

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

ARTHUR ALVES COELHO

**AVALIAÇÃO DA POSSÍVEL FACILITAÇÃO DA RESPOSTA DE EXTINÇÃO
DO MEDO CONDICIONADO APÓS TRAUMA POR DROGAS QUE
MODULAM A SINALIZAÇÃO ENDOCANABINOIDE**

RIBEIRÃO PRETO
2021

ARTHUR ALVES COELHO

**AVALIAÇÃO DA POSSÍVEL FACILITAÇÃO DA RESPOSTA DE EXTINÇÃO
DO MEDO CONDICIONADO APÓS TRAUMA POR DROGAS QUE
MODULAM A SINALIZAÇÃO ENDOCANABINOIDE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Bacharelado em Ciências Biomédicas com
Ênfase em Ciências Básicas em Saúde da Faculdade
de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São
Paulo para obtenção do grau de bacharel em Ciências
Biomédicas

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sabrina F. de Souza Lisboa

Autorizo a reprodução e divulgação total deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

A inclusão deste trabalho foi aprovada pela Comissão Coordenadora do Curso em sua 58^a Sessão Ordinária, realizada em 08/11/2021.

RIBEIRÃO PRETO

2021

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, **Ione Alves Ribeiro** e **Marcelo de Almeida Coelho**, pelo incentivo aos estudos desde que me entendo por gente. Por todos os anos de amor e carinho incondicional. Por serem meu porto seguro em cada momento de instabilidade durante esta trajetória. Sem vocês nada seria possível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família por me acalmarem em cada momento de angústia. Por me auxiliarem em cada decisão a ser tomada. Por serem meu exemplo a ser seguido. Por estarem presentes, mesmo quando distantes. Vocês são meu tudo.

Agradeço à minha querida orientadora, Prof^a. Dr^a. Sabrina Lisboa, por acreditar em mim e por ter feito com que eu crescesse tanto em tão pouco tempo. Pelo convite para te acompanhar no seu próprio laboratório. Por todo o conhecimento que adquiri graças a você. Agradeço pelo exemplo de cientista, de professora e de pessoa que você é. Quando eu crescer, quero ser igual você.

Também agradeço a todos que fizeram parte da minha rotina de laboratório. Ao Prof. Dr. Francisco Guimarães por me aceitar em seu laboratório. À Alice Hartmann, Carla Vila-Verde e Nicole Rodrigues por me ensinarem a dar os primeiros passos. À Aline Roncalho, Amanda Sales, Ariandra Sartim, Andreza Sonogo, Camilla Nappi, Fernanda Matias, Gabriela Silote, Isabela Cortez, Kennia Moura, Larissa Menegassi, Laura Colete, Letícia Vieira, Luana Neves, Mayara Firmino, Pedro Gobira e à Prof^a. Dr^a. Sâmia Joca por todas as discussões extremamente produtivas que me fizeram aprender tanto. Agradeço também ao João Francisco e à Prof^a. Dr^a. Elaine Guimarães pela disponibilidade e ajuda com os experimentos. À Miriam Melo e à Flávia Salata pelo apoio técnico. E por fim, agradeço em especial à Bruna Ferreira e Yurie Sato por fazerem com que eu conseguisse olhar com bom humor para cada experimento que não obtive o resultado esperado. Por deixarem meus dias mais leves. Agradeço a todos do fundo do meu coração.

Agradeço a todos os meus amigos da República Sparta por me acolherem tão bem quando precisei. Em especial agradeço ao Douglas Oliveira, Guilherme Peroti, Jhonas Camili, Júlia Cipolato, Júlia Penfield, Juliana Reis, Larissa Heliodoro, Larissa Tinelli, Paulo Nhani e Vinicius Costa. Agradeço a vocês pelos filmes na sala, pelas barrigadas na piscina e por cada conversa jogada fora. Vocês foram e são minha segunda família e quero vocês sempre juntos comigo.

Agradeço à minha namorada Larissa Tinelli. Por todos os desabafos que você foi obrigada a escutar e por cada abraço apertado que deu para me

acalmar. Agradeço por todos os momentos que passamos juntos e por todos que ainda vamos passar.

Agradeço a todos meus colegas de turma por cada revisão de última hora antes da prova. Por cada conhecimento compartilhado. Por nunca nos vermos como competidores e sim como companheiros. Agradeço por cada cochilo no chão do Multi antes da aula começar. Pelas idas ao Bandex, pelos sorvetes no HC e pelos cafés na Val. Agradeço por cada festa. Vocês me deram a melhor rotina (se é que posso chamar assim) que eu poderia ter durante a graduação. Alguns não admitem, mas todos sabem que a T4 sempre vai ser a melhor turma que a CB já viu.

Agradeço aos meus amigos Athos Castro, Larissa Pistoni, Thaise Tawara e Gabriela Teramoto pelos anos de amizade e pelos inúmeros momentos de risada. É impressionante ver como nossa amizade permanece inalterada mesmo com 260 Km entre nós. Se eu pudesse, colocaria vocês na mala e traria comigo em cada viagem para Ribeirão.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) pela concessão da bolsa de iniciação científica que permitiu a realização deste projeto. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), também pelo suporte financeiro. Por fim, também agradeço à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) e à Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCFRP) pela estrutura disponibilizada para realização do projeto.

*“Na vida, não existe nada a se temer,
apenas a ser compreendido.”*

Marie Curie

RESUMO

O transtorno de estresse pós-traumático (*posttraumatic stress disorder*, PTSD) pode se desenvolver após exposição a traumas severos, resultando em sintomas debilitantes, como dificuldade em extinguir memórias aversivas. Frente a isto, a principal terapia é a cognitivo-comportamental com intuito de facilitar a extinção daquelas memórias. No entanto, apesar da severidade do PTSD, esta terapia, bem como a farmacoterapia, que pode ser associada à terapia cognitivo-comportamental, são ineficazes em muitos pacientes. Além disso, a farmacoterapia é bastante limitada. Estes fatos demonstram a necessidade de identificação de mecanismos alterados pelo trauma que poderiam servir como biomarcadores e indicar, assim, novos alvos terapêuticos a serem explorados. O sistema endocanabinoide se encontra alterado em resposta ao trauma em humanos e em modelos animais. Além disso, este sistema é importante na resposta ao estresse e facilitação da extinção. Desta forma, objetivo deste projeto foi avaliar se a intervenção farmacológica no sistema ECB associada ao processo de extinção 7 dias após a exposição a um potencial evento traumático em camundongos é capaz de facilitar o processo de extinção e se há alteração de moléculas deste sistema.

Durante a execução do projeto foram realizadas tentativas de padronização do estresse de derrota social repetida, onde falhamos em obter o efeito comportamental do mesmo em diversos testes, como o labirinto em cruz elevado, teste de campo aberto, teste de reflexo de sobressalto acústico, splash test, teste de esquiva social e medo condicionado contextual. Apesar disso, observamos um efeito fisiológico do estresse, evidenciado pelo aumento no peso do baço dos animais estressados. Sendo assim, diante das tentativas frustradas e alterações no protocolo experimental levantamos a possibilidade de a linhagem de animais utilizada no projeto ter sofrido alguma alteração que proveu resiliência ao estresse.

Após todas essas tentativas, optamos por avaliar apenas o efeito da droga Araquidonoil Serotonina (AA-5HT), inibidora da enzima FAAH e antagonista TRPV1, em diferentes doses, administrada 30 minutos antes da sessão de extinção do medo condicionado contextual em animais não estressados. Conseguimos observar que a AA-5HT melhorou a consolidação da memória de extinção, indicando que inibição da FAAH pode estar causando um acúmulo de

anandamida, que age predominantemente em receptores CB1, pois a droga também está bloqueando a ativação de receptores TRPV1. Entretanto, ainda não testamos a participação dos receptores CB1, através do uso de antagonista para testar esta hipótese. Além disso, os testes moleculares ainda serão realizados. Desta forma, como não obtivemos efeito do estresse, não conseguimos extrapolar nossos resultados para o contexto de PTSD, como proposto inicialmente. Entretanto, o fato da AA-5HT ter facilitado a consolidação da extinção reforça nossa hipótese de que apresenta potencial efeito em condições em que este processo está alterado, como no PTSD.

Palavras-chave: Transtorno do estresse pós-traumático; Medo condicionado contextual; Sistema endocanabinoide; FAAH; TRPV1.

ABSTRACT

Post-traumatic stress disorder (PTSD) can develop after exposure to severe trauma, resulting in debilitating symptoms, such as difficulty in extinguishing aversive memories. Consequently, the main therapy is cognitive-behavioral therapy, which aims to facilitate the extinction of those memories. However, despite the severity of PTSD, this therapy, as well as pharmacotherapy, which can be associated with cognitive-behavioral therapy, are ineffective in many patients. Also, pharmacotherapy is quite limited. These facts demonstrate the need to identify mechanisms altered by trauma that could serve as biomarkers and thus indicate new therapeutic targets to be explored. The endocannabinoid system is altered in response to trauma in humans and in animal models of psychiatric disorders. Furthermore, this system is important to buffer stress response and facilitate fear extinction. Therefore, the aim of this project was to evaluate whether the pharmacological intervention in the ECB system associated with the extinction process 7 days after exposure to a potentially traumatic event in mice can facilitate the extinction process.

During the execution of the project, attempts were made to standardize the repeated social defeat stress. However, we failed to induce stress effects in several tests, such as the Elevated Plus Maze, open field test, acoustic startle reflex test, splash test, social avoidance test, and contextual conditioned fear. Despite this, we observe a physiological effect of stress, evidenced by the increase in the spleen weight of stressed animals. Therefore, because of our unsuccessful attempts and changes in the experimental protocol, we raised the possibility that the line of animals used in the project had undergone some change that provided resilience to stress.

After all these attempts, we chose to evaluate the effect of the drug Aracdonoil Serotonin (AA-5HT), a FAAH enzyme inhibitor and TRPV1 antagonist, in different doses, administered 30 minutes before the Contextual Conditioned Fear extinction session, in non-stressed animals. We observed that AA-5HT improved the consolidation of extinction memory. This data indicates that inhibition of FAAH may be causing an accumulation of anandamide, which acts predominantly on CB1 receptors, since the drug is also blocking the activation of TRPV1 receptors. However, we did not test this hypothesis yet. Moreover, we still

need to perform molecular tests. Therefore, as we did not obtain the effect of stress in any of the attempts, we were unable to extrapolate this result to the context of PTSD, as initially proposed. However, considering AA-5HT facilitated the fear extinction consolidation, this reinforces our hypothesis that this drug has a potential effect in conditions where fear extinction is altered, such as in PTSD.

Keywords: Post-traumatic stress disorder; Contextual conditioned fear; Endocannabinoid system; FAAH; TRPV1.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Linhas do tempo do experimento “Padronização do EDSR”, realizado em duas tentativas. (EDSR: Estresse de Derrota Social Repetida; LCE: Labirinto em Cruz Elevado; TCA: Teste de Campo Aberto; STT: Teste do Reflexo de Sobressalto Acústico; MCC: Medo Condicionado Contextual)30

Figura 2: Efeito do estresse e do condicionamento ao medo na (A) distância percorrida, na (B) latência para o centro, no (C) número de entradas e (D) tempo nas zonas do teste de campo aberto. Os testes foram realizados no 7º e 8º dia após o fim do estresse. Foram utilizados 5 animais naives (1 animal foi retirado deste teste devido a um problema no software) e 6 estressados. n=5-6/grupo. Os dados são representados pela média +/- EPM.....31

Figura 3: Efeito do estresse na resposta de Startle. O teste foi realizado 6 dias depois do fim do estresse. Foram utilizados 11 animais naives e 9 estressados. n=9-11/grupo. Os dados são representados pela média +/- EPM.....32

Figura 4: Efeito do estresse na (A) porcentagem de entradas e tempo no braço aberto e (B) número de entradas no braço fechado no labirinto em cruz elevado. O teste foi realizado no dia seguinte ao fim do estresse. Foram utilizados 17 animais no grupo naive e 15 no grupo estressado. n=15-17/grupo. Os dados são representados pela média +/- EPM.....33

Figura 5: Efeito do estresse no experimento de medo condicionado contextual. A extinção foi feita 1 dia e sua consolidação 2 dias após o condicionamento. A consolidação foi feita 2 dias após o condicionamento (Média). Foram utilizados 14 animais no grupo naive condicionado e 12 no grupo estressado condicionado, 3 animais no grupo naive habituado e 3 animais no grupo estressado habituado. n=3-14/grupo. Os dados são representados pela média +/- EPM.....34

Figura 6: Linha do tempo do experimento “Avaliação de uma medida patológica característica do EDSR”. (EDSR: Estresse de Derrota Social Repetida; TCA: Teste de Campo Aberto; ESQ: Esquiva Social)35

Figura 7: Efeito do estresse na (A) distância total percorrida, na (E) latência para o centro, na (B) distância percorrida, (C) número de entradas e (D) tempo nas zonas do teste de campo aberto. O teste foi realizado no dia seguinte ao fim do estresse. Foram utilizados 6 animais em cada grupo. $n=6/\text{grupo}$. Os dados são representados pela média $\pm$ EPM.....36

Figura 8: Efeito do estresse na (A) distância total percorrida, na (B) latência para a zona próxima, na (C) distância percorrida, (D) número de entradas e (E) tempo nas zonas no teste esquivo social. O teste foi realizado no dia seguinte ao fim do estresse. Foram utilizados 6 animais em cada grupo. $n=6/\text{grupo}$. Os dados são representados pela média $\pm$ EPM.....37

Figura 9: Efeito do estresse no peso do baço, corrigido pelo peso do animal. Foram utilizados 6 animais em cada grupo. $n=6/\text{grupo}$. Os dados são representados por média $\pm$ EPM.....38

Figura 10: Linha do tempo do experimento “Padronização do EDSR e caracterização do efeito do tratamento agudo com AA-5HT na extinção do MCC em animais expostos ao EDSR”. (EDSR: Estresse de Derrota Social Repetida; LCE: Labirinto em Cruz Elevado; TCA: Teste de Campo Aberto; SPL: *Splash Test*; MCC: Medo Condicionado Contextual)39

Figura 11: Distância total percorrida pelos animais separados em 3 por caixa no teste de campo aberto. O teste foi realizado 1 dia antes do início do protocolo de estresse para randomização dos grupos.....39

Figura 12: Efeito do estresse na (A) distância total percorrida, na (B) distância percorrida, (C) tempo e (D) número de entradas nas zonas no teste de campo aberto. O teste foi realizado no dia seguinte ao fim do estresse. Foram utilizados 17 animais naïves e 18 estressados. $n=17-18/\text{grupo}$. Os dados são representados pela média $\pm$ EPM. * indica diferença estatística em relação às medidas basais.....40

Figura 13: Efeito do estresse (A) no tempo total e (B) na latência para primeiro grooming no *Splash Test*. As medidas basais foram realizadas 1 dia antes do início do protocolo de estresse e o teste 6 dias após o fim do estresse. Foram

utilizados 17 animais naïves e 18 estressados. n=17-18/grupo. Os dados são representados pela média +/- EPM.....41

Figura 14: Efeito do estresse na (A) porcentagem de entradas e tempo no braço aberto e (B) número de entradas no braço fechado no labirinto em cruz elevado. O teste foi realizado 6 dias após o fim do estresse. Foram utilizados 17 animais naïves e 18 estressados. n=17-18/grupo. Os dados são representados pela média +/- EPM.....42

Figura 15: Efeito do condicionamento e do estresse no tempo total em congelamento na (A) na sessão de extinção e (B) na sessão de consolidação, (C) e na sessão de extinção, minuto a minuto. O condicionamento foi realizado 7 dias depois do fim do estresse de derrota social repetida. A extinção foi feita 1 dia e sua consolidação 2 dias após o condicionamento. Foram utilizados 3 animais naïve-habitados, 3 estressado-habitados, 4 naïve-condicionados e 4 estressado-condicionado. Os dados são representados pela média +/- EPM. n=3-4/grupo. * indica diferença estatística entre os grupos habituado e condicionado.....43

Figura 16: Efeito da droga AA-5HT no experimento de medo condicionado contextual (A) em animais naïves e (B) em animais estressados. A extinção foi feita 1 dia e sua consolidação 2 dias após o condicionamento. Para os grupos naïves foram utilizados 3, 4, 3, 4 e 3 animais para habituado, veículo, AA-5HT 0,1, 0,3, 1,0 e 3,0 mg/Kg, respectivamente. Para os grupos estressados foram utilizados 3, 4, 4, 4 e 3 animais para habituado, veículo, AA-5HT 0,1, 0,3, 1,0 e 3,0 mg/Kg, respectivamente. n=3-4/grupo. Os dados são representados pela média +/- EPM. * indica diferença estatística no grupo veículo.....45

Figura 17: Efeito da droga AA-5HT na consolidação da memória de extinção do medo condicionado. Os dados apresentados mostram a porcentagem de congelamento no último minuto da sessão de extinção e média da sessão de consolidação (A) em animais naïves e (B) em animais estressados. Para os grupos naïves foram utilizados 3, 4, 3, 4 e 3 animais para habituado, veículo, AA-5HT 0,1, 0,3, 1,0 e 3,0 mg/Kg, respectivamente. Para os grupos estressados foram utilizados 3, 4, 4, 4 e 3 animais para habituado, veículo, AA-5HT 0,1, 0,3,

