O experimento 1 visou investigar a possível influência do ritmo circadiano nos efeitos do antagonismo dos receptores canabinoides, CB1, na consolidação da memória de medo contextual. Para isso os animais foram divididos em dois grupos de acordo com o período nos quais os experimentos foram realizados: fase clara (7-8h) ou fase escura (19-20h). Dentro de cada grande grupo os animais foram tratados com AM 251 (0,1; 0,3 ou 1,0 mg/kg, i.p.) ou solução controle imediatamente após a sessão de condicionamento (pareamento do contexto A com choques). A figura 17 detalha como foi realizada essa etapa experimental.



**Figura 16.** Representação esquemática dos procedimentos utilizados na realização do experimento 1. Experimentos realizados nos dois períodos do ciclo claro-escuro (dia e noite), com administração das drogas (controle e AM 251 0,1; 0,3 ou 1,0 mg/kg) logo após a sessão de condicionamento. (LCE – Labirinto em cruz elevado).

A Figura 18 mostra o perfil comportamental de ratos tratados com AM 251 ou controle após o condicionamento de medo contextual nos diferentes períodos do ritmo circadiano. A ANOVA de duas vias não revelou interação significativa entre o período do dia e o tratamento no parâmetro de porcentagem de congelamento na sessão A<sub>1</sub> [ $F(3,73) = 2,4$ ;  $P = 0,08$ . Fig 18 A]. Todavia, observa-se o efeito do tratamento na sessão A<sub>1</sub> [ $F(3,73) = 12,25$ ;  $P = 0,00$ . Fig 18 A], nesses casos o teste

*post-hoc* de Newman-Keuls revelou um aumento na porcentagem de congelamento no teste A<sub>1</sub> dia em animais que receberam AM251 0,3 e 1,0 mg/kg e A<sub>1</sub> noite em animais tratados com AM 251 0,1; 0,3 mg/kg e 1,0 mg/kg quando comparados com seus respectivos animais controle. O efeito do período também foi encontrado [ $F(1,73) = 9,8; P = 0,003$ . Fig 18 A], a posterior análise por teste de *post-hoc* de Newman-Keuls revela uma maior porcentagem de congelamentos em animais tratados com AM 251 0,1 mg/kg, no teste A<sub>1</sub> noite, quando comparados com AM 251 0,1 mg/kg no teste A<sub>1</sub> dia.



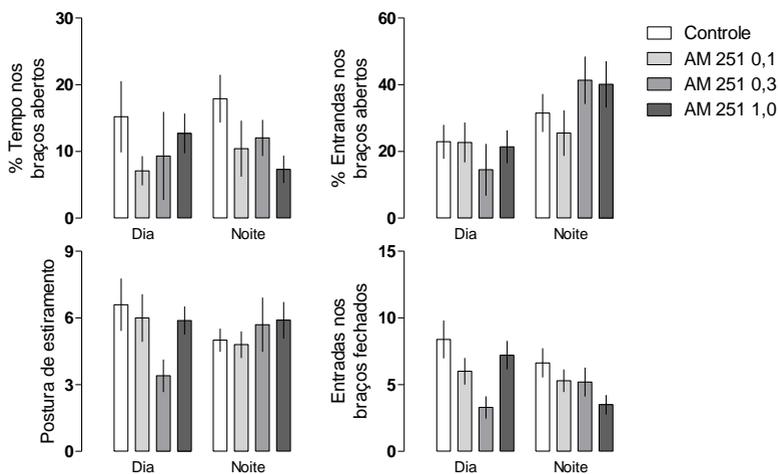
**Figura 17.** Porcentagem de congelamento após a administração de controle ou antagonista dos receptores CB1 (AM 251 0,1; 0,3 ou 1,0 mg/kg) sobre o processo de consolidação de uma memória de medo contextual. (A) Avaliação da % de congelamento no teste A<sub>1</sub> e no teste B<sub>1</sub>, realizados em diferentes períodos do ciclo circadiano dia (7-8h) ou noite (19-20h). (B) % de congelamento nas sessões teste A<sub>2</sub> e B<sub>2</sub> nos diferentes períodos do ciclo circadiano. As barras verticais representam a média  $\pm$  EPM (n = 8-11). Os asteriscos indicam uma diferença significativa ( $*P < 0,05$ ) entre os grupos tratados com AM 251 e o grupo controle da cada sessão e as cerquilhas indica uma diferença significativa ( $#P < 0,05$ ) entre o mesmo tratamento de dia ou de noite. (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de *post-hoc* de Newman-Keuls).

A interação entre tratamento e período ocorreu na sessão B<sub>1</sub> [F(3,73) = 3,0; *P* = 0,04. Fig 18 A). A porcentagem de congelamento foi maior em ratos tratados com AM 251 1,0 mg/kg durante a noite, em relação ao grupo controle e ao mesmo grupo testados durante o dia. A porcentagem de congelamento sofreu um acréscimo em ratos tratados com AM 251 0,3 ou 1,0 mg/kg comparados com seus respectivos controle.

Para as sessões A<sub>2</sub> e B<sub>2</sub> também foi realizada a ANOVA de duas vias, e os resultados estão plotados no gráfico B da figura 18. Na sessão A<sub>2</sub>, a ANOVA revelou interação entre o período e o tratamento [F(3,73) = 3,8; *P* = 0,007. Fig 18 B]. A porcentagem de congelamento no teste A<sub>2</sub> noite foi maior do que A<sub>2</sub> dia em ratos tratados com AM 251 1,0 mg/kg. Na sessão, A<sub>2</sub> noite o teste *post-hoc* de Newman-Keuls revela uma manutenção do aumento significativo da porcentagem de congelamento em animais tratados com AM 251 0,3 e 1,0 mg/kg, comparados ao grupo controle. Já na sessão B<sub>2</sub> a ANOVA revelou uma interação entre tratamento e período [F(3,73) = 9,7; *P* = 0,000. Fig 18 B]. Na sessão B<sub>2</sub> noite o nível de congelamento foi maior em animais que receberam AM 251 1,0 mg/kg, em relação ao grupo controle e ao mesmo grupo testados durante o dia.

Com os resultados obtidos podemos sugerir que o bloqueio dos receptores CB1, pelo antagonista AM 251, após o condicionamento realizado no período noturno foi capaz de potencializar a consolidação da memória de medo contextual, fato demonstrado pelo aumento da % de congelamento no teste A<sub>1</sub>. O antagonismo dos receptores canabinoides do subtipo 1 também foi capaz de induzir um processo de generalização da memória, observado pelo aumento do comportamento de congelamento no teste B1, além de levar a persistência da potencialização dos processos de consolidação (A<sub>2</sub>) e de generalização (B<sub>2</sub>) da memória de medo contextual. Todavia, quando os experimentos ocorrem durante o dia, foi observado que o AM 251 é capaz de causar o aumento da porcentagem de congelamento somente no teste A<sub>1</sub>, levando a potencialização do processo de consolidação da memória de medo condicionada, sem causar generalização e muito menos a persistência dessa resposta comportamental, ou seja, não temos aumento da porcentagem de congelamento frente ao teste B<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> e B<sub>2</sub>. Isso pode indicar uma diferença de funcionalidade do sistema endocanabinóide nos diferentes períodos do ciclo circadiano (VALENTI *et al.*, 2004; VAUGHN *et al.*, 2010).

Para investigar se ocorreu sensibilização, todos os animais foram expostos ao labirinto em cruz elevado (LCE) dois dias após o teste B<sub>2</sub>. Os resultados estão demonstrados na figura 19. Dois animais foram excluídos da análise estatística, pois acabaram caindo do LCE repetidas vezes, sendo essa uma situação onde essa exclusão é aceitável. Como pode ser visto na figura 19, o tratamento com AM 251 não foi capaz de causar nenhuma alteração nos parâmetros comportamentais avaliados, fato comprovado pela realização de ANOVA de duas vias, a qual revelou que não ocorre interação entre o período e o tratamento em nenhum dos parâmetros avaliados %TA [F(3,71) = 0,5; P = 0,70], %EA [F(3,71) = 1,6; P = 0,19], PAR [F(3,71) = 2,0; P = 0,012] e EF [F(3,71) = 2,5; P = 0,06]. Efeito do fator tratamento foi observado somente para o parâmetro EF [F(3,71) = 3,6; P = 0,02], entretanto, o teste *post hoc* de Newman-Keuls não revelou nenhuma diferença significativa. Efeito do tratamento não foi observado nos demais parâmetros %TA [F(3,71) = 1,4; P = 0,25], %EA [F(3,71) = 0,2; P = 0,87] e PAR [F(3,71) = 0,98; P = 0,40]. A análise estatística revelou efeito do período somente para o parâmetro %EA [F(1,71) = 9,0; P = 0,004], nesse caso o teste de *post hoc* de Newman-Keuls também não revelou nenhuma diferença significativa. Não houve o efeito do período para os seguintes parâmetros %TA [F(1,71) = 0,05; P = 0,83], PAR [F(1,71) = 0,04; P = 0,84] e EF [F(1,71) = 2,6; P = 0,11].



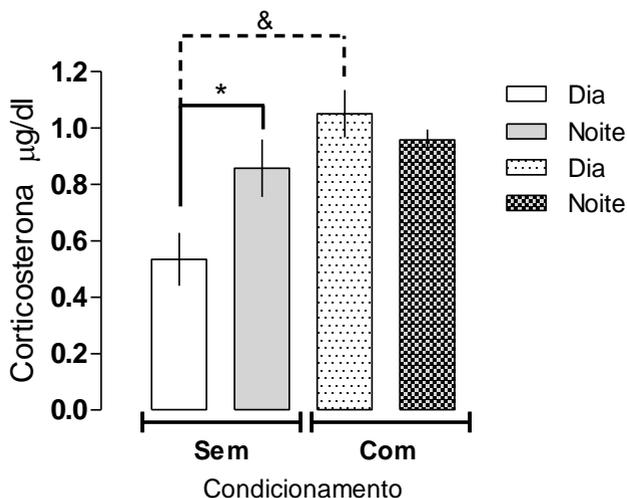
**Figura 18.** Efeito do bloqueio farmacológico dos receptores CB1 pelo AM 251 0,1; 0,3 ou 1,0 mg/kg no labirinto em cruz elevado (LCE), em diferentes períodos do ritmo circadiano dia (7-8h) ou noite (19-20h). O processo de sensibilização da memória não ocorreu, pois a ANOVA seguida pelo teste de *post-hoc* de Newman-Keuls não revelou diferença significativa em nenhum dos parâmetros avaliados. As barras verticais representam a média  $\pm$  EPM ( $n = 8-11$ ). (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de *post-hoc* de Newman-Keuls).

#### 4.2 Experimento 2. Quantificação da concentração plasmática de corticosterona nas diferentes fases do ciclo circadiano

No experimento 2, foi realizada a dosagem de corticosterona plasmática, a fim de confirmar uma diferença de liberação de corticosterona pelo organismo nos diferentes períodos do ritmo circadiano (LISTON *et al.*, 2013). Assim como, analisar o papel do condicionamento, em diferentes períodos do ritmo circadiano, sobre a liberação de corticosterona plasmática.

A figura 20 mostra o perfil de liberação de corticosterona basal e após o condicionamento de medo contextual, nos diferentes períodos do ritmo circadiano. A ANOVA de duas vias mostrou uma interação entre período e condicionamento [ $F(1,26) = 6,6$ ;  $P = 0,017$ ] na liberação de corticosterona. Foi observada uma maior liberação de corticosterona

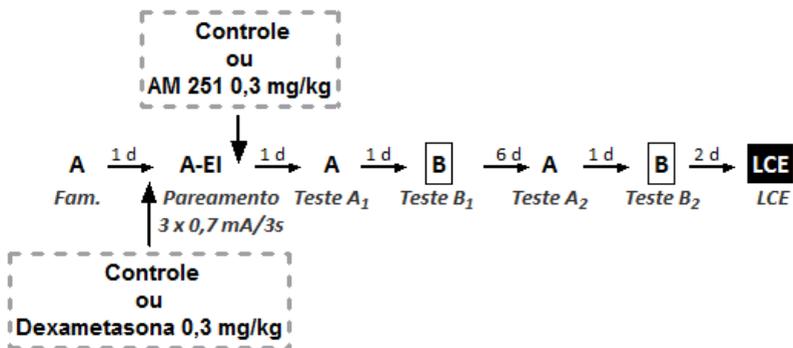
plasmática em animais não condicionando e sacrificados durante o período noturno quando comparados com o grupo diurno. Também foi encontrando um aumento da concentração plasmática de corticosterona em animais sacrificados após o condicionamento de medo tanto no período diurno quanto no período noturno, quando comparado aos animais não condicionados e sacrificados no período diurno.



**Figura 19.** Dosagem de corticosterona basal e após o condicionamento de medo contextual nos diferentes períodos do ritmo circadiano dia (7-8h) ou noite (19-20h). As barras verticais representam a média  $\pm$  EPM (n = 7-8). O asterisco indica uma diferença significativa da concentração plasmática de corticosterona noturna (\*P < 0,05) em relação à concentração plasmática durante o dia em animais não condicionados. O eítza (&) indica uma diferença da concentração plasmática de corticosterona dos animais condicionado em relação a grupo não condicionado durante o dia (&P < 0,05) (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de *post-hoc* de Newman-Keuls).

### 4.3 Experimento 3. Efeitos da dexametasona sobre o antagonismo de receptores CB1 na consolidação da memória de medo contextual durante a noite

Essa etapa experimental tem como finalidade mimetizar e simular os níveis diurnos de liberação de glicocorticoides durante a noite através da administração de dexametasona e investigar quais os efeitos dessa manipulação sobre o antagonismo CB1. Para isso as seguintes drogas foram administradas: dexametasona (0,3 mg/kg i.p.), AM 251 (0,3 mg/kg i.p.) ou solução controle. Os procedimentos e grupos experimentais foram similares ao do experimento 1, diferindo na administração de solução controle ou dexametasona 0,3 mg/kg, 60 min antes da sessão de condicionamento, com objetivo de suprimir a liberação de corticosterona pela glândula adrenal. Já a solução controle ou AM 251 foram administradas imediatamente após a sessão de condicionamento conforme o experimento 1. Os seguintes grupos foram formados controle + controle, controle + AM 251 0,3 mg/kg, dexametasona 0,3 mg/kg + controle e dexametasona 0,3 mg/kg + AM 251 0,3 mg/kg. O esquema de administração está exemplificado na figura 21.

