



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**MARIA CAMILA SANTOS DE OLIVEIRA**

**EFEITO DO CANABIDIOL NO COMPORTAMENTO TIPO ANSIOSO E NA  
FORMAÇÃO DE MEMÓRIA AVERSIVA EM RATAS**

**SÃO CRISTOVÃO**

**2024**

MARIA CAMILLA SANTOS DE OLIVEIRA

EFEITO DO CANABIDIOL NO COMPORTAMENTO TIPO ANSIOSO E NA FORMAÇÃO DE MEMÓRIA AVERSIVA EM RATAS

2025

**MARIA CAMILA SANTOS DE OLIVEIRA**

**EFEITO DO CANABIDIOL NO COMPORTAMENTO TIPO ANSIOSO E NA  
FORMAÇÃO DE MEMÓRIA AVERSIVA EM RATA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Sergipe, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

**Orientador:** Prof. Dr. José Ronaldo dos Santos

**Coorientador:** Prof. Dr. Auderlan M. de Gois

**SÃO CRISTOVÃO**

**2024**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

O48e Oliveira, Maria Camila Santos de  
Efeito do canabidiol no comportamento tipo ansioso e na formação de memória aversiva em rata / Maria Camila Santos de Oliveira ; orientador José Ronaldo dos Santos. – São Cristóvão, SE, 2024.  
61 f. : il.

Dissertação (mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal de Sergipe, 2024.

1. Ansiedade. 2. Estro. 3. Canabinóides. 4. Fêmeas. 5. Estimulação aversiva. I. Santos, José Ronaldo dos, orient. II. Título.

CDU 612.621.5:582.635.38

**MARIA CAMILA SANTOS DE OLIVEIRA**

**EFEITO DO CANABIDIOL NO COMPORTAMENTO TIPO ANSIOSO E NA  
FORMAÇÃO DE MEMEMÓRIA AVERSIVA EM RATAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Sergipe, etapa de qualificação, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

**Orientador:** Prof. Dr. José Ronaldo dos Santos

**Coorientador:** Prof. Dr. Auderlan M. de Gois

---

Prof. Dr. José Ronaldo dos Santos (UFS)  
Presidente da banca

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Debora Estadella (UNIFESP)  
1<sup>a</sup> Examinadora (Avaliadora Externa)

---

Prof. Dr. Enilton Aparecido Camargo (UFS)  
2<sup>a</sup>. Examinadora (Avaliador Interno)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

## AGRADECIMENTOS

Aqui finalizo mais um ciclo da minha vida. Nesta experiência vivenciada aprendi coisas fascinantes da fisiologia. Foi muito gratificante mergulhar nesse mundo pelo qual sou apaixonada. Foram dois anos de muito aprendizado que possibilitaram meu crescimento pessoal e profissional. Palavras não são suficientes para descrever o sentimento de gratidão que habita em meu coração. Mas, não poderia deixar de escrever os meus sinceros agradecimentos.

Primeiramente, agradeço a Deus pela oportunidade de ter vivido essa experiência. Se fui capaz de chegar até aqui é porque ele sempre esteve comigo, até mesmo nos momentos que me senti incapaz de continuar. Agradeço a nossa senhora, minha mãezinha, por toda intercessão e proteção durante minha caminhada.

Agradeço a mim mesma, por não ter desistido e ter se mantido firme nesse desafio. Durante esse período, muitas coisas aconteceram, boas e ruins. Em meio às dificuldades, ao sentimento de medo e angústia, sempre tive um ombro amigo para desabafar e tentar enxergar tudo com um novo olhar. Aqui agradeço especialmente a Micaelle, Mylaine, Milena, Leilinha e as meninas que chegaram um pouco depois, Ana Carla, Iasmin e Raquel. Grata por me ouvirem, por me acolherem e por todos os momentos de conversas aleatórias (kkkkk). Obrigada pela amizade meninas!

Grata, especialmente, a Micaelle que foi minha parceira de disciplina. Sempre quando íamos pra UFS, no ônibus das 7h40min, o caminho pra São Cristóvão se tornava curto, pois íamos discutindo os conteúdos das aulas durante todo o caminho. Acredito que muitas pessoas odiavam sentar perto da gente (kkk), porque somos muito empolgadas e quem conhece sabe. Não poderia deixar de agradecer ao meu orientador Ronaldo e coorientador Auderlan que graças a Deus tiveram muita paciência durante esses dois anos. Obrigada pela dedicação, compreensão e por todo conhecimento compartilhado. Todas as orientações, todos os conselhos foram essenciais para o meu crescimento. Muito obrigada!

No meio do meu mestrado fui surpreendida com a chegada de minha gravidez que, no início, me deixou um pouco desestabilizada, mas foi uma benção na minha vida. Foram muitas coisas acontecendo, dissertação pra escrever, parte molecular pra finalizar e que até então estava tudo correndo bem e eu como sempre muito apressada. Quem me conhece sabe o quanto sou agoniada (kkk). Mas logo depois, comecei a apresentar algumas complicações na gravidez, idas

mais frequentes ao médico, remédio, repouso, preocupação e dor resumiam esse final de mestrado. Fiquei afastada do laboratório e mal conseguia escrever, pois era muito difícil ficar sentada. Tudo isso me fez desacreditar que eu seria capaz de finalizar o mestrado e acabava ficando muito frustrada e me sentindo incapaz com tudo isso.

Mas, no meio disso tudo o sentimento de gratidão e alegria por estar gerando o amor da minha vida, meu pequeno João Lucas, me acalmava. Agradeço ao meu amado e querido esposo Fernando, que sempre esteve comigo e foi tranquilizador nos momentos de angústia e desespero. Sua presença nesse processo foi indispensável. Ele que me mostrava que tudo ficaria bem e que me passava a certeza que eu conseguiria. Seu incentivo foi importante nesse processo. Ele que sempre esteve tão presente e que me ouvia quando tinha algum problema nos experimentos ou quando eu estava transbordando de alegria, pois estava correndo tudo bem. Te agradeço, Fernando, por tudo e por tanto.

Agradeço ao meu filho João Lucas por ter me ensinado a ir devagar e me desacelerar, viver cada dia e entender que cada passo é muito importante. A sua presença me acalma e me mostra que está tudo bem. Em cada chute seu pude sentir sua presença e amar-te cada vez mais.

Agradeço, mais uma vez, ao meu orientador Ronaldo por toda preocupação, cuidado e empatia durante esse tempo de afastamento do laboratório. Sempre preocupado e atencioso com minha situação. Gratidão por acreditar em mim!

Agradeço a minha família por estar sempre presente na minha vida e serem tão importante em tudo da minha vida. Vocês foram extremamente importantes pra eu ser quem eu sou e pra estar aqui. Agradeço especialmente a minha mãe Maria Aparecida, mulher forte e guerreira e a meus irmãos que sempre estiveram comigo durante todos esses anos. Saibam que cada um foi extremamente importante para que eu conseguisse chegar aqui. Também a minha vó e meus tios, por serem meu porto seguro e o lugar de paz e tranquilidade. As idas a casa de vovó, lugar de reunião familiar, lugar de muitas conversas e muito barulho, mas que foi importante para que eu pudesse me desligar de tudo que acontecia. Agradeço a família de Fernando, por me acolher e serem tão presentes na minha vida, local onde também se tornou minha casa e que sempre estavam dispostos a ajudar.

Agradeço a todos do laboratório de neurobiologia comportamental e evolutiva (Lance), por toda parceria, dedicação e companheirismo nesse processo. Sem vocês não seria possível

finalizar esse trabalho. Obrigada por todas as partilhas e conversas aleatórias. Agradeço a minha equipe de experimento. Sem vocês nada seria possível. Obrigada por todo o trabalho e dedicação para que tudo ocorresse bem.

Agradeço à Universidade Federal de Sergipe e a todos que fazem parte dela por todo o suporte necessário para que esse trabalho fosse finalizado. Agradeço ao Programa de Pós-graduação em ciências Fisiológicas (PROCFIS) e todos os professores que fazem parte, por todo o acompanhamento e auxílio para que esse trabalho fosse executado.

## RESUMO

### EFEITO DO CANABIDIOL NO COMPORTAMENTO TIPO ANSIOSO E NA FORMAÇÃO DE MEMEMÓRIA AVERSIVA EM RATAS, Maria Camila Santos de Oliveira, São Cristóvão, 2024.

A ansiedade é um estado adaptativo que provoca comportamentos defensivos diante de situações desconhecidas ou potencialmente perigosas, podendo atingir quadros patológicos. Estudos mostram que a ansiedade é mais prevalente no sexo feminino e pode estar relacionada à oscilação hormonal durante o ciclo menstrual. No entanto, em mulheres, o tratamento da ansiedade com ansiolíticos apresenta baixa eficiência e muitos efeitos adversos. Nesse sentido, novos compostos vêm sendo estudados para o tratamento da ansiedade. Entre eles, destaca-se o canabidiol (CBD), que tem apresentado potencial terapêutico para problemas emocionais e psicológicos. Assim, o presente trabalho objetivou avaliar o efeito do canabidiol no comportamento tipo ansioso e na formação de memória aversiva em ratas. Foram utilizadas 42 ratas, com três meses de idade, da linhagem Wistar, distribuídas em três grupos: controle (CTR), tratados com solução salina NaCl 0,9%, diazepam (DZP) 2,0mg/kg e canabidiol (CBD) 0,3mg/kg. Por 10 dias o ciclo estral das ratas foi acompanhado para confirmação das fases do ciclo estral e o experimento ocorreu na fase de diestro tardio. Após a confirmação, as ratas receberam uma injeção intraperitoneal de acordo com os grupos experimentais, respectivamente. 1 h após a injeção, os animais foram submetidos ao labirinto em cruz elevado modificado e, 1 h após o teste, foram anestesiados, sacrificados os encéfalos coletados e submetidos à imunohistoquímica para c-Fos. Observamos que os grupos DZP e o CBD apresentaram redução da ansiedade e apenas o grupo DZP apresentou prejuízo na formação da memória. Na análise da imunorreatividade para c-Fos, observamos uma redução do número de células c-Fos+ para os grupos CBD e DZP na substância cinzenta paraquedutal (PAG) dorsomedial ( $p < 0,05$ ), hipocampo ( $p < 0,05$ ) e hipotálamo ( $p < 0,05$ ), quando comparados ao CTR. No entanto, na PAG ventromedial houve um aumento de células c-Fos+ para os grupos CBD ( $p < 0,05$ ) e DZP ( $p < 0,05$ ), comparado ao CTR. O CBD provocou uma redução de c-Fos+ no locus coeruleus ( $p < 0,05$ ) e um aumento no leito da estria terminal ( $p < 0,05$ ) comparado aos demais grupos. Na amígdala, o grupo DZP apresentou uma redução de c-Fos+ comparado aos demais grupos. Dessa forma, nossos dados sugerem que o tratamento agudo com CBD provoca efeito ansiolítico sem prejuízos na memória de ratas na fase do ciclo diestro tardio, por envolver a atuação de diferentes áreas cerebrais.

**Palavras-chave:** Ansiedade, fêmeas, ciclo estral, canabinoide

## ABSTRACT

### **EVALUATION OF THE ANXIOLYTIC EFFECT OF CBD AND ITS ROLE DURING THE FORMATION OF AN AVERSIVE MEMORY IN RATS, Maria Camila Santos de Oliveira, São Cristóvão, 2024.**

Anxiety is an adaptive state that causes defensive behavior in the face of unfamiliar or potentially dangerous situations, which can lead to pathological conditions. Studies show that anxiety is more prevalent in women and may be related to hormonal fluctuations during the menstrual cycle. However, in women, the treatment of anxiety with anxiolytics has low efficiency and many adverse effects, so new compounds have been studied for the treatment of anxiety. One of these is cannabidiol (CBD), which has shown therapeutic potential for emotional and psychological problems. The aim of this study was to evaluate the effect of cannabidiol on anxiety-like behavior and the formation of aversive memory in female rats. Forty-two three-month-old Wistar female rats were divided into three groups: control (CTR), treated with 0.9% NaCl saline, diazepam (DZP) 2.0mg/kg and cannabidiol (CBD) 0.3mg/kg. The rats' estrous cycle was monitored for 10 days to confirm the phases of the estrous cycle and the experiment took place in the late diestrus phase. After confirmation, the rats received an intraperitoneal injection according to the experimental groups, respectively. 1 hour after the injection, the animals were submitted to the modified elevated cross maze and, 1 hour after the test, they were anesthetized, sacrificed and the brains collected and submitted to immunohistochemistry for c-Fos. We observed that the DZP and CBD groups showed reduced anxiety and only the DZP group showed impaired memory formation. In the analysis of c-Fos immunoreactivity, we observed a reduction in the number of c-Fos+ cells for the CBD and DZP groups in the dorsomedial paraventricular gray matter (PAG) ( $p < 0.05$ ), hippocampus ( $p < 0.05$ ) and hypothalamus ( $p < 0.05$ ), when compared to the CTR. However, in the ventromedial PAG there was an increase in c-Fos+ cells for the CBD ( $p < 0.05$ ) and DZP ( $p < 0.05$ ) groups, compared to the CTR. CBD caused a reduction in c-Fos+ in the locus coeruleus ( $p < 0.05$ ) and an increase in the bed nucleus of the stria terminalis ( $p < 0.05$ ) compared to the other groups. In the amygdala, the DZP group showed a reduction in c-Fos+ compared to the other groups. Thus, our data suggest that acute treatment with CBD has an anxiolytic effect without impairing the memory of female rats in the late diestrus phase, as it involves the action of different brain areas.

**Keywords:** Anxiety, females, estrous cycle, cannabinoid.

## RESUMO PARA A SOCIEDADE

A ansiedade é uma resposta fisiológica que provoca comportamentos defensivos, diante de determinadas situações desconhecidas ou potencialmente perigosas. Mesmo sendo um sentimento natural, fisiológico e importante para as espécies, anormalidades no processamento dessa emoção pode gerar um quadro patológico, que podem comprometer a vida diária das pessoas. Além disso, as respostas alteradas de ansiedade apresentam maior prevalência em pessoas do sexo feminino quando comparado ao sexo masculino. Essa maior prevalência pode ser respondida, em partes, pela influência dos hormônios sexuais femininos, que oscilam durante o ciclo menstrual. Um outro ponto importante a se destacar é que o tratamento farmacológico da ansiedade para mulheres apresenta uma menor eficácia e muitos efeitos colaterais. Nesse sentido, novos compostos vêm sendo estudados para o tratamento dos quadros patológicos de ansiedade. Entre eles, destaca-se o o canabidiol (CBD), um dos compostos presentes na planta *Cannabis sativa* (maconha), que tem apresentado potencial terapêutico para problemas emocionais e psicológicos. Diante disso, o presente trabalho objetivou avaliar o efeito do canabidiol no comportamento tipo ansioso e também na formação de memória aversiva em ratas durante a fase de diestro tardio, fase que representa o período pré-menstrual em mulheres, quando os níveis de ansiedade são mais elevados. Para organizamos as ratas em três grupos: o grupo que foi tratado com uma única injeção de uma solução em que foram diluídos os demais fármacos (chamado de grupos Controle), o grupo que recebeu canabidiol na dose de 0,3mg/kg (grupo CBD) e o grupo que foi tratado com Diazepam na dose de 1,5mg/kg (grupo DZP), para que assim pudéssemos comparar com um medicamento que já é utilizado no tratamento agudo para a ansiedade. As ratas foram tratadas de acordo com o grupo ao qual estavam incluídas e 1 h após a injeção elas foram submetidas a uma tarefa em um labirinto em cruz, que possuem dois braços abertos, um braço seguro e um braço contendo estímulos aversivos (luz e som). Como a plataforma desse labirinto fica a 60 cm de altura, as medidas nos braços abertos são utilizadas como parâmetro de ansiedade, já que são desprotegidos. Já a permanência no braço seguro e a evitação do braço aversivo são parâmetros de memória. Como resultado, observamos que o CBD, semelhante ao DZP, foi capaz de reduzir o comportamento tipo ansioso nas fêmeas. Além disso, foi observado que o CBD não causou perda de memória nesses animais, como é observado no tratamento com o DZP. Ao analisarmos as áreas cerebrais dos animais estudados, observamos que o CBD e o DZP induziram diferentes padrões de atividade cerebrais em áreas envolvidas com o processamento da ansiedade e da memória, o que pode ser uma das causas para o CBD ser capaz de reduzir a ansiedade em fêmeas e não causar perda de memória.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Circuito da ansiedade .....	7
Figura 2: Imagens representativas das fases do ciclo estral.....	17
Figura 3: Delineamento Experimental.....	18
Figura 4: Efeito da administração de diazepam e CBD, na atividade exploratória no teste labirinto em cruz elevado modificado. ....	24
Figura 5: Efeito da administração de diazepam e canabidiol, no número de entradas nos braços do labirinto em cruz elevado modificado. ....	26
Figura 6: Efeito da administração de diazepam e CBD, no tempo de permanência nos braços do labirinto em cruz elevado modificado .....	28
Figura 7: Efeito da administração de diazepam e CBD, no número de entradas e curva de aprendizagem minuto a minuto no braço aversivo no teste labirinto em cruz elevado modificado.....	30
Figura 8: Efeito da administração de diazepam e CBD, na imunorreatividade para c-Fos no Locus coeruleus .....	31
Figura 9: Efeito da administração de diazepam e CBD, na imunorreatividade para c-Fos no Núcleo dorsal da rafe.....	32
Figura 10: Efeito da administração de diazepam e CBD, na imunorreatividade para C-Fos na PAG .....	33
Figura 11: Efeito da administração de diazepam e CBD, na imunorreatividade para C-Fos na Amígdala e no núcleo do leito da estria terminal. ....	34
Figura 12: Efeito da administração de diazepam e CBD, na imunorreatividade para C-Fos no hipocampo. ....	36
Figura 13: Efeito da administração de diazepam e CBD, na imunorreatividade para C-Fos no CPFm e no córtex ínsular. ....	37
Figura 14: Efeito da administração de diazepam e CBD, na imunorreatividade para C-Fos no hipotálamo. ....	38
Figura 15: Imagem representativa da imunorreatividade para C-Fos no hipocampo.....	38
Figura 16: Imagem representativa da imunorreatividade para C-Fos no hipotálamo. ....	40

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>BLA</b>	Amígdala basolateral
<b>BNST</b>	Núcleo do leito da estria terminal
<b>BZD</b>	Benzodiazepínicos
<b>CEA</b>	Amígdala central
<b>CBD</b>	Canabidiol
<b>CPFm</b>	Córtex pré-frontal medial
<b>CRH</b>	Hormônio liberador de corticotropina
<b>CTR</b>	Controle
<b>DZP</b>	Diazepan
<b>HPA</b>	Hipotálamo-hipófise-adrenal
<b>HPCd</b>	Hipocampo dorsal
<b>HPCv</b>	Hipocampo ventral
<b>IMAO</b>	Inibidores da monoamino oxidase
<b>IRSN</b>	Inibidores da recaptção de serotonina e noradrenalina
<b>ISRS</b>	Inibidores seletivos da recaptção de serotonina
<b>PAG</b>	Substância cinzenta paraquedutal
<b>PVN</b>	Núcleo paraventricular do hipotálamo
<b>THC</b>	$\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol
<b>vHPC</b>	Hipocampo ventral
<b>TPM</b>	Tensão pré-menstrual (TPM)
<b>GABA</b>	ácido gama-aminobutírico

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	3
<b>2.1. Ansiedade</b> .....	3
<b>2.2. Influência dos hormônios sexuais na ansiedade</b> .....	7
<b>2.3. Sistema endocanabinoide</b> .....	10
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	15
<b>3.1. Objetivo geral:</b> .....	15
<b>3.2. Objetivos específicos:</b> .....	15
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	16
<b>4.1. Animais</b> .....	16
<b>4.2. Drogas</b> .....	16
<b>4.3. Procedimentos gerais</b> .....	16
<b>4.4. Delineamento experimental</b> .....	18
<b>4.5. Testes comportamentais:</b> .....	19
<b>4.6. Perfusão e processamento dos encéfalos</b> .....	20
<b>4.7. Imuno-histoquímica</b> .....	21
<b>4.8. Aquisição e análise das imagens</b> .....	21
<b>4.9. Análise estatística</b> .....	22
<b>5. RESULTADOS</b> .....	23
<b>5.1. Labirinto em cruz elevado modificado</b> .....	23
<b>5.2. Imunorreatividade para c-Fos</b> .....	31
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	41
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	41

<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>48</b>
--	-----------

## 1. INTRODUÇÃO

A ansiedade é um estado adaptativo que provoca comportamentos defensivos, diante de determinadas situações (LeDoux & Pine, 2016; Yamamori & Robinson, 2023). A ansiedade se difere do medo, pois o medo é um sentimento consciente evocado por uma ameaça ou perigo iminente, enquanto que a ansiedade é uma antecipação de uma ameaça ou perigo futuro real ou imaginário (Penninx et al., 2021). Sendo caracterizada por um estado de alta excitação e prevalência de pensamentos negativos, a ansiedade causa um estado de maior vigilância, podendo ser definida como um estado subjetivo de tensão, pensamentos negativos, bem como alterações fisiológicas, incluindo sudorese, tontura, aumento da pressão arterial e frequência cardíaca (Calhoun & Tye, 2015a; Mack et al., 2023).

A ansiedade está presente durante toda a vida da pessoa e, em níveis ótimos, pode ser entendida como um sentimento normal e natural que alerta o indivíduo para novos eventos que podem o colocar em risco (Bouras et al., 2023; Kenwood et al., 2022; Murray B. Stein & Thomas Steckler, 2010). Ela é caracterizada pelo estado de elevada excitação, maior vigilância e sentimentos gerais de aversividade na ausência de uma ameaça imediata (Mack et al., 2023). Mesmo sendo um sentimento natural e fisiológico, anormalidades nos circuitos neurais, como a ansiedade persistente, excessiva e inadequada, devido a fatores genéticos e ambientais, podem levar o indivíduo a desenvolver transtornos de ansiedade que comprometem a vida diária (Bandelow & Michaelis, 2015).

Sendo atualmente uma das principais causas de incapacidade em todo o mundo, 33,7% da população mundial é afetada por, pelo menos, um transtorno de ansiedade durante a vida (Bandelow & Michaelis, 2015b; VosT. et al., 2020). A ansiedade é mais prevalente em pessoas do sexo feminino, quando comparado ao sexo masculino. Estudos mostram que esses resultados podem ser influenciados pelos hormônios sexuais femininos (Devall et al., 2009; Hantsoo & Epperson, 2017). Durante a fase lútea tardia há um declínio brusco nos níveis de progesterona e essa redução pode ser uma das causas do aumento dos sintomas da tensão pré-menstrual (TPM).

Em ratas os níveis de progesterona também diminuem rapidamente durante a fase final do ciclo estral, o qual chamamos de diestro tardio. Esse declínio causa também uma diminuição

do metabólito neuroativo da progesterona, a alopregnanolona (ALLO). Esse metabólito, causa uma regulação positiva da expressão da subunidade do receptor o ácido gama-aminobutírico (GABA<sub>A</sub>) extra-sináptico, causando uma excitabilidade dos circuitos neurais envolvidos na mediação de comportamento tipo ansioso nesses animais (Devall et al., 2009; Machado Figueiredo et al., 2019).

O tratamento da ansiedade com ansiolíticos, em mulheres, apresenta baixa eficiência e muitos efeitos adversos, nesse sentido, novos compostos vêm sendo estudados para o tratamento da ansiedade. Entre eles, destaca-se o o canabidiol (CBD), que tem apresentado potencial terapêutico para problemas emocionais e psicológicos (Amin et al., 2005; Salviato et al., 2021; Sramek et al., 2016).

Em um estudo com ratas foi visto que doses baixas de CBD reduziram o comportamento tipo ansioso nesses animais (Salviato et al., 2021). No entanto, nesse trabalho não foi observada a influência da fase do ciclo. Um estudo desenvolvido por Fabris, et. al. (2022) observou que uma dose baixa de CBD foi capaz de reduzir o comportamento tipo ansioso de ratas no diestro tardio. No entanto, nesse trabalho não foi comparado o efeito do CBD em relação aos medicamentos que já são usados na clínica para o tratamento de ansiedade. Além disso, também não foi avaliado quais os núcleos do circuito da ansiedade participavam desse efeito. Assim, o presente trabalho objetiva avaliar o efeito do canabidiol no comportamento tipo ansioso e na formação de memória aversiva em ratas.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Ansiedade

A ansiedade é um estado adaptativo que provoca comportamentos defensivos diante de situações potencialmente ameaçadoras (LeDoux & Pine, 2016; Yamamori & Robinson, 2023) e, evolutivamente, esse comportamento foi preservado nas espécies como mecanismo de defesa do organismo. Diferente do medo, um sentimento consciente evocado por uma ameaça ou perigo iminente, a ansiedade é uma antecipação de ameaça ou perigo futuro, real ou imaginário (Penninx et al., 2021).

A ansiedade é um sentimento natural, o qual deixa o indivíduo em estado de alerta para eventos que possam o coloca-lo em risco, podendo gerar comportamentos de luta ou fuga (Bouras et al., 2023; Kenwood et al., 2022; Murray B. Stein & Thomas Steckler, 2010). Logo, a ansiedade é caracterizada por um estado de alta excitação e prevalência de pensamentos negativos, gerando um estado de maior vigilância, definido como um estado subjetivo de tensão, pensamentos preocupados e sentimentos gerais de aversividade na ausência de uma ameaça imediata. Além disso, provoca alterações fisiológicas, como sudorese, tontura, aumento da frequência cardíaca e da pressão arterial (Calhoun & Tye, 2015a; Mack et al., 2023). Dessa forma, podemos considerá-la como uma função adaptativa, que proporciona ao indivíduo um estado de hipervigilância que aumenta a probabilidade de detecção de ameaças no ambiente e a elaboração de estratégias defensivas apropriadas de acordo com a proximidade da ameaça (Kenwood et al., 2022).

Apesar de ser fisiologicamente natural, a ansiedade persistente, excessiva e inadequada, devido a fatores genéticos ou ambientais pode provocar anormalidades nos circuitos neurais e gerar transtornos de ansiedade, que comprometem a qualidade de vida das pessoas (Bandelow & Michaelis, 2015). Atualmente, os transtornos de ansiedade estão entre as principais causas de incapacidade, afetando 33,7% da população mundial em algum momento da vida (Bandelow & Michaelis, 2015b; VosT. et al., 2020). Entre os transtornos de ansiedade, estão o transtorno de ansiedade generalizada, transtorno de pânico, transtorno de ansiedade de separação, fobia social, agorafobia e fobias específicas (Ghasemi et al., 2022). Esses diferem entre si de acordo com os objetos ou situações que induzem medo, ansiedade ou comportamento de esquiva e na

ideação cognitiva associada, podendo assim serem diferenciados por exames detalhados de acordo com o tipo de situação que são temidas ou evitadas e pelo conteúdo dos pensamentos ou crenças associadas (DMS-5).

Vários circuitos neurais estão envolvidos nas repostas fisiológicas e comportamentais associadas à ansiedade. No entanto, alguns núcleos encefálicos, como a amígdala, o núcleo do leito da estria terminal (BNST), o hipocampo ventral (vHPC), o córtex pré-frontal e o hipotálamo desempenham papel-chave no controle dessas repostas (Calhoon & Tye, 2015; Tovote et al., 2015).