1,0 e 3,0 mg/Kg, respectivamente. n=3-4/grupo. Os dados são representados pela média +/- EPM.....46

Figura 18: Linhas do tempo do experimento “Caracterização do efeito do tratamento agudo com AA-5HT na extinção do MCC em animais não estressados”. (MCC: Medo Condicionado Contextual)47

Figura 19: Efeito da droga AA-5HT no experimento de medo condicionado contextual. A extinção foi feita 1 dia e sua consolidação 2 dias após o condicionamento. Foram utilizados 20, 18, 20, 19 e 14 animais para os grupos veículo, AA-5HT 0,1, 0,3, 1,0 e 3,0 mg/Kg, respectivamente. n=14-20/grupo. Os dados são representados pela média +/- EPM. * indica diferença estatística no grupo veículo.....47

Figura 20: Efeito da droga AA-5HT na consolidação da memória de extinção do medo condicionado. Os dados apresentados mostram a porcentagem de congelamento no último minuto da sessão de extinção e média da sessão de consolidação. Foram utilizados 20, 18, 20, 19 e 14 animais para os grupos veículo, AA-5HT 0,1, 0,3, 1,0 e 3,0 mg/Kg, respectivamente. n=14-20/grupo. Os dados são representados pela média +/- EPM. * indica diferença estatística no grupo veículo.....48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-AG.....	2-Araquidonoil glicerol
AA-5HT.....	Araquidonoil serotonina
AEA.....	Anandamida
ANOVA.....	Análise de variância
CB1.....	Receptor canabinoide 1
CB2.....	Receptor canabinoide 2
CPFm.....	Córtex Pré-frontal medial
DAGL.....	Diacylglicerol lipase
DSM.....	Manual de diagnóstico médico de doenças mentais
ECB.....	Endocanabinoide
EDSR.....	Estresse de Derrota Social Repetida
EPM.....	Erro Padrão da Média
FAAH.....	<i>Fatty Acid Amide Hydrolase</i>
HIP.....	Hipocampo
HPA.....	Hipotálamo-Pituitária-Adrenal
LCE.....	Labirinto em Cruz Elevado
MCC.....	Medo Condicionado Contextual
NAPE-PLD.....	N-acil-fosfatidiletanolamina fosfolipase D
PTSD...	<i>Post-Traumatic Stress Disorder</i> (Transtorno do estresse pós-traumático)
SNC.....	Sistema Nervoso Central
TCA.....	Teste de Campo Aberto
TRPV1.....	Receptor Vaniloide de Potencial Transitório Tipo 1

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. Transtorno do estresse pós-traumático	19
1.2. <i>PTSD</i> e modelos animais	20
1.3. <i>PTSD</i> e sistema endocanabinoide	21
2. OBJETIVOS	24
2.1. Objetivo Geral	24
2.2. Objetivos específicos	24
3. MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1. Animais	25
3.2. Drogas	25
3.3. Modelo de estresse: Estresse de derrota social repetida (EDSR)	25
3.4. Labirinto em cruz elevado	26
3.5. Teste de campo aberto	26
3.6. Teste do Reflexo de Sobressalto Acústico (Startle Reflex Response Test)	26
3.7. <i>Splash Test</i>	27
3.8. Esquiva Social	27
3.9. Medo condicionado contextual	28
3.10. Análise estatística	29
4. RESULTADOS	30
4.1. Padronização do EDSR	30
4.1.1. Teste de Campo Aberto	30
4.1.2. Startle	32
4.1.3. Labirinto em Cruz Elevado	32
4.1.4. Medo Condicionado Contextual	33
4.2. Avaliação de uma medida patológica característica do EDSR	35
4.2.1. Teste de Campo Aberto	35
4.2.2. Esquiva Social	36
4.2.3. Peso do Baço	38
4.3. Padronização do EDSR e caracterização do efeito do tratamento agudo com AA-5HT na extinção do MCC em animais expostos ao EDSR	38
4.3.1. Teste de Campo Aberto	39
4.3.2. <i>Splash Test</i>	41
4.3.3. Labirinto em Cruz Elevado	41

4.3.4.	Medo Condicionado Contextual.....	42
4.4.	Caracterização do efeito do tratamento agudo com AA-5HT na extinção do MCC em animais não estressados	46
4.4.1.	Medo Condicionado Contextual.....	47
5.	DISCUSSÃO	49
6.	CONCLUSÃO.....	52
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	53

1. INTRODUÇÃO

1.1. Transtorno do estresse pós-traumático

O transtorno de estresse pós-traumático (*PTSD-posttraumatic stress disorder*) é um transtorno neuropsiquiátrico crônico e debilitante associado ao trauma e estresse altamente prevalente (8% da população mundial ao longo da vida). Ao contrário de outros transtornos psiquiátricos, o critério diagnóstico é a exposição a eventos traumáticos, como por exemplo guerras, violência sexual, assaltos, desastres naturais, entre outros. Enquanto a maioria dos indivíduos se recupera desta resposta de estresse aguda, alguns desenvolverão o *PTSD* (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013; BONNE et al., 2004; BREMNER et al., 1995; DYKMAN; ACKERMAN; NEWTON, 1997; GILBOA; FRIEDMAN; TSUR, 1994; YEHUDA, 2009).

Este transtorno é caracterizado pela presença de 4 grupos de sintomas, sendo eles: (1) a intrusão e reexperimentação, caracterizada pela presença de memórias intrusivas involuntárias, pesadelos e flashbacks que remetem o indivíduo ao evento traumático, fazendo com que ele possa entrar em um estado dissociativo onde se comporta como se o evento estivesse acontecendo no momento. Devido a tamanho sofrimento, o indivíduo passa a ter alto nível de (2) evitação de pensamentos, lembranças e diálogos que remetem ao trauma. Além disso, evita atividades, lugares e pessoas que desencadeiam este tipo de lembrança. Com isso, também ocorrem (3) alterações negativas de humor e cognição, que podem ser manifestadas como medo, raiva, culpa, vergonha e anedonia. Por fim, o paciente também sofre com (4) alta excitabilidade, caracterizada por hipervigilância, irritabilidade e agressividade (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013).

Dentre os sintomas do *PTSD* destacam-se a incapacidade de reduzir a consolidação do trauma, bem como de extinguir respostas aversivas aprendidas (AMSTADTER; NUGENT; KOENEN, 2009; FILIPOVIC et al., 2011; GILBOA; FRIEDMAN; TSUR, 1994; MILAD et al., 2009; MUTSO et al., 2012). Tanto estas características quanto a ocorrência de patologias associadas parecem envolver ativação anormal de estruturas encefálicas. No *PTSD*, a hiperatividade da amígdala e a falta de inibição de sua atividade pelo córtex pré-frontal medial (CPFm) contribuem para os sintomas do transtorno, incluindo déficits de extinção de memórias aversivas (KOENIGS; GRAFMAN, 2009; LIBERZON; ABELSON, 2016). Além disso, a disfunção do hipocampo (HIP) e a falta de controle do CPFm sobre ele contribuem para prejuízos

na discriminação de contextos relacionados ao trauma ou não, resultando em generalização de respostas de medo (LIBERZON; ABELSON, 2016)

Apesar do prejuízo na qualidade de vida dos indivíduos, além do alto custo em saúde que o *PTSD* gera, a farmacoterapia é bastante limitada e pode não ser eficaz, principalmente em pacientes do sexo masculino (KRYSTAL et al., 2017; WHITTLE; SINGEWALD, 2014). A combinação de fármacos é frequente para tratar diversos sintomas, podendo aumentar o risco de efeitos colaterais e descontinuação da medicação (KRYSTAL et al., 2008). O principal tratamento para promover redução de respostas condicionadas é a associação da terapia de exposição ao tratamento farmacológico. Entretanto, este esquema de tratamento não se demonstra superior à farmacoterapia ou à terapia isoladas (WHITTLE; SINGEWALD, 2014). Além disso, o *PTSD* apresenta grandes índices de comorbidade com outros transtornos psiquiátricos, como a depressão, fazendo com que o tratamento se torne ainda mais difícil (BRAND; HARVEY, 2017; MARCHETTI et al., 2020; RYTWINSKI et al., 2013).

1.2. *PTSD* e modelos animais

O *PTSD* ainda não é completamente compreendido. Sendo assim a utilização de modelos animais para seu estudo é extremamente necessária (DESLAURIERS et al., 2018). Existem diversos modelos de trauma que tentam ao máximo mimetizar fenótipos fisiológicos e comportamentais induzidos por essa patologia, como por exemplo o estresse por choques inescapáveis nas patas (PRYCE et al., 2011), exposição ao predador (COHEN et al., 2006), estresse único prolongado (LIBERZON; KRSTOV; YOUNG, 1997), estresse de restrição (BUYNITSKY; MOSTOFSKY, 2009) e estresse de derrota social (HAMMELS et al., 2015), entre outros.

Dentre estes estressores, se destaca o estresse de derrota social, um modelo de agressão e estresse social que reproduz diversos comportamentos observados em pacientes com *PTSD*, como por exemplo, evitação social, ansiedade exagerada e anedonia (BERTON et al., 2006; HAMMELS et al., 2015; KINSEY et al., 2007; KRISHNAN et al., 2007), além de déficits de extinção do medo condicionado contextual (LISBOA et al., 2018). Além disso o estresse de derrota social também reproduz parâmetros fisiológicos observados em pacientes com *PTSD*, como por exemplo, o aumento da atividade da amígdala por falta de controle do córtex pré-frontal (HULTMAN et al., 2016) e inflamação central e periférica duradoura (READER

et al., 2015). Por fim, também é possível observar um prejuízo na qualidade de sono, resultando em diminuição de sono REM e aumento de sono não REM (KAMPHUIS et al., 2015; MEERLO; PRAGT; DAAN, 1997). Desta forma, optamos por utilizar este estressor no presente trabalho.

Somando-se a isso, neste trabalho também utilizamos o modelo experimental de medo condicionado contextual. O medo condicionado consiste no pareamento de um estímulo neutro com um estímulo aversivo, como por exemplo o choque nas patas, de forma que o estímulo neutro se torna um estímulo condicionado, pois prediz a ocorrência do estímulo aversivo (FENDT; FANSELOW, 1999). Sendo assim, quando o animal é reexposto ao contexto em que aconteceu o pareamento, reações de defesa, como por exemplo o comportamento de congelamento, ou *freezing*, são desencadeadas, mesmo que desta vez não haja a presença de estímulo aversivo (CARRIVE, 2000; FENDT; FANSELOW, 1999; RESSTEL et al., 2006). Conforme o animal é reexposto ao contexto sem a presença de estímulo aversivo de forma repetida ou prolongada ele consegue extinguir a memória de medo condicionado, ou seja, o estímulo condicionado deixa de predizer o estímulo aversivo, reduzindo assim as reações desencadeadas pelo contexto (QUIRK; GARCIA; GONZÁLEZ-LIMA, 2006; QUIRK; MUELLER, 2008; VANELZAKKER et al., 2014). É importante ressaltar que a memória de extinção não se trata do esquecimento do medo e sim da formação de uma nova memória que se sobrepõe à antiga, inibindo sua evocação (MAREN; HOLMES, 2016).

Desta forma, a combinação de um modelo de trauma, como o estresse de derrota social, com o modelo de medo condicionado contextual se torna muito relevante para os estudos que investigam a fisiopatologia do *PTSD* (BOWERS; RESSLER, 2015).

1.3. *PTSD* e sistema endocanabinoide

Endocanabinoides (ECBs) são mediadores lipídicos produzidos sob demanda no terminal pós-sináptico e em células da glia a partir de fosfolipídeos de membrana em resposta ao aumento de atividade neuronal. A anandamida (DEVANE et al., 1992) e o 2-araquidonoilglicerol, 2-AG, (MECHOULAM et al., 1995) até hoje são os mais estudados, sendo eles sintetizados pelas enzimas N-acil-fosfatidiletanolamina fosfolipase D (NAPE-PLD) e diacilglicerol lipase (DAGL), respectivamente (WANG; UEDA, 2009). Estes mediadores podem atuar por receptores canabinoides CB₁ e CB₂,

localizados por exemplo no terminal pré-sináptico e células da glia. Estes receptores são acoplados à proteína Gi, logo sua ativação leva à inibição da liberação de neurotransmissores e neuromoduladores (CRISTINO; BISOGNO; DI MARZO, 2020). Os ECBs são degradados por enzimas localizadas no terminal pós ou pré-sináptico. A enzima amida hidrolase de ácidos graxos (FAAH; *Fatty Acid Amide Hydrolase*), é responsável pela degradação da anandamida e localiza-se no terminal pós-sináptico. Já o 2-AG é degradado pela monoacilglicerol lipase (MAGL), localizada no terminal pré-sináptico (CRISTINO; BISOGNO; DI MARZO, 2020; LISBOA et al., 2017).

Os ECBs são produzidos em resposta ao estresse e modulam esta resposta por limitar a excitabilidade neuronal principalmente por inibir a liberação de glutamato; modulam, ainda, a atividade do eixo HPA e a neuroinflamação. Estes efeitos podem ser mediados por CB₁ ou CB₂ (CORREA et al., 2005; ELJASCHEWITSCH et al., 2006; GARCÍA-GUTIÉRREZ et al., 2012; LISBOA et al., 2016, 2017; WOLF; TAUBER; ULLRICH, 2008). A ativação de CB₁ em estruturas relacionadas ao controle de respostas emocionais é capaz de induzir efeitos ansiolíticos e panicolíticos (LISBOA et al., 2017). Os ECBs modulam, ainda, a hiper-reatividade e perfil pró-inflamatório de células da micróglia, incluindo em situações de estresse (ELJASCHEWITSCH et al., 2006; LISBOA et al., 2018; THAM et al., 2007). Outra importante função da sinalização via CB₁ é facilitar a extinção de memórias aversivas condicionadas (GANON-ELAZAR; AKIRAV, 2013; LARICCHIUTA; CENTONZE; PETROSINI, 2013; LISBOA et al., 2015; MARSICANO et al., 2002). A facilitação desta sinalização pode, portanto, modular diversos sistemas envolvidos no *PTSD*, sendo possível alvo para seu tratamento (LISBOA et al., 2018; NEUMEISTER, 2013; NEUMEISTER et al., 2015).

Ao contrário da ativação de receptores CB₁, o bloqueio de receptores vaniloide de potencial transitório tipo 1 (TRPV1), um canal catiônico não seletivo que pode ser ativado por anandamida, induz efeito ansiolítico semelhante à ativação de CB₁, reduz a resposta de medo condicionado e facilita a resposta de extinção, inclusive em situação de estresse (LARICCHIUTA; CENTONZE; PETROSINI, 2013; MARSCH et al., 2007). Além disso, a inibição farmacológica de TRPV1 nas mesmas estruturas encefálicas que a ativação de CB₁ induz efeitos ansiolíticos, sendo que estes efeitos opostos parecem envolver modulação da neurotransmissão pelo glutamato (AGUIAR et al., 2014). Um trabalho recente demonstrou que uma droga que promove tanto a inibição da FAAH quanto o antagonismo de TRPV1 reduziu a expressão do medo condicionado contextual, tanto administrada sistemicamente quanto no hipocampo

dorsal (GOBIRA et al., 2017), mas o efeito na extinção não foi avaliado. Dessa forma, a facilitação da sinalização via CB1 associada à inibição da sinalização via TRPV1 poderiam facilitar respostas de extinção após eventos traumáticos.

Corroborando um potencial terapêutico para drogas que modulam a sinalização ECB no PTSD, indivíduos com este transtorno apresentam alteração nos níveis circulantes de endocanabinoides (ECBs) (HAUER et al., 2013; HILL et al., 2013; SPAGNOLO et al., 2016) e em receptores CB1 (NEUMEISTER, 2013; NEUMEISTER et al., 2013). Além disso, evidências de polimorfismos na enzima FAAH em pacientes com PTSD apontam que a redução da atividade desta enzima e aumento dos níveis de anandamida apresentam efeito protetor (PARDINI et al., 2012; SPAGNOLO et al., 2016). Embora estudos farmacológicos em pacientes com PTSD ainda não tenham sido demonstrados, a inibição farmacológica da FAAH em indivíduos saudáveis (MAYO et al., 2020) ou em animais de laboratório, como citado acima (GUNDUZ-CINAR et al., 2013; LIN et al., 2009) demonstram que ocorre facilitação da resposta de extinção. Logo, a inibição farmacológica desta enzima parece ser importante alvo terapêutico no PTSD, em que déficits de extinção são observados.

Considerando que a disfunção do sistema ECB induzida pela exposição ao trauma pode estar envolvida nas consequências comportamentais deste trauma, como os déficits de extinção de memórias aversivas condicionadas, a modulação deste sistema durante a avaliação das respostas de extinção poderia atenuar as consequências do trauma. Assim, um fármaco que inibe a enzima FAAH e é antagonista de receptores TRPV1 em associação ao processo de extinção da resposta de medo condicionada poderia atenuar os déficits induzidos pela exposição prévia ao trauma. Assim, o objetivo deste estudo foi testar a hipótese de que o tratamento com este fármaco dual, a araquidonoil-serotonina (AA-5HT), facilita os déficits de extinção da memória condicionada contextual induzidos pela exposição de camundongos a um trauma prévio.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da exposição a um estressor traumático no processo de extinção do medo condicionado contextual e o efeito da AA-5HT, droga que inibe a enzima FAAH e antagoniza receptores TRPV1, na resposta de extinção.