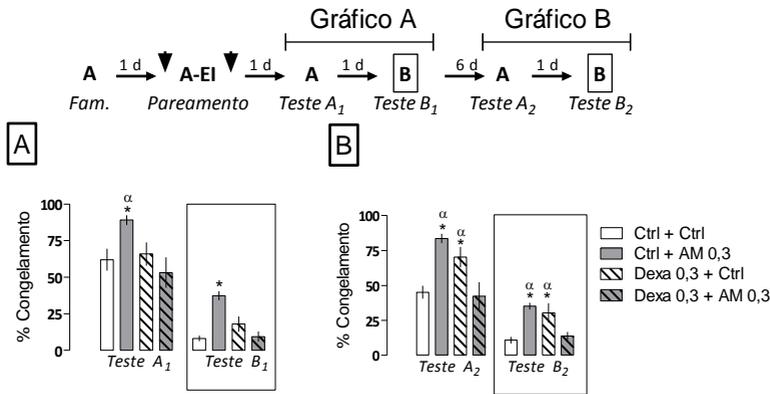


**Figura 20.** Representação esquemática dos procedimentos utilizados para a realização da sessão de experimentos 3. Experimentos conduzidos durante a noite (início 19-20h). Pré-tratamento, 60 min, antes da sessão de condicionamento, com solução controle ou dexametasona 0,3 mg/kg e tratamento imediatamente após o pareamento com solução controle ou AM 251 0,3 mg/kg.

A figura 22 A mostra que a dexametasona foi capaz de inibir a resposta comportamental induzida pelo AM 251, ou seja, em animais

que receberam dexametasona antes do treino e logo depois o antagonista de receptores CB1 não foi observada nem a potencialização, nem a generalização da memória de medo. Para a sessão de teste A<sub>1</sub> a ANOVA de duas vias revelou uma interação entre o pré-tratamento e o tratamento [F(1,31) = 6,93; P = 0,01]. A análise por teste de *post-hoc* de Newman-Keuls demonstrou um aumento significativo da porcentagem de congelamento dos grupos controle + AM 251 0,3 mg/kg, em relação ao grupo controle + controle e quando comparados com os animais dexametasona 0,3 mg/kg + controle e dexametasona 0,3 mg/kg + AM 251 0,3 mg/kg. Na sessão B<sub>1</sub> a ANOVA também revelou interação entre os fatores pré-tratamento e tratamento [F(1,31) = 27,1; P = 0,00001], sendo que o grupo controle + AM 251 0,3 mg/kg apresentou uma maior duração do comportamento de congelamento em relação ao grupo controle.

No figura 22 B, uma interação entre o pré-tratamento e o tratamento na sessão A<sub>2</sub> foi encontrada pela ANOVA de duas vias [F(1,31) = 25,6; P = 0,00002]. Uma maior porcentagem de congelamento foi observada nos grupos controle + AM 251 0,3 mg/kg e dexametasona 0,3 mg/kg + controle, em relação aos animais controle + controle e ao grupo pré tratado com dexametasona 0,3 mg/kg e posteriormente tratado com AM 251 0,3 mg/kg (dexametasona 0,3 mg/kg + AM 0,3 mg/kg). O mesmo padrão de resposta comportamental é observado no teste B<sub>2</sub> [F(1,31) = 23,7; P = 0,00003].

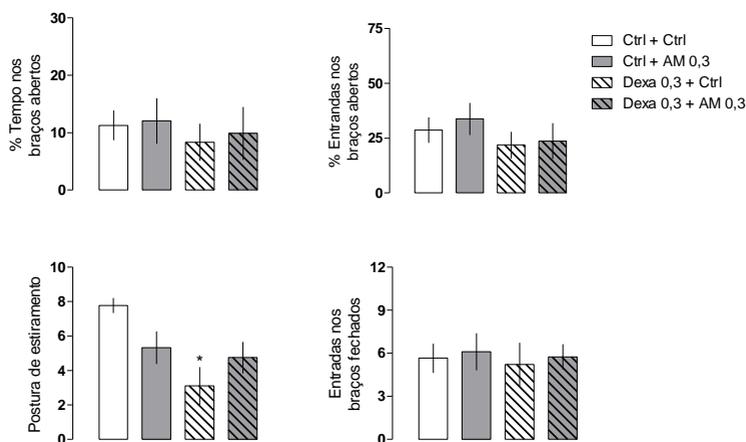


**Figura 21.** Efeitos do pré-tratamento com dexametasona 0,3 mg/kg (Dexa 0,3) sobre o bloqueio farmacológico dos receptores CB1 pelo AM 251 0,3 mg/kg (AM 0,3) na consolidação da memória de medo contextual. Experimentos realizados no período noturno (19-20h). (A) Avaliação da % de congelamento nas sessões A<sub>1</sub> e B<sub>1</sub>. (B) % de congelamento nas sessões A<sub>2</sub> e B<sub>2</sub>. As barras verticais representam a média ± EPM (n = 8-11). Os asteriscos indicam uma diferença significativa (\*P < 0,05) em relação ao grupo controle e o alfa indica diferença para os outros grupos tratados (αP < 0,05). (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de *post-hoc* de Newman-Keuls).

Os resultados observados na etapa 3 revelam que ocorreu potencialização da consolidação da memória condicionada em animais controle + AM 251 0,3 mg/kg, como era esperado, concordando com os dados do experimento 1. Da mesma forma foi observada a generalização da resposta de medo condicionado e a persistência tanto da consolidação quanto da generalização. Entretanto, nos demais grupo tratado não se observou potencialização, nem a generalização da resposta de medo condicionada, mostrando que a administração de dexametasona preveniu mudanças comportamentais do AM 251.

O LCE foi realizado dois dias após o teste B<sub>2</sub> durante a noite (19-20h). Os resultados estão descritos na figura 23. A ANOVA de duas vias revelou interação entre os fatores pré-tratamento e tratamento somente no parâmetro postura de estiramento (PAR - [F(1,31) = 4,3; P = 0,05], sendo que o teste *post-hoc* de Newman-Keuls revelou diferença significativa do grupo dexametasona 0,3 mg/kg + controle quando

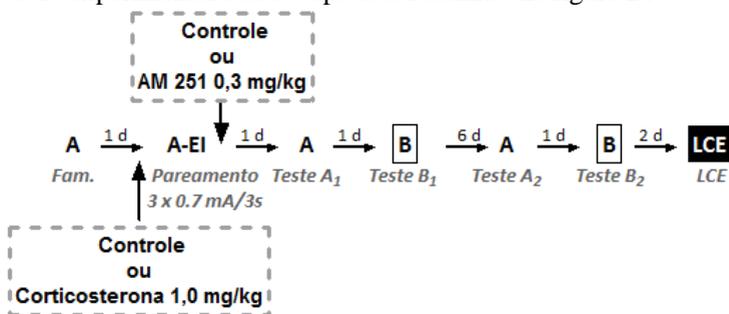
comparado com o grupo controle + controle. Entretanto, esse resultado não indica a ocorrência do processo de sensibilização. Para os outros parâmetros avaliados, a ANOVA não revelou interação entre os fatores pré-tratamento e tratamento para %TA [ $F(1,31) = 0,72$ ;  $P = 0,41$ ]; %EA [ $F(1,31) = 0,08$ ;  $P = 0,8$ ] e EF [ $F(1,31) = 0,14$ ;  $P = 0,71$ ]. Efeito do pré tratamento também não foi observado em nenhum dessas parâmetros comportamentais, %TA [ $F(1,31) = 2,24$ ;  $P = 0,14$ ]; %EA [ $F(1,31) = 3,1$ ;  $P = 0,09$ ] e EF [ $F(1,31) = 0,5$ ;  $P = 0,5$ ]. Assim como, nenhum efeito do tratamento foi revelado pela ANOVA de duas vias: %TA [ $F(1,31) = 2,24$ ;  $P = 0,15$ ]; %EA [ $F(1,31) = 1,3$ ;  $P = 0,32$ ] e EF [ $F(1,31) = 0,6$ ;  $P = 0,45$ ].



**Figura 22.** Efeitos do pré-tratamento com dexametasona 0,3 mg/kg (Dexa 0,3) sobre o bloqueio farmacológico dos receptores CB1 pelo AM 251 0,3 mg/kg (AM 0,3) no processo de sensibilização da memória em animais expostos ao labirinto em cruz elevado (LCE). Experimento realizado durante o período noturno (19-20h). As barras verticais representam a média  $\pm$  EPM ( $n = 8-11$ ). Os asteriscos indicam uma diferença significativa ( $*P < 0,05$ ) entre os grupos tratado com dexametasona 0,3 mg/kg + controle em relação ao grupo controle + controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste de *post-hoc* de Newman-Keuls).

#### 4.4 Experimento 4. Efeitos da corticosterona sobre os efeitos do bloqueio farmacológico dos receptores CB1 na consolidação da memória de medo contextual durante o dia

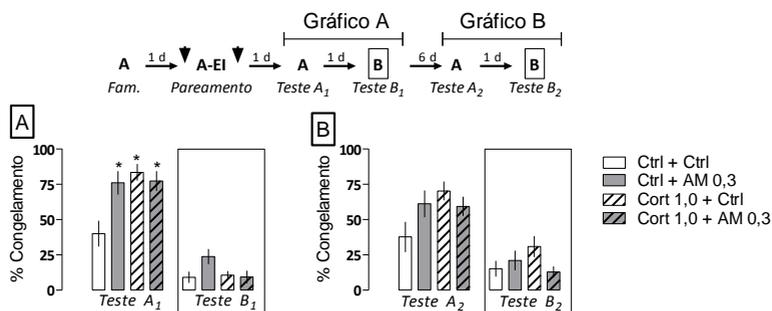
Essa etapa experimental tem como finalidade mimetizar e simular os níveis noturnos de liberação de corticosterona durante o dia através da administração de corticosterona e investigar quais os efeitos dessa manipulação sobre o antagonismo CB1. Dessa forma, nessa etapa as seguintes drogas foram administradas: corticosterona (1,0 mg/kg i.p.), AM 251 (0,3 mg/kg i.p.) e solução controle. Todo o procedimento experimental foi realizado durante o dia, ou seja, entre 7-8h. Os animais foram tratados com solução controle ou corticosterona imediatamente antes da sessão de condicionamento e com solução controle ou AM 251 0,3 mg/kg logo após essa sessão. Os seguintes grupos foram formados controle + controle, controle + AM 251 0,3 mg/kg, corticosterona 1,0 mg/kg + controle e corticosterona 1,0 mg/kg + AM 251 0,3 mg/kg. O protocolo experimental dessa etapa está resumido na figura 24.



**Figura 23.** Representação esquemática dos procedimentos utilizados para a realização da sessão de experimentos 3. Experimentos conduzidos durante o dia (início entre 7-8h). Pré-tratamento, imediatamente, antes da sessão de condicionamento, com solução controle ou corticosterona 1,0 mg/kg e tratamento, imediatamente, após o pareamento com solução controle ou AM 251 0,3 mg/kg.

A figura 25 A mostra que a corticosterona foi incapaz de reforçar a resposta comportamental induzida pelo AM 251. A ANOVA de medidas repetidas revelou que ocorreu uma interação entre pré-tratamento e tratamento [ $F(1,32) = 6,84$ ;  $P = 0,01$ ] durante o Teste A<sub>1</sub>. No teste A<sub>1</sub> houve um aumento significativo da porcentagem de

congelamento dos grupos controle + AM 251 0,3 mg/kg, corticosterona 1,0 mg/kg + controle e corticosterona 1,0 mg/kg + AM 251 0,3 mg/kg em relação ao grupo controle + controle. Na sessão  $B_1$  a ANOVA não revelou efeito do fator pré-tratamento [ $F(1,32) = 2,13$ ;  $P = 0,16$ ], assim como do fator tratamento [ $F(1,32) = 2,25$ ;  $P = 0,14354$ ], e nem uma interação entre os dois fatores [ $F(1,32) = 3,23$ ;  $P = 0,08$ ]. Durante a sessão  $A_2$  não foi observado efeito do fator pré-tratamento [ $F(1,32) = 3,55$ ;  $P = 0,07$ ], nem do fator tratamento [ $F(1,32) = 2,9$ ;  $P = 0,1$ ], e consequentemente não ocorre interação entre os dois fatores [ $F(1,32) = 0,47$ ;  $P = 0,5$ ]; na sessão  $B_2$  não foi encontrado efeito do fator pré-tratamento [ $F(1,32) = 0,4$ ;  $P = 0,55$ ], assim como do fator tratamento [ $F(1,32) = 1,0$ ;  $P = 0,34$ ], e nem uma interação entre os dois fatores [ $F(1,32) = 3,56$ ;  $P = 0,07$ ].

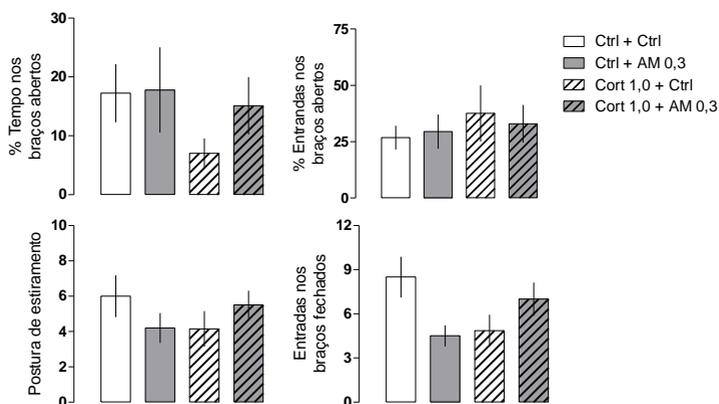


**Figura 24.** Efeitos do pré-tratamento com corticosterona 1,0 mg/kg (Cort 1,0) sobre o bloqueio farmacológico dos receptores CB1 pelo AM 251 0,3 mg/kg (AM 0,3) na consolidação da memória de medo contextual. Experimentos realizados durante o período diurno (7-8h). (A) Avaliação da % de congelamento nas sessões  $A_1$  e  $B_1$ . (B) % de congelamento nas sessões  $A_2$  e  $B_2$ . As barras verticais representam a média  $\pm$  EPM ( $n = 8-11$ ). Os asteriscos indicam uma diferença significativa ( $*P < 0,05$ ) em relação ao grupo controle. (ANOVA de uma com medidas repetidas seguida pelo teste de *post-hoc* de Newman-Keuls).

Os resultados observados na etapa 4 demonstram que ocorreu potencialização da consolidação da memória condicionada de medo nos grupos tratados, mas não foi possível observar a persistência dessa potencialização e nem a generalização da resposta de medo condicionada, mostrando que a administração de corticosterona,

juntamente com AM 251, não foi capaz de causar as mudanças comportamentais esperadas, ou seja, mesmo a corticosterona apresentando efeito *per se*, ela não foi capaz de mimetizar os efeitos do AM 251 durante o período noturno.