A amígdala desempenha um papel fundamental na regulação e processamento das emoções, incluindo a ansiedade. A amígdala é formada por 13 subnúcleos interligados que integra informações aferentes sensoriais talâmicas e corticais para gerar diversas repostas eferentes relacionadas à ansiedade. Esses formam o complexo amigdalóide, localizado no lobo temporal medial, esses subnúcleos são: núcleo lateral (LA); núcleo basolateral (BLA); núcleo basal acessório (AB); núcleo do trato olfatório lateral (NLOT); o núcleo do leito do trato olfatório acessório (BAOT); o núcleo cortical anterior e posterior (CoA e CoP, respectivamente); córtex periamigdalóide (PAC); Amígdala central (CeA); medial (M); área anterior da Amígdala (AAA); área amigdaló-hipocampal (AHA) e núcleos intercalados (I)(Babaev et al., 2018a; Sah et al., 2003). Entre estes, os núcleos basolateral (BLA) e central (CeA) da amígdala destacam-se no processamento da ansiedade (Adhikari, 2014; Janak & Tye, 2015). A BLA está envolvida no processamento do valor de ameaça de um estímulo, dessa forma as informações sensoriais que chegam na amígdala se projetam para o núcleo BLA, principal local de entrada da amígdala, onde são processadas e enviadas para o núcleo CeA, este por sua vez, é uma região de saída que se projeta para várias regiões encefálicas, está envolvido no processamento das repostas defensivas básicas, como repostas autonômicas e motoras (Freese & Amaral, 2006; Savander et al., 1997).

O núcleo do leito da estria terminal (BNST) tem forte comunicação com os núcleos da amígdala, sendo muitas vezes considerado uma extensão da amígdala, uma vez que suas porções lateral, medial e caudal recebem projeções, principalmente, da CeA, MeA e BLA, respectivamente (Davis et al., 2010). Além disso, BNST recebe projeções viscerossensorial e noradrenérgica, principalmente do trato solitário (núcleo do tronco cerebral) e da medula

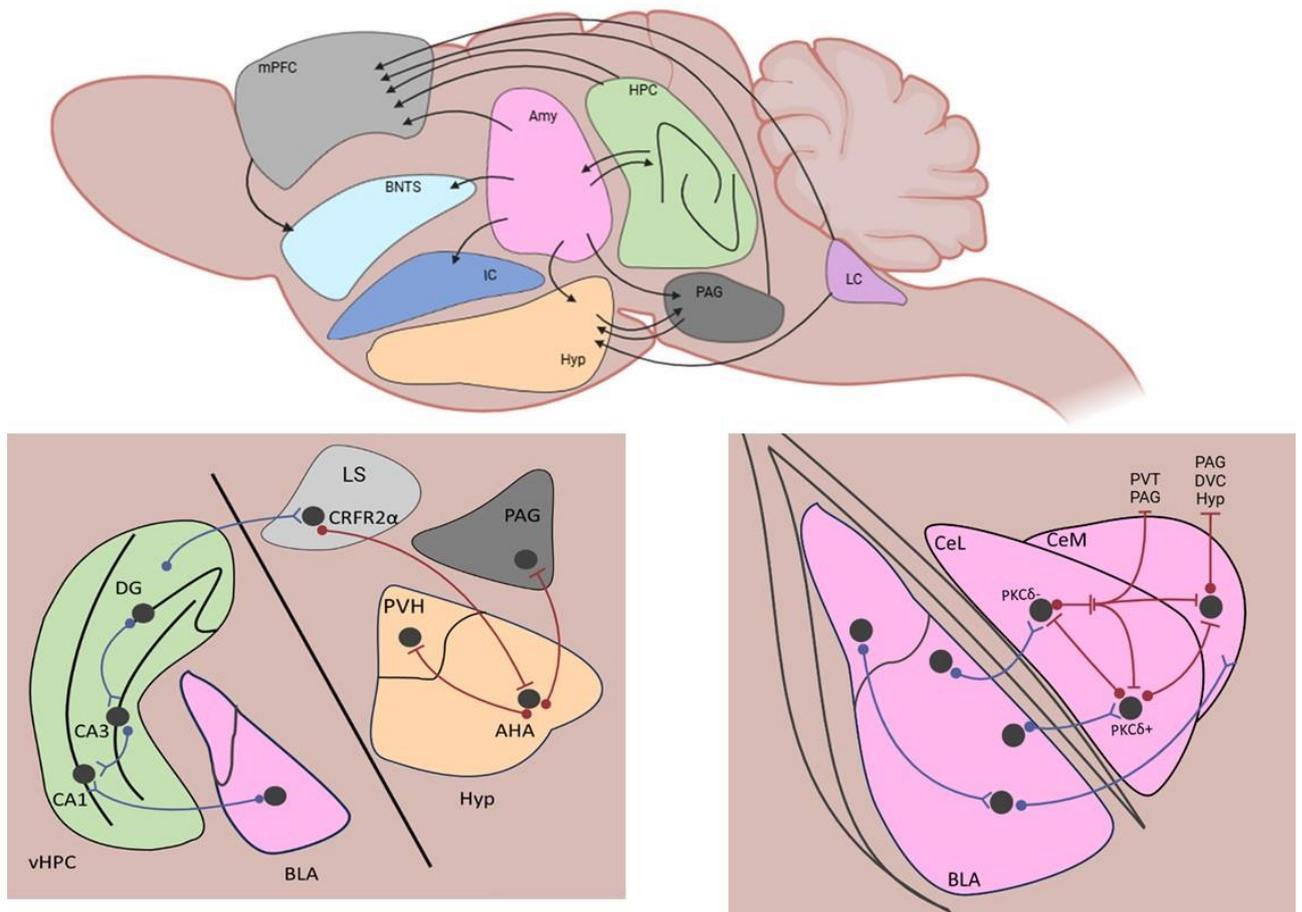
ventrolateral. Assim BNST é uma associação visceral-central, integrando sinais pré-autônomos descendentes e sinais viscerossensoriais ascendentes (Ellenbroek & Charles Marsden, n.d.; Freese & Amaral, 2006; Sladky et al., 2024). Outras regiões límbicas também estão associadas à amígdala no processamento das respostas emocionais, como o hipotálamo e a substância cinzenta periaquedutal (PAG), as quais são responsáveis pela regulação do sistema nervoso autônomo (Craske & Stein, 2016; Ghasemi et al., 2022b; Martin et al., 2009). Assim para avaliar uma situação como ameaçadora, o indivíduo detecta estímulos ambientais, por meio do sistema sensorial e assim é possível julgá-lo como aversivo ou como um possível potencial perigoso, para então termos uma atividade coordenada na amígdala, BNST, HPC, CPF e o córtex insular ou ínsula, que estão envolvidos no controle de funções sensoriais, emocionais, fisiológicas, motivacionais e cognitivas (Berret et al., 2019; Nieuwenhuys, 2012; Uddin et al., 2017; Berret et al., 2019; Cauda et al., 2011; Gehrlach et al., 2019; Thompson, 2002), (figura 1). Além disso, estudos mostram que em situações que geram ansiedade, a atividade insular aumenta, mas a administração de ansiolítico reduz sua atividade (Lopes et al., 2024; Paulus et al., 2005), sugerindo que o córtex insular desempenha um importante papel nas manifestações de ansiedade.

De modo geral, durante episódios de ansiedade, a amígdala coordena a resposta ansiosa, o hipocampo medeia os processos de aprendizagem e memória e o córtex pré-frontal, governa a função cognitiva, essas estruturas são altamente interconectadas, com múltiplas projeções recíprocas (Bao & Swaab, 2019; Shupe et al., 2024). Essas áreas, em conjunto, atuam no processamento do comportamento do medo frente a um potencial ameaçador, caracterizando episódios de ansiedade. Além disso, associado a esse circuito, o hipotálamo, através do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), atua como integrador gerando respostas autonômicas, endócrinas e comportamentais. E apesar de várias áreas hipotalâmicas estarem envolvidas, o núcleo paraventricular (PVN), é o principal núcleo hipotalâmico envolvido nas respostas autonômicas de estresse (Fiksdal et al., 2019; Lamotte et al., 2021; Weera et al., 2023). Além disso, por apresentar neurônios do hormônio liberador de corticotropina (CRH), o PVN é responsável pela estimulação da secreção de glicocorticoides, e atua como uma região crítica para a função e regulação de respostas fisiológicas associadas a ansiedade (Ghasemi et al., 2022b; Li et al., 2023; Liu et al., 2024; Shao et al., 2022; Vila-Merkle et al., 2023).

Outra estrutura do sistema límbico envolvida no processamento das emoções é o hipocampo, o qual pode ser dividido em hipocampo dorsal (HPCd) - essencial no processamento do aprendizado, memória episódica e no mapeamento espacial, e em hipocampo ventral (HPCv) - envolvido no processamento da memória emocional, no estresse e na ansiedade. No entanto, ainda não está claro seu papel na ansiedade, uma vez que estudos mostram seu envolvimento tanto na promoção quanto na supressão da ansiedade, por meio de diferentes alvos de projeção (Adhikari et al., 2010; Ghasemi et al., 2022b; Strange et al., 2014; Vila-Merkle et al., 2023; Wang et al., 2019).

A ansiedade pode ser desencadeada por estímulos externos que causam perturbações neuroendócrinas e de neurotransmissores em diferentes núcleos encefálicos. Em especial, os neurotransmissores, serotonina, ácido gama-aminobutírico (GABA), glutamato, noradrenalina e dopamina, medeiam a sinalização entre os principais núcleos envolvidos na ansiedade e a desregulação na comunicação desses núcleos pode resultar em desenvolvimento de transtornos de ansiedade (Martin et al., 2009). Dessa forma, os principais medicamentos utilizados para tratamento desses transtornos, como inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS), inibidores da recaptação de serotonina e noradrenalina (IRSN), antidepressivos tricíclicos, inibidores da monoamina oxidase (IMAO) e benzodiazepínicos (BZD), agem balanceando os níveis desses neurotransmissores no cérebro (Craske & Stein, 2016; Markman & Combs, 2024).

Apesar dessas opções farmacêuticas serem eficazes para o tratamento de transtornos mentais, como a ansiedade, há uma grande variabilidade na resposta de eficiência à medicação, efeitos colaterais e tolerância aos medicamentos (Ergisi et al., 2022; Griebel & Holmes, 2013). Desse modo, a tolerância à alguns medicamentos apresenta diferenças interpessoais e entre os sexos, alguns estudos já mostram que mulheres e homens apresentam uma resposta diferente e que isso pode ser explicado pela ação dos hormônios sexuais apesar disso, a maioria dos trabalhos desconsideram essa influência hormonal. (Bauer, 2023; de Jonge et al., 2016; Kessler et al., 2012).



**Figura 1: Circuito da ansiedade:** as informações sensoriais que chegam no córtex e no tálamo se projetam para a BLA que se comunica com a CeA e estas se comunicam com todas as outras regiões para que assim ocorra a resposta. Imagem adaptada de Tye (2015).

## 2.2. Influência dos hormônios sexuais na ansiedade

Estudos mostram que os transtornos psiquiátricos e de ansiedade são mais prevalentes em mulheres do que em homens, e isso pode estar relacionado às diferenças e flutuações hormonais (Altemus et al., 2014; Bangasser & Cuarenta, 2021). Além da taxa de prevalência ser maior em mulheres que em homens a taxa de sintomatologia e curso da doença também são maiores, onde as mulheres tendem a ter mais sintomas que os homens, e estas apresentam o comprometimento funcional mais significativo e uma maior probabilidade de cronificação e recorrência (Höglund et al., 2020). Além disso dados da carga global de doenças (GBD) traz

os dados de anos de incapacidade vividos, no qual dos 225 milhões de casos de transtornos de ansiedade que acometeram mulheres, 26,4 milhões sofreram por incapacidade, o que mostra um comprometimento funcional nas mulheres (Santomauro et al., 2021). Já se é sabido que mulheres apresentam um aumento na incidência de transtornos de ansiedade quando se compara aos homens assim, alguns estudos mostram que as mulheres apresentam uma maior vulnerabilidade para transtornos de humor no período pós-puberdade, com início de mudanças cíclicas na secreção de estrógeno dos ovários (Höglund et al., 2020; Walf & Frye, 2006)

Assim, acredita-se que o ciclo menstrual é um fator que pode influenciar diretamente a ocorrência e no tratamento desses transtornos, uma vez que transtornos associados à ansiedade em mulheres, como a síndrome pré-menstrual/transtornos disfórico pré-menstrual, são afetados pelo ciclo menstrual. Além disso, durante a fase perimenstrual, correspondente ao período pré-menstrual e menstrual, há maior índice de admissões de mulheres em hospitais psiquiátricos, sugerindo que as flutuações hormonais durante o ciclo menstrual podem estar relacionadas a uma piora de transtornos psiquiátricos, entre eles a ansiedade (Jang & Elfenbein, 2019a; Reilly et al., 2020).

Em ratas, a avaliação do comportamento tipo ansioso mostra que as fases do ciclo estral podem influenciar de forma diferente esse comportamento. Durante as fases de estro, metaestro e diestro, caracterizadas por apresentar baixos níveis de estradiol e progesterona, há um aumento desse comportamento, comparadas a fase de proestro, marcado por um alto nível de estradiol e progesterona (Lovick & Zangrossi, 2021a; Pestana et al., 2022).

Quando o estradiol, progesterona ou metabólito alopregnanolona (neuroesteroide que atua como um modulador alostérico positivo do receptor GABAA) são administradas nas ratas ovariectomizadas ou em ratas intactas durante o diestro, observa-se uma redução do comportamento semelhante a ansiedade (Koonce & Frye, 2013; Picazo & Fernfindez-Guasti, 1995). Por outro lado, a interrupção abrupta do tratamento provoca um comportamento do tipo ansioso nas ratas. Esses efeitos podem estar associados a uma alteração na expressão e função dos GABAA (Lovick, 2012; Schiller et al., 2014).

No entanto, estudos mostram que a experiência reprodutiva (gravidez, lactação e experiência materna em cuidar da prole) pode alterar a natureza e os efeitos das flutuações dos hormônios ovarianos ao longo do ciclo estral, uma vez que ratas primíparas, apresentam um

aumento nos níveis de estradiol circulante durante a fase do proestro, comparadas a ratas nulíparas (Bridges & Byrnes, 2006; Milligan-Saville & Graham, 2016). Além disso, a experiência reprodutiva aumenta a densidade das espinhas dendríticas e neurogênese no hipocampo, sugerindo que a experiência reprodutiva pode amenizar as alterações cíclicas da ansiedade ocasionada pelas flutuações hormonais do ciclo ovariano (Duarte-Guterman et al., 2019; Pestana et al., 2023). Dessa forma, as flutuações nos níveis hormonais, podem levar a mudanças cíclicas na ansiedade e diferentes respostas aos tratamentos, tanto em humanos quanto em roedores fêmeas sensíveis aos hormônios. Além disso o estrógeno também interage com o neurotransmissor serotonina, induzindo mudanças na transmissão, ligação e no metabolismo da serotonina, isso em animais em humanos os dados ainda são inconsistentes (Amin et al., 2005).

Em relação ao tratamento dos diferentes tipos de transtornos psiquiátricos e de ansiedade, tem sido observado que mulheres podem ser mais sensíveis aos efeitos agudos dos inibidores de recaptção de serotonina (ISRS), enquanto que homens respondem menos ao tratamento, quando comparada as mulheres, e estas apresentam uma eficácia de até 40% com esse tipo de fármaco (Sramek et al., 2016). Além disso estudo com animais mostrou que doses mais baixas de fluoxetina, paroxetina e sertralina são capazes de provocar uma resposta antidepressiva em ratas e camundongos fêmeas, comparado aos machos (Fernández-Guasti et al., 2017; Kokras et al., 2015). No entanto, estudos de meta análises sobre a eficácia de tratamento mostraram que mulheres respondem menos aos inibidores da recaptção de noradrenalina (IRN), enquanto homens respondem aos ISRS, IRN e tricíclicos (Berlanga & Flores-Ramos, 2006; Ellenbroek, 2011).

Estudos mostram que as fases do ciclo estral podem afetar a sensibilidade a fármacos ansiolíticos, uma vez que fêmeas, durante a fase de metaestro-diestro, precisam de doses mais altas de diazepam (2,0 mg/kg) e topiramato (30,0 mg/kg) para causar efeitos ansiolíticos, enquanto na fase de proestro as doses 1,3mg/kg e 20mg/kg, respectivamente, são suficientes para promover efeito ansiolítico (Molina-Hernández et al., 2013).

A fluoxetina, administrada subcronicamente (14 dias), reduziu a resposta de medo durante o aprendizado de extinção e lembrança da extinção em ratas na fase de diestro, mas não na fase de proestro/estro, ou em machos. Além disso, fluoxetina, administrada em baixas doses

na fase de diestro tardio, mas não em outras fases do ciclo estral, diminui o medo incondicionado, o número de vocalizações ultrassônicas causada pelo estresse da contenção, e a hiperalgesia (Devall et al., 2015; Lovick & Zangrossi, 2021b). Devido à grande variabilidade na resposta aos tratamentos tradicionais para os transtornos de ansiedade, novas opções de tratamento farmacológicas com menos efeitos adversos são necessários. Nesse sentido, estudos com compostos que atuam no sistema endocanabinoide têm se mostrando promissores para o desenvolvimento de novos medicamentos, uma vez que parecem atuar positivamente na modulação da ansiedade (Papagianni & Stevenson, 2019; Skelley et al., 2020).

### **2.3. Sistema endocanabinoide**

Apesar de, historicamente, a canábis ser utilizada para fins medicinais, os princípios ativos da planta não eram bem conhecidos e não havia padronização no uso medicinal, o que causava efeitos variáveis (de Souza et al., 2022). No entanto, mesmo sem uma padronização na forma de prescrição, não havia relatos de intoxicações graves e nem riscos potenciais relacionado ao consumo de cannabis. Mas, com o passar do tempo, produtos sintéticos surgiram para o uso recreativo, causaram dependência química e se tornaram uma das drogas de abuso mais utilizadas (Babalonis et al., 2017). Este fato despertou preocupações das autoridades, as quais formularam leis restritivas ao uso e comercialização da espécie e seus compostos (Debruyne & Le Boisselier, 2015; Oliveira da Cruz et al., 2021).

A *Cannabis sativa* (canábis) é uma das plantas mais antigas cultivada pela humanidade, com registros de uso há anos antes de Cristo (Antonio Waldo Zuardi, 2006). A cannabis é uma planta herbácea anual, do gênero *Cannabis*, originária da Ásia central, a qual era utilizada para produção de fibras de cânhamo, fonte de alimento, óleo, efeitos medicinais, bem como para fins recreativos e religiosos (Bonini et al., 2018; de Souza et al., 2022; Karche & Singh, 2019). Apesar da utilização de suas propriedades medicinais por diversas culturas e regiões no ocidente, somente no século XIX ocorre popularização, de sua utilização com fins medicinais anti-inflamatórios, analgésicos, antieméticos e anticonvulsivantes, pelas diversas regiões do globo, incluindo a Europa e às América (Madras & Hospital, 2015; Maioli et al., 2022).

Devido ao aumento na utilização dessa planta para diversas finalidades e o pouco conhecimento sobre os seus efeitos medicinais, estudos têm sido realizados para identificar seus componentes e como estes podem atuar no organismo (Do, 2018). Estudos demonstraram que na *Cannabis sativa* estão presentes mais de 500 compostos, como canabinóides, flavonoides, terpenos e ácidos graxos. Dentre esses compostos, os fitocanabinóides são um grupo de metabólitos secundários terpenofenólicos que somam mais de 100 substâncias diferentes. Eles se distinguem dos canabinóides sintéticos e dos endocanabinóides, que são os canabinóides produzidos pelo próprio corpo humano. Entre os fitocanabinóides, se destacam o  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THC), conhecido por seus efeitos psicoativos, e o canabidiol (CBD), conhecido por seus potenciais benefícios terapêuticos (Julie Gould, 2015; Morais Glitzenhirn et al., 2020), atuando na modulação da resposta nociceptiva, da atividade motora, da temperatura corporal, do apetite, da memória e aprendizagem, da sobrevivência/morte celular e da neuroinflamação (Jean-Gilles et al., 2010; Lastres-Becker et al., 2005; Pellati et al., 2018), sem provocar efeitos psicoativos (Morales et al., 2017).

A planta *Cannabis sativa* tem sido usada há milênios seja para o uso recreativo ou medicinal e atualmente vem ganhando destaque nas pesquisas devido a função terapêutica, apresentando dois componentes principais o THC e CBD (Cammà et al., 2025). Isso abriu o caminho para descoberta do sistema endocanabinoide, o qual a sua sinalização ocorre principalmente por meio dos receptores CB1 e CB2 (Lichenstein, 2022). Esse sistema desempenha uma função de regulador sináptico em todo o sistema nervoso central (Ortiz et al., 2022). Os endocanabinoides agem como mensageiros retrógrados suprimindo a liberação de transmissores seja de forma transitória ou duradoura, além disso esse sistema tem sido implicado na formação de novas sinapses e neurogênese (Harkany et al., 2008; Lichenstein, 2022). Desse modo esse sistema regula uma serie de funções neuronais, das quais são: cognição, controle motor, comportamentos alimentares, além disso quando ocorre uma desregulação nesse sistema, alguns autores já mostram que essa desregulação está relacionada com distúrbios neuronais, como depressão e ansiedade (Hillard et al., 2012; Mechoulam & Parker, 2013).

Diante das dificuldades no tratamento de transtornos psicóticos, ansiedade e depressão, os quais atualmente apresentam um aumento na incidência e prevalência na população global nas últimas décadas (Zamarripa et al., 2023). O tratamento com fitocanabinóides, derivados da *Cannabis sativa*, como o CBD e THC, têm se destacado como potenciais medicamentos

adjuvantes no tratamento desses distúrbios mentais e emocionais (Blessing et al., 2015; Linares et al., 2019), que são grandes desafios para saúde pública em todo o mundo (García-Gutiérrez et al., 2020).

A diversificada ação desses componentes, especialmente o THC e CBD, nos organismos, levantou a hipótese de existência de um sistema canabinoide endógeno (Boggs et al., 2018). A descoberta do sistema endocanabinoide, formado por moléculas sinalizadoras derivadas de lipídios, como a anandamida e o 2-araquidonoilglicerol (2-AG), enzimas responsáveis pela síntese e degradação dessas moléculas, e pelos receptores canabinoide CB1 e CB2, demonstrou que este sistema está envolvido na regulação das diversas funções homeostáticas do organismo (Hillard, 2018).

Os efeitos homeostáticos e terapêuticos dos canabinoides ocorrem através da modulação dos receptores acoplados a proteína G, CB1 e CB2 e também canais de potencial transitório vanilóide (TRPV) (Fonseca et al., 2013; Zou & Kumar, 2018). O receptor CB1 foi identificado em 1990 no cérebro de ratos (Cristino et al., 2020; Lisa A. Matsuda et al., 1990) e embora esteja distribuído por todo o sistema nervoso central, é altamente expresso em regiões específicas, como no córtex, hipocampo, gânglios da base e cerebelo. A presença desse receptor nessas estruturas sugere que estejam envolvidos no processamento da memória, cognição, movimento e nocicepção (Fride, 2002; Zou & Kumar, 2018). Além disso, esses receptores também são expressos, em níveis mais baixos, no sistema nervoso periférico, tecidos reprodutivos, sistema gastrointestinal, sistema cardiovascular (El-Talatini et al., 2009; Fonseca et al., 2009, 2012; Fride, 2002; Zou & Kumar, 2018).

Por outro lado, o receptor CB2, foi identificado inicialmente no sistema nervoso central em 1993, no entanto os maiores níveis de expressão são observados em células do sistema imunológico (Cristino et al., 2020; Lisa A. Matsuda et al., 1990), o que sugere uma modulação no sistema de defesa periférica. Os TRPV estão distribuídos amplamente nos terminais centrais e periféricos de neurônios sensoriais pequenos e médios, no cérebro o TRPV é expresso principalmente na micróglia, onde participa de processos inflamatórios (Bassi et al., 2019; W. Kong et al., 2019). Na medula espinhal estes apresentam um papel na ativação da micróglia, na mediação de processos de nocicepção, inflamação e dor (Choi et al., 2016; Marinelli et al., 2023).

Além de sua presença na micoglia esses receptores estão presente em algumas regiões no cérebro de roedores, envolvidas com a resposta emocional como, LC, PAG, córtex cingulado anterior, CPF e o núcleo accumbens (Cristino et al., 2006; W. L. Kong et al., 2017; Tian et al., 2018). Nos últimos anos, alguns trabalhos vêm relacionando a etiopatologia de transtornos psiquiátricos a processos inflamatórios, assim pensar em drogas que estejam envolvidas com as vias pró e anti-inflamatórias é essencial para o descobrimento de novos medicamentos que tratem dessas disfunções neuronais (M. E. Bauer & Teixeira, 2019; Escelsior et al., 2020).

A partir da descoberta do sistema endocanabinoide, medicamentos à base de cannabis têm sido utilizados para o tratamento de diversas condições, como epilepsia, doenças neurodegenerativas, ansiedade, depressão, dor cônica e náuseas e vômitos relacionados ao câncer (Baron, 2018; Chen et al., 2019a; Ivan Urits et al., 2019; Martini et al., 2023; White, 2019). Medicamentos como o nabiximols (sativex®), compostos uma mistura 1:1 de THC e CBD, tem sido utilizado no tratamento da esclerose múltipla, para aliviar a rigidez muscular e a dor neuropática. O dronabinol (Marinol®) e nabilona (Cesamet®), análogos sintéticos do THC, atuam no controle do vômito e da náusea em pacientes oncológicos que não respondem aos antieméticos convencionais. Bem como, óleo CBD (Epidiolex®), aprovado pela US Food and Drug Administration (FDA), utilizado no tratamento de condições de epilepsia pediátrica, como as síndromes de Lennox-Gastaut e Dravet, as quais são refratárias às terapias convencionais (Alves et al., 2020; Chen et al., 2019b; Ivan Urits et al., 2019).

Assim o sistema canabidiol fornece uma excelente para intervenção terapêutica para transtornos mentais (Castillo et al., 2012). Diante das dificuldades no tratamento de transtornos psicóticos, ansiedade e depressão, os quais atualmente apresentam um aumento na incidência e prevalência na população global nas últimas décadas (Zamarripa et al., 2023). O tratamento com fitocanabinóides, derivados da Cannabis sativa, como o CBD e THC, têm se destacado como potenciais medicamentos adjuvantes no tratamento desses distúrbios mentais e emocionais (Blessing et al., 2015; Linares et al., 2019), que são grandes desafios para saúde pública em todo o mundo (García-Gutiérrez et al., 2020).

Além disso, estudos com modelos animais têm mostrado que o CBD pode reduzir o comportamento tipo ansioso em fêmeas (Salviato et al., 2021; Fabris et al., 2022). No entanto,

não está claro se a ação do CBD pode ser influenciada pelas fases do ciclo, uma vez que as flutuações hormonais durante as fases do ciclo estão associadas à distúrbios de ansiedade.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1.Objetivo geral:**

Avaliar o efeito do canabidiol no comportamento tipo ansioso e na formação de memória aversiva em ratas.

#### **3.2.Objetivos específicos:**

- Avaliar se o CBD reduz a ansiedade observada em ratas na fase de diestro tardio;
- Analisar o efeito do CBD no processo de formação de uma memória aversiva;
- Verificar a participação de núcleos encefálicos envolvidos com memória e ansiedade após o tratamento com CBD em uma tarefa de memória aversiva.

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1. Animais**

Foram utilizadas 42 ratas da linhagem Wistar, com três meses de idade, pesando ente 300 e 350 g, provenientes do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Sergipe (UFS). Antes do experimento todos os animais foram mantidos no Biotério do Laboratório de Neurobiologia Comportamental e Evolutiva (LaNCE) da UFS/Campus Itabaiana, alojados, em número de no máximo quatro animais, em gaiolas plásticas (33 x 40 x 17 cm) com grade de aço inoxidável, sob condições de ventilação e temperatura controladas ( $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), ciclo claro/escuro de 12h/12h e acesso livre à água e ração. Os animais utilizados neste estudo foram tratados de acordo com os princípios éticos estabelecidos pela lei brasileira para o uso de animais em pesquisas nº 11.794, de 8 de outubro de 2008 (Lei Arouca) e Resolução Normativa CONCEA 26/2016 sob o protocolo CEUA nº 5911150224 (Anexo). Todos os esforços foram realizados para minimizar o número de animais usados e o seu sofrimento.

