



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**EFEITOS DE LIGANTES DO RECEPTOR CANABINÓIDE CB1
NOS COMPORTAMENTOS DE ANSIEDADE E NA
HIPERVIGILÂNCIA INDUZIDA POR COCAÍNA EM
MICOS-ESTRELA**

Priscila Lelis Cagni

Brasília, 2012

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**EFEITOS DE LIGANTES DO RECEPTOR CANABINÓIDE CB1
NOS COMPORTAMENTOS DE ANSIEDADE E NA
HIPERVIGILÂNCIA INDUZIDA POR COCAÍNA EM
MICOS-ESTRELA**

Orientadora: Profa. Dra. Marília Barros

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde (Neurociências).

Priscila Lelis Cagni

Brasília, 2012

Priscila Lelis Cagni

**Efeito de ligantes do receptor canabinóide CB1 nos
comportamentos de ansiedade e na hipervigilância induzida por
cocaína em micos-estrela**

Tese apresentada como requisito
parcial para a obtenção do título
de Doutor em Ciências da Saúde
pelo Programa de Pós-Graduação
em Ciências da Saúde da
Universidade de Brasília.

Aprovada no dia 5 de julho de 2012.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Marília Barros (presidente)
Universidade de Brasília

Prof. Dr. Reinaldo Takahashi
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Carlos Tomaz
Universidade de Brasília

Prof. Dr. Vitor Motta
Universidade de Brasília

Prof. Dr. Maurício Homem de Mello
Universidade de Brasília

A G R A D E C I M E N T O S

- À minha orientadora Dra. Marília Barros, obrigada de coração. Pela paciência, por todo apoio e todos os seus ensinamentos ao longo dessa trajetória, que contribuíram para a minha formação no mestrado e no doutorado.
- Aos professores Dr. Carlos Tomaz, Dr. Joseph Huston, Dr. Christian Muller, Dr. Vitor Motta, Dr. Renato Malcher-Lopes, Dr. Reinaldo Takahashi e Dr. Maurício Homem de Mello pelas sugestões, considerações e correções para o trabalho.
- Aos meus estagiários Talita, Gabriela, Augusto e Natália e às minhas colegas de pós-graduação Mara e Aline. Obrigada pela dedicação durante tardes na fazenda, mesmo em finais de semana ou feriados.
- Ao Sr. Alex Souto Maior pela confecção do aparato.
- Aos meus sujeitos experimentais que muito ‘trabalharam’ para o desenvolvimento do meu projeto.
- Aos veterinários Dr. Danilo Teixeira, Dr. Raimundo de Oliveira e Dra. Cecília Dias pelo cuidado e carinho constantes com os animais e pelo apoio prestado durante a realização dos experimentos.
- Aos funcionários da Fazenda Água Limpa; Adão Pedro e Geinaldo, por terem me ajudado sempre, ao longo de todos os experimentos.

- À minha família (meu pai, minha mãe, minha irmã, minha sobrinha e meu marido) por estar sempre ao meu lado. Obrigada pelas ajudas, pelo apoio moral e pelo incentivo nos momentos mais difíceis. Eu amo vocês!

- À CAPES pelo apoio financeiro conferido através da bolsa de estudos.

- Ao CNPq pelo financiamento conferido através do Edital Universal.

- À Universidade de Brasília, ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências da Saúde e ao Centro de Primatologia da UnB (CPUnB), por possibilitarem a realização deste trabalho.

- À Deus e a todos aqueles que de uma forma contribuíram para a realização deste trabalho. Muito obrigada!

SUMÁRIO

Agradecimentos -----	i
Sumário -----	iii
Lista de Abreviaturas -----	vi
Resumo -----	vii
Abstract -----	ix
1 INTRODUÇÃO -----	1
1.1 Sistema endocanabinóide-----	1
1.1.1 Receptores canabinóides-----	2
1.1.2 Ligantes canabinóides-----	5
1.2 Papel do Sistema Endocanabinóide na ansiedade-----	9
1.2.1 Aspectos gerais da ansiedade-----	9
1.2.2 Bases neuroanatômicas da ansiedade-----	11
1.2.3 Bases neuroquímicas da ansiedade-----	12
1.2.4 Influência do Sistema Endocanabinóide na ansiedade-----	14
1.3 Papel do Sistema Endocanabinóide na dependência-----	16
1.3.1 Aspectos gerais da dependência-----	16
1.3.2 Farmacodependência e cocaína-----	18
1.3.3 Influência do Sistema Endocanabinóide na dependência-----	21
1.4 Uso de primatas não-humanos em modelos animais-----	23
1.4.1 Uso de primatas não-humanos em testes de ansiedade-----	25
1.4.2 Uso de primatas não-humanos em testes de dependência-----	28
2 OBJETIVOS -----	29
3 ESTUDO 1 -----	31
3.1 Introdução-----	31
3.1.1. Teste do campo aberto-----	32
3.1.2. Aspectos farmacológicos dos benzodiazepínicos-----	33
3.2 Objetivo-----	35
3.3 Metodologia-----	35
3.3.1 Sujeitos-----	35
3.3.2 Aparato experimental-----	37
3.3.3 Drogas-----	38

3.3.4	Procedimento experimental-----	38
3.3.5	Análise dos dados-----	40
3.4	Resultados-----	41
3.5	Discussão-----	44
3.6	Conclusão-----	46
4	ESTUDO 2-----	47
4.1	Introdução-----	47
4.2	Objetivo-----	48
4.3	Metodologia-----	48
4.3.1	Sujeitos-----	48
4.3.2	Aparato experimental-----	48
4.3.3	Drogas-----	49
4.3.4	Procedimento experimental-----	49
4.3.5	Análise dos dados-----	50
4.4	Resultados-----	50
4.5	Discussão-----	53
4.6	Conclusão-----	55
5	ESTUDO 3-----	57
5.1	Introdução-----	57
5.2	Objetivo-----	58
5.3	Metodologia-----	58
5.3.1	Sujeitos-----	58
5.3.2	Aparato experimental-----	58
5.3.3	Drogas-----	59
5.3.4	Coleta e análise dos dados comportamentais-----	59
5.3.5	Coleta de sangue e análise dos dados hormonais-----	60
5.3.6	Análise estatística-----	62
5.4	Resultados-----	62
5.5	Discussão-----	65
5.6	Conclusão-----	68
6	ESTUDO 4-----	69
6.1	Introdução-----	69

6.2 Objetivo-----	70
6.3 Metodologia-----	70
6.3.1 Sujeitos-----	70
6.3.2 Aparato experimental-----	70
6.3.3 Drogas-----	70
6.3.4 Procedimento experimental-----	71
6.3.5 Análise dos dados comportamentais-----	72
6.3.6 Análise estatística-----	73
6.4 Resultados-----	74
6.5 Discussão-----	79
6.6 Conclusão-----	82
7 DISCUSSÃO GERAL-----	83
8 CONCLUSÃO-----	85
9 BIBLIOGRAFIA-----	86
10 ANEXOS-----	113
Anexo A: Parecer do Comitê de Ética no Uso Animal – IB/UnB-----	113
Anexo B: Cópia da publicação do estudo 1-----	114
Anexo C: Cópia do manuscrito do estudo 3, submetido à publicação-----	119

LISTA DE ABREVIATURAS

Δ^9THC,.....	Delta-9-tetrahydrocannabinol
2-AG,.....	2-aracdonoilglicerol
AEA,.....	Anandamida
BDZ,.....	Benzodiazepínico
CA,.....	Campo aberto
DA,.....	Dopamina
DAT,.....	Transportador de dopamina
DZP,.....	Diazepam
eEC	Endocannabinóide
FAAH,.....	Amida hidrolase de ácidos graxos
GABA,.....	Ácido γ -aminobutírico
HPA,.....	Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
MGL	Lipase monoacilglicerol
PAG	Matéria cinzenta periaquedutal
NAc,.....	Núcleo <i>accumbens</i>
ECS,.....	Sistema Endocannabinóide
CNS,.....	Sistema Nervoso Central
TRPV1,.....	Receptor vanilóide transitório do tipo 1
VTA,.....	Área tegmental ventral

RESUMO

O Sistema Endocanabinóide (SE) de sinalização é um modulador fundamental de diferentes funções neurais, sendo que seus receptores canabinóides CB1 estão presentes em regiões cerebrais relacionadas à ansiedade e à dependência por drogas de abuso. Entretanto, pouco se sabe a respeito dos efeitos desta modulação em primatas não-humanos (PNH). Portanto, este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos de ligantes do receptor CB1 (agonista WIN 55-212,2; antagonista AM 251) nos comportamentos de ansiedade e nos efeitos induzidos pela administração repetida de cocaína em micos-estrela (*Callithrix penicillata*). Para tanto, o trabalho foi dividido em quatro estudos: os primeiros dois para avaliação da ansiedade e os outros dois para a dependência. No primeiro, os micos foram tratados com diazepam (DZP; 0 ou 0,5 mg/kg i.p.), 30-min antes de uma única exposição individual de 15-min a um Campo Aberto (CA). O tratamento prévio com DZP alterou diferentes indicadores de ansiedade nesses animais, correspondendo a um efeito ansiolítico, o que sugere o uso do teste do CA para o estudo da ansiedade nessa espécie. No segundo estudo, micos-estrela foram tratados com veículo (controle), WIN 55-212,2 (WIN; 1 mg/kg i.p.) ou AM 251 (AM; 2 mg/kg i.p.) 30-min antes de uma única exposição individual de 15-min ao CA. Ambos os ligantes reverteram os mesmos comportamentos indicativos de ansiedade vistos no estudo anterior. Porém, apenas nos sujeitos tratados com WIN houve um aumento no tempo permanência na zona central do aparato, indicativo de um efeito ansiolítico nesse teste, semelhante ao observado com a administração de DZP. Em ambos os estudos não foram observados efeitos sedativos, uma vez que não houve alteração na locomoção dos animais. No terceiro estudo, o efeito da administração sistêmica de cocaína (0 ou 5 mg/kg i.p.) nos micos, 5-min antes do teste, foi avaliado em nove sessões de 15-min cada realizadas no CA. Em seguida, foram realizadas quatro sessões de retirada em que os animais foram expostos ao aparato sem receber tratamento. Ao longo do procedimento, foram coletadas cinco amostras de sangue para dosagem dos níveis séricos de cortisol. A administração de cocaína nos micos induziu um aumento gradual e significativo em determinados comportamentos de vigilância, sem serem observadas alterações concomitantes na locomoção e na concentração de cortisol. Na retirada, houve uma reversão imediata das alterações comportamentais induzidas anteriormente pela cocaína. No quarto estudo, micos-estrela foram tratados com a seguinte combinação de pré-tratamento/tratamento:

veículo-salina, veículo-cocaína, WIN-salina, WIN-cocaína, AM-salina, AM-cocaína. O pré-tratamento foi dado 30-min antes da sessão e o tratamento 5-min antes, usando as mesmas doses dos estudos 2 e 3. Cada mico foi submetido no CA a seis sessões de teste e uma de retirada (sem tratamento), de 15-min cada. O pré-tratamento com WIN não modificou o perfil de hipervigilância induzido pela cocaína. Contudo, a administração prévia de AM potencializou (desde a primeira sessão) esse efeito da administração repetida de cocaína nos micos, sendo o mesmo revertido durante a sessão de retirada. Em ambos os estudos não foi observada uma alteração na locomoção dos animais, independente do grupo. Portanto, considerando importantes diferenças existentes entre roedores e humanos, micos-estrela parecem caracterizar um bom modelo para estudo pré-clínico da ansiedade e dependência por cocaína. Nesse sentido, ficou demonstrado no presente estudo que a modulação do SE dos micos, via administração de ligantes do receptor canabinóide CB1, parece influenciar diferentes respostas comportamentais indicativas de ansiedade, assim como o desenvolvimento de um efeito de hipervigilância induzido pelo tratamento repetido de cocaína nesse pequeno PNH.

Palavras-chave: receptor CB1, ansiedade, cocaína, vigilância, mico-estrela, campo-aberto

ABSTRACT

The endocannabinoid system (ES) is a key modulator of different neural functions and their cannabinoid type 1 receptors (CB1r) are located in brain regions related to anxiety and drug addiction. However, little is known about the effects of ES modulation in non-human primates (NHP). Thus, the present study assessed the effects of CB1r ligands (agonist WIN 55-212,2; antagonist AM 251) on anxiety-related and cocaine-induced behavioral responses in adult black tufted-ear marmoset (*Callithrix penicillata*). Therefore, four studies were conducted: the first two to evaluate anxiety parameters and the last two to analyzed cocaine dependence. For the first study, subjects were treated with diazepam (DZP: 0 or 0,5 mg/kg i.p.), 30-min prior to a single and individual 15-min exploration trial in an open field (OF) arena. DZP treatment induced several changes in behavioral indicators of anxiety in these animals, corresponding to an anxiolytic-like effect, which suggests that the OF test may be a useful procedure to assess anxiety behaviors in marmosets. For the second study, subjects were treated with vehicle (control), WIN 55-212,2 (WIN; 1 mg/kg i.p.) or AM 251 (AM; 2 mg/kg i.p.) 30-min prior to a single and individual 15-min exposure to the OF. Both ligands reversed the same anxiety-related behaviors as seen in the previous study. However, only WIN-treated marmosets significantly increased sojourn time in the central zone of the OF, as previously seen in subjects treated with DZP, an important indicator of an anxiolytic-like effect in this test. Sedation was not observed in both studies, as no changes were seen in locomotion. On the third study, the effects of repeated systemic cocaine administrations (0 or 5 mg/kg i.p.), injected 5-min before the test, were analyzed during nine 15-min trials held in the OF. Four withdrawal trials were subsequently held in the OF, in the absence of any treatment. During this procedure, five blood samples were obtained to measure the levels of cortisol. Cocaine treatment induced a gradual and significant increase in specific vigilance-related behaviors, with no concomitant change in locomotion or cortisol levels. Cessation of cocaine treatment, during the withdrawal trials, rapidly reversed this effect. For the fourth study, subjects were administered the following combination of pre-treatment/treatment: vehicle/saline, vehicle/cocaine, WIN/saline, WIN/cocaine, AM/saline or AM/cocaine. Pre-treatment was given 30-min prior and treatment 5-min prior to the trials, with the same doses used in studies 2 and 3. Each marmoset was submitted, in the OF, to six 15-min tests trials and one 15-min (no-treatment) withdrawal trial. Pre-treatment with WIN did not

modify the cocaine-induced hypervigilance effect. However, pre-treatment with AM potentiated this effect of repeated cocaine administration in the marmosets, already on trial 1. This effect was reversed during the withdrawal trial. Changes in locomotion were not observed in both studies, regardless of the treatment given. Therefore, considering significant differences that exists between rodents and humans, marmosets seem to constitute an unique animal model to pre-clinical assess anxiety and cocaine addiction. In fact, it was presently shown that modulation of the ES in marmosets, via administration of CB1r ligands, seems to influence several important behavioral indicators of anxiety, as well as the development of a hypervigilance effect induced by repeated cocaine injections in this small NHP.

Keywords: CB1 receptor, anxiety, cocaine, vigilance, marmoset, open-field

1 INTRODUÇÃO

1.1 SISTEMA ENDOCANABINÓIDE

A planta *Cannabis spp.*, popularmente conhecida como maconha, é um arbusto cultivado há séculos devido as suas propriedades psicoativas e medicinais (1). A *Cannabis* é a droga ilícita mais consumida no mundo, estimando-se os seus consumidores em 4% da população mundial adulta (2; 3). Acredita-se que seja originária da Ásia e tenha se espalhado pelo mundo com os movimentos migratórios e atividades comerciais (4). As flores e as folhas da planta secretam uma resina que contém compostos psicoativos chamados de canabinóides (5).

No que diz respeito às propriedades medicinais, os canabinóides foram usados para o tratamento da dor durante séculos (6). Eles foram utilizados, durante a idade média, como anestésicos cirúrgicos na China, para tratar a dor do parto em Israel e como analgésico na Ásia. Por razões políticas e farmacológicas, a exemplo da instabilidade dos extratos da *Cannabis* e da sua absorção imprevisível e insolubilidade em água, o uso dos canabinóides como agentes terapêuticos foi interrompido em 1930 (4).

Atualmente, são conhecidos cerca de 540 constituintes da *Cannabis spp.* (7); os mais abundantes incluem Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 THC), canabidiol, canabinol, canabigerol e canabicromeno (8). Os análogos do Δ^9 THC contribuíram para que fossem identificados e localizados os receptores para canabinóides (9) no Sistema Nervoso Central (CNS). Ligantes endógenos para estes receptores também foram encontrados no cérebro (10; 11; 12). Esta descoberta levou à necessidade de classificação e redefinição dos canabinóides, que passaram a serem identificados de acordo com os diferentes ligantes dos receptores canabinóides, a saber: (1) endocanabinóides (eECs) – ligantes endógenos; (2) fitocanabinóides - derivados da *Cannabis* e (3) ligantes canabinóides sintéticos (7). Dessa forma, os receptores canabinóides, seus ligantes endógenos (eECs) e as enzimas que

participam da produção e da degradação dos ECs formam o Sistema Endocanabinóide – ECS (13).

O ECS é um sistema de sinalização lipídica que apareceu recentemente na evolução e que possui funções regulatórias importantes, presente nos vertebrados (14). É, também, um sistema de sinalização endógena que atua fisiologicamente na regulação da homeostase energética e está envolvido em diversos processos fisiológicos, incluindo a memória e o aprendizado (15), as emoções (16), a nocicepção (17; 18) e o apetite (19). A importância desses processos e as patologias a eles relacionadas explicam o porquê esse sistema vem, recentemente, sendo foco de diversas pesquisas. Por muitos anos, os substratos molecular, celular e neuroanatômico relacionados ao uso da *Cannabis* permaneceram inexplicados. A descoberta do ECS no final do século XX permitiu novas abordagens sobre o tema, desafiando e revolucionando a visão clássica sobre a *Cannabis*. Esse sistema é, portanto, um sistema neuromodulatório ubiqüitário, fundamental na fisiologia básica e em aspectos comportamentais possivelmente envolvidos em condições fisiopatológicas, em nível central e periférico (20).

1.1.1 Receptores Canabinóides

Nos últimos anos, foi identificada a existência de pelo menos dois receptores canabinóides, identificados como CB1 e CB2 (21). Os receptores canabinóides pertencem à família dos receptores acoplados à proteína G, com a função primária de realizar a transdução de estímulos extracelulares em sinais intracelulares e cujas características incluem a presença de longas cadeias de aminoácidos e um grau de similaridade da seqüência primária através das espécies (22). Como o presente estudo se propôs a investigar os efeitos de ligantes do receptor CB1, apenas este receptor será discutido a seguir.

Os primeiros estudos a respeito da distribuição regional dos receptores CB1 estabeleceram conceitos que, hoje em dia, são fundamentais para explicar a importância fisiológica e patológica do ECS, são eles: (1) alta densidade de receptores; (2) padrão regional característico; e (3) similaridade entre as espécies (23, 24).

Este receptor teve seu DNA clonado pela primeira vez a partir de células de ratos, utilizando uma abordagem homóloga para a identificação de receptores acoplados à proteína G órfãos (25). Subseqüentemente ele foi encontrado em todos os vertebrados. O padrão regional conservado, bem como a alta similaridade da seqüência protéica, sugere que a sinalização endocanabinóide pode ser antiga e ter um papel básico na regulação da atividade neuronal (14). Todavia, um estudo realizado em 1999 revelou diferenças na distribuição e densidade dos receptores canabinóides no cérebro de primata não-humano comparado ao de roedor (26).

O receptor canabinóide do tipo CB1 está densamente distribuído em áreas do cérebro relacionadas com o controle motor, a cognição, as respostas emocionais, o comportamento motivacional e a homeostase (13). Foi encontrada uma alta densidade de receptores CB1 no bulbo olfatório, hipocampo, estriado lateral, globo pálido, substância negra e cerebelo (27; 28); densidade moderada em áreas do córtex cerebral (sobretudo no lobo frontal e parietal e giro do cíngulo), septo, amígdala, hipotálamo e na medula espinhal (27; 28); baixa densidade no tálamo e em núcleos do tronco cerebral (29) e os diversos núcleos medulares responsáveis pela organização das funções respiratórias e cardiovasculares parecem não possuir sinalização canabinóide (14). Nos órgãos e tecidos periféricos, os CB1 são expressos em baixa densidade (28; 20).

A densidade dos receptores canabinóides no CNS atinge níveis que se igualam a vista para os receptores glutamatérgicos e GABAérgicos em todo o cérebro e de receptores dopaminérgicos encontrados no estriado (30). Ademais, a densidade de receptores canabinóides é maior que a de neuropeptídeos, que também parecem exercer efeitos moduladores (14). Em conjunto, esses achados sugerem que o ECS pode ter um papel crucial na regulação da neurotransmissão sináptica.

Apesar do receptor CB1 ser praticamente comum na maioria dos tipos celulares, alguns neurônios não possuem nem a expressão do receptor CB1, nem a expressão do seu mRNA, p.e. neurônios dopaminérgicos do mesencéfalo (24); células de Purkinje no cerebelo (31); e neurônios colinérgicos do estriado (32). Por fim, a abundância de sítios de ligação canabinóides é comparada às dos principais neurotransmissores encontrados no cérebro, como o ácido γ -aminobutírico (GABA) e o glutamato, indicando que a sinalização canabinóide endógena pode ter um papel fundamental na comunicação neural (33).

A descoberta do receptor CB1 forneceu informações também em nível de mRNA na expressão celular e, depois do surgimento de anticorpos seletivos, num padrão de localização subcelular (25; 34). Estudos focados na distribuição subcelular dos receptores CB1 revelaram que a proteína do receptor está acumulada na membrana plasmática nos terminais do axônio (35), o que indica que os eECs podem executar um papel essencial na regulação das transmissões sinápticas. Os terminais axônios possuem uma elaborada maquinaria que medeia a neurotransmissão sináptica basal e também algumas vias moleculares de sinalização que ajustam a eficácia da comunicação sináptica. Os receptores CB1 pré-sinápticos parecem estar envolvidos em pelo menos duas dessas vias e, em ambas, resultam na atenuação da liberação de neurotransmissores. A ativação dos receptores CB1 pré-sinápticos pode induzir a inibição dos canais de cálcio dependentes de voltagem, causando uma depressão sináptica de curta duração (33). Além disso, os receptores pré-sinápticos CB1 podem diminuir a atividade da via adenilil-ciclase-proteína quinase A, que resulta em uma inibição de longa duração na liberação de neurotransmissores (36).

Mais especificamente, receptores canabinóides CB1 estão localizados nos axônios de neurônios GABAérgicos derivados do estriado (30). No hipocampo, estes receptores são localizados nos axônios tanto dos neurônios GABAérgicos, quanto dos glutamatérgicos (37; 38). Ademais, os interneurônios GABAérgicos amplamente distribuídos pelo cérebro

também sintetizam e expressam o mRNA de receptores CB1, de uma forma similar ao que ocorre no córtex cerebral.

Contudo, a persistência de efeitos comportamentais em camundongos *knockout* para receptores CB1 ou CB2 sugere a existência de outros receptores canabinóides (39). Nesse contexto, o receptor vanilóide transitório do tipo 1 (TRPV1) está filogeneticamente relacionado aos receptores canabinóides, a medida que o mesmo ligante natural capaz de se ligar aos receptores CB1 também é capaz de se ligar a estes receptores (40). O receptor TRPV1 tem localização pré- e, sobretudo, pós-sináptica (13). Sabe-se ainda que vários ligantes e receptores canabinóides tem a capacidade de interagir com canais iônicos e esta interação pode resultar em efeitos fisiológicos relevantes sob algumas condições (41).

1.1.2 Ligantes Canabinóides

Os eECs são moléculas derivadas do ácido araquidônico, formadas por vias dependentes de fosfolípídeos, liberadas na fenda sináptica por meio de difusão, e que se ligam aos receptores canabinóides (42). Os eECs são sintetizados sob demanda a partir de precursores lipídicos e servem como mensageiros retrógrados nas sinapses GABAérgicas e glutamatérgicas, assim como moduladores da transmissão pós-sináptica, interagindo com outros neurotransmissores, incluindo a dopamina (DA) (40). Os eECs são internalizados pelos neurônios pré-sinápticos e degradados por enzimas (43).

A identificação molecular das enzimas envolvidas na síntese ou ativação dos eECs abriu a possibilidade de se encontrar o início e o fim da sinalização endógena que mimetiza o efeito dos fitocannabinóides (44; 45; 46; 47; 48). Estudos neuroanatômicos moleculares confirmaram que as enzimas de biossíntese e degradação estão acumuladas nas junções sinápticas, juntamente com os receptores CB1 (49; 50; 51).

Os compostos canabinóides são, portanto, ligantes ortostéricos, que interagem diretamente com o sítio de ligação e cuja ocupação ativa o receptor (7). A anandamida (N-

araquidonoiletanolamina, AEA) foi o primeiro eEC a ser identificado (10). Contudo, o 2-araquidonoilglicerol (2-AG) vem sendo sugerido como o mais importante eEC no organismo. Apesar de serem considerados os principais eECs, existe um grande número de agentes endógenos capazes de ativar os receptores canabinóides (52).

O ligante mais abundante do eECS, o 2-AG, é encontrado em concentrações bem menores que o glutamato e o GABA, os dois principais neurotransmissores do CNS, sendo mais comparada à concentração de DA (14). Uma possível explicação para essa diferença é o papel peculiar que o 2-AG exerce no cérebro. Ao contrário do glutamato e do GABA, ele possivelmente não está envolvido na atividade basal sendo, portanto, sintetizado e liberado sob demanda após uma atividade neuronal excessiva. A concentração de AEA é ainda menor, atingindo as mesmas concentrações de outros neurotransmissores (53), portanto, sua função (atividade) parece ser mais específica.

A forma mais direta de se manipular o ECS é ativando os receptores canabinóides com agonistas ou antagonistas. Nos últimos anos houve uma intensa proliferação de agonistas e antagonistas de receptores CB1 e CB2. Alguns deles possuem potencial terapêutico em humanos como, por exemplo, os agonistas não-seletivos de receptores CB1 e CB2 e antagonistas CB1 (54). Outros, como os agonistas de receptores CB2, são grandes promessas terapêuticas em estudos pré-clínicos (5). Essas novas ferramentas permitiram estudos do papel fisiológico dos eECs e abriram novos caminhos para o tratamento da dor, obesidade, doenças neurológicas como esclerose múltipla, distúrbios de humor como ansiedade e outras desordens psiquiátricas, incluindo a farmacodependência.

Agonistas do Receptor CB1:

Existem quatro classes definidas de agonistas canabinóides (21): os canabinóides clássicos, os não-clássicos, os aminoalquilindóis e os eicosanóides. Os canabinóides clássicos podem ser encontrados na natureza, como o Δ^9 THC, ou podem ser sintetizados, como o HU210. Os canabinóides não-clássicos possuem alta afinidade tanto pelo receptor CB1, quanto pelo receptor CB2. Dentre estes compostos destaca-se o CP55,940, que teve

grande importância na definição da localização e função dos receptores CB1 (24). Foi descoberto ainda que um composto da classe das naftalinas é um potente agonista CB1 e CB2, porém, com uma capacidade limitada de atravessar a barreira hematoencefálica (55). Os agonistas da classe aminoalquilindóis foram desenvolvidos primeiramente como drogas anti-inflamatórias e analgésicas, sendo posteriormente descoberta sua propriedade de se ligar a receptores do tipo CB1 e CB2 (56). Dos compostos desta classe, o WIN 55,212-2 é o mais comumente utilizado em estudos.

Os compostos eicosanóides compõem a última classe de agonistas canabinóides e constituem os compostos conhecidos como eECs (57). Existem basicamente dois tipos de endocanabinóides a saber: (1) acil-etanolamidas e (2) acil-esters. O principal representante do primeiro tipo é a AEA (10). Um grande número de compostos acil-etanolamidas, que possuem atividade no receptor CB1, pode ser encontrado *in vivo* (57). Uma característica destes compostos é que eles possuem uma eficácia intrínseca relativamente baixa para receptores CB1. Dentro dos agonistas do tipo acil-esters, o composto 2-AG é o único extensivamente estudado (58; 12). A AEA é capaz de se ligar tanto em receptores canabinóides CB1, quanto CB2, além de se ligar também ao receptor TRPV1. Contudo, o 2-AG vem sendo sugerido como o mais importante eEC no organismo. Está presente em grandes concentrações nos tecidos e apresenta uma maior eficácia que a AEA no receptor CB1 (59).

Antagonistas do Receptor CB1

A primeira e mais estudada classe de antagonistas de receptores CB1 é representada pelo SR 141716A (Rimonabant; 21). Outros membros amplamente encontrados nesta família são o AM 251 e o AM 281 (21). Compostos desta família apresentam uma seletividade para o receptor CB1 de 100 a 1000 vezes maior que para o receptor CB2 e também funcionam como um agonista inverso (60). A capacidade de inibir o consumo de comida e, portanto, promover a perda de peso, resultou em um grande esforço das indústrias farmacêuticas para que fossem desenvolvidos outros antagonistas de

receptor CB1 (61). Contudo, causam diversos efeitos adversos, possivelmente devido a sua ação como agonistas inversos em determinadas situações.

Em suma, os estudos realizados nas duas últimas décadas revelaram a posição precisa de diversos componentes do ECS. A arquitetura molecular envolve a: (1) síntese dos eECs no neurônio pós-sináptico pela ação de uma enzima; (2) ligação no receptor pré-sináptico CB1; (3) captação do eEC na fenda sináptica e (4) degradação do eEC no neurônio pela ação de enzimas específicas: Amida hidrolase de ácido graxo (FAAH) para a AEA e Lípase monoacilglicerol (MGL) para o 2-AG (Figura 1.1). Nesse sentido, pesquisas farmacológicas recentes levaram à síntese de agonistas e antagonistas de receptores canabinóides, bloqueadores da recaptação de AEA e potentes inibidores seletivos da degradação dos eECs. Esses compostos com a finalidade de modular o efeito do ECS em diferentes funções neurais, como a ansiedade e dependência, discutidos a seguir.

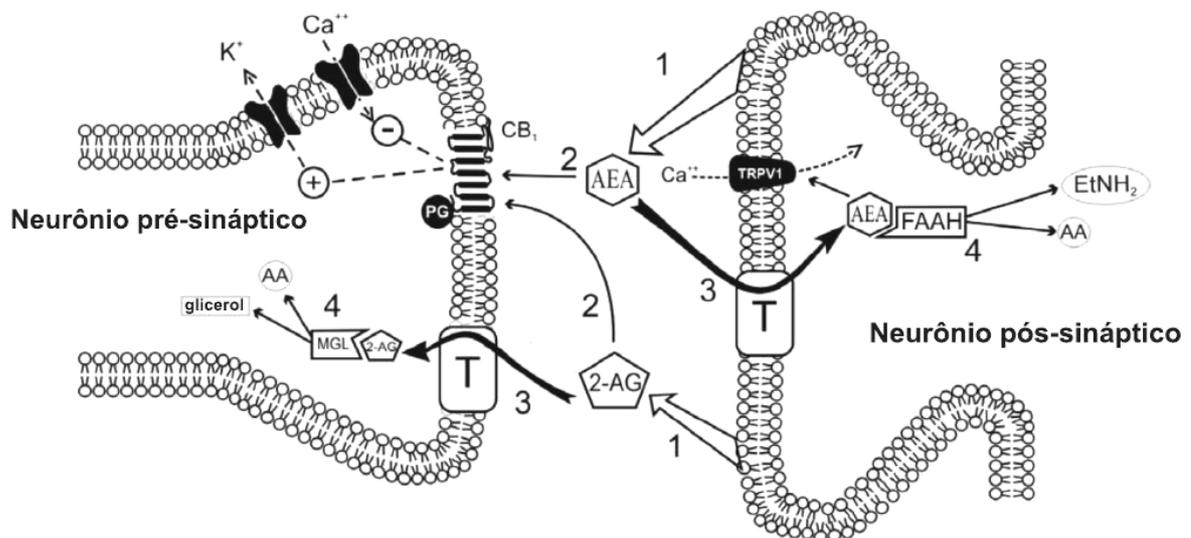


Figura 1.1 Representação esquemática do ECS mostrando em: (1) a síntese de eEC pelo neurônio pós-sináptico, (2) a ligação dos eECs no receptor canabinóide CB1 no neurônio pré-sináptico – restrição da atividade neuronal, (3) a captação dos eECs na fenda sináptica – 2-AG pelo neurônio pré- e AEA pelo neurônio pós-sináptico e (4) degradação dos eECs – AEA sofre hidrólise pela FAAH e o 2-AG pela MGL (adaptado de Saito e cols., 2010).

1.2 PAPEL DO SISTEMA ENDOCANABINÓIDE NA ANSIEDADE

1.2.1 Aspectos Gerais da Ansiedade

A ansiedade constitui uma emoção normal, advertindo sobre perigos de dano físico, dor, impotência, possíveis punições, separação social, entre outros (62). Desta forma, ela estimula o organismo a tomar as medidas necessárias para impedir a ameaça ou, no mínimo, reduzir suas conseqüências (63). Ademais, a ansiedade parece estar intimamente associada ao medo, uma resposta emocional básica frente a um estímulo ameaçador no ambiente, estando o seu circuito neural envolvido em alguns tipos de ansiedade (64; 65).

Em mamíferos, o medo e a ansiedade fazem parte das primeiras linhas de defesa, compreendendo a habilidade de prever o perigo antes que ele ocorra de fato (66). Neste contexto, e considerando que foram moldados ao longo da evolução pelo processo de seleção natural, o medo e a ansiedade têm um importante significado adaptativo e evolutivo, sendo emoções fundamentais para a sobrevivência (67; 68; 69).

A ansiedade pode ser observada em duas importantes formas, a saber: ansiedade traço e ansiedade estado. A primeira corresponde a uma resposta persistente e duradoura, inerente à personalidade do indivíduo, indicando a forma com que ele interage com seu ambiente físico e social. A ansiedade estado, por sua vez, é a resposta de um indivíduo a uma situação específica. Essa resposta pode mudar, ao longo do tempo, em decorrência do nível de estresse e de acordo com o modo com que este é percebido pelo indivíduo (62).

Apesar de ser uma resposta emocional normal, a ansiedade pode adquirir características patológicas no homem, ocorrendo em momentos inapropriados ou de forma exacerbada (62). Neste estado a resposta emocional torna-se inadequada a um determinado estímulo, em virtude de sua intensidade e/ou duração. Pode provocar confusão e distorções da percepção temporal e espacial em relação a pessoas e ao significado dos acontecimentos. Estas distorções podem interferir no aprendizado pela diminuição da concentração, redução da memória e prejuízo da capacidade de associação (63).

A ansiedade varia tanto em termos quantitativos (i.e., duração e intensidade), como qualitativos. Uma simples preocupação diária persistente é diferente de uma expectativa a um desafio, que por sua vez também é diferente de uma crise súbita, rápida, imprevisível e irracional de medo intenso. Essas respostas podem ser normais em condições apropriadas, porém, patológicas e mal adaptadas quando em situações inapropriadas. Essas diferenças fenomenológicas também podem ser acompanhadas por diferenças em termos das respostas fisiológicas, autonômicas e farmacológicas, o que levou à necessidade de se descrever e entender melhor as diversas reações comportamentais e fisiológicas associadas à ansiedade (70).

Nesse contexto, os distúrbios associados à ansiedade podem ser classificados com base nos seus fenômenos (intensidade, duração, qualidade, curso natural do distúrbio, sintomas e histórico familiar), respondendo de maneira diferenciada aos tratamentos farmacológicos disponíveis atualmente. A ansiedade patológica necessita de intervenção terapêutica e pode ocorrer em decorrência de outras patologias, psicológicas e/ou fisiológicas, sendo considerada, nesses casos, uma manifestação secundária. Quando é a principal ou única manifestação observada, a ansiedade se enquadra nos distúrbios ou transtornos de ansiedade primária (71).

Pela classificação do DSM-IV (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, elaborado pela Associação Psiquiátrica Americana – APA), em vigor desde 1994, os vários tipos de ansiedade patológica podem ser classificados em: ansiedade generalizada, pânico – com ou sem agorafobia, distúrbio obsessivo-compulsivo, distúrbio do estresse pós-traumático, distúrbio de ansiedade atípica e fobias (agorafobia, social e simples). Além disso, sabe-se que os diversos tipos de ansiedade afetam diferentemente as estruturas cerebrais (62). Neste sentido, os sistemas neurais envolvidos na ansiedade, normal e patológica, vêm sendo intensamente investigados, podendo sua elucidação contribuir significativamente para uma melhor compreensão de funções específicas dentro do complexo circuito neural responsáveis pelas emoções de medo e ansiedade (70), assim

como para o desenvolvimento de novos tratamentos farmacológicos para os distúrbios a eles associados.

1.2.2 Bases Neuroanatômicas da Ansiedade

Por ser essencialmente uma resposta emocional, é de se esperar que as estruturas implicadas na ansiedade façam parte do sistema límbico (72). Este compreende a parte mais velha, filogeneticamente, do córtex cerebral e é considerado o centro das emoções (66). Em 1878, o neurocirurgião francês Paul Broca, cunhou a expressão 'sistema límbico' para se referir ao anel cortical que envolve o tronco encefálico (73). Com base em evidências experimentais e clínicas, o neuroanatomista James Papez deu uma conotação funcional a este conceito de sistema límbico, identificando neste um papel chave no controle das emoções. Foi o Circuito de Papez, um dos primeiros a implicar também o hipocampo na regulação das emoções (72; 74; 75).

Este circuito, compreendendo estruturas do lobo límbico até então identificadas (giro para-hipocampal, giro do cíngulo, giro subcaloso e o córtex subjacente à formação hipocampal), formava o principal substrato neural das emoções. Papez, ao elaborar um circuito que explicava a comunicação dos centros corticais superiores com o hipotálamo, propôs um papel de processador de informações neurais de caráter emocional ao hipocampo (p.e. 72). Sabe-se hoje que essa estrutura transmite informações aos corpos mamilares do hipotálamo, via o fórnix. Seguindo este circuito, as informações de cunho emocional são então projetadas dos corpos mamilares para o tálamo, passando pelo trato mamilotálamico, para depois seguirem até o giro do cíngulo. Por fim, a atividade neural é repassada para outras regiões corticais a partir do córtex cingulado, recebendo, assim, novos aspectos emotivos (p.e. 72; Figura 1.2).