O LCE foi realizado dois dias após o teste B<sub>2</sub> durante o dia (7-8h). Durante a realização dessa etapa 4 animais foram excluídos por caírem do aparato experimental repetida vezes, sendo esse um fator de exclusão do animal. A figura 26 mostra que os parâmetros comportamentais não foram alterados pelos tratamentos descritos acima. Dessa forma, a ANOVA de duas revela uma interação entre o pré-tratamento e o tratamento somente no parâmetro EF [F(1,29) = 7,1; P = 0,013], sendo que o teste *post-hoc* de Newman-Keuls não revelou diferenças significativas. Para os outros parâmetros a interação entre esses dois fatores não ocorreu %TA [F(1,29) = 0,41; P = 0,53]; %EA [F(1,29) = 0,2; P = 0,7] e PAR [F(1,29) = 2,3; P = 0,12]. Também não foram observados efeitos do pré-tratamento %TA [F(1,29) = 1,2; P = 0,53]; %EA [F(1,29) = 0,7; P = 0,41] e PAR [F(1,29) = 0,7; P = 0,8], assim como do tratamento %TA [F(1,29) = 0,5; P = 0,5]; %EA [F(1,29) = 0,02; P = 0,9] e PAR [F(1,29) = 0,05; P = 0,84]. Isso indica que o processo de sensibilização da memória não foi observado nessa etapa.



**Figura 25.** Efeitos do pré-tratamento com corticosterona 1,0 mg/kg (Cort 1,0) sobre o bloqueio farmacológico dos receptores CB1 pelo AM 251 0,3 mg/kg (AM 0,3) no processo de sensibilização da memória em animais expostos ao labirinto em cruz elevado (LCE). Experimento realizado durante o período diurno (7-8h). As barras verticais representam a média  $\pm$  EPM ( $n = 8-11$ ). (ANOVA de uma com medidas repetidas seguida pelo teste de *post-hoc* de Newman-Keuls).

## 5 Discussão

O presente trabalho teve como principais objetivos avaliar a influência do antagonismo dos receptores canabinoides do subtipo 1 (CB1) na consolidação da memória de medo contextual, em diferentes períodos do ritmo circadiano. Assim como a possível modulação da resposta desse bloqueio pelo sistema glicocorticoide, já que a dinâmica fisiológica dos glicocorticoides e do ritmo circadiano faz pensar numa possível ligação entre os dois sistemas, endocanabinoide e glicocorticoide. Para testar estas hipóteses, usou-se o modelo comportamental do condicionamento de medo contextual, assim como análises bioquímicas da dosagem de corticosterona plasmática.

Como já foi revisado na parte introdutória dessa dissertação, esses três fatores (ritmo circadiano, glicocorticoides e endocanabinoides) podem prejudicar ou auxiliar a consolidação da memória de medo contextual, por esse motivo qualquer alteração em um desses fatores pode levar a mudanças comportamentais e fisiológicas no organismo. Assim, iniciou-se avaliando a papel do sistema endocanabinoide na consolidação da memória de medo aversiva, em diferentes períodos do ritmo circadiano. Primeiramente, baseado na revisão de Riebe e colaboradores (2012), onde se discute o papel do sistema eCB sobre os processos mnemônicos, entre eles a consolidação de uma memória de medo condicionado. Nessa revisão eles revelam que a liberação de endocanabinoides após uma situação de estresse seria importante para atenuar as respostas aversivas, ou de medo. Esse processo acaba auxiliando na expressão das respostas de medo altamente adaptativas (ex. congelamento, luta, fuga) que garantem a sobrevivência do organismo frente uma situação perigosa. Nessa revisão também foi abordado que o bloqueio dos receptores CB1 levaria a um aumento da resposta de medo, sendo esse efeito benéfico quando se observa uma melhora na consolidação de um evento aversivo, ou maléfico quando a falta de resposta dos eCB desencadeia transtornos de ansiedade, TEPT, fobias, entre outros.

Assim, iniciou-se o trabalho realizando o experimento 1, onde os animais são tratados com diferentes doses de AM 251 (i.p), um antagonista dos receptores canabinoides, em dois períodos do ritmo circadiano: dia (7-8h) ou noite (19-20h), e são avaliados em um modelo muito utilizado em nosso laboratório, o condicionamento contextual de medo (STERN *et al.*, 2012; GAZARINI *et al.*, 2013).

Os principais resultados obtidos no experimento 1 revelam que o bloqueio dos receptores CB1, por meio da administração de AM 251

imediatamente após a sessão de condicionamento, foi capaz de causar a potencialização da memória de medo contextual em ambos os períodos do ciclo claro-escuro, entretanto somente durante a noite essa resposta foi mantida, ou seja, ocorreu a persistência da memória condicionada. Durante a noite também foi observada a manifestação do processo de generalização, pois os animais tratados com AM 251, apresentam um aumento da porcentagem de congelamento frente a um contexto neutro (contexto B), essa resposta foi mantida após um intervalo de tempo de 7 dias, revelando também a persistência do processo de generalização. Por fim, com base nos resultados obtidos no LCE, pode-se concluir que o bloqueio dos receptores CB1 após o condicionamento de medo contextual, não foi capaz de causar sensibilização da esQUIVA aos braços abertos do LCE em nenhum período do ritmo circadiano.

Como era de se esperar a administração do antagonista CB1 foi capaz de gerar uma potencialização da resposta de medo contextual durante o dia e durante a noite, levando a uma melhor consolidação da memória aversiva. Os resultados concordam com dados da literatura (ARENOS *et al.*, 2006), indicando que o bloqueio dos receptores canabinoides, pelo AM 251, provocou uma melhor consolidação de uma memória contextual, entretanto, prejudicou a consolidação da memória de medo olfatória. Outros grupos revelam que o bloqueio do receptor CB1 é capaz de promover uma melhor consolidação da memória espacial (WOLFF e LEANDER, 2003), o bloqueio desses receptores é capaz de gerar uma memória espacial prolongada no teste do labirinto radial (WISE *et al.*, 2008). A administração de antagonistas dos receptores CB1 também foi capaz de promover uma melhora da aquisição e consolidação quando injetados diretamente no hipocampo (ROBINSON *et al.*, 2008). Em um elegante estudo, Takahashi e colaboradores (2005) relatam que o bloqueio dos receptores CB1 foi capaz de melhorar a aquisição e a consolidação de uma memória aversiva em animais expostos o labirinto em T elevado. Já De Oliveira Alvares e colaboradores (2010) reportam que o sistema eCB hipocampal é recrutado para melhorar a consolidação da memória contextual de medo somente em condições de aversividade elevada, obtida através da aplicação de choque de 0,7 mA, mas não com choques de 0,3 mA, apoiando os dados, pois também aplicou-se um choque de alta aversividade (0,7 mA). Mesmo fato foi encontrado em experimentos realizados com camundongos nocautes para o receptor CB1, ou seja, foi requerido um choque nas patas de alta intensidade para gerar uma melhor consolidação da memória de medo condicionada, que também foi capaz de gerar generalização dessa memória (JACOB *et al.*, 2012).

Assim, confirmou-se que os resultados estão de acordo com os dados encontrados na literatura, sendo o bloqueio do receptor CB1 um dos responsáveis pelos processos de potencialização, generalização e persistência de uma memória de medo contextual.

Todavia, os antagonistas dos receptores de canabinoides também são capazes de produzir efeitos prejudiciais sobre a consolidação da memória semelhantes às induzidas pelo agonismo dos receptores canabinoides do tipo 1 (YIM *et al.*, 2008; ZARRINDAST *et al.*, 2011). Essa afirmação é observada, por exemplo, nos ensaios realizados por De Oliveira e colaboradores (2005 e 2006) onde é proposto que o AM 251 quando injetado diretamente na região hipocampal, uma importante região do sistema nervoso central ligado aos processos de aprendizado e memória, foi capaz de prejudicar a consolidação da memória aversiva em animais expostos à esquiwa passiva (*step down*) e também inibir o processo de potencialização de longo prazo. Diferenças nos procedimentos experimentais, das respostas comportamentais esperadas, droga e/ou doses administradas e o local de administração dessas drogas, sistemicamente ou diretamente numa região específica do SNC, podem explicar a diversidade dos resultados relatados (AKIRAV, 2013; MORENA e CAMPOLONGO, 2013). Além disso, o sistema endocanabinoide também pode afetar outros sistemas de neurotransmissão, incluindo o noradrenérgico, colinérgico, GABAérgico, glutamatérgico, dopaminérgico, entre outros, em estrutura límbicas ligadas a consolidação da memória (McGAUGH, 2000). Por exemplo, uma alta densidade de receptores CB1 é encontrada nas sinapses GABAérgicas do hipocampo, enquanto um nível menor desses receptores está presente em sinapses glutamatérgicas (KATONA *et al.*, 2000; KAWAMURA *et al.*, 2006). Assim, a influência dos canabinoides sobre o comportamento pode diferenciar dependendo da sinapse ativada e da circuitaria neuronal recrutada para determinada situação (MORENA e CAMPOLONGO, 2013).

Existem relatos na literatura demonstrando o papel do sistema endocanabinoide na modulação das diferentes fases da memória (REICH *et al.*, 2008, AKIRAV, 2013; MORENA e CAMPOLONGO, 2013): sobre a aquisição (MARSICANO *et al.*, 2002; CANNICH *et al.*, 2004), sobre a consolidação como já foi explicado acima (BUCHERELLI *et al.*, 2006; MORENA e CAMPOLONGO, 2013), na reconsolidação (BUCHERELLI *et al.*, 2006, STERN *et al.*, 2012) e no processo de extinção (MARSICANO *et al.*, 2002; DE BITENCOURT *et al.*, 2013). Quando o assunto é extinção da memória, está bem consolidado que o sistema endocanabinoide é crucial durante esse

processo (MARSICANO *et al.*, 2002; PAMPLONA *et al.*, 2008; MARSICANO e LAFENÊTRE, 2009), revelando que o bloqueio dos receptores CB1, seja por deleção gênica (animais nocautes) ou pelo antagonismo farmacológico, é capaz de prejudicar a extinção de uma memória (CHHATWAL *et al.*, 2005; KAMPRATH *et al.*, 2006), sem interferir no aprendizado associativo dessa tarefa (MARSICANO *et al.*, 2002; MARSICANO e LUTZ, 2006). O papel do sistema endocanabinoide sobre cada uma dessas etapas de memória pode gerar respostas diferentes, sendo que o antagonismo dos receptores CB1 capaz de melhorar ou prejudicar cada um desses processos mnemônicos, e essa discrepância pode ser explicada pelo local de administração da droga (periféricos ou em uma estrutura específica do SNC), pela afinidade da droga utilizada pelo receptor CB1, sem atuar nos receptores TRPV1 e CB2, e, por fim, pelas diferenças no procedimento experimental (MARSICANO e LAFENÊTRE, 2009).

O processo de consolidação é bem definido, como um processo de transformação da memória, tornando-a mais forte e resiliente (menos sensível) até a memória ficar praticamente insensível a interferentes. Os principais interferentes no processo de consolidação da memória incluem trauma cerebral, choque eletroconvulsivo, fármacos que interferem com alguma fase do processo, um novo aprendizado dentro da janela de consolidação, entre outros (McGAUGH, 2003; ROOZENDAAL e McGAUGH, 2011). Vários estudos avaliam a anatomia da consolidação, ou seja, causam inativação ou lesão de determinadas áreas do SNC, a fim de avaliar como determinada região do cérebro pode vir a participar do processo de consolidação da memória. Atualmente, sabe-se que a consolidação dos diferentes tipos de memória, dependendo da sua valência emocional (ex. memória espacial, ameaça predatória, memória de medo), pode ativar diferentes áreas do SNC (AMBROGI LORENZINI *et al.*, 1999; POLDRACK e PACKARD, 2003). Isso pode explicar a possível diferença entre os experimentos que não focaram em nenhuma região cerebral específica, e outros trabalhos, que focaram na administração do antagonista de receptores CB1 em regiões importantes para a consolidação de uma memória, por exemplo, hipocampo, amígdala, córtex pré-frontal, entre outras.

Entretanto, poucos trabalhos avaliam o efeito do ciclo circadiano sobre o sistema. Esses estudos revelam a existência de uma variação circadiana do sistema endocanabinoide, já que em diferentes fases do ritmo circadiano existe uma diferença de liberação de endocanabinoides (2-AG e anandamida), da ação das enzimas de biossíntese e

metabolização desses neurotransmissores e na densidade de receptores (VALENTI *et al.*, 2004; VAUGHN *et al.*, 2010). Um dos fatores que pode ajudar na confirmação da interação entre o sistema eCB e o ritmo circadiano, é o fato que em indivíduos privados de sono observa-se uma quebra ou falha na variação diurna de eCB, principalmente da anandamida. Nesses estudos, sugere-se em humanos um aumento da concentração plasmática de eCB durante o sono, alcançando um pico aproximadamente às 8h, ou seja, no momento em que o organismo se torna mais ativo (KOETHE *et al.*, 2006; HILL *et al.*, 2008). O padrão inverso é esperado para animais de hábitos noturnos, como ratos, ou seja, um pico de concentração dos eCB aproximadamente às 20h, juntamente com o pico de glicocorticóides (LIGHTMAN *et al.*, 2010).

O ritmo circadiano pode ser regulado ou regular a liberação de neurotransmissores e hormônios, auxiliando dessa forma na manutenção de várias funções fisiológicas vitais para o organismo, entre elas os processos de aprendizado e memória (AKIRAV, 2013). A liberação de eCB sofre uma variação circadiana, regulada pelo ritmo, entretanto os eCB também podem participar da regulação do ritmo circadiano, visto a grande presença de receptores CB1 no NSQ, e influenciar a liberação de hormônios relacionados a manutenção da variação circadiana, principalmente a corticosterona (eixo HPA) e a melatonina (glândula pineal). Nossos resultados sugerem a existência da interação comportamental entre o ritmo circadiano e o sistema endocanabinóide na modulação do processo de consolidação de uma memória de medo contextual em ratos. Podemos sugerir essa interação, pelos resultados obtidos no experimento 1, revelando que o bloqueio dos receptores CB1 foi capaz de gerar uma potencialização da consolidação da memória de medo contextual. A potencialização da resposta de medo após uma situação de estresse é amplamente relatada na literatura. Vários estudos demonstram que a exposição do animal a um evento aversivo leva ao aumento da liberação de corticosterona, podendo causar a potencialização da resposta de medo. No nosso caso ocorreu uma potencialização da memória de medo contextual em animais que são expostos ao evento aversivo e logo após recebem a AM 251, em ambos os períodos do ritmo circadiano (dia e noite) (KORTE, 2001). Entretanto, somente o tratamento noturno com AM 251 é capaz de induzir o processo de generalização da resposta de medo condicionada, que consiste no fato de apresentar respostas comportamentais de medo frente a um contexto neutro, ou seja, um contexto no qual o animal não foi exposto a nenhum evento aversivo (DUDAI, 2002). A generalização é produto da potencialização da memória de medo a níveis maiores que

os adaptativos, levando à formação de uma memória inapropriada com uma falha na restrição do comportamento ao contexto pareado (GAZARINI *et al.*, 2013). O bloqueio farmacológico dos receptores CB1 durante a noite também causou a persistência da memória de medo contextual, assim como generalização, fato que não ocorre quando esse tratamento é realizado durante o dia.