### **4.2. Drogas**

O canabidiol (CBD) foi adquirido da THC-Pharm, Frankfurt, Alemanha. O material foi armazenado no LaNCE/UFS/Campus Itabaiana. Para o presente estudo, foram utilizados no total 0,42 g de CBD, do qual alíquotas de 50  $\mu\text{L}$  foi preparado diariamente, diluído em soro fisiológico e 1% tween-80. O diazepam (CRISTÁLIA) 2,0 mg/kg foi diluído em solução salina (NaCl 0,9%).

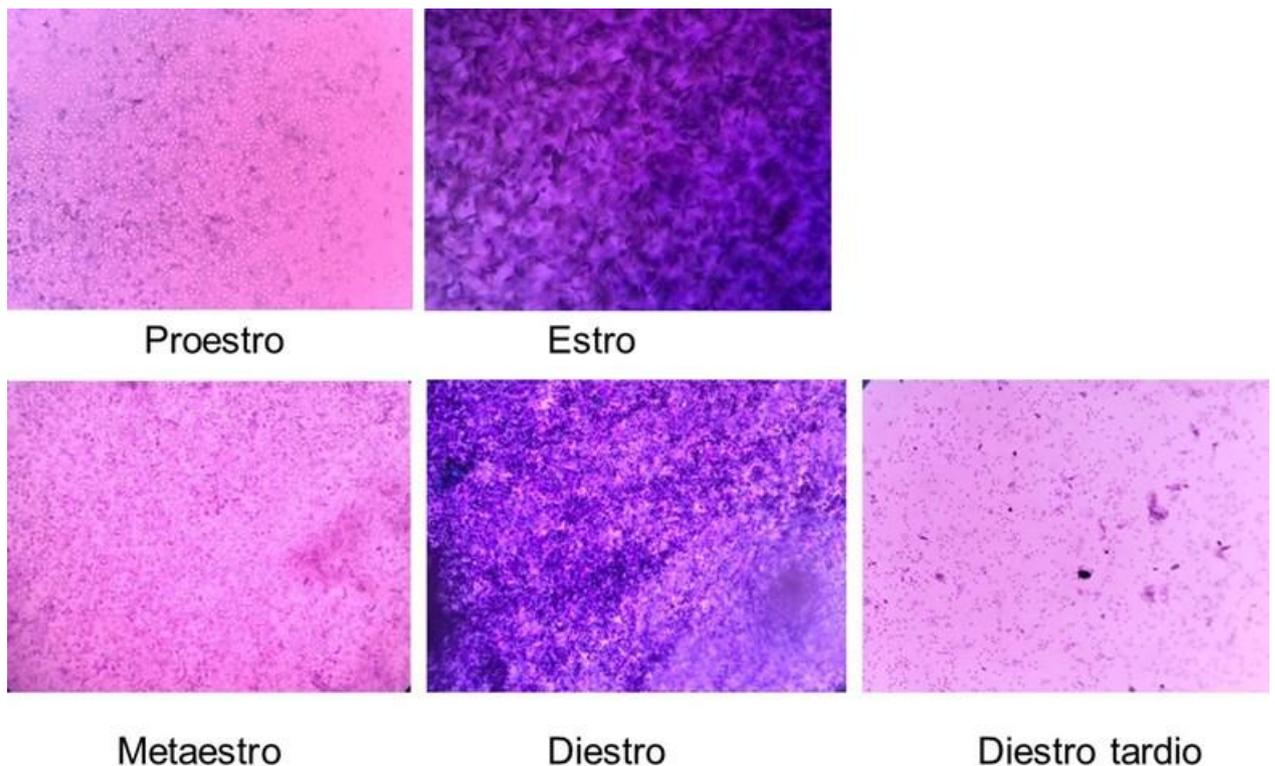
### **4.3. Procedimentos gerais**

Antes do início dos procedimentos experimentais, todos os animais foram submetidos a um período de 10 minutos de manipulação, diariamente, durante 10 dias, com a finalidade de habitué-los ao toque e à presença dos experimentadores. Todos os experimentos foram

realizados, preferencialmente, no mesmo turno e horário. Entre as sessões de avaliação comportamental, o aparelho foi limpo com uma solução de etanol a 10% para evitar possíveis pistas de odores deixadas por outro animal. Os parâmetros comportamentais do teste de labirinto em cruz elevado modificado foram gravados e quantificados por um programa de rastreamento de animais Anymaze, Stoelting, EUA (Oliveira da Paixão et al., n.d.).

#### 4.4. Monitoramento do ciclo estral

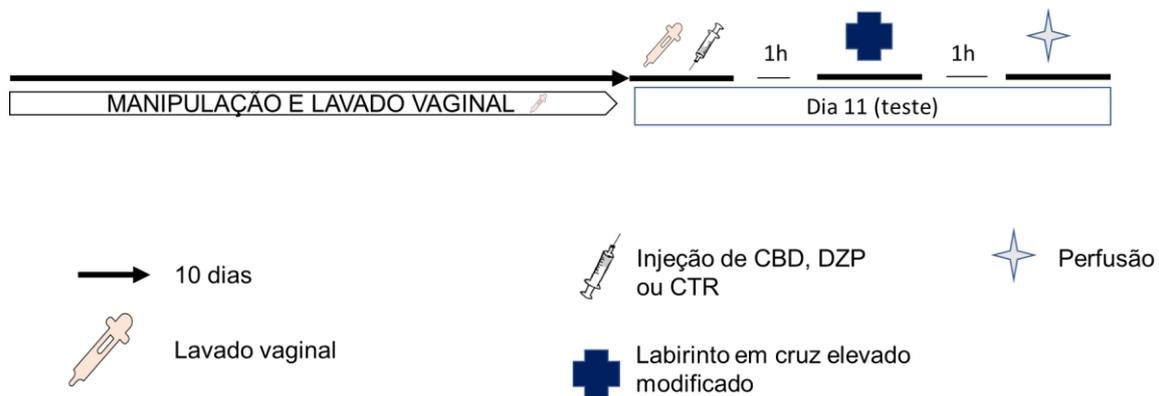
Para realização deste procedimento foi utilizada uma pipeta de Pasteur de polietileno (3 ml) com um volume aproximado de 0,3 ml de solução salina 0,9% em sua ponta. Para coleta do material, a ponta da ponteira foi introduzida no orifício vaginal, com cuidado para não estimular a cérvix uterina. Uma gota de solução salina foi injetada, aspirada e colocada em uma lâmina. A este material foi adicionada uma gota de azul de toluidina para visualização do ciclo estral ao microscópio, com magnificação de 10 ou 40 vezes (MARCONDES; BIANCHI; TANNO, 2002). O procedimento foi realizado inicialmente nos primeiros 10 dias para identificar quais animais estavam com ciclo regular, após a identificação de que estavam com ciclo regular estas foram adicionadas ao experimento e este procedimento foi realizado todos os dias até o fim do experimento.



**Figura 2** - Imagens representativas das fases do ciclo estral (acervo próprio)

#### 4.5. Delineamento experimental

Foram utilizadas 42 ratas, as quais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos (n = 14 por grupo): 1) controle (CTR), TWEEN 80 (1%) e solução salina (NaCl 0,9%); 2) diazepam (DZP) 2,0 mg/kg e 3) canabidiol (CBD) 0,3 mg/kg. Antes do início dos experimentos, o ciclo estral das ratas foi avaliado durante 10 dias consecutivos. No dia 11, as ratas na fase do ciclo estral diestro tardio foram selecionadas, incluídas em cada grupo experimental, e tratadas com uma injeção intraperitoneal de solução veículo, DZP ou CBD. Os animais voltaram para suas gaiolas de origem e 1 h após a injeção de cada um dos tratamentos, os animais foram submetidos ao teste de labirinto em cruz elevado modificado, por 10 minutos. Para avaliação do comportamento tipo ansioso, avaliamos os seguintes parâmetros: distância total percorrida em cada braço, número de entradas em cada braço, porcentagem de tempo em cada braço, entrada no braço aversivo minuto a minuto e curva de aprendizagem. Uma hora após o teste, os animais foram anestesiados e sacrificados por perfusão transcárdica com paraformoldeído 4% para fixação e coleta dos encéfalos (Figura 2). Posteriormente os encéfalos foram cortados, processados e submetidos à técnica de imuno-histoquímica para o marcador de atividade neuronal c-Fos.



**Figura 3: Delineamento Experimental:** Após a avaliação do ciclo estral, no dia 11 dia, as ratas em diestro tardio foram tratadas com solução veículo, Diazepam (2,0 mg/kg) ou canabidiol (0,3 mg/kg) e, 1h após a injeção, submetidas ao teste de labirinto em cruz elevado modificado.

## **4.6. Testes comportamentais:**

### **4.6.1. Labirinto em cruz elevado modificado:**

O labirinto elevado modificado é um dos modelos mais utilizados para investigar as bases fisiopatológicas da ansiedade, amplamente utilizado para verificar o potencial efeito ansiolítico ou ansiogênico de medicamentos, além de possibilitar o entendimento do processo de memória (Himanshu et al., 2020; Lovick & Zangrossi, 2021).

O teste foi realizado em um labirinto feito de madeira em cruz elevado modificado, contendo dois braços fechados (40 cm de comprimento x 15 cm de largura x 40 cm de altura), em oposição a dois braços abertos (40 cm de comprimento x 15 cm de largura). Em um dos braços fechados continha uma lâmpada de 100W e uma caixa de som para emissão de som de 80 dB (ruído branco), os quais são ligados simultaneamente a cada vez que o animal entrar nesse braço (braço aversivo), o braço fechado que não possui esses estímulos, luminoso e sonoro, é considerado o braço seguro.

Para realização do teste, os animais foram colocados individualmente no centro do labirinto para livre exploração, durante 10 min. Para cada animal que entrasse no braço aversivo, foi acionado o estímulo aversivo (luz e som) e assim que o animal saiu do braço aversivo, o estímulo aversivo foi desligado. Todo o teste foi registrado como auxílio de uma câmera posicionada sobre o aparato a uma altura de 230 cm, conectada a um computador, no qual os parâmetros comportamentais foram quantificados pelo programa de rastreamento de animais Anymaze, Stoelting, USA., (Walf & Frye, 2007).

No aparato citado realizamos a avaliação de diferentes comportamentos dos animais durante a tarefa. Na avaliação da distância total percorrida, foi avaliado quantos metros os animais se locomoveram durante os 600 segundos (tempo total / 10 minutos) de livre exploração dos braços e também avaliamos a distância total percorrida em cada braço. Avaliamos o número de entradas em cada braço durante toda a tarefa. Outra análise realizada foi a comparação entre os braços seguro, aversivo e aberto, quanto a porcentagem de tempo gasto em cada um durante o teste nos 10 minutos da tarefa. Exclusivamente para a análise da permanência no braço aversivo, verificamos também o tempo em blocos de 60 segundos ao longo dos 10 minutos de

tarefa (10 blocos de tempo) para verificar a curva de aprendizagem. Com esses dados avaliamos também as equações das retas dos grupos avaliados afins de verificar diferenças no padrão de aprendizado.

#### **4.7. Perfusão e processamento dos encéfalos**

Após a realização do teste comportamental, os animais foram anestesiados (1h após o teste) com uma mistura de cloridrato de cetamina (100 mg/Kg) e cloridrato de xilazina (10 mg/Kg) intraperitoneal. Com o animal completamente anestesiado e imobilizado, foi realizado um acesso, seccionando a pele e partes moles, a cavidade torácica. Após a exposição da cavidade abdominal, foi feita uma incisão no diafragma para exposição do coração. Os animais foram perfundidos transcardiacamente com tampão fosfato de sódio (TFS; pH 7,4) para a lavagem dos vasos, por 10 minutos e, posteriormente, com paraformaldeído 4% (PFA) em tampão fosfato (PB; pH 7,4; 100 mM), por 20 minutos, para fixação do tecido. Após a perfusão, os encéfalos foram removidos e mergulhados em uma solução fixadora de sacarose 30% a 4°C. Após a perfusão dos animais, as carcaças foram depositadas em sacos plásticos apropriados e armazenadas no freezer de coleta de material biológico situado no biotério do Departamento de Fisiologia da UFS para posterior recolhimento durante a coleta de lixo especializada.

Os resíduos perfurocortantes foram armazenados em caixas adequadas e levados até o hospital universitário para descarte junto ao material do hospital. Os cérebros foram levados a um criostato de deslizamento (Leica, EUA) onde foram congelados à -20°C para obtenção de secções coronais de 50µm, que foram distribuídas sequencialmente em 4 compartimentos, em um meio líquido contendo solução anticongelante. Cada um desses compartimentos corresponde a 1 de 4 secções, de maneira que a distância entre uma secção e a seguinte seja de aproximadamente 250µm. Estes cortes foram armazenados em uma solução anticongelante à base de etilenoglicol e PB e posteriormente conservados a 4°C até as reações de imunohistoquímica.

#### **4.8. Imuno-histoquímica**

A bateria de imuno-histoquímica consistiu nos seguintes passos: 1) lavagem dos tecidos em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4, quatro vezes, por cinco minutos cada; 2) lavagem dos tecidos em tampão fosfato + água oxigenada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), para bloqueio da peroxidase endógena, por vinte minutos; 3) repetição do procedimento 1; 4) lavagem do material em leite desnatado, para bloqueio de ligações inespecíficas, durante quinze minutos; 5) incubação dos tecidos no anticorpo primário policlonal antiC-fos (1:500; Santa Cruz Biotechnology, U.S.A) produzidos em coelho diluídos em Triton-X 100 (0,4%) e mantidos overnight (de 12 horas a 18 horas) em agitador automático; 6) repetição do procedimento 1; 7) incubação dos tecidos no anticorpo secundário biotiniliado anti-coelho produzido em cabra (1:750 Sigma Chemical Company) diluído em Triton-X 100 (0,4%) e mantido sob agitação automática por duas horas; 8) repetição do procedimento 1; 9) incubação do material no ABC (Complexo Avidina-Biotina, ABC Elite kit, Vector Labs, Burlingame, EUA concentração de (2:1000), diluído em Triton-X 100 (0,4% + NaCl 0,9%), e mantido no agitador por duas horas; 10) repetição do procedimento 1; 11) revelação do material por meio de lavagens dos tecidos em uma solução de Diaminobenzidina (DAB) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 12); repetição do procedimento 1; 13) montagem do tecido em lâminas gelatinizadas. Após a montagem, o material foi reidratado, intensificado em tetróxido de ósmio 0,1% e submetido a uma bateria de desidratação em álcool e xilol. As lâminas foram cobertas com meio de montagem e fixação de uma lamínula. Todos os procedimentos acerca da realização da perfusão e da imunohistoquímica, foram feitos seguindo protocolos realizados em trabalhos anteriores como: Melo et al. (2022), Bispo et al. (2019) e Lins et al. (2018).

#### **4.9. Aquisição e análise das imagens**

As lâminas foram fotografadas em um microscópio óptico (Nikon Eclipse Ci-S, Nikon Corporation inc., Japan), com câmera fotográfica digital acoplada (Ds-fi1c, Nikon Corporation inc., Japan) e programa de computador específico para essa finalidade (Ds-U3, Labconco Corporation inc., EUA). Para cada animal analisado, foram feitas imagens dos cortes, em aumento de 10x, nas quais foi possível ver em detalhes a presença ou ausência de células

marcadas nos tecidos. A contagem de células foi realizada em 4 secções de cada animal e o número de células para cada um deles corresponde à média entre as 4 secções analisadas. As áreas analisadas foram: hipocampo, amígdala, córtex pré-frontal medial (CPFm), córtex insular (CI), Leito da estria terminal, substância cinzenta paraquedutal, hipotálamo (núcleo paraventricular e arqueado), locus ceruleus, núcleo da Rafe medial. Todas as células marcadas na área de interesse foram contadas usando o software Image J (versão 1.46i, NIH) e a delimitação da área foi realizada com base no atlas de Paxinos e Watson (2014). Todas as contagens foram realizadas de forma encoberta, em que o experimentador não soube a que grupo pertencia cada imagem a ser contada.

#### **4.10. Análise estatística**

Após avaliar a normalidade dos dados através do teste Brown-Forsythe. Em linhas gerais, os dados paramétricos foram analisados através das análises de variância (ANOVA) de uma ou mais vias, com ou sem medidas repetidas, seguidos pelo teste de Tukey ou pós-teste LSD de Fisher. Os dados não paramétricos foram submetidos ao teste de Kruskal Wallis. Além disso, quando avaliamos a curva de aprendizagem para o número de entradas no braço aversivo minuto a minuto, escolhemos a análise de regressão linear e comparamos a diferença entre cada curva de aprendizagem e avaliamos a normalidade dos resíduos. Os dados foram expressos como média mais ou menos o erro padrão da média ( $\pm$  E.P.M.) e foram considerados significativos valores com  $p < 0,05$ . Todas as análises foram realizadas através do software Graphpad Prism versão 8.0.

## 5. RESULTADOS

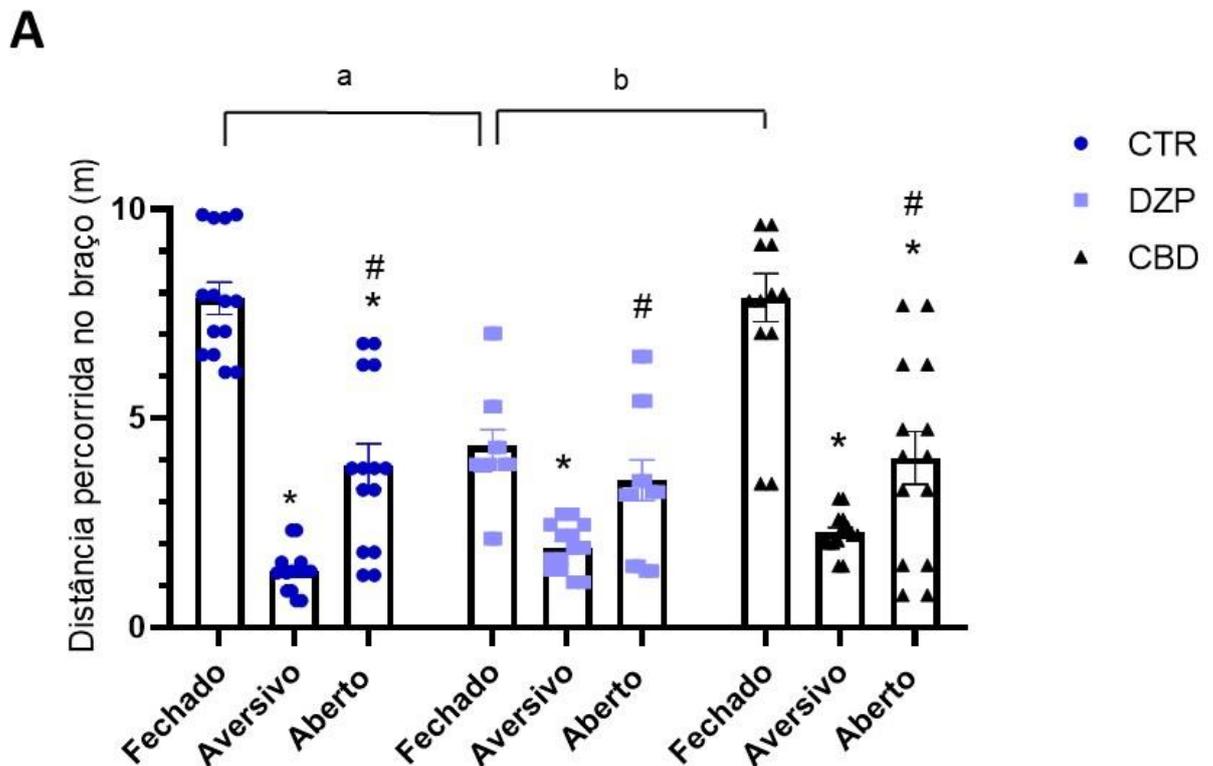
### 5.1. Labirinto em cruz elevado modificado

#### 5.1.1 Distância total percorrida

A ANOVA de duas vias mostrou efeito de braço [ $F(2,117) = 100,3$ ;  $p < 0,0001$ ], tratamento [ $F(2,117) = 9,895$ ;  $p = 0,0001$ ] e interação braço vs. tratamento [ $F(4,117) = 7,530$ ;  $p < 0,0001$ ] para a distância percorrida em cada braço (Figura 4).

Quando avaliada a distância total percorrida, em cada braço, no mesmo grupo (Figura 2B), o pós-teste LSD mostrou que os grupos CTR e CBD apresentaram um aumento significativo na distância percorrida no braço fechado comparado aos braços aberto ( $p < 0,0001$  e  $p < 0,0001$ , respectivamente) e aversivo ( $p < 0,0001$  e  $p < 0,0001$ , respectivamente). Bem como, no braço aberto comparado ao braço aversivo ( $p < 0,0001$  e  $p = 0,0033$ , respectivamente). O pós-teste LSD também mostrou que o grupo DZP apresentou um aumento significativo na distância percorrida no braço fechado comparado ao braço aversivo ( $p < 0,0001$ ), porém não houve diferença significativa quando comparada à distância percorrida no braço aberto ( $p = 1713$ ). Além disso, o grupo DZP apresentou um aumento significativo da distância percorrida no braço aberto comparado ao braço aversivo ( $p = 0,0083$ ).

Quando avaliada a distância total percorrida em cada braço, entre os grupos, o pós-teste LSD revelou que os grupos CTR e CBD apresentaram um aumento significativo na distância percorrida no braço fechado quando comparado ao grupo DZP ( $p < 0,0001$  e  $p < 0,0001$ , respectivamente). No entanto, não houve diferença na distância percorrida no braço fechado quando comparado aos grupos CTR e CBD ( $p = 9801$ ). Não foi observada diferença significativa para a distância percorrida nos braços aversivos entre os grupos CTR vs DPZ, CTR vs CBD e CBD vs DZP ( $p = 0,3429$ ,  $p = 0,1261$  e  $p = 0,5574$ , respectivamente) e para o braço aberto entre os grupos CTR vs DPZ, CTR vs CBD e CBD vs DZP ( $p = 0,5705$ ,  $p = 0,7421$  e  $p = 0,3707$ , respectivamente).



**Figura 4: Efeito da administração de diazepam e CBD, na atividade exploratória no teste labirinto em cruz elevado modificado.** O tratamento com diazepam e CBD na atividade locomotora dos animais no aparato. Os grupos CTR e CBD apresentaram um aumento da distância percorrida no braço fechado comparado aos outros braços, bem como o braço aberto em relação ao aversivo. O grupo DZP apresentou maior distância percorrida nos braços aberto e fechado comprado ao aversivo. Além disso, os grupos CTR e CBD apresentaram um aumento na distância percorrida, no braço fechado, comparado O grupo DPZ. Os valores foram expressos como média ± E. P. M. \* $p < 0,05$  comparado ao braço fechado; # $p < 0,05$  comparado ao braço aversivo ap  $p < 0,05$  quando comparado braço fechado CTR vs. DZP; bp  $p < 0,05$  quando comparado braço fechado CBD vs. DZP.

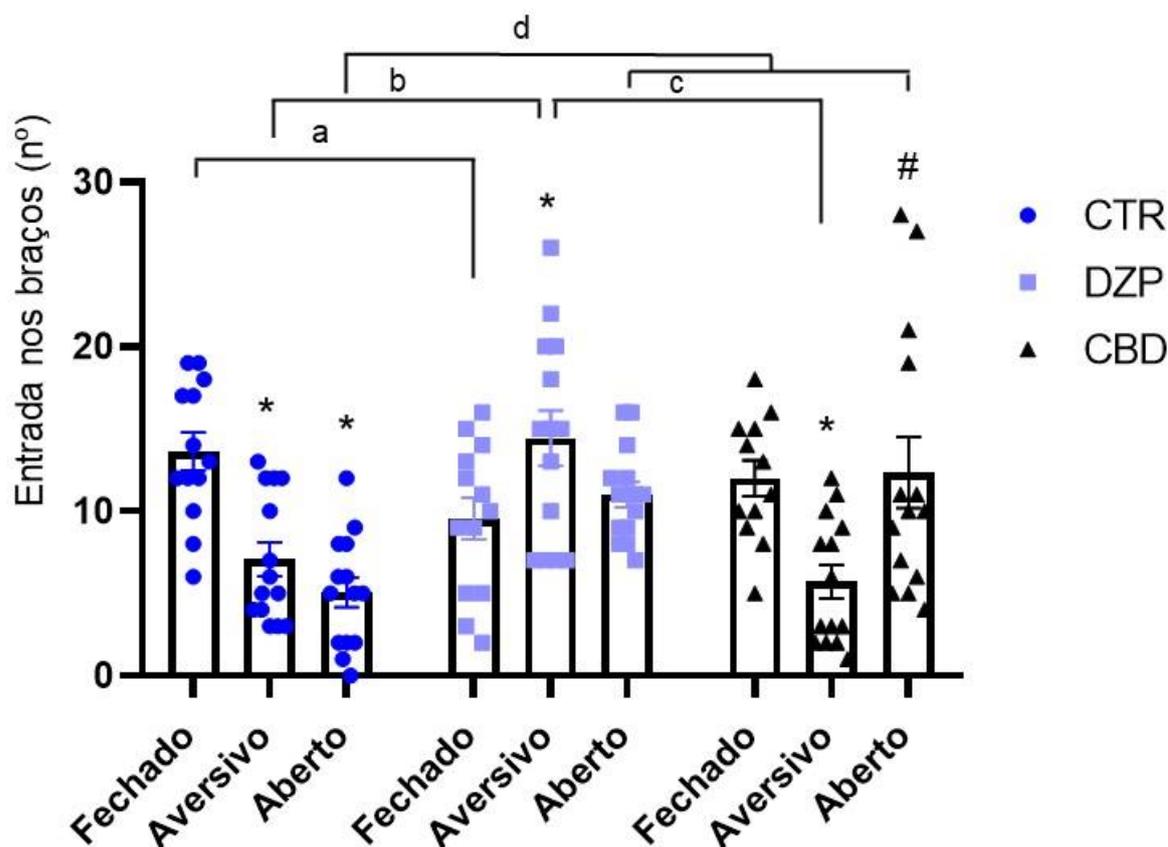
### 5.1.2 Número de entradas nos braços

Em relação ao número de entradas em cada braço, no mesmo grupo, a ANOVA de duas vias mostrou efeito de braço [ $F(2,117) = 3,761$ ;  $p = 0,0261$ ], tratamento [ $F(2,117) = 4,374$ ;  $p = 0,0147$ ] e interação braço vs. tratamento [ $F(2,117) = 10,68$ ;  $p < 0,0001$ ], (Figura 5).

Quando avaliado o número de entradas em cada braço, no mesmo grupo (Figura 5), O pós-teste LSD mostrou que o grupo CTR apresentou um aumento significativo no número de entradas no braço fechado comparado aos braços aberto ( $p < 0,0001$ ) e o aversivo ( $p = 0,0006$ ),

porém não houve diferença significativa quando comparado o número de entradas entre o braço aberto e aversivo ( $p = 0,2748$ ). O pós-teste LSD também mostrou que grupo DZP apresentou um aumento significativo no número de entradas no braço aversivo comparado ao braço fechado ( $p = 0,0097$ ), no entanto, não houve diferença significativa no número de entradas quando comparado o braço aberto aos braços fechado e aversivo ( $p = 0,4330$ ,  $p = 0,0625$  respectivamente). Além disso, o pós-teste LSD mostrou que o grupo CBD, apresentou um aumento significativo no número de entradas nos braços fechado e aberto comparados ao braço aversivo ( $p = 0,0012$  e  $p = 0,0004$ , respectivamente). No entanto não houve diferença significativa no número de entradas quando comparado os braços fechados com o braço aberto ( $p = 0,8510$ ).