2.2. Objetivos específicos

1) Avaliar o estresse de derrota social repetida como um modelo de trauma para mimetizar comportamentos relacionados ao transtorno do estresse pós traumático.

2) Investigar se a facilitação farmacológica da sinalização via CB1 e bloqueio de receptores TRPV1 associada à resposta de extinção do medo condicionado contextual é capaz de facilitar a extinção da resposta induzida por exposição prévia a trauma.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Camundongos C57BL/6 (6 semanas de idade, 26g) provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo, campus de Ribeirão Preto, foram alocados em grupos de 3 animais por gaiola e aclimatados no biotério do Departamento da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP/USP) até atingirem a idade necessária para o início dos experimentos (9 semanas). Os animais foram mantidos com água e comida *ad libitum*, ciclo claro-escuro de 12 h e temperatura controlada ($24\pm1^{\circ}\text{C}$). Camundongos CD-1 (4 meses), utilizados como intrusos no modelo de trauma, foram obtidos dos Laboratórios *Charles River* (EUA). Após serem aposentados como reprodutores, foram mantidos isolados para privá-los do convívio social e aumentar o comportamento agressivo, o que é necessário para o modelo de trauma utilizado, como amplamente descrito na literatura. Para os grupos que foram avaliados a longo-prazo após o término do trauma no teste do medo condicionado contextual, os animais foram mantidos isolados a fim de excluir o efeito confundidor de brigas entre os residentes, conforme previamente padronizado e publicado pelo nosso grupo. Todos os procedimentos realizados foram aprovados pelo Comissão de Ética no Uso de Animais do Campus da USP de Ribeirão Preto (CEUA, número do processo: 19.1.671.60.6).

3.2. Drogas

AA-5HT, antagonista TRPV1 e inibidor de FAAH (0,1, 0,3, 1,0 e 3,0 mg/Kg, 0,1 mg/ml i.p., Tocris) foi administrada agudamente 30 minutos antes da avaliação da resposta de extinção do estímulo condicionado. A droga, disponível em solução 10 mg/ml em metil acetato, foi dissolvida em salina (0,9% NaCl) no dia do experimento.

3.3. Modelo de estresse: Estresse de derrota social repetida (EDSR)

O EDSR foi realizado por 6 dias, durante 2h por dia, período no qual um animal CD-1 foi inserido na caixa de um grupo de 3 camundongos residentes. Diferentes intrusos foram usados em noites consecutivas. Durante o período total do estresse (2h), um observador permaneceu na sala para garantir que os animais experimentais assumiriam uma postura submissa e evitar que eles fossem gravemente lesados pelo camundongo agressor.

3.4. Labirinto em cruz elevado

Para avaliarmos o comportamento do tipo-ansioso foi realizado o teste do labirinto em cruz elevado. O comportamento foi registrado pelo software AnyMaze durante 5 minutos. Foram utilizados como parâmetros as porcentagens de tempo e entrada nos braços abertos, bem como o número de entradas nos braços fechados. A maior exploração dos braços abertos, sem aumentar a exploração dos braços fechados, é um indicativo de efeito do tipo-ansiolítico.

3.5. Teste de campo aberto

O teste de campo aberto é utilizado para avaliarmos a atividade locomotora, evidenciada pela distância total percorrida no teste, e comportamentos do tipo-ansioso dos animais, evidenciados pelo número de entradas, tempo e distância percorrida na área central e periférica do aparato, além da latência para o animal se deslocar para o centro. Eles foram colocados em uma arena redonda de 30 cm de diâmetro e o software AnyMaze analisou todos estes parâmetros durante 5 minutos.

3.6. Teste do Reflexo de Sobressalto Acústico (Startle Reflex Response Test)

Nesse teste foram utilizadas duas caixas de sobressalto, que consistem em gaiolas de barras de aço inoxidável com dimensões internas de 25x9x9cm, suspensas em uma armação de PVC - ENV-262A Med Associates (MA). Cada uma dessas gaiolas é abrigada em uma caixa maior (64 x 60 x 40cm) fabricada em madeira com atenuação acústica (ENV-018S MA). A resposta de sobressalto do animal gera uma pressão nesta plataforma que é captada por sensores e amplificada (PHM 250-60, amplificador MA) gerando um sinal analógico que é digitalizado e analisado por um programa computacional (Startle Reflex, versão 4.10 MA) que representará graficamente os sinais dessa resposta. A apresentação dos estímulos, duração, intensidade e amplitude também foram computadorizadas através de uma interface 729 - MA. A resposta do sobressalto foi medida durante os primeiros 200ms após a apresentação do estímulo de sobressalto. O teste do reflexo de sobressalto foi composto por duas etapas: A) Aclimação: Período de 5 minutos, durante o qual nenhum estímulo é apresentado. Consiste na manutenção do animal na gaiola de aço ou cilindro acrílico onde o teste é realizado, com ruído de fundo (background) pré-estabelecido de 65 dB; B) Resposta ao sobressalto acústico (Startle Reflex Response): A sessão iniciou com quatro apresentações de som de 115 dB de duração

de 20ms, que não foram incluídas nas análises posteriores devido as respostas aos primeiros estímulos surpreendentemente diferirem em magnitude do resto dos ensaios. Assim, a exposição a esses estímulos iniciais permite o estabelecimento de uma linha de base estável e assim após essa breve etapa, foi iniciado o ensaio de resposta ao sobressalto acústico. Essa etapa foi composta por apresentações pseudo randomizadas dos diferentes estímulos que compõem o teste: Pulsos (85 dB; 95 dB; 105 e 115 dB de ruído branco, duração de 20ms) e a ausência de estímulo (nulo). Durante o ensaio os estímulos foram apresentados em intervalos médios de 19 segundos (variando de 11 a 27 segundos), sendo apresentados 20 de cada categoria de maneira que nunca um estímulo fora apresentado mais de duas vezes seguidas.

3.7. *Splash Test*

Os animais foram submetidos à duas borrifadas de uma solução de sacarose a 10% sobre o dorso a qual apresenta viscosidade suficiente para elicitare comportamentos de autolimpeza, conhecido em roedores pelo termo *grooming*. Após as borrifadas, os animais foram gravados durante seis minutos para posterior análise comportamental manual, onde os parâmetros analisados foram latência para o primeiro episódio e porcentagem do tempo em *grooming*. Espera-se que os animais estressados tenham um aumento na latência para o primeiro episódio e diminuição do tempo total, sendo estes padrões considerados comportamento do tipo-depressivo.

3.8. *Esquiva Social*

No teste de esquiva social os animais foram submetidos a uma arena quadrada contendo uma pequena gaiola vazia por 2 minutos e 30 segundos. Em seguida, foi colocado um camundongo CD-1 utilizado no estresse de derrota social na gaiola e os animais ficaram na arena por mais 2 minutos e 30 segundos. Foram avaliados o tempo, número de entradas e distância percorrida na área próxima à gaiola e nos dois cantos opostos ao lado onde se localizava a gaiola com o animal agressor, normalizados pelos mesmos parâmetros de quando o agressor não estava presente. Além disso foram avaliadas a distância total percorrida durante o teste e a latência para primeira entrada na zona próxima ao agressor. As medidas foram obtidas pelo software AnyMaze. Espera-se que animais que passaram pelo EDSR fiquem mais tempo nos cantos opostos (corners 1 e 2) e menos tempo na zona próxima ao agressor.

3.9. Medo condicionado contextual

Este modelo é utilizado para avaliar a resposta comportamental de animais quando são expostos a um estímulo neutro (no caso, uma caixa) que, após ser associado a um estímulo aversivo exteroceptivo (choques nas patas), torna-se um estímulo condicionado. O protocolo teve início 7 dias após o término do trauma. De acordo com este protocolo, animais submetidos ao EDSR apresentam prejuízo na extinção do MCC, assim como pacientes que apresentam *PTSD*. No dia do condicionamento, os animais foram colocados na caixa de condicionamento contextual e tiveram um período de habituação de 2 minutos. Após este período, os animais passaram pela sessão de condicionamento, durante a qual três choques inescapáveis (0,75 mA, 2 segundos cada) foram aplicados às patas através do chão da caixa, uma grade metálica. 24 h após a sessão de condicionamento, os animais foram re-expostos à caixa, sem apresentação de choques, durante 20 minutos para avaliação da resposta de extinção. Após outras 24h, os animais foram novamente testados na mesma caixa, por 10 minutos, para avaliação da consolidação da resposta de extinção, também sem apresentação de choques nas patas. O tempo de congelamento foi registrado como medida de medo do animal frente ao contexto previamente pareado com choques elétricos nas patas.

No primeiro experimento (padronização do EDSR) o teste foi gravado e o congelamento foi manualmente quantificado depois. Para os experimentos 3 e 4 (“Padronização do EDSR e caracterização do efeito do tratamento agudo com AA-5HT na extinção do MCC em animais expostos ao EDSR” e “Caracterização do efeito do tratamento agudo com AA-5HT na extinção do MCC em animais não estressados, respectivamente”), obtivemos sistema de condicionamento automatizado da Ugo Basile. Sendo assim, o congelamento passou a ser quantificado em tempo real pelo software AnyMaze (foram previamente realizadas medidas manuais de animais para comparação e validação das medidas automáticas pelo software). O limiar utilizado para a imobilidade ser considerada congelamento foi de 1000 milissegundos.

Vale ressaltar que inicialmente as medidas do sistema passaram por um processo de validação, em que as suas medidas automatizadas em diferentes experimentos foram comparadas com as análises manuais por diferentes experimentadores. O padrão de análise, avaliado pelo perfil das curvas de congelamento, foi similar entre os experimentadores e o programa, sendo que as

diferenças observadas foram na escala, o que já é normalmente observado de um experimentador para outro (dados não mostrados).

3.10. Análise estatística

Os dados são representados como média $\pm$ EPM.

Nos testes de labirinto em cruz elevado e esquiva social foi realizado teste t de Student para comparar os grupos naïve e estressado. O mesmo foi feito para análise do splash test, porém os dados foram normalizados pelas medidas basais. No teste de startle foi realizado uma análise ANOVA de 2 vias, onde os fatores considerados foram condição do animal e intensidade do estímulo.

Em relação ao teste de campo aberto, no primeiro e no terceiro experimento foram obtidos dados basais. Nestes casos foi feito ANOVA de medidas repetidas, onde o tempo foi a medida repetida e a condição do animal (naïve ou estressado) foram os fatores analisados. No segundo experimento, quando não obtivemos os dados basais, os grupos foram comparados por teste t de Student.

No teste de medo condicionado contextual foi feito ANOVA de medidas repetidas, onde o tempo foi a medida repetida e a condição do animal (naïve ou estressado) foram os fatores analisados. No caso dos experimentos com tratamento farmacológico, inicialmente foi realizada ANOVA de medidas repetidas, onde o tempo foi a medida repetida e a condição e o tratamento os fatores dependentes. Na ausência de efeito da condição, os dados foram separados por condição (naïve ou estressado) e analisados considerando apenas a medida repetida e o tratamento como fatores. Em caso de significância estatística, as médias dos grupos foram analisadas pelo teste de Tukey para detectar as diferenças entre os grupos. Também realizamos testes t pareados para comparar o fim da sessão de extinção com a média da sessão de consolidação.

O nível de significância assumido foi menor que 0,05.

4. RESULTADOS

4.1. Padronização do EDSR

Para a realização padronização do estresse de derrota social repetida realizamos o protocolo de estresse previamente descrito. Os animais do grupo naïve foram apenas manipulados durante todos os dias de estresse. Foram realizadas duas tentativas, com pequenas diferenças entre elas (figura 1). Desta forma, unimos os n experimentais nos testes de labirinto em cruz elevado e medo condicionado contextual, comuns nas duas tentativas, mas não nos testes de campo aberto e do reflexo de sobressalto acústico, que foram realizados apenas em uma ou outra tentativa.

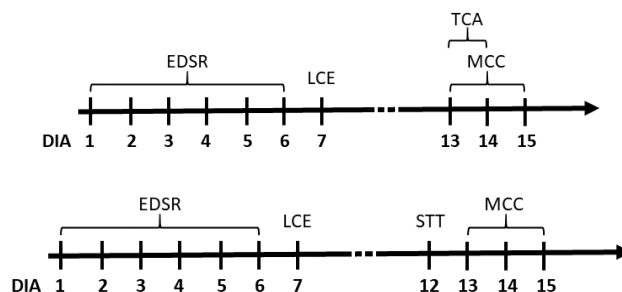


Figura 1: Linhas do tempo do experimento “Padronização do EDSR”, realizado em duas tentativas. (EDSR: Estresse de Derrota Social Repetida; LCE: Labirinto em Cruz Elevado; TCA: Teste de Campo Aberto; STT: Teste do Reflexo de Sobressalto Acústico; MCC: Medo Condicionado Contextual)

4.1.1. Teste de Campo Aberto

Realizamos o teste de campo aberto uma semana após o término do estresse para avaliar a atividade locomotora dos animais e como outra forma de verificar se o estresse e/ou o condicionamento causaram efeito ansiogênico (figura 2). Foram avaliados a distância total percorrida pelos animais, o número de entradas e tempo no centro e na periferia do aparato em 5 minutos de teste. A análise foi feita no dia do condicionamento (antes dele ser realizado) e no dia seguinte (antes da extinção). Para análise do experimento, foi realizado um teste de ANOVA de 2 vias, levando em conta o dia da realização do experimento (pré condicionamento ou pós condicionamento) e a condição dos animais (naïve ou estressado).

Em relação à distância total percorrida (figura 2A), a ANOVA de 2 vias indicou que não houve diferença significativa entre os grupos ($F^{(1,9)}=0,675$; $p=0,432$), porém houve diferença entre os dias de realização do experimento ($F^{(1,9)}=98,64$; $p<0,0001$). Não houve interação entre os fatores ($F^{(1,9)}=0,0003$; $p=0,984$). Em relação à latência para

o centro (figura 2B), o resultado foi o mesmo. Obtivemos diferença significativa entre o diferentes dias ($F^{(1,9)}=7,283$; $p=0,024$), mas não entre os grupos ($F^{(1,9)}=2,097$; $p=0,181$) e não houve interação ($F^{(1,9)}=2,412$; $p=0,154$).

Analizamos também o número de entradas e tempo que os animais ficaram no centro e na periferia do aparato. Obtivemos uma diminuição no número de entradas (figura 2C) em ambas as zonas no segundo dia de experimento (centro: $F^{(1,9)}=12,13$, $p=0,006$; periferia: $F^{(1,9)}=18,93$, $p=0,001$), porém não houve diferença entre os grupos (centro: $F^{(1,9)}=2,069$, $p=0,184$; periferia: $F^{(1,9)}=2,297$, $p=0,163$) e nem interação entre os fatores (centro: $F^{(1,9)}=1,109$, $p=0,319$; periferia: $F^{(1,9)}=2,465$, $p=0,150$). Em relação ao tempo em cada zona (figura 2D), não obtivemos diferença nem entre os dias de experimento (centro: $F^{(1,9)}=0,054$, $p=0,821$; periferia: $F^{(1,9)}=0,145$, $p=0,711$), nem entre os grupos (centro: $F^{(1,9)}=2,800$, $p=0,128$; periferia: $F^{(1,9)}=3,267$; $p=0,104$), e também não houve interação (centro: $F^{(1,9)}=0,0653$, $p=0,804$; periferia: $F^{(1,9)}=0,004$, $p=0,947$).

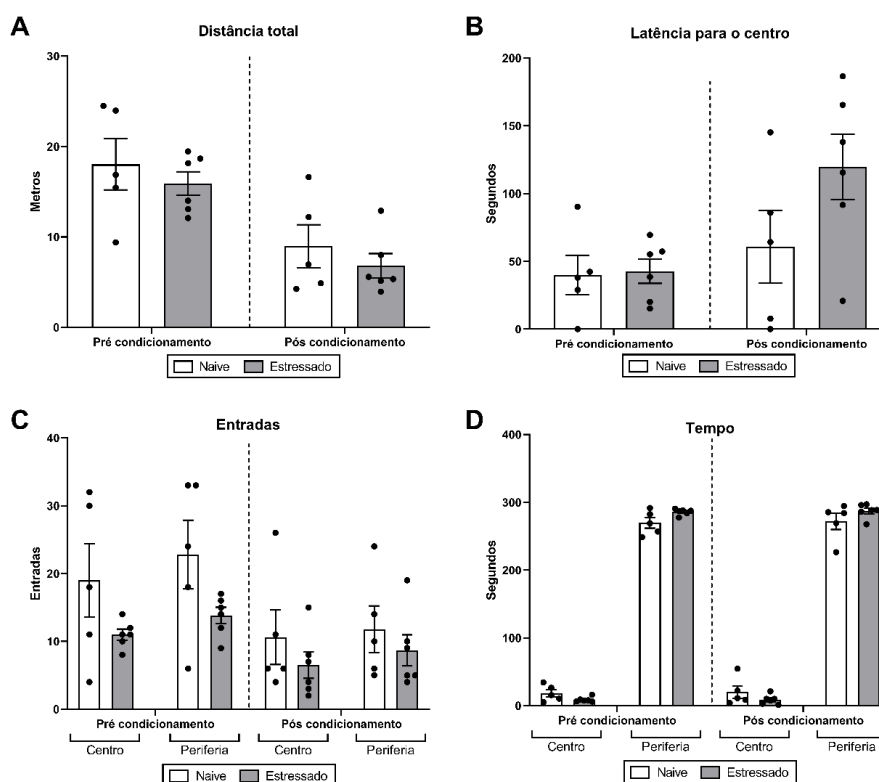


Figura 2: Efeito do estresse e do condicionamento ao medo na (A) distância percorrida, na (B) latência para o centro, no (C) número de entradas e (D) tempo nas zonas do teste de campo aberto. Os testes foram realizados no 7º e 8º dia após o fim do estresse. Foram utilizados 5 animais naives (1 animal foi retirado deste teste devido a um problema no software) e 6 estressados. $n=5-6/\text{grupo}$. Os dados são representados pela média $\pm$ EPM

Com estes resultados observamos uma diminuição da locomoção dos animais no segundo dia de experimento, evidenciado pela distância total percorrida e pelo número

de entradas em ambas as zonas. Este feito pode ter sido causado pelo condicionamento que os animais passaram, mas também por uma possível habituação dos animais ao aparato. Observamos um aumento da latência para primeira entrada no centro, embora não estatisticamente significativo, o que poderia sugerir um efeito ansiogênico induzido pelo condicionamento, independente do estresse prévio.