Resumindo, os resultados encontrados no experimento 1, mostram que somente durante o período noturno o antagonismo dos receptores CB1 é capaz de gerar uma resposta de medo potencializada, generalizada e persistente, fato que pode ser explicado, pelo menos em parte, pela revisão de Riebe e colaboradores (2012). Nela, afirma-se que numa situação de estresse ocorre uma maior liberação de eCB, principalmente 2-AG, levando a um alívio ou diminuição da resposta de medo. Uma vez que, os eCB são responsáveis por gerar várias respostas fisiológicas que ocasionam na diminuição da resposta de medo, entre elas uma diminuição da ação dos glicocorticoides, como já foi explicado na introdução (SANFORD *et al.*, 2008; RIEBE *et al.*, 2012).

Diante dos fatores descritos acima, pode-se observar similaridades entre as respostas fisiológicas e/ou psicofisiológicas mediadas pelos sistemas endocanabinoide e glicocorticoide. Porém, a interação entre os dois sistemas ainda é um campo de estudo muito promissor. Alguns estudos revelam a existência de uma interação funcional entre os dois sistemas (DI *et al.*, 2003; HILL *et al.*, 2005), indicando que o sistema endocanabinoide pode regular ou ser regulado pelo sistema glicocorticoides. Hill e colaboradores (2005) revelam que um aumento nos níveis de glicocorticoides levou a um aumento de liberação de endocanabinoides, dado também comprovado por Patel e colaboradores (2005). Os resultados deles confirmam que após uma situação de estresse foi observado um aumento da liberação do endocanabinoide, 2-AG, em algumas regiões cerebrais (ex. amígdala, hipocampo, córtex pré-frontal, entre outras). Outros afirmam que após a administração de glicocorticoide exógeno (ex. corticosterona) é observado um aumento da liberação de eCB, principalmente anandamida (HILL *et al.*, 2005). Vários outros estudos experimentais observam essa interação bidirecional dos dois sistemas (PATEL *et al.*, 2004; RADEMACHER e HILLARD, 2007; AKIRAV 2013). Tanto em uma situação fisiológica normal quanto em uma situação aversiva, o aumento nos níveis de glicocorticoides leva a um aumento da síntese e liberação de endocanabinoides. Estes, por sua vez, participam da modulação de outros sistemas de neurotransmissão, como por exemplo os neurotransmissores GABA e glutamato, mas também são capazes de

agir sobre a alça de retroalimentação do eixo HPA e inibir a liberação de corticosterona pelo córtex das glândulas adrenais, através do que chamamos de *feedback* rápido (PATEL *et al.*, 2004). Dessa forma, a sinalização eCB através do receptor CB1 parece ser essencial para a regulação do eixo HPA (PATEL *et al.*, 2004; GINSBERG *et al.*, 2010; HILL e MCEWEN, 2010), sendo capaz de causar um alívio ou uma diminuição da resposta de medo após ou frente a um estímulo estressante (RIEBE *et al.*, 2012). Em contraponto, o bloqueio farmacológico, por exemplo, realizado pelo antagonista AM 251, ou genético dos receptores canabinoides, pode ser capaz de aumentar a atividade do eixo HPA. Como consequência ele prolonga o tempo de resposta desse eixo ao estresse (PATEL *et al.*, 2004; COTA *et al.*, 2007; EVANSON *et al.*, 2010; HILL *et al.*, 2010), pois não temos o *feedback* negativo necessário para interromper a ação da corticosterona, nem do eixo HPA (COTA *et al.*, 2007; STEINER e WOJTAK, 2008). Isso pode gerar alterações comportamentais, auxiliando ou prejudicando a consolidação da memória.

A interação entre os sistemas endocanabinoide e glicocorticoides é observada em vários processos fisiológicos, incluindo os processos de aprendizado e memória que é o alvo principal deste estudo. Ambos os sistemas estão densamente presentes dentro da circuitaria cerebral que envolve o aprendizado aversivo e emocional (HERKENHAM *et al.*, 1990; KATONA *et al.*, 2001), ou seja, áreas do sistema nervoso central que controlam ou que possuem um papel relevante na modulação de processos mnemônicos e comportamentais (ex. ansiedade, medo, TEPT), como amígdala, hipocampo e córtex cerebral. Essa afirmação fica ainda mais evidente quando se observa a propriedade da *Cannabis sativa* em diminuir a resposta de estresse, ansiedade e medo, tanto comportamentalmente quanto bioquimicamente pela diminuição dos níveis de glicocorticoides na circulação (HILL *et al.*, 2010, RIEBE *et al.*, 2012). Também se observou similaridade das alterações comportamentais entre os dois sistemas, pois tanto o sistema endocanabinoide quanto o sistema glicocorticoide apresentam uma papel importante na modulação de vários processos comportamentais e psicopatológicos. Como por exemplo, ansiedade, depressão, transtorno de estresse pós-traumático (TEPT), esquizofrenia, processos cognitivos (consolidação), entre outros (MILLAN *et al.*, 2003; AKIRAV, 2013). Entretanto, nenhum desses trabalhos demonstrou a participação do ritmo circadiano na interação desses dois sistemas sobre o processo de consolidação da memória aversiva.

Uma possível explicação para os resultados encontrados no experimento 1 seria a interação entre os sistemas endocanabinoide e glicocorticoide, e que essa ligação pode se manifestar de maneira distinta de dia ou de noite. Nos animais de hábito noturno, como os ratos Wistar, é possível observar um pico de liberação de corticosterona aproximadamente entre 19-20h e uma depressão de liberação por volta das 7-8h. Estes dados comprovados das dosagens sanguíneas de corticosterona e observadas no experimento 2, ao contrário de humanos e animais de hábito diurno (PANDA *et al.*, 2002; VAN DER ZEE *et al.*, 2009). Como o bloqueio dos receptores canabinoides bloqueia também a alça de retroalimentação do eixo HPA, levando a uma inibição da supressão desse eixo, essa interferência farmacológica pode ocasionar um aumento do pico de corticosterona plasmática, ou um aumento do tempo de ação desses hormônios, ou ambos os processos, podendo explicar os efeitos do AM 251 observados nessa etapa experimental, ou seja, uma resposta de medo condicionada potencializada, generalizada e persistente. Resultados semelhantes foram encontrados por Kamprath e colaboradores (2006). Nesse estudo, camundongos nocautes para receptores CB1 são incapazes de suprimir a resposta de medo condicionada, gerando uma resposta de medo potencializada e persistente ao longo do tempo, ocasionada possivelmente pela falta do *feedback* negativo regulado pelo sistema eCB. Entretanto, a maioria dos trabalhos que concordam e/ou discordam com estes dados realizaram os testes comportamentais em ratos e/ou camundongos, animais de hábitos noturnos, durante a manhã ou tarde. Ou seja, no período quiescente do ritmo circadiano, fase que ocorre uma menor liberação de corticosterona plasmática. Este pode ser um dos motivos que resultaram em respostas comportamentais diferentes das desta pesquisa e do contexto natural, onde esses animais passariam por uma situação de estresse, mais provavelmente durante o período noturno (YOUNG *et al.*, 2004).

Baseado em tudo que foi discutido e com o objetivo de tentar comprovar que existe uma diferença de concentração plasmática de glicocorticoides em diferentes fases do ritmo circadiano (LISTON *et al.*, 2013), assim como, uma ligação entre os sistemas endocanabinoide e glicocorticoide (DI *et al.*, 2003) os próximos experimentos foram propostos.

No experimento 2, foram realizadas as dosagens sanguíneas de corticosterona plasmática e avaliou-se se existe uma diferença basal de liberação de corticosterona entre diferentes períodos do ritmo circadiano (dia ou noite), e se ocorre um aumento dessa liberação após o condicionamento de medo contextual. Os resultados dessa segunda

etapa corroboram com dados da literatura, pois demonstram que existe uma diferença na concentração plasmática de corticosterona durante o dia e a noite, sendo que se encontrou uma maior concentração de glicocorticoides durante a noite, ou seja, durante o período ativo dos animais, resultado totalmente esperado e muito bem estabelecido na literatura (DE KLOET *et al.*, 1998; YOUNG *et al.*, 2004; LIGHTMAN *et al.*, 2008; LIGHTMANN e CONWAY-CAMPBELL, 2010; MORENA e CAMPOLONGO, 2013; LISTON *et al.*, 2013; TSANG *et al.*, 2013).

Essa primeira etapa da dosagem de corticosterona plasmática foi crucial para os experimentos posteriores, pois a comprovação dos dados da literatura e confirmação que temos uma diferença basal de liberação de corticosterona em diferentes períodos do dia possibilitou a realização das outras dosagens de corticosterona. A segunda etapa de análise da dosagem de glicocorticoides foi embasada na dinâmica de ação desse hormônio após uma experiência aversiva, ou seja, os glicocorticoides sofrem uma variação circadiana, como sugerida na etapa anterior, mas também é observado um aumento nos níveis plasmáticos desses hormônios após uma situação de estresse (RIEBE *et al.*, 2012), como é o caso do condicionamento de medo contextual. Algumas perguntas foram elaboradas nessa etapa: Neste protocolo de condicionamento seria capaz de precipitar um aumento nos níveis plasmáticos de corticosterona? O condicionamento de medo seria capaz de manter as diferenças de concentração plasmática de glicocorticoide entre o período diurno e noturno? A resposta encontrada pode ser observada na figura 20, onde os resultados revelam que após uma situação de estresse (3 choques de 0,7 mA/3s) ocorreu um aumento da liberação de corticosterona quando comparado com os níveis de liberação basal. Entretanto, esse aumento ocorre somente quando o condicionamento foi realizado durante o período diurno. Esse resultado concorda com vários grupos de pesquisa (TASKER, 2006; JÖELS *et al.*, 2011; SOUZA, 2011; CAVALLI, 2013; LISTON *et al.*, 2013), revelando que neste protocolo de condicionamento foi capaz, pelo menos em parte, de gerar uma maior liberação de hormônios do estresse. Entretanto, obteve-se um resultado inesperado durante a noite, nesse período não foi observado um aumento da concentração plasmática de corticosterona em relação aos animais que não foram condicionados. Esse resultado pode ser explicado, em parte, pelo trabalho de Lightman e colaboradores (2008), onde foi revelado que animais que se encontram em uma fase de aumento dos níveis endógenos de corticosterona, antes de passar pela situação de estresse, respondem a esse evento com uma liberação adicional de

corticosterona, alcançando picos dentro de 30-40 min após a experiência aversiva. Já animais onde os níveis basais de corticosterona estão decaindo, uma situação de estresse é capaz de aumentar um pouco ou não causar nenhuma resposta nos níveis de corticosterona plasmática (LIGHTMAN *et al.*, 2008). Dessa forma, pode-se ter sim um modelo experimental capaz de gerar um aumento nos níveis de corticosterona plasmática durante a noite. Entretanto, como argumentado acima, os animais poderiam estar em uma fase de decaimento dos níveis plasmáticos de corticosterona, fato conhecido como ritmo ultradiano. Este é um processo fisiológico que afirma que mesmo na fase de pico de liberação da corticosterona é possível observar variações nos níveis de glicocorticoides, ou seja, hora ocorre um pico, hora uma depressão ou uma queda transitória dos níveis de glicocorticoides (LIGHTMAN *et al.*, 2008).

Resumindo os resultados do experimento 2, foi possível confirmar que existe uma variação circadiana de liberação de glicocorticoides e a influência do condicionamento sobre a liberação de corticosterona. Entretanto, uma situação aversiva não foi capaz de manter as diferenças de concentração plasmática de glicocorticoides entre o período diurno e noturno. Todavia, ainda são necessárias as realizações de outras dosagens de corticosterona plasmática para responder as dúvidas deixadas pelos resultados do experimento 1. Nesse caso, ter-se-ia que quantificar os níveis desse hormônio, após o condicionamento de medo contextual seguido do bloqueio dos receptores CB1 (pelo AM 251). Essas dosagens poderiam explicar porque os animais tratados com AM 251 são capazes de potencializar, generalizar e manter essas duas respostas (persistência) diferente dos grupos que não receberam AM 251 e dos animais que passaram pelo mesmo protocolo experimental, mas durante o dia, onde se tem somente uma potencialização na consolidação da memória de medo contextual.

Como explicado anteriormente alguns estudos mostram que os glicocorticoides são capazes de estimular a liberação de endocanabinóides pela pós-sinapse, a fim de ativar uma alça de retroalimentação negativa (*feedback* negativo) não genômica, com objetivo final de causar uma supressão na liberação de glicocorticoides pelo eixo HPA, funcionando como um freio do sistema. Dessa forma, o bloqueio os receptores canabinoides pelo antagonista AM 251, pode inibir ou dificultar a funcionalidade dessa via de retroalimentação, alterando a concentração plasmática de corticosterona, ou seja, aumentando e/ou mantendo os níveis de corticosterona elevados por um maior período de tempo.

Seguindo essa linha de pensamento, os dados podem ser explicados por de Kloet e colaboradores (1999). Eles afirmam que os receptores GR estão mais envolvidos com o processo de consolidação, enquanto os MR são responsáveis pela interpretação do estímulo ambiental e seleção da resposta comportamental (BOHUS e DE KLOET, 1981; PUGH *et al.*, 1997). Dessa forma, em situações onde é possível observar uma maior liberação de glicocorticoides pode-se ter uma melhor consolidação da memória, como possivelmente é o caso do deste experimento, sendo o aumento no nosso protocolo causado por três fatores: condicionamento, período do dia e antagonismo CB1, de forma isolada ou agregada. Entretanto, as respostas de generalização e persistência obtidos como o bloqueio CB1 no período noturno, podem indicar uma ativação excessiva dos receptores GR, causada possivelmente pelas altas concentrações plasmáticas de corticosterona, que podem levar à transtornos de pânico e estresse pós-traumático, que são caracterizados pelo processo de generalização e persistência da memória do evento aversivo (DE KLOET *et al.*, 1999; MILAD *et al.*, 2009; AKIRAV, 2013). Dessa forma, seria interessante avaliar qual a ligação entre os sistemas endocanabinoide e glicocorticoide na modulação dos processos de consolidação de uma memória de medo. Para isso foram realizadas mais duas etapas comportamentais.

Assim, a próxima etapa (experimento 3) comportamental teve como objetivo avaliar uma possível ligação entre os dois sistemas, simulando uma condição diurna dos níveis de corticosterona, em testes realizados durante o período noturno, com a administração de dexametasona (0,3 mg/kg i.p.) (ROOZENDAAL, 1999; CAVALLI, 2013). A dexametasona é um potente agonista do GR, capaz de suprimir a ativação do eixo HPA induzida pelo estresse, diminuindo a liberação de corticosterona (DE KLOET *et al.*, 1999). A supressão do eixo HPA ocorre primeiramente pela ligação da dexametasona aos receptores GR da glândula pituitária. Isso causa um decréscimo na ativação desses receptores da pituitária em resposta a uma situação de estresse agudo, levando a inibição da liberação de corticosterona. A supressão ocorre no nível da glândula pituitária sendo comprovada pela capacidade da dexametasona inibir os efeitos do hormônio liberador de corticotrofina (HLC), mas não possui efeito sobre o HACT, descartando uma ação sobre as glândulas adrenais (COLE *et al.*, 2000). No experimento 4, outros grupos de animais foram submetidos ao processo inverso, com objetivo de simular níveis noturnos de corticosterona durante o dia. Para isso, animais receberam reforço exógeno de corticosterona, na dose de 1,0 mg/kg i.p. (GAZARINI *et al.*, dados não publicados).