Quando avaliado o número de entradas em cada braço, entre os grupos (Figura 5), o pós-teste LSD mostrou o grupo CTR apresentou um aumento significativo no número de entradas no braço fechado comparado ao grupo DZP ( $p = 0,0332$ ), mas quando comparado ao grupo CBD, não houve diferença significativa ( $p = 0,4045$ ). E relação ao número de entradas no braço aversivo, observamos que o grupo DZP apresentou um aumento significativo no número de entradas comparado aos grupos CTR e CBD ( $p < 0,0001$  e  $p < 0,0001$ , respectivamente). No entanto, não houve diferença significativa no número de entradas no braço aversivo quando comparado os grupos CTR e CBD ( $p = 0,4581$ ). Para o número de entradas no braço aberto, observamos que o grupo CTR apresentou uma diminuição significativa no número de entradas comparado aos grupos DZP e CBD ( $p = 0,0015$  e  $p = 0,0001$ , respectivamente). No entanto, quando comparado os grupos DZP e CBD não há diferença significativa ( $p = 0,4581$ ).



**Figura 5: Efeito da administração de diazepam e canabidiol, no número de entradas nos braços do labirinto em cruz elevado modificado.** O grupo CTR entrou mais no braço fechado quando comparado com o aberto \*( $p < 0,0001$ ), e o aversivo \*( $p = 0,0006$ ); o grupo DZP entrou mais no aversivo do que no fechado \*( $p = 0,0097$ ); o grupo CBD entrou mais no braço fechado do que no aversivo \*( $p = 0,0012$ ) e entrou mais no aberto do que o aversivo #( $p = 0,0004$ ); (a) o grupo CTR entrou mais no fechado que o grupo DZP ( $p = 0,0332$ ), o grupo DZP entrou mais no aversivo quando comparado com o (b) CTR ( $p < 0,0001$ ) e (c) CBD ( $p < 0,0001$ ), para o braço aberto o grupo CTR entrou menos quando comparado com o (d) DZP ( $p = 0,0015$ ) e (e) CBD ( $p = 0,0001$ ).

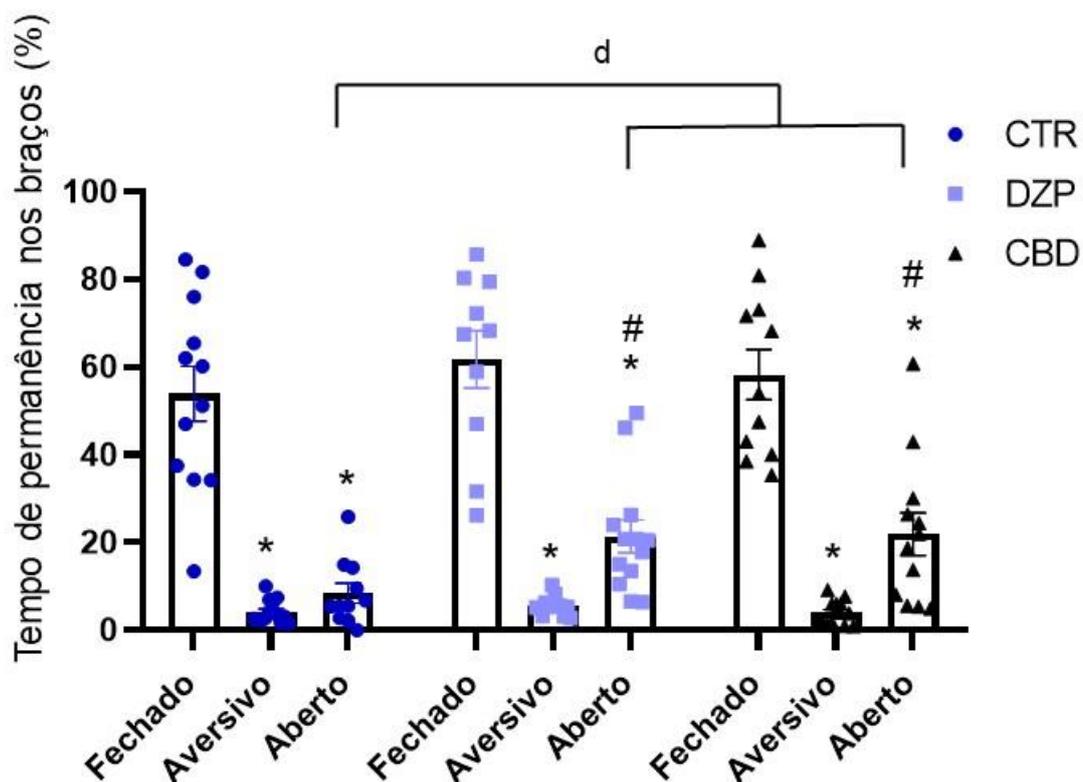
### 5.1.3 Tempo de permanência nos braços

Para o tempo de permanência em cada braço a ANOVA de duas vias mostrou efeito de braço [ $F(2,116) = 202,9$ ;  $P < 0,0001$ ] e de tratamento [ $F(2,116) = 3,954$ ;  $P = 0,0218$ ], (Figura 6).

Quando avaliado o tempo de permanência em cada braço, no mesmo grupo (Figura 6), o pós-teste LSD mostrou que os grupos CTR e CBD apresentaram um aumento significativo no tempo de permanência no braço fechado comparado aos braços aberto ( $p < 0,0001$  e  $p <$

0,0001, respectivamente) e aversivo ( $p < 0,0001$  e  $p < 0,0001$ , respectivamente). Quando comparada a permanência de tempo entre os braços aberto e aversivo, não houve diferença para o grupo CTR ( $p = 0,4406$ ), mas o grupo CBD apresentou maior tempo de permanência no braço aberto ( $P = 0,0004$ ). O pós-teste LSD também mostrou que o grupo DZP apresentou um maior tempo permanência no braço fechado comparados aos braços aberto e aversivo ( $p < 0,0001$  e  $p < 0,0001$ , respectivamente). Além disso, o grupo DZP apresentou menor tempo de permanência no braço aversivo comparado ao braço aberto ( $p = 0,0012$ ).

Quando avaliada a permanência de tempo em cada braço, entre os grupos (Figura 6), o pós-teste LSD mostrou que o grupo CTR apresentou menor tempo de permanência no braço aberto comparado aos grupos DZP e CBD ( $p = 0,0075$  e  $p = 0,0064$ , respectivamente). No entanto, não foi observada diferença significativa ( $p > 0,05$ ) no tempo de permanência nos braços fechados e aversivos entre grupos CTR, DZP e CBD.

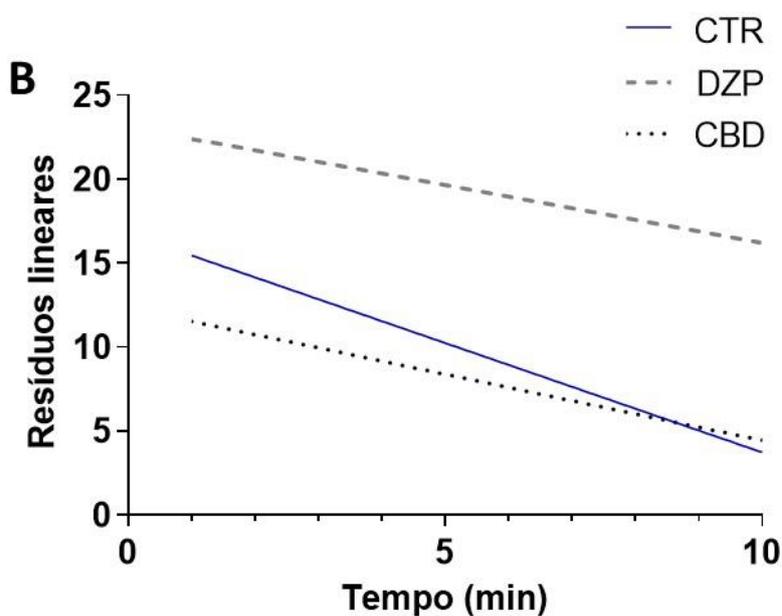
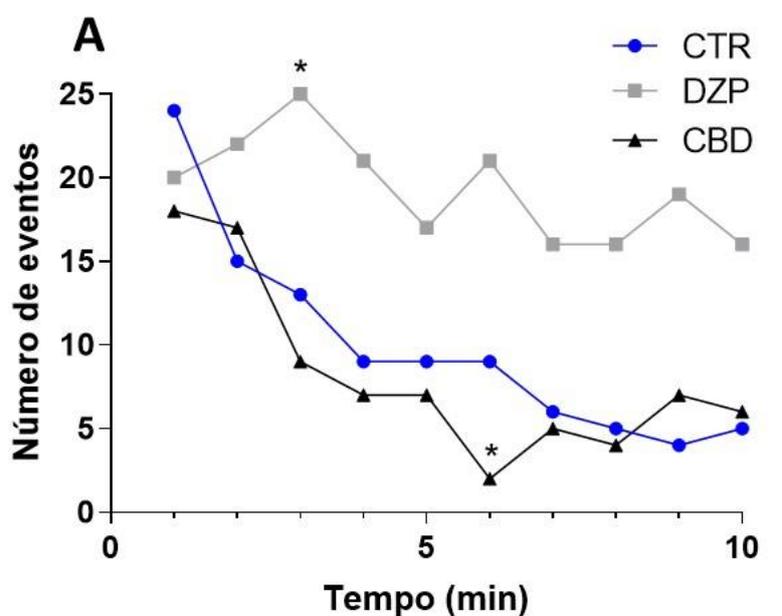


**Figura 6: Efeito da administração de diazepam e CBD, no tempo de permanência nos braços do labirinto em cruz elevado modificado.** O grupo CTR permaneceu mais tempo no braço fechado quando comparado com o aberto  $*(p < 0,0001)$ , e o aversivo  $*(p = 0,0006)$ ; o grupo DZP permaneceu mais tempo no braço fechado, quando comparado com o aberto  $*(p < 0,0001)$  e o aversivo  $*(p < 0,0001)$ , quando comparado o aberto com o aversivo este permaneceu mais tempo no aberto  $\#(P = 0,0012)$ ; o grupo CBD permaneceu mais tempo no braço fechado, quando comparado com o aberto  $*(p < 0,0001)$  e o aversivo  $*(p < 0,0001)$ , quando comparamos o aberto com o aversivo o grupo CBD permaneceu mais tempo no aberto  $\#(P = 0,0004)$ ; (a) o grupo CTR permaneceu menos tempo que o grupo DZP  $(P = 0,0075)$  e CBD  $(P = 0,0064)$  no braço aberto.

Quando analisamos a entrada minuto a minuto no braço aversivo (Figura 7A) a ANOVA de duas vias mostrou efeito de tempo  $[F(9,388) = 5,647; P < 0,0001]$  e tratamento  $[F(2,388) = 40,66; P < 0,0001]$ . O pós-teste LSD revelou uma diminuição no número de entradas no braço aversivo, do grupo CBD, no intervalo entre 3 e 10 minutos, e do grupo CTR, nos intervalos entre 3 e 4 minutos e entre 6 e 10 minutos, comparados ao grupo DZP  $\{[CTR; (p_3 = 0,0055; p_4$

= 0,0055; p5 = 0,0634; p6 = 0,0055; p7 = 0,0205; p8 = 0,0108; p9 < 0,0001; p10 = 0,0108)], [CBD; (p3 = 0,0002; p4 = 0,0012; p5 = 0,0205; p6 < 0,0001; p7 = 0,0108; p8 = 0,0055; p9 = 0,0008; p10 = 0,0205)]}.

Para avaliar o desempenho dos grupos na tarefa de medo condicionado, primeiro, destacamos o número de entradas no braço aversivo, segundo o quanto o número de entradas no tempo é reduzido, dessa forma obtemos a curva de aprendizagem que indica se os grupos conseguiram reproduzir a tarefa dentro do esperado (Figura 7B). Assim, foi avaliado se as curvas de aprendizagem são diferentes entre os grupos CTR ( $y = -1,303x + 16,76$ ,  $n = 8$ ), DZP ( $y = -0,6878x + 23,08$ ,  $n = 8$ ) e CBD ( $y = -0,7876 + 12,32$ ,  $n = 8$ ), mostrando que as retas são diferentes para os grupos [ $F(4,24) = 13,68$ ;  $p < 0,0001$ ]. Dessa forma, foi possível destacar que o grupo CBD reproduziu o melhor desempenho associado à identificação do braço aversivo e progressivamente visitou menos o local, quando comparado ao grupo DZP. Quanto à comparação entre o grupo CBD e CTL não foram observadas diferenças significativas.



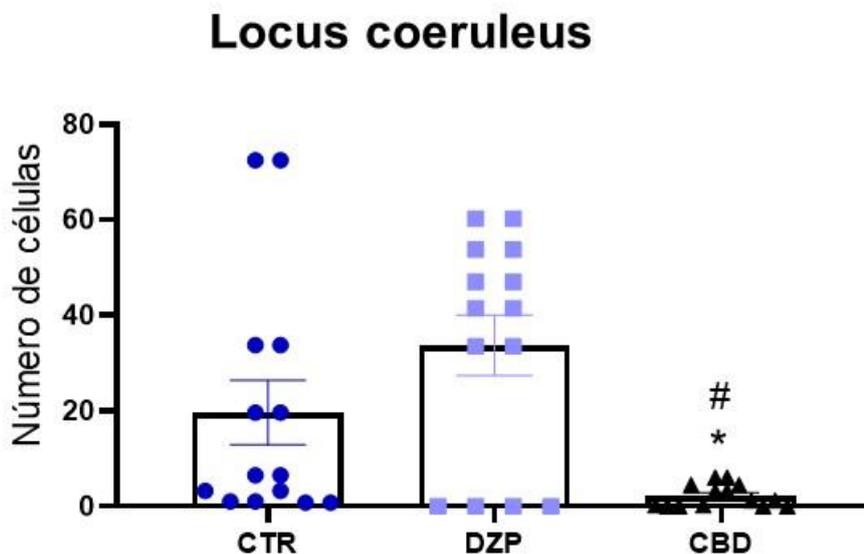
Grupos	Curva de aprendizagem				
		Coefficiente angular	B	R <sup>2</sup>	
CTR	Y =	-1,303*x	+	16,76	0,756
DZP	Y =	-0,687*x	+	23,08	0,475
CBD	Y =	-0,787*x	+	16,76	0,345

**Figura 7: Efeito da administração de diazepam e CBD, no número de entradas e curva de aprendizagem minuto a minuto no braço aversivo no teste labirinto em cruz elevado modificado.** (A) Os grupos CTR e CBD apresentaram uma gradativa diminuição no número de entradas durante o tempo quando comparados ao grupo DZP, que apresentou um número maior de entradas. Assim, apresentando diferença de DZP contra o grupo CTR ( $p < 0,0001$ ) e CBD ( $p < 0,0001$ ). Anova de duas vias, com pós-teste de Fisher e  $p < 0,05$ . (B) As curvas quando comparadas se mostram diferentes entre os grupos, o que indica que o aprendizado também é diferente, para o grupo CBD o decaimento ( $b = -0,78$ ) proporciona menor número de entradas no braço aversivo na maior parte do tempo comparado ao grupo CTR ( $b = -1,3$ ) e em todo o tempo comparado ao grupo DZP ( $b = -0,68$ ). Realizada

comparação entre as regressões lineares apresentadas por meio do coeficiente angular ( $a \cdot x$ ) e eixo de interceptação em Y (b), curva de aprendizagem de CTR ( $y = -1,303x + 16,76$ ,  $n = 8$ ), DZP ( $y = -0,6878x + 23,08$ ,  $n = 8$ ) e CBD ( $y = -0,7876 + 12,32$ ,  $n = 8$ ).

## 5.2. Imunorreatividade para c-Fos

Para a análise da imunorreatividade para c-Fos a ANOVA mostrou efeito significativo de tratamento [ $F(2,39) = 6,086$ ;  $p = 0,0050$ ] no locus coeruleus e o pós-teste de Tukey revelou uma redução significativa do número de células imunorreativas para c-Fos no grupo CBD quando comparado aos grupos CTR ( $p = 0,0263$ ) e DZP ( $p = 0,0002$ ), (Figura 7). Já para o núcleo dorsal da rafe, a ANOVA não mostrou efeito de tratamento [ $F(2,33) = 2,011$ ;  $p = 0,1500$ ], (Figura 8).

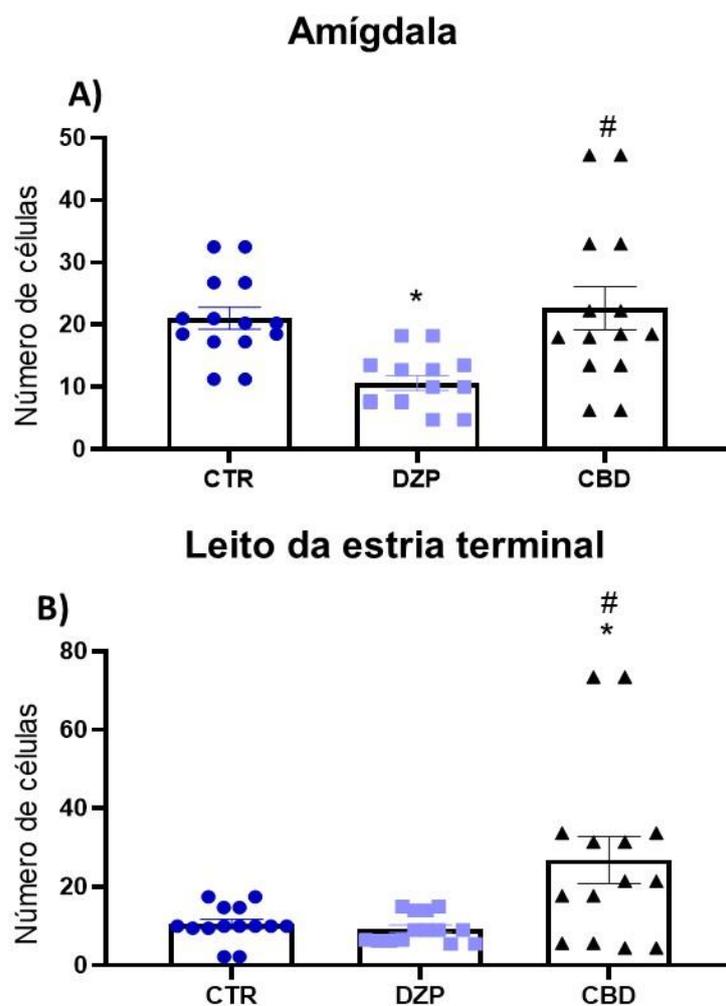


**Figura 8: Efeito da administração de diazepam e CBD, na imunorreatividade para c-Fos no Locus coeruleus.** O tratamento com CBD provocou uma redução no número de células imunorreativas para c-Fos quando comparado aos grupos CTR e DZP. Os valores foram expressos como média ± E. P. M. \* $p < 0,05$  comparado ao grupo CTR; # $p < 0,05$  comparado ao grupo DZP. (ANOVA seguida pelo pós-teste de Tukey).



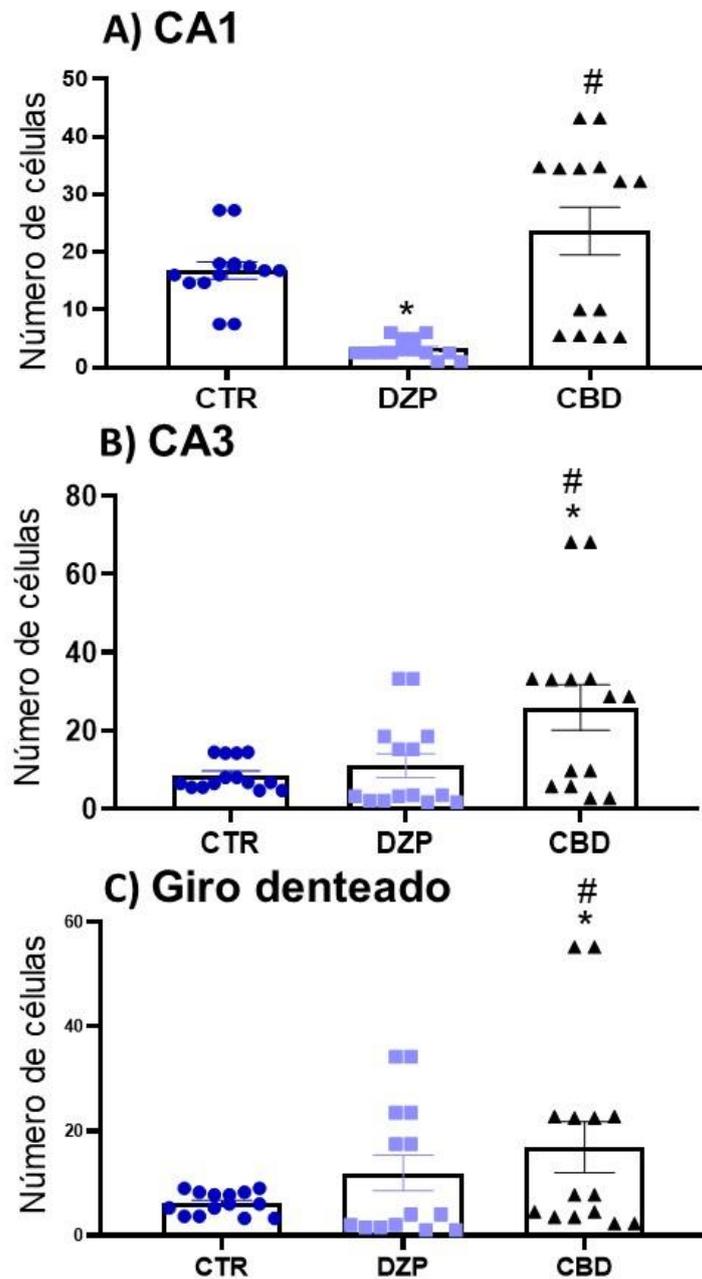


A ANOVA também mostrou efeito significativo de tratamento na amígdala [ $F(2,39) = 7,725$ ;  $p = 0,0015$ ], (Figura 10A), e no leito da estria terminal [ $F(2,39) = 7,427$ ;  $p = 0,0018$ ], (Figura 10). O pós-teste de Tukey revelou uma redução significativa na imunorreatividade para c-Fos, na amígdala, no grupo DZP comparado aos grupos CTR ( $p = 0,0032$ ) e CBD ( $p = 0,0008$ ), (Figura 10A). Já no BNST foi observado um aumento significativo na imunorreatividade para c-Fos no grupo CBD comparado aos grupos CTR ( $p = 0,0074$ ) e DZP ( $p = 0,0038$ ), (Figura 10B).



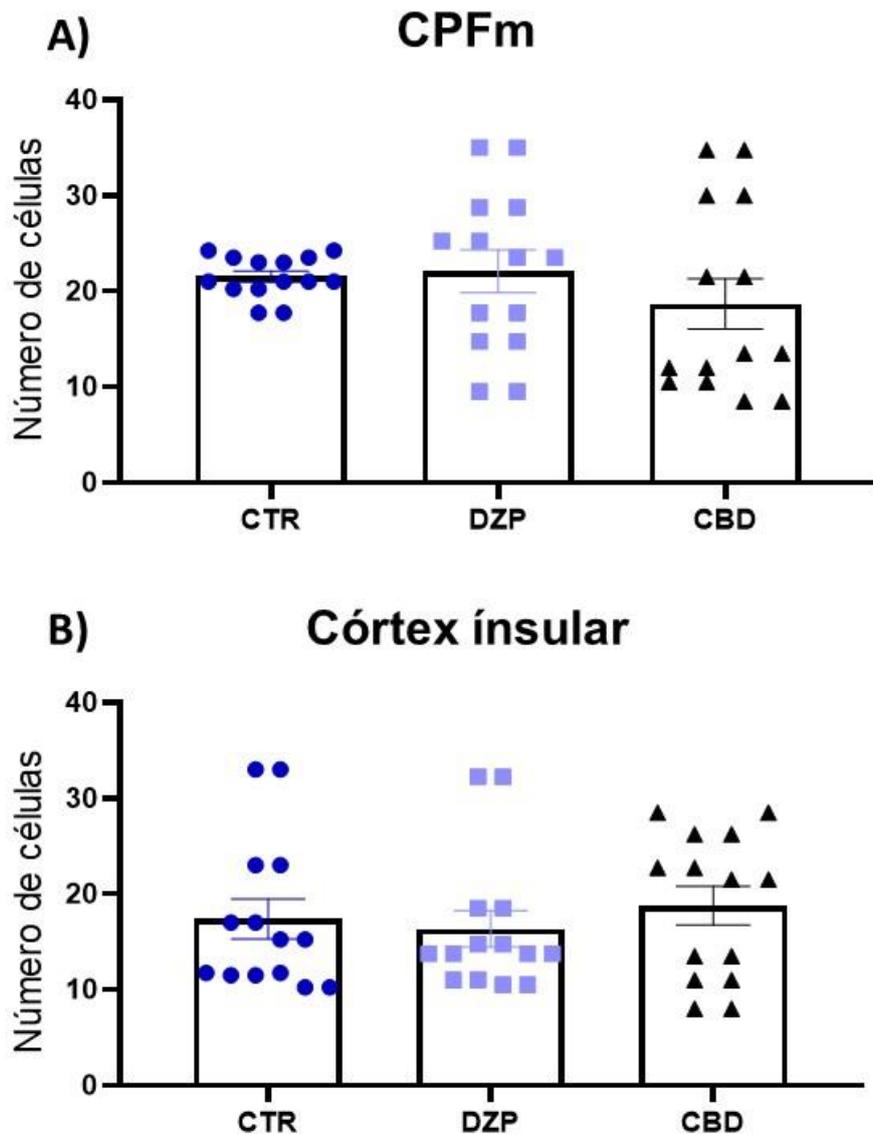
**Figura 11: Efeito da administração de diazepam e CBD, na imunorreatividade para C-Fos na Amígdala e no núcleo do leito da estria terminal (BNST).** A) Na Amígdala, o grupo DZP apresentou uma redução no número de células imunorreativas quando comparado com CTR ( $p=0,0032$ ) e CBD ( $p=0,0008$ ); B) No Leito da estria terminal, o grupo CBD apresentou um aumento na imunorreatividade para C-Fos quando comparado com o grupo CTR ( $p=0,0074$ ) e DZP ( $p=0,0038$ ).

No hipocampo, a ANOVA mostrou efeito significativo de tratamento em CA1 [F (2,39) = 16,65;  $p < 0,0001$ ], CA3 [F (2,39) = 5,901;  $p = 0,0058$ ], e no giro denteado [F (2,39) = 6,034;  $p = 0,0052$ ]. O pós-teste de Tukey revelou uma redução significativa da imunorreatividade para c-Fos, em CA1, no grupo DZP comparado aos grupos CTR ( $p = 0,0015$ ) e CBD ( $p < 0,0001$ ), (Figura 11A). Já em CA3 e no giro denteado, observamos que o grupo CBD apresentou um aumento significativa na imunorreatividade para c-Fos comparado aos grupos CTR ( $p = 0,0080$  e  $p = 0,0071$ , respectivamente) e DZP ( $p = 0,0255$  e  $p = 0,0247$ , respectivamente), (Figura 11B e C).



**Figura 12: Efeito da administração de diazepam e CBD, na imunorreatividade para C-Fos no hipocampo.** (A) em CA1 o grupo DZP apresentou uma redução no número de células quando comparado com os grupos CTR \*(p=0,0015) e CBD #(p<0,0001). (B) Para a região de CA3 o grupo CBD apresentou um aumento na imunorreatividade de C-Fos quando comparado com o grupo CTR \*(p=0,0080) e DZP #(p=0,0255), (C) na região do giro denteado o grupo CBD aumentou a imunorreatividade de C-Fos quando comparado ao grupo CTR \*(p=0,0071) e DZP #(p=0,0247).