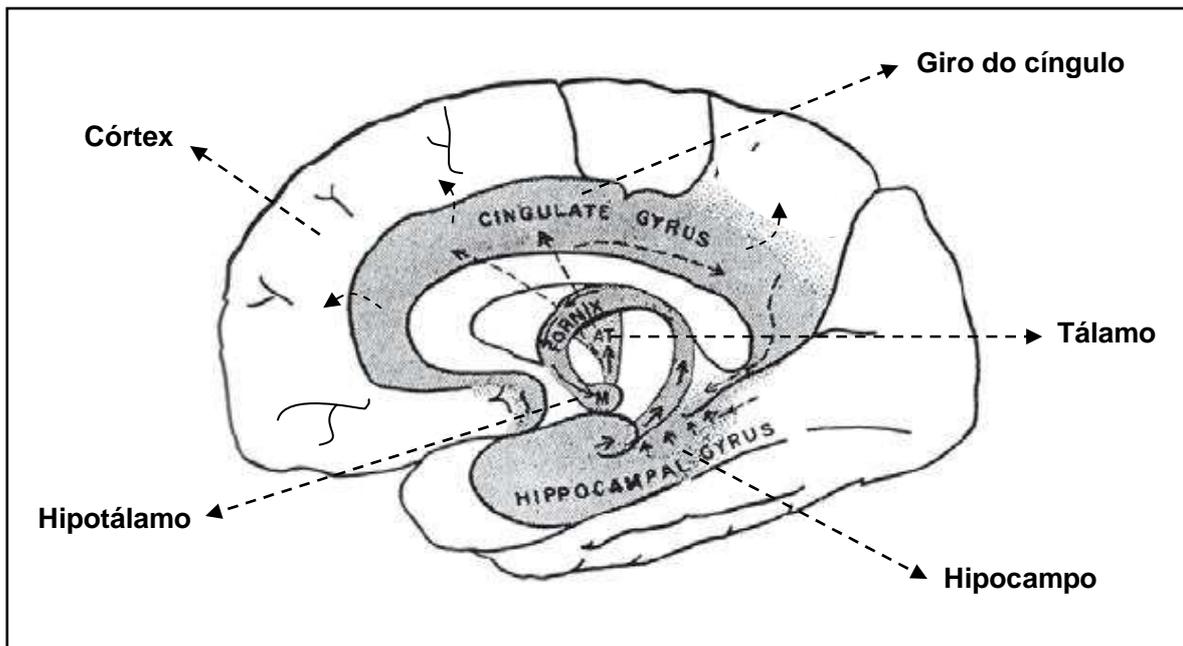


Figura 1.2 Esquema ilustrativo do circuito de Papez (adaptado de Ribas, 2007).

Contudo, novos estudos indicaram a participação de outras estruturas na regulação das emoções. A exemplo disso, Paul MacLean, em 1949, acrescentou outras estruturas ao Circuito de Papez, como o hipotálamo - que regula a expressão neurovegetativa e hormonal dos estados emocionais - e a amígdala - que exerce papel fundamental sobre o medo e a ansiedade (76).

1.2.3 Bases Neuroquímicas da Ansiedade

Diversas vias neurotransmissoras têm sido implicadas nas respostas de medo/ansiedade, porém, o maior número de trabalhos está focado na serotonina (5-HT) e no GABA. Esta ênfase em determinadas vias está, possivelmente, associada à comprovada eficácia clínica de compostos que afetam esses neurotransmissores na modulação das respostas de medo e ansiedade (62). Como o presente estudo se propôs a investigar os efeitos do ansiolítico benzodiazepínico diazepam, que modula a neurotransmissão GABAérgica, apenas essa via será discutida a seguir.

O GABA, um aminoácido derivado da glutamina, é principal neurotransmissor inibitório do CNS (72). Os neurônios GABAérgicos enervam estruturas cerebrais distantes de seus corpos celulares e dendritos (na via mesoestriatal e no córtex cerebelar), mas em sua maioria, estão envolvidos na modulação local, prevenindo uma atividade neural excitatória excessiva. Inclusive, estruturas corticais do sistema límbico, conhecidamente envolvidas na modulação da ansiedade, como o hipocampo, o septo, a amígdala e a matéria cinzenta periaquedutal (MCP), contém inúmeras redes de interneurônios GABAérgicos e projeções GABAérgicas (77; 78).

Os receptores para GABA se dividem em duas grandes classes: os ionotrópicos (GABA_A e GABA_C) e os metabotrópicos (GABA_B). A diferença entre esses receptores tem como base a localização, a utilização e/ou tipo de segundo mensageiro e aspectos farmacológicos (79). Os receptores do tipo GABA_A e GABA_C são canais iônicos transmembrânicos, porém, diferem farmacologicamente. Ambos são formados por cinco subunidades transmembrana e, quando ativado pela ligação extracelular de GABA, aumentam a permeabilidade da membrana aos íons de cloreto (80; 81).

Nos receptores do tipo GABA_A, as subunidades são formadas por proteínas com estruturas distintas, pertencentes a diferentes famílias. A maioria dos receptores GABA_A é formada por subunidades das famílias α -(1-6), β -(1-3) e γ -(1-3) (82). Quando este receptor está localizado na membrana pós-sináptica, o influxo de cloreto induz uma hiperpolarização do neurônio em questão, dificultando a despolarização excitatória, resultando na inibição da transmissão, conhecida como inibição pós-sináptica. Já os receptores GABA_A localizados na membrana pré-sináptica, promovem o efluxo de cloreto, despolarizando a célula, resultando em uma menor liberação do neurotransmissor excitatório na fenda sináptica – uma inibição pré-sináptica (79; 72).

Dentre os receptores GABAérgicos, os do tipo GABA_A foram, por muito tempo, os mais estudados por serem o sítio de ação de substâncias que agem como ansiolíticos,

sedativos, anticonvulsivantes e relaxantes musculares. Estudos recentes revelaram a existência de vários subtipos de receptores GABA_A e pesquisas com roedores sugerem que os diversos efeitos dos ansiolíticos benzodiazepínicos parecem estar ocorrendo em decorrência de sua ação nos diferentes subtipos desse receptor (82). A ativação da via inibitória GABAérgica é o mecanismo básico de ação dos ansiolíticos benzodiazepínicos no tratamento dos distúrbios de ansiedade generalizada, pânico, distúrbios do sono e na epilepsia (83).

1.2.4 Influência do Sistema Endocanabinóide na Ansiedade

Do ponto de vista neuroanatômico, há uma sobreposição considerável entre o circuito neural envolvido nas emoções e a localização de receptores CB1 no CNS. Esses receptores, por exemplo, estão presentes no córtex pré-frontal, na amígdala, no hipocampo, no estriado ventral, no tálamo e no hipotálamo, tanto de humanos (84; 85), quanto de roedores (30; 24). Além disso, os receptores CB1 podem ser encontrados em projeções excitatórias, assim como em projeções inibitórias GABAérgicas (57), e estão posicionados de forma a modularem a atividade do neurônio. Apesar desses aspectos, apenas recentemente começou-se a investigar os efeitos específicos da manipulação dos receptores CB1 em testes pré-clínicos de ansiedade. De fato, a intoxicação por *Cannabis* produz uma série de efeitos nas emoções, que incluem euforia, redução da ansiedade, alívio do estresse e aumento na sensação de bem-estar (86). Esses efeitos também são observados em estudos pré-clínicos com modelos animais (87).

Neste sentido, a ativação farmacológica dos receptores CB1, a inibição da degradação de AEA e a inibição da recaptção de eECs induzem efeitos ansiolíticos em diferentes testes comportamentais de ansiedade utilizando roedores (p.e. labirinto em cruz elevado [88; 89; 90; 91; 92; 93; 94; 95; 96], labirinto em círculo elevado [97] e na caixa claro-escuro [98; 99]). Entretanto, estudos dose-resposta tem demonstrado que o efeito da

ativação direta do receptor CB1 parece ser bifásica, onde doses baixas induzem efeitos ansiolíticos e doses altas induzem efeitos ansiogênicos (100). Esse efeito dose-resposta parece ocorrer em decorrência de uma saturação diferenciada dos receptores CB1 nas regiões cerebrais relacionadas à emotividade (101). Por outro lado, a capacidade que a AEA tem de também ativar os receptores TRPV1 no cérebro levou à hipótese de que essa ativação induz os efeitos ansiogênicos indesejados obtidos com compostos canabinóides em testes pré-clínicos (100).

A administração crônica de antagonistas do receptor CB1 em testes pré-clínicos, por sua vez, demonstrou que o bloqueio crônico da sinalização endocanabinóide aumenta os índices de ansiedade e depressão (102; 103; 104). Vale ressaltar também que o antagonismo dos receptores CB1 induziu efeitos ansiolíticos (105), ansiogênicos (106) ou até mesmo nenhum efeito (107) em estudos pré-clínicos. Esses resultados contraditórios parecem ser devido à vários fatores metodológicos, incluindo a espécie utilizada, a dose, o tipo de teste, as condições em que os testes são conduzidos ou ainda em decorrência de efeitos indesejados (p.e. ativação de receptores vanilóides).

Camundongos *knockout*, sem a expressão de receptores CB1 demonstraram um aumento nos comportamentos de ansiedade na caixa claro-escuro (108), no labirinto em cruz elevado (109; 110; 111; 112) e no teste de interação social (108). Além disso, animais sem a expressão de receptores CB1 foram mais susceptíveis aos efeitos de um estresse crônico (108), demonstraram uma hiperativação do eixo hipófise-pituitária-adrenal (HPA; 113; 110), tiveram uma neurogênese hipocampal debilitada (114) e apresentaram respostas reduzidas a estímulos de recompensa, como o açúcar e o álcool (115; 116).

Ao contrário do que ocorre em animais sem a expressão dos receptores CB1, aqueles que não expressam a enzima FAAH (que degrada eECs) exibem respostas ansiolíticas nos testes do labirinto em cruz elevado (16), do campo aberto (117) e da caixa claro-escuro (92; 94). A deleção genética da enzima FAAH também evitou o surgimento de efeitos ansiogênicos em animais expostos a um estresse social (118). Esses dados sugerem, portanto, que a deleção gênica de FAAH aumenta a atividade da AEA, induzindo

um fenótipo típico de resistência ao estresse, em contraste com o perfil dos animais *knockout* para receptores CB1 que foram particularmente susceptíveis a prejuízos relacionados ao estresse nas respostas emocionais (119). Dessa forma, é provável que o aumento da sinalização endocanabinóide seja capaz de induzir efeitos ansiolíticos, enquanto que a inibição desse sistema pode levar a prejuízos relacionados às emoções (119).

1.3 PAPEL DO SISTEMA ENDOCANABINÓIDE NA DEPENDÊNCIA

1.3.1 Aspectos Gerais da Dependência

O estado físico e/ou psicológico causado pela ação recíproca entre um organismo vivo e um fármaco é denominado farmacodependência (120). O impulso irreprimível de usar o fármaco, de forma contínua ou periódica, a fim de experimentar seus efeitos psíquicos e evitar o mal-estar induzido pela sua privação, caracterizam a farmacodependência. Essas características persistem mesmo após evidências de efeitos prejudiciais à saúde do usuário. Além disso, indivíduos farmacodependentes apresentam alterações comportamentais e desprezam fontes alternativas de prazer. Vale ressaltar, porém, que nem todos os usuários de droga são, de fato, dependentes. O desenvolvimento da dependência, e dos prejuízos fisiológicos, psicológicos e sociais que podem ou não acompanhá-la, ocorre, normalmente, após exposições repetitivas e uso prolongado. Mais do que o prazer e a euforia gerados pelo uso inicial de uma determinada substância, são os efeitos progressivos, a longo prazo, que parecem mediar as patologias fisiológicas e psicológicas relacionadas ao abuso de determinadas substâncias psicoativas (121).

Os fatores que podem levar ao abuso e a dependência de drogas são variados, podendo ser de origem biológica, psicológica, sócio-cultural ou ainda envolver todos ou alguns destes fatores. Sabe-se, porém, que essa capacidade está relacionada à ativação das áreas neurais relacionadas aos reforçadores naturais, tais como alimento, água e sexo,

sendo que todos têm o efeito comum de aumentar a probabilidade de ocorrência de comportamentos diretamente a eles associados (122).

A dependência às drogas pode ser definida como uma síndrome comportamental, com fatores neurobiológicos, que resulta no consumo compulsivo de drogas, com recaídas frequentes (123). Esse comportamento é comum, pode ocorrer mesmo depois de muitos anos de abstinência e está associado a consequências desastrosas para o indivíduo, incluindo a morte. A compulsão pelo uso da substância relacionada ao reforço positivo (prazer) para a continuidade do uso é considerada o componente psicológico da dependência, sendo, por alguns autores, diferenciada da dependência física e da síndrome de abstinência (124).

A dependência constitui-se de três elementos – a substância, o indivíduo e o contexto ambiental sócio-econômico - e não é um processo que se instala repentinamente no indivíduo sendo, na verdade, um processo contínuo, constituído de cinco etapas gerais: (1) *aquisição*, relacionada aos mecanismos neurais de reforçamento e o poder inerente da droga em gerar dependência; (2) *manutenção*, formação do hábito de consumir a droga (125); (3) *retirada*, interrupção do consumo da droga; (4) *compulsão*, associada ao intenso desejo de se obter e consumir a droga após sua retirada (126); e (5) *recaída*, retomada do comportamento de busca e auto-administração da droga (125). Essa divisão tem uma finalidade fundamentalmente didática, uma vez que as diferentes etapas se sobrepõem consideravelmente em relação à sintomatologia observada, aos componentes neuroquímicos e fisiológicos que subsidiam as respostas detectadas, assim como às áreas cerebrais ativadas.

O entendimento do circuito de recompensa, nos anos 50, levou ao entendimento da dependência através de sua ação neuroquímica. Muitos estudos tem buscado elucidar os mecanismos e sistemas que medeiam o reforçamento positivo durante a aquisição da dependência. O principal sistema envolvido é a via dopaminérgica mesocorticolímbica,

relacionada com o controle das emoções e padrões comportamentais. Essa via, com origem na área tegmental ventral do mesencéfalo (VTA), projeta para o estriado ventral, incluindo o núcleo *accumbens* (NAc) e outras regiões do sistema límbico, como a amígdala e o septo, assim como para diferentes áreas corticais pré-frontais (125). Esta via de neurotransmissão dopaminérgica é também conhecida como via reforçadora, do prazer ou das emoções (127).

Na verdade, o aumento na disponibilidade extracelular de DA no NAc está intimamente relacionado ao comportamento de auto-administração e aos processos de reforçamento positivo que, por sua vez, subsidiam a aquisição da dependência por várias drogas psicoativas (128; 129; 130). As propriedades da transmissão dopaminérgica, no NAc e no córtex pré-frontal, são mais consistentes na motivação e no reforçamento positivo, e portanto, o NAc atuaria como uma interface entre a motivação e a ação (131).

Atualmente sabe-se que outros neurotransmissores podem ser fundamentais para farmacodependência, como a serotonina (5-HT), o glutamato e o GABA (122). Ademais, o eixo HPA também é alterado por drogas de abuso, podendo os hormônios por ele liberado exercer um efeito importante sobre os mecanismos envolvidos na dependência, em especial a recaída (133; 134).

1.3.2 Farmacodependência e Cocaína

A cocaína é uma das drogas de abuso mais utilizadas no mundo. Dados da Organização Mundial de Saúde estimam que, até 2008, aproximadamente 19 milhões de pessoas ao redor do mundo fizeram o uso da cocaína (WHO, 2010). Foram 31.800 mortes relacionadas às drogas nos EUA, somente em 2007 – mais do que o dobro do número de mortes por assassinato; cerca de 40% destas estavam relacionadas ao uso de cocaína. Entre 2002 e 2007, a WHO estima que essas mortes prematuras custaram 33 bilhões de dólares aos EUA.

A cocaína é um alcalóide estimulante extraído da folha do arbusto de coca (*Erythroxylon coca*), uma planta encontrada tipicamente na Bolívia, Peru, Colômbia e Equador, com alto poder de causar dependência. O principal efeito, em curto prazo, provocado pelo uso desse psicoestimulante nas doses habitualmente empregadas são euforia, bem estar, elevação do humor e aumento da auto-estima, além da exacerbação da sociabilidade e sexualidade, diminuição da fadiga e do sono, e ainda melhora no desempenho de tarefas que exigem atenção e cautela (130). Esses, juntamente com um aumento na locomoção e vigilância, ocorrem em poucos segundos/minutos após o consumo e possuem um curto intervalo de duração, sendo dependente da dose e da via de administração.

Além dos efeitos comportamentais subjetivos, este psicoestimulante também provoca alterações fisiológicas marcantes na pressão arterial e frequência cardíaca, perda de peso conseqüente à perda de apetite, como também causa a dilatação da pupila e mudanças na temperatura corporal. Doses mais elevadas e/ou uso crônico e indiscriminado podem provocar episódios de agressividade, delírios, alucinações, distúrbios do humor, comportamentos estereotipados e irritabilidade (130), assim como cefaléia, hipertermia, hipertensão arterial, parada cardiorespiratória, convulsões e óbito (126).

Na dependência por cocaína os usuários tem grande dificuldade em evitar a procura pela droga, mesmo que isso tenha conseqüências negativas (135). Sabe-se que doses repetidas induzem um aumento da resposta motora e da motivação (136) e o uso contínuo leva à sensitização, isto é, aumento da resposta a estímulos. A sensitização duradoura induzida pela cocaína está relacionada à recaída (137). De fato, a recaída à cocaína é um dos obstáculos mais difíceis da reabilitação de dependentes (138).

A DA é o principal neurotransmissor envolvido no mecanismo de ação da cocaína, atuando como um agente da neuroadaptação relacionado à droga. A cocaína bloqueia a recaptção desse neurotransmissor liberado na fenda sináptica, uma vez que se liga às

proteínas transportadoras de DA (DAT), presentes na membrana pré-sináptica. Portanto, a cocaína leva a um aumento extracelular substancial de DA (122).

Estudos com camundongos *knockouts* para DAT (p.e. 139) sugerem, porem, que outros neurotransmissores também exercem um importante papel modulador na dependência por cocaína, via mecanismos dependentes e/ou independentes de DA (139; 140). Sabe-se, por exemplo, que a cocaína aumenta a disponibilidade de 5-HT no NAc (122), podendo haver uma interação entre os sistemas DA/5-HT nesta, e talvez em outras regiões com altas concentrações de receptores 5-HT. No NAc, este acúmulo proveniente da VTA é visto como um dos principais mecanismos subjacentes ao efeito reforçador e à hiperatividade induzida pela administração desse psicoestimulante (ex. 141). De fato, a administração de um antagonista de receptores 5-HT_{1A} (WAY 100635) bloqueou, enquanto que a de um agonista (8-OH-DPAT) aumentou a hiperatividade induzida por baixas doses de cocaína em roedores, sem alterar a capacidade dessa última em aumentar a disponibilidade de DA em regiões relacionadas ao processo de reforçamento (142; 143).

Poucos segundos após sua administração, a cocaína provoca alterações comportamentais, neuroquímicas e fisiológicas, como a alteração na concentração de cortisol, através da ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) e a inibição da prolactina (144). A primeira decorre, principalmente, de um aumento na liberação de CRF (fator de liberação de corticotropina) pelo hipotálamo, induzido pela cocaína, levando a um aumento significativo nos níveis circulantes de corticosterona em roedores (p.e. 145) e de cortisol em primatas não-humanos e no homem (146; 147). O mecanismo exato de como a cocaína estimula o eixo HPA ainda não está totalmente elucidado, apesar de haver indícios de uma modulação direta via neurotransmissores tais como DA e 5-HT (133; 134).

O eixo HPA é o principal sistema endógeno relacionado ao estresse e as respostas fisiológicas que o acompanham (148) Por isso, vários autores vêm sugerindo a existência de uma importante relação entre os mecanismos neurais que subsidiam a farmacodependência

e o estresse (148; 149; 150; 151). Sabe-se ainda que os glicocorticóides atuam diretamente sobre o mecanismo reforçador da cocaína, facilitando a neurotransmissão de DA no NAc (152). Portanto, os efeitos neuroendócrinos observados com a administração de cocaína podem subsidiar, em parte, os mecanismos da dependência por este psicoestimulante, além de induzir uma resposta de recaída após a sua retirada. Contudo, esta não é uma condição primordial para que a droga induza seus efeitos eufóricos/comportamentais, nem para o desenvolvimento da dependência (152).

Várias estratégias terapêuticas têm sido propostas para o tratamento da dependência por cocaína, incluindo a acupuntura (153) e vacinas, como também o uso de substâncias naturais (154). Entretanto, a influência do ECS, que pode ser um importante alvo para a modulação de diversos aspectos relacionados à dependência, ainda não está definida. Atualmente, as estratégias vão desde a modulação do sistema endocanabinóide (155) à farmacogenética (156). Mas, ainda não existe um tratamento farmacológico capaz de bloquear eficientemente a dependência por esse e outros psicoestimulantes. Estudos visam, portanto, o desenvolvimento de novos fármacos eficazes para o tratamento de usuários ou até mesmo para sua prevenção.

1.3.3 Influência do Sistema Endocanabinóide na Dependência

Os canabinóides e os compostos que estimulam a neurotransmissão endocanabinóide parecem influenciar o efeito de diversas drogas de abuso, a exemplo da cocaína (157; 158; 159). Ademais, os receptores canabinóides também estão localizados nas principais regiões cerebrais relacionadas à dependência, como a VTA, o NAc e o córtex pré-frontal (160). Portanto, o ECS pode modular os efeitos reforçadores primários das drogas de abuso e esta habilidade parece depender da liberação de eEC na VTA (161).

No estriado, os receptores canabinóides estão localizados nos terminais pré-sinápticos de neurônios glutamatérgicos e GABAérgicos e, também, nos terminais pós-

sinápticos GABAérgicos (162; 32). Quando estas células são despolarizadas, os eECs podem ser liberados no NAc (163) e na VTA (164), onde atuam como mensageiros retrógrados, modulando a neurotransmissão excitatória (glutamatérgica) e inibitória (GABAérgica) que controla os neurônios dopaminérgicos da via mesocorticolímbica. Esta via dopaminérgica possui uma função bem estabelecida nos efeitos reforçadores das drogas de abuso.

A administração de agonistas dos receptores CB1 (165) e a administração de cocaína (166), são capazes de aumentar as concentrações de DA no NAc. Em humanos, o uso de Δ^9 THC resultou no aumento da neurotransmissão dopaminérgica (167) ou ainda não teve efeito (168). O bloqueio dos receptores canabinóides, por sua vez, reduziu os efeitos reforçadores de drogas de abuso como opiáceos, nicotina, álcool e cocaína, indicando o envolvimento do ECS nos mecanismos neurobiológicos da dependência (169). De fato, o tratamento de indivíduos com o antagonista do ECS rimonabant reduziu as respostas neuronais à recompensa (170). Entretanto, o uso de antagonistas canabinóides, como o rimonabant, foi abandonado devido à associação deste tratamento com o aumento de casos de depressão e suicídio (171).

Além disso, a administração de cocaína foi capaz de aumentar as concentrações de AEA no CNS (172), enquanto que o bloqueio dos receptores CB1 atenuou a hiperatividade da DA induzida pela administração de cocaína no NAc (Cheer e cols., 2000). Neste sentido, a administração crônica de cocaína induziu uma diminuição modesta, porém significativa, nos níveis de 2-AG em estruturas do sistema límbico (172).

Vale ressaltar que, os primeiros achados são de estudos *post mortem*, por isso, ainda não está claro se esses dados refletem as reais alterações nos níveis de eECs ou alterações agudas na formação de eECs. Além disso, esses estudos consideraram um regime de administração não-contingente, o que pode produzir efeitos neuroquímicos diferentes do que realmente ocorre no regime de auto-administração de livre escolha (173).

Sendo assim, mais estudos são necessários para se determinar a forma como os níveis de eECs são afetados pelo regime de administração. Atualmente, os diferentes aspectos envolvidos na dependência a drogas de abuso em humanos podem ser avaliados em estudos comportamentais com modelos animais. Estes modelos podem fornecer resultados valiosos para o melhor entendimento dos diferentes fatores que contribuem para os efeitos de drogas psicotrópicas (155).

Nesse sentido, o trabalho realizado por Caille e colaboradores em 2007 (174) foi o primeiro a mensurar os níveis de eECs durante a auto-administração de uma droga de abuso. Este estudo revelou que a auto-administração de cocaína não foi capaz de alterar os níveis de AEA e 2-AG no NAc. Bequet e colaboradores, em 2007 (175), demonstraram que o agonista inverso de CB1 aumentou a liberação de AEA no hipotálamo de ratos, enquanto que o WIN 55,212-2 diminuiu e induziu efeitos opostos na liberação de 2-AG.

1.4 USO DE PRIMATAS NÃO-HUMANOS EM MODELOS ANIMAIS

Muitas são as dificuldades em se trabalhar com primatas não-humanos. A exigência de uma dieta especial, grandes espaços, higienização de recintos e complexas interações sociais são parâmetros importantes que precisam ser levados em consideração a fim de evitar anormalidades comportamentais e fisiológicas (176; 177; 178; 179). Neste contexto, e com o intuito de minimizar as dificuldades relacionadas ao custo e à manutenção de primatas não-humanos em cativeiros, surgiu, nas últimas duas décadas, um interesse especial pelas espécies do Novo Mundo, correspondente àquelas que ocorrem na América Central e América do Sul (180).

O gênero *Callithrix*, particularmente, pode ser encontrado habitando diversas regiões, desde a bacia Amazônica e Mata Atlântica, até o cerrado do Planalto Central. Apesar da grande destruição do seu *habitat* e conseqüente risco de extinção, as espécies *Callithrix jacchus* (mico-comum) e *C. penicillata* (mico-estrela: Figura 1.3) nunca foram consideradas

ameaçadas ou estiveram vulneráveis à extinção. Essas duas espécies são ainda conhecidas por habitarem regiões caracteristicamente inóspitas (cerrado e caatinga) e se adaptam facilmente ao cativeiro, em comparação a outros símios (181; 182).



Figura 1.3 Fotografia do mico-estrela adulto (*Callithrix penicillata*) em seu habitat natural (Foto: Marília Barros).

Este gênero, pertencente à família dos calitriquídeos, pesa entre 250-450g quando adulto, tem uma expectativa de vida de 10-12 anos em cativeiro, atinge a maturidade sexual aos 12-18 meses, apresenta uma gestação de aproximadamente 145 dias, dando a luz a gêmeos e tendo um anestro pós-parto (183; 181; 184; 185; 182). Além disso, estes pequenos primatas neotropicais possuem um sistema nervoso que se assemelha ao dos demais antropóides (186).

Outra vantagem na pesquisa com primatas é a quantidade de comportamentos que se pode obter (187), variando desde comportamentos auto-direcionados a complexos

comportamentos sociais. Ademais, todas as espécies de macacos apresentam altos índices cognitivos e capacidade manipulatória.

1.4.1 Uso de Primatas Não-Humanos em Testes de Ansiedade

O uso de primatas não-humanos como modelo para investigar medo e ansiedade é baseado não apenas na sua proximidade filogenética a humanos, mas também no fato de que eles exibem respostas comportamentais e fisiológicas semelhantes à de humanos, quando a ansiedade é induzida experimentalmente (188; 189). Ademais, a complexidade do cérebro de primatas não-humanos e a sua semelhança ao do homem colaboram para o uso desses sujeitos em experimentos para investigar os mecanismos neurobiológicos das emoções humanas, como o medo e a ansiedade. De fato, várias espécies de primatas não-humanos têm sido utilizadas como último passo em ensaios pré-clínicos para averiguar a segurança e eficácia de novos tratamentos farmacológicos antes destes compostos serem testados em humanos (179).

Os calitriquídeos também apresentam uma variedade de respostas comportamentais quando deparados com diferentes situações ambientais, sendo o perfil geral ainda presente em micos mantidos em cativeiro (182). Em diversos tipos de situações de ameaça, estes pequenos primatas apresentam um repertório comportamental complexo, mas facilmente discernível, variando desde expressões faciais e vocalizações específicas, até alterações posturais (ex. coçar, marcação-de-cheiro, catação e exposição genital) (182). Este vasto repertório comportamental, juntamente ao baixo custo de manutenção, fácil manejo, adaptabilidade ao cativeiro e alta taxa reprodutiva, vêm contribuindo para o estabelecimento desses símios como sujeitos experimentais em investigações biomédicas, comportamentais e neuropsicofarmacológicas (180).

Em primatas não-humanos, vários testes têm sido validados. Tais procedimentos experimentais podem ser agrupados em: (1) testes de respostas condicionadas (ex. choque

elétrico e *puff* de ar nos olhos – 82); e (2) testes de respostas inatas, tais como: interação social (p.e. 190), isolamento social (p.e. 191), ‘ameaça humana’ – AE (p.e. 192) e confronto com predador – CP (p.e. 193). Visto que testes de resposta condicionada necessitam de uma fase de aprendizado (pré-treino) e de um grau de motivação, podem empregar estímulos dolorosos e não apresentam respostas de linha de base (194), testes mais etologicamente-baseados – que avaliam respostas inatas – também foram desenvolvidos para primatas não-humanos.

Nesse contexto, o isolamento social e a falta de rotas de fuga e/ou de proteção podem desencadear respostas emocionais (195). Exposições curtas a um ambiente novo induzem uma rápida habituação das respostas comportamentais (196), minimizando o gasto energético com comportamentos antipredatórios assim que a situação é percebida como sendo segura (197).

Em roedores, vários compostos têm sido empregados em estudos em um campo aberto (ambiente desconhecido), incluindo ansiolíticos (benzodiazepínicos – p.e. 198; ligantes serotoninérgicos – p.e. 199; e peptídeos – p.e. 200), bem como também compostos estimulantes (cocaína e anfetamina) e sedativos/neurolépticos (revisado em 201). Já existem dados relacionados aos efeitos da exposição a um ambiente novo em primatas não-humanos, entretanto, a influência de ansiolíticos e de ligantes canabinóides neste tipo de procedimento ainda não foi testada em macacos. O teste do campo aberto é amplamente utilizado em roedores para avaliar os comportamentos relacionados à exploração e ansiedade.

1.4.2 Uso de Primatas Não-Humanos em Testes de Dependência

A dependência é um distúrbio comportamental complexo que possui diversos aspectos a serem elucidados. Para melhor entender os efeitos neuroquímicos, comportamentais e fisiológicos resultantes do consumo da cocaína, contribuições

significativas tem sido obtidas através de estudos que empregam modelos animais. Estudos dessa natureza permitem verificar de forma mais controlada os efeitos da administração de cocaína, por exemplo, assim como avaliar a relação desses com vários estímulos ambientais que contribuem para a dependência. Por outro lado, estudos clínicos, realizados com usuários, apresentam complicações éticas e metodológicas (148).

Em relação à dependência à cocaína, ratos são empregados em vários parâmetros tais como auto-administração (202) e teste de preferência por lugar (203). Um dos mais confiáveis e difundidos testes de dependência à cocaína é o teste de auto-administração (204; 203).

Vale ressaltar, porém, que existe uma grande diferença genética entre humanos e roedores (205), o que pode dificultar a extrapolação destes resultados para humanos. Para minimizar possíveis restrições ao se generalizar para humanos os resultados obtidos com roedores, primatas não-humanos tem sido empregados com uma frequência cada vez maior (206) nos últimos 40 anos (207; 204; 202).

A homologia genética entre os primatas não-humanos e os humanos chega a 95%, dependendo da espécie (208). Uma maior proximidade filogenética reflete uma maior similaridade anatômica, fisiológica e comportamental. Esses aspectos filogenéticos, a organização morfofuncional, as respostas fisiológicas, os componentes neuroquímicos e o comportamento de primatas não-humanos são mais parecidos com os de humanos que os de qualquer outro modelo animal (209). Nesse sentido, contribuições significativas podem ser obtidas via o estudo de primatas, principalmente os micos (187).

Desta forma, ao se comparar roedores e primatas, várias diferenças já foram apontadas, como por exemplo: (1) na organização morfológica, conectividade e desenvolvimento do sistema dopaminérgico mesocorticolímbico (210; 211; 212); (2) na forma de liberação e recaptção de DA no estriado (213); (3) na homologia gênica do transportador DAT (214); (4) na densidade e distribuição dos receptores no circuito neural

da dependência (p.e. 215) e (5) nas respostas metabólicas do cérebro à diferentes psicoestimulantes (p.e. 216). Ademais, tem-se uma melhor previsibilidade farmacocinética em símios do que em roedores (217). Estudos de longo prazo e comparações intra-individuais, com um número menor de sujeitos, são possíveis em várias espécies de primatas graças à sua longevidade (209). Algumas espécies chegam a viver mais que 40 anos (218). Essa característica tem implicação direta na vantagem de se utilizar primatas não-humanos em estudos que levam em conta uma idade específica, p.e. a adolescência (187). Ademais, primatas não-humanos demonstraram todos os sinais possíveis após a retirada de opióides, incluindo vômitos, soluços, palidez e cólicas abdominais, sendo os mesmos vistos em humanos (209). Roedores, por outro lado, não apresentam esses sintomas de retirada. Da mesma forma, outro efeito mais sutil das drogas de abuso, a alucinação, só pode ser percebido em primatas não-humanos (219).

Mas, pouco ainda se sabe a respeito do efeito comportamental e hormonal da administração repetida de cocaína em primatas, e em especial no mico-estrela.

2 OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivo geral investigar, em micos-estrela adultos (*Callithrix penicillata*), o efeito da administração de ligantes de receptores canabinóides CB1 nos comportamentos de (1) ansiedade induzidos pela exposição a um ambiente desconhecido e (2) vigilância e locomoção induzidas pela administração repetida de cocaína.

Especificamente, este trabalho se propôs a:

- a) avaliar comportamentos indicativos de ansiedade em micos-estrela, induzidos por uma exposição aguda, rápida e individual a um ambiente desconhecido, após a administração sistêmica do ansiolítico benzodiazepínico diazepam ou seu veículo (controle);
- b) determinar se a administração sistêmica de um agonista e um antagonista de receptores canabinóides CB1, WIN 55-212,2 e AM 251, respectivamente, modula comportamentos indicativos de ansiedade em micos-estrela, induzidos por uma exposição aguda, rápida e individual a um ambiente desconhecido;
- c) verificar o efeito da administração sistêmica e repetida de cocaína nos comportamentos de vigilância e locomoção em micos-estrela, assim como na concentração sérica de cortisol;

- d) avaliar se o pré-tratamento sistêmico com um agonista e um antagonista de receptores canabinóides CB1, WIN 55-212,2 e AM 251, respectivamente, modula os efeitos induzidos pela administração sistêmica e repetida de cocaína nos comportamentos de vigilância e locomoção em micos-estrela.

O presente trabalho foi dividido em quatro estudos, descritos a seguir. Todo o procedimento foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (Anexo A).

3 ESTUDO 1: Efeitos do diazepam nas respostas comportamentais indicativas de ansiedade induzidas pela exposição a um ambiente novo

3.1 INTRODUÇÃO

O confronto forçado com um ambiente novo, do qual a fuga é impedida pela presença de barreiras ou paredes, é bastante utilizado para o estudo das emoções em diversas espécies de animais (220; 201). Em roedores, particularmente, os comportamentos relacionados à ansiedade induzidos por esta condição experimental podem se dar devido ao isolamento social e/ou agorafobia, podendo ser revertidos com o uso de ansiolíticos (p.e. benzodiazepínicos - BZD, agonistas de receptor 5-HT_{1A}; 201). Contudo, as condições em que estes experimentos são conduzidos (p.e. tamanho e forma do aparato, presença de objetos em seu interior, iluminação e duração do teste), assim como a resposta comportamental observada e o efeito da administração de drogas de referência variam muito dependendo do modelo animal utilizado.

Sabe-se também que, ambientes desconhecidos podem ser uma importante fonte de estresse, medo e ansiedade para primatas não-humanos. Em micos, ambientes novos induzem vocalizações de contato, além de elevar as concentrações de cortisol e a frequência cardíaca (221; 222; 223). Em se tratando de uma situação que pode aumentar o risco de predação, ambientes desconhecidos também exigem do indivíduo uma vigilância freqüente e eficiente (224). Estes pequenos animais arbóreos e diurnos formam grupos estáveis de 2-13 indivíduos (182), apresentam cuidado parental de sua prole (Yamamoto, 1993) e sofrem uma das mais altas taxas de predação dentre os primatas (225). Portanto, o isolamento dos demais membros do seu grupo e a falta de rotas de fuga e/ou de proteção podem desencadear respostas emocionais durante estas situações (224). Exposições curtas a um ambiente novo induzem uma rápida habituação das respostas comportamentais (196), minimizando o gasto energético com comportamentos antipredatórios assim que a situação

é percebida como sendo segura (197). Tal aspecto é visto tanto em animais de cativeiro, quanto os de vida livre (197; 225; 180).

Já existem dados relacionados aos efeitos da exposição a um ambiente novo em primatas não-humanos, entretanto, a influência de ansiolíticos neste tipo de experimento ainda não foi testada em macacos. O teste do campo aberto é amplamente utilizado em roedores para avaliar os comportamentos relacionados à exploração e ansiedade.

3.1.1 Teste do Campo Aberto

Hall, em 1934, originalmente descreveu o teste do campo aberto (CA) para se estudar a emoção em roedores (revisado em 226). Esse procedimento consiste em submeter um animal a um ambiente desconhecido, em que a fuga é impedida por paredes circundantes. O CA é um dos aparatos mais utilizado para testes psicológicos em animais, podendo ser encontrado em diferentes formatos (quadrados, retangulares, circulares), com diferentes tipos de luminosidade e presença ou não de objetos contidos dentro do campo (plataformas, colunas, túneis; 227).

O processo envolve, geralmente, o confronto forçado do animal com aquela determinada situação. Em geral, o indivíduo é colocado no centro ou próximo de alguma parede do aparato e determinados parâmetros comportamentais relacionados à atividade locomotora são mensurados ao longo de uma sessão, tais como: distância percorrida, tempo de permanência em movimento dentro da arena, número de entradas no compartimento central (ou outro previamente selecionado) e tempo de permanência neste compartimento (201).