Vários trabalhos revelam que a administração de doses moderadas de corticosterona e dexametasona são capazes, de melhorar a consolidação quando administradas imediatamente após o treino (FLOOD *et al.*, 1978; ROOZENDAAL e McGAUGH, 1996; ROOZENDAAL *et al.*, 1999). As principais questões nesse momento são: seriam essas drogas (dexametasona e corticosterona) capazes de alterar a consolidação da memória de medo quando administrada antes do treino? Qual a interação dessas drogas com o bloqueio farmacológico dos receptores CB1 pelo AM 251? Os resultados obtidos podem confirmar uma ligação entre os sistemas glicocorticoide e endocanabinoide?

Os resultados comportamentais confirmam, em parte, que existe uma possível ligação entre os sistemas endocanabinoídeos e glicocorticoídeos, e que essa “interação” pode ser a responsável pelos efeitos do bloqueio farmacológico dos receptores CB1 durante diferentes fases do ritmo circadiano (dia ou noite). Entretanto, é necessária a confirmação bioquímica dos resultados comportamentais, procedimentos que serão realizados posteriormente.

Os resultados do experimento 3 sugerem uma possível ligação entre os sistemas glicocorticoide e endocanabinoide. Fato comprovado pelos dados observados na figura 21 A, onde os animais tratados com dexametasona (0,3 mg/kg); 60 min antes do condicionamento realizado no período noturno, não apresentam *per se* nem melhora, nem prejuízo da resposta condicionada, apresentando porcentagem de congelamento semelhante ao controle, comprovando o uso de uma dose sub-efetiva (MILLER *et al.*, 1992; ROOZENDAAL, 1999), que é incapaz de causar a supressão total do eixo HPA (COLE *et al.*, 2000; KORTE, 2001; CAVALLI, 2013). Entretanto, animais pré-tratados com solução controle, e que após 60 min passaram pelo condicionamento contextual e imediatamente depois receberam AM 251 0,3 mg/kg, apresentam uma potencialização da memória de medo, assim como uma generalização, fato que concorda com o experimento 1 e com alguns trabalhos citados acima. A ligação entre os dois sistemas pode ser observada no grupo dexametasona 0,3 mg/kg + AM 251 0,3 mg/kg, como descrito anteriormente, os animais desse grupo recebem uma dose sub-efetiva de dexametasona 1h antes do condicionamento e imediatamente após essa sessão é administrado o antagonista dos receptores CB1. Os resultados encontrados revelam que foi possível mimetizar os efeitos diurnos do AM 251, no período noturno, através da administração de dexametasona. Sugerindo assim uma interação entre os sistemas glicocorticoide e endocanabinoide, uma vez que, o co-tratamento na

sessão  $A_1$  foi capaz de bloquear a potencialização da resposta de medo, e também foi capaz de impedir a generalização da memória de medo contextual (teste  $B_1$ ), e por consequência a persistência dessas duas respostas (teste  $A_2$  e  $B_2$  – Figura 21 B). A interação entre dexametasona e AM 251 pode ser encontrada em alguns trabalhos, como por exemplo, um estudo realizado em 2010 por Evanson e colaboradores, onde eles realizaram somente análises bioquímicas dos níveis de corticosterona. Nesse artigo, animais tratados com dexametasona apresentam uma diminuição dos níveis de HACT e corticosterona em resposta ao estresse por contenção. Isso ocorre pela supressão do eixo HPA, causada segundo Evanson e colaboradores (2010) pelo *feedback* rápido através da sinalização eCB. Para confirmar esse padrão de resposta foi realizada a administração de AM 251 após o estresse por retenção, e foi observado que essa droga não leva a alterações por si só nos níveis de corticosterona. Entretanto, o AM 251, nesse trabalho, foi capaz de reverter os efeitos da dexametasona sobre a concentração plasmática de corticosterona, já que a supressão do eixo foi inibida (EVANSON *et al.*, 2010). Todavia, ainda não se tem dados bioquímicos para poder confirmar essa interação.

Os dados encontrados na etapa 3, revelam que uma dose baixa de dexametasona não é capaz de gerar nenhum efeito sobre a consolidação da memória. Resultado diferente ao encontrado no trabalho de Carrol e colaboradores (1981), no qual foi descrito o “teste de supressão do eixo HPA por dexametasona”. Nele doses altas dessa droga são capazes de causar uma potente retroalimentação negativa sobre a liberação de glicocorticoides, levando a uma redução significativa nos níveis plasmáticos desses hormônios, prejudicando a consolidação da memória. É possível observar também uma melhora no processo de consolidação causado pela dexametasona, como exemplificado por Roozendaal (1999). Ele relata que a administração de dexametasona após o condicionamento de medo, foi capaz de gerar uma melhor consolidação da memória, devido à supressão dos níveis de corticosterona na circulação, ou seja, auxiliando na manutenção de concentrações ótimas desse hormônio. Já no trabalho realizado por Cole e colaboradores (2000), onde se avaliou a supressão do eixo HPA pela dexametasona após uma situação de estresse agudo, baixas doses de dexametasona foram incapazes de reduzir a resposta ao estresse. Além disso, doses elevadas foram capazes de diminuir a resposta ao estresse a níveis próximos ao basal, indicando que somente doses altas são capazes de causar uma supressão do eixo HPA. Resumindo até o momento, tanto

uma situação aversiva elevada, quanto doses altas de dexametasona são capazes de causar uma supressão do eixo.

Segundo de Bitencourt e colaboradores (2013), a administração de dexametasona (em dose elevadas) pode levar a uma maior liberação de eCB, sendo esses neurotransmissores responsáveis pela facilitação do processo de extinção da memória aversiva. Assim, os resultados encontrados no nosso experimento podem seguir a mesma dinâmica, mas nesse caso impedindo a melhora da consolidação da memória, fato já discutido e que se chamou aqui de “alívio” da memória de medo (RIEBE *et al.*, 2012). Por fim, pode-se também ter uma supressão parcial do eixo HPA, causada pela própria dexametasona (SOUZA, 2011), causando uma menor liberação de corticosterona, e assim, um prejuízo na resposta de medo condicionada, sem que haja uma interação com o sistema eCB.

Um resultado interessante ocorreu nos animais que receberam dexametasona 0,3 mg/kg, 1h antes do condicionamento de medo. Nesse grupo não foi observado potencialização, nem generalização da memória de medo, ou seja, nenhum aumento da porcentagem de congelamento nos teste A<sub>1</sub> e B<sub>1</sub>. Entretanto, foram encontrados níveis elevados de congelamento, semelhantes aos animais tratados somente com AM 251, nas sessões de teste A<sub>2</sub> e B<sub>2</sub>. Essa dinâmica também ocorre para a dose de 0,1 mg/kg de dexametasona, a qual também foi testada durante a fase de padronização do protocolo experimental, sendo que esse fato parece ser intrínseco desse agonista. Esse curioso resultado pode ser explicado, em parte, pelo fato da dexametasona possuir um tempo de meia vida muito longo, entre 36-54h, e por esse motivo seus efeitos sobre o processo mnemônicos, como a consolidação, pode decorrer e variar durante esse período (MEIKLE e TAYLOR, 1977; BELKEBIR-MASBAH *et al.*, 1999). Entretanto, pode-se não ter uma ligação entre os dois sistemas, quando se levou em conta que os níveis de congelamento do grupo co-tratado, não foi significativamente diferente do grupo controle e nem dos animais tratados somente com dexametasona, fatos que poderiam sugerir que a diminuição nos níveis de congelamento, foi causada somente pela supressão parcial do eixo HPA e, como consequência, uma diminuição dos níveis plasmáticos de corticosterona, a níveis similares aos observados durante o período diurno.

A ligação entre os sistemas eCB e glicocorticóides não é observada quando realizamos o protocolo inverso, experimento 4. Ou seja, a tentativa de simular níveis noturno de corticosterona durante o dia, pela administração de corticosterona, e logo após observar a

influência desse tratamento sobre o bloqueio CB1. Os resultados revelam que a corticosterona *per se* é capaz de gerar uma potencialização na consolidação da memória de medo contextual, resposta similar a encontrada nos animais tratados somente com AM 251, esse dados estão representados na figura 25 (MARSICANO e LAFENÊTRE, 2009). Nossos resultados estão de acordo com a literatura, já que uma elevação dos níveis de glicocorticóides é capaz de gerar uma melhora na consolidação da memória (CORDERO *et al.*, 2002; AKIRAV, 2013). Por exemplo, no trabalho realizado por Cordero e Sandi (1998), onde corticosterona injetada intraperitonealmente (i.p.) foi capaz de causar um melhor condicionamento de medo contextual. Todavia, nesse trabalho essa resposta é mantida por 7 dias, fato não encontrado no nosso, podendo ser explicado pela diferença na dose aplicada, no caso 5 mg/kg contra 1,0 mg/kg do nosso protocolo. Esse aumento da resposta de medo concorda com Korte (2001), onde a administração de corticosterona em doses capazes de simular uma situação de estresse, ou o pico de liberação fisiológico, foi capaz de reduzir a exploração dos braços abertos no LCE, caracterizando um aumento persistente da resposta de medo, ocorrendo o que se chamou de potencialização da resposta de medo. Como já foi relatado acima, neste caso essa potencialização não foi duradoura, possivelmente porque a dose aplicada não foi capaz de gerar tal resposta comportamental, já que outros trabalhos revelam que doses altas de corticosterona são capazes de gerar um potencialização duradora (COROMIDAS *et al.*, 1994; JONES *et al.*, 1994; KORTE, 2001), e isso ocorre possivelmente por uma ativação prolongada dos receptores GR . Por exemplo, em estudos realizados em primatas com altos níveis plasmáticos de corticosterona, é possível observar uma resposta de potencializada e duradora (KALIN *et al.*, 1998). No trabalho realizado por Liston e colaboradores (2013), também é possível observar essa resposta, nesse estudo altas doses de corticosterona são aplicadas durante o período de depressão do ritmo circadiano em camundongos (dia), e é possível observar, primeiramente um aumento da concentração de corticosterona plasmática, um aumento da formação de novas espinhas dendríticas e a manutenção dessas espinhas recém-formadas após um período de tempo prolongado (7 dias). Por fim, uma melhora persistente na realização da tarefa comportamental aprendida, ou seja, ocorreu uma ótima consolidação (LISTON *et al.*, 2013). Dados não publicados do laboratório demonstram que a dose usada era subefetiva em outra condição, sendo realizado um treino fraco durante o período vespertino, podendo justificar o fato dela não ser sub-efetiva pela manhã.

Entretanto, não é observado um aumento esperado na porcentagem de congelamento pela administração de corticosterona + AM 251. Era esperado que nesse grupo ocorresse a potencialização da resposta de medo, e que essa resposta fosse mantida, ou seja, também era esperada uma maior durabilidade (persistência) da memória de medo, já que a administração de corticosterona exógena aumentaria as taxas desse glicocorticoides a níveis similares aos observados nos animais que passaram pelo condicionamento durante o período noturno, e como pode ser visto no experimento 1, o grupo tratamento com AM 251 0,3 mg/kg possui uma resposta de medo condicionada potencializada, generalizada e persistente, diferente do grupo corticosterona + AM 251 que apresentou somente uma resposta potencializada. Ou seja, não foi possível mimetizar os efeitos do bloqueio CB1 noturnos através da administração de corticosterona durante o período diurno.

Resumindo os resultados do experimento 4, em todos os grupos tratados foi observada uma potencialização da resposta de medo de contextual. Entretanto, no grupo corticosterona + AM 251, não foi relatada a generalização da resposta de medo, muito menos a durabilidade da potencialização, comportamento esperado para esse grupo. Já que o objetivo desse tratamento era simular uma maior concentração de corticosterona durante o dia, podendo simular as taxas de liberação noturna desse hormônio, e avaliar uma possível resposta comportamental reforçada pelo bloqueio dos receptores canabinóides pelo AM 251. Levando, como já foi explicado, a uma maior quantidade e/ou um maior tempo de ação dos glicocorticoides, podendo causar uma melhor consolidação da memória de medo contextual. Pode-se explicar essa resposta de algumas maneiras: uma possível questão de dose, ou seja, seria necessária uma dose menor ou maior do que 1,0 mg/kg. Uma provável falta de interação entre os sistemas glicocorticoide e endocanabinoide durante o processo de consolidação da memória de medo contextual no período diurno, pelo menos nesse protocolo experimental. Por fim, ao tentar simular exogenamente os níveis noturnos (elevados) de corticosterona durante o dia, deve-se levar em consideração também outros fatores que podem contribuir contra essa mimetização de um “estado noturno”, por exemplo, a iluminação, temperatura corporal, estado de sono/vigília, etc.

## 6. Conclusões

O ritmo circadiano possui influência sobre o bloqueio farmacológico dos receptores canabinoides do subtipo 1 durante o processo de consolidação da memória. Também se confirmou uma diferença na concentração plasmática de corticosterona em diferentes períodos do dia, indicando que esse hormônio sofre uma variação circadiana. Além disso, o condicionamento foi capaz de gerar um aumento da liberação da corticosterona, fato também esperado. Por fim, pode-se ter uma interação entre os sistemas endocanabinoide e glicocorticoides durante o processo de condicionamento de medo contextual, sendo que essa interação pode, de certa forma, sofrer uma influência do ritmo circadiano. Essa interação provavelmente ocorre através do *feedback* negativo, realizado pelo sistema eCB, sobre o sistema glicocorticoide, processo que foi muito abordado durante todo o trabalho. Entretanto, ainda se faz necessária a realização de outros ensaios bioquímicos, como a dosagem de corticosterona após o condicionamento e sobre o efeito do tratamento farmacológico e comportamentais, como a adição de uma dose de corticosterona no experimento 4. Todos esses ensaios serão realizados assim que possível, com objetivo de confirmar a possível interação entre os dois sistemas.