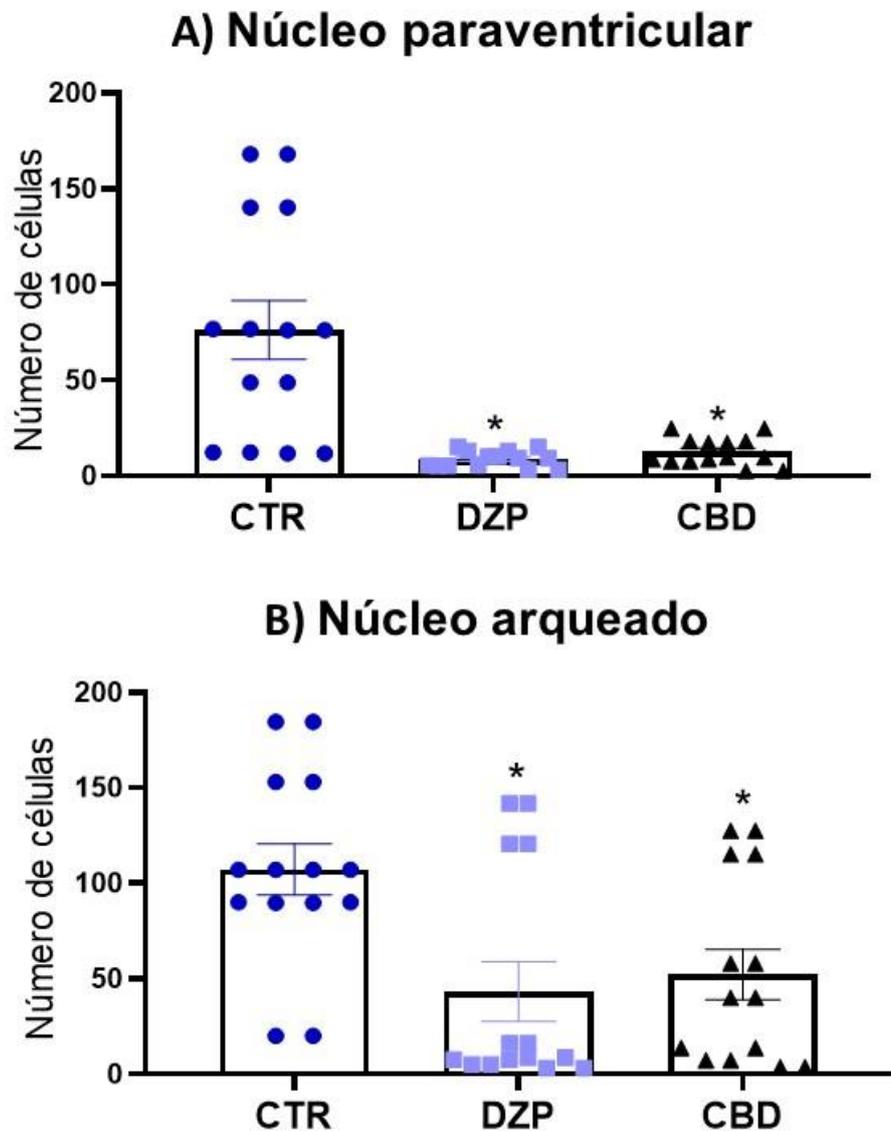
ANOVA não mostrou efeito significativo de tratamento para o CPFm [F (2,39) = 0,8106; p = 0,4519], (Figura 12 A) e córtex insular [F (2,39) = 0,3647; p = 0,6968], (Figura 12 B).



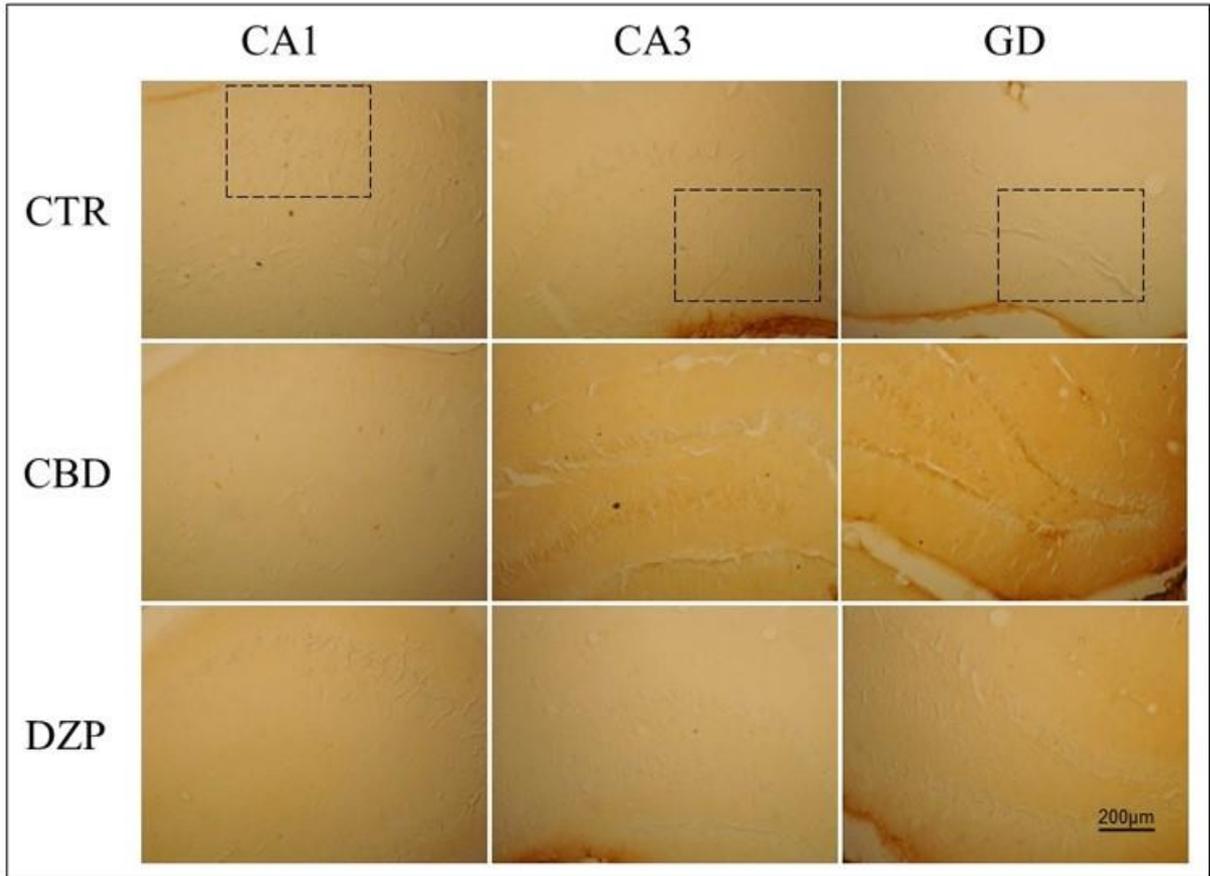
**Figura 13: Efeito da administração de diazepam e CBD, na imunorreatividade para C-Fos no CPFM e no córtex ínsular.** A) o pós-teste de Tukey's não mostrou diferença significativa na imunorreatividade de C-Fos entre os grupos CTR, DZP e CBD; B) o pós-teste de Tukey's não mostrou diferença significativa na imunorreatividade de C-Fos entre os grupos CTR, DZP e CBD.

No hipotálamo, a ANOVA mostrou efeito significativo de tratamento para o núcleo paraventricular [ $F(2,39) = 17,83$ ;  $p < 0,0001$ ], e para núcleo arqueado [ $F(2,39) = 6,086$ ;  $p = 0,0050$ ]. O pós-teste de Tukey revelou uma redução significativa na imunorreatividade para c-Fos, no núcleo paraventricular, dos grupos DZP e CBD comparados ao grupo CTR ( $p < 0,0001$  e  $p < 0,0001$ , respectivamente), (Figura 13A). Semelhante, no núcleo arqueado, os grupos DZP

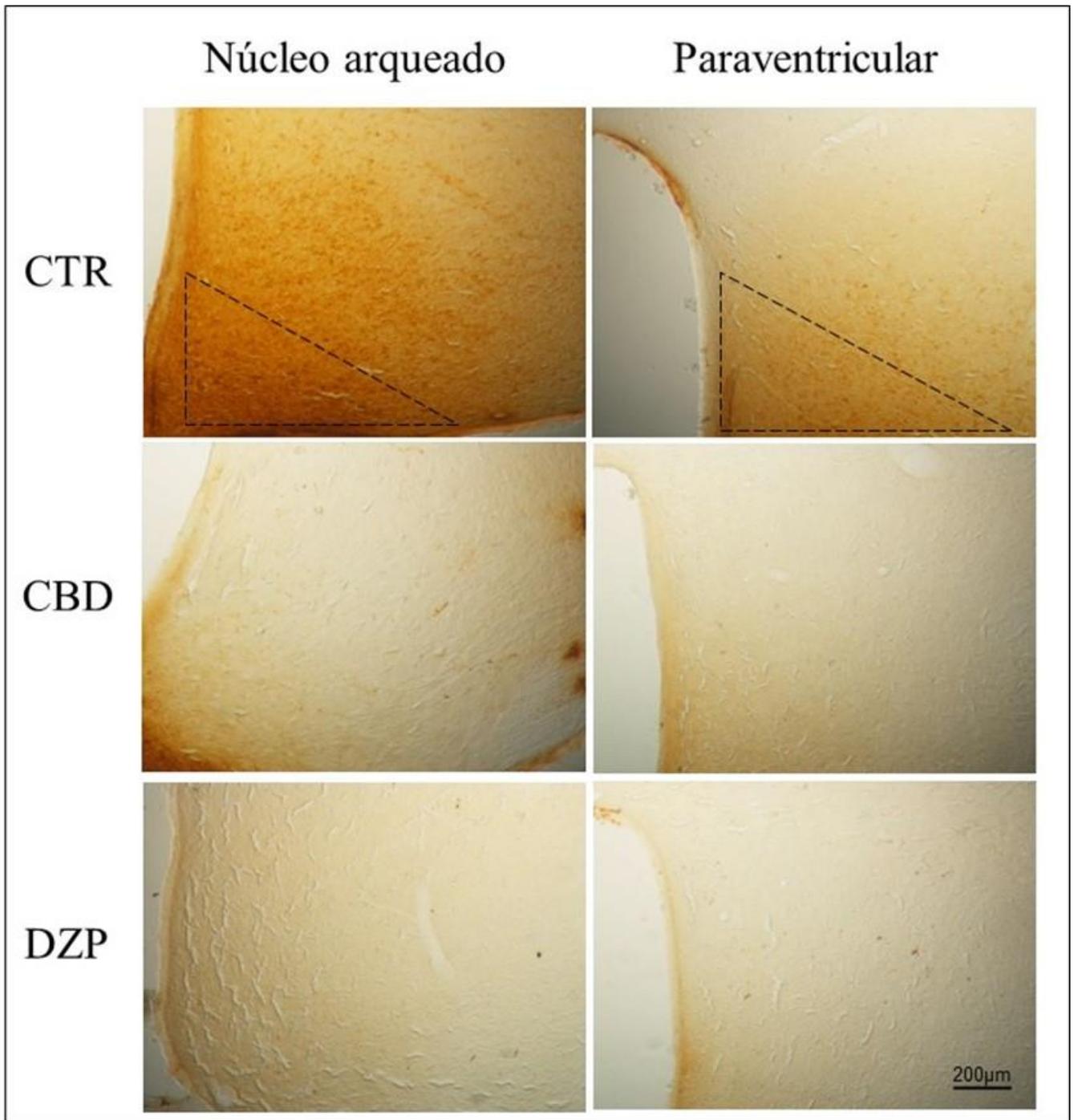
e CBD apresentaram redução na imunorreatividade, quando comparado ao CTR ( $p = 0,0071$  e  $p = 0,0226$ , respectivamente), (Figura 13B).



**Figura 14: Efeito da administração de diazepam e CBD, na imunorreatividade para C-Fos no hipotálamo.** (A) No núcleo paraventricular, o grupo CTR apresentou um aumento na imunorreatividade de C-Fos, quando comparado com o grupo DZP  $*(p<0,0001)$  e CBD  $*(p<0,0001)$  e (B) no núcleo arqueado, o grupo CTR apresentou um aumento na imunorreatividade de C-Fos, quando comparado com o grupo DZP  $*(p=0,0071)$  e CBD  $*(p=0,0226)$ .



**Figura 15:** Imagens representativas de imunorreatividade para C-Fos em CA1, CA3 e giro denteado.



**Figura 16:** Imagens representativas de imunorreatividade para C-Fos no hipotálamo nos núcleos arqueado e paraventricular.

## 6. DISCUSSÃO

No presente trabalho foi avaliado o efeito de uma dose baixa (0,3 mg/kg) de CBD em ratas fêmeas na fase de diestro tardio, fase na qual as ratas apresentam uma redução abrupta de progesterona, o que favorece a ocorrência de um aumento do comportamento do tipo ansioso. Além disso foi avaliada a ativação de áreas envolvidas na circuitaria da ansiedade e da memória. Observamos que a dose baixa de CBD reduziu o comportamento tipo ansioso sem causar perda de memória nesses animais. Além disso, observamos que o CBD aumentou a atividade dos núcleos: leito da estria terminal, CA3 e giro denteado e reduziu a atividades dos núcleos: hipotalâmicos (núcleo paraventricular e núcleo arqueado).

No estudo de Fabris (2022), foi visto que de acordo com o período estral das ratas existe diferença em relação ao comportamento tipo ansioso, onde no diestro tardio, as ratas entram menos no braço aberto quando comparadas com ratas no proestro, caracterizando um comportamento tipo ansioso no grupo diestro tardio. Esse resultado tem sido mostrado em outros estudos que também trazem essa diferença em relação a fase do ciclo e reforçam a importância de se levar em consideração as diferenças entre machos e fêmeas quanto a sensibilidade a diferentes drogas (Fabris et al., 2022; Jang & Elfenbein, 2019; Shelby Blair et al., 2022). Quanto ao efeito do CBD, no trabalho de Fabris (2022) foi observado que uma dose de 0,3 mg/kg apresentou efeito ansiolítico, na tarefa do labirinto em cruz elevado, em fêmeas na fase diestro tardio do ciclo estral. Além disso, também foi observado que fêmeas no diestro tardio elas apresentam uma maior sensibilidade a uma dose baixa (0,3 mg/kg) de CBD quando comparada a outras fases do ciclo e às doses maiores (3 e 30 mg/kg). No presente estudo, utilizando a tarefa de labirinto em cruz elevado modificado, observamos resultado semelhante, quando uma dose de 0,3 mg/kg de CBD administrada, pois, reduziu o comportamento tipo ansioso de ratas na fase de diestro tardio. Ainda, para os parâmetros de ansiedade, os resultados obtidos para o CBD, foram semelhantes ao observado com o uso do DZP.

O labirinto em cruz elevado modificado é um dos modelos mais utilizados para investigar as bases fisiopatológicas da ansiedade, amplamente utilizado para verificar o potencial efeito ansiolítico ou ansigênico de medicamentos, além de possibilitar o estudo das

diversas fases do processo de memória e também da atividade motora dos animais (Himanshu et al., 2020; Lovick & Zangrossi, 2021).

Um dos parâmetros avaliados no presente estudo foi a distância total percorrida, onde não foi observada diferença significativa entre os grupos CTR, DZP e CBD. Esse resultado está de acordo com a literatura, na qual é mostrado que o CBD e o DZP não causam alterações motoras nas doses empregadas (Huffstetler et al., 2023; Matsumoto et al., 2021; Mehrhoff et al., 2023; Todd & Arnold, 2016). Huffstetler et al., 2023, em um modelo de camundongos selvagens e camundongos com ansiedade características, mostraram que o CBD nas doses de 10 e 20 mg/kg não apresentaram alterações motoras nos animais, além de não ter influência do sexo. Semelhantemente, no trabalho de Todd & Arnold (2016), os quais também não observaram prejuízo motor nos animais tratados com CBD em uma dose de 10 mg/kg, além disso foi visto que o CBD foi capaz de reduzir o déficit motor causado pelo THC.

Ao avaliarmos a distância total percorrida em cada braço observamos que os grupos CTR e CBD apresentaram comportamento semelhante, apresentando uma maior distância percorrida no braço fechado quando comparados com o grupo DZP. O braço fechado corresponde ao braço seguro. Esse dado corrobora com outros achados onde mostram que os animais possuem uma preferência maior ao braço fechado quando comparado aos outros braços. O labirinto em cruz elevado modificado possui estímulos aversivos leves (luz e ruído), sendo assim o teste é capaz de promover o aprendizado associativo. Apesar das diferenças observadas, quando comparado aos grupos CTR e CBD, o grupo DZP também apresentou maior distância percorrida no braço fechado, quando comparado ao braço aversivo. Mesmo sendo considerado leve esses estímulos são aversivos para o animal e quando pensamos em distância total percorrida em cada braço é esperado que os animais percorram menos o aversivo quando comparado aos outros independentemente do tratamento (Silva et al., 2004a; Silva & Frussa-Filho, 2000).

Quando pensamos em um teste que avalia aspectos ansiolíticos, o labirinto é um dos testes que se destaca. Um dos parâmetros mais utilizados para avaliar esse comportamento é o número de entradas em cada braço, já que os animais tendem a entrar menos nos braços abertos, pois estes são mais expostos para o animal. Nossos dados mostram um efeito ansiolítico para o CBD, semelhante ao Diazepam, cujos animais tratados com uma das duas drogas apresentaram

um maior número de entradas nos braços abertos, quando comparados com os animais do grupo CTR. Nossos dados vão de encontro aos dados apresetados no estudo de Huffstetler et.al, (2023), no qual foi observado que o CBD, em fêmeas, não causou efeito ansiolítico. Essa divergência de resultados pode ser explicada pelo fato deles não avaliarem a influência do ciclo estral das ratas.

Já no estudo de Salviato et. al (2021), foi feito um experimento agudo onde as doses utilizadas foram 1 mg/kg e 3 mg/kg. Neste trabalho foi visto que apenas a dose maior (3 mg/kg) foi capaz de causar um efeito ansiolítico nas fêmeas. Entretanto, neste estudo não foi avaliada a influência do ciclo estral, o que pode ser a explicação para apenas uma dose maior do CBD apresentar efeito ansiolítico nas ratas.

Acompanhar a fase do ciclo é um fator de grande relevância, pois ratas se comportam de maneira diferente em testes comportamentais, de acordo com a fase do ciclo (Shelby Blair et al., 2022). Semelhantemente, esse aspecto também é observado em mulheres, pois elas apresentam comportamento tipo ansioso e respostas a determinados medicamentos que oscilam de acordo com a fase do ciclo menstrual (Jang & Elfenbein, 2019). Assim pensar na influência hormonal causada pelas oscilações hormonais que ocorrem durante todo o ciclo ovariano é essencial para entendermos melhor os efeitos do CBD em fêmeas.

No estudo de Fabris et. al, (2022), foi avaliado a influência do ciclo estral em relação a resposta após a administração aguda de CBD, neste trabalho foi visto que, de acordo com o a fase do ciclo, as ratas respondem diferentemente ao CBD e no diestro tardio, fase de maior comportamento tipo ansioso, o CBD foi capaz de causar uma redução da aniedade, observada pelo aumento do número de entradas nos braços avertos do labirinto. As ratas responderam com uma redução do comportamento ansioso apenas quando tratadas com uma dose (0,3 mg/kg) de CBD, mas não a doses maiores (3,0 mg/kg ou 30 mg/kg).

Além disso o nosso trabalho corrobora ao de Fabris et. al, (2022) para o número de entradas no braço fechado. Observamos que o CTR não foi diferente do CBD nesse parâmetro, o que já era esperado pra esse parâmetro, pois o animal tende a ficar mais no braço fechado, que é considerado o braço seguro (Silva et al., 2004). Alguns trabalhos já mostram o efeito ansiolítico do CBD, mas a maioria deles são feitos com machos e quando comparamos a curva de dose resposta de machos com fêmeas é bem diferente. Os machos respondem a doses bem

maiores do que a das fêmeas, principalmente quando é lavada em consideração a fase do ciclo na resposta ao CBD (Knight et al., 2021; Schiavon et al., 2016).

No presente estudo também avaliamos o efeito do CBD sobre a capacidade de formar memória. Observamos que o CBD não causou perda de memória nas ratas testadas, pois quando comparado com o grupo CTR o número de entradas no braço aversivo não apresentou diferença significativa. Entretanto, as ratas do grupo DZP, apesar de apresentarem redução do comportamento tipo ansioso, apresentaram prejuízos na fase de formação de memória. Esse resultado é constatado quando observamos que o grupo DZP apresentou um maior número de entradas no braço aversivo, quando comparado ao controle.

Além disso realizamos um teste para avaliar a curva de aprendizado, foi observado a curva de aprendizado do DZP apresentou uma inclinação bem menor que o CTR e CBD, reforçando assim que o grupo DZP apresentou prejuízo na aprendizagem da tarefa. Esse dado corrobora outros estudos que mostram que o DZP apresenta efeito ansiolítico, mas que prejudica o processo de aprendizagem, indicando prejuízo na aquisição de memória aversiva (Dierschnabel et al., 2023; Leão et al., 2016; Pestana & Graham, 2023). Esse achado pode ser explicado pelo fato de o DZP ser um modulador alostérico dos receptores GABA<sub>A</sub>. O aumento da inibição provocada pelo GABA, o qual está distribuído em áreas do cérebro envolvidas na formação de memória, interfere na função das sinapses excitatórias, que são essenciais para o processo de memória (Joksimović et al., 2013; Murakami et al., 2017).

Para avaliar se os diferentes efeitos observados entre o CBD e o DZP são causados pela atividade neuronal de diferentes núcleos cerebrais, nós observamos a expressão de c-Fos em neurônios de áreas envolvidas com ansiedade e memória. Um aumento da imunorreatividade para a proteína c-Fos indica uma maior atividade neuronal (Singewald et al., 2003). No presente estudo, observamos que o CBD aumentou a atividade dos núcleos: leito da estria terminal, CA1, CA3, giro denteado e locus coeruleus e reduziu a atividades dos núcleos: hipotalâmicos (núcleo paraventricular e núcleo arqueado), enquanto o grupo DZP apresentou um aumento da atividade no núcleo ventrolateral da PAG. Os resultados de imunorreatividade para a proteína c-Fos corroboram os nossos dados comportamentais, pois a ausência do prejuízo na memória proporcionada pelo CBD pode ser explicada pelo aumento da ativação de áreas hipocâmpais.

Os nossos achados vão de encontro aos demonstrado por Toood e Arnold (2016), no qual não foi visto nenhuma alteração na imunorreatividade para c-Fos para os animais tratados apenas com CBD (Todd & Arnold, 2016). Essa diferença pode ser explicada pelas diferenças metodológicas aplicadas entre os estudos. No estudo citado, foi utilizada uma dose diferente de CBD, além de ter sido um trabalho que utilizou apenas animais machos e também a dose utilizada foi diferente da nossa. Nesse estudo eles não observaram redução da ansiedade após o tratamento com CBD 10mg/kg. Entretanto, ainda no mesmo estudo, quando os animais foram tratados com uma combinação de 1:1 de THC e CBD, eles apresentaram uma redução do comportamento tipo ansioso, acompanhado de uma redução na imunorreatividade para c-Fos em áreas envolvidadas com a ansiedade, como a PAG, a qual provoca comportamentos defensivos caracterizados por alerta, congelamento e fuga, e por respostas autonômicas (Lukasik et al., 2019).

No estudo de Lowery-Gionta (2018) foi visto que a inibição funcional dos neurônios GABA na região ventrolateral da PAG leva a um comportamento ansiogênico, avaliado através do teste de labirinto elevado e campo aberto. Esse achado corrobora os nossos dados, pois observamos que nessa região os grupos DZP e CBD apresentaram um aumento na imunorreatividade de c-Fos, o que caracteriza a redução no comportamento tipo ansioso (Lowery-Gionta et al., 2018). A região dorsomedial da PAG está envolvida com o comportamento ansiogênico e de pânico. Já foi visto que em situação de pânico, como expor um animal ao seu predador, ocorre um aumento da produção da proteína c-Fos nessa região (Sabino et al., n.d.; Ullah et al., 2017). Além disso, a PAG desencadeia respostas autonômicas através de uma ação integrada com o tronco cerebral, hipotálamo e amígdala (McCall et al., 2015; Shupe et al., 2024). Durante situações estressantes e quadros de ansiedade, o eixo hipotálamo-hipofise-adrenal é ativado, causando a liberação de cortisol (Bao & Swaab, 2019). No presente estudo, observamos uma redução de c-Fos nos núcleos hipotalâmicos dos animais tratados com CBD e DZP, corroborando com o que já é descrito na literatura sobre o envolvimento dessa área com o comportamento de ansiedade. (Bao & Swaab, 2019)

Uma outra área analisada no presente estudo foi o locus coeruleus. Esta área é um dos principais núcleos produtores de noradrenalina e está envolvido com respostas estímulos estressores e o comportamento de ansiedade (Reyes et al., 2008). É importante ressaltar que o hormônio liberador de corticotrofina age como um neurotransmissor no locus coeruleus,

ativando os neurônios noradrenergicos deste núcleo (McCall et al., 2015; Shupe et al., 2024). No presente estudo, observamos uma redução na atividade desse núcleo para o grupo CBD, o que pode ser explicado pela regulação que esse núcleo sofre do hipotálamo (Reyes et al., 2008). Na literatura já é documentado que um aumento na imunorreatividade para c-Fos no locus coeruleus está envolvido com o comportamento ansiogênico e o contrário estar relacionado com o comportamento ansiolítico (McCall et al., 2015).

Quando avaliamos a imunorreatividade para c-Fos na amígdala, um dos pontos chaves no circuito da ansiedade, observamos que o CBD não reduziu, como o grupo DZP, o número de células reativas para a proteína c-Fos. E, observando o leito da estria terminal, o CBD causou um aumento do número de células imunorreativas para c-Fos, quando comparado ao grupo controle e DZP. Em parte, possivelmente, o efeito ansiolítico do CBD pode ser explicado pelo envolvimento de diferentes áreas envolvidas no circuito da ansiedade, quando comparado ao efeito ansiolítico promovido pelo DZP. Entretanto, esses mecanismos precisam ser melhores investigados.

## 7. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que a administração aguda de uma dose baixa de CBD (0,3 mg/kg) em ratas fêmeas, na fase de diestro tardio, foi eficaz na redução do comportamento do tipo ansioso, sem causar prejuízos na formação de memória. Os efeitos ansiolíticos observados foram comparáveis aos do DZP, porém com a vantagem de não comprometer a capacidade de aprendizado e memória.

O impacto diferencial do CBD e do DZP também se refletiu nos padrões de ativação neuronal, evidenciados pela expressão de c-Fos em diferentes regiões cerebrais associadas à ansiedade e à memória. O aumento da atividade em áreas hipocampais e no leito da estria terminal, juntamente com a redução da atividade em núcleos hipotalâmicos, sugere um mecanismo de ação distinto para o CBD, quando comparado ao DZP.