O CA se tornou um aparato tão popular que é utilizado em várias espécies, incluindo coelhos, aves e primatas (220). De fato, o mesmo se tornou um procedimento eficaz para mensurar comportamentos não apenas relacionados à ansiedade, como também para o estudo da sedação e atividade. A ansiedade no CA, por sua vez, está relacionada a dois

fatores: isolamento social - onde o sujeito é separado do seu grupo social; e agorafobia – por ser uma arena ampla e diferente de seu ambiente natural/familiar. O tratamento com um ansiolítico, portanto, deve diminuir/bloquear a ação inibitória da atividade exploratória causada pelo estresse relacionado ao ambiente novo. No entanto, vale ressaltar que, a atividade exploratória pode ser aumentada por outros fatores, como a privação de água e/ou alimentos. Por isso é importante verificar a interação dos tratamentos com a alimentação antes de se afirmar a ocorrência de efeitos ansiolíticos (201).

Vários compostos têm sido empregados em estudos no CA, incluindo ansiolíticos (benzodiazepínicos – p.e. 228; ligantes serotoninérgicos – p.e. 199; e peptídeos – p.e. 200, 1989), bem como também compostos estimulantes (cocaína e anfetamina) e sedativos/neurolepticos (revisado em 201). Neste tipo de situação, roedores tendem a ficar na periferia do aparato ao invés de cruzarem pelo centro. O aumento no número de cruzamentos no compartimento central e o tempo de permanência neste compartimento indicariam uma possível atividade ansiolítica, enquanto que o contrário pode ser interpretado como um efeito ansiogênico. Já o aumento na atividade locomotora é sugestivo de um efeito estimulante, enquanto que a diminuição indicaria a ocorrência de sedação ou fraqueza (201).

3.1.2 Aspectos Farmacológicos dos Benzodiazepínicos

Os BZDs exercem diversos efeitos comportamentais em humanos e testes experimentais com animais, podendo ser utilizados como anticonvulsivantes, sedativos/hipnóticos, relaxantes musculares e ansiolíticos. Uma vez que apresentam um perfil farmacodinâmico semelhante, em termos de afinidade e eficácia, diferenças farmacocinéticas entre os compostos determinam em grande parte sua aplicabilidade clínica (77).

Esses compostos apresentam um sítio de ligação específico em receptores GABAérgicos, sendo esta ligação dependente da presença de subunidades α no receptor do tipo GABA_A. Uma vez ligado a esta subunidade, os BZDs alteram a conformação do receptor que, por sua vez, facilita a ligação do GABA ao mesmo, e assim aumenta a permeabilidade do canal de cloreto e amplifica a resposta biológica (72; 62; 77). Visto que dependem da presença de GABA na fenda sináptica para exercerem sua ação, os BZDs não possuem ação intrínseca própria, sendo considerados moduladores (e não mediadores) da atividade sináptica.

Além disso, estudos farmacológicos em camundongos transgênicos (229; 83) e primatas (82) têm apontado para funções distintas entre os diferentes subtipos do receptor GABA_A. De acordo com Rowlett e cols. (82), receptores formados pelas subunidades $\alpha 2$, 3 e 5 seriam responsáveis pelo efeito ansiolítico dos BZDs, enquanto que os efeitos motores e sedativos ocorreria pela ativação dos receptores formados pelas subunidades $\alpha 1$.

A identificação desses efeitos em diferentes receptores é um importante passo para o desenvolvimento de drogas seletivas para o tratamento de transtornos de ansiedade (229; 83; 82). De fato, a utilização de BZDs como ansiolítico gera efeitos indesejáveis como relaxamento muscular, ataxia, sonolência diurna e dependência física, além de possuírem propriedades sedativo-hipnóticas e possível efeito amnésico anterógrado (72; 77). A retirada súbita do medicamento em tratamento crônico pode causar síndrome de retirada (77). Vale ressaltar, porém que, nas doses terapêuticas esses compostos são praticamente destituídos de efeitos periféricos nos sistemas cardiovascular, respiratório, digestivo, urinário e ósseo, além de não afetar os sistemas nervoso simpático e parassimpático (72).

Dentre os compostos BZDs desenvolvidos até o presente, destaca-se o diazepam (DZP) cuja ação ansiolítica já foi comprovada em diversos estudos com animais, sendo um dos compostos mais empregados para o tratamento dos distúrbios da ansiedade em humanos (72; 77). O DZP é rapidamente absorvido por via oral, altamente lipossolúvel e

atravessa a barreira hemato-encefálica. Este ansiolítico sofre biotransformação hepática, sendo alguns desses metabólitos altamente ativos, podendo gerar um efeito cumulativo com o uso de doses repetidas (230). Por possuir ação ansiolítica bem estabelecida, o DZP é largamente empregado na validação farmacológica de novos testes experimentais de medo/ansiedade.

3.2 OBJETIVO

Este estudo teve como objetivo analisar as respostas comportamentais de micos-estrela adultos durante uma exposição aguda, rápida (15 min) e individual a um ambiente desconhecido (aparato do campo aberto), após a administração sistêmica do ansiolítico benzodiazepínico diazepam ou seu veículo (controle).

O presente estudo já foi publicado e uma cópia pode ser encontrada no Anexo B.

3.3 METODOLOGIA

3.3.1 Sujeitos

Foram utilizados micos-estrela adultos (machos e fêmeas) da espécie *Callithrix penicillata* (peso: 290 - 390g), alojados no Centro de Primatologia da Universidade de Brasília (CPUnB). O Centro é credenciado pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA como criadouro de primatas para fins científicos (Registro IBAMA, 1/53/1999/000006-2). Os animais foram mantidos no Pavilhão Central do CPUnB, em condições naturais de temperatura, luminosidade e umidade, em casais heterossexuais, e em viveiros-padrão (1,3 m de largura x 2 m de comprimento x 2 m de altura). O Pavilhão Central possuía dois corredores com doze viveiros cada, separados por um corredor de segurança (Figura 3.1). Cada viveiro possuía uma caixa-ninho suspensa, um pote de alumínio para alimentos frescos, um tubo de PVC para ração seca, uma plataforma de alumínio suspensa e balanços feitos com madeiras naturais fixadas em diversas alturas.

Os viveiros eram formados por duas paredes de concreto paralelas e três de tela de arame (malha: 2,5 cm²), estas últimas formando o teto, a frente e o fundo. O teto era ainda coberto por telha Eternite® intercalada com telha transparente, cobrindo dois terços do Pavilhão Central a partir do corredor de segurança (Figura 3.1). Desta forma os viveiros apresentavam uma área livre aberta para o ambiente. O chão era de terra, coberto com folhas secas naturais.



Figura 3.1 Fotografias do Pavilhão Central do CPUnB. (a) Vista frontal do pavilhão: porta de acesso ao pavilhão; (b) Vista interna do pavilhão: corredor e disposição dos viveiros, e (c,d) Vistas laterais do pavilhão.

Ao longo do estudo, os animais foram acompanhados por um médico veterinário, assim como pesados e avaliados no início de cada mês. Diariamente, das 07:30 às 17:00h, os animais receberam frutas, legumes e vegetais frescos. Peito de frango, ovos cozidos e larvas de tenébrio foram fornecidos esporadicamente. Água e ração para primatas estava sempre disponível dentro de cada viveiro. Durante todo o experimento, a rotina de manejo já estabelecida no CPUnB para os calitriquídeos, e aprovada pelo IBAMA, foi mantida.

3.3.2 Aparato Experimental

O aparato empregado – o CA – consistiu em uma arena retangular de livre circulação (130 cm de comprimento x 75 cm de profundidade x 40 cm de altura), suspensa a 1,2 m do solo. Possuía um chão de tela metálica (malha de 2,5 cm²), três paredes de chapa de alumínio, e a quarta parede e o teto de vidro transparente de 4 mm. Uma porta tipo-guilhotina, localizada na parede oposta a de vidro, dava acesso ao aparato. Esse foi pintado de branco e dividido em 15 quadrantes (26 x 25 x 40 cm) para as análises comportamentais (vide abaixo).

O aparato estava localizado em uma sala de experimento, situada a 50 m dos viveiros de moradia dos animais. Portanto, os sujeitos foram transportados de seus viveiros até a sala de experimento, e depois de volta aos seus viveiros, via uma caixa de transporte (35 cm comprimento x 20 cm de profundidade x 23 cm de altura). Essa não permitia a visualização do ambiente durante o transporte, tendo uma porta tipo-guilhotina que se acoplava diretamente a de entrada/saída do CA. Duas lâmpadas de 100W, em paredes opostas, fizeram a iluminação da sala de experimento. A observação e o registro das sessões foram realizados via um circuito interno de filmagem composto por duas câmeras digitais (Fire-i, Unibrain, EUA). Uma câmera foi instalada a aproximadamente 1 m acima do aparato (vista superior) e a outra estava localizada a 1,5 m de distância da parede de vidro do CA (vista frontal). As câmeras foram conectadas diretamente a um computador portátil (*laptop*) localizado em uma sala adjacente à de experimento. Desta sala, todas as sessões foram acompanhadas e registradas. Os animais dentro do aparato do CA foram rastreados de forma automatizada (via a câmera de vista superior) usando o programa AnyMaze (Stoelting Co., EUA).

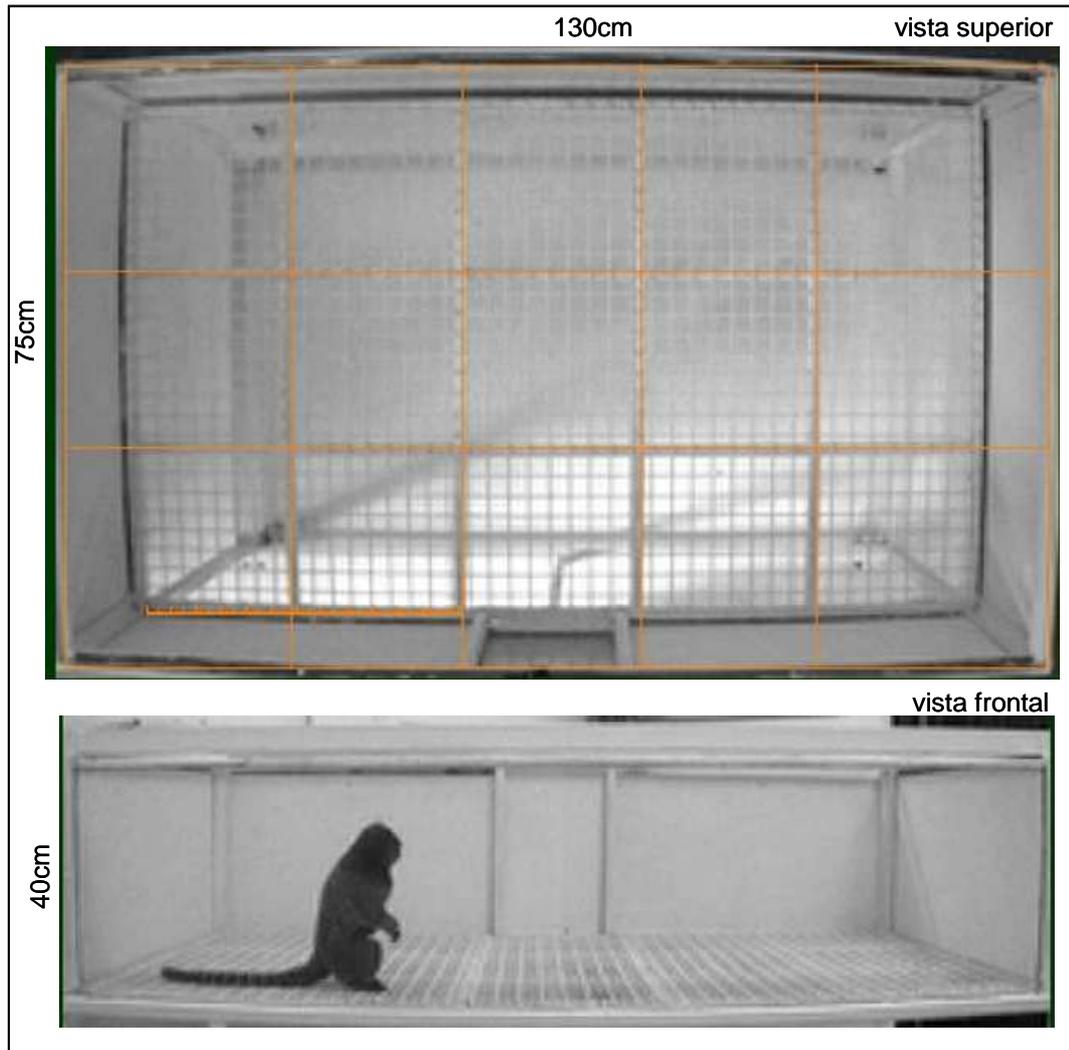


Figura 3.2 Fotografias do aparato campo aberto para estudo da ansiedade em micos-estrela. Vista superior (acima) destacando a divisão em 15 quadrantes e vista frontal (abaixo) destacando a visão do experimentador durante a sessão experimental.

3.3.3 Drogas

O DZP (0; 0,5mg/kg - Compaz, Brasil) foi dissolvido em solução salina com 1% de Tween 80 (Sigma-Aldrich, EUA) e administrado via intraperitoneal (i.p.), no volume de 1 mL/kg. A escolha da dose utilizada neste estudo teve como referência estudos anteriores realizados com micos (192; 231).

3.3.4 Procedimento Experimental

Cada sujeito foi inicialmente submetido a quatro sessões, de 5-min cada, de manuseio/*handling*, realizados em intervalos de 24-h. Essas sessões tiveram o intuito

habituar os sujeitos aos procedimentos de captura, manuseio, acomodação na caixa-transporte e transporte por curtas distâncias (viveiro de moradia – sala de experimento). Para cada sessão de manuseio, o mico foi rapidamente capturado no seu viveiro de moradia, com o auxílio de uma rede e luvas de couro, colocado na caixa-transporte e depois levado à sala de experimento. Nessa sala, o animal permaneceu dentro da caixa-transporte por 5-min, sendo então levado de volta ao seu viveiro de moradia

Em seguida, os sujeitos foram divididos em dois grupos experimentais e submetidos a uma sessão, de 15-min, de exposição ao CA. Antes da sessão, foi administrado o tratamento, de acordo com o grupo experimental, a saber: (1) Veículo (controle; n=5); e (2) DZP (n=5). No dia de teste, o animal foi capturado em seu viveiro de moradia, administrado o seu respectivo tratamento e liberado de volta ao seu viveiro. Após um intervalo de 30-min, o mico foi novamente capturado e em seguida colocado dentro da caixa-transporte para então ser levado até a sala de experimento e liberado no aparato. Durante a sessão de 15-min o sujeito teve acesso livre e espontâneo a todo aparato, sendo o mesmo levado de volta ao seu viveiro de moradia, via a caixa-transporte, ao final desse intervalo. O procedimento foi realizado entre às 13:30 e 17:00 h. A ordem dos sujeitos foi estabelecida de forma pseudo-randômica (Figura 3.3).

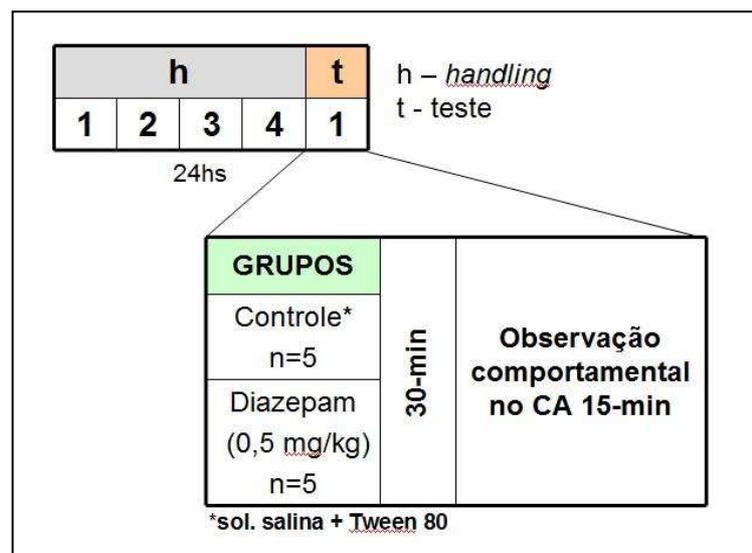


Figura 3.3 Representação esquemática do estudo 1.

3.3.5 Análise dos Dados

O programa AnyMaze (Stoelting Co., EUA) registrou de forma automatizada o tempo de permanência e o número de entradas em cada um dos 15 quadrantes do aparato, assim como a distância total percorrida e a velocidade média dos micos dentro do aparato. Além disso, um observador treinado, com uma confiabilidade inter-observador de 95%, registrou no mesmo programa os comportamentos descritos a seguir, ao pressionar teclas em um computador portátil à medida que os mesmos ocorriam. Foram feitos registros de: (1) Vocalização do tipo *long call*, frequência desse tipo de vocalização usado para a manutenção de contato entre os membros do grupo; (2) Atividade exploratória, frequência de comportamentos do tipo *leg stand* (ficar em uma posição bipedal estendida) e cheirar e/ou lambar qualquer parte do CA; (3) *Glance*, frequência de movimentos curtos e rápidos direcionados ao ambiente enquanto o animal permanecia parado e (4) *Scan*, monitoramento visual, duração e frequência de movimentos da cabeça longos e duradores (>5-s) de varredura direcionados ao ambiente, enquanto o animal permanecia parado.

Além disso, os dados do uso de espaço foram agrupados de forma a gerar duas grandes zonas: central (correspondente aos quadrantes localizados no centro do aparato) e periférica (compreendendo os quadrantes que fazem todo o contorno externo do aparato; Figura 3.4). A permanência e as entradas na zona central foram determinadas pelo tempo total de permanência e a frequência de entrada nos três quadrantes centrais do aparato. Já a permanência e as entradas na zona periférica corresponderam ao tempo total de permanência e o número de entradas nos 12 quadrantes periféricos do aparato. Considerando a diferença de área correspondente a cada zona, com 80% do CA perfazendo a zona periférica e 20% sendo a zona central, os dados referentes ao uso do espaço foram, portanto, calculados a partir do número de quadrantes de cada zona em relação ao número total de quadrantes do aparato.

Para cada comportamento os resultados foram expressos com a média dos valores e o erro padrão da média (+epm). O tempo de permanência e o número de entradas nas

zonas central e periférica do CA foram analisados por meio de uma Análise de Variância de duas vias de desenho misto (*mixed design two-way ANOVA*), sendo o grupo experimental (veículo e diazepam) o fator independente e a zona do aparato (central e periférica) a variável dependente. Resultados significativos foram então analisados com o teste-t para determinação de diferenças entre os grupos experimentais e o teste-t pareado para diferenças entre as zonas. Para os demais parâmetros comportamentais, os dados foram analisados usando o teste-t. Em todos os testes, foi adotado um valor de $p < 0,05$ para o nível de significância.

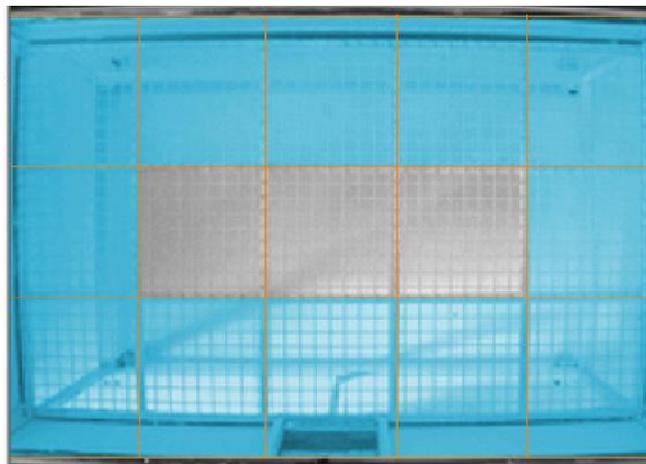


Figura 3.4 Representação das zonas do aparato campo aberto: em azul a zona periférica formada por 12 quadrantes e em cinza a zona central formada por 3 quadrantes.

3.4 RESULTADOS

Os animais tratados com DZP apresentaram níveis significativamente menores de vocalização (de contato social) do tipo *long call* ($t_8=2,63$, $p < 0,05$) e de exploração ($t_8=2,46$, $p < 0,05$), quando comparados aos do grupo controle. Além disso, esse mesmo grupo passou significativamente mais tempo monitorando o ambiente que os micos tratados com veículo ($t_8=-3,27$, $p < 0,05$; Figura 3.5).

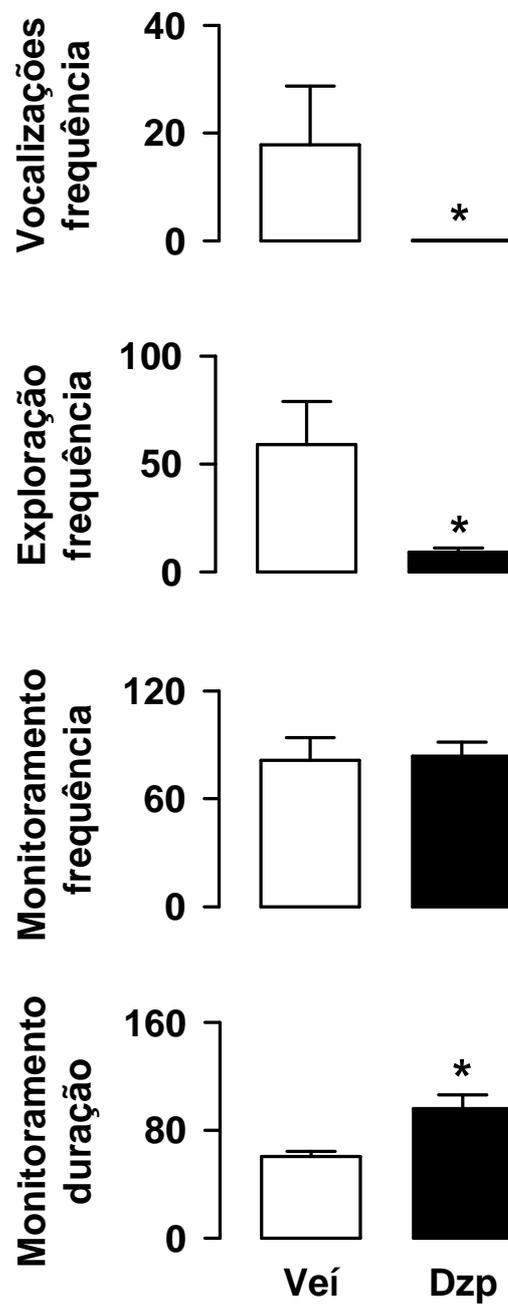


Figura 3.5 Média (+EPM) do número de vocalizações do tipo *long call*, da frequência de exploração, do número e da duração, em segundos, de monitoramentos visuais, observados nos animais tratados com veículo – grupo controle (branco) e nos animais tratados com diazepam – 0,5 mg/kg (preto), durante uma única exposição ao aparato do campo aberto. * $p < 0,05$ vs. veículo.

O tempo de permanência dentro do aparato diferiu significativamente entre os dois grupos ($F_{1,8}=4,64$, $p<0,05$) e as duas zonas ($F_{1,8}=25,02$, $p<0,001$), tendo uma interação significativa entre os fatores grupo vs. zona ($F_{1,16}=9,30$, $p<0,01$; Figura 3.6). Desta forma, foi observado que os animais tratados com DZP e veículo ocuparam a zona periférica do CA por um período de tempo equivalente, enquanto que na zona central o grupo tratado com DZP demonstrou uma taxa de ocupação significativamente ($p<0,05$) maior que os animais controle. Ademais, os sujeitos do grupo controle permaneceram significativamente menos tempo na zona central que na periférica, enquanto que os micos tratados com DZP dividiram seu tempo de permanência equitativamente entre as duas zonas do CA.

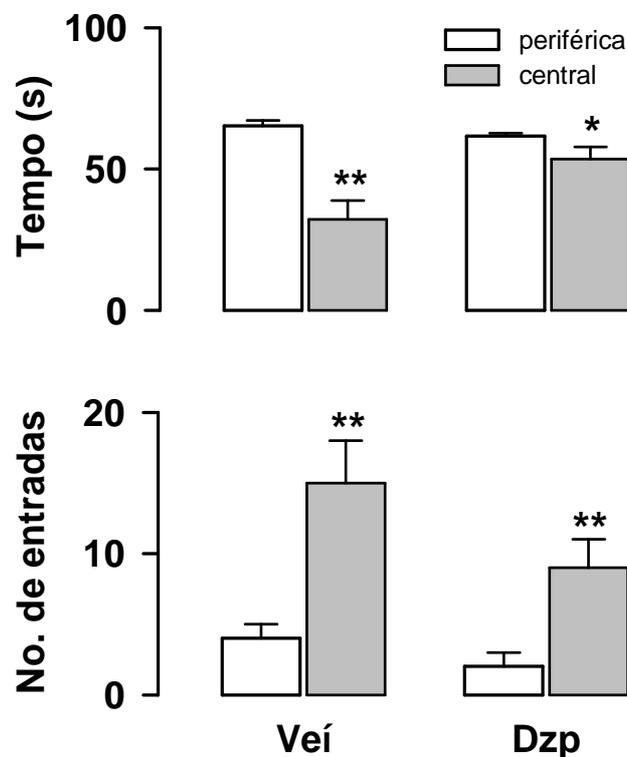


Figura 3.6 Média (+EPM) do tempo gasto, em segundos, e número de entradas nas zonas periférica (branco) e central (cinza) do aparato, com relação ao número de quadrantes de cada zona, observado nos animais tratados com veículo (Veí) e diazepam – 0,5 mg/kg (Dzp), durante uma única exposição ao aparato do campo aberto. * $p<0,05$ vs. veículo, ** $p<0,05$ vs. respectiva zona central.

Com relação à frequência, ambos os grupos demonstraram um número significativamente maior de entradas na zona central do aparato que na periférica ($F_{1,8}=98,48$, $p<0,01$), não havendo diferença significativa entre os grupos ($F_{1,8}=2,89$, $p=0,09$) ou uma interação entre os fatores grupo vs. zona ($F_{1,16}=2,57$, $p=0,11$). Para os demais parâmetros comportamentais analisados, não foram observados diferenças significativas entre os dois grupos (distância percorrida: $t_8=1,91$, $p=0,09$; número de cruzamentos: $t_8=0,92$, $p=0,39$; velocidade média: $t_8=1,88$, $p=0,10$; frequência de *glance*: $t_8=1,35$, $p=0,21$; monitoramento visual: $t_8=-0,16$, $p=0,87$; Tabela 3.1).

Tabela 3.1 Respostas comportamentais observadas durante uma única exposição ao aparato do campo aberto nos animais tratados com veículo e diazepam.

Comportamento	Grupo de Tratamento ^a	
	Veículo	Diazepam
Distância percorrida (em metros)	75 ± 16	54 ± 14
Número de cruzamentos	316 ± 62	240 ± 56
Velocidade média (em m/s)	0,08 ± 0,02	0,05 ± 0,02
Número de <i>glances</i>	20 ± 5	15 ± 1

^a média ± epm.

3.5 DISCUSSÃO

No presente estudo, cada sujeito foi individualmente exposto a um ambiente novo por uma sessão única de 15-min. Os animais tratados com o ansiolítico DZP apresentaram um número significativamente menor de comportamentos relacionados à ansiedade que os micos tratados com veículo. Além disso, os animais tratados com DZP, quando comparados aos do grupo controle, demonstraram um número significativamente menor de vocalizações e de atividade exploratória, assim como uma maior frequência de monitoramentos visuais. No grupo controle, os níveis observados para os parâmetros comportamentos analisados vão de encontro com os de estudos anteriores realizados com a mesma espécie e empregando protocolos e aparatos experimentais similares aos usados no presente trabalho

(224; 232). De fato, micos de diferentes faixas etárias expostos a ambientes desconhecidos, independente de estarem sendo mantidos em uma condição social ou isoladamente, demonstram altos níveis de vocalizações de contato (233; 223; 221; 196). Sabe-se, também, que ambientes novos induzem um aumento na atividade exploratória nessa espécie (193; 234; 196), além de inibirem comportamentos relacionados à vigilância (224). Esse efeito parece ser revertido à medida que o grau de familiaridade com o ambiente cresce em casos de exposições repetidas. Por outro lado, a administração de BZD reverteu o aumento na emissão de vocalizações de alarme em diferentes espécies de primatas (235) e induziu um aumento da vigilância em micos submetidos a um estresse (experimental) de predação (232).

O tratamento com DZP também induziu um aumento significativo no tempo gasto pelos micos na zona central do CA, comparado ao grupo controle que recebeu apenas veículo. Os animais deste último grupo permaneceram, significativamente, mais tempo na zona periférica que na central do aparato. As alterações nas taxas de ocupação do aparato, induzidas pela administração prévia de DZP, não foram acompanhadas por mudanças na frequência de entradas, quando comparado ao perfil observado nos animais tratados com veículo. Dessa forma, em decorrência da localização da zona central do CA, ambos os grupos entraram mais na nesta região do aparato do que na zona periférica. A utilização dos três quadrantes centrais do CA pode ser uma rota alternativa mais curta para se atingir lados opostos do aparato. Um perfil de respostas parecido é tipicamente visto com roedores testados sob as mesmas condições, sendo que esses animais demonstram um medo inato de espaços abertos. Portanto, um aumento na taxa de ocupação da região central é considerado como sendo um indicador de um efeito ansiolítico nesse tipo de teste (201). Apesar de não se aplicar necessariamente a todas as espécies primatas, em micos, ambientes abertos e desconhecidos podem representar uma importante ameaça, considerando sua alta taxa de predação (225). Esses pequenos primatas arborícolas, comparados a outras espécies, são altamente predados, principalmente por aves de rapina

(p.e. 236). Dessa forma, o medo de espaços abertos e desconhecidos pode, também, ser uma resposta inata em calitriquídeos.

3.6 CONCLUSÃO

Portanto, os resultados do presente estudo mostraram que a administração prévia do ansiolítico benzodiazepínico DZP reduz a expressão de diferentes comportamentos indicativos de ansiedade induzidos pela exposição de micos-estrela a um ambiente novo, o CA. Vale ressaltar que, para todos os sujeitos, não houve uma diferença significativa em termos da distância percorrida, do número de cruzamentos e da velocidade média dentro do aparato. Esse resultado sugere, portanto, que o efeito ansiolítico observado para o DZP não foi acompanhado de efeitos sedativos, o que é tipicamente visto no uso de benzodiazepínicos (p.e. 83). Em roedores, já foi demonstrado que o DZP induz um efeito ansiolítico similar, ou seja, induz um aumento no tempo de permanência e no número de entradas na zona central (revisado em 201). Porém, muitas vezes nesses animais, esta é a única resposta observada para indicar um efeito ansiolítico nesse teste.

Portanto, assim como em roedores, o aparato do CA se mostrou uma ferramenta simples e útil para se avaliar comportamentos indicativos de ansiedade nessa espécie de primatas não-humanos, e por conseguinte, pode se constituir como teste ímpar que permitira uma comparação direta entre estudos sob ansiedade e/ou sedação com roedores e primatas.

4 ESTUDO 2: Efeitos de ligantes de receptores canabinóides CB1 nos comportamentos indicativos de ansiedade induzidos pela exposição a um ambiente novo.

4.1 INTRODUÇÃO

A maior parte dos receptores canabinóides CB1 está localizada nos neurônios pré-sinápticos, acoplados à proteína G da membrana. Quando ativados, esses receptores inibem (de forma retrógrada) a liberação de diversos neurotransmissores, incluindo o GABA, o glutamato, a dopamina e a serotonina (revisado em 237). Identificados inicialmente como receptores dos compostos psicoativos mais abundantes da planta da *Cannabis* (9), diferentes ligantes endógenos também já foram encontrados no cérebro (eECs p.e. AEA e 2-AG) (10; 11; 12). Dessa forma, eECs, fitocanabinóides e seus análogos sintéticos são considerados importantes compostos sinalizadores do SNC, capazes de modular diversos processos neurais tanto em humanos, quanto em modelos animais, incluindo as respostas emoções (238).

De fato, altas densidades de receptores canabinóides CB1 são encontrados em regiões cerebrais envolvidas na regulação do estresse, do medo e da ansiedade (21). Além disso, manipulações genéticas e farmacológicas desse receptor alteram comportamentos relacionados à ansiedade (119). Porém, já foi demonstrado que a ativação do receptor canabinóide CB1 induz efeitos ansiolíticos e ansiogênicos, podendo até mesmo não causar efeito (revisado recentemente em 239). Estes resultados, a princípio contraditórios, podem ser decorrentes: (1) da dose utilizada (baixa vs. alta; 240), (2) da região cerebral estudada (córtex pré-frontal vs. amígdala basolateral; 241), (3) da sensibilidade diferenciada dos tipos de receptores (CB1 vs. TRPV1; 242), (4) da expressão dos receptores em diferentes tipos de neurônios (GABA vs. glutamato, 242), (5) da condição experimental (110) e (6) da espécie empregada (ratos vs. camundongos; 243).

Em termos da espécie, primatas não-humanos, comparado com roedores, parecem responder de forma mais semelhante aos humanos quando tratados com ligantes de receptores canabinóides CB1 (244; 21; 245; 246), tendo uma distribuição e densidade desses receptores diferente da encontrada em roedores (26). Contudo, pouco se sabe sobre os efeitos comportamentais da administração de ligantes canabinóides em primatas não-humanos, principalmente nas respostas emocionais.

4.2 OBJETIVO

Este estudo teve como objetivo analisar as respostas comportamentais de micos-estrela adultos durante uma exposição aguda, rápida (15 min) e individual a um ambiente desconhecido (aparato do campo aberto), após a administração sistêmica de um agonista ou antagonista do receptor canabinóide CB1, WIN 55-212,2 e AM 251, respectivamente.

4.3 METODOLOGIA

4.3.1 Sujeitos

Foram utilizados 15 micos-estrela adultos (machos e fêmeas) da espécie *Callithrix penicillata* (peso: 290 - 370g), alojados no Centro de Primatologia da Universidade de Brasília (CPUnB). As demais condições de alojamento e manejo foram mantidas como descrito no item 3.3.1 do estudo anterior.

4.3.2 Aparato Experimental

O aparato empregado – o CA – consistiu em uma arena retangular de livre circulação (130 cm de comprimento x 75 cm de profundidade x 40 cm de altura), suspensa a 1,2 m do solo. Uma descrição completa do aparato encontra-se no item 3.3.2 do estudo anterior (Figura 3.2).

4.3.3 Drogas

O agonista de receptores CB1 WIN 55-212,2 (247; Sigma-Aldrich, Brasil) e o antagonista AM 251 (21; Sigma-Aldrich, Brasil) foram dissolvidos em uma solução veículo contendo Tween 80, DMSO e salina (1:1:8) e administrados via i.p., no volume de 1 mL/kg, 30-min antes do teste. O WIN 55-212,2 foi administrado na dose de 1 mg/kg e o AM 251 na dose de 2 mg/kg. A escolha das doses utilizadas neste estudo tiveram como referência estudos anteriores similares em que foram realizadas administrações sistêmicas desses ligantes canabinóides em primatas ou roedores (248; 249).

4.3.4 Procedimento Experimental

Cada sujeito foi inicialmente submetido a quatro sessões, de 5-min cada, de manuseio/*handling*, conforme já descrito no item 3.3.4 do estudo anterior. Em seguida, os sujeitos foram divididos em três grupos experimentais e submetidos a uma sessão, de 15-min, de exposição ao CA. Antes da sessão, foi administrado o tratamento, de acordo com o grupo experimental, a saber: (1) Veículo (controle; n=5); (2) WIN 55-212,2 (n=5); e (3) AM 251 (n=5). No dia de teste, o animal foi capturado em seu viveiro de moradia, administrado o seu respectivo tratamento e liberado de volta ao seu viveiro. Após um intervalo de 30-min, o mico foi novamente capturado e em seguida colocado dentro da caixa-transporte para então ser levado até a sala de experimento e liberado no aparato. Durante a sessão de 15-min, o sujeito teve acesso a todo o CA, sendo ele levado de volta ao seu viveiro de moradia, via a caixa-transporte, ao final desse intervalo. O procedimento foi realizado entre às 13:30 e 17:00 h. A ordem dos sujeitos no dia do teste foi estabelecida de forma pseudo-randômica.

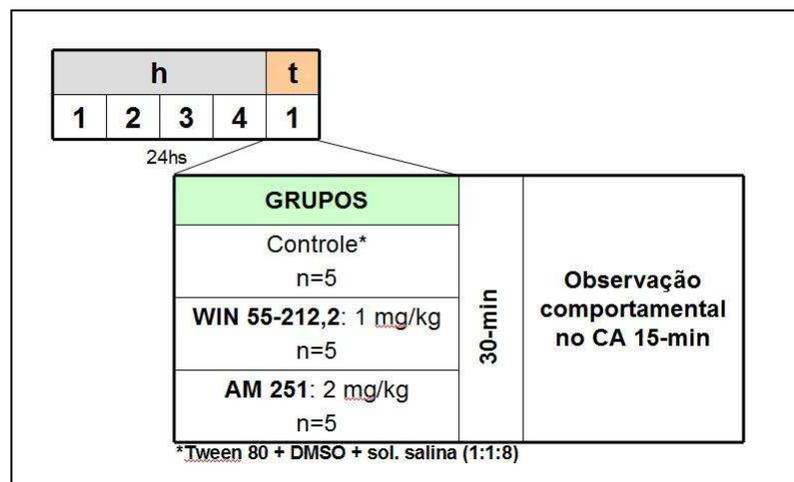


Figura 4.1 Representação esquemática do estudo 2.

4.3.5 Análise dos Dados

Os dados comportamentais deste estudo foram analisados conforme já descrito no item 3.3.5, no estudo anterior. Para cada comportamento os resultados foram expressos com a média dos valores e o erro padrão da média (+epm). Os dados comportamentais foram analisados por meio de uma Análise de Variância de uma via (*one-way ANOVA*) e os resultados, quando significativos, analisados posteriormente por meio do teste de Tukey. Os dados de frequência e tempo de permanência nas zonas central e periférica do CA foram analisados por meio de uma Análise de Variância de duas vias de desenho misto (*mixed design two-way ANOVA*), sendo o grupo experimental (veículo, WIN 55-212,2 e AM 251) o fator independente e a zona do aparato (central e periférica) a variável dependente. Resultados significativos foram posteriormente analisados com o teste-t para determinação de diferenças entre os grupos experimentais e o teste-t pareado para diferenças entre as zonas. Em todos os testes, foi adotado um valor de $p \leq 0,05$ para o nível de significância.