4.1.2. Startle

Para análise deste experimento (figura 3), foi realizada um teste de ANOVA de 2 vias, onde os fatores foram condição do animal e intensidade do estímulo. Observamos que houve diferença significativa entre as diferentes intensidades de estímulo ($F^{(3,68)}=47,50$; $p<0,0001$), porém não obtivemos diferença entre os grupos naïve e estressado ($F^{(1,68)}=0,567$; $p=0,453$), nem interação entre os fatores ($F^{(3,68)}=0,293$; $p=830$).

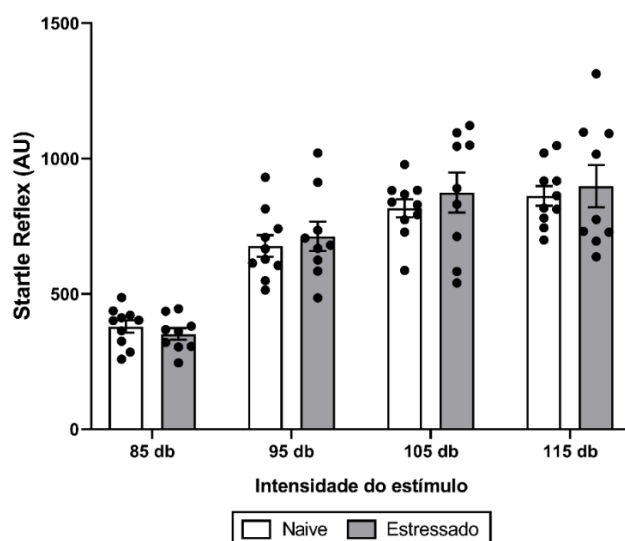


Figura 3: Efeito do estresse na resposta de Startle. O teste foi realizado 6 dias depois do fim do estresse. Foram utilizados 11 animais naïves e 9 estressados. $n=9-11$ /grupo. Os dados são representados pela média $\pm$ EPM.

4.1.3. Labirinto em Cruz Elevado

No teste do LCE, evidenciado na figura 4, foram registrados, por 5 minutos, o número de entradas e o tempo despendido nos braços abertos e fechados. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos experimentais em nenhum destes parâmetros (porcentagem de entradas (aberto): $T_{30}=1,654$, $p=0,108$; porcentagem de tempo (aberto): $T_{30}=0,956$, $p=0,346$; número de entradas (fechado): $T_{30}=0,420$, $p=0,677$, teste t de Student). Estes resultados indicam que o efeito

ansiolítico que esperávamos encontrar após o estresse de derrota social repetida não aconteceu logo após seu término.

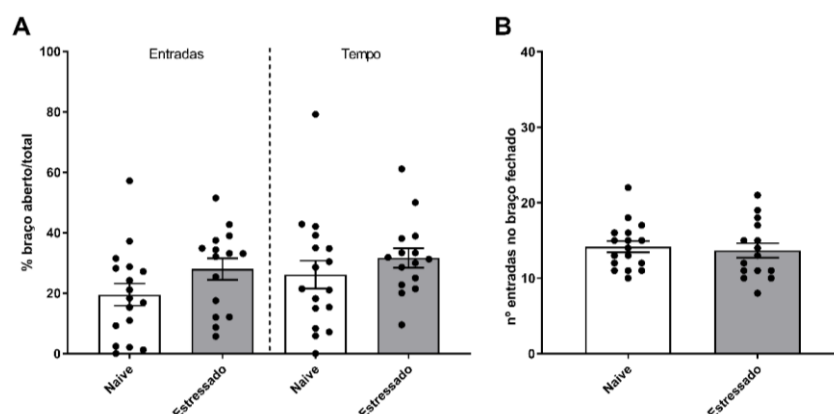


Figura 4: Efeito do estresse na (A) porcentagem de entradas e tempo no braço aberto e (B) número de entradas no braço fechado no labirinto em cruz elevado. O teste foi realizado no dia seguinte ao fim do estresse. Foram utilizados 17 animais no grupo naive e 15 no grupo estressado. $n=15-17/\text{grupo}$. Os dados são representados pela média $\pm$ EPM.

4.1.4. Medo Condicionado Contextual

Na sessão de condicionamento (figura 5) é possível observar o tempo de habituação, onde os animais ainda não tinham levado nenhum choque (ponto H), e em seguida os pontos 1, 2 e 3 representam o intervalo entre o primeiro e segundo choque, segundo e terceiro choque, e terceiro choque até o fim do experimento, respectivamente. Os grupos habituados foram expostos à caixa de condicionamento, porém sem o disparo dos choques nesta sessão.

Primeiramente avaliamos a sessão de condicionamento por meio de um teste ANOVA de medidas repetidas onde os fatores analisados foram condicionamento e estresse, e o tempo a medida repetida. Pudemos observar que houve efeito do tempo ($F(3, 112)=8,030$; $p<0,0001$), do condicionamento ($F(1, 112)=28,56$; $p<0,0001$) e interação entre estes fatores ($F(3, 112)=17,24$; $p<0,0001$), indicando que os animais condicionados apresentaram aumento do congelamento ao longo dos choques em relação aos habituados. Não observamos efeito do estresse ($F(1, 112)=0,764$; $p=0,383$).

Para a análise minuto a minuto da sessão de extinção, foi realizado um teste ANOVA de medidas repetidas, cujo fatores analisados foram o estresse e o condicionamento, tendo o tempo como medida repetida. Obtivemos diferença estatística em relação ao tempo ($F(19, 560)=2,816$; $p<0,0001$), ao condicionamento ($F(1, 560)=10,87$; $p<0,0001$) e à interação entre esses dois fatores ($F(19, 560)=1,882$; $p=0,013$), porém não observamos diferença no fator estresse ($F(1, 560)=0,279$; $p=0,597$). Desta

forma, podemos concluir que os animais apresentaram resposta de medo condicionado e a extinguiram, porém o estresse prévio não influenciou esta resposta.

Em relação à consolidação (últimos pontos da figura 5), comparamos o tempo total de congelamento durante a sessão por meio de um teste ANOVA de 2 vias. Os fatores analisados foram estresse e condicionamento. Pudemos observar, novamente, diferença estatística no fator condicionamento ($F^{(1, 28)}=8,016$; $p=0,008$), porém sem diferença em relação ao fator estresse ($F^{(1, 28)}=0,824$; $p=0,371$). Também não observamos interação entre os fatores ($F^{(1, 28)}=0,021$; $p=0,885$).

Como o déficit na consolidação da memória de extinção é representado por um aumento do freezing no último dia em relação ao freezing no final da sessão de aquisição da extinção, comparamos a porcentagem de tempo em congelamento no fim da sessão de extinção com a média da sessão de consolidação completa por teste t pareado para cada um dos tratamentos. Não observamos diferença estatística nos grupos naive-condicionado ($T_{(17)}=1,760$, $p=0,096$), naive-habitado ($T_{(2)}=1,207$, $p=0,350$) e estresse-habitado ($T_{(2)}=0,534$, $p=0,646$). Observamos diferença estatística no grupo estresse-condicionado ($T_{(15)}=3,497$, $p=0,003$), o que indicaria um déficit na consolidação da memória de extinção. Apesar disso, não consideramos que isso indica um efeito robusto do estresse, pois podemos observar que o grupo naive-condicionado apresenta tendência a esse aumento. Além disso, não conseguimos observar efeito do estresse em nenhum outro teste comportamental.

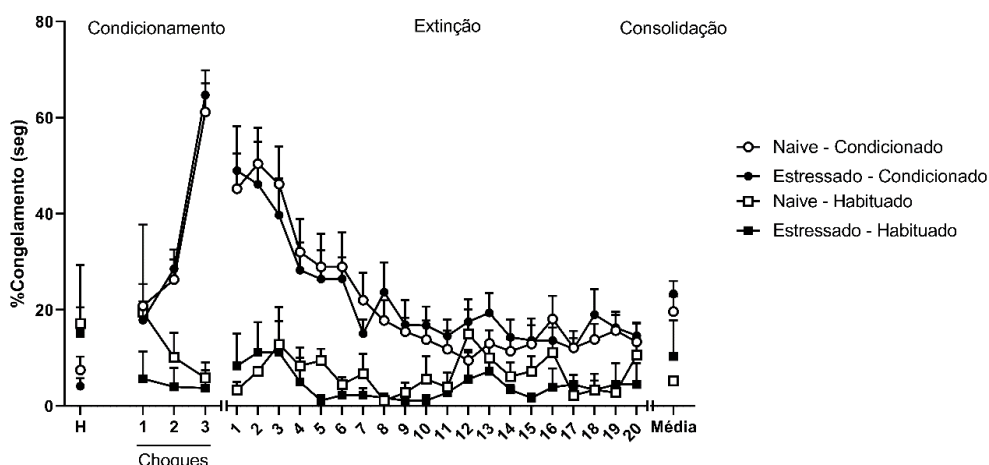


Figura 5: Efeito do estresse no experimento de medo condicionado contextual. A extinção foi feita 1 dia e sua consolidação 2 dias após o condicionamento. A consolidação foi feita 2 dias após o condicionamento (Média). Foram utilizados 14 animais no grupo naive condicionado e 12 no grupo estressado condicionado, 3 animais no grupo naive habitado e 3 animais no grupo estressado habitado. $n=3-14$ /grupo. Os dados são representados pela média +/- EPM.

4.2. Avaliação de uma medida patológica característica do EDSR

Como o estresse de derrota social repetida inicialmente não gerou as respostas comportamentais esperadas a longo prazo como havia sido demonstrado por nosso grupo (LISBOA et al., 2018), resolvemos reproduzir os experimentos originais, realizados pelos grupos dos professores Godbout e Sheridan em Ohio, onde eles realizam o teste de campo aberto e de esquiva social, além de avaliar o peso do baço dos animais. Os testes foram realizados na manhã seguinte do fim do protocolo de estresse (figura 6).

Com o experimento anterior, observamos que os animais estavam respondendo ao condicionamento, mas o estresse não estava gerando o comportamento esperado. Sendo assim, retiramos e pesamos os baços dos animais após o término da esquiva social, pois a literatura mostra que o estresse de derrota social repetida causa um aumento no tamanho e peso deste órgão devido a um acúmulo de células mieloides (MCKIM et al., 2018). Assim, conseguiríamos observar se o estresse está causando efeito patológico, apesar de não gerar comportamento anormal. Neste experimento, não realizamos o MCC.



Figura 6: Linha do tempo do experimento “Avaliação de uma medida patológica característica do EDSR”.
(EDSR: Estresse de Derrota Social Repetida; TCA: Teste de Campo Aberto; ESQ: Esquiva Social)

4.2.1. Teste de Campo Aberto

Quando analisamos a distância total percorrida na arena (figura 7A), pudemos observar uma diminuição da locomoção nos animais estressados ($T_{10}=2,628$, $p=0,025$, teste t Student). Este efeito também foi observado quando analisamos as áreas centrais e periféricas separadamente (centro: $T_{10}=3,262$, $p=0,008$; periferia: $T_{10}=2,314$, $p=0,043$, teste t Student) (figura 7B). A diferença também foi observada quando analisamos o número de entradas nas diferentes áreas (centro: $T_{10}=4,968$, $p=0,0006$; periferia: $T_{10}=5,347$, $p=0,0003$, teste t Student) (figura 7C).

Em relação ao tempo nas diferentes áreas (centro: $T_{10}=0,5987$, $p=0,562$; periferia: $T_{10}=0,5987$, $p=0,562$, teste t Student) e à latência para a primeira entrada na área central ($T_{10}=0,3305$, $p=0,747$, teste t de Student), não observamos diferenças entre os grupos (figuras 7D e 7E, respectivamente).

Estes resultados podem estar relacionados a uma resposta ansiogênica decorrente do estresse de derrota social repetida, causando uma diminuição na locomoção dos animais durante o teste.

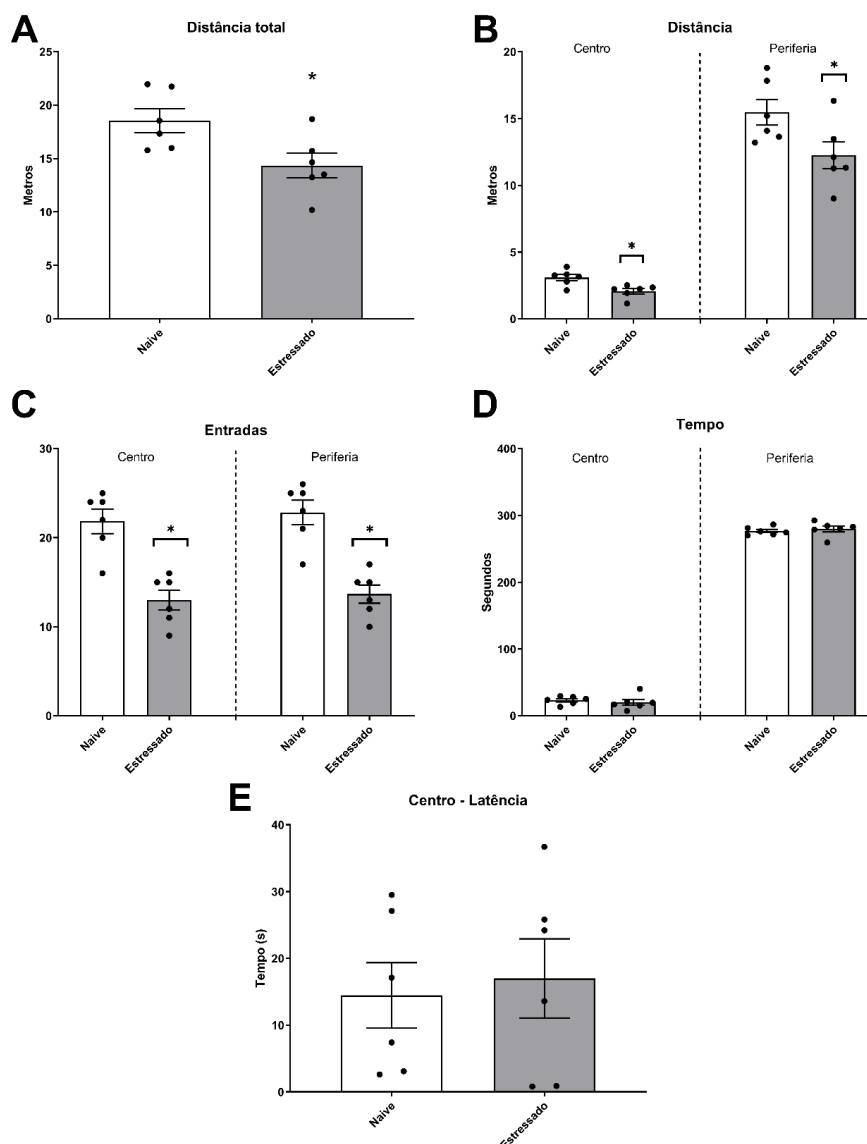


Figura 7: Efeito do estresse na (A) distância total percorrida, na (E) latência para o centro, na (B) distância percorrida, (C) número de entradas e (D) tempo nas zonas do teste de campo aberto. O teste foi realizado no dia seguinte ao fim do estresse. Foram utilizados 6 animais em cada grupo. $n=6/\text{grupo}$. Os dados são representados pela média $\pm$ EPM.

4.2.2. Esquiva Social

Para analisarmos o experimento de esquiva social primeiramente calculamos a diferença dos valores após a exposição ao animal agressor pelo valor basal (pré exposição) para cada um dos parâmetros. Pudemos observar diferença significativa entre os grupos na distância percorrida ($T_{10}=2,639$, $p=0,024$, teste t Student) (figura

8A) e no número de entradas na zona próxima ao animal agressor ($T_{10}=2,692$, $p=0,022$, teste t Student) (figura 8D), porém ao contrário do que esperávamos os animais estressados entraram mais nesta zona do aparato. Nenhuma diferença estatística foi observada nos outros parâmetros analisados (latência para primeira entrada na zona próxima: $T_{10}=1,160$, $p=0,273$ / número de entradas: corner 1: $T_{10}=0,176$, $p=0,863$; corner 2: $T_{10}=0,703$, $p=0,498$ / tempo: zona próxima: $T_{10}=1,200$, $p=0,258$; corner 1: $T_{10}=2,054$, $p=0,067$; corner 2: $T_{10}=0,167$, $p=0,870$ / distância percorrida: zona próxima: $T_{10}=0,679$, $p=0,512$; corner 1: $T_{10}=1,194$, $p=0,260$; corner 2: $T_{10}=0,982$, $p=0,349$, testes t Student) (figuras 8B, 8C, 8D e 8E).