Os achados do presente estudo apontam que o CBD pode ser uma excelente alternativa para o tratamento agudo da ansiedade em fêmeas. Entretanto, novos estudos precisam ser realizados para melhor a compreensão dos mecanismos envolvidos nesse processo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adhikari, A. (2014). Distributed circuits underlying anxiety. In *Frontiers in Behavioral Neuroscience* (Vol. 8, Issue APR). Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00112>
- Adhikari, A., Topiwala, M. A., & Gordon, J. A. (2010). Synchronized Activity between the Ventral Hippocampus and the Medial Prefrontal Cortex during Anxiety. *Neuron*, 65(2), 257–269. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.12.002>
- Altemus, M., Sarvaiya, N., & Neill Epperson, C. (2014). Sex differences in anxiety and depression clinical perspectives. In *Frontiers in Neuroendocrinology* (Vol. 35, Issue 3, pp. 320–330). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2014.05.004>
- Alves, P., Amaral, C., Teixeira, N., & Correia-da-Silva, G. (2020). Cannabis sativa: Much more beyond  $\Delta$ 9-tetrahydrocannabinol. In *Pharmacological Research* (Vol. 157). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.104822>
- Amin, Z., Canli, T., & Epperson, C. N. (2005). Effect of estrogen-serotonin interactions on mood and cognition. In *Behavioral and Cognitive Neuroscience Reviews* (Vol. 4, Issue 1, pp. 43–58). <https://doi.org/10.1177/1534582305277152>
- Antonio Waldo Zuardi. (2006). História da cannabis como medicamento: uma revisão. *Rev. Brás. Psiquiatra*.
- Babaev, O., Piletti Chatain, C., & Krueger-Burg, D. (2018a). Inhibition in the amygdala anxiety circuitry. In *Experimental and Molecular Medicine* (Vol. 50, Issue 4). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s12276-018-0063-8>
- Babaev, O., Piletti Chatain, C., & Krueger-Burg, D. (2018b). Inhibition in the amygdala anxiety circuitry. In *Experimental and Molecular Medicine* (Vol. 50, Issue 4). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s12276-018-0063-8>
- Babalonis, S., Haney, M., Malcolm, R. J., Lofwall, M. R., Votaw, V. R., Sparenborg, S., & Walsh, S. L. (2017). Oral cannabidiol does not produce a signal for abuse liability in frequent marijuana smokers. *Drug and Alcohol Dependence*, 172, 9–13. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2016.11.030>
- Bandelow, B., & Michaelis, S. (2015a). *Epidemiology of anxiety disorders in the 21st century*. [www.dialogues-cns.org](http://www.dialogues-cns.org)
- Bandelow, B., & Michaelis, S. (2015b). *Epidemiology of anxiety disorders in the 21st century*. [www.dialogues-cns.org](http://www.dialogues-cns.org)
- Bangasser, D. A., & Cuarenta, A. (2021). Sex differences in anxiety and depression: circuits and mechanisms. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 22, Issue 11, pp. 674–684). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41583-021-00513-0>
- Bao, A. M., & Swaab, D. F. (2019). The human hypothalamus in mood disorders: The HPA axis in the center. In *IBRO Reports* (Vol. 6, pp. 45–53). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ibror.2018.11.008>

- Baron, E. P. (2018). Medicinal Properties of Cannabinoids, Terpenes, and Flavonoids in Cannabis, and Benefits in Migraine, Headache, and Pain: An Update on Current Evidence and Cannabis Science. In *Headache* (Vol. 58, Issue 7, pp. 1139–1186). Blackwell Publishing Inc. <https://doi.org/10.1111/head.13345>
- Bassi, M. S., Gentile, A., Iezzi, E., Zagaglia, S., Musella, A., Simonelli, I., Gilio, L., Furlan, R., Finardi, A., Marfia, G. A., Guadalupi, L., Bullitta, S., Mandolesi, G., Centonze, D., & Buttari, F. (2019). Transient receptor potential vanilloid 1 modulates central inflammation in multiple sclerosis. *Frontiers in Neurology*, *10*(JAN). <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00030>
- Bauer, E. P. (2023). Sex differences in fear responses: Neural circuits. In *Neuropharmacology* (Vol. 222). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2022.109298>
- Bauer, M. E., & Teixeira, A. L. (2019). Inflammation in psychiatric disorders: What comes first? In *Annals of the New York Academy of Sciences* (Vol. 1437, Issue 1, pp. 57–67). Blackwell Publishing Inc. <https://doi.org/10.1111/nyas.13712>
- Berlanga, C., & Flores-Ramos, M. (2006). Different gender response to serotonergic and noradrenergic antidepressants. A comparative study of the efficacy of citalopram and reboxetine. *Journal of Affective Disorders*, *95*(1–3), 119–123. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2006.04.029>
- Berret, E., Kintscher, M., Palchadhuri, S., Tang, W., Osypenko, D., Kochubey, O., & Schneggenburger, R. (2019). Insular cortex processes aversive somatosensory information and is crucial for threat learning. In *Science* (Vol. 364, Issue 6443). American Association for the Advancement of Science. <https://doi.org/10.1126/science.aaw0474>
- Blessing, E. M., Steenkamp, M. M., Manzanares, J., & Marmar, C. R. (2015). Cannabidiol as a Potential Treatment for Anxiety Disorders. In *Neurotherapeutics* (Vol. 12, Issue 4, pp. 825–836). Springer New York LLC. <https://doi.org/10.1007/s13311-015-0387-1>
- Boggs, D. L., Nguyen, J. D., Morgenson, D., Taffe, M. A., & Ranganathan, M. (2018). Clinical and Preclinical Evidence for Functional Interactions of Cannabidiol and  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol. In *Neuropsychopharmacology* (Vol. 43, Issue 1, pp. 142–154). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/npp.2017.209>
- Bonini, S. A., Premoli, M., Tambaro, S., Kumar, A., Maccarinelli, G., Memo, M., & Mastinu, A. (2018). Cannabis sativa: A comprehensive ethnopharmacological review of a medicinal plant with a long history. In *Journal of Ethnopharmacology* (Vol. 227, pp. 300–315). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.09.004>
- Bouras, N. N., Mack, N. R., & Gao, W. J. (2023). Prefrontal modulation of anxiety through a lens of noradrenergic signaling. In *Frontiers in Systems Neuroscience* (Vol. 17). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2023.1173326>
- Bridges, R. S., & Byrnes, E. M. (2006). Reproductive experience reduces circulating  $17\beta$ -estradiol and prolactin levels during proestrus and alters estrogen sensitivity in female rats. *Endocrinology*, *147*(5), 2575–2582. <https://doi.org/10.1210/en.2005-0917>

- Calhoun, G. G., & Tye, K. M. (2015a). Resolving the neural circuits of anxiety. In *Nature Neuroscience* (Vol. 18, Issue 10, pp. 1394–1404). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nn.4101>
- Calhoun, G. G., & Tye, K. M. (2015b). Resolving the neural circuits of anxiety. In *Nature Neuroscience* (Vol. 18, Issue 10, pp. 1394–1404). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nn.4101>
- Cammà, G., Verdouw, M. P., van der Meer, P. B., Groenink, L., & Batalla, A. (2025). Therapeutic potential of minor cannabinoids in psychiatric disorders: A systematic review. In *European Neuropsychopharmacology* (Vol. 91, pp. 9–24). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2024.10.006>
- Castillo, P. E., Younts, T. J., Chávez, A. E., & Hashimoto, Y. (2012). Endocannabinoid Signaling and Synaptic Function. In *Neuron* (Vol. 76, Issue 1, pp. 70–81). <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.09.020>
- Cauda, F., D'Agata, F., Sacco, K., Duca, S., Geminiani, G., & Vercelli, A. (2011). Functional connectivity of the insula in the resting brain. *NeuroImage*, 55(1), 8–23. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2010.11.049>
- Chen, J. W., Borgelt, L. M., & Blackmer, A. B. (2019a). Cannabidiol: A New Hope for Patients With Dravet or Lennox-Gastaut Syndromes. In *Annals of Pharmacotherapy* (Vol. 53, Issue 6, pp. 603–611). SAGE Publications Inc. <https://doi.org/10.1177/1060028018822124>
- Chen, J. W., Borgelt, L. M., & Blackmer, A. B. (2019b). Cannabidiol: A New Hope for Patients With Dravet or Lennox-Gastaut Syndromes. In *Annals of Pharmacotherapy* (Vol. 53, Issue 6, pp. 603–611). SAGE Publications Inc. <https://doi.org/10.1177/1060028018822124>
- Choi, S. I., Lim, J. Y., Yoo, S., Kim, H., & Hwang, S. W. (2016). Emerging Role of Spinal Cord TRPV1 in Pain Exacerbation. In *Neural Plasticity* (Vol. 2016). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2016/5954890>
- Craske, M. G., & Stein, M. B. (2016). Anxiety. In *The Lancet* (Vol. 388, Issue 10063, pp. 3048–3059). Lancet Publishing Group. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30381-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30381-6)
- Cristino, L., Bisogno, T., & Di Marzo, V. (2020). Cannabinoids and the expanded endocannabinoid system in neurological disorders. In *Nature Reviews Neurology* (Vol. 16, Issue 1, pp. 9–29). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41582-019-0284-z>
- Cristino, L., de Petrocellis, L., Pryce, G., Baker, D., Guglielmotti, V., & Di Marzo, V. (2006). Immunohistochemical localization of cannabinoid type 1 and vanilloid transient receptor potential vanilloid type 1 receptors in the mouse brain. *Neuroscience*, 139(4), 1405–1415. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.02.074>
- Davis, M., Walker, D. L., Miles, L., & Grillon, C. (2010). Phasic vs sustained fear in rats and humans: Role of the extended amygdala in fear vs anxiety. In *Neuropsychopharmacology* (Vol. 35, Issue 1, pp. 105–135). <https://doi.org/10.1038/npp.2009.109>
- de Jonge, P., Roest, A. M., Lim, C. C. W., Florescu, S. E., Bromet, E. J., Stein, D. J., Harris, M., Nakov, V., Caldas-de-Almeida, J. M., Levinson, D., Al-Hamzawi, A. O., Haro, J. M., Viana, M. C., Borges, G., O'Neill, S., de Girolamo, G., Demyttenaere, K., Gureje, O., Iwata,

- N., ... Scott, K. M. (2016). Cross-national epidemiology of panic disorder and panic attacks in the world mental health surveys. *Depression and Anxiety*, 33(12), 1155–1177. <https://doi.org/10.1002/da.22572>
- de Souza, M. R., Henriques, A. T., & Limberger, R. P. (2022). Medical cannabis regulation: an overview of models around the world with emphasis on the Brazilian scenario. In *Journal of Cannabis Research* (Vol. 4, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s42238-022-00142-z>
- Debruyne, D., & LE BOISSELIER, R. (2015). Emerging drugs of abuse: current perspectives on synthetic cannabinoids. *Substance Abuse and Rehabilitation*, 113. <https://doi.org/10.2147/sar.s73586>
- Devall, A. J., Liu, Z. W., & Lovick, T. A. (2009). Hyperalgesia in the setting of anxiety: Sex differences and effects of the oestrous cycle in Wistar rats. *Psychoneuroendocrinology*, 34(4), 587–596. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2008.10.021>
- Devall, A. J., Santos, J. M., Fry, J. P., Honour, J. W., Brandão, M. L., & Lovick, T. A. (2015). Elevation of brain allopregnanolone rather than 5-HT release by short term, low dose fluoxetine treatment prevents the estrous cycle-linked increase in stress sensitivity in female rats. *European Neuropsychopharmacology*, 25(1), 113–123. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2014.11.017>
- Dierschnabel, A. L., de Lima, A. P. N., do Nascimento, E. B., Suchecki, D., Silva, R. H., & Ribeiro, A. M. (2023). Acute Fluoxetine Administration (but Not Other Antidepressant or Anxiolytics) Reverses Stress-Induced Aversive Memory Deficits in Mice. *Psychology and Neuroscience*, 16(1), 52–70. <https://doi.org/10.1037/pne0000304>
- Do, E. P. B. (2018). *Medicinal Properties of Cannabinoids, Terpenes, and Flavonoids in Cannabis, and Benefits in Migraine, Headache, and Pain: An Update on Current Evidence and Cannabis Science*.
- Duarte-Guterman, P., Leuner, B., & Galea, L. A. M. (2019). The long and short term effects of motherhood on the brain. In *Frontiers in Neuroendocrinology* (Vol. 53). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2019.02.004>
- Ellenbroek, B. (2011). *Current Topics in Behavioral Neurosciences*.
- Ellenbroek, B., & Charles Marsden, G. (n.d.). *Current Topics in Behavioral Neurosciences*.
- El-Talatini, M. R., Taylor, A. H., Elson, J. C., Brown, L., Davidson, A. C., & Konje, J. C. (2009). Localisation and function of the endocannabinoid system in the human ovary. *PLoS ONE*, 4(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004579>
- Ergisi, M., Erridge, S., Harris, M., Kawka, M., Nimalan, D., Salazar, O., Loupasaki, K., Ali, R., Holvey, C., Coomber, R., Platt, M., Rucker, J. J., & Sodergren, M. H. (2022). UK Medical Cannabis Registry: an analysis of clinical outcomes of medicinal cannabis therapy for generalized anxiety disorder. *Expert Review of Clinical Pharmacology*. <https://doi.org/10.1080/17512433.2022.2020640>
- Escelsior, A., Sterlini, B., Murri, M. B., Serafini, G., Aguglia, A., da Silva, B. P., Corradi, A., Valente, P., & Amore, M. (2020). Red-hot chili receptors: A systematic review of TRPV1

- antagonism in animal models of psychiatric disorders and addiction. In *Behavioural Brain Research* (Vol. 393). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.112734>
- Fernández-Guasti, A., Olivares-Nazario, M., Reyes, R., & Martínez-Mota, L. (2017). Sex and age differences in the antidepressant-like effect of fluoxetine in the forced swim test. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *152*, 81–89. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2016.01.011>
- Fiksdal, A., Hanlin, L., Kuras, Y., Gianferante, D., Chen, X., Thoma, M. V., & Rohleder, N. (2019). Associations between symptoms of depression and anxiety and cortisol responses to and recovery from acute stress. *Psychoneuroendocrinology*, *102*, 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2018.11.035>
- Fonseca, B. M., Correia-da-Silva, G., Taylor, A. H., Konje, J. C., Bell, S. C., & Teixeira, N. A. (2009). Spatio-temporal expression patterns of anandamide-binding receptors in rat implantation sites: Evidence for a role of the endocannabinoid system during the period of placental development. *Reproductive Biology and Endocrinology*, *7*. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-7-121>
- Fonseca, B. M., Correia-da-Silva, G., Taylor, A. H., Lam, P. M. W., Marczylo, T. H., Konje, J. C., & Teixeira, N. A. (2012). Characterisation of the endocannabinoid system in rat haemochorial placenta. *Reproductive Toxicology*, *34*(3), 347–356. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2012.05.036>
- Fonseca, B. M., Costa, M. A., Almada, M., Correia-Da-Silva, G., & Teixeira, N. A. (2013). Endogenous cannabinoids revisited: A biochemistry perspective. In *Prostaglandins and Other Lipid Mediators* (Vols. 102–103, pp. 13–30). <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2013.02.002>
- Freese, J. L., & Amaral, D. G. (2006). Synaptic organization of projections from the amygdala to visual cortical areas TE and V1 in the macaque monkey. *Journal of Comparative Neurology*, *496*(5), 655–667. <https://doi.org/10.1002/cne.20945>
- Fride, E. (2002). *Endocannabinoids in the central nervous system-an overview*. <http://www.idealibrary.com>
- García-Gutiérrez, M. S., Navarrete, F., Gasparyan, A., Austrich-Olivares, A., Sala, F., & Manzanares, J. (2020). Cannabidiol: A potential new alternative for the treatment of anxiety, depression, and psychotic disorders. *Biomolecules*, *10*(11), 1–34. <https://doi.org/10.3390/biom10111575>
- Gehrlach, D. A., Dolensek, N., Klein, A. S., Roy Chowdhury, R., Matthys, A., Junghänel, M., Gaitanos, T. N., Podgornik, A., Black, T. D., Reddy Vaka, N., Conzelmann, K. K., & Gogolla, N. (2019). Aversive state processing in the posterior insular cortex. *Nature Neuroscience*, *22*(9), 1424–1437. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0469-1>
- Ghasemi, M., Navidhamidi, M., Rezaei, F., Azizikia, A., & Mehranfard, N. (2022a). Anxiety and hippocampal neuronal activity: Relationship and potential mechanisms. In *Cognitive, Affective and Behavioral Neuroscience* (Vol. 22, Issue 3, pp. 431–449). Springer. <https://doi.org/10.3758/s13415-021-00973-y>

- Ghasemi, M., Navidhamidi, M., Rezaei, F., Azizikia, A., & Mehranfard, N. (2022b). Anxiety and hippocampal neuronal activity: Relationship and potential mechanisms. In *Cognitive, Affective and Behavioral Neuroscience* (Vol. 22, Issue 3, pp. 431–449). Springer. <https://doi.org/10.3758/s13415-021-00973-y>
- Griebel, G., & Holmes, A. (2013). 50 years of hurdles and hope in anxiolytic drug discovery. In *Nature Reviews Drug Discovery* (Vol. 12, Issue 9, pp. 667–687). <https://doi.org/10.1038/nrd4075>
- Hantsoo, L., & Epperson, C. N. (2017). Anxiety Disorders Among Women: A Female Lifespan Approach. *FOCUS*, 15(2), 162–172. <https://doi.org/10.1176/appi.focus.20160042>
- Harkany, T., Mackie, K., & Doherty, P. (2008). Wiring and firing neuronal networks: endocannabinoids take center stage. In *Current Opinion in Neurobiology* (Vol. 18, Issue 3, pp. 338–345). <https://doi.org/10.1016/j.conb.2008.08.007>
- Hillard, C. J. (2018). Circulating Endocannabinoids: From Whence Do They Come and Where are They Going? In *Neuropsychopharmacology* (Vol. 43, Issue 1, pp. 155–172). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/npp.2017.130>
- Hillard, C. J., Weinlander, K. M., & Stuhr, K. L. (2012). Contributions of endocannabinoid signaling to psychiatric disorders in humans: Genetic and biochemical evidence. In *Neuroscience* (Vol. 204, pp. 207–229). <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.11.020>
- Himanshu, Dharmila, Sarkar, D., & Nutan. (2020). A review of behavioral tests to evaluate different types of anxiety and anti-anxiety effects. In *Clinical Psychopharmacology and Neuroscience* (Vol. 18, Issue 3, pp. 341–351). Korean College of Neuropsychopharmacology. <https://doi.org/10.9758/CPN.2020.18.3.341>
- Höglund, P., Hakelind, C., & Nordin, S. (2020). Severity and prevalence of various types of mental ill-health in a general adult population: Age and sex differences. *BMC Psychiatry*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12888-020-02557-5>
- Huffstetler, C. M., Cochran, B., May, C. A., Maykut, N., Silver, C. R., Cedeno, C., Franck, E., Cox, A., & Fadool, D. A. (2023). Single cannabidiol administration affects anxiety-, obsessive compulsive-, object memory-, and attention-like behaviors in mice in a sex and concentration dependent manner. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 222. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2022.173498>
- Ivan Urits, Matthew Borchart, Morgan Hasegawa, Justin Kochanski, Vwaire Orhurhu, & Omar Viswanath. (2019). An Update of Current Cannabis-Based Pharmaceuticals in Pain Medicine. *Pain and Therapy*, 8. <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.7619327>
- Janak, P. H., & Tye, K. M. (2015). From circuits to behaviour in the amygdala. In *Nature* (Vol. 517, Issue 7534, pp. 284–292). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nature14188>
- Jang, D., & Elfenbein, H. A. (2019a). Menstrual Cycle Effects on Mental Health Outcomes: A Meta-Analysis. *Archives of Suicide Research*, 23(2), 312–332. <https://doi.org/10.1080/13811118.2018.1430638>

- Jang, D., & Elfenbein, H. A. (2019b). Menstrual Cycle Effects on Mental Health Outcomes: A Meta-Analysis. *Archives of Suicide Research*, 23(2), 312–332. <https://doi.org/10.1080/13811118.2018.1430638>
- Jean-Gilles, L., Gran, B., & Constantinescu, C. S. (2010). Interaction between cytokines, cannabinoids and the nervous system. *Immunobiology*, 215(8), 606–610. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2009.12.006>
- Joksimović, S., Divljaković, J., Van Linn, M. L., Varagic, Z., Brajković, G., Milinković, M. M., Yin, W., Timić, T., Sieghart, W., Cook, J. M., & Savić, M. M. (2013). Benzodiazepine-induced spatial learning deficits in rats are regulated by the degree of modulation of  $\alpha 1$  GABAA receptors. *European Neuropsychopharmacology*, 23(5), 390–399. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2012.05.003>
- Julie Gould. (2015). *The cannabis crop*.
- Karche, T., & Singh, M. R. (2019). The application of hemp Cannabis sativa l. for a green economy: A review. In *Turkish Journal of Botany* (Vol. 43, Issue 6, pp. 710–723). Turkiye Klinikleri. <https://doi.org/10.3906/bot-1907-15>
- Kenwood, M. M., Kalin, N. H., & Barbas, H. (2022). The prefrontal cortex, pathological anxiety, and anxiety disorders. In *Neuropsychopharmacology* (Vol. 47, Issue 1, pp. 260–275). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41386-021-01109-z>
- Kessler, R. C., Petukhova, M., Sampson, N. A., Zaslavsky, A. M., & Wittchen, H. U. (2012). Twelve-month and lifetime prevalence and lifetime morbid risk of anxiety and mood disorders in the United States. *International Journal of Methods in Psychiatric Research*, 21(3), 169–184. <https://doi.org/10.1002/mpr.1359>
- Knight, P., Chellian, R., Wilson, R., Behnood-Rod, A., Panunzio, S., & Bruijnzeel, A. W. (2021). Sex differences in the elevated plus-maze test and large open field test in adult Wistar rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 204. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2021.173168>
- Kokras, N., Antoniou, K., Mikail, H. G., Kafetzopoulos, V., Papadopoulou-Daifoti, Z., & Dalla, C. (2015). Forced swim test: What about females? *Neuropharmacology*, 99, 408–421. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.03.016>
- Kong, W. L., Peng, Y. Y., & Peng, B. W. (2017). Modulation of neuroinflammation: Role and therapeutic potential of TRPV1 in the neuro-immune axis. In *Brain, Behavior, and Immunity* (Vol. 64, pp. 354–366). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.03.007>
- Kong, W., Wang, X., Yang, X., Huang, W., Han, S., Yin, J., Liu, W., He, X., & Peng, B. (2019). Activation of TRPV1 Contributes to Recurrent Febrile Seizures via Inhibiting the Microglial M2 Phenotype in the Immature Brain. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00442>
- Koonce, C. J., & Frye, C. A. (2013). Progesterone facilitates exploration, affective and social behaviors among wildtype, but not 5 $\alpha$ -reductase Type 1 mutant, mice. *Behavioural Brain Research*, 253, 232–239. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.07.025>

- Lamotte, G., Shouman, K., & Benarroch, E. E. (2021). Stress and central autonomic network. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, 235. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2021.102870>
- Lastres-Becker, I., Molina-Holgado, F., Ramos, J. A., Mechoulam, R., & Fernández-Ruiz, J. (2005). Cannabinoids provide neuroprotection against 6-hydroxydopamine toxicity in vivo and in vitro: Relevance to Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*, 19(1–2), 96–107. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2004.11.009>
- Leão, A. H. F. F., Cabral, A., Izídio, G. S., Ribeiro, A. M., & Silva, R. H. (2016). Diazepam effects on aversive memory retrieval and extinction: Role of anxiety levels. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 141, 42–49. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2015.11.012>
- LeDoux, J. E., & Pine, D. S. (2016). Using neuroscience to help understand fear and anxiety: A two-system framework. In *American Journal of Psychiatry* (Vol. 173, Issue 11, pp. 1083–1093). American Psychiatric Association. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2016.16030353>
- Li, Y., Li, Y., Zhang, X., Li, Y., Liu, Y., & Xu, H. (2023). CaMKIIa Neurons of the Ventromedial Hypothalamus Mediate Wakefulness and Anxiety-like Behavior. *Neurochemical Research*, 48(8), 2463–2475. <https://doi.org/10.1007/s11064-023-03925-9>
- Lichenstein, S. D. (2022). THC, CBD, and Anxiety: a Review of Recent Findings on the Anxiolytic and Anxiogenic Effects of Cannabis' Primary Cannabinoids. In *Current Addiction Reports* (Vol. 9, Issue 4, pp. 473–485). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s40429-022-00450-7>
- Linares, I. M., Zuardi, A. W., Pereira, L. C., Queiroz, R. H., Mechoulam, R., Guimarães, F. S., & Crippa, J. A. (2019). Cannabidiol presents an inverted U-shaped dose-response curve in a simulated public speaking test. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 41(1), 9–14. <https://doi.org/10.1590/1516-4446-2017-0015>
- Lisa A. Matsuda, Stephen J. Lolait, Michael J. Brownstein, Alice C. Jovem, & Tom I. Bonner. (1990). Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* .
- Liu, Y. J., Wang, Y., Wu, J. W., Zhou, J., Song, B. L., Jiang, Y., & Li, L. F. (2024). GABAergic synapses from the ventral lateral septum to the paraventricular nucleus of hypothalamus modulate anxiety. *Frontiers in Neuroscience*, 18. <https://doi.org/10.3389/fnins.2024.1337207>
- Lopes, L. M., Reis-Silva, L. L., Rodrigues, B., & Crestani, C. C. (2024). Pharmacological Manipulation of Corticotropin-Releasing Factor Receptors in the Anterior and Posterior Subregions of the Insular Cortex Differently Affects Anxiety-Like Behaviors in the Elevated Plus Maze in Rats. *BioMed Research International*, 2024. <https://doi.org/10.1155/2024/8322844>
- Lovick, T. A. (2012). Estrous cycle and stress: Influence of progesterone on the female brain. In *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* (Vol. 45, Issue 4, pp. 314–320). Associação Brasileira de Divulgação Científica. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2012007500044>

- Lovick, T. A., & Zangrossi, H. (2021a). Effect of Estrous Cycle on Behavior of Females in Rodent Tests of Anxiety. In *Frontiers in Psychiatry* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2021.711065>
- Lovick, T. A., & Zangrossi, H. (2021b). Effect of Estrous Cycle on Behavior of Females in Rodent Tests of Anxiety. In *Frontiers in Psychiatry* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2021.711065>
- Lovick, T. A., & Zangrossi, H. (2021c). Effect of Estrous Cycle on Behavior of Females in Rodent Tests of Anxiety. In *Frontiers in Psychiatry* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2021.711065>
- Machado Figueiredo, R., de Carvalho, M. C., Brandão, M. L., & Lovick, T. A. (2019). Short-term, low-dose fluoxetine prevents oestrous cycle-linked increase in anxiety-like behaviour in female rats. *Journal of Psychopharmacology*. <https://doi.org/10.1177/0269881119841833>
- Mack, N. R., Deng, S., Yang, S. S., Shu, Y., & Gao, W. J. (2023). Prefrontal Cortical Control of Anxiety: Recent Advances. In *Neuroscientist* (Vol. 29, Issue 4, pp. 488–505). SAGE Publications Inc. <https://doi.org/10.1177/10738584211069071>
- Madras, B. K., & Hospital, M. (2015). *Update of Cannabis and its medical use*.
- Maeng, L. Y., & Milad, M. R. (2015). Sex differences in anxiety disorders: Interactions between fear, stress, and gonadal hormones. *Hormones and Behavior*, 76, 106–117. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2015.04.002>
- Maioli, C., Mattoteia, D., Amin, H. I. M., Minassi, A., & Caprioglio, D. (2022). Cannabinol: History, Syntheses, and Biological Profile of the Greatest “Minor” Cannabinoid. In *Plants* (Vol. 11, Issue 21). MDPI. <https://doi.org/10.3390/plants11212896>
- Marinelli, S., Marrone, M. C., Di Domenico, M., & Marinelli, S. (2023). Endocannabinoid signaling in microglia. *GLIA*, 71(1), 71–90. <https://doi.org/10.1002/glia.24281>
- Markman, J., & Combs, H. (2024). Newer Treatments for Mood and Anxiety Disorders. *Medical Clinics of North America*. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2024.03.006>
- Martin, E. I., Ressler, K. J., Binder, E., & Nemeroff, C. B. (2009). The Neurobiology of Anxiety Disorders: Brain Imaging, Genetics, and Psychoneuroendocrinology. In *Psychiatric Clinics of North America* (Vol. 32, Issue 3, pp. 549–575). <https://doi.org/10.1016/j.psc.2009.05.004>
- Martini, S., Gemma, A., Ferrari, M., Cosentino, M., & Marino, F. (2023). Effects of Cannabidiol on Innate Immunity: Experimental Evidence and Clinical Relevance. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 24, Issue 4). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/ijms24043125>
- Matsumoto, D., Ushio, S., Wada, Y., Noda, Y., Esumi, S., Izushi, Y., Kitamura, Y., & Sendo, T. (2021). *Bumetanide prevents diazepam-modified anxiety-like behavior in lipopolysaccharide-treated mice*.
- Mechoulam, R., & Parker, L. A. (2013). The endocannabinoid system and the brain. In *Annual Review of Psychology* (Vol. 64, pp. 21–47). Annual Reviews Inc. <https://doi.org/10.1146/annurev-psych-113011-143739>

- Mehrhoff, E. A., Booher, W. C., Hutchinson, J., Schumacher, G., Borski, C., Lowry, C. A., Hoefler, C. A., & Ehringer, M. A. (2023). *Diazepam Effects on Anxiety-related Defensive Behavior of High and Low Open-Field Activity Inbred Mouse Strains*. <https://ssrn.com/abstract=4439984>
- Milligan-Saville, J. S., & Graham, B. M. (2016). Mothers do it differently: Reproductive experience alters fear extinction in female rats and women. *Translational Psychiatry*, 6(10). <https://doi.org/10.1038/TP.2016.193>
- Molina-Hernández, M., Téllez-Alcántara, N. P., Olivera-López, J. I., & Jaramillo, M. T. (2013). Estrous cycle variation in anxiolytic-like effects of topiramate in Wistar rats in two animal models of anxiety-like behavior. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 103(3), 631–636. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2012.11.002>
- Morais Glitzenhirn, G., Adelina, V., & Bandeira, C. (2020). *AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TERAPÊUTICOS DA CANNABIS E SEUS METABÓLITOS NO TRATAMENTO DA DOR ONCOLÓGICA: UMA REVISÃO | EVALUATION OF THE THERAPEUTIC EFFECTS OF CANNABIS AND ITS METABOLITES IN THE TREATMENT OF ONCOLOGIC PAIN: AN REVIEW*.
- Morales, P., Hurst, D. P., & Reggio, P. H. (2017). Molecular Targets of the Phytocannabinoids: A Complex Picture. In *Progress in the chemistry of organic natural products* (Vol. 103, pp. 103–131). [https://doi.org/10.1007/978-3-319-45541-9\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-319-45541-9_4)
- Murakami, M., Nagahama, M., Maruyama, T., & Niikura, T. (2017). Humanin ameliorates diazepam-induced memory deficit in mice. *Neuropeptides*, 62, 65–70. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2016.10.008>
- Murray B. Stein, & Thomas Steckler. (2010). *Behavioral Neurobiology of Anxiety and Its Treatment*.
- Nieuwenhuys, R. (2012). The insular cortex. A review. In *Progress in Brain Research* (Vol. 195, pp. 123–163). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53860-4.00007-6>
- Oliveira da Cruz, J. F., Ioannidou, C., Pagano Zottola, A. C., Muguruza, C., Gomez-Sotres, P., Fernandez, M., Callado, L. F., Marsicano, G., & Busquets-Garcia, A. (2021). Sex-dependent pharmacological profiles of the synthetic cannabinoid MMB-Fubinaca. *Addiction Biology*, 26(3). <https://doi.org/10.1111/adb.12940>
- Oliveira da Paixão, A., Vasconcelos Freitas de Jesus, A., Santos Silva, F., Maria Santos Messias, G., Luiza Gonçalves Magalhães Nunes, T., Luiza Gonçalves Magalhães Nunes, T., Batista Santos, T., Zanardo Gomes, M., & das Graças da Silva Correia, M. (n.d.). *DOENÇA DE PARKINSON: UMA DESORDEM NEURODEGENERATIVA*.
- Ortiz, Y. T., McMahon, L. R., & Wilkerson, J. L. (2022). Medicinal Cannabis and Central Nervous System Disorders. In *Frontiers in Pharmacology* (Vol. 13). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.881810>
- Paulus, M. P., Feinstein, J. S., Castillo, G., Simmons, A. N., Murray, J., & Stein, B. (2005). *Dose-Dependent Decrease of Activation in Bilateral Amygdala and Insula by Lorazepam During Emotion Processing*.