4.4 RESULTADOS

Os animais tratados com WIN 55-212,2 e AM 251 apresentaram níveis significativamente menores de vocalização (de contato social) do tipo *long call* ($F_{2,12}=4,66$, $p < 0,05$) e de exploração ($F_{2,12}=4,20$, $p < 0,05$), quando comparados aos do grupo controle (Figura 4.2). Por outro lado, os animais tratados com esses ligantes de receptores

canabinóides CB1 apresentaram taxas significativamente maiores de *glance* ($F_{2,12}=4,54$, $p<0,05$) e passaram significativamente mais tempo monitorando o ambiente ($F_{2,12}=10,46$, $p<0,01$; Figura 4.2).

O tempo de permanência dentro do aparato (Figura 4.3) diferiu significativamente entre as duas zonas ($F_{1,24}=7,87$, $p<0,01$), mas não houve diferença significativa entre os grupos de tratamento ($F_{1,24}=1,59$, $p=0,23$). Entretanto, foi observada uma interação significativa entre os fatores grupo vs. zona ($F_{2,24}=3,88$, $p<0,05$). Neste sentido, apenas o grupo de animais tratados com o agonista WIN 55-212,2 dividiu seu tempo igualmente entre as duas zonas do aparato. Os animais tratados com o antagonista AM 251 e os do grupo controle passaram significativamente mais tempo na zona periférica que na central.

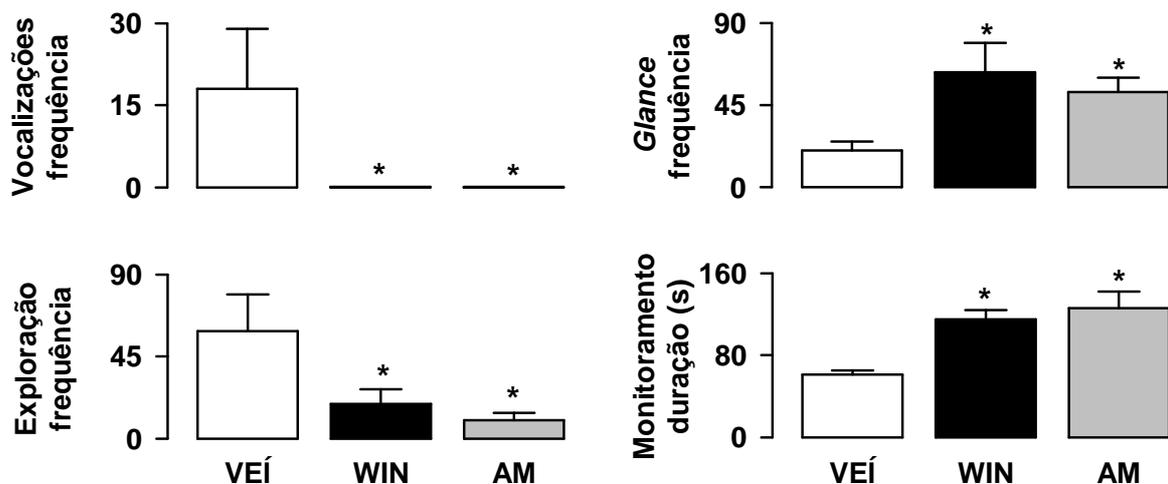


Figura 4.2 Média (+EPM) do número de vocalizações do tipo *long call*, da frequência de exploração, do número de *glances* e da duração, em segundos, de monitoramentos visuais, observados nos animais tratados com veículo – grupo controle (branco), WIN 55-212,2 (preto) e com AM 251 (cinza), durante uma única exposição no aparato do campo aberto. * $p<0,05$ vs. veículo.

Com relação à frequência, foram observadas diferenças significativas entre as zonas central e periférica do CA ($F_{1,24}=40,86$, $p<0,001$) e entre os grupos ($F_{2,24}=8,04$, $p<0,01$), mas sem efeito de interação entre os fatores grupo vs. zona ($F_{2,24}=2,98$, $p=0,08$). Portanto, todos

os grupos entraram significativamente mais vezes na zona central do aparato que na zona periférica. Além disso, o número de entradas feitos pelos animais tratados com WIN 55-212,2 foi significativamente ($p < 0,05$) maior que o observado nos animais tratados com AM 251 (Figura 4.3).

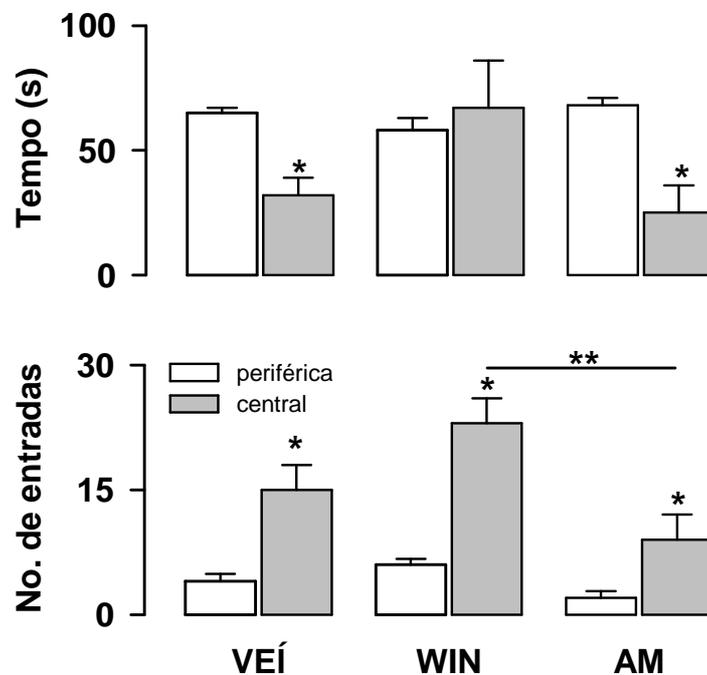


Figura 4.3 Média (+EPM) do tempo gasto, em segundos, e número de entradas nas zonas periférica (branco) e central (cinza) do aparato, em relação ao número de quadrantes de cada zona, observada nos animais tratados com veículo (Veí), WIN 55-212,2 e AM 251, durante uma única exposição ao aparato campo aberto. * $p < 0,05$ vs. respectiva zona central, ** $p < 0,05$ vs. AM 251.

Para os demais parâmetros comportamentais analisados, não foram observadas diferenças significativas entre os três grupos testados (distância percorrida: $F_{2,12} = 0,56$,

$p=0,59$; número de cruzamentos: $F_{2,12}=2,45$, $p=0,13$; velocidade média: $F_{2,12}=0,72$, $p=0,51$; frequência de *scan* - monitoramentos: $F_{2,12}=0,76$, $p=0,49$; Tabela 4.1).

Tabela 4.1 Respostas comportamentais observadas durante uma única exposição ao aparato do campo aberto nos animais tratados com veículo, WIN 55-212,2 e AM 251.

Comportamento	Grupo de tratamento ^a		
	Veículo	WIN 55-212,2	AM 251
Distância percorrida (em metros)	75 ± 16	83 ± 8	63 ± 15
Número de cruzamentos	316 ± 62	396 ± 35	262 ± 48
Velocidade média (em m/s)	0,11 ± 0,04	0,09 ± 0,01	0,07 ± 0,02
Frequência de monitoramentos	81 ± 13	91 ± 7	75 ± 8

^a média ± epm

4.5 DISCUSSÃO

Micos-estrela expostos individualmente a um ambiente desconhecido tipicamente demonstram altos níveis de vocalizações de contato (233; 223; 221; 196) e de exploração (193, 234, 196), enquanto que os comportamentos relacionados à vigilância parecem ser inibidos (195). No presente estudo, a administração prévia do agonista de receptores CB1 WIN 55-212,2 bloqueou, de forma significativa, essas respostas comportamentais nos micos-estrela adultos expostos ao ambiente desconhecido do CA, quando comparado ao grupo controle, correspondendo a um efeito ansiolítico. Além disso, para os animais tratados com o WIN 55-212,2 houve um aumento significativo no tempo de permanência na zona central, comparado ao grupo controle, sem uma modificação concomitante na frequência de entrada nessa mesma zona. Esse efeito consiste em um importante indicativo de um efeito ansiolítico nesse tipo de teste (201), tendo sido observado um perfil de resposta similar em micos tratados com DZP nesse mesmo protocolo (250). A maior frequência de entrada na zona central versus a periférica nesse grupo (e nos demais) pode corresponder ao fato da mesma ser empregada como uma rota de passagem de um lado para o outro do aparato.

Um perfil de resposta parecido é tipicamente visto em roedores testados sob essas mesmas condições, sendo que esses animais demonstram um medo inato de espaços

abertos. Como já visto anteriormente, apesar de não se aplicar necessariamente a todas as espécies primatas, em micos, ambientes abertos e desconhecidos podem representar uma importante ameaça, considerando sua alta taxa de predação (225), principalmente por aves de rapina (p.e. 236). Dessa forma, o medo de espaços abertos e desconhecidos pode, também, ser uma resposta importante em calitriquídeos.

Ademais, em roedores, estudos anteriores que utilizaram o WIN 55-212,2 relatam efeitos ansiolíticos (243; 251; 252), assim como o tratamento com o agonista Δ^9 THC (253). O mesmo efeito também foi induzido por outras formas de estimulação do ECS nesses animais, via inibição da FAAH (89; 94) ou do transportador de AEA (88). Entretanto, um efeito ansiogênico também foi encontrado (89). Ao que parece, doses baixas de canabinóides tendem a ter um efeito ansiolítico, enquanto que doses maiores, um efeito ansiogênico (254; 255; 256; 257). Portanto, considerando o perfil comportamental observado, a dose presentemente empregada nos micos pode ser baixa, levando ao efeito ansiolítico. Vale ressaltar que esse efeito não foi acompanhado de hipoatividade, já relatada em roedores (157). Possíveis diferenças em termos da quantidade e localização de receptores CB1 em roedores e primatas podem ser responsáveis por essa divergência entre as duas espécies. Ong e Mackie (26) relataram uma ausência desses receptores no estriado de primatas, o que não ocorre nos roedores.

Os animais tratados com o antagonista de receptor canabinóide CB1 AM 251 também apresentaram uma redução significativa de diferentes comportamentos indicativos de ansiedade induzidos pela exposição ao ambiente novo. Neste sentido, esse ligante CB1 induziu um número significativamente menor de vocalizações de contato social (*long call*) e de atividade exploratória, quando comparado aos animais do grupo controle. Ao mesmo tempo, os micos tratados com AM 251 demonstraram níveis significativamente maiores de vigilância (*glance* e monitoramento do ambiente), em relação aos do grupo controle. Contudo, os animais do grupo tratado com AM 251 permaneceram significativamente mais tempo na zona periférica que na central do aparato, como também visto no grupo controle.

Já foi observado que o tratamento com o antagonista rimonabant inibiu a atividade exploratória de roedores em ambientes desconhecidos, efeito considerado ansiogênico (94), assim como a administração de AM 251 induziu um aumento de comportamentos indicativos de ansiedade em camundongos testados no labirinto em cruz elevado (110). Por outro lado, resultados divergentes já foram relatados após a administração de AM 251 que, em alguns casos, não induz efeito algum (97) ou ainda efeito ansiogênico (89; 248).

Os efeitos ansiolíticos e ansiogênicos após a administração sistêmica de canabinóides, também relatados com administrações centrais, podem ser decorrentes da área do cérebro afetada (para revisão recente ver 258). Neste sentido, a via de administração sistêmica induz uma absorção diferenciada da droga, levando a atingir diferentes regiões cerebrais. O receptor CB1 também modula tanto a neurotransmissão excitatória glutamatérgica quanto a inibitória GABAérgica. Dessa forma, os ligantes canabinóides parecem ser capazes de modular processos opostos (78). Ademais, levando em consideração os aspectos relacionados às diferenças entre roedores, primatas não-humanos e humanos, os primatas parecem responder de forma mais parecida com o que ocorre em humanos (187). Ademais, sabe-se que o agonista canabinóide WIN 55-212,2 também é capaz de se ligar a receptores do tipo TPV1 (252; 251). Contudo, a ativação destes receptores parece induzir uma resposta ansiogênica (100).

Vale ressaltar também que, algumas discrepâncias observadas podem ser decorrentes das diferentes condições experimentais estudadas. Ao que parece, efeitos contraditórios a partir da modulação do ECS são observados em condições estressantes (258). De fato, o ECS atua sob demanda, em condições estressantes (255, 259).

4.6 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo mostraram que um pré-tratamento com os ligantes de receptores canabinóides CB1 reduziram a expressão de diferentes comportamentos

indicativos de ansiedade, os quais haviam sido induzidos pela exposição de micos-estrela a um ambiente novo, o CA. Vale ressaltar que, para todos os sujeitos, não houve uma alteração significativa em termos da locomoção nesse ambiente e, portanto, os efeitos ansiolíticos observados não foram acompanhados de efeitos sedativos, o que é tipicamente visto no uso dos agonistas de receptores canabinóide CB1 (260). Em micos, já foi demonstrado que o DZP induz efeitos similares (250).

Dessa forma, os ligantes canabinóides utilizados foram capazes de modular as respostas indicativas de ansiedade induzidas pela exposição ao aparato CA, que já foi demonstrado ser uma ferramenta simples e útil para testes de ansiedade e/ou sedação em primatas não-humanos.

5 ESTUDO 3: Efeitos comportamentais e hormonais da administração sistêmica e repetida de cocaína em micos-estrela.

5.1 INTRODUÇÃO

Psicoestimulantes (p.e. cocaína) induzem uma série de efeitos comportamentais e hormonais em roedores, primatas não-humanos e humanos. No primeiro, esse efeito consiste tipicamente em um aumento da locomoção. Em primatas não-humanos e em humanos, por sua vez, observa-se um aumento em comportamentos estereotipados do tipo psicoticomiméticos/alucinatórios (revisado em 261; 262; 263). Em primatas não-humanos já foram observados efeitos na viglância, assim como em comportamentos estereotipados de catação, movimentos orofaciais e de rastreamento de objetos inexistentes (p.e. 264; 265). Sabe-se também que, a administração repetida de agonistas dopaminérgicos em macacos também é capaz de induzir essas alterações comportamentais (266). Alguns desses efeitos podem ser observados independentemente de como a substância é administrada: contingente (como no caso da auto-administração) ou não contingente (como no caso da administração ser feita pelo experimentador).

Em roedores, a administração aguda de cocaína, por sua vez, também ativa o eixo HPA, induzindo um aumento de corticosterona (267). Em primatas não-humanos, a ativação do eixo HPA por psicoestimulantes resulta em uma elevação nos níveis circulantes de cortisol (147), assim como também ocorre com humanos (146). Contudo, o efeito da forma de administração (contingente ou não-contingente) na ativação do eixo HPA ainda é desconhecido (p.e. 268).

Contudo, contribuições significativas podem ser obtidas via o estudo de primatas, principalmente micos (187), em vista de importantes diferenças que esses apresentam em relação aos roedores. Estas incluem diferenças, por exemplo: (1) na organização morfológica, conectividade e desenvolvimento do sistema dopaminérgico

mesocorticolímbico (210; 211; 212); (2) na forma de liberação e recaptção de DA no estriado (213); (3) na homologia gênica do transportador de DA (214); (4) na densidade e distribuição dos receptores no circuito neural da dependência (p.e. 215) e (5) nas respostas metabólicas do cérebro à diferentes psicoestimulantes (p.e. 216). Mas, pouco ainda se sabe a respeito do efeito comportamental e hormonal da administração repetida de cocaína em primatas, e em especial no mico-estrela.

5.2 OBJETIVO

Este estudo teve como objetivo analisar os efeitos da administração sistêmica e repetida de cocaína, e de sua retirada, na locomoção e nos comportamentos de vigilância de micos-estrela. Ademais, os efeitos nos níveis circulantes de cortisol também foram analisados.

Este estudo já foi submetido à revista *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. Uma cópia do manuscrito pode ser encontrada no Anexo C.

5.3 METODOLOGIA

5.3.1 Sujeitos

Foram utilizados dez micos-estrela adultos (machos e fêmeas) da espécie *Callithrix penicillata* (peso: 290 - 410g), alojados no Centro de Primatologia da Universidade de Brasília (CPUnB). As demais condições de alojamento e manejo foram mantidas como descrito no item 3.3.1.

5.3.2 Aparato Experimental

O aparato empregado – o CA – consistiu em uma arena retangular de livre circulação (130 cm de comprimento x 75 cm de profundidade x 40 cm de altura), suspensa a 1,2 m do solo (Figura 3.2). Uma descrição completa do aparato encontra-se no item 3.3.2.

5.3.3 Drogas

O hidrocloreto de cocaína (Sigma-Aldrich, EUA; 5mg/kg) foi dissolvido em solução salina e injetado via i.p. em um volume de 1mL/kg, 5-min antes do teste comportamental. A dose e o intervalo de administração utilizados neste estudo foram baseados em anteriores similares nesta espécie (269).

5.3.4 Coleta e Análise dos Dados Comportamentais

Cada sujeito foi inicialmente submetido a quatro sessões, de 5-min cada, de manuseio/*handling*, conforme já descrito no item 3.3.4. Em seguida, os sujeitos foram divididos em dois grupos experimentais e submetidos a nove sessões, de 15-min cada, de exposição ao CA em intervalos de 48-h. Antes de cada sessão, foi administrado um dos compostos pré-estabelecidos em cada mico, de acordo com o seu grupo experimental: (1) salina (controle; n=5) ou (2) cocaína (5mg/kg; n=5).

Nas nove sessões (de teste) o sujeito foi testado no CA, 5-min após a administração do tratamento. Em cada dia de teste, o animal foi capturado em seu viveiro de moradia, administrado o seu respectivo tratamento, e em seguida colocado dentro da caixa-transporte para então ser levado até a sala de experimento e liberado no aparato. Durante cada sessão de 15-min foi dado acesso livre e espontâneo a todo aparato, sendo o sujeito levado de volta ao seu viveiro de moradia, via a caixa-transporte, ao final desse intervalo.

Nas quatro sessões subsequentes (de retirada), os animais foram capturados e colocados diretamente na caixa-transporte para serem levados à sala de experimento e liberado no campo aberto. Portanto, nessas sessões, não houve a administração de nenhum composto. O restante do procedimento foi igual o das sessões anteriores (de teste). Todas as sessões experimentais foram realizadas entre às 13:30 e 17:00 h. A ordem dos sujeitos em cada dia de teste foi pseudo-randomicamente estabelecida.

O programa AnyMaze (Stoelting Co., EUA) registrou de forma automatizada o tempo de permanência e o número de entradas em cada um dos 15 quadrantes do aparato, assim como a distância total percorrida e a velocidade média dos micos dentro do aparato. Além disso, um observador treinado, com uma confiabilidade inter-observador de 95%, registrou no mesmo programa os comportamentos de vigilância descritos a seguir, ao pressionar teclas em um computador portátil à medida que os mesmos ocorriam. Foram feitos registros de: (1) *Leg stand*, ficar em uma posição bipedal estendida; (2) *Glance*, freqüência de movimentos curtos e rápidos direcionados ao ambiente enquanto o animal permanecia parado e (3) *Scan*, monitoramento visual, duração e freqüência de movimentos da cabeça longos e duradores (>5-s) de varredura direcionados ao ambiente, enquanto o animal permanecia parado. Os comportamentos de vigilância foram baseados em etogramas de micos (284; 182) e estudos anteriores (224, 196; 285).

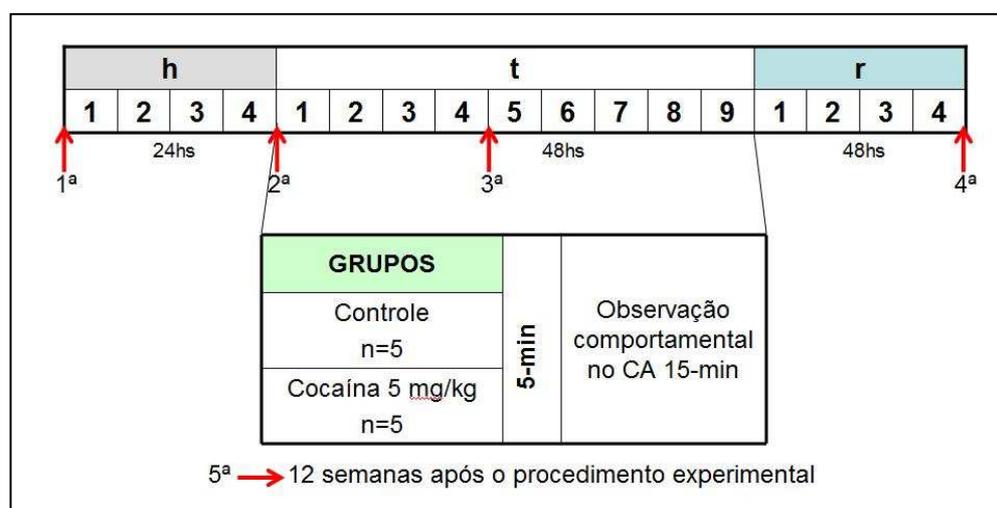


Figura 5.1 Representação esquemática do estudo 3.

5.3.5 Coleta de Sangue e Análise dos Dados Hormonais

Foram coletadas cinco amostras de sangue (1,0 mL cada) de cada sujeito. As amostras foram coletadas nos seguintes momentos ao longo do estudo: (1) uma semana antes da primeira sessão de teste (nível basal, como controle); (2) após a primeira sessão

de teste; (3) após a quarta sessão de teste; (4) após a última sessão de retirada (sessão 9) e (5) 12 semanas após o término do procedimento experimental. Em cada dia, a ordem dos sujeitos foi randomizada e as coletas realizadas entre 09:00-11:00 h. Portanto, exceto a coleta de controle (primeira), todas as amostras foram obtidas na manhã posterior ao procedimento experimental.

O procedimento, em cada dia de coleta de sangue, consistiu em capturar o animal no seu viveiro de moradia e levá-lo até uma sala de procedimento. O sujeito foi então anestesiado por via inalatória com o anestésico isoflurano (Fluorane[®]). Uma vez anestesiado, uma amostra de 1,0 mL de sangue foi obtida por punção da veia femoral. A amostra obtida foi imediatamente colocada em um tubo pré-resfriado com ativador de coagulação. As amostras foram mantidas resfriadas em gelo até seu processamento inicial no laboratório. Aproximadamente 5-min após a coleta, os sujeitos eram levados de volta ao seu viveiro de moradia e acompanhado durante 15-min. Suplementos vitamínicos foram então fornecidos para a recuperação do animal.

O procedimento de coleta das amostras foi mensurado (i.e. tempo gasto entre a entrada no viveiro para a captura do animal até o final da coleta) a fim de se analisar sua possível influência nos resultados de cortisol. A duração média do procedimento foi de $4,02 \pm 0,59$ (média \pm epm). Já foi demonstrado que este intervalo não induz um efeito significativo nas concentrações de cortisol em micos (Saltzman e cols., 1994). Todas as coletas foram acompanhadas por um médico veterinário do CPUUnB.

As amostras de sangue resfriadas foram levadas ao laboratório e centrifugadas (3.500 rpm, 5-min, 4°C). O sobrenadante foi coletado (soro), armazenado em um tubo *ependorf* e posteriormente diluído com água tri-destilada na proporção 1:50. A proporção de diluição foi baseada em estudos anteriores (270). As amostras foram então analisadas para a determinação das concentrações séricas de cortisol com uso do kit comercial para ensaio imunoenzimático por fluorescência (ELFA, *enzyme linked fluorescent assay*) no

sistema automatizado Mini-Vidas (Biomérieux, EUA). O coeficiente de variação inter e intra-ensaio foi de 9,6 e 8,2%, respectivamente, e a sensibilidade do teste foi de 2 ng/mL.

5.3.6 Análise Estatística

Para cada parâmetro (comportamental e hormonal) obtido, os resultados foram expressos como a média dos valores e o erro padrão da média (+epm). Foram analisadas possíveis diferenças entre os grupos de tratamento e dentro de um mesmo grupo, ao longo das sessões. Os dados foram analisados por meio de uma Análise de Variância de duas vias de desenho misto (*mixed design two-way ANOVA*), sendo o grupo experimental (veículo, cocaína) o fator independente e a sessão (teste 1-9 e retirada 1-4) ou a amostra coletada (1-5) a variável dependente. Resultados significativos foram seguidos pelos testes *post hoc* de: 1) Dunnett, para os dados comportamentais, ou de 2) Tukey, dados hormonais. A duração do procedimento de coleta da amostra sanguínea também foi comparada com o respectivo dado hormonal utilizando o teste de correlação de Pearson. O nível de significância adotado em todos os testes foi de $p \leq 0,05$.

5.4 RESULTADOS

Os níveis de monitoramento (Figura 5.2) diferiram significativamente entre os grupos (duração: $F_{1,104}=48,95$, $p < 0,001$; frequência: $F_{1,104}=77,64$, $p < 0,01$) e as sessões (duração: $F_{12,104}=2,23$, $P < 0,05$; frequência: $F_{12,104}=3,26$, $p < 0,001$), sendo observada uma interação significativa entre grupo vs. sessão (duração: $F_{12,104}=2,19$, $p < 0,05$; frequência: $F_{12,104}=2,48$, $p < 0,01$). Neste sentido, a duração e a frequência de monitoramentos visuais apenas no grupo de animais tratados com cocaína foram significativamente maiores nas sessões de 4 a 9, que o observado na sessão 1. Além disso, o nível de monitoramento nesse grupo foi significativamente maior, a partir da sessão 2, quando comparado ao do grupo salina. Mas, durante as quatro sessões de retirada, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos em termos da duração e frequência de monitoramentos, sendo os níveis

observados similares aos detectados na primeira sessão. Os dados comportamentais do grupo controle permaneceram inalterados ao longo das sessões.

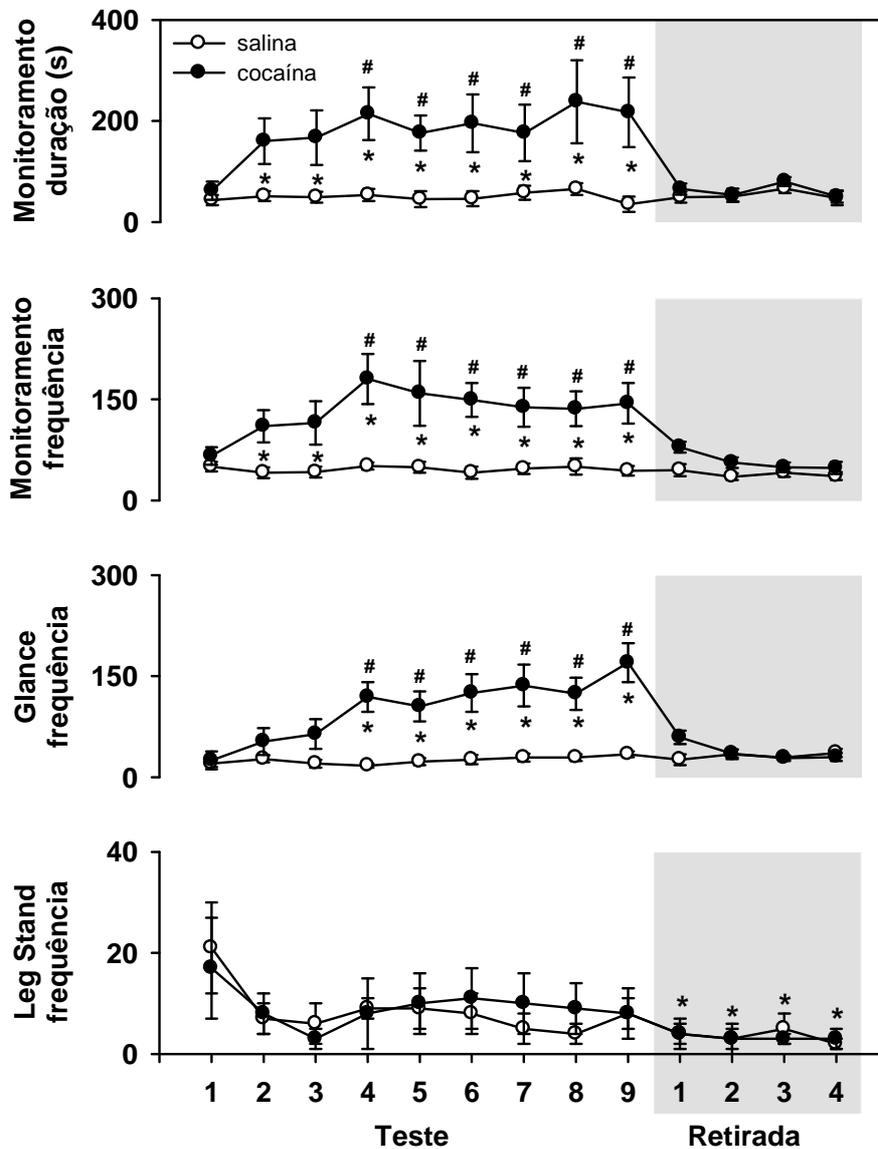


Figura 5.2 Média (\pm epm) da duração de monitoramentos visuais, assim como da frequência de monitoramentos, de *glance* e de *leg stand* observados nos animais tratados com veículo – grupo controle (branco) e com cocaína (preto), durante as nove sessões de teste e as 4 quatro sessões de retirada. * $p < 0,05$ vs. veículo, # $p < 0,5$ vs. sessão 1.

Em relação ao número de *glance* (Figura 5.2) diferenças significativas foram observadas entre os grupos ($F_{1,104}=91,63$, $p < 0,001$) e as sessões ($F_{12,104}=5,55$, $p > 0,01$), assim como uma interação entre grupo vs. sessão ($F_{12,104}=5,60$, $p < 0,001$). De fato, os

animais tratados com cocaína apresentaram um aumento na frequência de *glimp* ao longo das sessões de teste, sendo observada uma diferença significativa nas sessões 4 a 9, quando comparada à sessão 1 e ao observado nos micos tratados com salina. Nas sessões de retirada, este parâmetro comportamental foi detectado em níveis similares ao da sessão 1, tanto para os animais tratados com cocaína, quanto para os tratados com salina. Nesse último grupo a frequência de *glimp* também permaneceu constante ao longo das sessões.

Ao contrário do que foi observado para os demais comportamentos relacionados à vigilância, o número de *leg stand* diminuiu ao longo das sessões, independente do tratamento administrado, atingindo níveis significativamente menores nas quatro sessões de retirada, comparado com a primeira sessão (grupo: $F_{1,104}=0,08$, $p=0,78$; sessão: $F_{12,104}=1,87$, $p<0,05$; interação: $F_{12,104}=0,17$, $p=1,00$; Figura 5.2). Para os demais parâmetros analisados, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos e as sessões, assim como não foi observada uma interação entre grupo vs. sessão (*Distância Percorrida* – grupo: $F_{1,104}=0,13$, $p=0,72$; sessão: $F_{12,104}=0,84$, $p=0,61$; interação: $F_{1,104}=0,54$, $p=0,88$; *Número de Cruzamentos* – grupo: $F_{1,104}=2,21$, $p=0,14$; sessão: $F_{12,104}=1,09$, $p=0,38$; interação: $F_{12,104}=0,90$, $p=0,55$; *Velocidade Média* – grupo: $F_{1,104}=0,28$, $p=0,60$; sessão $F_{12,104}=1,09$, $p=0,38$; interação: $F_{12,104}=0,74$, $p=0,71$; Tabela 5.1).

Os níveis de cortisol encontrados nas amostras coletadas não diferiram significativamente entre os grupos e as amostras (grupo: $F_{1,39}=0,19$, $p=0,67$; amostra: $F_{4,39}=0,24$, $p=0,92$; interação: $F_{4,39}=0,22$, $P=0,93$; Tabela 5.2). Esse parâmetro também não foi significativamente correlacionado ao tempo necessário para cada coleta (controle basal: $r=-0,11$, $p=0,76$; após a sessão 1: $r=-0,59$, $p=0,08$; após a sessão 4: $r=0,35$, $p=0,33$; após a retirada: $r=0,13$, $p=0,72$; 12 semanas após a retirada: $r=-0,24$, $p=0,54$).

Tabela 5.1 Parâmetros locomotores (média \pm epm) observados nos animais tratados com veículo ou cocaína, nas nove sessões de teste e nas quatro sessões de retirada.

	Distância percorrida (m)		Número de cruzamentos		Velocidade média (m/s)	
	salina	cocaína	salina	cocaína	salina	cocaína
Sessões de teste						
1	75 \pm 16	90 \pm 21	316 \pm 62	432 \pm 92	0,11 \pm 0,04	0,12 \pm 0,02
2	60 \pm 20	95 \pm 42	279 \pm 62	480 \pm 158	0,07 \pm 0,02	0,11 \pm 0,05
3	56 \pm 25	86 \pm 47	248 \pm 91	383 \pm 157	0,06 \pm 0,03	0,12 \pm 0,04
4	53 \pm 19	58 \pm 18	245 \pm 66	343 \pm 79	0,09 \pm 0,05	0,09 \pm 0,02
5	60 \pm 18	81 \pm 38	298 \pm 72	442 \pm 107	0,07 \pm 0,02	0,09 \pm 0,04
6	50 \pm 21	72 \pm 24	254 \pm 71	436 \pm 109	0,06 \pm 0,02	0,08 \pm 0,03
7	65 \pm 26	64 \pm 17	281 \pm 96	367 \pm 77	0,07 \pm 0,03	0,07 \pm 0,02
8	62 \pm 15	45 \pm 21	341 \pm 96	261 \pm 86	0,08 \pm 0,02	0,05 \pm 0,02
9	53 \pm 12	29 \pm 12	275 \pm 85	199 \pm 61	0,08 \pm 0,02	0,03 \pm 0,01
Sessões de retirada						
1	33 \pm 18	57 \pm 17	164 \pm 65	257 \pm 54	0,04 \pm 0,02	0,06 \pm 0,02
2	50 \pm 16	33 \pm 8	219 \pm 66	176 \pm 39	0,06 \pm 0,02	0,04 \pm 0,01
3	54 \pm 11	28 \pm 7	298 \pm 52	205 \pm 49	0,08 \pm 0,01	0,03 \pm 0,01
4	74 \pm 21	49 \pm 21	303 \pm 81	186 \pm 51	0,06 \pm 0,03	0,09 \pm 0,02

Tabela 5.2 Concentração sérica de cortisol nos animais tratados com salina e com cocaína, em cada uma das coletas realizadas ao longo do experimento; média \pm epm (μ g/dL).

Amostra	Grupo	
	salina	cocaína
controle basal	92 \pm 14	84 \pm 16
após a sessão 1	102 \pm 7	94 \pm 8
após a sessão 4	91 \pm 6	89 \pm 6
após as sessões de retirada	102 \pm 10	91 \pm 8
12 semanas após a retirada	103 \pm 18	103 \pm 17

5.5 DISCUSSÃO

Os micos tratados repetidamente com cocaína (5 mg/kg), apresentaram, após algumas sessões, um aumento significativo em comportamentos de vigilância. Essa alteração não foi acompanhada de mudanças na locomoção e na concentração de cortisol.

De fato, os micos tratados com cocaína demonstraram significativamente mais monitoramentos visuais (duração e frequência) e *glances*, entre as sessões de teste 4 e 9, quando comparados aos níveis observados na primeira sessão de teste e ao animais do grupo controle. Em macacos Rhesus (p.e. 265) e em macacos *vervet* (p.e. 264), a administração repetida desse mesmo psicoestimulante também levou a um aumento progressivo no monitoramento visual, enquanto que em humanos uma psicose paranóica também já foi relatada (revisado em 261). Em roedores, os comportamentos de vigilância não são modulados por administrações aguda e crônica de cocaína (261). Por outro lado, o número de *leg stand* diminuiu ao longo das sessões experimentais, independente do tratamento administrado. Esta postura em micos está associada a um aumento da visibilidade do ambiente e de interesse em objetos novos presentes no ambiente (182), e já foi modulada por diferentes tratamentos farmacológicos nesses primatas (p.e. 232). Portanto, esse perfil observado no presente estudo parece estar mais relacionado a um possível efeito de habituação ao procedimento/aparato experimental, como relatado em estudos anteriores (p.e. 195).

A retirada da cocaína, por sua vez, foi capaz de reverter os efeitos comportamentais na vigilância. Nas quatro sessões de retirada, o número de monitoramentos visuais e de *glance* do grupo tratado com cocaína não diferiram significativamente dos que receberam apenas salina, estando em níveis similares aos observados na primeira sessão.

Os parâmetros avaliados para a locomoção (distância percorrida, número de cruzamentos e velocidade média) permaneceram inalterados ao longo de todas as sessões experimentais, independente do tratamento administrado. Em roedores, a cocaína induz um efeito de hiperlocomoção após administrações realizadas de forma aguda e crônica, porém, esse efeito não é tipicamente observado em primatas não-humanos (261). Em micos, um aumento na locomoção foi relatado, porém outro tipo de protocolo experimental e uma dose maior de cocaína (10 mg/kg) foram empregados (271; 272). Em outras espécies de primata não-humanos, a administração de psicoestimulantes induziu um aumento em movimentos

estereotipados (p.e. 219), enquanto que em voluntários humanos foi relatado um aumento na atividade após uma exposição limitada a anfetamina (p.e. 273).

Em relação aos níveis de cortisol, a administração repetida de cocaína ou salina não tiveram efeitos significativos, mesmo sabendo-se que esse psicoestimulante ativa o eixo HPA, e por consequência aumenta a concentração de cortisol presente no sangue (revisado em 267). Apesar do longo intervalo entre a administração do tratamento e a coleta de sangue, que no presente estudo foi de 12-h, uma ausência de efeito nos níveis de cortisol já foi relatada anteriormente (270). Nesse trabalho, em que foram coletadas amostras de sangue 30-min e 60-min após a administração de diferentes doses de cocaína, um aumento de cortisol circulante só foi observado após um intervalo de 60-min da administração de 20 mg/kg. Outro fator que deve ser considerado é a de um possível efeito teto sobre a concentração de cortisol devido ao estresse causado pelo procedimento de captura. Mas, trabalhos anteriores realizados em micos relatam um aumento nesse hormônio, após uma indução experimental, para níveis acima dos observados no presente estudo (p.e. 221). De fato, as concentrações presentemente encontradas são similares as já relatadas para essa espécie (274). Além disso, os níveis não foram correlacionados à duração do procedimento de captura e os dados do grupo salina permaneceram inalterados, mesmo após diversas coletas. A ausência de um efeito pode ter sido causada, em parte, pela baixa afinidade que glicocorticóides tem pelo seu receptor nessa espécie, levando a níveis basais elevados (p.e. 275; porem veja 276). Em macacos-de-cheiro, uma outra espécie de primata neotropical resistente à glicocorticóides, uma re-exposição a cocaína re-estabeleceu o comportamento de busca e obtenção pela droga, apesar de não ser observado alterações nos níveis de cortisol presente na saliva (200). Por outro lado, em macacos Rhesus, a administração de cocaína comumente induz um aumento na liberação de cortisol (p.e. 277). Esses resultados sugerem, portanto, que macacos do Velho Mundo (incluindo os humanos) e os do Novo Mundo podem diferir em termos de sua resposta hormonal (do eixo HPA) à administração sistêmica de cocaína.