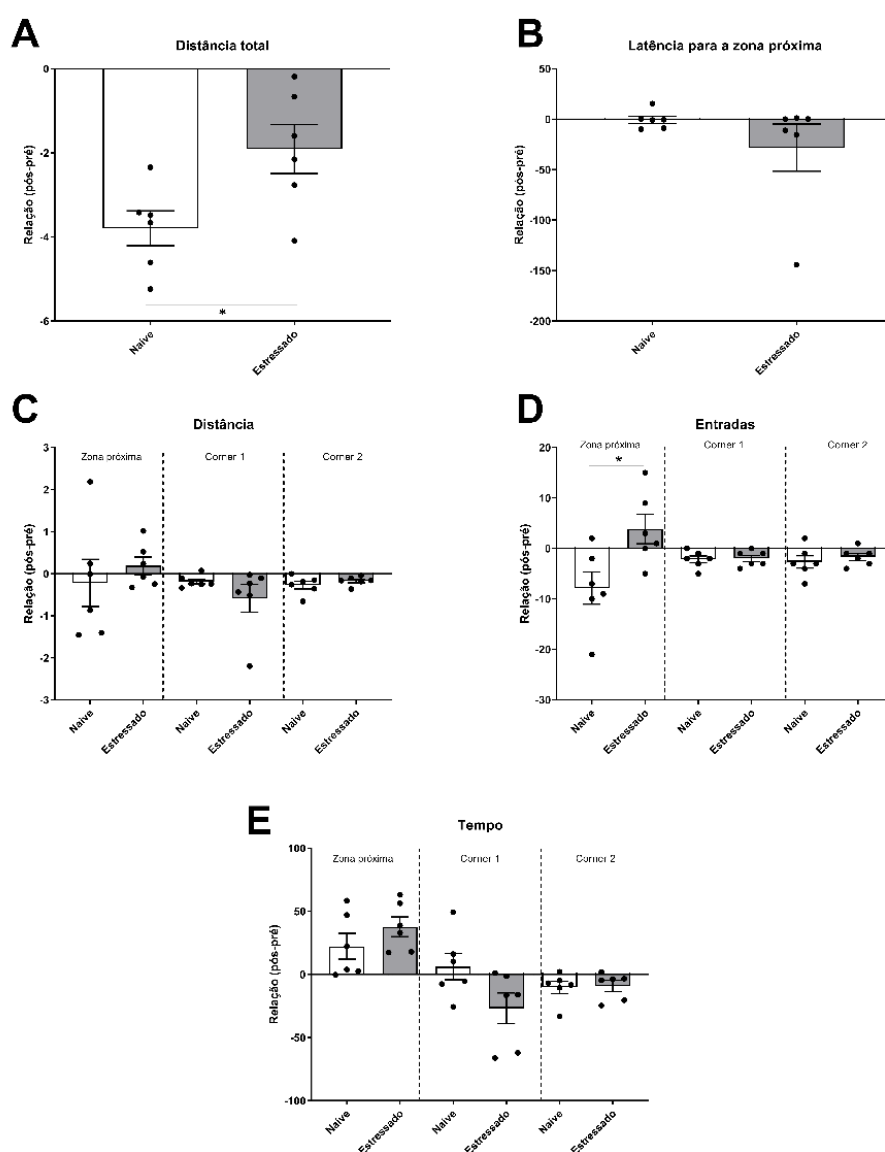


Figura 8: Efeito do estresse na (A) distância total percorrida, na (B) latência para a zona próxima, na (C) distância percorrida, (D) número de entradas e (E) tempo nas zonas no teste esquiwa social. O teste foi realizado no dia seguinte ao fim do estresse. Foram utilizados 6 animais em cada grupo. $n=6/\text{grupo}$. Os dados são representados pela média $\pm$ EPM.

4.2.3. Peso do Baço

Ao final do protocolo experimental os baços foram retirados e pesados em balança de precisão. O resultado foi normalizado pelo peso do animal (figura 9). Conseguimos observar um resultado coerente com o apresentado na literatura, onde os baços dos animais estressados eram significativamente mais pesados do que os dos animais naïve ($T_{10}=3,379$, $p=0,007$, teste t Student), indicando que o estresse causou efeitos fisiológicos, apesar de não promover as alterações comportamentais robustas esperadas.

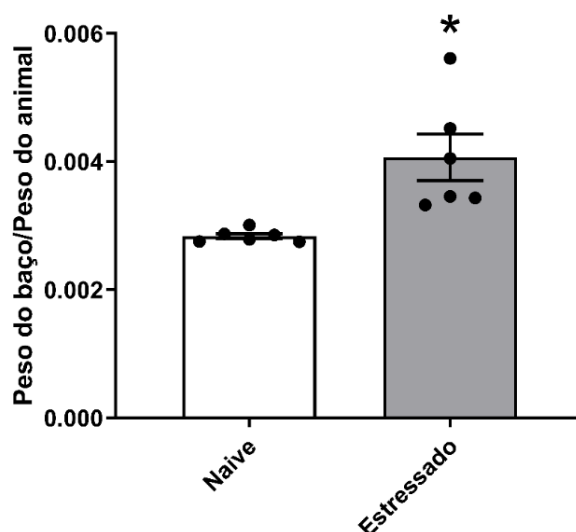


Figura 9: Efeito do estresse no peso do baço, corrigido pelo peso do animal. Foram utilizados 6 animais em cada grupo. $n=6/\text{grupo}$. Os dados são representados por média $\pm$ EPM.

4.3. Padronização do EDSR e caracterização do efeito do tratamento agudo com AA-5HT na extinção do MCC em animais expostos ao EDSR

Visto que não conseguimos detectar efeitos claros e consistentes da exposição ao estresse, aventamos a possibilidade de diferenças basais interindividuais dos animais atrapalharem a detecção de possíveis efeitos do estresse. Com o intuito de deixar os grupos mais homogêneos em relação à ansiedade basal, antes da realização do nosso próximo protocolo de estresse, realizamos um teste de campo aberto e randomizamos os animais conforme a distância total percorrida nos 5 minutos de teste. Além disso, adicionamos o splash test com o intuito de avaliarmos o possível comportamento anedônico decorrente do estresse. Este comportamento seria evidenciado por uma diminuição do tempo em grooming durante a sessão de experimento, refletindo diminuição no comportamento de autolimpeza, comum aos roedores.

Além disso, decidimos já realizar o primeiro teste da droga AA-5HT nesta tentativa de padronização do estresse. A administração foi feita 30 minutos antes da primeira re-exposição dos animais à caixa de condicionamento (extinção do medo condicionado), para avaliarmos a possível redução do tempo de freezing nestes animais. Concomitantemente a isso, a partir deste momento utilizamos o sistema de condicionamento da Ugo Basile, que nos trouxe algumas vantagens, como por exemplo, isolamento acústico e quantificação do freezing automatizada e com maior precisão, devido à redução de diferença na mensuração entre diferentes experimentadores. A sequência dos testes realizados pode ser observada na figura 10.



Figura 10: Linha do tempo do experimento “Padronização do EDSR e caracterização do efeito do tratamento agudo com AA-5HT na extinção do MCC em animais expostos ao EDSR”. (EDSR: Estresse de Derrota Social Repetida; LCE: Labirinto em Cruz Elevado; TCA: Teste de Campo Aberto; SPL: *Splash Test*; MCC: Medo Condicionado Contextual)

4.3.1. Teste de Campo Aberto

Não houve diferença entre os animais das diferentes caixas na medida basal na arena ($F^{(11,23)}=1,797$, $p=0,113$, ANOVA de 2 vias) (Figura 11).

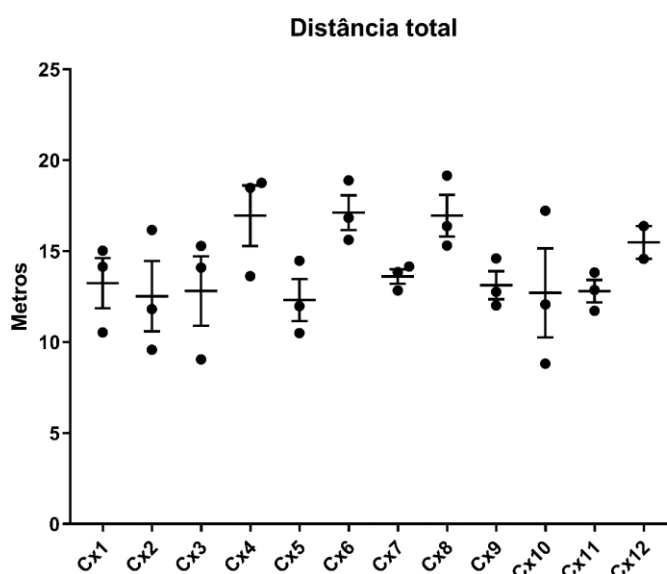


Figura 11: Distância total percorrida pelos animais separados em 3 por caixa no teste de campo aberto. O teste foi realizado 1 dia antes do início do protocolo de estresse para randomização dos grupos.

Para compararmos a distância total percorrida nos dois dias de experimento, realizamos um teste ANOVA de 2 vias com condição do animal e dia do experimento como fatores. Observamos uma redução da distância total percorrida pelos animais no segundo experimento ($F^{(1,33)}=94,52$; $p<0,0001$), provavelmente por uma habituação ao aparato. Ao contrário do experimento anterior, não observamos diferença entre os grupos ($F^{(1,33)}=0,635$; $p=0,431$), nem interação entre os fatores analisados ($F^{(1,33)}=2,897$; $p=0,098$) (figura 12A).

Também não observamos diferenças entre os grupos em relação à distância (figura 12B), número de entradas (figura 12C) e tempo no centro e na periferia (figura 12D) (periferia: distância: $T_{33}=1,416$, $p=0,166$; entradas: $T_{33}=1,578$, $p=0,124$; tempo: $T_{33}=0,030$, $p=0,975$, testes t Student), (centro: distância: $T_{33}=1,977$, $p=0,056$; entradas: $T_{33}=1,328$, $p=0,193$; tempo: $T_{33}=0,702$, $p=0,487$ testes t Student).

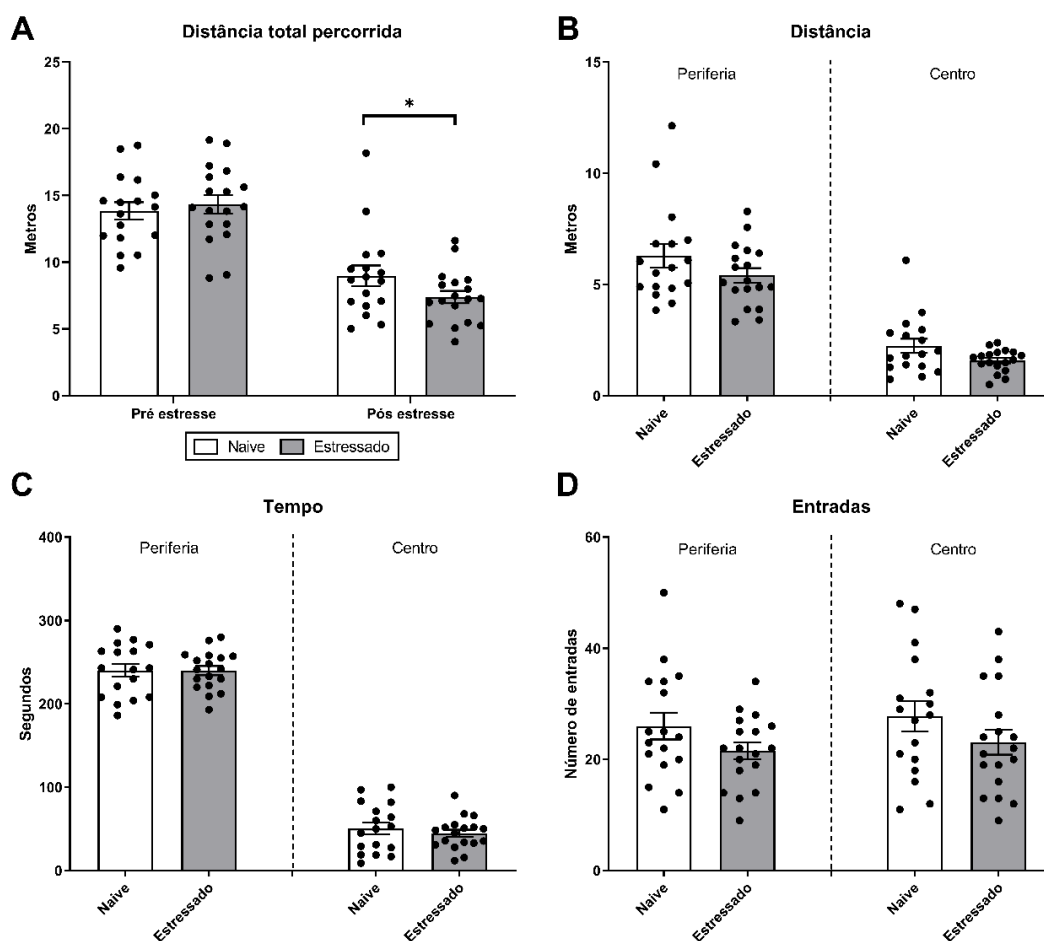


Figura 12: Efeito do estresse na (A) distância total percorrida, na (B) distância percorrida, (C) tempo e (D) número de entradas nas zonas no teste de campo aberto. O teste foi realizado no dia seguinte ao fim do estresse. Foram utilizados 17 animais naïves e 18 estressados. $n=17-18/\text{grupo}$. Os dados são representados pela média $\pm$ EPM. * indica diferença estatística em relação às medidas basais.

4.3.2. *Splash Test*

No *Splash test*, uma solução de sacarose 10% foi borrifada no dorso do animal e avaliamos o comportamento de autolimpeza e anedonia através da análise do tempo total em grooming e latência para o primeiro episódio de grooming nos seguintes 6 minutos. Para a análise, normalizamos os valores do teste (após o estresse) pelos valores basais (pré estresse) (figura 13). Não encontramos diferenças entre os grupos nem no tempo total que os animais ficaram em grooming ($T_{32}=0,881$, $p=0,384$ teste t Student), nem na latência para o primeiro grooming ($T_{32}=0,572$, $p=0,570$, teste t Student).

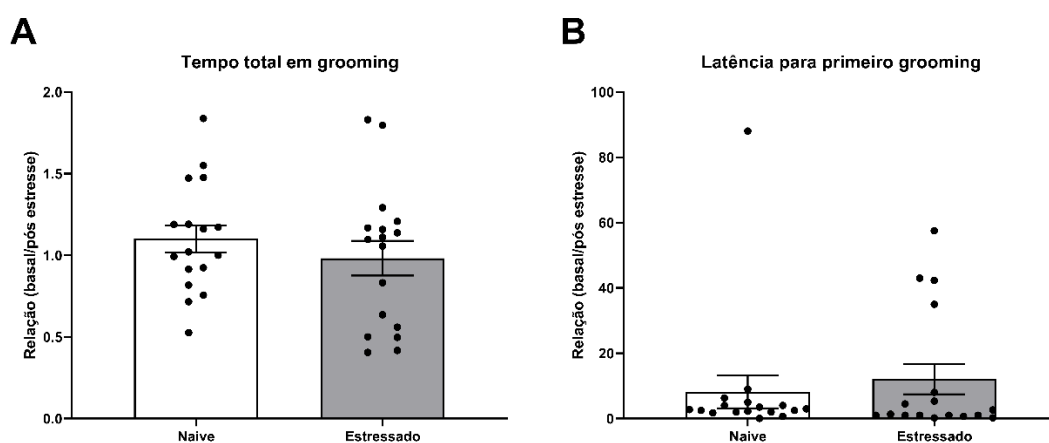


Figura 13: Efeito do estresse (A) no tempo total e (B) na latência para primeiro grooming no *Splash Test*. As medidas basais foram realizadas 1 dia antes do início do protocolo de estresse e o teste 6 dias após o fim do estresse. Foram utilizados 17 animais naïves e 18 estressados. $n=17-18/\text{grupo}$. Os dados são representados pela média $\pm$ EPM.

4.3.3. *Labirinto em Cruz Elevado*

Novamente não obtivemos a resposta ansiogênica decorrente do estresse esperada no teste de labirinto em cruz elevado (figura 14). Os grupos naïve e estressado não apresentaram diferença entre si em relação à porcentagem de entradas e tempo nos braços aberto (entradas: $T_{33}=0,482$, $p=0,632$; tempo: $T_{33}=0,355$, $p=0,724$, teste t Student), nem em relação ao número de entradas nos braços fechados ($T_{33}=0,741$, $p=0,463$, teste t Student).