- Pellati, F., Borgonetti, V., Brighenti, V., Biagi, M., Benvenuti, S., & Corsi, L. (2018). Cannabis sativa L. and Nonpsychoactive Cannabinoids: Their Chemistry and Role against Oxidative Stress, Inflammation, and Cancer. In *BioMed Research International* (Vol. 2018). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2018/1691428>
- Penninx, B. W., Pine, D. S., Holmes, E. A., & Reif, A. (2021). Anxiety disorders. In *The Lancet* (Vol. 397, Issue 10277, pp. 914–927). Elsevier B.V. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00359-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00359-7)
- Pestana, J. E., & Graham, B. M. (2023). Reproductive experience alters the effects of diazepam and fluoxetine on anxiety-like behaviour, fear extinction, and corticosterone levels in female rats. *Psychopharmacology*, *240*(12), 2515–2528. <https://doi.org/10.1007/s00213-023-06446-z>
- Pestana, J. E., Islam, N., Van der Eyk, N. L., & Graham, B. M. (2022). What Pre-clinical Rat Models Can Tell Us About Anxiety Across the Menstrual Cycle in Healthy and Clinically Anxious Humans. In *Current Psychiatry Reports* (Vol. 24, Issue 11, pp. 697–707). Springer. <https://doi.org/10.1007/s11920-022-01376-7>
- Pestana, J. E., Kershaw, K. A., & Graham, B. M. (2023). The impact of the ovarian cycle on anxiety, allopregnanolone, and corticotropin releasing hormone changes after motherhood in female rats and women. *Translational Psychiatry*, *13*(1). <https://doi.org/10.1038/s41398-023-02480-9>
- Picazo, O., & Fernfindez-Guasti, A. (1995). Anti-anxiety effects of progesterone and some of its reduced metabolites: an evaluation using the burying behavior test. In *Brain Research* (Vol. 680).
- Reilly, T. J., Sagnay De La Bastida, V. C., Joyce, D. W., Cullen, A. E., & McGuire, P. (2020). Exacerbation of Psychosis during the Perimenstrual Phase of the Menstrual Cycle: Systematic Review and Meta-analysis. *Schizophrenia Bulletin*, *46*(1), 78–90. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbz030>
- Sah, P., Faber, E. S. L., Lopez De Armentia, M., & Power, J. (2003). *The Amygdaloid Complex: Anatomy and Physiology*. <https://doi.org/10.1152/physrev.00002.2003.-A>
- Salviato, B. Z., Raymundi, A. M., Rodrigues da Silva, T., Salemme, B. W., Batista Sohn, J. M., Araújo, F. S., Guimarães, F. S., Bertoglio, L. J., & Stern, C. A. (2021). Female but not male rats show biphasic effects of low doses of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol on anxiety: can cannabidiol interfere with these effects? *Neuropharmacology*, *196*. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2021.108684>
- Savander, V., Miettinen, † R, Ledoux, J. E., & Pitka } Nen, A. (1997). *LATERAL NUCLEUS OF THE RAT AMYGDALA IS RECIPROCALLY CONNECTED WITH BASAL AND ACCESSORY BASAL NUCLEI: A LIGHT AND ELECTRON MICROSCOPIC STUDY*.
- Schiavon, A. P., Bonato, J. M., Milani, H., Guimarães, F. S., & Weffort de Oliveira, R. M. (2016). Influence of single and repeated cannabidiol administration on emotional behavior and markers of cell proliferation and neurogenesis in non-stressed mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *64*, 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2015.06.017>

- Schiller, C. E., Schmidt, P. J., & Rubinow, D. R. (2014). Allopregnanolone as a mediator of affective switching in reproductive mood disorders. In *Psychopharmacology* (Vol. 231, Issue 17, pp. 3557–3567). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00213-014-3599-x>
- Shao, J., Gao, D. S., Liu, Y. H., Chen, S. P., Liu, N., Zhang, L., Zhou, X. Y., Xiao, Q., Wang, L. P., Hu, H. L., & Yang, F. (2022). Cav3.1-driven bursting firing in ventromedial hypothalamic neurons exerts dual control of anxiety-like behavior and energy expenditure. *Molecular Psychiatry*, 27(6), 2901–2913. <https://doi.org/10.1038/s41380-022-01513-x>
- Shelby Blair, R., Acca, G. M., Tsao, B., Stevens, N., Maren, S., & Nagaya, N. (2022). *Estrous cycle contributes to state-dependent contextual fear in female rats*.
- Shupe, E. A., Kerman, I. A., & Clinton, S. M. (2024). Premotor projections from the locus coeruleus and periaqueductal grey are altered in two rat models with inborn differences in emotional behavior. *Experimental Brain Research*, 242(4), 857–867. <https://doi.org/10.1007/s00221-024-06786-y>
- Silva, R. H., & Frussa-Filho, R. (2000). The plus-maze discriminative avoidance task: a new model to study memory-anxiety interactions. Effects of chlordiazepoxide and caffeine. In *Journal of Neuroscience Methods* (Vol. 102). [www.elsevier.com/locate/jneumeth](http://www.elsevier.com/locate/jneumeth)
- Silva, R. H., Kameda, S. R., Carvalho, R. C., Takatsu-Coleman, A. L., Niigaki, S. T., Abílio, V. C., Tufik, S., & Frussa-Filho, R. (2004a). Anxiogenic effect of sleep deprivation in the elevated plus-maze test in mice. *Psychopharmacology*, 176(2), 115–122. <https://doi.org/10.1007/s00213-004-1873-z>
- Silva, R. H., Kameda, S. R., Carvalho, R. C., Takatsu-Coleman, A. L., Niigaki, S. T., Abílio, V. C., Tufik, S., & Frussa-Filho, R. (2004b). Anxiogenic effect of sleep deprivation in the elevated plus-maze test in mice. *Psychopharmacology*, 176(2), 115–122. <https://doi.org/10.1007/s00213-004-1873-z>
- Singewald, N., Salchner, P., & Sharp, T. (2003). *ORIGINAL ARTICLES Induction of c-Fos Expression in Specific Areas of the Fear Circuitry in Rat Forebrain by Anxiogenic Drugs*.
- Sladky, R., Kargl, D., Haubensak, W., & Lamm, C. (2024). An active inference perspective for the amygdala complex. In *Trends in Cognitive Sciences* (Vol. 28, Issue 3, pp. 223–236). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2023.11.004>
- Sramek, J. J., Murphy, M. F., & Cutler, N. R. (2016). Sex differences in the psychopharmacological treatment of depression. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 18(4), 447–457. <https://doi.org/10.31887/dcns.2016.18.4/ncutler>
- Strange, B. A., Witter, M. P., Lein, E. S., & Moser, E. I. (2014). Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 15, Issue 10, pp. 655–669). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrn3785>
- Thompson, Neil. (2002). *Loss and Grief: a Guide for Human Services Practitioners*. Bloomsbury Publishing Plc.
- Tian, Y. H., Ma, S. X., Lee, K. W., Wee, S., Koob, G. F., Lee, S. Y., & Jang, C. G. (2018). Blockade of TRPV1 Inhibits Methamphetamine-induced Rewarding Effects. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19207-2>

- Todd, S. M., & Arnold, J. C. (2016). Neural correlates of interactions between cannabidiol and  $\Delta 9$ -tetrahydrocannabinol in mice: Implications for medical cannabis. *British Journal of Pharmacology*, 173(1), 53–65. <https://doi.org/10.1111/bph.13333>
- Tovote, P., Fadok, J. P., & Lüthi, A. (2015). Neuronal circuits for fear and anxiety. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 16, Issue 6, pp. 317–331). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrn3945>
- Uddin, L. Q., Nomi, J. S., Hébert-Seropian, B., Ghaziri, J., & Boucher, O. (2017). Structure and Function of the Human Insula. In *Journal of Clinical Neurophysiology* (Vol. 34, Issue 4, pp. 300–306). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1097/WNP.0000000000000377>
- Vila-Merkle, H., González-Martínez, A., Campos-Jiménez, R., Martínez-Ricós, J., Teruel-Martí, V., Lloret, A., Blasco-Serra, A., & Cervera-Ferri, A. (2023). Sex differences in amygdalohippocampal oscillations and neuronal activation in a rodent anxiety model and in response to infralimbic deep brain stimulation. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 17. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2023.1122163>
- Vos T., Lim, S., Abbafati, C., Abbas, K., Abbasi, M., Abbasifard, M., . . ., & Bhutta, Z. (2020). *Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019*.
- Walf, A. A., & Frye, C. A. (2006). A review and update of mechanisms of estrogen in the hippocampus and amygdala for anxiety and depression behavior. In *Neuropsychopharmacology* (Vol. 31, Issue 6, pp. 1097–1111). <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301067>
- Walf, A. A., & Frye, C. A. (2007). The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature Protocols*, 2(2), 322–328. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.44>
- Wang, C., Zhang, Y., Shao, S., Cui, S., Wan, Y., & Yi, M. (2019). Ventral Hippocampus Modulates Anxiety-Like Behavior in Male But Not Female C57BL/6 J Mice. *Neuroscience*, 418, 50–58. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.08.032>
- Weera, M. M., Webster, D. A., Shackett, R. S., Benvenuti, F., Middleton, J. W., & Gilpin, N. W. (2023). Traumatic stress-induced increases in anxiety-like behavior and alcohol self-administration are mediated by central amygdala CRF1 neurons that project to the lateral hypothalamus. *Journal of Neuroscience*, 43(50), 8690–8699. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1414-23.2023>
- White, C. M. (2019). A Review of Human Studies Assessing Cannabidiol's (CBD) Therapeutic Actions and Potential. In *Journal of Clinical Pharmacology* (Vol. 59, Issue 7, pp. 923–934). Blackwell Publishing Inc. <https://doi.org/10.1002/jcph.1387>
- Yamamori, Y., & Robinson, O. J. (2023). Computational perspectives on human fear and anxiety. In *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* (Vol. 144). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2022.104959>
- Zamarripa, C. A., Spindle, T. R., Surujunaraian, R., Weerts, E. M., Bansal, S., Unadkat, J. D., Paine, M. F., & Vandrey, R. (2023). Assessment of Orally Administered  $\Delta 9$ -

Tetrahydrocannabinol When Coadministered With Cannabidiol on  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol Pharmacokinetics and Pharmacodynamics in Healthy Adults: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Network Open*, 6(2), e2254752. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2022.54752>

Zou, S., & Kumar, U. (2018a). Cannabinoid receptors and the endocannabinoid system: Signaling and function in the central nervous system. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 19, Issue 3). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms19030833>

Zou, S., & Kumar, U. (2018b). Cannabinoid receptors and the endocannabinoid system: Signaling and function in the central nervous system. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 19, Issue 3). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms19030833>



FORMULÁRIO 1/4

CPF: 01874441537 Finalidade: Pesquisa (Acadêmica)

Título da proposta (Português): EFEITO DA EXPOSIÇÃO A UMA BAIXA TEMPERATURA SOBRE PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICOS EM UM MODELO PROGRESSIVO DE PARKINSONISMO EM RATOS

Título da proposta (inglês): EFFECT OF LOW TEMPERATURE EXPOSURE ON BEHAVIORAL AND NEUROCHEMICAL PARAMETERS IN PROGRESSIVE MODEL OF PARKINSONISM IN RATS

Responsável: José Ronaldo Dos Santos

Celular: (79) 9 9126-9440 e-mail: joseronaldosantos@gmail.com

CV. Lattes: <http://lattes.cnpq.br/3626754379892089>

Área: Fisiologia Campus: Itabaiana

Experiência: Sim : 19 ano(s) Treinamento: Não

Vínculo: Professor Adjunto

Obj. Acadêmico: Mestrado Acadêmico Patente: Não

Grande área: Ciências biológicas específica: Ciências biológicas

Patrocínio: Governamental Patrocinador:

Chefe de Depto: Marcos Vinicius Meiado e-mail: marcos\_meiado@yahoo.com.br

**Pesquisador 1:**

E-mail: camila14092000@gmail.com Telefone: (79) 99847-0333

Nome: Maria Camila Santos de Oliveira

Instituição: Universidade Federal de Sergipe Nível: Graduado

Vínculo: Aluno de Pós-Graduação

Experiência: Sim: 3 (ano) Treinamento: Não: (hora)

Cv. Lattes: <http://lattes.cnpq.br/6293593478489458>

Sector: Departamento de fisiologia Função: Executante

Obs:

**Pesquisador 2:**

E-mail: leila.lorrane0821@gmail.com Telefone: (79) 99898-7568

Nome: Leila Barros de Jesus

Instituição: Universidade Federal de Sergipe Nível: Graduado

Vínculo: Aluno de Pós-Graduação



Experiência: Sim: 9 anos (ano)  
Cv. Lattes: <http://lattes.cnpq.br/6533695959088046>  
Setor: Departamento de Fisiologia  
Obs:

Treinamento: Não: (hora)  
Função: Colaborador

Pesquisador 3:

E-mail: [mylaine99.ms@gmail.com](mailto:mylaine99.ms@gmail.com)  
Nome: Mylaine Santos Mendonça  
Instituição: Universidade Federal de Sergipe  
Vínculo: Aluno de Pós-Graduação  
Experiência: Sim: 6 anos (ano)  
Cv. Lattes: <http://lattes.cnpq.br/8479304837692752>  
Setor: Departamento de Fisiologia  
Obs:

Telefone: (79) 99948-0487  
Nível: Graduado  
Treinamento: Não: (hora)  
Função: Colaborador

## FORMULÁRIO 2/4

Instituição participante: 1: Universidade Federal de Sergipe

**Resumo:** A doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa que acomete principalmente a via dopaminérgica. Estudos em modelos animais tem contribuído para um melhor entendimento da fisiopatologia da DP e o desenvolvimento de terapias para conter a natureza progressiva dessa doença. Nesse contexto encontram-se os trabalhos que envolvem os canais de Potencial Receptor Transiente (TRP), entre eles o TRPM8, que atua como termosensor ativado por baixas temperaturas e são modulados na DP. Assim, o presente trabalho objetiva avaliar efeito da exposição a uma baixa temperatura sobre parâmetros comportamentais e neuroquímicos em um modelo progressivo de parkinsonismo em ratos. Serão utilizados 32 ratos wistar machos, divididos em 4 grupos (n = 8 por grupo): (1) Controle (CTR): tratados com solução salina 0,9% e mantidos à temperatura de 22°C; (2) Reserpina (RES): tratados com reserpina 0,1 mg/kg e mantidos à temperatura de 22°C; (3) CTR Frio: tratados com veículo e submetidos à temperatura de 12°C e (4) RES Frio: tratados com RES 0,1 mg/kg e submetidos à temperatura de 12°C. Os animais receberão 15 injeções de veículo ou RES, uma a cada 48h. Animais dos grupos 3 e 4 serão expostos por 2h a um ambiente com temperatura de 12°C, 15 dias antes do início da indução do parkinsonismo e durante todo o experimento. Ao longo do experimento, os animais serão submetidos a testes comportamentais (Catalepsia, campo aberto, movimentos orais e reconhecimento de objeto novo. No último dia os animais serão perfundidos e os encéfalos coletados e submetidos à imunohistoquímica.

**Objetivos:** OBJETIVOS

Avaliar o efeito neuroprotetor do frio em um modelo progressivo da doença de Parkinson induzido por reserpina.

**OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Avaliar o efeito da exposição a uma baixa temperatura sobre alterações motoras e cognitivas no modelo de parkinsonismo induzidas por reserpina;



Avaliar o efeito da exposição a uma baixa temperatura sobre alterações neuroquímicas no modelo de parkinsonismo induzidas por reserpina;

Verificar o efeito do frio na expressão dos receptores TRPM8 no modelo de parkinsonismo induzido por reserpina.

**Justificativa e relevância:** O tratamento da DP é realizado, principalmente, através do uso contínuo de Levodopa associado a outros fármacos pró-dopaminérgicos e terapias complementares (SANTOS et al., 2021; VIJAYAKUMAR; JANKOVIC, 2016). Entretanto, o surgimento de efeitos colaterais que aceleram a progressividade da DP é um dos fatores que estimulam os estudos e desenvolvimento de novas terapias.

Há muitos anos, a redução da temperatura corporal, tem sido utilizada como estratégia terapêutica para várias doenças (BLEAKLEY et al., 2006). A utilização do frio como terapia é uma técnica que consiste no uso de toda ou qualquer substância que provoque diminuição na temperatura dos tecidos corporais com o objetivo medicinal (KNIGHT, 2000), como por exemplo, compressas de gelo, toalhas frias, massagem com gelo, banho de imersão em água gelada e spray de gelo químico (NADLER, 2004). Essa técnica visa provocar a vasoconstrição, diminuindo o fluxo sanguíneo, anestesiando o local da área aplicada, reduzir hematoma, edemas, inflamação, hemorragia, espasmos musculares e o metabolismo local (DROEGEMULLER, 1980; KNIGHT, 2000). Além disso, tem sido mostrado que o tratamento com frio apresenta um efeito neuroprotetor em algumas patologias e estes já são aplicados na clínica, como em trauma de crânio, nos acidentes vasculares cerebrais e na hemorragia subaracnóide (BELLIARD et al., 2007; CLIFTON et al., 2009). Assim, estudos têm sugerido que o efeito neuroprotetor da terapia com frio esteja associado à supressão de apoptose, redução do processo inflamatório, redução dos níveis de espécies reativas de oxigênio e na taxa metabólica cerebral (DRURY et al., 2014. SUN et al., 2019).

O mecanismo celular que está envolvido no efeito neuroprotetor da terapia com frio é complexo e ainda não é bem compreendido (TORIUCHI et al., 2020). Entretanto, acredita-se que há o envolvimento da ativação dos canais de Potencial Receptor Transiente (TRP). Os TRPs são canais catiônicos, na sua maioria permeáveis ao  $Ca^{2+}$ , que podem ser ativados por uma grande diversidade de estímulos e que possuem graus diferentes de seletividade (CLAPHAM, 2003).

Estudos recentes mostram que esses receptores estão relacionados com doenças neurológicas (AZIRO?LU et al., 2020), e a expressão desse receptor é modulada em doenças neurodegenerativas, como a doença de Parkinson, apresentando uma redução em seus níveis (ÖZ; ÇELIK, 2021). Assim pequenas diminuições na temperatura cerebral apresentam níveis significativos de neuroproteção em vários modelos animais de isquemia cerebral e uma redução da extensão do dano cerebral e melhora da função neurológica (POLDERMAN, 2008). Quando a temperatura cai abaixo dos  $32^{\circ}C$ , a taxa metabólica do cérebro é reduzida em cerca de 50% do normal e o consumo de  $O_2$  e a produção de  $CO_2$  cai proporcionalmente (POLDERMAN, 2004). Assim além da diminuição na taxa metabólica, a hipotermia provoca uma redução no gasto de energia, restaura o equilíbrio dos neurotransmissores após uma isquemia, onde os níveis de glutamato são elevados, reduz o influxo de cálcio e acidose intracelular, previne a ruptura da barreira hematoencefálica e suprime vias de morte celular (LIU; YENARI, 2006, LIU; YENARI, 2009; ZHAO et al., 2007).

Em um estudo recente, Chakraborty and Goswami (2022), demonstraram que a ativação de receptores TRPM8 induzem aumento da proliferação e migração de micróglias e mudanças na morfologia dessas células gliais. Associado ao fato dessas células possuírem papel importante no processo neuroinflamatório, os achados desse estudo indicam que, possivelmente, a ativação desses receptores pode atuar como efeito neuroprotetor em doenças neurodegenerativas, como a DP, principalmente, ainda em estágios iniciais da doença.

#### REFERÊNCIAS

AZIRO?LU M, ÖZ A., YILDIZHAN K. Selenium and neu- rological diseases: focus on peripheral pain and TRP channels. *Curr Neuropharmacol*. 2020;18:501-517  
BELLIARD G, CATEZ E, CHARRON C, CAILLE V, AEGERTER P, DUBOURG O, et al. Efficacy of therapeutic hypothermia after out-of-hospital cardiac arrest due to



ventricular fibrillation. Resuscitation. 2007;75(2):252-9.

BLEAKLEY CM, MCDONOUGH SM, MACAULEY DC. Cryotherapy for acute ankle sprains: a randomised controlled study of two different icing protocols. Br J Sports Med 2006;

CLAPHAM DE. TRP channels as cellular sensors. Nature. 2003

CLIFTON GL, DREVER P, VALADKA A, ZYGUN D, OKONKWO D. Multicenter trial of early hypothermia in severe brain injury. J Neurotrauma. 2009;26(3):393-7.

CHAKRABORTY R, GOSWAMI C. Both heat-sensitive TRPV4 and cold-sensitive TRPM8 ion channels regulate microglial activity. Biochem Biophys Res Commun. 2022;

DOS SANTOS, T. F. O. et al. Balance alterations and reduction of pedunculopontine cholinergic neurons in early stages of parkinsonism in middle-aged rats. Experimental Gerontology, v. 145, 1 mar. 2021.

DROEGEMULLER W. Cold sitz baths for relief of postpartum perineal pain. Clin Obstet Gynecol. 1980;23(4):1039-43.

KNIGHT KL. Crioterapia no tratamento das lesões esportivas. São Paulo: Manole; 2000.

LIU L, YENARI MA. Aplicação clínica da hipotermia terapêutica no acidente vascular cerebral. Pesquisa Neurológica. 2009;

LIU L, YENARI MA. Hipotermia terapêutica: mecanismos neuroprotetores. Fronteiras em Biociência. 2007

NADLER SF, WEINGAND K, KRUSE RJ. The physiologic basis and clinical applications of cryotherapy and thermotherapy for the pain practitioner. Pain Physician 2004;

POLDERMAN KH. Hipotermia induzida e controle da febre para prevenção e tratamento de lesões neurológicas. Lancet. 2008

POLDERMAN KH. Induced hypothermia for neuroprotection: understanding the underlying mechanisms. In: Vincent JL, editor. Intensive Care Medicine. New York: Springer; 2004.

VIJAYAKUMAR, D.; JANKOVIC, J. Drug-Induced Dyskinesia, Part 1: Treatment of Levodopa-Induced Dyskinesia. Drugs, v. 76, n. 7, p. 759-777, 2016.

DRURY PP, GUNN ER, BENNET L, GUNN AJ. Mechanisms of hypothermic neuroprotection. Clin Perinatol. 2014;

ÖZ A, ÇELİK Ö. The effects of neuronal cell differentiation on TRPM7, TRPM8 and TRPV1 channels in the model of Parkinson's disease. Neurol Res. 2021

SUN YJ, ZHANG ZY, FAN B, LI GY. Neuroprotection by therapeutic hypothermia. Front Neurosci. 2019;

TORIUCHI K, KAKITA H, TAMURA T, TAKESHITA S, YAMADA Y, AOYAMA M. Prolonged astrocyte-derived erythropoietin expression attenuates neuronal damage under hypothermic conditions. J Neuroinflammation. 2020 May 2;17(1):141.

ZHAO H, STEINBERG GK, SAPOLSKY RM. Ações gerais versus específicas da hipotermia leve a moderada na atenuação do dano isquêmico cerebral. Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism . 2007;

**Delimitação experimental:** Os animais serão divididos, aleatoriamente, em 4 grupos (n = 8 por grupo): (1)

Controle (CTR): tratados com solução salina 0,9% e mantidos à temperatura de 22°C; (2)

Reserpina (RES): tratados com reserpina 0,1 mg/kg e mantidos à temperatura de 22°C;

(3) CTR Frio: tratados com veículo e submetidos à temperatura de 12°C e (4) RES Frio:

tratados com RES 0,1 mg/kg e submetidos à temperatura de 12°C.

Após o período de manipulação, todos os animais serão submetidos, diariamente

a uma exposição de 2h (6:30 às 8:30 a.m.) em baixa temperatura (12°C [grupos com

tratamento de frio] ou mantidos em temperatura ambiente (22°C). No momento da



exposição, todos os animais serão alojados, individualmente, em gaiolas com dimensões de 30 x 20 x 13 cm, depois eles retornarão para suas respectivas caixas colônia, em grupos de 4 animais por caixa. O período total de exposição terá duração de 45 dias. Após os primeiros 15 dias, animais dos grupos 2 e 4 serão induzidos ao parkinsonismo com 15 injeções de RES (0,1 mg/kg), uma a cada 48h, por via subcutânea, durante 30 dias.