5.6 CONCLUSÃO

A dose de 5 mg/kg de cocaína, administrada de forma repetida em micos sem exposição prévia à droga, induziu um aumento progressivo nos comportamentos de vigilância, sem alterar a locomoção e os níveis de cortisol desses animais. Dessa forma, após a administração de cocaína, os micos parecem responder com comportamentos similares aos relatados tanto para humanos, quanto para outros primatas não-humanos. Contudo, as alterações hormonais observadas não foram similares. Ademais, a administração de cocaína não alterou igualmente todos os parâmetros comportamentais da vigilância, apenas o monitoramento visual e *glance*. Esse efeito comportamento-específico já observado por Mello e cols. (278), em que foi administrado anfepramona de forma aguda em micos. Portanto, a vigilância nos primatas não-humanos pode ser uma forma ímpar de mensurar as alterações induzidas pela cocaína.

6 ESTUDO 4: Efeitos de ligantes de receptores canabinóides CB1 nos comportamentos induzidos pela administração repetida de cocaína.

6.1 INTRODUÇÃO

Diversos estudos indicam a participação do ECS na dependência por drogas de abuso (p.e. psicoestimulantes). O mesmo pode modular as vias dopaminérgicas de recompensa, o que sugere que os eECs também desempenham um papel importante nos mecanismos que subsidiam o abuso por diferentes substâncias (279). Ademais, os receptores canabinóides estão localizados nas principais regiões cerebrais relacionadas à dependência, como a VTA, o NAc e o córtex pré-frontal (160). Sabe-se também que os canabinóides e outros compostos que modulam o ECS podem influenciar o efeito da cocaína em modelos animais (157; 158; 159). Já foi demonstrado que o bloqueio dos receptores canabinóides reduziu os efeitos reforçadores de drogas de abuso como opiáceos, nicotina, álcool e cocaína, indicando o envolvimento do ECS nos mecanismos neurobiológicos da dependência (169). Apesar dos mecanismos neurais envolvidos na interação ECS e cocaína não estarem totalmente elucidados, a estimulação dos receptores canabinóides CB1 pode atuar como um mecanismo de *feedback* negativo que age sob demanda, contra o aumento de DA no Nac induzido pela administração da cocaína (280).

Contudo, foram apontadas importantes diferenças entre roedores e primatas não-humanos em termos do ECS e sua modulação sobre os efeitos das drogas de abuso. De fato, esses dois modelos animais apresentam diferenças na distribuição de receptores canabinóides CB1 (26) e na via dopaminérgica (para revisão recente ver 187). Além disso, a administração concomitante de agonista dopaminérgico e ligantes canabinóides afetou roedores e primatas de forma diferenciada (245). Em roedores, estudos anteriores relatam que o bloqueio do ECS pelo rimonabant reduziu a busca pela droga e a recaída (281). Por outro lado, estudos indicam a ativação do ECS teve efeitos divergentes, tendo induzido preferência por lugar (159) ou nenhum efeito neste mesmo teste (282).

As discrepâncias observadas podem ser causadas por diferenças metodológicas como: (1) doses altas vs. baixas (240); (2) diferentes compostos utilizados, com diferentes alvos no ECS (258); (3) a espécie utilizada no modelo animal (camundongos vs. ratos; 243; roedores vs. primatas; 245) e (4) diferentes aparatos experimentais adotados (283). Ademais, primatas não-humanos, comparado com roedores, parecem responder de forma mais semelhante aos humanos quando tratados com ligantes de receptores canabinóides CB1 (244; 21; 245; 246). Mas, pouco se sabe a respeito da interação entre o pré-tratamento com ligantes canabinóides nos efeitos da cocaína.

6.2 OBJETIVO

Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito do pré-tratamento com um agonista e um antagonista de receptor canabinóide CB1, WIN 55-212,2 e AM 251, respectivamente, nos comportamentos de vigilância e locomoção em micos-estrela após a administração sistêmica e repetida de cocaína.

6.3 METODOLOGIA

6.3.1 Sujeitos

Foram utilizados trinta micos-estrela adultos (machos e fêmeas) da espécie *Callithrix penicillata* (peso: 290 - 410g) e alojados no Centro de Primatologia da Universidade de Brasília (CPUnB). As demais condições de alojamento e manejo foram mantidas como descrito no item 3.3.1.

6.3.2 Aparato Experimental

O aparato empregado – o CA – consistiu em uma arena retangular de livre circulação (130 cm de comprimento x 75 cm de profundidade x 40 cm de altura), suspensa a 1,2 m do solo (Figura 3.2). Uma descrição completa do aparato encontra-se no item 3.3.2.

6.3.3 Drogas

O agonista de receptores CB1 WIN 55-212,2 (Luk e cols., 2004) e o antagonista AM 251 (Howlett e cols., 2002) (Sigma-Aldrich, Brasil) foram dissolvidos em uma solução veículo contendo Tween 80, DMSO e salina (1:1:8) e administrados via i.p., no volume de 1 mL/kg, 30-min antes das injeções de cocaína ou salina. O WIN 55-212,2 foi administrado na dose de 1 mg/kg e o AM 251 na dose de 2 mg/kg. O hidrocloreto de cocaína (Sigma-Aldrich, EUA; 5mg/kg) foi dissolvido em solução salina e injetado via i.p. em um volume de 1mL/kg, 5-min antes do teste comportamental. A escolha das doses utilizadas neste estudo tiveram como referência estudos anteriores similares em que foram realizadas administrações sistêmicas desses ligantes canabinóides em primatas ou roedores (Rodgers e cols., 2005; Delatte e Paronis, 2008).

6.3.4 Procedimento Experimental

Cada sujeito foi inicialmente submetido a quatro sessões, de 5-min cada, de manuseio/*handling*, conforme já descrito no item 3.3.4. Em seguida, os sujeitos foram divididos em seis grupos experimentais (n=5 em cada grupo), de acordo com o seguinte sequência de pré-tratamento e tratamento pré-estabelecida: (1) veículo-salina; (2) veículo-cocaína; (3) WIN 55-212,2-salina; (4) WIN 55-212,2-cocaína; (5) AM 251-salina e (6) AM 251-cocaína. Cada grupo foi submetido a seis sessões de teste e uma sessão de retirada, de 15-min cada. Todas as sessões foram realizadas no aparato do campo aberto e em intervalos de 48-h.

Em cada uma das seis sessões de teste, o animal foi capturado em seu viveiro de moradia, administrado o seu respectivo pré-tratamento (i.e. WIN 55-212,2, AM 251 ou veículo) e liberado de volta ao seu viveiro de moradia. Após o intervalo de 30-min, o mico foi novamente capturado e o tratamento (i.e. cocaína ou salina) foi administrado. Em seguida, o sujeito foi colocado dentro da caixa-transporte para então ser levado até a sala de experimento e liberado no aparato. Durante a sessão de 15-min, o sujeito teve acesso livre e

espontâneo a todo aparato, sendo o mesmo levado de volta ao seu viveiro de moradia, via a caixa-transporte, ao final desse intervalo. Na sessão subsequente (de retirada), os animais foram capturados e colocados diretamente na caixa-transporte para serem levados à sala de experimento e liberados no campo aberto. Portanto, nessa sessão, não houve a administração de nenhum composto. O restante do procedimento nesta sessão foi igual o das sessões anteriores (de teste). Os testes foram realizados entre às 13:30 e 17:00 h. A ordem dos sujeitos em cada dia de experimento foi estabelecida de forma randômica.

Todas as sessões foram observadas da sala adjacente à sala de experimento, através do circuito interno de filmagem, e gravadas no programa de análise comportamentais Any-Maze™ Video Tracking System (Stoelting Co., EUA).

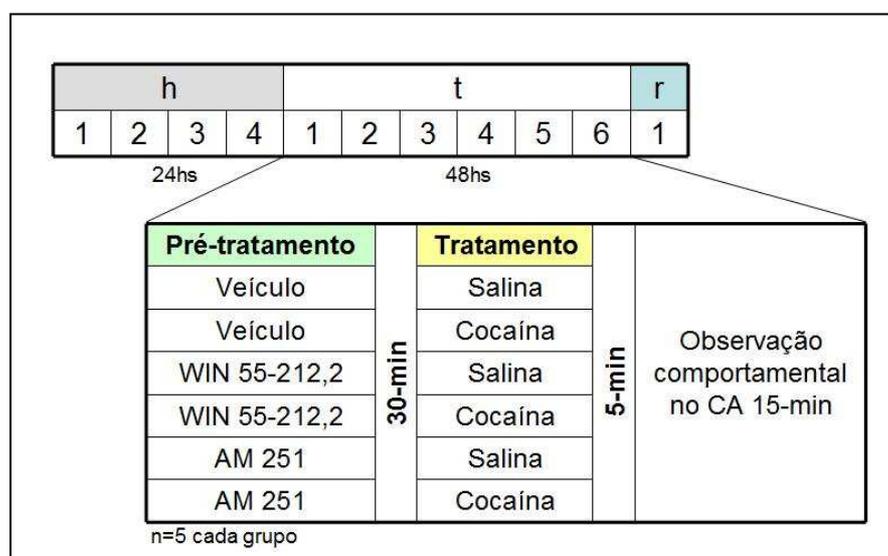


Figura 6.1 Representação esquemática do estudo 4.

6.3.5 Análise dos Dados Comportamentais

O programa AnyMaze (Stoelting Co., EUA) registrou de forma automatizada o tempo de permanência e o número de entradas em cada um dos 15 quadrantes do aparato, assim como a distância total percorrida e a velocidade média dos micos dentro do aparato. Além disso, um observador treinado, com uma confiabilidade inter-observador de 95%, registrou no mesmo programa os comportamentos de vigilância descritos a seguir, ao pressionar

teclas em um computador portátil à medida que os mesmos ocorriam. Foram feitos registros de: (1) *Leg stand*, ficar em uma posição bipedal estendida; (2) *Glance*, frequência de movimentos curtos e rápidos direcionados ao ambiente enquanto o animal permanecia parado e (3) *Scan*, monitoramento visual, duração e frequência de movimentos da cabeça longos e duradores (>5-s) de varredura direcionados ao ambiente, enquanto o animal permanecia parado. Os comportamentos de vigilância foram baseados em etogramas de micos (284; 182) e estudos anteriores (224, 196; 285).

6.3.6 Análise Estatística

Para cada parâmetro obtido, os resultados foram expressos como a média dos valores e o erro padrão da média (+epm). Na análise estatística, apenas os dados das sessões de teste um e seis e da sessão de retirada foram utilizados, uma vez que estudos anteriores nessa mesma espécie tem demonstrado que a administração repetida de cocaína altera de forma consistente diferentes parâmetros comportamentais (dados ainda não publicados).

Ademais, os dados referentes aos grupos de animais testados com WIN 55-212,2 (WIN 55-212,2–salina e WIN 55-212,2–cocaína) foram analisados separadamente dos que foram tratados com AM 251 (AM 251–salina e AM 251–cocaína). Os dados dos grupos veículo–salina e veículo–cocaína foram utilizados como controle negativo e positivo, respectivamente, na análise dos resultados de ambos os ligantes. Como o veículo utilizado para ambos os ligantes foi o mesmo, o uso dos mesmo animais como controle visou reduzir o número de sujeitos no estudo.

Foram analisadas possíveis diferenças entre os grupos e entre as sessões dentro de um mesmo grupo. Os dados foram analisados por meio de uma Análise de Variância de duas vias de desenho misto (*mixed design two-way ANOVA*), sendo o grupo experimental o fator independente e a sessão a variável dependente. Resultados significativos foram

seguidos pelo teste *post hoc* de Tukey. O nível de significância adotado em todos os testes foi de $p \leq 0,05$.

6.4 RESULTADOS

A administração do agonista de receptores canabinóides CB1 WIN 55-212,2 (WIN) alterou, de forma significativa, a frequência de monitoramentos visuais entre os grupos ($F_{3,48}=12,46$, $p < 0,001$) e as sessões ($F_{2,48}=6,46$, $p > 0,001$), tendo uma interação significativa entre o grupo vs. a sessão experimental ($F_{6,48}=2,35$, $p < 0,05$; Figura 6.2). Desta forma, nos grupos veículo-cocaína e WIN-cocaína, a frequência de monitoramentos na sessão 6 foi significativamente ($p < 0,05$) maior que a observada na sessão 1 e na de retirada. Além disso, na sessão 6, o nível de monitoramento nos grupos veículo-cocaína, WIN-salina e WIN-cocaína foi significativamente ($p < 0,05$) maior que o do grupo controle veículo-salina. Na sessão 1, esse mesmo parâmetro comportamental foi significativamente ($p < 0,05$) maior no grupo WIN-cocaína, comparado ao grupo controle (veículo-salina). Na sessão de retirada, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos.

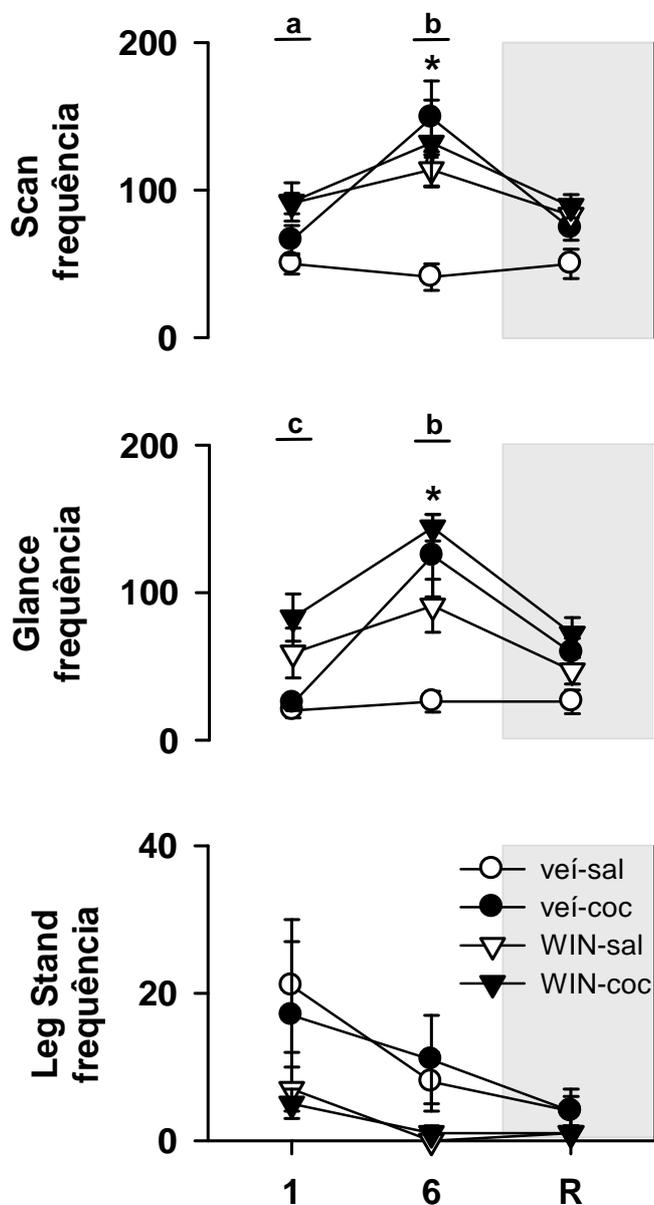


Figura 6.2 Média (+epm) da frequência de comportamentos de vigilância (*monitoramento*, *glance* e *leg stand*) observados nos micos tratados com veículo-salina, veículo-cocaína, WIN 55-212,2-salina e WIN 55-212,2-cocaína durante a primeira e última sessão de tratamento (1 e 6) e na sessão de retirada (R): n=5 em cada grupo. (a) $p < 0,05$ WIN-coc vs. veí-sal; (b) $p < 0,05$ veí-sal vs. veí-coc, WIN-sal, WIN-coc; (c) $p < 0,05$ WIN-coc vs. veí-sal e veí-coc; * $p < 0,05$ vs. sessão 1 e R nos grupos veí-coc e WIN-coc.

Em relação ao número de *glances*, houve diferenças significativas entre os grupos ($F_{3,48}=16,07$, $p > 0,001$) e as sessões ($F_{2,48}=13,58$, $p < 0,001$), tendo uma interação significativa entre o grupo vs. as sessões ($F_{6,48}=3,36$, $p < 0,01$; Figura 6.2). Nos grupos veículo-cocaína e WIN-cocaína a frequência de *glances* na sessão 6 foi significativamente ($p < 0,05$) maior que

a da sessão 1 e a de retirada. Além disso, nessa última sessão com droga (sessão 6), os grupos veículo-cocaína, WIN-salina e WIN-cocaína demonstraram um número significativamente ($p < 0,05$) maior de *glances* que o observado no grupo controle (veículo-salina). Na sessão 1, esse mesmo parâmetro comportamental foi significativamente ($p < 0,05$) maior no grupo WIN-cocaína, comparado aos grupos veículo-salina e veículo-cocaína. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos na sessão de retirada. Os níveis de monitoramento e *glance* no grupo controle veículo-salina permaneceram baixas e constantes ao longo de todo o experimento.

Por outro lado, a frequência de *leg stand* dos micos foi menor na sessão 6 e na de retirada, comparado a sessão 1, independente do grupo, mesmo que não tenha atingido níveis significativos (grupo: $F_{3,48}=2,14$, $p < 0,06$; sessão: $F_{2,48}=1,92$, $p=0,16$; interação: $F_{6,48}=0,81$, $p=0,57$; Figura 6.2). Ademais, não foram detectadas diferenças significativas para os parâmetros locomotores avaliados (*Distância Percorrida* - grupo: $F_{3,48}=0,67$, $p=0,58$; sessão: $F_{2,48}=2,70$, $p=0,08$; interação: $F_{6,48}=0,08$, $p=0,99$; *Número de Cruzamentos* - grupo: $F_{3,48}=2,05$, $p=0,12$; sessão: $F_{2,48}=2,41$, $p=0,06$; interação: $F_{6,48}=0,20$, $p=0,97$; *Velocidade Média* - grupo: $F_{3,48}=0,71$, $p=0,55$; sessão: $F_{2,48}=2,55$, $p=0,06$; interação: $F_{6,48}=0,16$, $p=0,98$; Tabela 6.1).

A administração do antagonista de receptor canabinóide CB1 AM 251 (AM) induziu uma alteração significativa na frequência de monitoramentos visuais entre os grupos de ($F_{3,48}=38,55$, $p < 0,001$) e as sessões ($F_{2,48}=19,10$, $p < 0,001$), tendo uma interação significativa entre grupo vs. sessão ($F_{6,48}=5,77$, $p < 0,001$; Figura 6.3). Nos grupos veículo-cocaína e AM-cocaína, a frequência de monitoramentos na sessão 6 foi significativamente maior que a observada na sessão 1 e na de retirada. Porém, na sessão 6, o grupo AM-cocaína demonstrou um número significativamente ($p < 0,05$) maior de monitoramentos que os dos demais três grupos. Nesta mesma sessão, a frequência de monitoramentos também foi significativamente ($p < 0,05$) maior nos grupos veículo-cocaína e AM-salina, comparado ao do grupo veículo-salina. Por outro lado, na sessão 1, a duração do monitoramento foi significativamente ($p < 0,05$) maior no grupo AM-cocaína, em relação aos outros grupos. Na

sessão de retirada, o número de monitoramentos e de *glances* no grupo AM–cocaína foi significativamente ($p < 0,05$) maior que a do grupo veículo-salina.

Tabela 6.1 Parâmetros locomotores (média \pm epm) observados durante a sessão 1, sessão 6 e a de retirada nos seis grupos experimentais testados.

Parâmetro	Sessão		
	1	6	Retirada
<i>Distância percorrida (m)</i>			
veículo-salina	75 \pm 16	50 \pm 21	53 \pm 18
veículo-cocaína	90 \pm 21	72 \pm 24	57 \pm 17
WIN 55-212,2-salina	83 \pm 10	65 \pm 21	48 \pm 21
WIN 55212,2-cocaína	92 \pm 10	62 \pm 20	59 \pm 11
AM 251-salina	63 \pm 15	53 \pm 15	77 \pm 21
AM 251-cocaína	75 \pm 10	85 \pm 11	94 \pm 10
<i>Número de cruzamentos</i>			
veículo-salina	316 \pm 62	254 \pm 71	264 \pm 75
veículo-cocaína	432 \pm 93	436 \pm 99	257 \pm 64
WIN 55-212,2-salina	396 \pm 35	278 \pm 74	268 \pm 55
WIN 55212,2-cocaína	353 \pm 38	317 \pm 74	239 \pm 54
AM 251-salina	242 \pm 38	299 \pm 57	264 \pm 53
AM 251-cocaína	434 \pm 79	434 \pm 48	221 \pm 41
<i>Velocidade média (m/s)</i>			
veículo-salina	0,10 \pm 0,04	0,06 \pm 0,04	0,06 \pm 0,04
veículo-cocaína	0,10 \pm 0,02	0,08 \pm 0,02	0,06 \pm 0,02
WIN 55-212,2-salina	0,09 \pm 0,02	0,07 \pm 0,02	0,06 \pm 0,02
WIN 55212,2-cocaína	0,10 \pm 0,02	0,07 \pm 0,02	0,05 \pm 0,03
AM 251-salina	0,07 \pm 0,02	0,05 \pm 0,02	0,05 \pm 0,02
AM 251-cocaína	0,13 \pm 0,03	0,09 \pm 0,03	0,06 \pm 0,02

O pré-tratamento com AM 251 também alterou, de forma significativa, o número de *glances* entre os grupos ($F_{3,48}=23,21$, $p < 0,001$) e as sessões ($F_{2,48}=11,73$, $p < 0,001$), tendo uma interação significativa entre grupo vs. sessão ($F_{6,48}=3,47$, $p < 0,01$; Figura 6.3). De fato, os grupos veículo–cocaína e AM–cocaína tiveram um número significativamente ($p < 0,05$) maior de *glances* na sessão 6 que na sessão 1 e na de retirada. Mas, durante a sessão 6, o grupo AM-cocaína demonstrou níveis significativamente ($p < 0,05$) maiores desse comportamento que os demais, enquanto que os grupos veículo-cocaína e AM-salina tiveram frequências mais altas que os animais tratados com veículo-salina. Na sessão 1, a frequência de *glance* foi significativamente maior apenas no grupo AM-cocaína, comparado aos demais grupos, e na sessão de retirada o grupo AM–cocaína teve um número significativamente ($p < 0,05$) maior de *glance* que os animais que receberam veículo-salina.

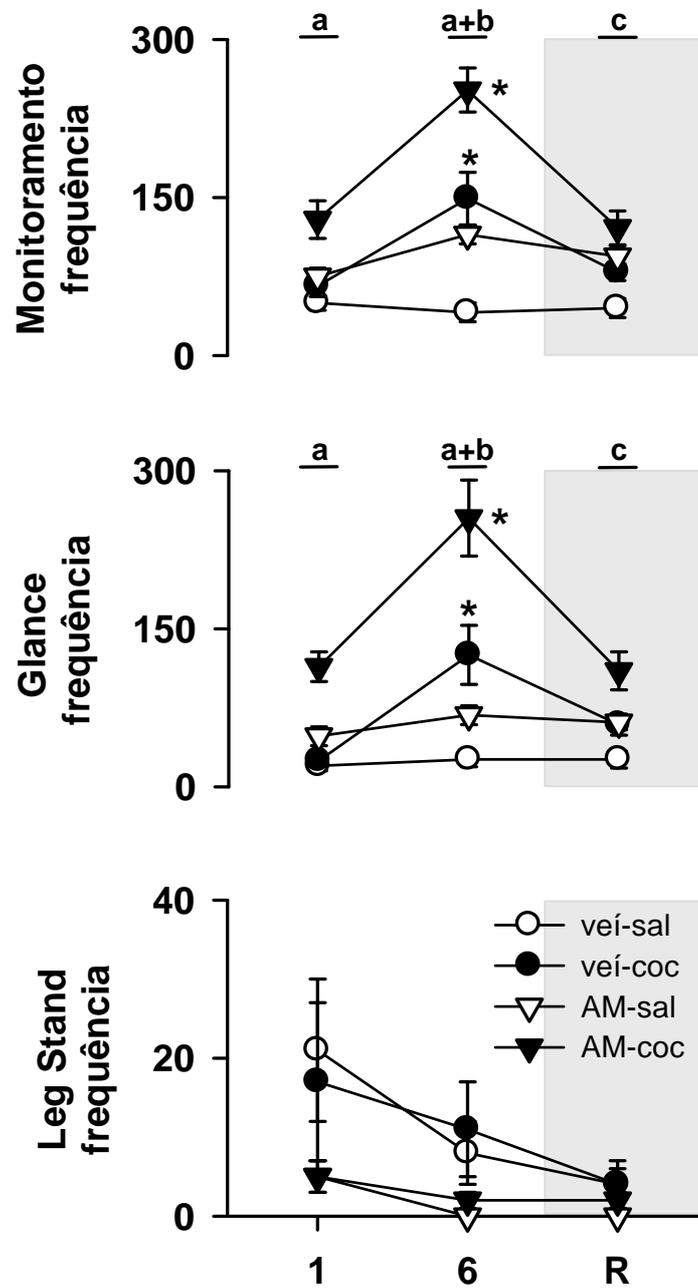


Figura 6.3 Média (+epm) da frequência de comportamentos de vigilância (*scan*, *glance* e *leg stand*) observados nos micos tratados com veículo – salina, veículo – cocaína, AM 251 – salina e AM 251 – cocaína durante a primeira e a última sessão de tratamento (1 e 6) e na sessão de retirada (R): n=5 em cada grupo. (a) p<0,05 AM-coc vs. veí-sal, veí-coc e AM-sal; (b) p<0,05 veí-sal vs. veí-coc, AM-sal; (c) p<0,05 AM-coc vs. veí-sal; *p<0,05 vs. sessão 1 e R nos grupos veí-coc e AM-coc.

A frequência de *leg stand* observada nos micos também foi menor na sessão 6 e na de retirada, comparada a sessão 1, independente do grupo, mesmo que diferenças significativas não foram detectadas (grupo: $F_{3,48}=3,88$, $p<0,07$; sessão: $F_{2,48}=1,86$, $p=0,17$; interação: $F_{6,48}=0,80$, $p=0,57$; Figura 6.3). Já para a locomoção, não foram observadas diferenças significativas em nenhum dos parâmetros avaliados (*Distância Percorrida* - grupo: $F_{3,48}=1,18$, $p=0,33$; sessão: $F_{2,48}=2,82$, $p=0,07$; interação: $F_{6,48}=0,086$, $p=0,53$; *Número de Cruzamentos* – grupo: $F_{3,48}=2,34$, $p=0,07$; sessão: $F_{2,48}=2,22$, $p=0,06$; interação: $F_{6,48}=0,99$, $p=0,44$; *Velocidade Média* – grupo: $F_{3,48}=0,92$, $p=0,44$; sessão: $F_{2,48}=2,67$, $p=0,06$; interação: $F_{6,48}=0,84$, $p=0,55$; Tabela 6.1).

6.5 DISCUSSÃO

Neste estudo, os micos tratados com o agonista de receptor canabinóide CB1 WIN apresentaram alterações significativas nos comportamentos de vigilância. De fato, os micos tratados veículo-cocaína e WIN-cocaína demonstraram significativamente mais monitoramentos visuais e *glances* na sessão 6, comparado a sessão 1 e a de retirada. Além disso, os micos dos grupos veículo-cocaína, WIN-cocaína e WIN-salina apresentaram um número significativamente maior de *glances* e monitoramentos na sessão 6, que os animais do grupo controle. Nesse sentido, o WIN, por si só, foi capaz de induzir um aumento da vigilância nos micos, observado ao longo de todas as sessões. Entretanto, não houve um efeito progressivo no aumento da vigilância, como demonstrado por Page e colaboradores (285). Neste estudo, a dose de 0,3 mg/kg de WIN 55-212,2 sistêmica induziu uma estimulação das vias noradrenérgicas, efeito relacionado com a vigilância (286).

Ademais, não foram observados efeitos significativos no grupo de animais tratados com cocaína, quando pré-tratados com WIN. Portanto, a administração do agonista de receptor canabinóide CB1 não foi capaz de modular os efeitos induzidos pela cocaína nos micos submetidos a seis sessões de pré-tratamento/tratamento. Este resultado corrobora com estudo anterior, que não obteve efeito modulador do ECS a partir da administração de

um agonista de receptor canabinóide CB1 em macacos-prego tratados com anfetamina (287).

Os micos tratados com o antagonista de receptor canabinóide CB1 AM apresentaram diferenças significativas nos comportamentos de vigilância. De fato, a frequência de monitoramentos visuais e o número de *glances* foi maior nos grupos AM-cocaína e veículo-cocaína na sessão 6 que o observado na sessão 1 e na de retirada. Na sessão 6, o grupo AM-cocaína demonstrou um número significativamente maior de monitoramentos visuais e de *glances* que os animais do grupo controle. Além disso, na sessão 1, os micos do grupo AM-cocaína demonstraram um número significativamente maior de monitoramentos visuais e de *glances* que os animais dos outros grupos. Dessa forma, foi observada uma potencialização dos efeitos induzidos pela cocaína nos micos, induzida pelo pré-tratamento com o antagonista canabinóide AM. Efeito semelhante foi relatado por Thiemann e colaboradores (288) onde o antagonista de receptor canabinóide CB1 rimonabant potencializou os efeitos da anfetamina em ratos. Por outro lado, Madsen e colaboradores (287) observaram uma diminuição da hipervigilância induzida por cocaína em macacos, efeito oposto ao observado. Vale ressaltar que este último estudo não utilizou o regime de administração repetida.

As alterações comportamentais observadas neste estudo não foram observadas de efeitos locomotores, comumente relatado em roedores. Diferenças na quantidade e localização de receptores CB1 em roedores e primatas podem ser responsáveis por essa divergência entre as duas espécies. Ong e Mackie (26) relataram uma ausência desses receptores no estriado de primatas, o que não ocorre nos roedores. Nesse sentido, o controle motor que é mediado pelos receptores canabinóides e dopaminérgicos localizados no estriado, tanto de roedores quanto de macacos, pode ser mais complexo e envolver diversas regiões dos núcleos basais, tais como globo pálido, substância nigra e núcleos subtalâmicos (246). Esta pode ser a razão pela ausência de efeitos locomotores observada após a administração sistêmica e repetida de ligantes de receptores canabinóides CB1 em primatas.

A frequência de *leg stand*, por sua vez, foi menor na sessão 6 e na de retirada que o observado na sessão 1, independente do grupo, sem diferenças significativas. Da mesma forma, ambientes novos induziram um aumento da atividade exploratória (193, 234; 196) e esse efeito diminuiu ao longo de exposições repetidas (224).

O fato do antagonista de receptor canabinóide CB1 ter potencializado o efeito da cocaína neste estudo contribui para a hipótese de que dois dos principais tipos de neurotransmissores (eECs e DA) podem exercer funções recíprocas nos processos neuroadaptativos (43). Entretanto, em primatas, essa ação não se dá no controle motor, como em roedores.

Estudos anteriores já demonstraram que o bloqueio farmacológico dos receptores canabinóides CB1 interfere negativamente com os efeitos induzidos por psicoestimulantes, o que sugere que esse receptor é necessário na determinação da dependência (115). Por outro lado, o bloqueio do receptor canabinóide CB1 pode causar a redução dos efeitos de recaída por drogas de abuso (281) ou até mesmo não induzir nenhum efeito (281). Além disso, estudos recentes demonstraram que os receptores canabinóides do tipo CB2 podem ser encontrados no CNS e que esta presença pode estar relacionada aos efeitos induzidos pela administração da cocaína (289; 290). Portanto, os efeitos observados neste estudo podem ser devido a interação das drogas utilizadas com este receptor.

O ECS já foi associado a diversos aspectos da dependência por drogas de abuso (p.e. busca, recaída). A interação do ECS com os efeitos induzidos pela cocaína já foi demonstrada em diversos estudos (p.e. 155). Entretanto, os resultados obtidos até o momento divergem, possivelmente devido às diferentes espécies empregadas, diferentes procedimentos experimentais, diferentes doses e/ou diferentes compostos utilizados (291). Nesse sentido, estudos realizados com primatas são importantes no sentido de contribuir com a crescente bibliografia acerca do ECS. Portanto, os micos podem constituir uma ferramenta ímpar na avaliação dos efeitos comportamentais de psicoestimulantes e canabinóides, pois respondem de maneira mais parecida com os humanos que os roedores (p.e. 244).

6.6 CONCLUSÃO

O pré-tratamento com o agonista de receptor canabinóide CB1, WIN 55-212,2 na dose de 1 mg/kg, induziu um aumento nas respostas de vigilância nos micos, mas não foi capaz de modular os efeitos induzidos pela administração repetida de cocaína. Por outro lado, o pré-tratamento com o antagonista de receptor canabinóide CB1, AM 251 na dose de 2 mg/kg, potencializou o efeito de hipervigilância induzido pela administração repetida de cocaína nos micos, já a partir da primeira sessão. Vale ressaltar que os efeitos observados não foram acompanhados de alterações no padrão de locomoção dos micos, para ambos ligantes. Além disso, a retirada do pré-tratamento/tratamento reverteu, rapidamente, todas as alterações observadas, independente da substância administrada.

Portanto, o pré-tratamento com ligantes de receptor canabinóide CB1 foi capaz de modular os efeitos induzidos pela cocaína, indicando que esse sistema pode desempenhar uma função importante na dependência por este psicoestimulante. Sendo assim, é possível modular o ECS em primatas não-humanos, via administração sistêmica de ligantes de receptor canabinóide CB1 que, por sua vez, influencia as respostas comportamentais induzidas por psicoestimulantes, como já demonstrado anteriormente (p.e. 287). Ademais, o perfil observado nestes animais é mais parecido com o perfil observado em humanos (p.e. 244). Neste sentido, este pode ser um modelo ímpar para avaliar os efeitos comportamentais da modulação do ECS e da interação do ECS com os efeitos induzidos pela administração repetida de cocaína.

7 DISCUSSÃO GERAL

A modulação do ECS tem sido considerada um importante alvo para o tratamento da ansiedade e da dependência por drogas de abuso, baseado nas diferentes propriedades terapêuticas e farmacológicas dos compostos que agem neste sistema. Nesse sentido, este trabalho avaliou o efeito de ligantes de receptores CB1 nos comportamentos de ansiedade e nos efeitos induzidos pela administração repetida de cocaína:

- A exposição aguda, rápida (15-min) e individual a um ambiente desconhecido (o aparato do CA) induziu, nos micos-estrela, um repertório comportamental sugestivo a uma situação/condição ansiogênica para esses animais, a qual foi revertida significativamente por uma administração sistêmica prévia do benzodiazepínico diazepam (0,5 mg/kg ip);
- A administração sistêmica prévia do agonista de receptor canabinóide WIN 55-212,2 (1 mg/kg ip) e do antagonista do receptor canabinóide CB1 AM 251 (2 mg/kg ip) também reverteram comportamentos indicativos de ansiedade nos micos expostos a um ambiente desconhecido (o aparato do CA), mas o efeito do WIN 55-212,2 foi mais consistente, pronunciado e similar ao visto anteriormente para o diazepam;
- A administração sistêmica e repetida de cocaína (5 mg/kg ip) induziu um aumento gradual e significativo em determinados comportamentos relacionados à vigilância nos micos (monitoramento e *g lance*), não havendo uma alteração concomitante nos níveis de locomoção ou cortisol;
- O pré-tratamento com o antagonista do receptor canabinóide CB1 (AM 251) potencializou o efeito de hipervigilância induzido por uma administração subsequente sistêmica e repetida de cocaína nos micos, já a partir da primeira sessão, enquanto que o pré-tratamento com o agonista do receptor canabinóide (WIN 55-212,2) não foi capaz de modular esse efeito;

- O pré-tratamento com ambos os ligantes de receptor canabinóide não induziu alterações no padrão de locomoção dos micos e a retirada dos pré-tratamentos/tratamentos reverteu, rapidamente, todas as alterações comportamentais induzidas pelos procedimentos experimentais, independentemente da substância administrada;
- Os efeitos comportamentais observados nos micos – tanto para ansiedade no CA, quanto para hipervigilância em resposta a administração repetida de cocaína – foram similares às respostas tipicamente relatadas em roedores e usuários crônicos, respectivamente;
- A ausência de uma resposta hormonal (cortisol) à administração de cocaína nos micos difere do perfil normalmente observado em roedores, outras espécies de primatas não-humanos (ex: macacos Rhesus) e humanos, podendo essa divergência ser devido a fatores metodológicos ou a resistência à glicocorticóides apresentada por primatas neotropicais, incluindo o mico-estrela;
- O pré-tratamento com ligantes do receptor canabinóide CB1 influenciou os efeitos comportamentais induzidos pela cocaína, indicando que esse sistema pode desempenhar um importante papel modulatório na dependência por esse psicoestimulante.

8 CONCLUSÃO

Considerando o perfil comportamental observado nos quatro estudos realizados, foi possível modular o SE em primatas não-humanos, via administração sistêmica de ligantes de receptor canabinóide CB1, que por sua vez influenciou as respostas comportamentais indicativas de ansiedade e os efeitos de psicoestimulantes (como a cocaína), sendo o perfil observado mais similar ao que é relatado em humanos, comparado a roedores.