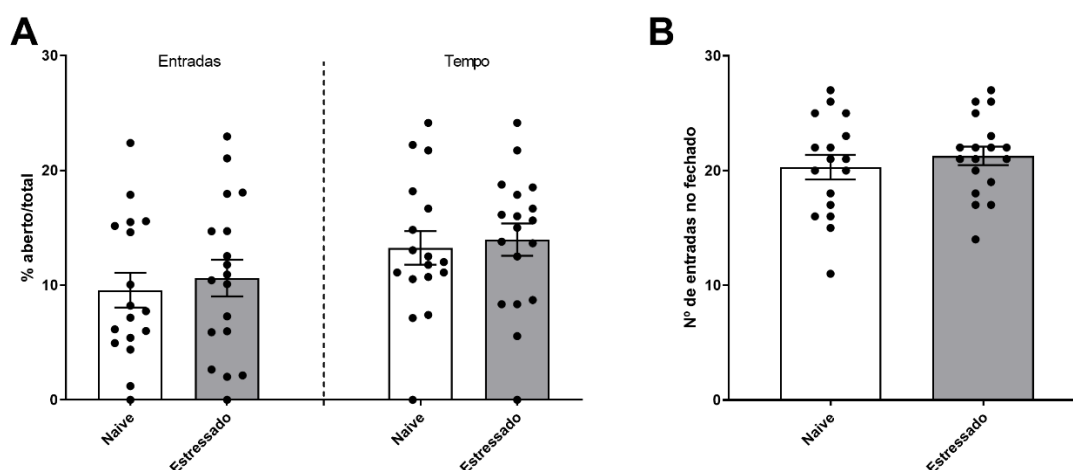


Figura 14: Efeito do estresse na (A) porcentagem de entradas e tempo no braço aberto e (B) número de entradas no braço fechado no labirinto em cruz elevado. O teste foi realizado 6 dias após o fim do estresse. Foram utilizados 17 animais naíves e 18 estressados. $n=17-18/\text{grupo}$. Os dados são representados pela média $\pm$ EPM.

4.3.4. Medo Condicionado Contextual

Quanto à extinção do medo condicionado, dividimos os dados do experimento nas figuras 15, 16 e 17 para melhor visualização e entendimento. Na figura 15 apenas demonstramos o efeito do estresse e do condicionamento nos animais que receberam veículo, enquanto nas figuras 16 e 17 apresentamos o efeito da droga AA-5HT, administrada 30 minutos antes da sessão de extinção.

Primeiramente realizamos um teste ANOVA de medidas repetidas para a sessão de condicionamento (figura 15C), onde os fatores analisados foram estresse e condicionamento e o tempo foi a medida repetida. Conseguimos observar efeito do tempo ($F^{(3,40)}=15,64$, $p<0,0001$) e do condicionamento ($F^{(1,40)}=29,63$, $p<0,0001$) e interação entre esses fatores ($F^{(3,40)}=10,36$, $p<0,0001$), mas não observamos efeito do estresse ($F^{(1,40)}=2,744$, $p=0,105$). Para análise do tempo total de congelamento na sessão de aquisição da extinção, realizamos um teste ANOVA de 2 vias, sendo o condicionamento e o estresse os dois fatores analisados. Observamos que os animais condicionados ficaram significativamente mais tempo em freezing do que os animais habituados durante a sessão de extinção ($F^{(1,10)}=23,58$, $p=0,0007$), porém sem efeito do estresse ($F^{(1,10)}=2,611$, $p=0,137$), como mostra a figura 15A. No dia seguinte, quando avaliamos a consolidação da aprendizagem de extinção, observamos o mesmo padrão (condicionamento: $F^{(1,10)}=22,57$, $p=0,0008$; estresse: $F^{(1,10)}=0,118$, $p=0,738$), evidenciado na figura 15B. Na análise minuto a minuto da sessão de extinção (figura 15C) observamos efeito do tempo ($F^{(19,190)}=2,894$; $p=0,0001$, ANOVA

de medidas repetidas) e do condicionamento ($F^{(1,10)}=23,58$; $p=0,0007$), porém não houve efeito do estresse ($F^{(1,10)}=2,611$; $p=0,137$). Estes dados sugerem que os animais adquirem a memória a aversiva e passam pelo processo de extinção, entretanto o estresse não foi capaz de alterar esta resposta.

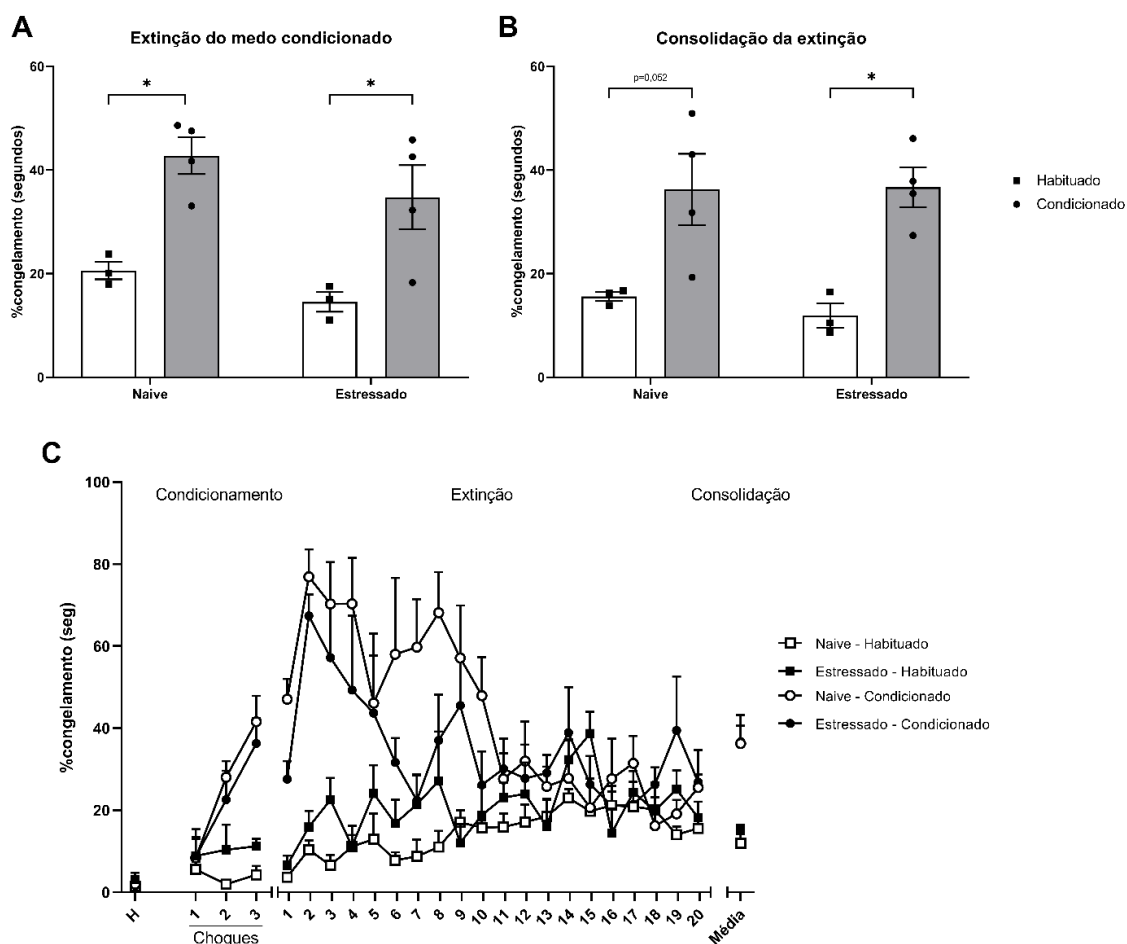


Figura 15: Efeito do condicionamento e do estresse no tempo total em congelamento na (A) na sessão de extinção e (B) na sessão de consolidação, (C) e na sessão de extinção, minuto a minuto. O condicionamento foi realizado 7 dias depois do fim do estresse de derrota social repetida. A extinção foi feita 1 dia e sua consolidação 2 dias após o condicionamento. Foram utilizados 3 animais naive-habituados, 3 estressado-habituados, 4 naive-condicionados e 4 estressado-condicionado. Os dados são representados pela média $\pm$ EPM. $n=3-4$ /grupo. * indica diferença estatística entre os grupos habituado e condicionado.

Devido à ineficácia do procedimento de estresse demonstrada, quando investigamos o efeito da droga AA-5HT avaliamos separadamente os animais naives e estressados. Os resultados estão demonstrados nas figuras 16 (aquisição da extinção) e 17 (consolidação). Para a análise minuto a minuto, realizamos testes ANOVA de medidas repetidas, com tratamento como variável independente e o tempo como medida repetida (os grupos habituados não entraram nesta análise).

Em relação aos animais naives, na aquisição da extinção (figura 16A) obtivemos efeito do tempo ($F^{(4.932,118.4)}=17,83$, $p<0,0001$), porém não houve diferença entre os grupos analisados ($F^{(3,24)}=1,562$, $p=0,224$). Ainda, observamos interação entre os fatores na sessão de extinção ($F^{(57,456)}=3,595$; $p<0,0001$). A análise de comparações múltiplas indicou uma redução do freezing dos animais tratados nas doses de 0,1 mg/Kg e 1,0 mg/Kg em relação aos tratados com veículo (AA-5HT 0,1 mg/Kg: $p=0,025$; AA-5HT 1,0 mg/Kg: $p=0,002$, pós teste de Tukey).

Em relação aos animais estressados na sessão de extinção (Figura 16B) também houve efeito do tempo ($F^{(6.204,161.3)}=18,53$, $p<0,0001$), mas não houve diferença no tratamento ($F^{(3,26)}=1,330$; $p=0,286$), nem interação entre os fatores ($F^{(57,494)}=1,315$, $p=0,069$).

Na sessão de consolidação (últimos pontos dos gráficos 16A e 16B) comparamos o tempo total em que os animais ficaram em congelamento. Foi realizada ANOVA de 1 via, com os animais naives e estressados separadamente (os grupos habituados não entraram nesta análise). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas (naives: $F^{(3,10)}=0,581$; $p=0,640$; estressados: ($F^{(3,11)}=3,232$; $p=0,064$).

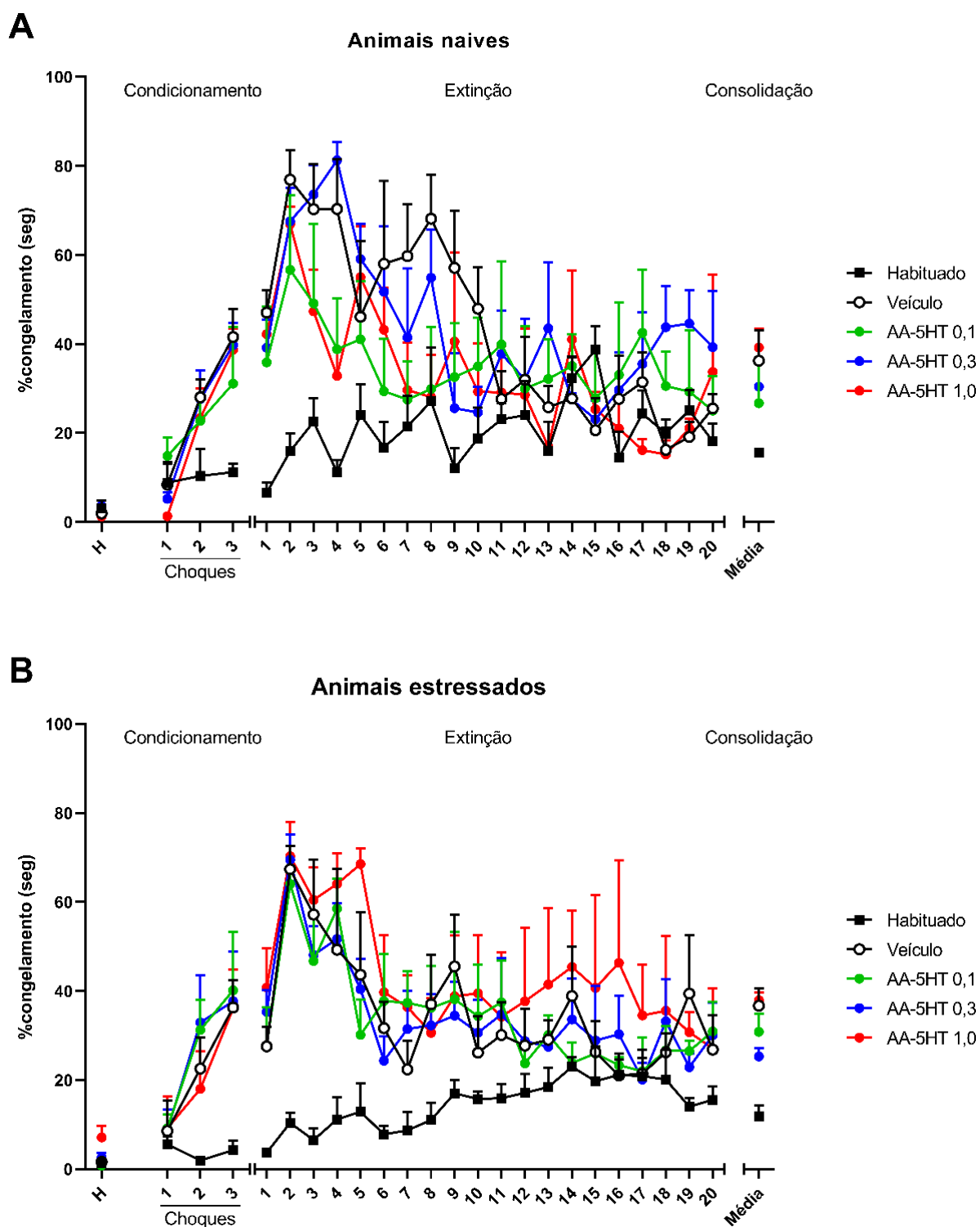


Figura 16: Efeito da droga AA-5HT no experimento de medo condicionado contextual (A) em animais naives e (B) em animais estressados. A extinção foi feita 1 dia e sua consolidação 2 dias após o condicionamento. Para os grupos naives foram utilizados 3, 4, 3, 4 e 3 animais para habituado, veículo, AA-5HT 0,1, 0,3, 1,0 e 3,0 mg/Kg, respectivamente. Para os grupos estressados foram utilizados 3, 4, 4, 4 e 3 animais para habituado, veículo, AA-5HT 0,1, 0,3, 1,0 e 3,0 mg/Kg, respectivamente. $n=3-4/\text{grupo}$. Os dados são representados pela média $\pm$ EPM. * indica diferença estatística no grupo veículo

Por fim, comparamos a porcentagem de tempo em congelamento no fim da sessão de extinção com a média da sessão de consolidação completa por teste t pareado para cada um dos tratamentos (figura 17), porém não observamos diferença estatística em nenhum grupo neste experimento (naives: veh: $T_{(3)}=1,727$, $p=0,182$; AA-5HT 0,1 mg/Kg: $T_{(2)}=0,357$, $p=0,754$; AA-5HT 0,3 mg/Kg: $T_{(3)}=0,842$, $p=0,461$; AA-5HT 1,0: $T_{(3)}=0,311$, $p=0,784$; estressados: veh: $T_{(3)}=1,848$, $p=0,161$; AA-5HT 0,1 mg/Kg: $T_{(3)}=0,008$, $p=0,993$; AA-5HT 0,3 mg/Kg: $T_{(3)}=0,761$, $p=0,502$; AA-5HT 1,0: $T_{(2)}=0,918$, $p=0,455$). Entretanto, com o n insuficiente por grupo, o experimento foi repetido apenas com animais não estressados.

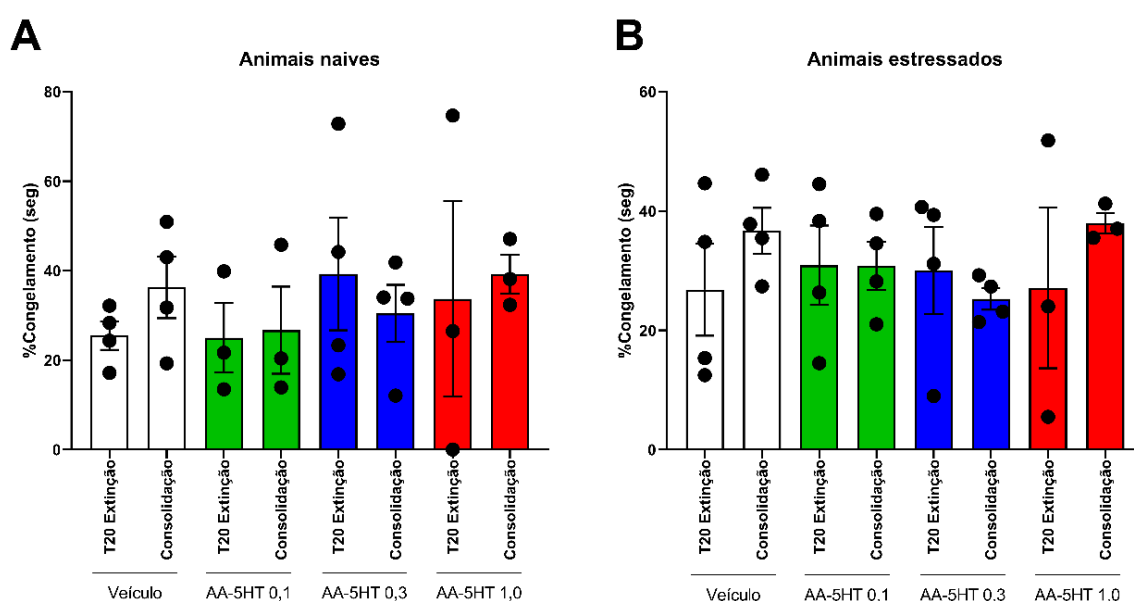


Figura 17: Efeito da droga AA-5HT na consolidação da memória de extinção do medo condicionado. Os dados apresentados mostram a porcentagem de congelamento no último minuto da sessão de extinção e média da sessão de consolidação (A) em animais naives e (B) em animais estressados. Para os grupos naives foram utilizados 3, 4, 3, 4 e 3 animais para habituado, veículo, AA-5HT 0,1, 0,3, 1,0 e 3,0 mg/Kg, respectivamente. Para os grupos estressados foram utilizados 3, 4, 4, 4 e 3 animais para habituado, veículo, AA-5HT 0,1, 0,3, 1,0 e 3,0 mg/Kg, respectivamente. $n=3-4$ /grupo. Os dados são representados pela média $\pm$ EPM.