## REFERÊNCIAS

- ABELSON JL; CURTIS GC. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in panic disorder. 24-hour secretion of corticotropin and cortisol. **Arch Gen Psychiatry**. 1996; 53:323–31
- AKIRAV I. Cannabinoids and glucocorticoids modulate emotional memory after stress. **Neurosci Biobehav Rev**. 2013 Dec; 37(10 Pt 2):2554–63.
- ALBERINI CM. Transcription factors in long-term memory and synaptic plasticity. **Physiological Reviews**. 2009, 89(1), 121–145
- ALBRECHT U. Timing to perfection: the biology of central and peripheral circadian clocks. **Neuron**. 2012 Apr 26; 74(2):246–60.
- ALGER BE, KIM J. Supply and demand for endocannabinoids. **Trends Neurosci**. 2011 Jun; 34(6):304–15.
- AMBROGI LORENZINI CG, BALDI E, BUCHERELLI C, SACCHETTI B, TASSONI G. Neural topography and chronology of memory consolidation: a review of functional inactivation findings. **Neurobiol Learn Mem**. 1999 Jan; 71(1):1–18.
- ANTLE MC, SMITH VM, STERNICZUK R, YAMAKAWA GR, RAKAI BD. Physiological responses of the circadian clock to acute light exposure at night. **Rev. Endocr. Metab. Disord**. 2009 Dec;10(4):279–91
- ARENOS JD, MUSTY RE, BUCCI DJ. Blockade of cannabinoid CB1 receptors alters contextual learning and memory. **Eur J Pharmacol**. 2006; 539:177–83
- ATSAK P, ROOZENDAAL B, CAMPOLONGO P. Role of the endocannabinoid system in regulating glucocorticoid effects on memory for emotional experiences. **Neuroscience**. 2012 Mar 1;204:104–16.
- BARNA I, ZELENA D, ARSZOVSZKI AC, LEDENT C. The role of endogenous cannabinoids in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis regulation: in vivo and in vitro studies in CB1 receptor knockout mice. **Life Sci**. 2004 Oct 29; 75(24):2959–70.
- BARNES CA, MCNAUGHTON BL, GODDARD GV, DOUGLAS RM, ADAMEC R. Circadian rhythm of synaptic excitability in rat and monkey central nervous system. **Science**. 1977 Jul 1;197(4298):91–2.

BEKINSCHTEIN P, CAMMAROTA M, IGAZ LM, BEVILAQUA LR, IZQUIERDO I, MEDINA JH. Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis- and BDNF- dependent phase in the hippocampus. **Neuron**. 2007 Jan 18;53(2):261-77.

BELKEBIR-MESBAH D, BONNEFONT-ROUSSELOT D, FREY-FRESSART V, MOINARD C, DELATTRE J, VASSON MP. Consequences of treatment with dexamethasone in rats on the susceptibility of total plasma and isolated lipoprotein fractions to copper oxidation. **Endocrine**. 1999 Jun;10(3):233-42.

BELL-PEDERSEN D, CASSONE VM, EARNEST DJ, GOLDEN SS, HARDIN PE, THOMAS TL, ZORAN MJ. Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms. **Nat Rev Genet**. 2005 Jul;6(7):544-56.

BENITO C, TOLON RM, PAZOS MR, NUNEZ E, CASTILLO AI, ROMERO J. Cannabinoid CB2 receptors in human brain inflammation. **Br J Pharmacol**. 2008;153:277-85.

BLANCHARD DC, BLANCHARD RJ. Innate and conditioned reactions to threat in rats with amygdaloid lesions. **J Comp Physiol Psychol**. 1972 Nov;81(2):281-90.

BLANCHARD RJ, BLANCHARD DC. Passive and active reactions to fear-eliciting stimuli. **J Comp Physiol Psychol**. 1969 May;68(1):129-35.

BOHUS B, DE KLOET ER. Adrenal steroids and extinction behavior: antagonism by progesterone, deoxycorticosterone and dexamethasone of a specific effect of corticosterone. **Life Sci**. 1981 Jan 26;28(4):433-40.

BORRELLI E, NESTLER EJ, ALLIS CD, SASSONE-CORSI P. Decoding the epigenetic language of neuronal plasticity. **Neuron**. 2008 Dec 26;60(6):961-74.

BUCHERELLI C, BALDI E, MARIOTTINI C, PASSANI MB, BLANDINA P. Aversive memory reactivation engages in the amygdala only some neurotransmitters involved in consolidation. **Learn Mem**. 2006; 13:426-30.

BUIJS RM, HERMES MH, KALSBECK A. The suprachiasmatic nucleus-paraventricular nucleus interactions: a bridge to the neuroendocrine and autonomic nervous system. **Prog Brain Res**. 1998; 119:365-82.

BUIJS RM, WORTEL J, VAN HEERIKHUIZE JJ, FEENSTRA MG, TER HORST GJ, ROMIJN HJ, KALSBECK A. Anatomical and functional demonstration of a multisynaptic suprachiasmatic nucleus adrenal (cortex) pathway. **Eur J Neurosci**. 1999 May;11(5):1535-44.

CAHILL L, MCGAUGH JL. Mechanisms of emotional arousal and lasting declarative memory. **Trends in Neuroscience**. 1998; 21:294–299.

CAMPOLONGO P, ROOZENDAAL B, TREZZA V, HAUER D, SCHELLING G, MCGAUGH JL, CUOMO V. Endocannabinoids in the rat basolateral amygdala enhance memory consolidation and enable glucocorticoid modulation of memory. **Proc Natl Acad Sci USA**. 2009 Mar 24;106(12):4888-93

CANNICH A, WOTJAK CT, KAMPRATH K, HERMANN H, LUTZ B, MARSICANO G. CB1 cannabinoid receptors modulate kinase and phosphatase activity during extinction of conditioned fear in mice. **Learn Mem**. 2004 Sep-Oct;11(5):625-32.

CARROLL TB, FINDLING JW. The diagnosis of Cushing's syndrome. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**. 2010 Jun;11(2):147-53.

CASTELLANO C, ROSSI-ARNAUD C, CESTARI V, COSTANZI M. Cannabinoids and memory: animal studies. **Curr Drug Targets CNS Neurol Disord**. 2003 Dec;2(6):389-402.

CAVALLI J. **Papel dos glicocorticóides no condicionamento olfatório aversivo promovido pelo pentilenotetrazol**. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina – Centro de Ciência Biológicas - Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Florianópolis - Santa Catarina, 2013.

CHAUDHURY D, WANG LM, COLWELL CS. Circadian regulation of hippocampal long-term potentiation. **J Biol Rhythms**. 2005 Jun;20(3):225-36.

CHEN DY, BAMBAH-MUKKU D, POLLONINI G, ALBERINI CM. Glucocorticoid receptors recruit the CaMKII $\alpha$ -BDNF-CREB pathways to mediate memory consolidation. **Nat Neurosci**. 2012 Dec;15(12):1707-14.

CHHATWAL JP, DAVIS M, MAGUSCHAK KA, RESSLER KJ. Enhancing cannabinoid neurotransmission augments the extinction of conditioned fear. **Neuropsychopharmacology**. 2005;30:516–24.

COLE MA, KIM PJ, KALMAN BA, SPENCER RL. Dexamethasone suppression of corticosteroid secretion: evaluation of the site of action by receptor measures and functional studies. **Psychoneuroendocrinology**. 2000 Feb;25(2):151-67.

CORDERO MI, KRUYT ND, MERINO JJ, SANDI C. Glucocorticoid involvement in memory formation in a rat model for traumatic memory. **Stress**. 2002 Feb;5(1):73-9.

CORDERO MI, SANDI C. A role for brain glucocorticoid receptors in contextual fear conditioning: dependence upon training intensity. **Brain Res.** 1998 Mar 9;786(1-2):11-7.

CORODIMAS KP, LEDOUX JE, GOLD PW, SCHULKIN J. Corticosterone potentiation of conditioned fear in rats. **Ann N Y Acad Sci.** 1994 Nov 30;746:392-3.

COTA D, MARSICANO G, TSCHÖP M, GRÜBLER Y, FLACHSKAMM C, SCHUBERT M, AUER D, YASSOURIDIS A, THÖNE-REINEKE C, ORTMANN S, TOMASSONI F, CERVINO C, NISOLI E, LINTHORST AC, PASQUALI R, LUTZ B, STALLA GK, PAGOTTO U. The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. **J Clin Invest.** 2003 Aug;112(3):423-31

COTA D, STEINER MA, MARSICANO G, CERVINO C, HERMAN JP, GRÜBLER Y, STALLA J, PASQUALI R, LUTZ B, STALLA GK, PAGOTTO U. Requirement of cannabinoid receptor type 1 for the basal modulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis function. **Endocrinology.** 2007 148:1574-1581

COULSTON CM, PERDICES M, TENNANT CC. The neuropsychology of cannabis and other substance use in schizophrenia: review of the literature and critical evaluation of methodological issues. **Aust N Z J Psychiatry.** 2007 Nov;41(11):869-84.

D'SOUZA DC, PERRY E, MACDOUGALL L, AMMERMAN Y, COOPER T, WU YT, BRALEY G, GUEORGUEVA R, KRYSTAL JH. The psychotomimetic effects of intravenous delta-9-tetrahydrocannabinol in healthy individuals: implications for psychosis. **Neuropsychopharmacology.** 2004 Aug;29(8):1558-72.

DALLMANN R, VIOLA AU, TAROKH L, CAJOCHEN C, BROWN SA. The human circadian metabolome. **Proc Natl Acad Sci USA.** 2012 Feb 14;109(7):2625-9

DE BITENCOURT RM, PAMPLONA FA, TAKAHASHI RN. A current overview of cannabinoids and glucocorticoids in facilitating extinction of aversive memories: potential extinction enhancers. **Neuropharmacology.** 2013 Jan;64:389-95.

DE BOER SF, KOOPMANS SJ, SLANGEN JL, VAN DER GUGTEN J. Plasma catecholamine, corticosterone and glucose responses to repeated stress in rats: effect of interstressor interval length. **Physiol Behav.** 1990 Jun;47(6):1117-24.

DE KLOET ER, REUL JM, SUTANTO W. Corticosteroids and the brain. **J Steroid Biochem Mol Biol.** 1990 Nov 20;37(3):387-94.

DE KLOET ER, VREUGDENHIL E, OITZL MS, JÖELS M. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. **Endocr Rev.** 1998 Jun;19(3):269-301.

DE KLOET ER. Brain corticosteroid receptor balance and homeostatic control. **Front. Neuroendocrinology.** 1991 12, 95 – 164

DE KLOET ER. Stress in the brain. **Eur J Pharmacol.** 2000 Sep 29;405(1-3):187-98.

DE OLIVEIRA ALVARES L, DE OLIVEIRA LF, CAMBOIM C, DIEHL F, GENRO BP, LANZIOTTI VB, QUILLFELDT JA. Amnestic effect of intrahippocampal AM251, a CB1-selective blocker, in the inhibitory avoidance, but not in the open field habituation task, in rats. **Neurobiol Learn Mem.** 2005 Mar;83(2):119-24.

DE OLIVEIRA ALVARES L, ENGELKE DS, DIEHL F, SCHEFFER-TEIXEIRA R, HAUBRICH J, DE FREITAS CASSINI L, MOLINA VA, QUILLFELDT JA. Stress response recruits the hippocampal endocannabinoid system for the modulation of fear memory. **Learn Mem.** 2010 Mar 26;17(4):202-9

DE OLIVEIRA ALVARES L, GENRO BP, VAN BREDA RV, PEDROSO MF, DA COSTA JC, QUILLFELDT JA. AM251, a selective antagonist of the CB1 receptor, inhibits the induction of long-term potentiation and induces retrograde amnesia. **Brain Res.** 2006 Feb 23;1075(1):60-7. Epub 2006 Feb 7.

DEVAN BD, GOAD EH, PETRI HL, ANTONIADIS EA, HONG NS, KO CH, LEBLANC L, LEBOVIC SS, LO Q, RALPH MR, MCDONALD RJ. Circadian phase-shifted rats show normal acquisition but impaired long-term retention of place information in the water task. **Neurobiol Learn Mem.** 2001 Jan;75(1):51-62.

DI MARZO V. Manipulation of the endocannabinoid system by a general anaesthetic. **Br J Pharmacol.** 2003 Jul;139(5):885-6.

DI S, MALCHER-LOPES R, HALMOS KC, TASKER JG. Nongenomic glucocorticoid inhibition via endocannabinoid release in the hypothalamus: a fast feedback mechanism. **J Neurosci.** 2003;23:4850–72003

DUDAI Y. Consolidation: fragility on the road to the engram. **Neuron.** 1996 Sep;17(3):367-70.

DUDAI Y. **Memory from A to Z**. Keywords, Concepts and Beyond. Oxford: Oxford Univ. Press. 2002

DUDAI Y. The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? **Annu. Rev. Psychol.** 2004 55:51–86

ECKEL-MAHAN KL, STORM DR. Circadian rhythms and memory : not so simple as cogs and gears. **EMBO Rep.** 2009; 10:584–591

ENGELAND WC, ARNHOLD MM. Neural circuitry in the regulation of adrenal cortico-sterone rhythmicity. **Endocrine.** 2005; 28:325–32

EVANSON NK, TASKER JG, HILL MN, HILLARD CJ, HERMAN JP. Fast feedback inhibition of the HPA axis by glucocorticoids is mediated by endocannabinoid signaling. **Endocrinology.** 2010 Oct;151(10):4811-9.

FALKENSTEIN E, TILLMANN HC, CHRIST M, FEURING M, WEHLING M. Multiple actions of steroid hormones—a focus on rapid, nongenomic effects. **Pharmacol Rev.** 2000 Dec;52(4):513-56

FANSELOW MS. Factors governing one trial contextual conditioning. **Anim Learn Behav.** 1990 18, 264–270

FANSELOW MS. From contextual fear to a dynamic view of memory systems. **Trends Cogn Sci.** 2010 Jan;14(1):7-15.. Epub 2009 Nov 24.

FANSELOW MS. Signaled shock-free periods and preference for signaled shock. **J Exp Psychol Anim Behav Process.** 1980, 6, 65–80

FENDT M, FANSELOW MS. The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. **Neurosci Biobehav Rev.** 1999 May;23(5):743-60.

FINN DP. Endocannabinoid-mediated modulation of stress responses: physiological and pathophysiological significance. **Immunobiology.** 2010 Aug;215(8):629-46

FLOOD JF, VIDAL D, BENNETT EL, ORME AE, VASQUEZ S, JARVIK ME. Memory facilitating and anti-amnesic effects of corticosteroids. **Pharmacol Biochem Behav.** 1978 Jan;8(1):81-7.