9 BIBLIOGRAFIA

- 1 Goodman & Gilman. As bases farmacológicas da terapêutica. Editores responsáveis: Joel G. Hardman, Lee E. Limbird. Editor consultor: Alfred Goodman Gilman; [tradução da 10. ed. original, Carla de Mello Vorsatz e cols., revisão técnica: Almir Lourenço da Fonseca]. Rio de Janeiro; McGraw-Hill, 2005.
- 2 Fattore L, Fadda P, Spano MS, Pistis M, Fratta W. Neurobiological mechanisms of cannabinoid addiction. *Mol Cell Endocrinol.* 2008;286 (1-2 Suppl 1):S97-107.
- 3 Elkashef A, Vocci F, Huestis M, Haney M, Budney A, Gruber A, et al. Marijuana neurobiology and treatment. *Subst Abus.* 2008; 29(3):17-29.
- 4 Malcher-Lopes R e Ribeiro S. Maconha, Cérebro e Saúde. Rio de Janeiro: Vieira & Lent, 2007.
- 5 Pertwee RG. Cannabinoid pharmacology: the first 66 years. *Brit J of Pharmacol.* 2006, V.147: p S136-S171.
- 6 Elphick MR, Egertova M. The neurobiology and evolution of cannabinoid signalling. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2001;356(1407):381-408.
- 7 Hazekamp A. Cannabis Review. Leiden, The Netherlands: Leiden University, Department of Plant Metabolomics; 2008.
- 8 Mechoulam R, Hanus L. A historical overview of chemical research on cannabinoids. *Chem Phys Lipids.* 2000;108(1-2):1-13.
- 9 Devane WA, Dysarz FA 3rd, Johnson MR e cols. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol.* 1988; 34:605-613.
- 10 Devane WA, Hanus L, Breuer A e cols., Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science.* 1992; 258: 1946-1949.

- 11 Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L e cols. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol.* 1995; 50:83-90.
- 12 Sugiura T e cols. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in the brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995; 215 (1):89-97.
- 13 De Petrocellis L, Di Marzo V. An introduction to the endocannabinoid system: from the early to the latest concepts. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2009;23(1):1-15.
- 14 Kendall D e Stephen A. *Behavioral Neurobiology of the Endocannabinoid System.* 1a ed. United Kingdom: Springer; 2009.
- 15 Arenos JD, Musty RE, Bucci DJ. Blockade of cannabinoid CB1 receptors alters contextual learning and memory. *Eur J Pharmacol.* 2006; 539: 177-183.
- 16 Bambico FR, Cassano T, Dominguez-Lopez S e cols. Genetic deletion of fatty acid amide hydrolase alters emotional behavior and serotonergic transmission in the dorsal raphe, prefrontal cortex, and hippocampus. *Neuropsychopharmacol.* 2010; 35:2083-2100.
- 17 Jhaveri MD, Richardson D, Chapman V. Endocannabinoid metabolism and uptake: novel targets for neuropathic and inflammatory pain. *Br J Pharmacol.* 2007a; 152:624-632.
- 18 Jhaveri MD, Sagar DR, Elmes SJ e cols. Cannabinoid CB(2) receptor-mediated antinociception in models of acute and chronic pain. *Mol Neurobiol.* 2007b; 36:26-35.
- 19 Kirkham TC, Williams CM. Endogenous cannabinoids and appetite. *Nutr Res Rev.* 2001; 14:65-86.
- 20 Wang J e Ueda N. Biology of endocannabinoid synthesis system. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2009; 89(3-4):112-9.
- 21 Howlett AC e cols. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev.* 2002; 54(2):161-202.

- 22 Andersson H e cols. Membrane assembly of the cannabinoid receptor 1: impact of a long N-terminal tail. *Mol Pharmacol*. 2003; 64(3):570-577.
- 23 Herkenham M, Lynn AB, Little MD e cols. Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990 87:1932-1936.
- 24 Herkenham M, Lynn AB, Johnson MR. Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J Neurosci*. 1991b 11(2):563-583.
- 25 Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ e cols. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*. 1990; 346:561-564.
- 26 Ong WY e Mackie K. A light and electron microscopic study of the CB1 cannabinoid receptor in primate brain. *Neuroscience* 1999. 92(4):1177-1191.
- 27 Chevalleyre V, Takahashi KA, Castillo PE. Endocannabinoid-mediated synaptic plasticity in the CNS. *Annu Rev Neurosci*. 2006; 29:37-76.
- 28 Svizenska I, Dubovy P, Sulcova A. Cannabinoid receptors 1 and 2 (CB1 and CB2), their distribution, ligands and functional involvement in nervous system structures: a short review. *Pharmacol Biochem Behav*. 2008;90(4):501-11.
- 29 Breivogel CS, Sim-Selley LJ. Basic neuroanatomy and neuropharmacology of cannabinoids. *Int Rev Psychiatry*. 2009;21(2):113-21.
- 30 Herkenham M, Lynn AB, de Costa BR e cols. Neuronal localization of cannabinoid receptors in the basal ganglia of the rat. *Brain Res*. 1991a 547:267-274.
- 32 Hohmann AG e Herkenham M. Localization of cannabinoid CB1 receptor mRNA in neuronal subpopulations of rat striatum: a double-label in situ hybridization study. *Synapse*. 2000 37:71-80.
- 33 Wilson RI, Nicoll RA. Endocannabinoid Signaling In The Brain. *Science*. 2002; 296: 678-682.

- 35 Katona I, Rancz EA, Acsady L e cols. Distribution of CB1 cannabinoid receptors in the amygdala and their role in the control of GABAergic transmission. *J Neurosci*. 2001. 21:9506-9518.
- 36 Chevalleyre V, Heifets BD, Kaeser PS e cols. Endocannabinoid-mediated long-term plasticity requires cAMP/PKA signaling and RIM1alpha. *Neuron*. 2007 54:801-812.
- 38 Monory K, Massa F, Ergetova M e cols. The endocannabinoid system controls key epileptogenic circuits in the hippocampus. *Neuron*. 2006. 51:455-466.
- 40 Di Marzo V, Bisogno T e De Petrocellis L. Anandamide: some like it hot. *Trends Pharmacol Sci* 2001. 22:346-349.
- 42 De Fonseca FR, Del Arco I, Bermudez-Silva FJ e cols. The endocannabinoid system: physiology and pharmacology. *Alcohol & Alcoholism* 2005. 40(1):2-14.
- 43 Giuffrida A, Beltramo M e Piomelli D. Mechanisms of endocannabinoid inactivation: biochemistry and pharmacology. *J of Pharmacol and Exp Ther* 2001. 298:7-14.
- 44 Bisogno T, Howell F, Williams G e cols. Cloning of the first sn1-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signalling in the brain. *J Cell Biol*. 2003; 163:463-468.
- 45 Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP e cols. Mol characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature*. 1996; 384:83-87.
- 46 Dinh TP, Carpenter D, Leslie FM e cols. Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid in activation. *Proc Nat Acad Sci USA*. 2002; 99:10819-10824.
- 47 Okamoto Y, Morishita J, Tsuboi K e cols. Mol characterization of a phospholipase D generating anandamide and its congeners. *J Biol Chem*. 2004. 279:5298-5305.
- 48 Simon GM, Cravatt BF. Anandamide biosynthesis catalyzed by the phosphodiesterase GDE1 and detection of glycerophospho-N-acyl ethanolamine precursors in mouse brain. *J Biol Chem*. 2008;283(14):9341-9.

- 49 Gulyas AI, Cravatt BF, Bracey MH e cols. Segregation of two endocannabinoid-hydrolyzing enzymes into pre- and postsynaptic compartments in the rat hippocampus, cerebellum and amygdala. *Eur J Neurosci*. 2004. 20:441-458.
- 50 Katona I, Urban GM, Wallace M e cols. Molecular composition of the endocannabinoid system at glutamatergic synapses. *J Neurosci* 2006. 26:5628-5637.
- 51 Yoshida T, Fukaya M, Uchigashima M e cols. Localization of diacylglycerol lipase- α around postsynaptic spine suggests close proximity between production site of an endocannabinoid, 2-arachidonoyl-glycerol, and presynaptic cannabinoid CB1 receptor. *J Neurosci*. 2006; 26:4740-4751.
- 52 Hanus L, Gopher A, Almog S e cols. Two new unsaturated fatty acid ethanolamides in brain that bind to the cannabinoid receptor. *J Med Chem*. 1993. 36:3032-3034.
- 53 Cadas H, Schinelli S, Piomelli D. Membrane localization of N-acylphosphatidylethanolamine in central neurons: studies with exogenous phospholipases. *J Lipid Mediat Cell Signal* 1996. 14:63-70.
- 54 Le Foll B e Goldberg SR. Cannabinoid CB1 receptor antagonists as promising new medications for drug dependence. *Perspectives in Pharmacology. JPET* 312:875–883, 2005
- 55 Dziadulewicz EK e cols. Naphthalen-1-yl-(4-pentyloxynaphthalen-1-yl) methanone: a potent, orally bioavailable human CB1/CB2 dual agonist with antihyperalgesic properties and restricted central nervous system penetration. *J Med Chem* 2007. 50(16):3851-3856.
- 56 Compton DR e cols. Aminoalkylindole analogs: cannabimimetic activity of a class of compounds structurally distinct from delta-9-tetrahydrocannabinol. *J Pharmacol Exp Ther* 1992. 263(3):1118-1126.
- 57 Felder CC e cols. Anandamide, an endogenous cannabimimetic eicosanoid, binds to the cloned human cannabinoid receptor and stimulates receptor-mediated signal transduction. *Proc Natl Acad Sci USA*.. 1993; 90(16):7656-7660.
- 57 Freund TK, Katona I, Piomelli D. Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol Rev*. 2003; 83(3):1017-1066.

- 58 Stella N, Schweitzer P, Piomelli D. A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature*. 1997; 388(6644):773-778.
- 59 Sugiura T, Waku K. Cannabinoid receptors and their endogenous ligands. *J Biochem*. 2002; 132:7-12.
- 60 Pertwee RG. Pharmacological actions of cannabinoids. *Handb Exp Pharmacol*. 2005(168):1-51.
- 61 Black, SC. Cannabinoid receptors antagonists and obesity. *Curr Opin Investig Drugs*. 2004; 5(4):389-394.
- 62 Sandford JJ, Argyropoulos SV e Nutt DJ. The psychobiology of anxiolytic drugs Part 1: basic neurobiology. *Pharmacol & Ther*. 2000; 88:197-212.
- 63 Brandão ML. *Psicofisiologia – as bases fisiológicas do comportamento*. São Paulo: Editora Atheneu, p. 125-49; 2001.
- 64 LeDoux JE. *The emotional brain*. New York: Simon and Schuster, 1996.
- 65 LeDoux JE. Fear and the brain: where have we been, and where are we going? *Biol Psychiatry*, 44: 1229-1238; 1998.
- 66 Kim J e Gorman J. The psychobiology of anxiety. *Clin Neuroscience Research*, 4: 335-347; 2005.
- 67 Darwin C. *The expression of the emotions in man and animals*. Chicago: University of Chicago Press, 1965 (1872).
- 68 McNaughton N. Cognitive dysfunction resulting from hippocampal hyperactivity – a possible cause of anxiety disorder? *Pharmacol Biochem Behav*, 56: 603-611; 1997.
- 69 Nesse RM. Proximate and evolutionary studies of anxiety, stress and depression: synergy at the interface. *Neurosci Behav Rev*, 23: 895-903; 1999.

- 70 Devrets WC, Price JL, Furey ML. Brain structural and functional abnormalities in mood disorders: implications for neurocircuitry models of depression. *Brain Struct Funct.* 2008; 213:93-118.
- 71 Graeff FG. Ansiedade. Em: Graeff, F. G. e Brandão, M. L. (eds). *Neurobiologia das doenças mentais.* São Paulo: Lemos Editorial, p.109-144; 1996.
- 72 Graeff FG. Medicamentos ansiolíticos. Em: Graeff, F. G. e Guimarães, F. S. (eds). *Fundamentos de Psicofarmacologia.* São Paulo: Editora Atheneu, p. 123-160; 1999.
- 73 Graeff FG e Hetem LAB. Neurobiologia. Em Hetem, L. A. B. e Graeff, F. G. (org). *Transtornos de ansiedade* (p. 55-74). São Paulo: Atheneu, 2004.
- 74 Dalgleish T. The emotional brain. *Nature*, 5: 582-589; 2004.
- 75 Machado ABM. *Neuroanatomia Funcional.* São Paulo: Atheneu, 2006.
- 76 MacLean PD. Some psychiatric implications of physiological studies on frontotemporal portion of limbic system (visceral brain). *Clin Neurophysiology*, 4: 407-418; 1952.
- 77 Bateson AN. Basic Pharmacologic Mechanisms Involved in Benzodiazepine Tolerance and Withdrawal. *Current Pharmaceutical Design.* 2002; 8: 5-215.
- 78 Millan MJ. The neurobiology and control of anxious states. *Prog in Neurobiology*, 70: 84-244; 2003.
- 79 Cooper JR, Floyd EB e Roth RH. *The biochemical basis of neuropharmacology*, 7 ed. New York: Oxford University Press, 1996.
- 80 Chebib M. GABA_C receptor ion channels. *Clin and Exp Pharmacology and Physiology*, 31: 800-804; 2004.
- 81 Wafford KA. GABA_A receptor subtypes: any clues to the mechanism of benzodiazepine dependence? *Cur Opin Pharmacol.* 2005; 5: 47-52.
- 82 Rowlett JK, Platt DM, Lelas, S e cols. Different GABA_A receptor subtypes mediate the anxiolytic, abuse-related, and motor effects of benzodiazepine-like drugs in primates. *Proc Nat Acad Sci USA (PNAS).* 2005; 102(3): 915-920.

- 83 Rudolph U e Möhler H. GABA-based therapeutics approach: GABA_A receptor subtype functions. *Cur Opin Pharmacol*. 2006; 6: 18-23.
- 84 Glass M, Dragunow M, Faull RL. Cannabinoid receptors in the human brain: a detailed anatomical and quantitative autoradiographic study in the fetal, neonatal and adult human brain. *Neuroscience*. 1997; 77:299-318.
- 85 Mato S e Pazos A. Influence of age, postmortem delay and freezing storage period on cannabinoid receptor density and functionality in human brain. *Neuropharmacol*. 2004; 46:716-726.
- 86 Curran HV, Brignell C, Fletcher S e cols. Cognitive and subjective dose-response effects of acute oral delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) in infrequent cannabis users. *Psychopharmacol (Berl)*. 2002; 164:61-70.
- 87 Bambico FR, Duranti A, Tontini A e cols. Endocannabinoids in the treatment of mood disorders: evidence from animal models. *Curr Pharm Des*. 2009; 15:1623-1646.
- 88 Bortolato M, Campolongo P, Mangieri RA e cols. Anxiolytic-like properties of the anandamide transport inhibitor AM404. *Neuropsychopharmacol*. 2006; 31:2652-2659.
- 89 Patel S e Hillard CJ. Pharmacological evaluation of cannabinoid receptor ligands in a mouse model of anxiety: further evidence for an anxiolytic role for endogenous cannabinoid signalling. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006; 318:304-311.
- 90 Braida D, Limonta V, Malabarba e cols. 5HT_{1A} receptors are involved in the anxiolytic effect of delta-9-tetrahydrocannabinol and AM404, the anandamide transport inhibitor, in Sprague-Dawley rats. *Eur J Pharmacol*. 2007; 555:156-163.
- 91 Hill MN, Karacabeyli ES e Gorzalka BB. Estrogen recruits the endocannabinoid system to modulate emotionality. *Psychoneuroendocrinology*. 2007; 32:350-357.
- 92 Naidu PS, Varvel SA, Ahn K e cols. Evaluation of fatty acid amide hydrolase inhibition in murine models of emotionality. *Psychopharmacol (Berl)*. 2007; 192:61-70.

- 93 Moise AM, Eisenstein SA, Astarita G e cols. An endocannabinoid signaling system modulates anxiety-like behaviors in male Syrian hamsters. *Psychopharmacol (Berl)*. 2008; 200:333-346.
- 94 Moreira FA, Kaiser N, Monory K e Lutz B. Reduced anxiety-like behaviour induced by genetic and pharmacological inhibition of the endocannabinoid-degrading enzyme fatty acid amide hydrolase (FAAH) is mediated by CB1 receptors. *Neuropsychopharmacol*. 2008; 54:141-150.
- 95 Naderi N, Haghparast A, Saber-Tehrani A e cols. Interaction between cannabinoid compounds and diazepam on anxiety-like behaviour of mice. *Pharmacol Biochem Behav*. 2008; 89:64-75.
- 96 Micale V, Cristino L, Tamburella A e cols. Anxiolytic effects in mice of a dual blocker of fatty acid amide hydrolase and transient receptor potential vanilloid type-1 channels. *Neuropsychopharmacol*. 2009; 34:593-606.
- 97 Kathuria S, Gaetani S, Fegley D e cols. Modulation of anxiety through blockade of anandamide hydrolysis. *Nat Med*. 2003; 9:76-81.
- 98 Rutkowska M, Jamontt J e Gliniak H. Effects of cannabinoids on the anxiety-like response in mice. *Pharmacol Rep*. 2006; 58:200-206.
- 99 Scherma M, Medalie J, Fratta W e cols. The endogenous cannabinoid anandamide has effects on motivation and anxiety that are revealed by fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibition. *Neuropsychopharmacol*. 2008; 54:129-140.
- 100 Moreira FA e Wotjak CT. Cannabinoids and anxiety. *Curr Top Behav Neurosci*. 2010; 2:429-450.
- 101 Hill MN e Gorzalka BB. The endocannabinoid system and the treatment of mood and anxiety disorders. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2009a; 8:451-458.
- 102 Christensesn R, Kristensen PK, Bartels EM e cols. A meta-analysis of the efficacy and safety of the anti-obesity agent Rimonabant. *Ugeskr Laeger*. 2007; 169:4360-4363.
- 103 Nissen SE, Nicholls SJ, Wolski K e cols. Effect of rimonabant on progression of atherosclerosis in patients with abdominal obesity and coronary artery disease: the STRADIVARIUS randomized controlled trial. *JAMA*. 2008; 299:1547-1560.

- 104 Hill MN e Gorzalka BB. Impairments in endocannabinoid signaling and depressive illness. *JAMA*. 2009b; 301:1165-1166.
- 105 Griebel G, Stemmelin J e Scatton B. Effects of the cannabinoid CB1 receptor antagonist rimonabant in models of emotional reactivity in rodents. *Biol Psychiatry*. 2005; 57:261-267.
- 106 Navarro M, Hernández E, Muñoz RM e cols. Acute administration of the CB1 cannabinoid receptor antagonist SR 141716^a induces anxiety-like responses in the rat. *Neuroreport*. 1997; 8:491-496.
- 107 Adamczyk P, Golda A, McCreary AC e cols. Activation of endocannabinoid transmission induces antidepressant-like effects in rats. *J Physiol Pharmacol*. 2008; 59:217-228.
- 108 Martin M, Ledent C, Parmentier M e cols. Involvement of CB1 cannabinoid receptors in emotional behaviour. *Psychopharmacol (Berl)*. 2002; 159:379-387.
- 109 Haller J, Bakos N, Szirmay M e cols. The effects of genetic and pharmacological blockade of the CB1 cannabinoid receptor on anxiety. *Eur J Neurosci*. 2002; 16:1395-1398.
- 110 Haller J, Varga B, Ledent C e cols. Context-dependent effects of CB1 cannabinoid gene disruption on anxiety-like and social behaviour in mice. *Eur J Neurosci*. 2004a; 19:1906-1912.
- 111 Haller J, Varga B, Ledent C e cols. CB1 cannabinoid receptors mediate anxiolytic effects: convergent genetic and pharmacological evidence with CB1-specific agents. *Behav Pharmacol*. 2004b; 15:299-304.
- 112 Hill MN, McLaughlin RJ, Pan B e cols. Recruitment of prefrontal cortical endocannabinoid signaling by glucocorticoids contributes to termination of the stress response. *J Neurosci*. 2011; 31:10506-10515.
- 113 Cota D, Marsicano G, Tchöp M e cols. The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. *J Clin Invest*. 2002; 112:423-431.

- 114 Jin K, Xie L, Kim SH e cols. Defective adult neurogenesis in CB1 cannabinoid receptor knockout mice. *Mol Pharmacol*. 2004; 66:204-208.
- 115 Poncelet M, Maruani J, Calassi R e Soubrié P. Overeating, alcohol and sucrose consumption decrease in CB1 receptors deleted mice. *Neurosci Lett*. 2003; 343:216-218.
- 116 Sanchis-Segura C, Cline BH, Marsicano G e cols. Reduced sensitivity to reward in CB1 knockout mice. *Psychopharmacol*. 2004; 176:223-232.
- 117 Cassano T, Gaetani S, Macheda T e cols. Evaluation of the emotional phenotype and serotonergic neurotransmission of fatty acid amide hydrolase-deficient-mice. *Psychopharmacol*. 2011; 214:465-476.
- 118 Rossi S, De Chiara V, Musella A e cols. Preservation of striatal cannabinoid CB1 receptor function correlates with the antianxiety effects of fatty acid amide hydrolase inhibition. *Mol Pharmacol*. 2010; 78:260-268.
- 119 McLaughlin RJ e Gobbi G. Cannabinoids and emotionality: a neuroanatomical perspective. *Neuroscience*. 2012; 204: 134-44.
- 120 Organização Mundial da Saúde. Neurociências de consumo e dependências de substâncias psicoativas: Resumo. Organização Mundial de Saúde, Genebra. p.40. 2004. Disponível em:
<http://www.who.int/mwg-internal/de5fs23hu73ds/progress?id=5qCwJ+Jhbv>
- 121 Aguilar MA, Rodríguez-Arias M, Miñarro J. Neurobiological mechanisms of the reinstatement of drug-conditioned place preference. *Brain Res Rev*. 2009; 59:253-277.
- 122 Nestler EJ, Hyman SE e Malenka RC. *Mol neuropharmacology: a foundation for Clin neuroscience*. Ed. McGraw-Hill, New York. 2001.
- 123 Burst JCM. Substance abuse, neurobiology, and ideology. *Arch Neurol* 56: 1528-31. 1999.
- 124 Spanagel R e Heilig M. Addiction and its brain science. *Addiction*. 2005; 100: 1813-22.
- 125 Feldman RS, Meyer JS, Quenzer LF. *Principles of Neuropsychopharmacology*. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 1997.

- 126 Marquardt AR e Barros HMT. Métodos Comportamentais para avaliar drogas de abuso. In: Almeida, R.N. Psicofarmacologia fundamentos básicos. Editora: Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 2006.
- 127 Wise RA. Addiction becomes a brain disease. *Neuron*. 2000; 26:27-33.
- 128 White FJ. Synaptic regulation of mesocorticolimbic dopamine neurons. *Ann Rev Neurosc*. 1996; 19:405-136.
- 129 Cannon CM e Bseikri MR. Is dopamine required for natural reward? *Physiol Behav*. 2004; 81:741-748.
- 130 O'Brein CP. Drogadição e Uso Abusivo de Drogas. Goodman & Gilman As Bases Farmacológicas da Terapêutica. Ed. McGraw-Hill, Califórnia. p. 543-562. 2006.
- 131 Ventulani J. Drug addiction. Part II. Neurobiology of addiction. *Poli J Pharmacol*: 53. p. 303-317. 2001.
- 133 Kalivas PW, Duffy P e Latimer LG. Neurochemical and behavioral effects of corticotropin-releasing factor in the ventral tegmental area of the rat. *J Pharmacol Exp Ther*. 1987; 242:757-763.
- 134 Lavicky J e Dunn AJ. Corticotropin-releasing factor stimulates catecholamine release in hypothalamus and prefrontal cortex in freely moving rats as assessed by microdialysis. *J Neurochem*. 1993; 60:602-612.
- 135 Vanderschuren L e Everitt BJ. Drug seeking becomes compulsive after prolonged cocaine self-administration. *Science*. 2004; 305:1017-1019.
- 136 Robinson TE e Berridge KC. The incentive sensitization theory of addiction: some current issues. *Phil Transac Roy Soc of London B: Biological Sci*. 2008; 363:3137-3146.
- 137 Paulson PE, Camp DM e Robinson TE. Time course of transient behavioral depression and persistent behavioral sensitization in relation to regional brain monoamine concentrations during amphetamine withdrawal in rats. *Psychopharmacol*. 1991; 103(4): 480-492.
- 138 O'Brien CP. A range of research-based pharmacotherapies for addiction. *Science*. 1997; 278:66-70.

- 139 Elliot JM e Beveridge TJR. Psychostimulants and monoamine transporters: upsetting the balance. *Curr Op Pharmacol*. 2004; 5:94-100.
- 140 Müller CP, De Souza Silva MA, Huston, JP e cols. Serotonin1A-receptor antagonism attenuates the cocaine-induced increase in serotonin levels in the hippocampus and nucleus accumbens but potentiates hyperlocomotion: an in vivo microdialysis study. *Neuropharmacol*. 2003; 44:592-603.
- 141 Koob GF, Sanna PP e Bloom FE. Neuroscience of addiction. *Neuron*. 1998; 21:467-476.
- 142 Müller CP, de Souza Silva MA, De Palma G e cols. The selective serotonin1A-receptor antagonist WAY 100635 blocks behavioural stimulating effects of cocaine but not ventral striatal dopamine. *Behav Brain Res*. 2002a; 134:337-346.
- 143 Müller CP, Carey RJ, de Souza Silva MA e cols. Cocaine increases serotonergic activity in the hippocampus and nucleus accumbens in vivo: 5-HT1A-receptor antagonism blocks behavioural but potentiates serotonergic activation. *Synap*. 2002b; 45:67-77.
- 144 Levy AD, Baumann MH e Kar LDV. Monoaminergic regulation of neuroendocrine function and its modification by cocaine. *Front Neuroendocrinol*. 1994; 15:85-156.
- 145 Mantsch JR, Schlussmann SD, Ho A, Kreek MJ. Effects of cocaine self-administration on plasma corticosterone and prolactin in rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 2000; 294: 239-247.
- 146 Baumann MH, Gendron TM, Beckett KM e cols. Effects of iv cocaine on plasma cortisol and prolactin in human cocaine abusers. *Biol Psychiatry*. 1995; 38:751-755.
- 147 Sarnyai Z, Mello NK, Mendelson JH e cols. Effects of cocaine on pulsatile activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in male rhesus monkeys: neuroendocrine and behavioral correlates. *J Pharmacol Exp Ther*. 1996; 277:225-234.
- 148 Mello NK e Mendelson JH. Cocaine's effects on neuroendocrine systems: Clin and preClin studies. *Pharm Biochem Behav*. 1997; 57:571-599.
- 149 Goeders NE. Stress and cocaine addiction. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002; 301:785-789.

- 150 Majewska MD. HPA axis and stimulant dependence: an enigmatic relationship. *Psychoneuroendocrinol.* 2002; 27:5-27.
- 151 Koob G e Kreek MJ. Stress, dysregulation of drug reward pathways, and the transition to drug dependence. *Am J Psychiat.* 2007; 164: 1149-1159.
- 152 Marinelli M e Piazza PV. Interaction between glucocorticoid hormones, stress and psychostimulant drugs. *Eur J Neurosci.* 2002; 16:387-394.
- 153 Cui CL, Wu LZ e Luo F. Acupuncture for the Treatment of Drug Addiction. *Neurochem Res.* 2008; 33:2013–2022.
- 154 Prisinzano TE. Natural products as tools for neuroscience: discovery and development of novel agents to treat drug abuse. *J. Nat. Prod.* 2009; 72: 581–587.
- 155 Tanda G. Modulation of the endocannabinoid system: Therapeutic potential against cocaine dependence. *Pharmacological Res.* 2007; 56:406–417.
- 156 Renthal W e Nestler EJ. Epigenetic mechanisms in drug addiction. *T in Mol Medicine.* 2008; Vol.14 No.8:341-350.
- 157 Vlachou S, Nomikos GG e Panagis G. WIN 55-212,2 decreases the reinforcing actions of cocaine through CB1 cannabinoid receptor stimulation. *Behav Brain Res.* 2003; 141:215-222.
- 158 Vigano D, Valenti M, Cascio MG e cols. Changes in endocannabinoid levels in a rat model of behavioural sensitization to morphine. *Eur J Neurosci.* 2004; 20: 1849-1857.
- 159 Solinas M, Panlilio LV, Tanda G e cols. Cannabinoid agonists but not inhibitors of endogenous cannabinoid transport or metabolism enhance the reinforcing efficacy of heroin in rats. *NeuroPsychopharmacol.* 2005; 30:2046-2057.
- 160 Terry GE, Liow JS, Zoghbi SS e cols. Quantitation of cannabinoid CB1 receptors in healthy human brain using positron emission tomography and an inverse agonist radioligand. *Neuroimage.* 2009; 48:362-370.
- 161 Lupica CR, Riegel AC. Endocannabinoid release from midbrain dopamine neurons: a potential substrate for cannabinoid receptor antagonist treatment of addiction. *Neuropharmacology.* 2005; 48:1105-1116.

- 162 Fusco FR, Martorana A, Giampa C e cols. Immunolocalization of CB1 receptor in rat striatal neurons: a confocal microscopy study. *Synapse*. 2004; 53:159-167.
- 163 Robbe D, Alonso G, Manzoni OJ. Exogenous and endogenous cannabinoids control synaptic transmission in mice nucleus accumbens. *Ann N Y Acad Sci*. 2003;1003:212-25.
- 164 Melis M, Pistis M, Perra S e cols. Endocannabinoids mediate presynaptic inhibition of glutamatergic transmission in rat ventral tegmental area dopamine neurons through activation of CB1 receptors. *J Neurosci*. 2004; 24:53-62.
- 165 Solinas M, Yasar S, Goldberg SR. Endocannabinoid system involvement in brain reward processes related to drug abuse. *Pharmacol Res*. 2007; 56(5):393-405.
- 166 Pontietti FE, Tanda G, Di Chiara G. Intravenous cocaine, morphine, and amphetamine preferentially increase extracellular dopamine in the "shell" as compared with the "core" of the rat nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995; 92:12304-12308.
- 167 Bossong MG, van Berckel BN, Boellaard R e cols. Delta 9-tetrahydrocannabinol induces dopamine release in the human striatum. *Neuropsychopharmacol*. 2009; 34:759-766.
- 168 Stokes PRA, Mehta MA, Curran HV e cols. Can recreational doses of THC produce significant dopamine release in the human striatum? *Neuroimage*. 2009; 48:186-190.
- 169 Maldonado R, Valverde O, Berrendero F. Involvement of the endocannabinoid system in drug addiction. *Trends Neurosci*. 2006;29 (4):225-32.
- 170 Horder J, Harmer CJ, Cowen PJ e McCabe C. Reduced neural response to reward following 7 days treatment with the cannabinoid CB1 antagonist rimonabant in healthy volunteers. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2010; 13:1103-1113.
- 171 Le Foll B, Gorelick DA, Goldberg SR. The future of endocannabinoids-oriented Clin research after CB1 antagonists. *Psychopharmacol*. 2009; 205:171-174.

- 172 Gonzalez S, Cascio MG, Fernandez-Ruiz J e cols. Changes in endocannabinoid contents in the brain of rats chronically exposed to nicotine, ethanol or cocaine. *Brain Res.* 2002; 954:73-81.
- 173 Jacobs EH, Smit AB, De Vries TJ e cols. Neuroadaptive effects of active versus passive drug administration in addiction research. *Trends Pharmacol Sci.* 2003; 24:566-573.
- 174 Calile S, Varez-Jaimes L, Polis I e cols. Specific alterations of extracellular endocannabinoid levels in the nucleus accumbens by ethanol, heroin and cocaine self-administration. *J Neurosci.* 2007; 27:3695-3702.
- 175 Bequet F, Uzabiaga F, Desbazeille M e cols. CB1 receptor-mediated control of the release of endocannabinoids (as assessed by microdialysis coupled with LC/MS) in the rat hypothalamus. *Eur J Neurosci.* 2007; 26:3458-3464.
- 176 Stellar E. The marmoset as a laboratory animal: maintenance, general observations of behavior, and simple learning. *J Compar Physiol – Psychol.* 1960; 53: 1-10.
- 177 Sainsbury AW, Mew JA, Purton P e cols. Advances in the management of primates kept for biomedical research. *Animal Technology.* 1990; 41: 87-101.
- 178 Kitchen AM e Martin AA. The effects of cage size and complexity on the behaviour of captive common marmosets, *Callithrix jacchus jacchus*. *Laboratory Animals.* 1996; 30: 317-26.
- 179 King FA, Yarbrough .CJ, Anderson DC e cols. Primates. *Science.* 1988; 240: 1475-1482.
- 180 Barros M e Tomaz C. Non-human primate models for investigating fear and anxiety. *Neuroscience and Behavioral Reviews.* 2002a; 26: 187-201.
- 181 Sussman RW e Kinzey WG. The ecological role of the Callitrichidae: a review. *A J Physiol and Anthropol.* 1984; 64: 419-49.
- 182 Stevenson MF e Rylands AB. The marmosets, genus *Callithrix*. In: Mittermeier, R. A., Rylands, A. B., Coimbra-Filho, A e Fonseca, G. A. B., eds. *Ecology and behavior of neotropical primates.* Contagem/Brazil: Littera Maciel Ltda./WWF: 131-222, 1988.

- 183 Epple G. The behavior of the marmoset monkeys (*Callitrichidae*). In: Roseblum L, editor. *Primate behavior*, vol 4. New York: Academic Press. 1975; p. 195-239.
- 184 Tardif SD, Carson RI e Gangaware BL. Comparison of infant groups of the common marmoset (*Callithrix jacchus*) and the cotton-top tamarin (*Saguinus aedipus*). *A J Primatol.* 1986; 11: 103-10.
- 185 Goldizen AW. Tamarins and marmosets: communal care of offspring. In: Smutts BB, Cheney, D. L.; Seyfarth, R. M.; Wrangham, R. W. e Struhsaker, T. T. editors. *Primate Societies*, Chicago: University of Chicago Press. p. 34-43; 1987.
- 186 Reis FP e Erhart EA. The brain of the marmoset (*Callithrix jacchus*). *Acta Anatomy*, 103: 350-357; 1979.
- 187 Maior RS, Barros M e Tomaz C. Contributions of Non-Human Primates to the Understanding of Cocaine Addiction. In: Uehara T, editors. *Psychiatric Disorders – Trends and Developments*, 2011; 339-366.
- 188 Vellucci SV. Primate social behaviour – anxiety and depression. *Pharmacol and Therap*, 47: 167-180; 1990.
- 189 Newman JD e Farley MJ. An ethologically based, stimulus and gender-sensitive nonhuman primate model of anxiety. *Prog in Neuropsychopharmacol Biol and Psychi*, 19: 677-685, 1995.
- 190 Cilia J e Piper DC. Marmoset conspecific confrontation: an ethologically-based model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav.* 1997; 58(1): 85-91.
- 191 Kalin NH, Shelton SE e Barksdale CM. Separation distress in infant rhesus monkeys: effects of diazepam and RO 15-1788. *Brain Research.* 1987; 408: 192-198.
- 192 Carey GJ, Costall B, Domeney AM e cols. Behavioural effects of anxiogenic agents in the common marmoset. *Pharmacol Biochem Behav.* 1992; 42: 143-153.
- 193 Barros M, De Souza Silva MA, Huston JP e Tomaz C. Anxiolytic-like effects of substance P fragment (SP₁₋₇) in non-human primates (*Callithrix penicillata*). *Peptides.* 2002b; 23: 967-973.

- 194 Rodgers RJ, Cao BJ, Dalvi A e Holmes A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. *Braz J Medical and Biol Res.* 1997; 30:289-304.
- 195 Barros M, De Souza Silva MA, Huston JP e Tomaz C. Multibehavioral analysis of fear and anxiety before, during, and after Exply induced predatory stress in *Callithrix penicillata*. *Pharmacol Biochem Behav.* 2004; 78: 357-367.
- 196 Barros, M.; Souza Silva, M. A.; Huston, J. P. e Tomaz, C. Multibehavioral analysis of fear and anxiety before, during, and after Exply induced predatory stress in *Callithrix penicillata*. *Pharmacol Biochem Behav*, 78: 357-367; 2004b.
- 197 Caine NG. Cutting costs in response to predatory threat by Geoffroy's marmosets (*Callithrix geoffroyi*). *A J of Primatol.* 1998; 46: 187-196.
- 198 Cannizzaro C, Martire M, Cannizzaro E e cols. Long-lasting handling affects behavioural reactivity in adult rats of both sexes prenatally exposed to diazepam. *Brain Res.* 2001; 904, 225– 233.
- 199 Mar A, Spreekmeester E e Rochford J. Antidepressants preferentially enhance habituation to novelty in the olfactory bulbectomized rat. *Psychopharmacologia.* 2000; 150, 52– 60.
- 200 Lee EH e Tsai MJ. The hippocampus and amygdala mediate the locomotor stimulating effects of corticotropin-releasing factor in mice. *Behav. Neural Biol.* 1989; 51, 412– 423.
- 201 Prut L e Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacology.* 2003; 463:3-33.
- 202 Mello NK e Negus SS. PreClin evaluation of pharmacotherapies for treatment of cocaine and opiod abuse using drug self-administration procedures. *NeuroPsychopharmacol.* 1996; 14:375-424.
- 203 Ator NA e Griffiths RR. Principles of drug abuse liability assessment in laboratory animals. *Drug and Alcohol Dependende.* 2003; 70(3):S55-S72.
- 204 Griffiths RR, Bigelow GE e Henningfield JE. Similarities in animal and human drug-taking behavior. In: NK Mello (Ed.). *Advances in substance abuse* (pp. 1-90). Greenwich, CT: JAI Press. 1980.