Ao longo do experimento serão realizados os testes comportamentais de (1) catalepsia (a cada 48h); (2) campo aberto (após a 4ª injeção de RES); (3) Avaliação dos movimentos orofaciais (MO) (após a 4ª injeção, 7ª injeção, 10ª injeção e 15ª injeção de RES); (4) Reconhecimento de objetos novos (após 5ª injeção de RES). No dia 45, 48h após a última injeção de RES, os animais serão anestesiados e sacrificados por perfusão transcardíaca para fixação e coleta dos encéfalos e posterior processamento dos tecidos a serem submetidos à imuno-histoquímica

Espécie:	Ratos heterogênicos	Sexo:	Machos	Peso:	300 a 400 g	idade:	6 a 7 semanas		
Linhagem:	Rattus novergicus/wistar	Instalação:	Gaiola	Tipo de cama:	maravalha	N por área:	3		N: 32
Animais eutanasiados e/ou abatidos: 32 (100,00%)									
Origem: Biotério da Universidade Federal de Sergipe									
Dimensões da instalação: 33 x 40 x 17 cm									
Informações da procedência: Os animais que serão utilizados, serão entregues aos pesquisadores pelo Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia									
Manutenção: Os animais serão mantidos na Universidade federal de Sergipe Campus São Cristóvão, registrada de acordo com as normas do CIAEP sob código 01.0197.2014 no CIUCA. Vale ressaltar que os animais estarão alocados no Laboratório de Neurofisiologia (LNFS) durante a realização dos experimentos, sendo o biotério de apoio o Biotério Setorial, ambos localizados no Departamento de Fisiologia									
Condições de alojamento:									
Iluminação: ciclo claro/escuro de 12h/12h (programado com timer digital)									
Alimentação: ração Nuvilab									
Fonte de água: garrafas fixas à gaiola									
Exaustão do ar: a temperatura do ambiente do Biotério será mantida a 22°C +/- 2°C, com sistema de exaustão contínua de ar, sendo realizadas 15 a 20 trocas de ar por hora.									

Local do experimento: Os animais serão mantidos na Universidade federal de Sergipe Campus São Cristóvão, registrada de acordo com as normas do CIAEP sob código 01.0197.2014 no CIUCA. Vale ressaltar que os animais estarão alocados no Laboratório de Neurofisiologia (LNFS) durante a realização dos experimentos, sendo o biotério de apoio o Biotério Setorial, ambos localizados no Departamento de Fisiologia

Procedimentos: Antes do início dos procedimentos experimentais, os animais serão submetidos a um período de 5 minutos de manipulação, diariamente, durante cinco dias, com a finalidade de habitué-los ao toque e à presença dos experimentadores. Todos os experimentos serão realizados, preferencialmente, no mesmo horário. Entre as sessões comportamentais, os aparelhos serão limpos com uma solução de etanol a 10% para evitar possíveis pistas de odores deixadas por outro animal. Os parâmetros comportamentais do teste de campo aberto serão quantificados por um programa de rastreamento de animais (Anymaze, Stoelting, EUA).

Os animais serão divididos, aleatoriamente, em 4 grupos (n = 8 por grupo): (1)

Controle (CTR): tratados com solução veículo de ácido acético (1 uL/1 mL - ácido acético/água) a 0,1% e mantidos à temperatura de 22°C; (2)

Reserpina (RES): tratados com reserpina 0,1 mg/kg e mantidos à temperatura de 22°C;

(3) CTR Frio: tratados com veículo e submetidos à temperatura de 12°C e (4) RES Frio: tratados com RES 0,1 mg/kg e submetidos à temperatura de 12°C.

Após o período de manipulação, todos os animais serão submetidos, diariamente

a uma exposição de 2h (6:30 às 8:30 a.m.) em baixa temperatura (12°C) □ grupos com



tratamento de frio) ou mantidos em temperatura ambiente (22°C). No momento da exposição, todos os animais serão alojados, individualmente, em gaiolas com dimensões de 30 x 20 x 13 cm, depois eles retornarão para suas respectivas caixas colônia, em grupos de 4 animais por caixa. O período total de exposição terá duração de 45 dias. Após os primeiros 15 dias, animais dos grupos 2 e 4 serão induzidos ao parkinsonismo com 15 injeções de RES (0,1 mg/kg), uma a cada 48h, por via subcutânea, durante 30 dias.

Ao longo do experimento serão realizados os testes comportamentais de (1) catalepsia (a cada 48h); (2) campo aberto (após a 4ª injeção de RES); (3) Avaliação dos movimentos orofaciais (MO) (após a 4ª injeção, 7ª injeção, 10ª injeção e 15ª injeção de RES); (4) Reconhecimento de objetos novos (após 5ª injeção de RES). No dia 45, 48h após a última injeção de RES, os animais serão anestesiados e sacrificados por perfusão transcardíaca para fixação e coleta dos encéfalos e posterior processamento dos tecidos a serem submetidos à imuno-histoquímica.

#### TESTES COMPORTAMENTAIS:

##### CATALEPSIA

O comportamento de catalepsia será avaliado seguindo o protocolo de (BISPO et al., 2019; MELO, 2022; SANTOS, 2013). O animal será colocado com ambas as patas dianteiras sobre uma barra horizontal, elevada 9 cm da superfície de apoio das patas traseiras, e medida a latência para o animal sair da posição inicial. Os animais serão submetidos ao aparato três vezes consecutivas, em cada dia de avaliação, até um limite de 180 segundos e para cada dia será realizada uma média do tempo de latência para cada animal.

##### CAMPO ABERTO

O campo aberto é um aparato acrílico, com interior preto (para aumentar o contraste e favorecer o reconhecimento do animal pelo programa) e com dimensões de 80 cm de diâmetro e 40 cm de altura. Cada animal será colocado individualmente no centro do aparato para livre exploração por 5 minutos. Uma câmera, conectada a um computador, será colocada sobre o campo aberto a uma altura de 230 cm, e os parâmetros comportamentais serão registrados por um programa de rastreamento de animais (Anymaze, Stoelting, USA). Os seguintes parâmetros serão avaliados: distância total percorrida, velocidade média e o número de eventos de rearing. O aparato limpo com uma solução de etanol a 10% entre os testes (BISPO, 2016; LINS et al., 2018; MELO, 2022; SANTOS et al., 2013; SOUZA, 2022).

##### 3.6.3 AVALIAÇÃO DOS MOVIMENTOS ORAIS

Esse teste é utilizado para avaliar os movimentos involuntários na região oral de animais experimentais. Os animais serão colocados em uma gaiola gradeada (40 cm x 40,5 cm x 20 cm) com espelhos posicionados sob e atrás da gaiola, a fim de permitir que o observador visualize o animal em qualquer posição. O número de movimentos de mastigação no vácuo, o número de movimentos de protusão de língua e o tempo de tremor oral, serão quantificados durante 10 minutos (BISPO, 2016; LEÃO et al., 2017; LINS et al., 2018).

##### TESTE DE RECONHECIMENTO DE OBJETO NOVO

A tarefa será realizada em uma arena circular (diâmetro = 80 cm, altura = 40cm), seguindo o protocolo de Fernandes et al., (2012) e Santos et al., (2013). O teste será realizado em dois momentos, treino e teste. No treino, cada animal será colocado no centro da arena na presença de dois objetos idênticos para livre exploração, durante 5 minutos. Uma hora após o treino o animal retornará à arena para o teste, o qual consiste



na exposição a dois objetos, um familiar ao animal (objeto do treino) e um novo objeto desconhecido do animal, durante 5 minutos. Será quantificada a porcentagem do tempo de exploração de cada objeto (tempo de exploração do objeto antigo ou novo/tempo de exploração de ambos os objetos) para avaliar a memória de curto prazo dos animais.

#### PERFUSÃO E PROCEDIMENTOS DO ENCÉFALO

Após o período de realização dos testes comportamentais os animais serão anestesiados com uma mistura de cloridrato de cetamina (100 mg/Kg) e cloridrato de xilazina (10 mg/Kg) intraperitoneal. Com o animal completamente anestesiado e imobilizado, será realizado um acesso, seccionando a pele e partes moles, a cavidade torácica. Após a exposição da cavidade abdominal, será feito uma incisão no diafragma para exposição do coração.

Os animais serão perfundidos intracardiamente com tampão fosfato de sódio (TFS; pH 7,4) para a lavagem dos vasos, por 10 minutos e, posteriormente, com paraformaldeído 4% (PFA) em tampão fosfato (TF; pH 7,4; 100 mM), por 20 minutos, para fixação do tecido. Após a perfusão, os cérebros serão removidos e mergulhados em uma solução fixadora de sacarose 30% a 4°C. Após a perfusão dos animais, as carcaças serão depositadas em sacos plásticos apropriados e armazenadas no freezer de coleta de material biológico situado no biotério do Departamento de Fisiologia da UFS para posterior recolhimento durante a coleta de lixo especializada. Os resíduos perfurocortantes serão armazenados em caixas adequadas e levados até o hospital universitário para descarte junto ao material do hospital. Os cérebros serão levados a um criostato de deslizamento (Leica, EUA) onde serão congelados à -20°C para obtenção de secções coronais de 50 µm, que serão distribuídas sequencialmente em 4 compartimentos, em um meio líquido contendo solução anticongelante. Cada um desses compartimentos corresponde a 1 de 4 secções, de maneira que a distância entre uma secção e a seguinte seja de aproximadamente 250 µm. Estes cortes vão ser armazenados em uma solução anticongelante à base de etilenoglicol e TF e posteriormente conservados a 4 °C até as reações de imuno-histoquímica.

#### IMUNOHISTOQUÍMICA

Após as fases de testes experimentais, perfusão e secção dos encéfalos, as secções dos tecidos serão submetidas a técnica de imunohistoquímica a temperatura ambiente (22-25°C). A imunohistoquímica consiste nos seguintes passos: 1) lavagem dos tecidos em tampão fosfato (PB) 0,1 mol/L, pH 7,4, quatro vezes, por 5 min cada; 2) lavagem dos tecidos em PB + água oxigenada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), para bloqueio da peroxidase endógena, por 20 min; 3) repetição do procedimento 1; 4) lavagem do material em leite desnatado, para bloqueio de ligações inespecíficas, durante 15 min; 5) encubação dos tecidos no anticorpo primário monoclonal anti-proteína de interesse (TH - produzido em coelho, #AB152 Chemicon, USA, concentração de 1:5000); GFAP (produzido em coelho, Millipore, concentração de 1:500); CD11 (produzido em coelho, Millipore, concentração de 1:1000) e TRPM8 (Abcam, Cambridge, MA, diluição 1:1.000) diluídos em Triton-X 100 e mantidos overnight (de 12 h a 18 h) em agitador automático; 6) repetição do procedimento 1; 7) encubação dos tecidos no anticorpo secundário biotinilado anti-anticorpo primário para TH, GFAP e TRPM8 (anti-coelho produzido em cabra, Sigma Chemical Company, concentração de 1:1000), diluídos em Triton-X 100 (0,4%) e mantidos sob agitação automática por 2 h; 8) repetição do procedimento 1; 9) encubação do material no ABC (Complexo Avidina-Biotina, ABC Elite kit, Vector Labs, Burlingame, USA concentração de 1:1000), diluído em Triton-X 100 (0,4%) + NaCl 0,9%, e mantido no agitador por duas horas; 10) repetição do procedimento 1; 11) revelação do material por meio de lavagens dos tecidos em uma solução de Diaminobenzidina (DAB) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 12); repetição do



procedimento 1; 13) montagem do tecido em lâminas gelatinizadas. Após a montagem, o material foi reidratado, intensificado em tetróxido de ósmio 0,1% e submetido a uma bateria de desidratação em álcool e xilol. As lâminas foram cobertas com meio de montagem e fixação de uma lamínula.

#### **AQUISIÇÃO DE IMAGENS, CONTAGEM DE CÉLULAS E ANÁLISE DA DENSIDADE ÓPTICA**

Após a imuno-histoquímica as secções serão montadas em lâminas previamente gelatinizadas, e em seguida intensificadas em solução de tetróxido de ósmio 0,006% e desidratadas através da exposição a concentrações crescentes de álcoois, clareadas com xilol e as lamínulas fixadas com Entellan (Merck). As secções serão examinadas por iluminação de campo claro (Nikon Eclipse Ci-S, Nikon Corporatin inc., Japan) e as imagens capturadas utilizando-se uma câmera digital (Ds-fi1c, Nikon Corporatin inc., Japan) e programa específico para essa finalidade (Imaging Software NIS Elements, Nikon, versão 4.30), os quais estão acoplados ao microscópio; as áreas serão localizadas com auxílio do atlas Paxinos e Watson (PAXINOS; WATSON, 2007).

Para cada animal analisado, serão feitas imagens dos cortes no aumento de 10X, no qual será possível obter toda a extensão da área pretendida, além da presença ou ausência de células imunorreativas na região. Para cada área, de cada animal, serão feitas 4 imagens (de quatro secções distintas). A contagem de células corresponderá à média entre as quatro secções das respectivas áreas. Para esta análise quantitativa, serão utilizadas imagens das seguintes regiões imunomarcadas para TH e GFAP: Substância negra parte compacta (SNpc), Área Tegmental ventral (VTA), Lócus Cerúleo (LC) e Núcleo Dorsal da Rafe (NDR). Todas as células imunorreativas à Proteína Ácida Fibrilar Glial (GFAP) e Tirosina Hidroxilase (TH) das áreas de interesse serão contadas utilizando o software ImageJ (versão 4.8). As contagens serão realizadas de forma "cega", sem que o experimentador soubesse a que grupo pertencia cada imagem analisada. Os dados serão normalizados pela média dos valores obtidos nos animais pertencentes ao grupo controle. Para a análise da DO as imagens serão obtidas em um mesmo momento, submetidas a uma mesma intensidade de luz, sem passar por qualquer modificação de brilho e contraste, uma vez que os valores em pixels encontrados em cada imagem correspondem a uma intensidade maior ou menor de marcação de determinada substância no tecido analisado. Cada animal será representado por 4 imagens consecutivas para cada área, ED (para TH e GFAP), SNpc, LC e NDR para GFAP e para TRPM8, as quais serão analisadas utilizando o software Image J (versão 1.6.0, NIH). Na mesma imagem também será selecionado um campo de igual tamanho em uma área controle, com pouca ou quase nenhuma marcação no tecido. O número médio de pixels calculados nos campos de interesse será subtraído do número de pixels da área controle no mesmo tecido. Assim como na contagem de células, os valores para cada animal foram normalizados pela média dos valores obtidos nos animais pertencentes ao grupo controle.

#### **ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Após verificar a normalidade dos dados, os testes estatísticos utilizados serão bastante variados. Em linhas gerais, serão utilizadas análises de variância (ANOVA) de uma ou mais vias, com ou sem medidas repetidas, com teste de Tukey, para análise paramétricas e análise de variância de Kruskal Wallis e teste U de Mann-Whitney, para análises não paramétricas. Os dados serão expressos como média mais ou menos o erro padrão da média e serão considerados significativos quando  $p < 0,05$ . O programa para realização dos testes estatísticos será o Graphpad Prism versão 8.0.

#### **REFERÊNCIAS**

BISPO, J. M. M. et al. Sex differences in the progressive model of parkinsonism induced by



reserpine in rats. Behavioural Brain Research, v. 363, n. January, p. 23-29, 2019.

LEÃO, A. H. F. F. et al. Spontaneously hypertensive rats (SHR) are resistant to a reserpine-induced progressive model of Parkinson's disease: Differences in motor behavior, tyrosine hydroxylase and  $\alpha$ -synuclein expression. Frontiers in Aging Neuroscience, v. 9, n. MAR, 27 mar. 2017.

LINS, L. C. R. F. et al. Carvacrol prevents impairments in motor and neurochemical parameters in a model of progressive parkinsonism induced by reserpine. Brain Research Bulletin, v. 139, n. 1, p. 9-15, 2018.

MELO, J. E. C. et al. Aging accentuates decrease in tyrosine hydroxylase immunoreactivity associated with the increase in the motor impairment in a model of reserpine-induced parkinsonism. Journal of Chemical Neuroanatomy, v. 125, p.102162, 2022.

PEIXINHO, A.; AZEVEDO, A. L.; SIMÕES, R. M. Alterações Neuropsiquiátricas da Doença de Parkinson. Revista do Serviço de Psiquiatria do Hospital Fernando Fonseca. V.3, N 2. 2006.

SANTOS, J. R. et al. Cognitive, motor and tyrosine hydroxylase temporal impairment in a model of parkinsonism induced by reserpine. Behavioural Brain Research, v. 253, p. 68-77, 2013.

SOUZA, M. F. et al. Motor, memory, and anxiety-like behavioral impairments associated with brain-derived neurotrophic factor and dopaminergic imbalance after inhalational exposure to deltamethrin. Brain Research Bulletin, v. 181, p. 55-64, 2022.

**Justificativa do uso dos procedimentos e da espécie:** A escolha da espécie animal foi com base na literatura, uma vez que trata-se de uma espécie bastante utilizada para investigar questões relacionadas ao tema proposto. Além disso, a espécie tem sido utilizada em nosso laboratório apresentando resultados em concordância com a literatura.

Os procedimentos a serem realizados tem relação com o modelo experimental escolhido para mimetizar a DP, o modelo da administração repetida de baixas doses de reserpina que também já foi utilizado em grupos de pesquisas parceiros com o objetivo de reproduzir o caráter progressivo da doença, possibilitando o maior entendimento dos aspectos a ela relacionados.

**Destinação:** As carcaças dos animais serão depositadas em sacos plásticos apropriados, devidamente identificados e armazenadas no freezer de coleta de material biológico situado no Laboratório de Neurofisiologia (LNFS), para depois serem recolhidas pelo Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia da UFS para descarte apropriado.

Envolve organismos geneticamente modificados? Não.

Envolve manipulação de agentes radioativos? Não.

Cronograma do estudo, início previsto para: 06/2023 com término previsto para: 06/2025

## FORMULÁRIO 3/4

**Invasividade:** GI 2 - Experimentos que causam estresse, desconforto ou dor, de leve intensidade.

**Estresse intencional?** Alteração térmica

O objetivo do presente projeto é avaliar o efeito neuroprotetor do frio em um modelo progressista da doença de Parkinson induzido por reserpina, dessa forma todos os animais serão submetidos, diariamente a uma exposição de 2h (6:30 às 8:30 a.m.) em baixa temperatura (12°C - grupos com tratamento de frio) ou mantidos em temperatura ambiente (22°C). No momento da exposição, todos os animais serão alojados, individualmente, em gaiolas com dimensões de 30 x 20 x13 cm, depois eles retornarão para suas respectivas caixas colônia, em grupos de 4 animais por caixa. O período total de exposição terá duração de 45 dias.

**Dor intencional?** Sim, haverá dor intencional causada nos animais (Curta duração).



Será realizada a administração de reserpina em ácido acético (1 ul/1ml) a 0,1%, o que pode gerar um pequeno desconforto no animal.

Fármaco para dor: Veículo para administração de drogas

Nome do princípio ativo (Denominação Comum Brasileira): Ácido Acético (DCB 00086)

Dose administrada: 0,1% UI

Via de administração: Subcutânea

Frequência do uso: 48/48h

Duração do uso: 30 dias

---

Justificativa para o não uso de analgésico para dor: O desconforto causado é agudo, apenas no momento de contato, o que inviabiliza a necessidade do uso do anestésico.

Haverá procedimento cirúrgico? Não haverá procedimento cirúrgico.

Exposição/inoculação de substâncias ou organismos que não fármacos? Não.

Será utilizado alguma outra droga, substância, extrato, vitamina ou suplemento? NÃO, não utilizo outras drogas, substâncias, extratos ou vitaminas.

Há extração de material biológico? Sim.

Material extraído: Encéfalo

Frequência de extração do material: 1

Quantidade do material: 32

Método de extração: Exposição do tecido e remoção da amostra após eutanásia

O material será utilizado em outro projeto? Não

---

Os animais serão eutanasiados? Sim.

Substância utilizada 1: cloridrato de quetamina

Via de administração: Intraperitoneal

Dose administrada: 100mg/kg

Substância utilizada 2: cloridrato de xilazina

Via de administração: Intraperitoneal

Dose administrada: 10mg/kg

Substância utilizada 3:

Via de administração:

Dose administrada:

Método de eutanásia: Após o período de realização dos testes comportamentais os animais serão anestesiados com uma mistura de cloridrato de cetamina (100 mg/Kg) e cloridrato de xilazina (10 mg/Kg) intraperitoneal. Com o animal completamente anestesiado e imobilizado, será realizado um acesso, seccionando a pele e partes moles, a cavidade torácica. Após a exposição da cavidade abdominal, será feito uma incisão no diafragma para exposição do coração. Os animais serão perfundidos intracardicamente com tampão fosfato de sódio (TFS; pH 7,4) para a lavagem dos vasos, por 10 minutos e, posteriormente, com paraformaldeído 4% (PFA) em tampão fosfato (TF; pH 7,4; 100 mM), por 20 minutos, para fixação do tecido. Após a perfusão, os cérebros serão removidos e mergulhados em uma solução fixadora de sacarose 30% a 4°C. Após a perfusão dos animais, as carcaças serão depositadas em sacos plásticos apropriados e



armazenadas no freezer de coleta de material biológico situado no biotério do Departamento de Fisiologia da UFS para posterior recolhimento durante a coleta de lixo especializada. Os resíduos perfurocortantes serão armazenados em caixas adequadas e levados até o hospital universitário para descarte junto ao material do hospital. Os cérebros serão levados a um criostato de deslizamento (Leica, EUA) onde serão congelados à  $-20^{\circ}\text{C}$  para obtenção de secções coronais de  $50\ \mu\text{m}$ , que serão distribuídas sequencialmente em 4 compartimentos, em um meio líquido contendo solução anticongelante. Cada um desses compartimentos corresponde a 1 de 4 secções, de maneira que a distância entre uma secção e a seguinte seja de aproximadamente  $250\ \mu\text{m}$ . Estes cortes vão ser armazenados em uma solução anticongelante à base de etilenoglicol e TF e posteriormente conservados a  $4^{\circ}\text{C}$  até as reações de imuno-histoquímica

Método restrito:

Método de descarte: As carcaças dos animais serão depositadas em sacos plásticos apropriados, devidamente identificados e armazenadas no freezer de coleta de material biológico situado no Laboratório de Neurofisiologia (LNFS), para depois serem recolhidas pelo Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia da UFS para descarte apropriado.

## FORMULÁRIO 4/4

Documentos anexados ao sistema

Título do documento: [Termo de Compromisso](#)

Nome do arquivo: [termodecompromisso Camila.pdf](#)

Título do documento: [Projeto de Pesquisa](#)

Nome do arquivo: [Projeto de Camila.pdf](#)

Título do documento: [FormConcea\\_14.02.2023](#)

Nome do arquivo: [FormConcea\\_14.02.2023.pdf](#)



# PESQUISA DE MESTRADO

**PR**  **CFIS**  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

Título do trabalho:



**EFEITO DO CANABIDIOL NO  
COMPORTAMENTO TIPO ANSIOSO E NA  
FORMAÇÃO DE MEMÓRIA AVERSIVA EM  
RATAS.**

Discente: Maria Camila Santos de Oliveira

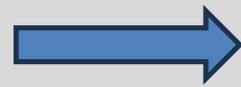
Orientador: Prof. Dr. José Ronaldo dos Santos

Coorientador: Prof. Dr. Auderlan de Mendonça Gois

# INTRODUÇÃO



## Ansiedade



É um sentimento natural e comum para todos os indivíduos



**Ansiedade Descontrolada e exagerada**

Caracteriza os transtornos de ansiedade.



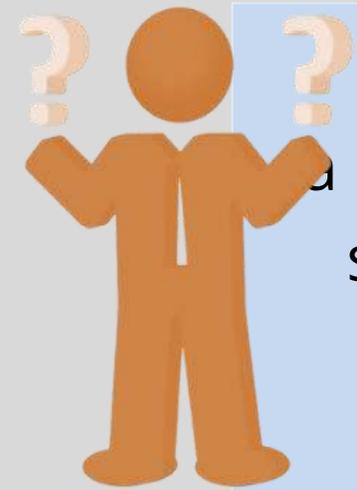
Afeta **33,7%** da população mundial

Incidência maior em indivíduos do sexo feminino.



A ansiedade está relacionada aos hormônios femininos.

# INTRODUÇÃO



Apesar disso,  
a maioria dos estudos  
são realizados com  
sujeitos do sexo  
masculino



Mulheres respondem diferente a  
alguns medicamentos e  
apresentam mais efeitos colaterais  
que os homens.



Dessa forma, em busca de um tratamento  
alternativo que reduza esses efeitos  
colaterais, a planta *Cannabis sativa*,  
popularmente conhecida como maconha,  
vem ganhando destaque na ciência com  
seu efeito terapêutico.



A Cannabis apresenta mais de 500 compostos  
e um deles vem ganhando destaque com seu  
efeito ansiolítico, **canabidiol (CBD)**.

# OBJETIVOS

- ✓ **Avaliar se o CBD é capaz de reduzir a ansiedade observada em ratas na fase de diestro tardio (corresponde a TPM das mulheres);**
- ✓ **Analisar o efeito do CBD no processo de formação de uma memória aversiva;**
- ✓ **Verificar a participação de algumas áreas cerebrais envolvidos com memória e ansiedade após o tratamento com CBD em uma tarefa de memória aversiva.**



# METODOLOGIA

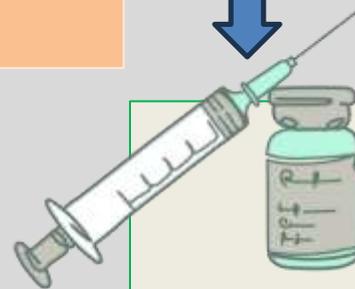


RATAS FÊMEAS

Durante 10 dias

Lavado vaginal, para acompanhar a fase do ciclo

Após identificar se os animais estavam no diestro tardio, estes receberam um dos tratamentos



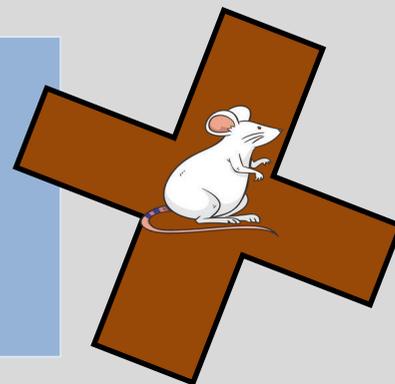
**Controle (CTR)**

**Canabidiol ((CBD) 0,3mg/kg))**

**Ou**

**Diazepam (2mg/kg)**

Após o tratamento, os animais passaram por um teste comportamental que avalia comportamento tipo ansioso e memória



# RESULTADOS

No trabalho vimos que o tratamento agudo com uma dose baixa de CBD (0,3 mg/kg) não causou prejuízo motor nos animais



Além disso, vimos que uma única dose de CBD foi capaz de reduzir o comportamento tipo ansioso se assemelhando ao diazepam que é um medicamento já utilizado na clinica para o tratamento da ansiedade



O diazepam é um medicamento que causa perda de memória. Quando utilizamos o CBD vimos que esse não causou esse dano.

# RESULTADOS



**Esses achado estão relacionados à ativação de áreas cerebrais que estão envolvidas no regulação da ansiedade e formação de memória, além de redução da atividade de áreas que estimulam a ansiedade.**





**PROCFIS**  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

## CONCLUSÃO

Podemos concluir que o tratamento agudo com CBD provoca efeito ansiolítico sem prejuízos na formação da memória de ratas em diestro tardio. Os achados do presente estudo apontam que o CBD pode ser uma excelente alternativa para o tratamento agudo da ansiedade em fêmeas.