FRANKLAND PW, BONTEMPI B, TALTON LE, KACZMAREK L, SILVA AJ. The involvement of the anterior cingulate cortex in remote contextual fear memory. **Science.** 2004304:881– 883

- FRANKLAND PW, JOSSELYN SA, ANAGNOSTARAS SG, KOGAN JH, TAKAHASHI E, SILVA AJ. Consolidation of CS and US representations in associative fear conditioning. **Hippocampus**. 2004, 14(5):557–569
- FREUND TF, HAJOS N. Excitement reduces inhibition via endocannabinoids. **Neuron**. 2003 May 8;38(3):362-5.
- FRIDE E. Endocannabinoids in the central nervous system – an overview. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**. 2002 Feb-Mar;66(2-3):221-33.
- FURINI CR, ROSSATO JI, BITENCOURT LL, MEDINA JH, IZQUIERDO I, CAMMAROTA M.  $\beta$ -Adrenergic receptors link NO/sGC/PKG signaling to BDNF expression during the consolidation of object recognition long-term memory. **Hippocampus**. 2010; 20: 672–683.
- GALLER JR, MOKLER DJ. A review of systems and networks of the limbic forebrain/limbic midbrain. **Prog Neurobiol**. 2005 Feb;75(2):143-60.
- GALLOU-KABANI C, VIGÉ A, JUNIEN C. Lifelong circadian and epigenetic drifts in metabolic syndrome. **Epigenetics**. 2007 Sep;2(3):137-46. Epub 2007 Aug 14.
- GAONI Y, MECHOULAM R. Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish. **J Am Chem Soc**. 1964 86:1646–1647
- GAZARINI L, STERN CA, CAROBREZ AP, BERTOGLIO LJ. Enhanced noradrenergic activity potentiates fear memory consolidation and reconsolidation by differentially recruiting  $\alpha$ 1- and  $\beta$ -adrenergic receptors. **Learn Mem**. 2013 Mar 19;20(4):210-9.
- GERSTNER JR, YIN JC. Circadian rhythms and memory formation. **Nat Rev Neurosci**. 2010 Aug;11(8):577-88.
- GINSBERG AB, PECORARO NC, WARNE JP, HORNEMAN HF, DALLMAN MF. Rapid alteration of stress-induced hypothalamic-pituitary-adrenal hormone secretion in the rat: a comparison of glucocorticoids and cannabinoids. **Stress**. 2010 May;13(3):248-57.
- GOLD PE, MCGAUGH JL. A single-trace, two process view of memory storage processes. **Academic Press**, New York, pp. 355 – 378. 1975
- GOLOMBEK DA, ROSENSTEIN RE. Physiology of circadian entrainment. **Physiol Rev**. 2010 Jul;90(3):1063-102.

GRAEFF FG. Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviors and related emotions in mammals. **Braz J Med Biol Res.** 1994 27:811–829.

GROENEWEG FL, KARST H, DE KLOET ER, JOËLS M. Rapid non-genomic effects of corticosteroids and their role in the central stress response. **J Endocrinol.** 2011 May; 209(2):153-67.

HALLER J, VARGA B, LEDENT C, BARNA I, FREUND TF. Context-dependent effects of CB1 cannabinoid gene disruption on anxiety-like and social behaviour in mice. **Eur J Neurosci.** 2004 19:1906–1912.

HANKINS MW, PEIRSON SN, FOSTER RG. Melanopsin: an exciting photopigment. **Trends Neurosci.** 2008 31, 27–36.

HARTMANN A, VELDHUIS JD, DEUSCHLE M, STANDHARDT H, HEUSER I. Twenty-four hour cortisol release profiles in patients with Alzheimer's and Parkinson's disease compared to normal controls: ultradian secretory pulsatility and diurnal variation. **Neurobiol Aging.** 1997;18:285–9

HASTINGS MH, MAYWOOD ES, REDDY AB. Two decades of circadian time. **J Neuroendocrinol.** 2008 Jun;20(6):812-9.

HEBB D. The organization of behavior; a neuropsychological theory. **Wiley,** New York, NY 1949.

HERKENHAM M, LYNN AB, LITTLE MD, JOHNSON MR, MELVIN LS, DE COSTA BR, RICE KC. Cannabinoid receptor localization in brain. **Proc Natl Acad Sci USA.** 1990 Mar; 87(5):1932-6.

HERMAN JP, FIGUEIREDO H, MUELLER NK, ULRICH-LAI Y, OSTRANDER MM, CHOI DC, CULLINAN WE. Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. **Front Neuroendocrinol** 2003; Jul;24(3):151-80.

HERMAN JP, PREWITT CM, CULLINAN WE. Neuronal circuit regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical stress axis. **Crit Rev Neurobiol.** 1996;10(3-4):371-94.

HILL MN, HO WS, MEIER SE, GORZALKA BB, HILLARD CJ. Chronic corticosterone treatment increases the endocannabinoid 2-arachidonylglycerol in the rat amygdala. **Eur J Pharmacol.** 2005; Dec 28;528(1-3):99-102.

HILL MN, MCEWEN BS. Involvement of the endocannabinoid system in the neurobehavioural effects of stress and glucocorticoids. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.** 2010; Jun 30;34(5):791-7

HILL MN, MILLER GE, CARRIER EJ, GORZALKA BB, HILLARD CJ. Circulating endocannabinoids and N-acyl ethanolamines are differentially regulated in major depression and following exposure to social stress. **Psychoneuroendocrinology**. 2009; 34:1257–62

HILL MN, MILLER GE, HO WS, GORZALKA BB, HILLARD CJ. Serum endocannabinoid content is altered in females with depressive disorders: a preliminary report. **Pharmacopsychiatry**. 2008; Mar;41(2):48-53.

HILL MN, PATEL S, CAMPOLONGO P, TASKER JG, WOTJAK CT, BAINS JS. Functional interactions between stress and the endocannabinoid system: from synaptic signaling to behavioral output. **J Neurosci**. 2010 Nov 10;30(45):14980-6

HINZ B, HIRSCHMANN R. Rapid non-genomic feedback effects of glucocorticoids on CRF-induced ACTH secretion in rats. **Pharm Res**. 2000; Oct;17(10):1273-7.

HOHMANN AG, SUPLITA RL, BOLTON NM, NEELY MH, FEGLEY D, MANGIERI R, KREY JF, WALKER JM, HOLMES PV, CRYSTAL JD, DURANTI A, TONTINI A, MOR M, TARZIA G, PIOMELLI D. Endocannabinoid mechanism for stress-induced analgesia. **Nature**. 2005; Jun 23;435(7045):1108-12.

HOWLETT AC. The cannabinoid receptors. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**. 2002 Aug;68-69:619-31.

JACOB W, MARSCH R, MARSICANO G, LUTZ B, WOTJAK CT. Cannabinoid CB1 receptor deficiency increases contextual fear memory under highly aversive conditions and long-term potentiation in vivo. **Neurobiol Learn Mem**. 2012; Jul;98(1):47-55.

JOËLS M, FERNANDEZ G, ROOZENDAAL B. Stress and emotional memory: a matter of timing. **Trends Cogn Sci**. 2011; Jun;15(6):280-8

JONES RB, SATTERLEE DG, RYDER FH. Fear of humans in Japanese quail selected for low or high adrenocortical response. **Physiol Behav**. 1994; Aug;56(2):379-83.

KALIN NH, SHELTON SE, RICKMAN M, DAVIDSON RJ. Individual differences in freezing and cortisol in infant and mother rhesus monkeys. **Behav Neurosci**. 1998; Feb;112(1):251-4.

KAMPRATH K, MARSICANO G, TANG J, MONORY K, BISOGNO T, DI MARZO V, LUTZ B, WOTJAK CT. Cannabinoid CB1 receptor mediates fear extinction via habituation-like processes. **J Neurosci.** 2006; Jun 21;26(25):6677-86.

KATONA I, RANCZ EA, ACSADY L, LEDENT C, MACKIE K, HAJOS N, FREUND TF. Distribution of CB1 cannabinoid receptors in the amygdala and their role in the control of GABAergic transmission. **J Neurosci.** 2001; Dec 1;21(23):9506-18.

KATONA I, SPERLAGH B, MAGLOCZKY Z, SANTHA E, KOFALVI A, CZIRJAK S, MACKIE K, VIZI ES, FREUND TF. GABAergic interneurons are the targets of cannabinoid actions in the human hippocampus. **Neuroscience.** 2000;100(4):797-804.

KAWAMURA Y, FUKAYA M, MAEJIMA T, YOSHIDA T, MIURA E, WATANABE M, OHNO-SHOSAKU T, KANO M. The CB1 cannabinoid receptor is the major cannabinoid receptor at excitatory presynaptic sites in the hippocampus and cerebellum. **J Neurosci.** 2006; Mar 15;26(11):2991-3001

KOETHE D, SCHREIBER D, GIUFFRIDA A, MAUSS C, FAULHABER J, HEYDENREICH B, HELLMICH M, GRAF R, KLOSTERKÖTTER J, PIOMELLI D, LEWEKE FM. Sleep deprivation increases oleoylethanolamide in human cerebrospinal fluid. **J Neural Transm.** 2009 Mar;116(3):301-5

KORTE, SM. Corticosteroids in relation to fear, anxiety and psychopathology. **Neurosci Biobehav Rev.** 2001; 25, 117 – 142.

LAMPRECHT R, LEDOUX J. Structural plasticity and memory. **Nature Reviews Neuroscience.** 2004 5(1), 45–54

LANDEIRA-FERNANDEZ J, DECOLA JP, KIM JJ, FANSELOW MS. Immediate shock deficit in fear conditioning: effects of shock manipulations. **Behav Neurosci.** 2006120(4):873– 879

LECHNER HA, SQUIRE LR, BYRNE JH. 100 years of consolidation--remembering Müller and Pilzecker. **Learn Mem.** 1999 Mar-Apr;6(2):77-87.

LEDOUX JE. Emotion circuits in the brain. **Annu Rev Neurosci.** 2000;23:155–84.

LEUTGEB S, LEUTGEB JK, MOSER EI, MOSER MB. Fast rate coding in hippocampal CA3 cell ensembles. **Hippocampus.** 2006;16(9):765-74.

LIGHTMAN SL, CONWAY-CAMPBELL BL. The crucial role of pulsatile activity of the HPA axis for continuous dynamic equilibration. **Nat Rev Neurosci.** 2010 Oct;11(10):710-8.

LIGHTMAN SL, WILES CC, ATKINSON HC, HENLEY DE, RUSSELL GM, LEENDERTZ JA, MCKENNA MA, SPIGA F, WOOD SA, CONWAY-CAMPBELL BL. The significance of glucocorticoid pulsatility. **Eur J Pharmacol.** 2008 583:255–262

LISTON C, CICHON JM, JEANNETEAU F, JIA Z, CHAO MV, GAN WB. Circadian glucocorticoid oscillations promote learning-dependent synapse formation and maintenance. **Nat Neurosci.** 2013 Jun;16(6):698-705.

MAGNUSSON A, BOIVIN D. Seasonal affective disorder: na overview. **Chronobiol Int.** 2003; Mar;20(2):189-207.

MALDONADO R, VALVERDE O, BERRENDERO F. Involvement of the endocannabinoid system in drug addiction. **Trends Neurosci.** 2006 29:225–232.

MAREN S, PHAN KL, LIBERZON I. The contextual brain: implications for fear conditioning, extinction and psychopathology. **Nat Rev Neurosci.** 2013 Jun;14(6):417-28.

MARSICANO G, LAFENÊTRE P. Roles of the endocannabinoid system in learning and memory. **Curr Top Behav Neurosci.** 2009; 1:201-30.

MARSICANO G, LUTZ B. Neuromodulatory functions of the endocannabinoid system. **J Endocrinol Invest.** 2006; 29(3 Suppl):27-46.

MARSICANO G, WOTJAK CT, AZAD SC, BISOGNO T, RAMMES G, CASCIO MG, HERMANN H, TANG J, HOFMANN C, ZIEGLGANSBERGER W, DI MARZO V, LUTZ B. The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. **Nature.** 2002; 418:530–534.

MARTINEZ-VARGAS M, GONZALEZ-RIVERA R, SOTO-NUÑEZ M, CISNEROS-MARTINEZ M, HUERTA-SAQUERO A, MORALES-GOMEZ J, MOLINA-GUARNEROS J, NAVARRO L. Recovery after a traumatic brain injury depends on diurnal variations effect of cystatin C. **Neurosci Lett.** 2005; May 29;400(1-2):21-4.

MATSUDA LA, LOLAIT SJ, BROWNSTEIN MJ, YOUNG AC, BONNER TI. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. **Nature.** 1990; 346:561 – 564.

McGAUGH JL, CAHILL L, ROOZENDAAL B. Involvement of the amygdala in memory storage: interaction with other brain systems. **Proc Natl Acad Sci USA**. 1996; Nov 26;93(24):13508-14.

McGAUGH JL. Involvement of hormonal and neuromodulatory systems in the regulation of memory storage. **Annu Rev Neurosci**. 1989;12:255-87. Review

McGAUGH JL. Memory: a century of consolidation. **Science**. 2000; 287:248–251

McGAUGH JL. Preserving the presence of the past. Hormonal influences on memory storage. **Am Psychol**. 1983; Feb;38(2):161-74.

McGAUGH JL. **Memory and emotion: the making of lasting memories**. London: Weidenfeld and Nicolson The Orion House Group Ltd; New York: Columbia University Press; 2003.

McINTYRE CK, McGAUGH JL, WILLIAMS CL. Interacting brain systems modulate memory consolidation. **Neurosci Biobehav Rev**. 2012; Aug;36(7):1750-62.

MECHOULAM R, BEN-SHABAT S, HANUS L, LIGUMSKY M, KAMINSKI NE, SCHATZ AR, GOPHER A, ALMOG S, MARTIN BR, COMPTON DR, et al. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. **Biochem Pharmacol**. 1995 Jun 29;50(1):83-90.

MEIKLE AW, TYLER FH. Potency and duration of action of glucocorticoids. Effects of hydrocortisone, prednisone and dexamethasone on human pituitary-adrenal function. **Am J Med**. 1977 Aug;63(2):200-7.

MILAD MR, PITMAN RK, ELLIS CB, GOLD AL, SHIN LM, LASKO NB, ZEIDAN MA, HANDWERGER K, ORR SP, RAUCH SL. Neurobiological basis of failure to recall extinction memory in posttraumatic stress disorder. **Biol Psychiatry**. 2009; Dec 15;66(12):1075-82.

MILLAN MJ. Multi-target strategies for the improved treatment of depressive states: conceptual foundations and neuronal substrates, drug discovery and therapeutic application. **Pharmacol Ther**. 2006; 110:135–370.

MILLAN MJ. The neurobiology and control of anxious states. **Prog Neurobiol**. 2003; 70: 83–244.

MILLER AH, SPENCER RL, PULERA M, KANG S, MCEWEN BS, STEIN M. Adrenal steroid receptor activation in rat brain and pituitary following dexamethasone: implications for the dexamethasone suppression test. **Biol Psychiatry**. 1992 Nov 15;32(10):850-69.

MOORE RY, EICHLER VB. Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. **Brain Res**. 1972; 42,201–206.

MOREIRA FA, LUTZ B. The endocannabinoid system: Emotion, learning, and addiction. **Addict Biol**. 2008; Jun;13(2):196-212.

MOREIRA FA, WOTJAK CT. Cannabinoids and anxiety. **Curr Top Behav Neurosci**. 2009;2:429-50.