- 205 Nilsson S, Helou K, Walentinsson A e cols. Rat-mouse and Rat-human comparative maps based on gene homology and high-resolution Zoo-FISH. *Genomics*. 2001; 287:287-298.
- 206 Valentinuzzi VS, Neto SP, Carneiro BT e cols. Memory for time of training modulates performance on a place conditioning task in marmosets. *Neurobiol Learn Mem*. 2008; 4:604-607.
- 206 Yamamoto ME. From dependence to sexual maturity: the behavioural ontogeny of Callitrichidae, In: Rylands AB, editor. *Marmosets and tamarins systematics, behaviour and ecology*. Oxford: Oxford Un Press. 1993; 235-254.
- 207 Thompson T e Schuster CR. Morphine self-administration, food-reinforced and avoidance behaviors in rhesus monkeys. *Psychopharmacologia*. 1964; 5:87-94.
- 208 Hacia JG, Mekalowski W, Edgemon K e cols. Evolutionary sequence comparisons using high-density oligonucleotide arrays. *Nature Genetics*. 1998; 18:155-158.
- 209 Weerts E, Fantergrossi WE e Goodwin AK. The Value of Nonhuman Primates in Drug Abuse Research. *Exp Clin Psychopharmacol*. 2007; 15:309–327.
- 210 Berger B, Gaspar P e Verney C. Dopaminergic innervation of the cerebral cortex: unexpected differences between rodents and primates. *Trends in Neuroscience*. 1991; 14:21-27.
- 211 Haber SN e McFarland NR. The concept of the ventral striatum in nonhuman primates. *Ann NY Acad Sci*. 1999; 877:33-48.
- 212 Joel D e Weiner I. The connections of the dopaminergic system with the striatum in rats and primates: an analysis with respect to the functional and compartmental organization of the striatum. *Neuroscience*. 2000; 96:451-474.
- 213 Cragg SJ, Hille CJ e Greenfield SA. Dopamine release and uptake dynamics within nonhuman primate striatum in vitro. *J Neurosci*. 2000; 20:8209-17.

- 214 Miller GM, Yatin SM, De La Garza R e cols. Cloning of dopamine, norepinephrine and serotonin transporters from monkey brain: relevance to cocaine sensitivity. *Mol Brain Research*. 2001; 87:124-143.
- 215 Camps M, Kelly PH e Palacios JM. Autoradiographic localization of dopamine D1 and D2 receptors in the brain of several mammalian species. *J Neural Transmis*. 1990; 80:105–127.
- 216 Lyons D, Friedman DP, Nader MA e Porrino LJ. Cocaine alters cerebral metabolism within the ventral striatum and limbic cortex of monkeys. *J Neurosci*. 1996; 16:1230-1238.
- 217 Ward KW e Smith BR. A comprehensive quantitative and qualitative evaluation of extrapolation of intravenous pharmacokinetic parameters from rat, dog, and monkey to humans: II. Volume of distribution and mean residence time. *Drug Metab Dispos*. 2004; 32:612–619.
- 218 Judge DS e Carey JR. Postreproductive life predicted by primate patterns. *J Geront: Biol Sci*. 2000; 55A(4):B201-B209.
- 219 Castner SA e Goldman-Rakic PS. Amphetamine sensitization of hallucinatory-like behaviors is dependent on prefrontal cortex in nonhuman primates. *Biological Psychiatry*. 2003; 54:105-110.
- 220 Belzung C. Measuring exploratory behavior. In: Crusio, W.E., Gerlai, R.T. (Eds.), *Handbook of Mol Genetic Techniques for Brain and Behavior Research (Techniques in the Behavioral and Neural Sciences)*. Elsevier, Amsterdam, pp. 739– 749. 1999.
- 221 Norcross JL e Newman JD. Effects of separation and novelty on distress vocalizations and cortisol in the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *A J of Primatol*. 1999; 47: 209-222.
- 222 Rukstalis M, French JA. Vocal buffering of the stress response: exposure to conspecific vocalizations moderates urinary cortisol excretion in isolated marmosets. *Horm Behav*. 2005; 47:1-7.
- 223 Smith TE, McGreer-Whitworth B e French JA. Close proximity of the heterosexual partner reduces the physiological and behavioral consequences of novel-cage housing in black tuftedear marmosets (*Callithrix kuhli*). *Horm & Behav*. 1998; 34: 211-222.

- 224 Barros M, Alencar C e Tomaz C. Differences in aerial and terrestrial visual scanning in captive back tufted-ear marmosets (*Callithrix penicillata*) exposed to a novel environment. *Folia Primatol.* 2004a; 75:85-92.
- 225 Cheney DL, Wrangham RW. Predation: In: Smuts, B. B.; Cheney, D. L.; Seyfarth, R. M.; Wrangham, R. W.; Struhsaker, T. T. (eds). *Primate Societies*. Chicago: Chicago University Press. 1987; 227-239.
- 225 Koenig A. Visual scanning by common marmosets (*Callithrix jacchus*): functional aspects and the special role of adult males. *Primates.* 1998;39:85-90.
- 226 Kalueff, A.V; Wheaton, M.; Murphy, D. L. What's wrong with my animal model? Advances and strategies in animal modeling of anxiety and depression. *Behav. Brain Research.* 2007; 179:1-18.
- 227 Takahashi LK, Kalin NH. Role of corticotropin-releasing factor in mediating the expression of defensive behavior. R.J. Blanchard, P.F. Brain, D.C. Blanchard, S. Parmigiani (Eds.), *Ethoexperiment App Study Behav.* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 1989:580-594.
- 228 Cannizzaro C, Martire M, Cannizzaro E e cols. Long-lasting handling affects behavioural reactivity in adult rats of both sexes prenatally exposed to diazepam. *Brain Res.* 2001; 904:225– 233.
- 229 Rudolph U e Möhler H. Analysis of GABA_A receptor functions and dissection of pharmacology of benzodiazepines and general anaesthetics by mouse genetics. *A Rev Pharmacol Toxicol.* 2004; 44:475-498.
- 230 Katzung BG. *Farmacologia Básica & Clínica* (8 ed). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.
- 231 Cagni P, Gonçalves Jr I, Ziller F e cols. Humans and natural predators induce different fear/anxiety reactions and response pattern to diazepam in marmoset monkeys. *Pharmacol Biochem Behav.* 2009; 93:187-196.
- 232 Barros M, Giorgetti M, Souto AAV e cols., Persistent anxiety-like behavior in marmosets following a recent predatory stress condition: reversal by diazepam. *Pharmacol Biochem Behav.* 2007; 86:705-711.
- 233 Epplé G. Comparative studies on vocalization in marmoset monkeys (*Hapalidae*). *Folia Primatol.* 1968; 8:1-40.

- 234 Barros M, Mello Jr, EL, Maior RS e cols. Anxiolytic-like effects of the selective 5-HT_{1A} receptor antagonist WAY 100635 in non-human primates. *European J of Pharmacology*. 2003; 482: 197-203.
- 235 Miczek KA, Weerts EM, Vivian JA e Barros HM. Aggression, anxiety and vocalization in animals – GABA(A) and 5-HT anxiolytics. *Psychopharmacol*. 1995; 121:38-56.
- 236 Heymann EW. Reactions of wild tamarins, *Saguinus mystax* and *Saguinus fuscicollis*, to avian predators. *International J of Primatol*. 1990; 11: 327-337.
- 237 Katona I e Freund TF. Endocannabinoid signalling as a synaptic circuit breaker in neurobiological disease. *Nat Med*. 2008; 14:923-930.
- 238 Laf enetre P, Chaouloff F e Marsicano G. The endocannabinoid system in the processing of anxiety and fear and how CB₁ receptors may modulate fear extinction. *Pharmacol Res*. 2007; 56:367-381.
- 239 Ruehle S, Aparisi Rey A, Remmers F e Lutz B. The endocannabinoid system in anxiety, fear memory and habituation. *J Psychopharmacol*. 2012; 26(1):23-39.
- 240 Genn RF, Tucci S, Marco EM e cols. Anxiolytic and anxiogenic effects of the cannabinoid agonist CP 55,940 in animal tests of anxiety. *J Psychopharmacol*. 2003; 17:A27.
- 241 Rubino T, Guidali C, Vigano D e cols. CB₁ receptor stimulation in specific brain áreas differently modulate anxiety-related behaviour. *Neuropharmacol*. 2008a; 54:151-160.
- 242 Rubino T, Realini N, Castiglioni C e cols. Role in anxiety behavior of the endocannabinoid system in the prefrontal córtex. *Cereb Cortex*. 2008b; 18:1292-1301.
- 243 Haller J, M ty s F, Sproni K e cols. Correlated species differences in the effects of cannabinoid ligands on anxiety and on GABAergic and glutamatergic synaptic transmission. *Eur J Neurosci*. 2007; 25:2445-2456.
- 244 Beardsley PM, Scimeca JA e Martin BR. Studies on the agonistic activity of delta 9-11-tetrahydrocannabinol in mice, dogs and rhesus monkeys and its interactions with delta 9-tetrahydrocannabinol. *J Pharmacol*. 1987; 241(2):521-526.

- 245 Meschler JP, Clarkson FA, Mathews PJ e cols. D2, but not D1 dopamine receptor agonist potentiate cannabinoid-induced sedation in nonhuman primates. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000; 292:952-959.
- 246 Meschler JP, Howlett AC e Madras BK. Cannabinoid receptor agonist and antagonist effects on motor function in normal and 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine (MPTP)-treated nonhuman primates. *Psychopharmacol.* 2001; 156:79-85.
- 247 Luk T e cols. Identification of a potent and highly efficacious, yet slowly desensitization CB1 cannabinoid receptor agonist. *Br J Pharmacol.* 2004; 142(3):495-500.
- 248 Rodgers RJ, Evans PM e Murphy A. Anxiogenic profile of AM251, a selective cannabinoid CB1 receptor antagonist, in plus-maze-naïve and plus-maze-experienced mice. *Behav Pharmacol.* 2005; 16:405-413.
- 249 Delatte MS e Paronis CA. Evaluation of cannabinoid agonists using punished responding and midazolam discrimination procedures in squirrel monkeys. *Psychopharmacol.* 2008; 198:521-528.
- 250 Cagni P, Komorowski M, Melo GC e cols. Diazepam-induced decrease in anxiety-like behaviors of marmoset monkeys exposed to a novel open-field. *Pharmacol Biochem Behav.* 2012; 100:518-521.
- 251 Ganon-Elazar E e Akirav I. Cannabinoid receptor activation in the basolateral amygdala blocks the effects of stress on the conditioning and extinction of inhibitory avoidance. *J Neurosci.* 2009; 29:11078-11088.
- 252 Campos AC e Guimarães FS. Evidence for a potential role for TRPV1 receptors in the dorsolateral periaqueductal Gray in the attenuation of the anxiolytic effects of cannabinoids. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2009; 33:1517-1521.
- 253 Berrendero F e Maldonado R. Involvement of the opioid system in the anxiolytic-like effects induced by Delta(9)-tetrahydrocannabinol. *Psychopharmacol.* 2002; 163:111-117.
- 254 Viveiros MP, Marco EM, File SE. Endocannabinoid system and stress and anxiety responses. *Pharmacol Biochem Behav.* 2005; 81:331-342.
- 255 Moreira FA e Lutz B. The endocannabinoid system: emotion, learning and addiction. *Addict Biol.* 2008; 13:196-212.

- 256 Moreira FA, Aguiar DC, Campos AC e cols. Antiaversive effects of cannabinoids: is the periaqueductal gray involved? *Neural Plast.* 2009a; 1-11.
- 257 Moreira FA, Grieb M e Lutz B. Central side-effects of therapies based on CB1 cannabinoid receptors agonists and antagonists: focus on anxiety and depression. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2009b; 23:133-144.
- 258 Moreira FA, Aguiar DC, Resstel e cols. Neuroanatomical substrates involved in cannabinoid modulation of defensive responses. *J Psychopharmacol.* 2012a; 26(1) 40-55.
- 259 Lutz B. Endocannabinoid signals in the control of emotion. *Curr Opin Pharmacol.* 2009; 9:46-52.
- 260 Filip M, Gold A, Zaniwska M e cols. Involvement of cannabinoid CB1 receptors in drug addiction: effects of rimonabant on behavioral responses induced by cocaine. *Pharmacol Rep.* 2006; 58:806.
- 261 Bradberry, CW. Cocaine sensitization and dopamine mediation of cue effects in rodents, monkeys, and humans: areas of agreement, disagreement, and implications on addiction. *Psychopharmacol.* 2007; 191:705-717.
- 262 Castner SA e Williams GV. From vice to virtue: insights from sensitization in the nonhuman primate. *Prog in Neuro-Psychopharmacol e Biol Psychi.* 2007; 31:1572-1592.
- 263 Leyton M. Conditioned and sensitized responses to stimulant drugs in humans. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry.* 2007; 31:1601-13.
- 264 Ridley RM, Baker HF, Owen F e cols. Behavioural and biochemical effects of chronic amphetamine treatment in the vervet monkey. *Psychopharmacol (Berl).* 1982; 78:245-251.
- 265 Farfel GM, Kleven MS, Woolverton WL e cols. Effects of repeated injections of cocaine on catecholamine receptor binding sites, dopamine transporter binding sites and behavior in rhesus monkey. *Brain Res.* 1992; 578:235-243.
- 266 Kleven MS e Woolverton WL. Effects of continuous infusions of SCH 23390 on cocaine- or food-maintained behavior in rhesus monkeys. *Behav Pharmacol.* 1990; 1:365-73.

- 267 Mello NK, Mendelson JH. Cocaine, hormones and behavior: Clin and preClin studies. *Hormones Brain Behav.* 2002; 5:665-745.
- 268 Palamarchouk V, Smagin G e Goeders NE. Self-administered and passive cocaine infusions produce different effects on corticosterone concentrations in the medial prefrontal cortex (MPC) of rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 2009; 94:163-8.
- 269 Barros M, Dempster EL, Illott N e cols. Decreased methylation of the NK3 receptor coding gene (TACR3) after cocaine-induced place preference in marmoset monkeys. *Addiction Biol.* 2011 doi: 10.1111/j.1369-1600.2011.00409.x.
- 270 Lima D, Dias L, Tomaz C e Barros M. Effects of acute systemic cocaine administration on the cortisol, ACTH and prolactina levels of black tufted-ear marmosets. *Psychoneuroendocrinol.* 2008; 33:321-327.
- 271 De Souza Silva MA, Mello Jr, Eldon L e cols. Interaction of the tachykinin NK3 receptor agonist senkitide with behavioral effects of cocaine in marmosets (*Callithrix penicillata*). *Peptides.* 2006a; 27:2214-2223.
- 272 De Souza Silva MA, Mello Jr, Eldon L e cols. The tachykinin NK3 receptor antagonist SR142801 blocks the behavioral effects of cocaine in marmoset monkeys. *Eur J Pharmacol.* 2006b; 536:269-278.
- 273 Strakowski SM e Sax KW. Progive behavioral response to repeated d-amphetamine challenge: further evidence for sensitization in humans. *Biol Psychiatry.* 1998; 44:11717.
- 274 Boere V, Pinheiro EC, De Oliveira e Silva I e cols. Comparision between sex and age class on some physiological, thermal, and hematological indices of the cerrado's marmoset (*Callithrix penicillata*). *J Med Primatol.* 2005; 34:156-162.
- 275 Chrousos GP, Renquist D, Brandon D e cols. Glucocorticoid hormone resistance during primate evolution: receptor-mediated mechanism. *Proc Nat Acad Sci USA.* 1982; 79:2036-2040.
- 276 Scammell JG, Denny WB, Valentine DL, Smith DF. Overexpression of the FK506-binding immunophilin FKBP51 is the common cause of glucocorticoid resistance in three New World primates. *Gen Comp Endocrinol.* 2001; 124:152-65.

- 277 Broadbear JH, Winger G, Cicero TJ e Woods JH. Effects of response contingent and noncontingent cocaine injection on hypothalamic-pituitary-adrenal activity in rhesus monkeys. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999; 290:393-402.
- 278 Mello Jr EL, Maior RS, Carey RC e cols. Setotonin1A-receptor antagonism blocks psychostimulant properties of diethylpropion in marmosets (*Callithrix penicillata*). *Eur Jor Pharmacol.* 2005; 511:43-52.
- 279 Solinas M, Panlilio LV, Justinova Z e cols. Using drug-discrimination techniques to study the abuse-related effects of psychoactive drugs in rats. *Nat Protoc.* 2006; 1:1194-1206.
- 280 Cetonze D, Battista N, Rossi S e cols. A critical interaction between dopamine D2 receptors and endocannabinoids mediates the effects of cocaine on striatal gabaergic transmission. *Neuropsychopharmacol.* 2004; 29:1488-1497.
- 281 De Vries TJ, Shaham Y, Homberg HR e cols. A cannabinoid mechanism in relapse to cocaine seeking. *Nature Med.* 2001; 7:1151-1154.
- 282 Gobbi G, Bambico FR, Mangieri R e cols. Antidepressant-like activity and modulation of brain monoaminergic transmission by blockade of anandamide hydrolasis. *Proc Nat Acad Sci USA.* 2005; 102:18620-18625.
- 283 Moreira FA, Aguiar DC, Terzian ALB e cols. Cannabinoid Type 1 receptors and transient receptor potential vanilloid type 1 channels in fear and anxiety-two sides of one coin? *Neurosci.* 2012b; 204:186-192.
- 284 Stevenson MF e Poole TB. An ethogram of the common marmoset (*Callithrix jacchus jacchus*): general behavioural repertorie. *Anim Behav.* 1976; 24:428-451.
- 285 Barros M, Alencar C, De Souza Silva MA e Tomaz C. Changes in Exp conditions alter anti-predator vigilance and sequence predictability in captive marmosets. *Behavioural Proc.* 2008; 77:351-356.
- 285 Page ME, Oropeza VC, Sparks SE e cols., Repeated cannabinoid administration increases indices of noradrenergic activity in rats. *Pharm Biochem Behav.* 2007; 86:162-168.
- 286 Aston-Jones G. Behavioral funcitions of locus coeruleus derived from cellular attributes. *Physiol Psychol.* 1985; 13:118-126.

- 287 Madsen MV, Peacock L, Werge T e cols. Effects of the cannabinoid CB1 receptor agonist CP55,940 and antagonist SR141716A on d-amphetamine-induced behaviours in Cebus monkeys. *Psychopharmacol.* 2006; 20(5):622-628.
- 288 Thiemann G, Van der Selt M, Petrosino S e cols. The role of the CB1 cannabinoid receptor and its endogenous ligands, anandamide and 2-arachidonolglycerol, in amphetamine-induced behavioral sensitization. *Behav Brain Res.* 2008; 187:289-296.
- 289 Lanciego JL, Barroso-Chinea P, Rico AJ e cols., Expression of the mRNA coding the cannabinoid receptor 2 in the pallidal complex of *Macaca fascicularis*. *Psychopharmacol.* 2011; 25(1): 97-104.
- 290 Xi X, Peng X, Li X e cols., Brain cannabinoid CB2 receptors modulate cocaine's action in mice. *Nature Neurosci.* 2011 14(9):1160-1168.
- 291 Vaughn LK, Mantsch JR, Vranjokovic O e cols. Cannabinoid receptor involvement in stress-induced cocaine reinstatement: potential interaction with noradrenergic pathways. *Neurosci.* 2012; 204:117-124.

ANEXO A – Parecer do comitê de ética no uso animal



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Comitê de Ética no Uso Animal

Brasília, 28 de junho de 2010

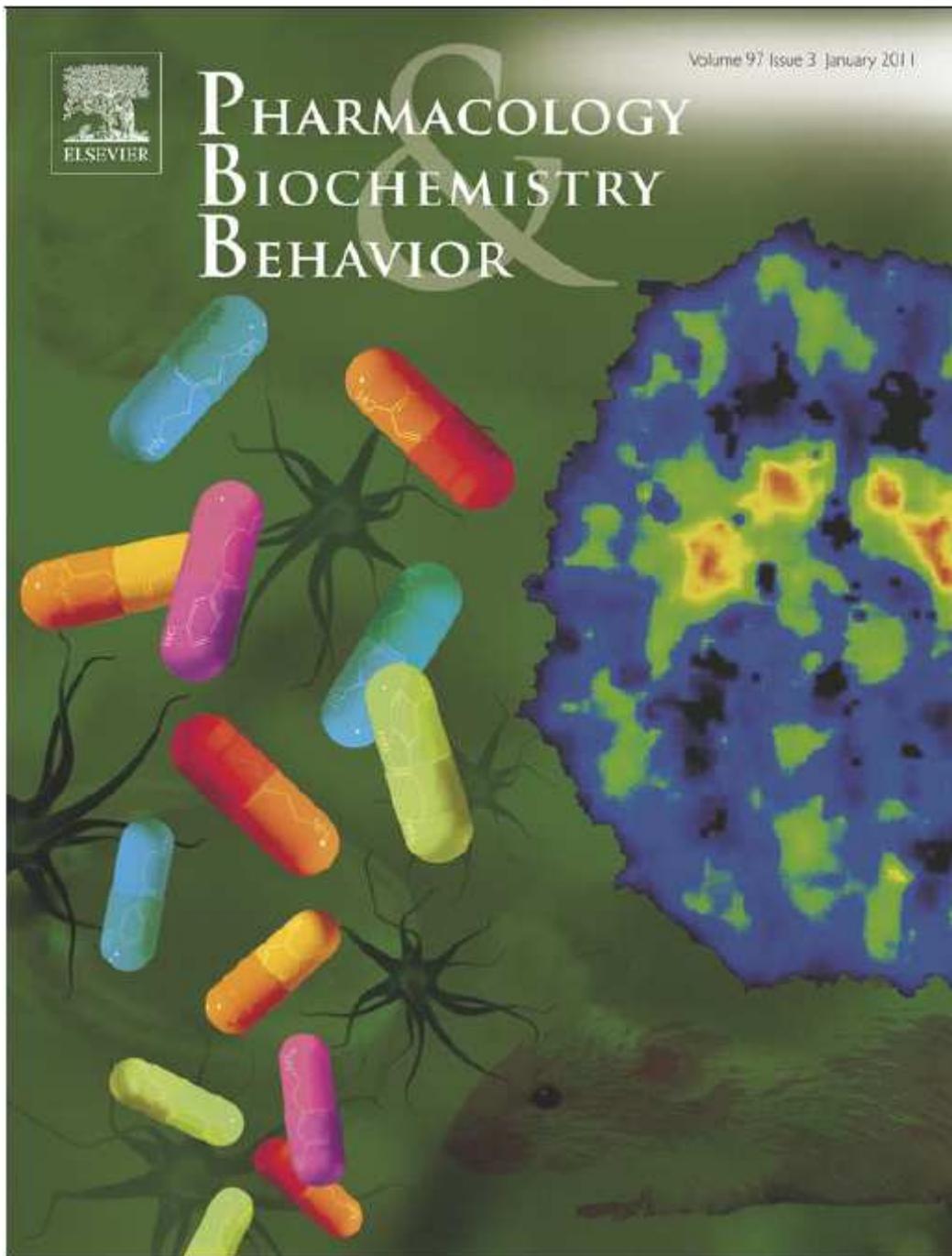
DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado "IMPACTO DO SISTEMA CANABINOÍDE NA DEPENDÊNCIA E ANSIEDADE INDUZIDAS PELA COCAÍNA EM PRIMATAS NÃO-HUMANOS", UnBDOC nº 121.617/2009, sob responsabilidade do Profa. Dra. Marília Barros, foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

Prof. Antonio Sebben
Coordenador do CEUA



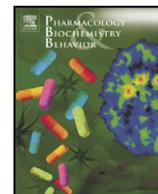
ANEXO B – Cópia da publicação do estudo 1





Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Pharmacology, Biochemistry and Behavior

journal homepage: www.elsevier.com/locate/pharmbiochembeh

Diazepam-induced decrease in anxiety-like behaviors of marmoset monkeys exposed to a novel open-field

Priscila Cagni^a, Mara Komorowski^b, Gabriela C. Melo^a, Talita Lima^a, Marilia Barros^{a,*}

^a Department of Pharmaceutical Sciences, School of Health Sciences, University of Brasilia, 70910-900 Brasilia, DF, Brazil

^b Center for Behavioral Neuroscience, University of Dusseldorf, 40204 Dusseldorf, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 August 2011

Received in revised form 18 October 2011

Accepted 21 October 2011

Available online 29 October 2011

Keywords:

Marmoset

Anxiety

Open-field

Diazepam

Behavior

ABSTRACT

Unfamiliar environments can be a source of stress, fear and anxiety for marmoset monkeys. In spite of existing data, the influence of putative anxiolytics on the effects of novel environments has yet to be tested in primates. Therefore, the behavior of adult black tufted-ear marmosets to a single brief (15 min) exposure to a novel environment was analyzed in the presence and absence of diazepam (DZP). Marmosets were pre-treated with vehicle ($n=5$) or diazepam (0.5 mg/kg, ip; $n=5$) and submitted to a 15 min free exploration trial within a rectangular open-field arena. DZP-treated subjects, compared to vehicle controls, demonstrated significantly lower rates of (*phee*) contact calls and exploration, while a higher scan duration. Sojourn time in the arena's central zone was also significantly higher in the former group and sedation was not observed. Thus, pre-treatment with the benzodiazepine DZP decreased several anxiety-related behaviors induced by subjecting the marmosets to a new environment. The results also indicate that, as with rodent subjects, the open-field may provide a useful simple paradigm for assessing anxiety-like behaviors in this primate and, as such, constitutes a unique opportunity for direct comparative studies between rodents and marmoset monkeys in terms of anxiety and/or sedation.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The forced confrontation with a novel environment, from which escape is prevented due to the presence of surrounding walls/barriers, has long been used to study emotionality in several animal species (Belzung, 1999; Prut and Belzung, 2003). For rodents, in particular, the anxiety-related behaviors resultant from these situations may be due to social isolation and/or agoraphobia, being reversed by standard anxiolytic treatments (i.e., benzodiazepines, 5-HT_{1A} receptor agonists; Prut and Belzung, 2003). However, the specific conditions under which the experiments are conducted (e.g., size/shape of the apparatus, presence of objects within the arena, lighting conditions, test duration), as well as the behavioral response observed and the effect of putative drug administration vary considerably depending on the animal model used. These typically range from rodents to several livestock species.

Yet unfamiliar environments can also be a potent source of stress, fear and anxiety for non-human primates. In marmoset monkeys, novel surroundings typically induce social (*phee*) contact calls, in addition to elevating cortisol and heart rate levels (Dettling, 2002; French et al., 2007; Gerber et al., 2002; Norcross and Newman, 1999; Rukstalis and French, 2005; Smith et al., 1998). Unfamiliar places may

also require a more efficient and frequent surveillance of the environment (Barros et al., 2004a), being potentially seen as a situation that may increase the risk of predation. These small-bodied, arboreal and diurnal monkeys not only form stable extended family groups of 2–13 individuals (Stevenson and Rylands, 1988), with a complex parental care of offspring (Yamamoto, 1993), but they also suffer one of the highest rates of predation among primates (Cheney and Wrangham, 1987). Thus, isolation from group members and lack of established escape routes and/or protective shelters could be triggering the emotional response elicited during these situations (e.g., Barros et al., 2004a). Brief (15–30 min) repeated exposures of marmosets to an unknown environment rapidly lead to the habituation of the behavioral response (e.g., Barros et al., 2004b), thus minimizing costly anti-predation responses once a situation has been accurately established as being safe (Caine, 1998). This seems to be the case even among captive- and captive-born callitrichids (Barros et al., 2002; Buchanan-Smith, 1999; Caine, 1998; Koenig, 1998).

In spite of existing data related to the effects of environmental novelty in non-human primates, the influence of putative anxiolytics on such an experimental design has yet to be tested in monkeys. The open-field has long been employed with rats and mice for assessing exploratory- and anxiety-related behaviors. Therefore, the present study analyzed the behavioral response of individually tested adult black tufted-ear marmosets to a single brief (15 min) exposure to a novel open-field environment, in the presence and absence of the benzodiazepine diazepam.

* Corresponding author at: Department of Pharmaceutical Sciences, School of Health Sciences, University of Brasilia, CEP 70910-900 Brasilia, DF, Brazil. Tel./fax: +55 61 3307 2098.

E-mail address: mbarros@unb.br (M. Barros).

2. Methods

2.1. Subjects and housing conditions

Ten, experimentally-naïve, adult black tufted-ear marmosets (*Callithrix penicillata*) were used, weighing 290–390 g at the beginning of the study. The marmosets were housed in pairs at the Primate Center of the University of Brasilia in cages ($2 \times 1.3 \times 2$ m each) of the same colony room. This room, which consisted of two parallel rows of 12 cages, separated by a common wire-mesh enclosed central corridor, formed an outdoor/semi-indoor housing system; thus, marmosets were exposed to natural light, temperature and humidity conditions. Each home-cage consisted of two parallel concrete walls (separating adjacent cages), a wire-mesh front, back and top, a suspended wooden nest-box, several wooden perches at different heights, a food tray (where food bowl was placed), a PVC feeding tube (for dry food pellets) hung from the wire mesh top, and a layer of saw dust on the floor. Additionally, a solid roof 50–150 cm above the wire-mesh top covered two thirds of all cages. Food was provided twice a day, at 07:00 h and 13:00 h, consisting of a mixture of fresh fruits and vegetables, with mealworms, boiled eggs, various nuts and/or cooked chicken breast given three times a week. Water and dry food pellets were available ad libitum. Housing conditions complied with the regulations of the Brazilian Institute of Environment and Renewable Natural Resources (IBAMA). All procedures employed were approved by the Animal Ethics Committee of the University of Brasilia, complied with the 'Brazilian Principles of Laboratory Animal Use' (COBEA) and followed the NIH guidelines for care and use of laboratory animals.

2.2. Drugs

Diazepam (DZP; 0 and 0.5 mg/kg; Compaz, Brazil) was dissolved in a solution of phosphate buffered saline with 1% Tween 80 (Sigma-Aldrich, USA) and injected intraperitoneally (ip) 30 min prior to the behavioral testing in a volume of 1.0 mL/kg. The dose used was based on similar behavioral studies with marmosets (Cagni et al., 2009; Carey et al., 1992).

2.3. Apparatus

Testing was conducted in a rectangular open-field (OF) arena ($130 \times 75 \times 40$ cm) suspended 1.2 m from the floor. Three of its walls were made of aluminum, whereas the fourth was of 4 mm transparent glass. This glass wall made up one of the two widest sides of the rectangular arena (i.e., 130 cm). The top consisted of the same glass material and the bottom was made of 2.5 cm^2 wire-mesh. The apparatus had a guillotine-type door located on the wall opposite the one made of glass, which served as its entry/exit point. Except for the glass wall and top, the OF arena was painted white to enhance the automated video-tracking of the marmosets.

The apparatus was set-up in a test-room located in a building 50 m away from the callitrichid colony facility. The marmosets were transported to and from the test-room in a stainless steel transportation-cage ($35 \times 20 \times 23$ cm) containing a guillotine-type door. This cage did not allow marmosets to see their surrounding while being transported. Two 100 W light bulbs, fixed on opposite walls of the test-room, acted as a light source. The OF arena was monitored via a closed-circuit system using two digital cameras (Fire-i, Unibrain, USA), one mounted approximately 1 m directly above the apparatus (top-view) and one located 1.5 m away from its glass wall (side-view). Both cameras were connected to a PC laptop located outside the test-room, from where all trials were observed and recorded. The marmosets were tracked automatically (via top-view camera) using the AnyMaze software (Stoelting Co., USA). An

observer, using the side-view camera, manually scored specific behaviors that could not be automatically distinguished by the software. Also, for the behavioral analyses (see Section 2.4), the same software divided the OF arena into 15 square sections of equal dimensions (26×25 cm).

2.4. Behavioral procedure and analyses

Marmosets were randomly assigned to one of two treatment groups: vehicle ($n=5$) or DZP ($n=5$). All subjects were submitted to a single 15 min trial of free exploration of the entire OF arena. This trial consisted in capturing the subject in its home-cage, administering the pre-established treatment (i.e., DZP or vehicle) and then releasing it back into its original home-cage. Following a 30 min interval, the subject was captured once again, placed in the transport-cage, taken to the test-room and released into the apparatus. At the end of the 15 min trial, the subject was promptly returned to its home-cage. The order in which subjects were tested was randomly assigned on each day and sessions were held between 13:30 and 17:00 h.

The AnyMaze software (Stoelting Co., USA) automatically tracked the marmosets' sojourn time and number of entries in each of the 15 sections of the OF arena, as well as the distance and average speed traveled within the apparatus. In addition, an experienced observer (with a 95% intra-rater reliability) scored, with the same program, the following behaviors by pressing keys on the keyboard upon occurrence of the appropriate response: (1) Long call vocalization, the frequency of long *phee* contact calls; (2) Exploratory activity, the frequency of leg-stands (to raise the body into a bipedal position) and the smelling/licking of any part of the apparatus; (3) Glance, the frequency of a single rapid upward or downward movement of the head directed at the environment, while the animal remained stationary; and (4) Scan, the frequency and duration of long-lasting (>5 s) sweeping upward or downward movements of the head directed at the environment, while the animal remained stationary. Also, the OF apparatus was divided into two zones, peripheral and central, comprising 80% and 20% of its total area, respectively. Sojourn and number of entries in the peripheral zone were determined as the total time spent and frequency in the 12 outer sections of the OF arena, respectively, relative to the total number of sections in this zone. The frequency and time spent in the three inner sections of the apparatus, also relative to the number of sections in this zone, was calculated for the central zone.

2.5. Statistical analysis

The time spent and number of entries in the peripheral and central zones of the OF arena were analyzed using a mixed design two-way analysis of variance (ANOVA), with treatment group (DZP and vehicle) as the independent factor, and zone (peripheral and central) as the repeated measure variable. Post-hoc comparisons were performed using the *t*-test (for the group factor) and paired *t*-test (for the zone factor). The remaining parameters were compared using the *t*-test. Significance level for all tests was set at $p \leq 0.05$.

3. Results

DZP-treated marmosets (0.5 mg/kg), compared to vehicle controls, demonstrated significantly lower rates of social contact vocalizations ($t_8 = 2.63$, $p < 0.05$; Fig. 1) and exploration within the test apparatus ($t_8 = 2.46$, $p < 0.05$; Fig. 1). On the other hand, the former group spent significantly more time scanning the environment than the vehicle-treated animals ($t_8 = -3.27$, $p < 0.05$; Fig. 1).

Sojourn time within the OF arena (Fig. 2) differed significantly between groups ($F_{1,8} = 4.64$, $p < 0.05$) and zones ($F_{1,8} = 25.02$, $p < 0.001$), with a significant group vs. zone interaction ($F_{1,16} = 9.30$,

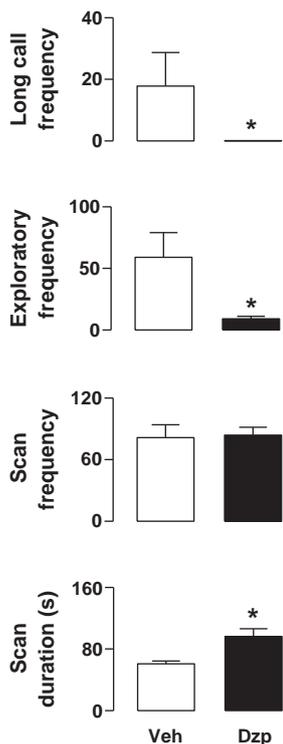


Fig. 1. Mean (+SEM) long call, exploration and scan frequency, as well as scan duration (in seconds), observed in the vehicle- (Veh) and diazepam-treated marmosets (Dzp; 0.5 mg/kg) during a single exposure to an open-field arena. n = 5/group; *p < 0.05 vs. vehicle.

p < 0.01). Accordingly, DZP-treated animals and those injected with vehicle spent equivalent amounts of time in the peripheral zone of the apparatus, while in the central part of the OF arena the former demonstrated a significantly higher occupancy than the latter group (p < 0.05). Also, marmosets injected with vehicle spent significantly less time in the central part of the apparatus than in its peripheral area, whereas DZP-treated subjects divided their time equally between both zones. In terms of frequency, both groups demonstrated a significantly higher number of entries into the central zone of the OF arena than in its outer region ($F_{1,8} = 98.48$, $p < 0.001$), with no significant group effect ($F_{1,8} = 2.89$, $p = 0.09$) or group vs. zone interaction ($F_{1,16} = 2.57$, $p = 0.11$). For the remaining behavioral parameters

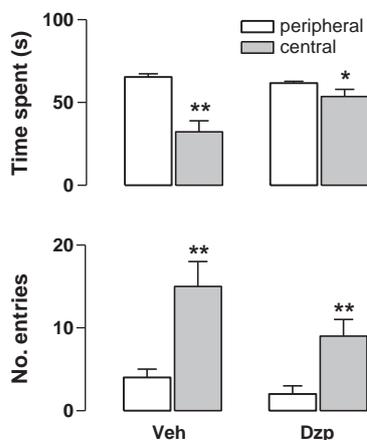


Fig. 2. Mean (+SEM) time spent (in seconds) and number of entries in the peripheral and central zones of the apparatus, relative to the number of sections in each zone, observed in the vehicle- (Veh) and diazepam-treated marmosets (Dzp; 0.5 mg/kg) during a single exposure to an open-field arena. n = 5/group; *p < 0.05 vs. vehicle, **p < 0.05 vs. its respective peripheral zone.

scored, significant between-group differences were not observed (distance traveled: $t_8 = 1.91$, $p = 0.09$; number of sections crossed: $t_8 = 0.92$, $p = 0.39$; travel speed: $t_8 = 1.88$, $p = 0.10$; glance frequency: $t_8 = 1.35$, $p = 0.21$; scan frequency: $t_8 = -0.16$, $p = 0.87$; Table 1 and Fig. 1).

4. Discussion

In the present study, adult marmoset monkeys were individually exposed to a novel OF arena during a single 15 min interval. Those who had been previously administered the putative anxiolytic DZP (0.5 mg/kg) demonstrated significantly less anxiety-related behaviors than the ones treated with vehicle. Accordingly, DZP-treated marmosets, compared to the vehicle group, demonstrated significantly lower rates of social (*phee*) contact calls and exploratory behaviors within the apparatus, while a higher scan duration. In the latter group, the rates observed for these behaviors were similar to previous reports in treatment-free subjects of the same species, using a similar protocol and apparatus (Barros et al., 2004b, 2007). In fact, when exposed to such conditions, both group- and singly-housed marmosets of several ages typically demonstrate high frequencies of social contact calls (Barros et al., 2004b; Epple, 1968; Goedeking and Newman, 1987; Jones et al., 1993; Norcross and Newman, 1993, 1999; Norcross et al., 1999; Smith et al., 1998). Novel environments are also reported to induce exploration (Barros et al., 2002, 2003, 2004b) and inhibit vigilance-related behaviors in this simian (Barros et al., 2004a), which in turn are reversed as the degree of familiarity increases due to repeated exposures. Benzodiazepine treatment, on the other hand, reversed distress vocalization in different primate species (reviewed by Miczek et al., 1995) and increased vigilance in marmosets submitted to a predatory stress (Barros et al., 2007).