4.4. Caracterização do efeito do tratamento agudo com AA-5HT na extinção do MCC em animais não estressados

Diante de várias tentativas frustradas de obtermos efeitos comportamentais decorrentes do estresse e efeitos promissores observados nos animais naives com a AA-5HT, optamos por continuar a avaliar o efeito da droga administrada antes da sessão de extinção do medo condicionado apenas em animais não estressados (figura 18). Para a análise, unimos os dados dos animais não estressados obtidos no experimento anterior (experimento 3) com os novos dados obtidos.

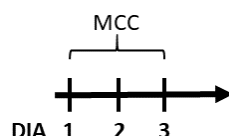


Figura 18: Linhas do tempo do experimento “Caracterização do efeito do tratamento agudo com AA-5HT na extinção do MCC em animais não estressados”. (MCC: Medo Condicionado Contextual)

4.4.1. Medo Condicionado Contextual

Conseguimos observar que os grupos experimentais adquiriram a resposta de condicionamento de forma igual (Figura 19, Choques) devido ao efeito do tempo no teste ANOVA de medidas repetidas ($F^{(1.966, 165.2)}=248,8$; $p<0,0001$), mas sem diferença entre os grupo ($F^{(4, 84)}=0,400$; $p=0,807$).

Para a sessão de extinção do medo condicionado realizamos um teste ANOVA de medidas repetidas, sendo tratamento o fator analisado e tempo a medida repetida. Observamos que o houve efeito significativo do tempo ($F^{(7.389, 620.7)}=56,48$; $p<0,0001$), porém não observamos efeito do tratamento ($F^{(4, 84)}=0,747$; $p=0,562$), indicando que de forma geral o processo de extinção do medo aconteceu de forma similar entre todos os grupos, ao contrário dos dados preliminares. Em relação à sessão de consolidação da extinção, no último dia, realizamos um teste ANOVA de 1 via, e novamente não conseguimos observar efeito do tratamento ($F^{(4, 63)}=1,310$; $p=0,276$).

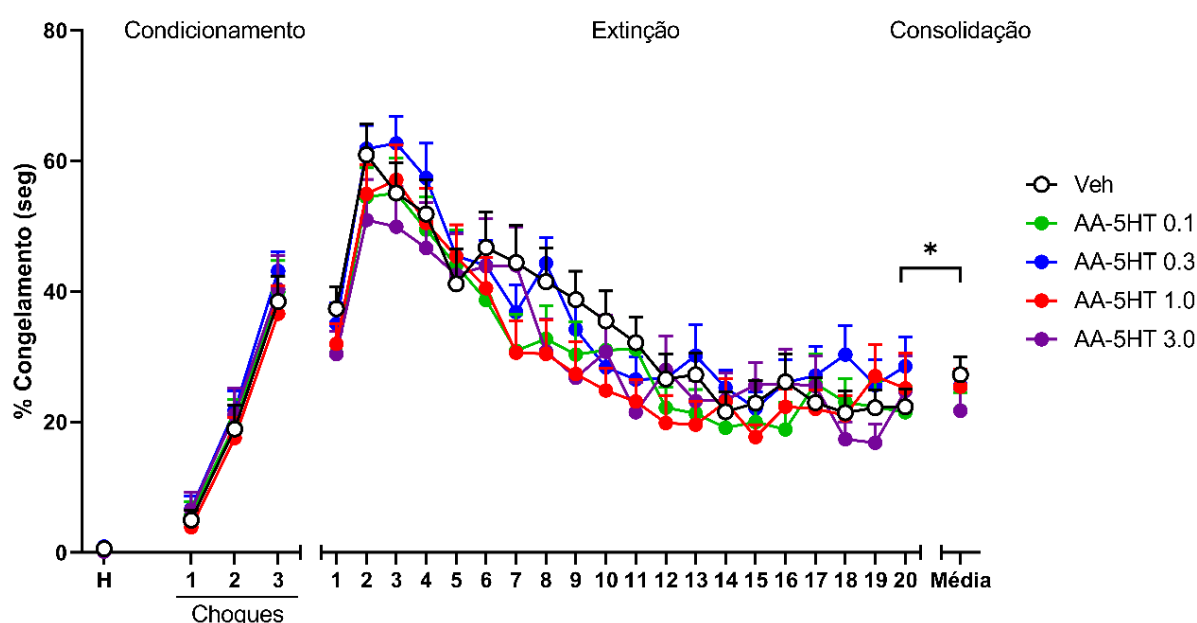


Figura 19: Efeito da droga AA-5HT no experimento de medo condicionado contextual. A extinção foi feita 1 dia e sua consolidação 2 dias após o condicionamento. Foram utilizados 20, 18, 20, 19 e 14 animais para os grupos veículo, AA-5HT 0,1, 0,3, 1,0 e 3,0 mg/Kg, respectivamente. $n=14-20$ /grupo. Os dados são representados pela média $\pm$ EPM. * indica diferença estatística no grupo veículo

Como descrito anteriormente, para avaliar o déficit na consolidação da memória de extinção comparamos a porcentagem de tempo em congelamento no fim da sessão de extinção (tempo 20 min, T20) com a média da sessão de consolidação completa por teste t pareado para cada um dos tratamentos (figura 20). Observamos, primeiramente, que para o grupo tratado com veículo houve diferença estatística para aumento da porcentagem de tempo em congelamento na sessão de consolidação ($T_{(19)}=2,285$; $P=0,034$) em relação ao T20, indicando que neste grupo, de forma geral, os animais parecem não ter consolidado o aprendizado de extinção do medo. Nos grupos tratados não observamos este aumento (AA-5HT 0,1: $T_{(17)}=0,069$, $p=0,840$; AA-5HT 0,3: $T_{(18)}=0,699$, $p=0,493$; AA-5HT 1,0: $T_{(18)}=0,620$, $p=0,543$; AA-5HT 3,0: $T_{(13)}=0,129$, $p=0,898$), indicando que a droga pode ter facilitado o processo de consolidação do aprendizado de extinção do medo condicionado

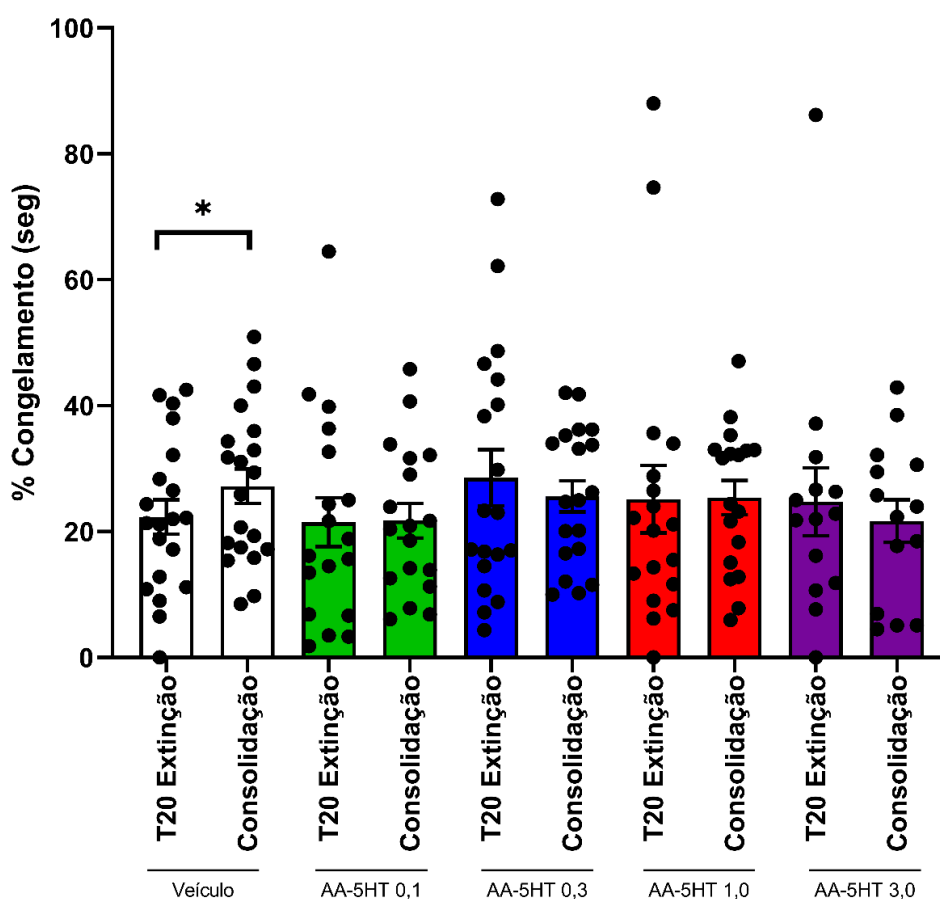


Figura 20: Efeito da droga AA-5HT na consolidação da memória de extinção do medo condicionado. Os dados apresentados mostram a porcentagem de congelamento no último minuto da sessão de extinção e média da sessão de consolidação. Foram utilizados 20, 18, 20, 19 e 14 animais para os grupos veículo, AA-5HT 0,1, 0,3, 1,0 e 3,0 mg/Kg, respectivamente. $n=14-20$ /grupo. Os dados são representados pela média $\pm$ EPM. * indica diferença estatística no grupo veículo

5. DISCUSSÃO

Diante de todos os resultados apresentados, podemos notar claramente que o estresse de derrota social repetida não reproduziu os efeitos comportamentais robustos já descritos na literatura na linhagem de animais que está sendo utilizada (camundongos C57BL/6), entre eles efeito ansiogênico e déficit de extinção do medo condicionado contextual (LISBOA et al., 2018). Apesar disso, os animais, tanto estressados quanto não estressados, apresentaram resposta de medo condicionado contextual, extinguindo essa memória e consolidando a nova aprendizagem, indicando que a resposta de medo condicionado é observada independente da condição prévia do animal. Um ponto importante a ser considerado, entretanto, é que o nível de congelamento dos animais não-estressados (naïves) foi bastante elevado, comparável à resposta dos animais estressados no trabalho anteriormente publicado pelo grupo utilizando este modelo (LISBOA et al., 2018), o que pode indicar alguma alteração nos animais naïves, dificultando a detecção de alterações comportamentais decorrentes da exposição ao estresse.

Uma possibilidade para a ausência de efeito do estresse que aventamos poderia envolver as consequências a longo-prazo dos problemas enfrentados no ano de 2018 com a qualidade nutricional inferior da ração comprada e fornecida aos animais no Biotério Central da Universidade de São Paulo, campus de Ribeirão Preto. Infelizmente o problema só foi detectado depois de alguns meses, com os animais apresentando sinais de subnutrição. Isto pode ter facilitado o aparecimento de mutações ou alterações epigenéticas, que poderiam ser passadas para as gerações futuras, comprometendo a qualidade da pesquisa realizada com estes animais. Apesar do fornecimento ter sido interrompido por algum tempo, análises específicas relevantes para nosso campo de pesquisa, particularmente no encéfalo, não foram realizadas para verificar se os animais não apresentavam alterações em relação à antes do ocorrido. Desta forma, embora de forma geral as gerações seguintes tenham se recuperado e não apresentado grandes alterações, é possível que tenha havido alguma alteração que conferiu resiliência ao efeito comportamental do estresse, ou que os tornou mais estressados naturalmente, dificultando detecção de efeito comportamental do estresse (considerando o padrão anormal de comportamento esperado para os animais naïves). Outros projetos do nosso grupo de pesquisa que utilizam esta mesma linhagem também tiveram este mesmo problema de ausência de responsividade a outros estressores, o que dá força a esta hipótese.

Entretanto, mesmo não tendo observado todas as alterações comportamentais esperadas, e em alguns casos, como na esquiva social até o efeito oposto, pudemos observar hipolocomoção induzida pelo estresse na manhã seguinte ao seu término. Além disso, observamos esplenomegalia nos animais. Este efeito é bem caracterizado após a exposição ao RSD, sendo, portanto, indicativo de que o protocolo de estresse funcionou (AVITSUR et al., 2003; KINSEY et al., 2007; MCKIM et al., 2018; READER et al., 2015). Entretanto, não foi observada a esquiva social, como relatado na literatura neste protocolo (RAMIREZ et al., 2015). Assim, apesar das alterações observadas, o aumento de respostas de medo e ansiedade não foi observado. O motivo para esta divergência não é possível determinar. Nos outros experimentos com a avaliação do MCC, a esplenomegalia não pôde ser avaliada logo após o estresse, logo não podemos afirmar que esta alteração tenha sido induzida nestes animais.

Apesar de todos os problemas observados, pudemos notar nos nossos últimos experimentos que em animais não estressados, a droga AA-5HT parece ter um efeito facilitador do processo de consolidação da memória de extinção do medo condicionado. O déficit de consolidação dessa memória é evidenciado pelo aumento da porcentagem de tempo em congelamento na sessão de consolidação quando comparado ao término da sessão de aquisição da memória de extinção. Observamos que este aumento aconteceu apenas nos animais que receberam veículo, mas não nos animais que receberam a droga (figura 16A). Resultados prévios da literatura já mostraram que a administração de AA-5HT em camundongos antes da re-exposição à caixa de condicionamento atenua o comportamento de congelamento frente ao contexto previamente pareado com choques nas patas (GOBIRA et al., 2017). Entretanto, até o momento não existiam relatos de que a administração desta droga com mecanismo dual também poderia facilitar o processo de extinção e sua consolidação, o que é de extrema relevância para o PTSD. Dessa forma, nosso trabalho é o primeiro a demonstrar que o bloqueio concomitante da enzima FAAH e dos receptores TRPV1 é capaz de facilitar a consolidação da extinção.

Estes mecanismos envolvendo FAAH e TRPV1 parecem ser importantes para este processo. Alterações genéticas na FAAH ou sua inibição indicam que esta enzima está envolvida nos processos de extinção em indivíduos saudáveis. Foi observado em um estudo em humanos e camundongos de Dincheva et al., 2015, que na presença de uma variação genética da enzima FAAH, que faz com que ela seja degradada mais facilmente, aumentando os níveis basais de anandamida, foi

observado aumento da conectividade entre córtex pré-frontal ventromedial e amígdala, o que poderia ser responsável por facilitar o processo de extinção do medo condicionado. Além disso, o estudo de Mayo et al., 2020 constatou que em indivíduos saudáveis a administração do inibidor da FAAH, PF-04457845, facilitou a consolidação da extinção de memórias aversivas, além de atenuar os efeitos do estresse. Por fim, já foi observado modelos animais que a inibição farmacológica da FAAH ou a administração de um agonista CB1 também facilita o aprendizado de extinção do medo condicionado (LARICCHIUTA; CENTONZE; PETROSINI, 2013; LISBOA et al., 2018; PAMPLONA et al., 2006).

Além dos receptores CB1, a anandamida também é capaz de ativar receptores TRPV1, porém mediando repostas opostas em relação à liberação de neurotransmissores e ao desencadeamento de respostas comportamentais frente a estímulos aversivos (MOREIRA et al., 2012). Enquanto a ativação do receptor CB1 age inibindo a liberação de glutamato e reduz a expressão do medo e comportamentos do tipo ansioso provavelmente por modular este mecanismo, o receptor TRPV1 aumenta a liberação deste neurotransmissor e desencadeia comportamentos do tipo ansioso (AGUIAR et al., 2014; MOREIRA et al., 2012). O estudo de Marsch et al., 2007, demonstrou que animais com deleção do gene para TRPV1 apresentam menores taxas de congelamento quando avaliados 1 ou 28 dias após o condicionamento ao medo, indicando um possível prejuízo no processo de extinção. Em outro estudo foi observado que a microinjeção de capsaicina, agonista TRPV1, no CPFm de ratos aumentou o congelamento após condicionamento ao medo, enquanto a administração de 6-iodo ou capsazepina, antagonistas TRPV1, tiveram o efeito oposto (TERZIAN et al., 2014). Não existem no nosso conhecimento, no entanto, trabalhos que demonstrem a relação de polimorfismos nestes receptores, ou estudos farmacológicos, com respostas de extinção em humanos.

O trabalho de Laricchiuta, Centonze e Petrosini, 2013, mostrou que o bloqueio farmacológico da FAAH com URB597 facilita a extinção do medo condicionado em camundongos estressados, porém este efeito é perdido quando a droga é administrada em conjunto com o antagonista do receptor CB1, AM251. Já quando o URB597 é administrado em conjunto com o antagonista TRPV1, I-RTX, o efeito é mantido. Inclusive a administração de I-RTX sem o URB597 já é capaz de facilitar a extinção do medo. Além disso, no trabalho de Gobira e colaboradores, 2017, citado anteriormente, também foi demonstrado que a administração de URB597 reduziu a

expressão do medo durante a sessão de extinção, porém com uma potência menor que a da AA-5HT. Entretanto, quando o URB597 foi administrado em conjunto com o SB366791, antagonista TRPV1, este efeito foi observado em doses menores. Neste trabalho, a administração prévia de AM251 também bloqueou os efeitos da AA-5HT. Estes dados sugerem papéis opostos de ambos os receptores também na resposta ao medo condicionado contextual.