MORENA M, CAMPOLONGO P. The endocannabinoid system an emotional buffer in the modulation of memory function. **Neurobiology of Learning and Memory**. 2013; Dec 29. pii: S1074-7427(13)00266-9.

MORIN LP, ALLEN CN. The circadian visual system. **Brain Res Rev**. 2006; Jun;51(1):1-60

MUELLER GE, PILZECKER A. **Experimentelle Beiträge zur Lehre vom Gedächtniss. Zeitschrift Psychologie**.1900; 1, 1 – 288.

MULDER H, NAGORNY CL, LYSSENKOV, GROOP L. Melatonin receptors in pancreatic islets: good morning to a novel type 2 diabetes gene. **Diabetologia**. 2009; 52, 1240–1249.

MUNRO S, THOMAS KL, ABU-SHAAR M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. **Nature**. 1993; 365:61–65.

NADEL L, HUPBACH A, GOMEZ R, NEWMAN-SMITH K. Memory formation, consolidation and transformation. **Neurosci Biobehav Rev**. 2012; Aug;36(7):1640-5

NIYUHIRE F, VARVEL SA, THORPE AJ, STOKES RJ, WILEY JL, LICHTMAN AH. The disruptive effects of the CB1 receptor antagonist rimonabant on extinction learning in mice are task-specific. **Psychopharmacology**. 2007;191:223–31 (Berl).

OHNO-SHOSAKU T, TSUBOKAWA H, MIZUSHIMA I, YONEDA N, ZIMMER A, KANO M. Presynaptic cannabinoid sensitivity is a major determinant of depolarization-induced retrograde suppression at hippocampal synapses. **J Neurosci**. 2002; 22: 3864–3872.

OITZL MS, DE KLOET ER. Selective corticosteroid antagonists modulate specific aspects of spatial orientation learning. **Behav Neurosci.** 1992 108, 62 – 71.

OITZL MS, FLUTTERT M, DE KLOET ER. The effect of corticosterone on reactivity to spatial novelty is mediated by central mineralocorticosteroid receptors. **Eur J Neurosci.** 1994; Jul 1;6(7):1072-9.

OSTER H, DAMEROW S, KIESSLING S, JAKUBCAKOVA V, ABRAHAM D, TIAN J, HOFFMANN MW, EICHELE G. The circadian rhythm of glucocorticoids is regulated by a gating mechanism residing in the adrenal cortical clock. **Cell Metab.** 2006; 4, 163–173.

PACHER P, BÁTKAI S, KUNOS G. The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. **Pharmacol Rev.** 2006; 58:389–462.

PAMPLONA FA, BITENCOURT RM, TAKAHASHI RN. Short- and long-term effects of cannabinoids on the extinction of contextual fear memory in rats. **Neurobiol Learn Mem.** 2008; Jul; 90(1):290-3

PANDA S, HOGENESCH JB, KAY SA. Circadian rhythms from flies to human. **Nature.** 2002; 417, 329–335 (2002)

PATEL S, ROELKE CT, RADEMACHER DJ, CULLINAN WE, HILLARD CJ. Endocannabinoid signaling negatively modulates stress-induced activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **Endocrinology.** 2004 Dec;145(12):5431-8.

PATEL S, ROELKE CT, RADEMACHER DJ, HILLARD CJ. Inhibition of restraint stress-induced neural and behavioural activation by endogenous cannabinoid signalling. **Eur J Neurosci.** 2005 Feb;21(4):1057-69.

PECORARO N, DALLMAN MF, WARNE JP, GINSBERG AB, LAUGERO KD, LA FLEUR SE, HOUSHYAR H, GOMEZ F, BHARGAVA A, AKANA SF. From Malthus to motive: how the HPA axis engineers the phenotype, yoking needs to wants. **Prog Neurobiol.** 2006 Aug;79(5-6):247-340..

POLDRACK RA, PACKARD MG. Competition among multiple memory systems: converging evidence from animal and human brain studies. **Neuropsychologia.** 2003;41(3):245-51.

POPOLI M, YAN Z, MCEWEN BS, SANACORA G. The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. **Nat Rev Neurosci.** 2011 Nov 30;13(1):22-37.

- PUGH CR, TREMBLAY D, FLESHNER M, RUDY JW. A selective role for corticosterone in contextual-fear conditioning. **Behav. Neurosci.** 1997; 111, 503 – 511.
- RADEMACHER DJ, HILLARD CJ. Interactions between endocannabinoids and stress-induced decreased sensitivity to natural reward. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.** 2007; Apr 13;31(3):633-41.
- RAWASHDEH O, DE BORSETTI NH, ROMAN G, CAHILL GM. Melatonin suppresses nighttime memory formation in zebrafish. **Science.** 2007; 318:1144–1146
- REICH C, MOHAMMADI M, ALGER B. Endocannabinoid modulation of fear responses: Learning and state-dependent performance effects. **J Psychopharmacol.** 2008; 22: 769–77.
- REUL JM, DE KLOET ER. Two receptor systems for corticosterone in the rat brain: microdistribution and differential occupation. **Endocrinology.** 1985; 117, 2505 – 2512
- RIEBE CJ, PAMPLONA FA, KAMPRATH K, WOTJAK CT. Fear relief-toward a new conceptual frame work and what endocannabinoids gotta do with it. **Neuroscience.** 2012; Mar 1;204:159-85.
- ROBINSON L, MCKILLOP-SMITH S, ROSS NL, PERTWEE RG, HAMPSON RE, PLATT B, RIEDEL G. Hippocampal endocannabinoids inhibit spatial learning and limit spatial memory in rats. **Psychopharmacology (Berl).** 2008 Jul;198(4):551-63. Epub 2007 Nov 30.
- ROCHE M, O'CONNOR E, DISKIN C, FINN DP. The effect of CB(1) receptor antagonism in the right basolateral amygdala on conditioned fear and associated analgesia in rats. **Eur J Neurosci.** 2007;26:2643–53.
- RODRIGUES SM, LEDOUX JE, SAPOLSKY RM. The influence of stress hormones on fear circuitry. **Annu Rev Neurosci.** 2009;32:289–313
- ROOZENDAAL B, MCGAUGH JL. The memory-modulatory effects of glucocorticoids depend on an intact stria terminalis. **Brain Res.** 1996 Feb 19;709(2):243-50
- ROOZENDAAL B, MCGAUGH JL. Memory modulation. **Behav Neurosci.** 2011 Dec;125(6):797-824.
- ROOZENDAAL B, PORTILLO-MARQUEZ G, MCGAUGH JL. Basolateral amygdala lesions block glucocorticoid-induced modulation of memory for spatial learning. **Behav Neurosci.** 1996 Oct;110(5):1074-83.

ROOZENDAAL B. 1999 Curt P. Richter award. Glucocorticoids and the regulation of memory consolidation. **Psychoneuroendocrinology**. 1999 Apr;25(3):213-38.

RUBY NF, HWANG CE, WESSELLS C, FERNANDEZ F, ZHANG P, SAPOLSKY R, HELLER HC. Hippocampal-dependent learning requires a functional circadian system. **Proc Natl Acad Sci USA**. 2008 Oct 7;105(40):15593-8

SAEB-PARSY K, LOMBARDELLI S, KHAN FZ, MCDOWALL K, AU-YONG IT, DYBALL RE. Neural connections of hypothalamic neuroendocrine nuclei in the rat. **J Neuroendocrinol**. 2000; 12635- 648.

SAITO A, BALLINGER MD, PLETNIKOV MV, WONG DF, KAMIYA A. Endocannabinoid system: potential novel targets for treatment of schizophrenia. **Neurobiol Dis**. 2013 May; 53:10-7.

SANDI C, LOSCERTALES M, GUAZA C. Experience-dependent facilitating effect of corticosterone on spatial memory formation in the water maze. **Eur J Neurosci**. 1997 Apr;9(4):637-42.

SANFORD AE, CASTILLO E, GANNON RL. Cannabinoids and hamster circadian activity rhythms. **Brain Res**. 2008 Jul 30;1222:141-8.

SARABDJITSINGH RA, JOËLS M, DE KLOET ER. Glucocorticoid pulsatility and rapid corticosteroid actions in the central stress response. **Physiol Behav**. 2012 Apr 12;106(1):73-80.

SCHLICKER E, KATHMANN M. Modulation of transmitter release via presynaptic cannabinoid receptors. **Trends Pharmacol Sci**. 2001;22:565–72.

SHORS TJ, DRYVER E. Effect of stress and long-term potentiation (LTP) on subsequent LTP and the theta burst response in the dentate gyrus. **Brain Res**. 1994 Dec 15;666(2):232-8.

SINK KS, SEGOVIA KN, COLLINS LE, MARKUS EJ, VEMURI VK, MAKRIYANNIS A, SALAMONE JD. The CB1 inverse agonist AM251, but not the CB1 antagonist AM4113, enhances retention of con-textual fear conditioning in rats. **Pharmacol Biochem Behav**. 2010 Jun; 95(4):479-84.

SINK KS, SEGOVIA KN, SINK J, COLLINS LE, CORREA M, VEMURI VK. Potential anxiogenic effects of cannabinoid CB1 receptor antagonist/inverse agonists in rats: comparisons between AM251, AM4113, and the benzodiazepine inverse agonist, FG-7142. **Europsychofarmacol**. 2010; 20:112–22.

SMITH GP. Adrenal hormones and emotional behavior. **Progress in Physiological**. 1973 Academic Press, New York, pp. 299 – 351.

SOUZA RR. **Papel dos corticosteróides no processamento de memórias aversivas : consequências bidirecionais no condicionamento olfatório de medo**. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina – Centro de Ciências Biológicas - Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Florianópolis - Santa Catarina, 2011.

SPROUSE J. Pharmacological modulation of circadian rhythms: a new drug target in psychotherapeutics. **Expert Opin Ther Targets**. 2004 Feb;8(1):25-38.

STERN CA, GAZARINI L, TAKAHASHI RN, GUIMARÃES FS, BERTOGLIO LJ. On disruption of fear memory by reconsolidation blockade: evidence from cannabidiol treatment. **Neuropsychopharmacology**. 2012 Aug;37(9):2132-42.

STEINER MA, WOTJAK CT. Role of the endocannabinoid system in regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. **Prog Brain Res**. 2008; 170:397-432. Review.

STEPHAN FK, ZUCKER I. Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. **Proc Natl Acad Sci USA**. 1972; 69:1583-1586

TAKAHASHI RN, PAMPLONA FA, FERNANDES MS. The cannabinoid antagonist SR141716A facilitates memory acquisition and consolidation in the mouse elevated T-maze. **Neurosci Lett**. 2005; 380:270–5.

TASKER JG. Rapid glucocorticoid actions in the hypothalamus as a mechanism of homeostatic integration. **Obesity (Silver Spring)**. 2006 Aug;14 Suppl 5:259S-265S

TERMAN M, TERMAN JS. Light therapy for seasonal and nonseasonal depression: efficacy, protocol, safety, and side effects. **CNS Spectr**. 2005 Aug;10(8):647-63; quiz 672.

TERRANOVA JP, STORME JJ, LAFON N, PÉRIO A, RINALDI-CARMONA M, LE FUR G, SOUBRIÉ P. Improvement of memory in rodents by the selective CB1 cannabinoid receptor antagonist, SR 141716. **Psychopharmacology (Berl)**. 1996 Jul;126(2):165-72.

TRIFILIEFF P, HERRY C, VANHOUTTE P, CABOCHE J, DESMEDT A, RIEDEL G, MONS N, MICHEAU J. Foreground contextual fear memory consolidation requires two independent phases of hippocampal ErK/crEB activation. **Learn Mem**. 2006; 13:349–358.

TSANG AH, BARCLAY JL, OSTER H. Interactions between endocrine and circadian systems. **J Mol Endocrinol.** 2013; Aug 30.

VALENTI M, VIGANÒ D, CASICO MG, RUBINO T, STEARDO L, PAROLARO D, DI MARZO V. Differential diurnal variations of anandamide and 2-arachidonoyl-glycerol levels in rat brain. **Cell Mol Life Sci.** 2004 Apr; 61(7-8):945-50.

VAN DER ZEE EA, BOERSMA GJ, HUT RA. The neurobiology of circadian rhythms. **Curr Opin Pulm Med.** 2009 Nov;15(6):534-9.

VAUGHN LK, DENNING G, STUHR KL, DE WIT H, HILL MN, HILLARD CJ. Endocannabinoid signalling: has it got rhythm? **Br J Pharmacol.** 2010 Jun;160(3):530-43.

VYAZOVSKIY VV, CIRELLI C, PFISTER-GENSKOW M, FARAGUNA U, TONONI G. Molecular and electrophysiological evidence for net synaptic potentiation in wake and depression in sleep. **Nature Neuroscience.** 2008 Feb;11(2):200-8.

WILSON RI, NICOLL RA. Endogenous cannabinoids mediate retrograde signaling at hippocampal synapses. **Nature.** 2001; 410, 588–592.

WISE LE, IREDALE PA, LICHTMAN AH. The cannabinoid CB(1) receptor antagonist CE prolongs spatial memory duration in a rat delayed radial arm maze memory task. **Eur J Pharmacol.** 2008; Aug 20;590(1-3):246-9.

WITTMANN G, DELI L, KALLO I, HRABOVSKY E, WATANABE M, LIPOSITS Z, FEKETE C. Distribution of type 1 cannabinoid receptor (CB1)-immunoreactive axons in the mouse hypothalamus. **J Comp Neurol.** 2007; Jul 10;503(2):270-9.

WOLFF MC, LEANDER JD. SR141716A, a cannabinoid CB1 receptor antagonist, improves memory in a delayed radial maze task. **Eur J Pharmacol.** 2003; Sep 23;477(3):213-7.

WOTJAK CT. Role of endogenous cannabinoids in cognition and emotionality. **Mini Rev Med Chem.** 2005 Jul; 5(7):659-70.

YERKES RM, DODSON, JD. The relation of strength of stimulus to rapidity of habit-formation. **J Comp Neurol Psychol.** 1908; 18: 459–482.

YIM TT, HONG NS, EJAREDAR M, MCKENNA JE, McDONALD RJ. Post-training CB1 cannabinoid receptor agonist activation disrupts long-term consolidation of spatial memories in the hippocampus. **Neuroscience.** 2008; Feb 19;151(4):929-36.

YOUNG EA, ABELSON J, LIGHTMAN SL. Cortisol pulsatility and its role in stress regulation and health. **Front Neuroendocrinol.** 2004 Jul; 25(2):69-76.

ZARRINDAST MR, NAVAEIAN M, NASEHI M. Influence of three-day morphine-treatment upon impairment of memory consolidation induced by cannabinoid infused into the dorsal hippocampus in rats. **Neuroscience Research** 2011 Jan; 69(1):51-9.

ZUARDI AW, SHIRAKAWA I, FINKELFARB E, KARNIOL IG. Action of cannabidiol on the anxiety and other effects produced by delta 9-THC in normal subjects. **Psychopharmacology.** 1982 76:245–250.