Desta forma, podemos sugerir que no presente trabalho a inibição da enzima FAAH pela AA-5HT esteja aumentando os níveis de anandamida, que agiria predominantemente em receptores CB1, já que a droga também age inibindo os receptores TRPV1. A ativação de receptores CB1 poderia reduzir a sinalização glutamatérgica durante a sessão de extinção do medo condicionado, talvez influenciando a conectividade de estruturas envolvidas no processo de extinção, o que facilitaria a consolidação desta nova memória. Porém, estas são apenas especulações e são necessários mais estudos comportamentais e biomoleculares para melhor compreensão deste processo.

Por fim, é importante ressaltar que como não conseguimos obter efeitos comportamentais decorrentes do estresse, não podemos extrapolar este resultado para um contexto de *PTSD*.

6. CONCLUSÃO

Sugerimos que a inibição da enzima FAAH, juntamente com o bloqueio do receptor TRPV1, através da administração da AA-5HT, pode facilitar o processo de consolidação da extinção do medo condicionado contextual em animais não estressados. Contudo, ainda não conseguimos extrapolar esta indicação para um paradigma de transtorno do estresse pós-traumático, já que o estresse que estamos utilizando, que mimetiza o trauma que ocorre neste distúrbio, não está produzindo efeitos comportamentais em nossos animais. Além disso, ainda são necessários mais experimentos comportamentais utilizando, por exemplo, um antagonista de receptores CB1 e testes moleculares para entendermos por qual mecanismo esta facilitação está acontecendo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, D. C. et al. Modulation of defensive behavior by Transient Receptor Potential Vanilloid Type-1 (TRPV1) Channels. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 46, n. P3, p. 418–428, 2014.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders**. [s.l.] American Psychiatric Association, 2013.
- AMSTADTER, A. B.; NUGENT, N. R.; KOENEN, K. C. Genetics of PTSD: Fear Conditioning as a Model for Future Research. **Psychiatric Annals**, v. 39, n. 6, p. 358–367, 1 jun. 2009.
- AVITSUR, R. et al. Expression of glucocorticoid resistance following social stress requires a second signal. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 74, n. 4, p. 507–513, 2003.
- BERTON, O. et al. Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress. **Science**, v. 311, n. 5762, p. 864–868, 2006.
- BONNE, O. et al. Adaptive and maladaptive psychobiological responses to severe psychological stress: Implications for the discovery of novel pharmacotherapy. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 28, n. 1, p. 65–94, 2004.
- BOWERS, M. E.; RESSLER, K. J. An Overview of Translationally Informed Treatments for Posttraumatic Stress Disorder: Animal Models of Pavlovian Fear Conditioning to Human Clinical Trials. **Biological Psychiatry**, v. 78, n. 5, p. E15–E27, set. 2015.
- BRAND, S. J.; HARVEY, B. H. Exploring a post-traumatic stress disorder paradigm in Flinders sensitive line rats to model treatment-resistant depression II: Response to antidepressant augmentation strategies. **Acta Neuropsychiatrica**, v. 29, n. 4, p. 207–221, 2017.
- BREMNER, J. D. et al. MRI-based measurement of hippocampal volume in patients with combat-related posttraumatic stress disorder. **American Journal of Psychiatry**, v. 152, n. 7, p. 973–981, 1995.
- BUYNITSKY, T.; MOSTOFSKY, D. I. Restraint stress in biobehavioral research: Recent developments. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 33, n. 7, p. 1089–1098, 2009.
- CARRIVE, P. Conditioned fear to environmental context: Cardiovascular and behavioral components in the rat. **Brain Research**, v. 858, n. 2, p. 440–445, 2000.
- COHEN, H. et al. The contribution of an animal model toward uncovering biological risk factors for PTSD. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1071, p.

335–350, 2006.

CORREA, F. et al. The Role of Cannabinoid System on Immune Modulation: Therapeutic Implications on CNS Inflammation. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 5, n. 7, p. 671–675, 2005.

CRISTINO, L.; BISOGNO, T.; DI MARZO, V. Cannabinoids and the expanded endocannabinoid system in neurological disorders. **Nature Reviews Neurology**, v. 16, n. 1, p. 9–29, 2020.

DESLAURIERS, J. et al. Current Status of Animal Models of Posttraumatic Stress Disorder: Behavioral and Biological Phenotypes, and Future Challenges in Improving Translation. **Biological Psychiatry**, v. 83, n. 10, p. 895–907, 2018.

DEVANE, W. et al. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. **Science**, v. 258, n. 5090, p. 1946–1949, 18 dez. 1992.

DINCHEVA, I. et al. FAAH genetic variation enhances fronto-amygdala function in mouse and human. **Nature Communications**, v. 6, n. 1, p. 6395, 3 maio 2015.

DYKMAN, R. A.; ACKERMAN, P. T.; NEWTON, J. E. Posttraumatic stress disorder: a sensitization reaction. **Integrative physiological and behavioral science: the official journal of the Pavlovian Society**, v. 32, n. 1, p. 9–18, 1997.

ELJASCHEWITSCH, E. et al. The endocannabinoid anandamide protects neurons during CNS inflammation by induction of MKP-1 in microglial cells. **Neuron**, v. 49, n. 1, p. 67–79, 2006.

FENDT, M.; FANSELOW, M. S. The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 23, n. 5, p. 743–760, 1999.

FILIPOVIC, B. R. et al. Volume changes of corpus striatum, thalamus, hippocampus and lateral ventricles in posttraumatic stress disorder (PTSD) patients suffering from headaches and without therapy. **Zentralblatt fur Neurochirurgie**, v. 72, n. 3, p. 133–137, 2011.

GANON-ELAZAR, E.; AKIRAV, I. Cannabinoids and traumatic stress modulation of contextual fear extinction and GR expression in the amygdala-hippocampal-prefrontal circuit. **Psychoneuroendocrinology**, v. 38, n. 9, p. 1675–1687, 2013.

GARCÍA-GUTIÉRREZ, M. S. et al. Chronic blockade of cannabinoid CB 2 receptors induces anxiolytic-like actions associated with alterations in GABA A receptors. **British Journal of Pharmacology**, v. 165, n. 4, p. 951–964, 2012.

GILBOA, D.; FRIEDMAN, M.; TSUR, H. The Burn as a Continuous Traumatic Stress:

Implications for Emotional Treatment During Hospitalization. **Journal of Burn Care & Rehabilitation**, v. 15, n. 1, p. 86–94, jan. 1994.

GOBIRA, P. H. et al. N-arachidonoyl-serotonin, a dual FAAH and TRPV1 blocker, inhibits the retrieval of contextual fear memory: Role of the cannabinoid CB1 receptor in the dorsal hippocampus. **Journal of Psychopharmacology**, v. 31, n. 6, p. 750–756, 2017.

GUNDUZ-CINAR, O. et al. Convergent translational evidence of a role for anandamide in amygdala-mediated fear extinction, threat processing and stress-reactivity. **Molecular Psychiatry**, v. 18, n. 7, p. 813–823, 2013.

HAMMELS, C. et al. Defeat stress in rodents: From behavior to molecules. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 59, p. 111–140, 2015.

HAUER, D. et al. Plasma Concentrations of Endocannabinoids and Related Primary Fatty Acid Amides in Patients with Post-Traumatic Stress Disorder. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, 2013.

HILL, M. N. et al. Reductions in circulating endocannabinoid levels in individuals with post-traumatic stress disorder following exposure to the world trade center attacks. **Psychoneuroendocrinology**, v. 38, n. 12, p. 2952–2961, dez. 2013.

HULTMAN, R. et al. Dysregulation of Prefrontal Cortex-Mediated Slow-Evolving Limbic Dynamics Drives Stress-Induced Emotional Pathology. **Neuron**, v. 91, n. 2, p. 439–452, jul. 2016.

KAMPHUIS, J. et al. Deep sleep after social stress: NREM sleep slow-wave activity is enhanced in both winners and losers of a conflict. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 47, p. 149–154, 2015.

KINSEY, S. G. et al. Repeated social defeat causes increased anxiety-like behavior and alters splenocyte function in C57BL/6 and CD-1 mice. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 21, n. 4, p. 458–466, 2007.

KOENIGS, M.; GRAFMAN, J. Posttraumatic stress disorder: The role of medial prefrontal cortex and amygdala. **Neuroscientist**, v. 15, n. 5, p. 540–548, 2009.

KRISHNAN, V. et al. Molecular Adaptations Underlying Susceptibility and Resistance to Social Defeat in Brain Reward Regions. **Cell**, v. 131, n. 2, p. 391–404, 2007.

KRYSTAL, J. H. et al. It Is Time to Take a Stand for Medical Research and Against Terrorism Targeting Medical Scientists. **Biological Psychiatry**, v. 63, n. 8, p. 725–727, 2008.

KRYSTAL, J. H. et al. It Is Time to Address the Crisis in the Pharmacotherapy of

Posttraumatic Stress Disorder: A Consensus Statement of the PTSD Psychopharmacology Working Group. **Biological Psychiatry**, v. 82, n. 7, p. e51–e59, 2017.

LARICCHIUTA, D.; CENTONZE, D.; PETROSINI, L. Effects of endocannabinoid and endovanilloid systems on aversive memory extinction. **Behavioural Brain Research**, v. 256, p. 101–107, 2013.

LIBERZON, I.; ABELSON, J. L. Context Processing and the Neurobiology of Post-Traumatic Stress Disorder. **Neuron**, v. 92, n. 1, p. 14–30, out. 2016.

LIBERZON, I.; KRSTOV, M.; YOUNG, E. A. Stress-restress: Effects on ACTH and fast feedback. **Psychoneuroendocrinology**, v. 22, n. 6, p. 443–453, 1997.

LIN, H. C. et al. The role of prefrontal cortex CB1 receptors in the modulation of fear memory. **Cerebral Cortex**, v. 19, n. 1, p. 165–175, 2009.

LISBOA, S. F. et al. Increased contextual fear conditioning in inos knockout mice: Additional evidence for the involvement of nitric oxide in stress-related disorders and contribution of the endocannabinoid system. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 18, n. 8, p. 1–12, 2015.

LISBOA, S. F. et al. Microglial cells as a link between cannabinoids and the immune hypothesis of psychiatric disorders. **Frontiers in Neurology**, v. 7, n. JAN, 2016.

LISBOA, S. F. et al. The Endocannabinoid System and Anxiety. In: **Anxiety (Volume 103) (Vitamins and Hormones, Volume 103)**. 1. ed. [s.l.] Academic Press, 2017. p. 193–279.

LISBOA, S. F. et al. Repeated social defeat-induced neuroinflammation, anxiety-like behavior and resistance to fear extinction were attenuated by the cannabinoid receptor agonist WIN55,212-2. **Neuropsychopharmacology**, v. 43, n. 9, p. 1924–1933, 2018.

MARCHETTI, L. et al. Gene expression signature of antidepressant treatment response/non-response in Flinders Sensitive Line rats subjected to maternal separation. **European Neuropsychopharmacology**, v. 31, p. 69–85, 2020.

MAREN, S.; HOLMES, A. Stress and fear extinction. **Neuropsychopharmacology**, v. 41, n. 1, p. 58–79, 2016.

MARSCH, R. et al. Reduced anxiety, conditioned fear, and hippocampal long-term potentiation in transient receptor potential vanilloid type 1 receptor-deficient mice. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 4, p. 832–839, 2007.

MARSICANO, G. et al. The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. **Nature**, v. 418, n. 6897, p. 530–534, 2002.

- MAYO, L. M. et al. Elevated Anandamide, Enhanced Recall of Fear Extinction, and Attenuated Stress Responses Following Inhibition of Fatty Acid Amide Hydrolase: A Randomized, Controlled Experimental Medicine Trial. **Biological Psychiatry**, v. 87, n. 6, p. 538–547, 2020.
- MCKIM, D. B. et al. Social Stress Mobilizes Hematopoietic Stem Cells to Establish Persistent Splenic Myelopoiesis. **Cell Reports**, v. 25, n. 9, p. 2552- 2562.e3, nov. 2018.
- MECHOULAM, R. et al. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. **Biochemical Pharmacology**, v. 50, n. 1, p. 83–90, 1995.
- MEERLO, P.; PRAGT, B. J.; DAAN, S. Social stress induces high intensity sleep in rats. **Neuroscience Letters**, v. 225, n. 1, p. 41–44, 1997.
- MILAD, M. R. et al. Neurobiological Basis of Failure to Recall Extinction Memory in Posttraumatic Stress Disorder. **Biological Psychiatry**, v. 66, n. 12, p. 1075–1082, dez. 2009.
- MOREIRA, F. A. et al. Cannabinoid type 1 receptors and transient receptor potential vanilloid type 1 channels in fear and anxiety-two sides of one coin? **Neuroscience**, v. 204, p. 186–192, 2012.
- MUTSO, A. A. et al. Abnormalities in hippocampal functioning with persistent pain. **Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 17, p. 5747–5756, 2012.
- NEUMEISTER, A. The endocannabinoid system provides an avenue for evidence-based treatment development for PTSD. **Depression and Anxiety**, v. 30, n. 2, p. 93–96, 2013.
- NEUMEISTER, A. et al. Elevated brain cannabinoid CB 1 receptor availability in post-traumatic stress disorder: A positron emission tomography study. **Molecular Psychiatry**, v. 18, n. 9, p. 1034–1040, 2013.
- NEUMEISTER, A. et al. Translational evidence for a role of endocannabinoids in the etiology and treatment of posttraumatic stress disorder. **Psychoneuroendocrinology**, v. 51, p. 577–584, 2015.
- PAMPLONA, F. A. et al. The cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 facilitates the extinction of contextual fear memory and spatial memory in rats. **Psychopharmacology**, v. 188, n. 4, p. 641–649, 2006.
- PARDINI, M. et al. Fatty-acid amide hydrolase polymorphisms and post-traumatic stress disorder after penetrating brain injury. **Translational psychiatry**, v. 2, n.

November 2011, p. 1–5, 2012.

PRYCE, C. R. et al. Helplessness: A systematic translational review of theory and evidence for its relevance to understanding and treating depression. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 132, n. 3, p. 242–267, 2011.

QUIRK, G. J.; GARCIA, R.; GONZÁLEZ-LIMA, F. Prefrontal Mechanisms in Extinction of Conditioned Fear. **Biological Psychiatry**, v. 60, n. 4, p. 337–343, 2006.

QUIRK, G. J.; MUELLER, D. Neural mechanisms of extinction learning and retrieval. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, n. 1, p. 56–72, 2008.

RAMIREZ, K. et al. Imipramine attenuates neuroinflammatory signaling and reverses stress-induced social avoidance. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 46, n. 12, p. 212–220, maio 2015.

READER, B. F. et al. Peripheral and central effects of repeated social defeat stress: Monocyte trafficking, microglial activation, and anxiety. **Neuroscience**, v. 289, n. 3, p. 429–442, mar. 2015.

RESSTEL, L. B. M. et al. Involvement of medial prefrontal cortex neurons in behavioral and cardiovascular responses to contextual fear conditioning. **Neuroscience**, v. 143, n. 2, p. 377–385, 2006.

RYTWINSKI, N. K. et al. The Co-Occurrence of Major Depressive Disorder Among Individuals With Posttraumatic Stress Disorder: A Meta-Analysis. **Journal of Traumatic Stress**, v. 26, n. 3, p. 299–309, jun. 2013.

SPAGNOLO, P. A. et al. FAAH Gene Variation Moderates Stress Response and Symptom Severity in Patients with Posttraumatic Stress Disorder and Comorbid Alcohol Dependence. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 40, n. 11, p. 2426–2434, 2016.

TERZIAN, A. L. B. et al. Medial prefrontal cortex transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) in the expression of contextual fear conditioning in Wistar rats. **Psychopharmacology**, v. 231, n. 1, p. 149–157, 2014.

THAM, C. S. et al. Inhibition of microglial fatty acid amide hydrolase modulates LPS stimulated release of inflammatory mediators. **FEBS Letters**, v. 581, n. 16, p. 2899–2904, 2007.

VANELZAKKER, M. B. et al. From Pavlov to PTSD: The extinction of conditioned fear in rodents, humans, and anxiety disorders. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 113, n. 5, p. 3–18, set. 2014.

WANG, J.; UEDA, N. Biology of endocannabinoid synthesis system. **Prostaglandins**

and Other Lipid Mediators, v. 89, n. 3–4, p. 112–119, 2009.

WHITTLE, N.; SINGEWALD, N. HDAC inhibitors as cognitive enhancers in fear, anxiety and trauma therapy: Where do we stand? **Biochemical Society Transactions**, v. 42, n. 2, p. 569–581, 2014.

WOLF, S.; TAUBER, S.; ULLRICH, O. CNS Immune Surveillance and Neuroinflammation: Endocannabinoids Keep Control. **Current Pharmaceutical Design**, v. 14, n. 23, p. 2266–2278, 2008.

YEHUDA, R. Status of glucocorticoid alterations in post-traumatic stress disorder. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1179, p. 56–69, 2009.