DZP treatment also led to a significantly longer sojourn time in the central zone of the novel OF apparatus, compared to marmosets that received vehicle. The latter group spent significantly more time in the outer than inner sections of the rectangular arena. Changes in zone occupancy – due to DZP administration – were not accompanied by modifications in entry frequency, compared to the profile of the vehicle-treated subjects. Accordingly, both groups entered the central zone of the OF arena more frequently than the peripheral area, possibly as an alternative short route between opposite sides of the apparatus. A similar profile is typically observed in rodents tested under comparable conditions, with rats/mice having an innate fear of open spaces. Thus, an increase in central occupancy is viewed as an indicator of anxiolysis in this type of setup (for review see Prut and Belzung, 2003). Although not necessarily true for all primates, unfamiliar open spaces may pose a considerable threat to the small arboreal neotropical marmoset, considering their high rate of predation (Cheney and Wrangham, 1987) – particularly by raptorial birds (e.g., Heymann, 1990). Thus, fear of unknown open spaces may also be a critical innate response in callitrichid monkeys.

Therefore, results from the present study indicate that pre-treatment with the benzodiazepine DZP decreased several anxiety-related behaviors induced by subjecting marmoset monkeys to a new environment. Importantly, this anxiolytic-like profile occurred in the absence of any

Table 1

Behavioral response to a single exposure to a novel open-field arena in vehicle- and diazepam-treated marmoset monkeys.

Behavior	Treatment group ^a	
	Vehicle	Diazepam
Distance traveled (in meters)	75 ± 16	54 ± 14
Number of sections crossed	316 ± 62	240 ± 56
Travel speed (in m/s)	0.11 ± 0.04	0.05 ± 0.02
Glance frequency	20 ± 5	15 ± 1

^a mean ± SEM.

confounding sedative effect, common for benzodiazepines (e.g., Rudolph and Möhler, 2006), with the distance traveled, number of sections crossed and travel speed being similar in all subjects. In rodents, DZP typically induces a similar anxiolytic-like response, with a higher sojourn time/entry in the central zone being the main (and oftentimes the sole) reported response (reviewed in Prut and Belzung, 2003). Accordingly, the present results also indicate that – as with rodent subjects – the OF arena may provide a useful simple paradigm for assessing anxiety-like behaviors in this primate species and, as such, constitutes a unique opportunity for direct comparative studies between rodents and marmoset monkeys in terms of anxiety and/or sedation.

Acknowledgements

This study was supported by CAPES/DAAD/PROBAL (324/09) and CNPq/Brazil (470604/2009-3). PC received a doctoral fellowship from CAPES/Brazil, GCM and TL a study scholarship from PIBIC/CNPq/UnB and MB a researcher fellowship from CNPq/Brazil (311621/2009-0). These funding sources had no involvement in the study design, data collection, analysis or interpretation, writing the manuscript or decision to submit it for publication. The authors would like to thank A.P. Souto Maior for constructing the marmoset open-field arena and Drs. C. Dias, L.P. Batista and D.S. Teixeira and R. de Oliveira, as well as G. Vieira and A.P.N. da Silva, for the excellent care of the animals. The experiments described herein complied with the regulations of the Brazilian Institute of Environment and Renewable Natural Resources (IBAMA), as well as the 'Brazilian Principles of Laboratory Animal Use' (COBEA), and was approved by the Animal Ethics Committee of the University of Brasilia.

References

- Barros M, Boere V, Mello Jr EL, Tomaz C. Reactions to potential predators in captive-born marmosets (*Callithrix penicillata*). *Int J Primatol* 2002;23:443–54.
- Barros M, Mello Jr EL, Maior RS, Müller CP, de Souza Silva MA, Carey RJ, et al. Anxiolytic-like effects of the selective 5-HT_{1A} receptor antagonist WAY 100635 in non-human primates. *Eur J Pharmacol* 2003;482:197–203.
- Barros M, Alencar C, Tomaz C. Differences in aerial and terrestrial visual scanning in captive black tufted-ear marmosets (*Callithrix penicillata*) exposed to a novel environment. *Folia Primatol* 2004a;75:85–92.
- Barros M, de Souza Silva MA, Huston JP, Tomaz C. Multibehavioral analysis of fear and anxiety before, during and after experimentally induced predatory stress in *Callithrix penicillata*. *Pharmacol Biochem Behav* 2004b;78:357–67.
- Barros M, Giorgetti M, Souto AAV, Vilela G, Santos K, Vilas Boas N, et al. Persistent anxiety-like behavior in marmosets following a recent predatory stress condition: reversal by diazepam. *Pharmacol Biochem Behav* 2007;86:705–11.
- Belzung C. Measuring exploratory behavior. In: Crusio WE, Gerlai RT, editors. *Handbook of molecular genetic techniques for brain and behavior research (Techniques in the behavioral and neural sciences)*. Amsterdam: Elsevier; 1999. p. 739–49.
- Buchanan-Smith HM. Exploration of unfamiliar areas and detection of potentially threatening objects in single- and mixed-species of tamarins. *Int J Comp Psychol* 1999;12:2–20.
- Cagni P, Gonçalves Jr I, Ziller F, Emile N, Barros M. Humans and natural predators induce different fear/anxiety reactions and response pattern to diazepam in marmoset monkeys. *Pharmacol Biochem Behav* 2009;93:134–40.
- Caine NG. Cutting costs in response to predatory threat by Geoffroy's marmosets (*Callithrix geoffroyi*). *Am J Primatol* 1998;46:187–96.
- Carey DL, Costall B, Domeney AM, Jones DN, Naylor RJ. Behavioural effects of anxiogenic agents in the common marmoset. *Pharmacol Biochem Behav* 1992;42:143–53.
- Cheney DL, Wrangham RW. Predation. In: Smuts BB, Cheney DL, Seyfarth RM, Wrangham RW, Struhsaker TT, editors. *Primate societies*. Chicago: Chicago University Press; 1987. p. 227–39.
- Detting AC. Early deprivation and behavioral and physiological responses to social separation/novelty in the marmoset. *Pharmacol Biochem Behav* 2002;73:259–69.
- Epple G. Comparative studies on vocalization in marmoset monkeys (Hapalidae). *Folia Primatol* 1968;8:1–40.
- French JA, Fite JE, Jensen H, Oparowski K, Rukstalis MR, Fix H, et al. Treatment with CRH-1 antagonist antalarmin reduces behavioral and endocrine responses to social stressors in marmosets (*Caffithrix kuhlii*). *Am J Primatol* 2007;69:877–89.
- Gerber P, Schnell CR, Anzenberger G. Behavioral and cardiophysiological responses of common marmosets (*Callithrix jacchus*) to social and environmental changes. *Primates* 2002;43:201–16.
- Goedeking P, Newman JD. Intra- and inter-individual variability in "phee" calls of captive common marmosets. *Am J Primatol* 1987;12:344.
- Heymann EW. Reactions of wild tamarins, *Saguinus mystax* and *Saguinus fuscicollis*, to avian predators. *Int J Primatol* 1990;11:327–37.
- Jones BS, Harris DHR, Catchpole CK. The stability of the vocal signature in phee calls of the common marmoset, *Callithrix jacchus*. *Am J Primatol* 1993;31:67–75.
- Koenig A. Visual scanning by common marmosets (*Callithrix jacchus*): functional aspects and the special role of adult males. *Primates* 1998;39:85–90.
- Miczek KA, Weerts EM, Vivian JA, Barros HM. Aggression, anxiety and vocalizations in animals – GABA(A) and 5-HT anxiolytics. *Psychopharmacology* 1995;121:38–56.
- Norcross JL, Newman JD. Context and sex-specific differences in the acoustic structure of common marmoset (*Callithrix jacchus*) phee calls. *Am J Primatol* 1993;30:37–54.
- Norcross JL, Newman JD. Effects of separation and novelty on distress vocalizations and cortisol in the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Am J Primatol* 1999;47:209–22.
- Norcross JL, Newman JD, Cofrancesco LM. Context and sex differences exist in the acoustic structure of phee calls by newly-paired common marmosets (*Callithrix jacchus*). *Am J Primatol* 1999;49:165–81.
- Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol* 2003;463:3–33.
- Rudolph U, Möhler H. GABA-based therapeutic approaches: GABA(A) receptor subtype functions. *Curr Opin Pharmacol* 2006;6:18–23.
- Rukstalis M, French JA. Vocal buffering of the stress response: exposure to conspecific vocalizations moderates urinary cortisol excretion in isolated marmosets. *Horm Behav* 2005;47:1–7.
- Smith TE, McGreer-Whitworth B, French JA. Close proximity of the heterosexual partner reduces the physiological and behavioral consequences of novel-cage housing in black tufted-ear marmosets (*Callithrix kuhlii*). *Horm Behav* 1998;34:211–22.
- Stevenson MF, Rylands AB. The marmosets, genus *Callithrix*. In: Mittermeier RA, Rylands AB, Coimbra-Filho A, Fonseca GAB, editors. *Ecology and behavior of neotropical primates*, vol. 2. Contagem/Brazil: Littera Maciel Ltda/WWF; 1988. p. 131–222.
- Yamamoto ME. From dependence to sexual maturity: the behavioural ontogeny of Callitrichidae. In: Rylands AB, editor. *Marmosets and tamarins systematics, behaviour and ecology*. Oxford: Oxford University Press; 1993. p. 235–54.

ANEXO C – Cópia do manuscrito do estudo 3

Elsevier Editorial System(tm) for Pharmacology, Biochemistry and Behavior
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Repeated cocaine administration in marmoset monkeys induces hypervigilance-related behaviors, but no changes in locomotion and cortisol levels.

Article Type: Research Article

Keywords: Marmoset; Cocaine; Vigilance; Locomotion; Cortisol; Open-field.

Corresponding Author: Dr. Marilia Barros,

Corresponding Author's Institution:

First Author: Priscila Cagni

Order of Authors: Priscila Cagni; Mara Komorowski ; Gabriela C Melo; Talita Lima; Carlos Tomaz; Maria A de Souza Silva; Joseph P Huston; Marilia Barros

Abstract: Although cocaine induces several behavioral and hormonal effects, little is known about non-contingent repeated administrations in non-human primates. Therefore, we analyzed behavioral (locomotion, vigilance) and hormonal (cortisol) responses of adult black tufted-ear marmosets during repeated administrations and withdrawal trials. The subjects were divided into two groups (saline or cocaine 5 mg/kg, ip) and submitted to nine treatment trials and four withdrawal trials in the absence of any treatment in an open-field arena. Blood samples were obtained on six different time points of the procedure. Cocaine repeatedly administered to drug-naïve marmosets induced a slow-onset hypervigilance effect (i.e., scan, glance), with no concomitant change in locomotion. Cortisol levels remained constant throughout the procedure, possibly associated to the glucocorticoid resistance of marmosets via a low receptor binding affinity, or to ceiling levels incurred by the capture and anesthesia procedure. Therefore, marmosets seem to have a similar behavioral - but not hormonal - response as human addicts and other NHPs repeatedly injected with cocaine, but differ from rats in their absence of hyperlocomotor activity. The development of hypervigilance with repeated application may constitute a unique measure to assess cocaine-induced changes in behavior in the marmoset and other NHPs.

Suggested Reviewers: Charles W Bradberry
University of Pittsburg
bradberrycw@upmc.edu
expert on primate addiction pharmacology

Robert J Carey
University of Syracuse
careybdjp@earthlink.net
expert on cocaine and behavior

Christian P Müller
University Erlangen-Nuremberg
Christian.Mueller@uk-erlangen.de
expert on behavioral pharmacology of psychostimulants

Gerhard Jocham
University of Oxford
gjocham@fmrib.ox.ac.uk
expert on psychostimulant action in the brain

Opposed Reviewers:

June 17th, 2012

G. F. Koob
Editor-in-Chief of Pharmacology Biochemistry and Behavior
Committee on the Neurobiology of Addictive Disorders
The Scripps Research Institute
10550 North Torrey Pines road
La Jolla 92037
USA

Dear Dr. Koob,

We are submitting the manuscript “Repeated cocaine administration in marmoset monkeys induces hypervigilance-related behaviors, but no changes in locomotion and cortisol levels” for publication in the journal *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. The experimental protocol employed in the study complies with the ‘Brazilian Principles of Laboratory Animal Use’ (COBEA) and was approved by the Animal Ethics Committee of the University of Brasilia, Brazil.

Looking forward to your editorial decision.

Sincerely,

Dr. Marilia Barros

Research highlights:

1. Repeated systemic cocaine induced slow-onset hypervigilance in marmosets
2. Changes in locomotion and cortisol were not induced
3. Primate vigilance may be a unique marker of cocaine behavioral effects

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11 **Repeated cocaine administration in marmoset monkeys induces**
12 **hypervigilance-related behaviors, but no changes in locomotion**
13 **and cortisol levels.**
14
15
16
17
18
19
20

21 Priscila Cagni^a, Mara Komorowski^b, Gabriela C. Melo^a, Talita Lima^a, Carlos Tomaz^c,
22 Maria A. de Souza Silva^b, Joseph P. Huston^b and Marilia Barros^a
23
24
25
26
27

28 ^a *Department of Pharmaceutical Sciences, School of Health Sciences, University of Brasilia,*
29 *70910-900 Brasilia, DF, Brazil.*
30
31

32 ^b *Center for Behavioral Neuroscience, Institute of Experimental Psychology, University of*
33 *Düsseldorf, 40204 Düsseldorf, Germany.*
34
35

36 ^c *Primate Center and Department of Physiological Sciences, Institute of Biology, University of*
37 *Brasilia, 70910-900 Brasilia, DF, Brazil.*
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47

48 Corresponding author: Dr. Marilia Barros
49

50 Department of Pharmaceutical Sciences, School of Health Sciences

51 University of Brasilia, CEP 70910-900

52 Brasilia - DF, Brazil

53 Tel/Fax: 55-61-3107-2002

54 E-mail: mbarros@unb.br
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Abstract

1
2 Although cocaine induces several behavioral and hormonal effects, little is known
3
4 about non-contingent repeated administrations in non-human primates. Therefore, we
5
6 analyzed behavioral (locomotion, vigilance) and hormonal (cortisol) responses of adult black
7
8 tufted-ear marmosets during repeated administrations and withdrawal trials. The subjects
9
10 were divided into two groups (saline or cocaine 5 mg/kg, ip) and submitted to nine treatment
11
12 trials and four withdrawal trials in the absence of any treatment in an open-field arena. Blood
13
14 samples were obtained on six different time points of the procedure. Cocaine repeatedly
15
16 administered to drug-naïve marmosets induced a slow-onset hypervigilance effect (i.e., scan,
17
18 glance), with no concomitant change in locomotion. Cortisol levels remained constant
19
20 throughout the procedure, possibly associated to the glucocorticoid resistance of marmosets
21
22 via a low receptor binding affinity, or to ceiling levels incurred by the capture and anesthesia
23
24 procedure. Therefore, marmosets seem to have a similar behavioral - but not hormonal -
25
26 response as human addicts and other NHPs repeatedly injected with cocaine, but differ from
27
28 rats in their absence of hyperlocomotor activity. The development of hypervigilance with
29
30 repeated application may constitute a unique measure to assess cocaine-induced changes in
31
32 behavior in the marmoset and other NHPs.
33
34
35
36
37
38
39

40 **Keywords:** marmoset; cocaine; vigilance; locomotion; cortisol; open-field
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1. Introduction

1 Psychostimulants, such as cocaine, induce several behavioral and hormonal effects
2
3 in rodents, nonhuman primates (NHP) and humans. They typically enhance locomotion in
4
5 rodents, whereas increases in stereotyped psychotomimetic or hallucinatory-like behaviors
6
7 have been reported in NHP and humans (reviewed in Bradberry, 2007; Castner and
8
9 Williams, 2007; Leyton, 2007). In NHP “checking of the environment” has been reported,
10
11 although stereotyped grooming, oral movements (e.g., orbuccal dyskinesias, vacuous
12
13 chewing) and manipulation of objects, as well as the tracking and/or grasping of nonexistent
14
15 stimuli may also occur (e.g., Farfel et al., 1992; Ridley et al., 1982). Direct dopaminergic
16
17 agonists repeatedly injected in monkeys result in similar behavioral patterns (Kleven and
18
19 Woolverton, 1990). Several of these behavioral changes are observed regardless of whether
20
21 the drug is applied by contingent (self-administered) or noncontingent (experimenter-
22
23 administered) means (reviewed in Steketee and Kalivas, 2011).

24 Acute cocaine administration also activates the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA)
25
26 axis, leading to an increased release of corticosterone in rodents (Mello and Mendelson,
27
28 2002) and cortisol in NHP (Sarnyai et al., 1996) and humans (Baumann et al., 1995).
29
30 Whether the release is more pronounced after contingent than noncontingent administration
31
32 remains a controversial issue (e.g., Palamarchouk et al., 2009). Nonetheless, activation of
33
34 the HPA axis has been associated to the neural mechanisms of cocaine reinforcement and
35
36 relapse (reviewed in Marinelli and Piazza, 2002). The hormonal effects of repeated cocaine
37
38 exposures and withdrawal in NHP have not been addressed.

39 Due to considerable differences between rodents and primates, including the
40
41 morphological organization, connectivity and prenatal development of the mesocortical DA
42
43 system (Berger et al., 1991; Haber and McFarland, 1999; Joel et al., 2000), the dynamics of
44
45 dopamine release and uptake in the striatum (Cragg et al., 2000), the genetic homology of
46
47 the dopamine transporter (Miller et al., 2001), the density and distribution of receptors within
48
49 addiction-related neural circuits (e.g., Camps et al., 1990) and brain metabolic responses to
50
51 psychostimulants (e.g., Lyons et al., 1996), NHP may help bridge the gap between pre-
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 clinical and clinical studies on drug addiction, particularly the small neotropical marmoset
2 monkey (Maior et al., 2011). However, little is still known about the behavioral and hormonal
3 effects of repeated cocaine administrations in this NHP.
4

5
6 Therefore, in the present study we analyzed locomotor and vigilance-related
7 behaviors of adult black tufted-ear marmosets during repeated systemic cocaine
8 administrations and withdrawal trials. The levels of circulating cortisol were also measured
9 during five different time points over the course of the experimental trials.
10
11
12
13
14
15
16

17 **2. Methods**

18 **2.1. Subjects and housing conditions**

19
20 We used 10, experimentally-naïve, adult black tufted-ear marmosets (*Callithrix*
21 *penicillata*), weighing 290-410g at the beginning of the study. They were housed in pairs at
22 the Primate Center of the University of Brasilia in cages (2 x 1.3 x 2 m each) of a same
23 colony room. This room, which consisted of two parallel rows of 12 cages, separated by a
24 common wire-mesh enclosed central corridor, formed an outdoor/semi-indoor housing
25 system; thus, the marmosets were exposed to natural light, temperature and humidity
26 conditions. Each home-cage consisted of two parallel concrete walls (separating adjacent
27 cages), a wire-mesh front, back and top, a suspended wooden nest-box, several wooden
28 perches at different heights, a food tray (where food bowl was placed), a PVC feeding tube
29 (for dry food pellets) hung from the wire mesh top, and a layer of saw dust on the floor.
30
31 Additionally, a solid roof 50-150 cm above the wire-mesh top covered two thirds of all cages.
32
33 Food was provided twice a day, at 07:00 h and 13:00 h, consisting of a mixture of fresh fruits
34 and vegetables, with meal-worms, boiled eggs, various nuts and/or cooked chicken breast
35 given three times a week. Water and dry food pellets were available ad libitum. Housing
36 conditions complied with the regulations of the Brazilian Institute of Environment and
37 Renewable Natural Resources (IBAMA). All procedures employed were approved by the
38 Animal Ethics Committee of the University of Brasilia, complied with the 'Brazilian Principles
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

of Laboratory Animal Use' (COBEA) and followed the NIH guidelines for care and use of laboratory animals.

2.2. Drugs

Cocaine hydrochloride (0 and 5 mg/kg; Sigma-Aldrich, USA) was dissolved in phosphate buffered saline and injected intraperitoneally, in a volume of 1.0 mL/kg, 5 min prior to the behavioral testing.

2.3. Apparatus

Testing was conducted in a rectangular open-field (OF) arena (130 x 75 x 40 cm) suspended 1.2 m from the floor. Three of its walls were made of aluminum, whereas the fourth was of 4 mm transparent glass. This glass wall made up one of the two widest sides of the rectangular arena (i.e., 130 x 40 cm). The top consisted glass and the bottom was made of 2.5 cm² wire-mesh. The apparatus had a guillotine-type door located on the wall directly opposite the one made of glass, which served as its entry/exit point. With the exception of the glass wall and top, the OF arena was painted white to enhance the automated video-tracking of the marmosets.

The apparatus was set up in a test-room located in a building 50 m away from the callitrichid colony facility. The marmosets were transported to and from the test-room in a covered aluminum transportation-cage (35 x 20 x 23 cm) containing a guillotine-type door. Two 100W light bulbs, fixed on opposite walls of the test-room, acted as a light source. The OF arena was monitored via a closed-circuit system using two digital cameras (Fire-i, Unibrain, USA), one mounted approximately 1.5 m directly above the apparatus (top-view) and one located 1.5 m away from its glass wall (side-view). Both cameras were connected to a PC laptop located outside the test-room, from where all trials were observed and recorded. The marmosets were tracked automatically (via top-view camera) using the AnyMaze software (Stoelting Co., USA). An observer, using the side-view camera, manually scored specific behaviors that could not be automatically distinguished by the software. Also, for the

behavioral analyses (see below), the same software divided the OF arena into 15 square sections of equal dimensions (26 x 25 x 40 cm).

2.4. Behavioral procedure and analyses

The marmosets were randomly assigned to one of two treatment groups: saline (n=5) or cocaine (n=5). All subjects were initially submitted to nine 15-min test trials and then to four 15-min withdrawal trials. All trials were held at 48 h intervals. Each trial consisted in capturing the subject in its home-cage and administering either cocaine or saline. The marmoset was then placed into the transportation-cage, taken to the test-room and released into the OF arena after a 5 min interval. At the end of the 15 min trial, the subject was promptly returned to its home-cage. As no treatment was administered prior to the four withdrawal trials, the marmosets were taken directly to the OF arena in the transportation-cage. The order in which subjects were tested was randomly assigned on each day and the sessions were held between 13:30 and 17:00 h.

The AnyMaze software (Stoelting Co., USA) automatically tracked the marmosets' entry into each of the virtual 15 sections of the OF arena, as well as the distance and average speed traveled within the apparatus. In addition, an experienced observer (with a 95% intra-rater reliability) scored, with the same program, the following vigilance-related behaviors by pressing keys on the keyboard upon occurrence of the appropriate response: (1) *Leg stand*, the frequency of raising the body into a bipedal position; (2) *Glance*, the frequency of a single rapid upward or downward movement of the head directed at the environment, while the animal remained stationary; and (3) *Scan*, the frequency and duration of long-lasting (>5 s) sweeping upward or downward movements of the head directed at the environment, while the animal remained stationary. Vigilance behaviors were based on marmoset ethograms (Stevenson and Poole, 1976; Stevenson and Rylands, 1988) and previous reports in this species (Barros et al., 2004a, 2004b, 2008).

2.5. Blood sampling and cortisol assay

1
2
3
4
5
6
7
8
9
Five blood samples were obtained from each marmoset as follows: the first sample was taken one week prior to the test-trials (baseline), the second sample after test-trial 1, the third sample after test-trial 4, the fourth sample after the last withdrawal-trial and the fifth sample was taken 12 weeks later. All sampling were done between 09:00 and 11:00 h. Thus, except for the initial baseline sample, blood was taken the morning after the behavioral trials.

10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
For each blood sampling, the marmoset was captured in its home-cage and conveyed to an adjacent procedure room where it was anesthetized with isoflurane via inhalation. A 1.0 mL blood sample was then collected via femoral venipuncture and immediately placed into a tube containing a gel barrier and clot-promoting additives for total serum analyses. Following its recovery (<5 min), the subject was released back into its home-cage, monitored for 15 min and given vitamin supplements. The sampling procedure (i.e., time elapsed between entering the home-cage to capture the animal and the end of the venipuncture) was determined, as this may possibly influence the hormone content observed. On average, the latency was 4.02 ± 0.59 min (mean \pm SEM), an interval previously reported not to exert a significant influence on cortisol assays in marmosets (Saltzman et al., 1994). All procedures were conducted in the presence of the Primate Center's veterinarian.

36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
Blood samples were kept on ice until centrifuged for 5 min at 3.500 rpm and 4°C. The resulting serum from each sample was transferred to an Eppendorf vial and diluted to 1:50 with tri-distilled water for cortisol assay. Dilution factor was based on previous studies in this species using a similar blood sampling and analysis procedure (Lima et al., 2008). The diluted serum was then analyzed by single enzyme-linked-fluorescent assay (ELFA) using commercial cortisol kits for the automated MiniVidas® immunoassay system (CORS kits; BioMérieux, USA). Cortisol assay sensitivity was 2 ng/mL and inter- and intra-assay coefficients of variation (CVs) from pooled serum were 9.6% and 8.2%, respectively.

58 59 60 61 62 63 64 65 **2.6. Statistical analysis**

Behavioral measures and cortisol concentrations were compared for possible between- and within-group effects. Accordingly, data from each parameter were analyzed

1 using a mixed design two-way analysis of variance (ANOVA), with group (cocaine and
2 saline) as the independent factor and behavioral trial (test trials 1-9, withdrawal trials 1-4) or
3 blood sample (1-5) as the repeated measure variable. Whenever significant, subsequent
4 comparisons were performed using the appropriate error variance terms from the respective
5 ANOVA summary tables with Dunnett's test (behavioral data: saline or test trial 1) or Tukey's
6 test for multiple pair-wise comparisons (cortisol data). Duration of the blood sampling
7 procedure was also compared to the respective cortisol level detected using the Pearson's
8 correlation test. Significance level for all tests was set at $p \leq 0.05$.

19 3. Results

20 The marmosets' scan levels (Fig. 1) differed significantly between groups (duration:
21 $F_{1,104}=48.95$, $p < 0.001$; frequency: $F_{1,104}=77.64$, $p < 0.001$) and trials (duration: $F_{12,104}=2.23$,
22 $p < 0.05$; frequency: $F_{12,104}=3.26$, $p < 0.001$), with a significant group vs. trial interaction
23 (duration: $F_{12,104}=2.19$, $p < 0.05$; frequency: $F_{12,104}=2.48$, $p < 0.01$). Accordingly, scan duration
24 and frequency on test trials 4 to 9 were significantly ($p < 0.05$) higher than those observed on
25 test trial 1, albeit only in the cocaine-treated marmosets. The scan-rates of this group - from
26 test trial 2 onward - differed significantly ($p < 0.05$) from those of the saline-group. During the
27 subsequent 4 withdrawal-trials, scan duration and frequency did not differ significantly
28 between cocaine- and saline-treated marmosets, with rates being constant and similar to
29 those seen during the test-trial 1. In the saline-group, scan-behavior (duration and frequency)
30 remained constant throughout the entire procedure.

31 A similar profile was seen in terms of the number of glances (Fig. 1), with significant
32 differences between groups ($F_{1,104}=91.63$, $p < 0.001$) and trials ($F_{12,104}=5.55$, $p < 0.001$), as well
33 as a group vs. trial interaction ($F_{12,104}=5.60$, $p < 0.001$). In fact, in the cocaine-treated subjects,
34 glance-frequency increased over the course of the test-trials, such that test-trials 4 to 9
35 differed significantly ($p < 0.05$) not only from test-trial 1, but from the saline-treated group as
36 well. During the subsequent withdrawal-trials, this parameter remained at levels similar to
37

those of test-trial 1, in both cocaine- and saline-treated subjects. In the saline-group, glance-frequency also remained constant over the course of the entire procedure.

Contrary to the vigilance-related behaviors, the number of leg stands decreased over the course of the study, regardless of the treatment given, attaining a significantly lower level during all 4 withdrawal trials compared to test-trial 1 (group effect: $F_{1,104}=0.08$, $p=0.78$; trial effect: $F_{12,104}=1.87$, $p<0.05$; interaction: $F_{12,104}=0.17$, $p=1.00$; Fig. 1). For the remaining behaviors scored - locomotor-related measures (Table 1) - significant between- and within-group effects were not observed, as well as no group vs. trial interaction (Distance Traveled – group effect: $F_{1,104}=0.13$, $p=0.72$; trial effect: $F_{12,104}=0.84$, $p=0.61$; interaction: $F_{12,104}=0.54$, $p=0.88$; Sections Crossed – group effect: $F_{1,104}=2.21$, $p=0.14$; trial effect: $F_{12,104}=1.09$, $p=0.38$; interaction: $F_{12,104}=0.90$, $p=0.55$; Average Speed – group effect: $F_{1,104}=0.28$, $p=0.60$; trial effect: $F_{12,104}=1.09$, $p=0.38$; interaction: $F_{12,104}=0.74$, $p=0.71$).

The levels of circulating cortisol did not differ between groups or samples (group: $F_{1,39}=0.19$, $p=0.67$; sample: $F_{4,39}=0.24$, $p=0.92$; interaction: $F_{4,39}=0.22$, $p=0.93$; Table 2). Cortisol levels were also not significantly correlated with the time required to obtain the blood sample (baseline: $r = -0.11$, $p=0.76$; post-test trial 1: $r = -0.59$, $p=0.08$; post-test trial 4: $r=0.35$, $p=0.33$; post-extinction: $r=0.13$, $p=0.72$; 12 weeks post-extinction: $r = -0.24$, $p=0.54$).

4. Discussion

Marmosets repeatedly injected with cocaine (5 mg/kg) demonstrated, after a few trials, a significant increase in vigilance-related behaviors, with no concomitant alteration in their locomotor pattern or cortisol level. In fact, from test trials 4 to 9, cocaine-treated subjects displayed significantly higher levels of scan (duration/frequency) and glance behaviors than when they were first exposed to the psychostimulant (test trial 1) and compared to marmosets that only received saline.

The gradual development of hypervigilance-related behaviors may indicate a sensitization effect. During all four withdrawal trials, the number of scans and glances made by the cocaine-treated subjects did not differ significantly from those of the saline-group and

1 were similar to the levels detected on their first cocaine exposure. The sudden cessation of
2 these behaviors during withdrawal does not indicate conditioning of the hypervigilance-
3 related behaviors. Scanning was also recently correlated with the neurochemical content in
4 different areas of the marmoset brain (de Souza Silva et al., 2007), pointing towards a
5 possible right hemispheric specialization for emotionally relevant stimuli. Repeated
6 psychostimulant administration also led to a progressive increase in visual monitoring of the
7 surroundings in rhesus (e.g., Farfel et al., 1992) and vervet monkeys (e.g., Ridley et al.,
8 1982), with paranoid psychosis being reported in humans (reviewed in Bradberry, 2007).
9 Acute or repeated cocaine injections do not typically modify vigilance-related behaviors in
10 rodents (Bradberry, 2007). On the other hand, and regardless of the treatment, the number
11 of leg-stands steadily decreased across trials. This posture has been associated with an
12 increased visibility of the surroundings and interest in novel objects (Stevenson and Rylands,
13 1988), with different pharmacological treatments modulating the number of leg stands in
14 marmosets (e.g., Barros et al., 2007). However, the profile presently observed seems more
15 akin to a habituation effect, similar to previous reports by our group (e.g., Barros et al.,
16 2004a).

17 Locomotion, measured as the number of sections crossed and the distance and
18 average speed traveled within the OF apparatus, remained constant throughout the nine test
19 trials, with saline- and cocaine-treated subjects demonstrating similar levels. In rodents,
20 cocaine-induced hyperlocomotion is typically seen following both acute and repeated
21 injections, an effect not consistently demonstrated in humans or NHP (Bradberry, 2007). De
22 Souza Silva et al. (2006a, 2006b) reported a locomotor effect after an acute injection of
23 cocaine, but only in a subset of high-responder marmosets and with a higher dose (10
24 mg/kg). In other NHP, psychostimulants seem, at best, to idiosyncratically enhance motor
25 stereotypies, such as pacing and circling (e.g., Castner and Goldman-Rakic, 2003), while
26 naive human volunteers exhibited increased activity levels following limited amphetamine
27 exposure (e.g., Strakowski and Sax, 1998).

1
2 In terms of the cortisol levels, repeated administrations of cocaine and saline in the
3 marmosets had no effect, even if activation of the HPA axis is known to occur, culminating in
4 a higher blood content (reviewed in Mello and Mendelson, 2002). Although in the present
5 study there was a long interval between treatment administrations and blood samplings (i.e.,
6 the next morning), Lima et al. (2008) also reported a lack of effect on cortisol levels 0, 30 and
7 60-min after a 10 mg/kg dose of cocaine, with increases occurring only 60-min after 20
8 mg/kg. One may not exclude the possibility that the capture and anesthesia procedure may
9 have incurred a ceiling effect, although previous studies have reported experimentally-
10 induced increases in blood cortisol levels beyond that seen in the present study (e.g.
11 Norcross and Newman, 1999). In fact, the present concentrations were similar to those
12 reported for marmosets (e.g., Boere et al., 2005) and not significantly correlated with the
13 duration of the procedure, and the levels detected in the saline-group remained constant
14 even after repeated samplings. The absence of an effect may be partly due to their low
15 receptor binding affinity, leading to high baseline glucocorticoids levels (e.g., Chrousos et al.,
16 1982; however see for example Scammell et al., 2001). In squirrel monkeys, another
17 glucocorticoid-resistant neotropical primate, cocaine priming reinstated drug-seeking, yet
18 failed to alter salivary cortisol (Lee et al., 2003; Platt et al., 2007), while Tiefenbacher et al.
19 (2003) required higher doses of CRF than ACTH to significantly increase salivary cortisol. In
20 rhesus monkeys, cocaine-induced release of cortisol is commonly reported (e.g., Broadbear
21 et al., 1999), suggesting that Old (including humans) and New World monkeys may differ in
22 this respect.
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45

46 In summary, a low dose of cocaine repeatedly administered to drug-naïve marmosets
47 induced a slow-onset hypervigilance effect, with no concomitant change in locomotion or
48 cortisol level in this glucocorticoid-resistant primate. Therefore, marmosets seem to have a
49 similar behavioral - but not hormonal - response as human addicts and other NHPs
50 repeatedly injected with cocaine. Vigilance measures in this and other NHPs may, thus,
51 constitute unique markers to assess cocaine-induced behavioral changes.
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Acknowledgements

1
2 This study was supported by CAPES/DAAD/PROBAL (324/09), CNPq/Brazil (470604/2009-
3
4 3), DPP/UnB (09/2011), Deutsche Forschungsgemeinschaft (grant DE 792/2-4) and
5
6 NEURON-ERANET DISCover (BMBF 01EW1003). PC received a doctoral fellowship from
7
8 CAPES/Brazil, GCM and TL a study scholarship from PIBIC/CNPq/UnB and MB a research
9
10 fellowship from CNPq/Brazil (311621/2009-0). These funding sources had no involvement in
11
12 the study design, data collection, analysis or interpretation, writing the manuscript or decision
13
14 to submit it for publication. The authors thank A.P. Souto Maior for constructing the
15
16 marmoset open-field arena and Drs. C. Dias, L.P. Batista, D.S. Teixeira and R. de Oliveira,
17
18 as well as G. Vieira and A.P.N. da Silva, for the excellent care of the animals and
19
20 participation in the blood sampling procedures. The experiments described herein complied
21
22 with the regulations of the Brazilian Institute of Environment and Renewable Natural
23
24 Resources (IBAMA), as well as the 'Brazilian Principles of Laboratory Animal Use' (COBEA),
25
26 and was approved by the Animal Ethics Committee of the University of Brasilia.
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

References

1
2 Barros M, de Souza-Silva MA, Huston JP, Tomaz C. Multibehavioral analysis of fear and
3 anxiety before, during, and after experimentally induced predatory stress in *Callithrix*
4 *penicillata*. Pharmacol Biochem Behav 2004a;78:357-67.
5
6

7
8
9
10 Barros M, Alencar C, Tomaz C. Differences in aerial and terrestrial visual scanning in captive
11 black tufted-ear marmosets (*Callithrix penicillata*) exposed to a novel environment. Folia
12 Primatol 2004b;75:85-92.
13
14
15

16
17
18 Barros M, Giorgetti M, Souto AAV, Vilela G, Santos K, Vilas Boas N et al. Persistent anxiety-
19 like behavior in marmosets following a recent predatory stress condition: reversal by
20 diazepam. Pharmacol Biochem Behav 2007;86:705-11.
21
22
23
24

25
26
27 Barros M, Alencar C, de Souza Silva MA, Tomaz C. Changes in experimental conditions
28 alter anti-predator vigilance and sequence predictability in captive marmosets. Behav
29 Processes 2008;77:351-56.
30
31
32
33

34
35
36
37 Baumann MH, Gendron TM, Becketts KM, Henning-Field JE, Gorelick DA, Rothaman RB.
38 Effects of intravenous cocaine on plasma cortisol and prolactin in human cocaine abusers.
39 Biol Psychol 1995;38:751-55.
40
41
42
43

44
45
46 Berger B, Gaspar P, Verney C. Dopaminergic innervation of the cerebral cortex: unexpected
47 differences between rodents and primates. Trends Neurosci 1991;14:21-7.
48
49
50

51
52
53 Boere V, Pinheiro EC, de Oliveira e Silva I, Paludo GR, Canale G, Pianta T et al.
54 Comparison between sex and age class on some physiological, thermal, and hematological
55 indices of the cerrado's marmoset (*Callithrix penicillata*). J Med Primatol 2005;34:156-62.
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Bradberry CW. Cocaine sensitization and dopamine mediation of cue effects in rodents, monkeys, and humans: areas of agreement, disagreement, and implications for addiction. *Psychopharmacol* 2007;191:705-17.

Broadbear JH, Winder G, Cicero TJ, Woods JH. Effects of self-administered cocaine on plasma adrenocorticotrophic hormone and cortisol in male rhesus monkeys. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;289:1641-7.

Camps M, Kelly PH, Palacios JM. Autoradiographic localization of dopamine D1 and D2 receptors in the brain of several mammalian species. *J Neural Trans* 1990;80:105-27.

Castner SA, Goldman-Rakic PS. Amphetamine sensitization of hallucinatory-like behaviors is dependent on prefrontal cortex in nonhuman primates. *Biol Psychiatry* 2003;54:105-10.

Castner SA, Williams GV. From vice to virtue: insights from sensitization in the nonhuman primate. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry* 2007;31:1572-92.

Chrousos GP, Renquist D, Brandon D, Eil C, Pugeat M, Vigersky R et al. Glucocorticoid hormone resistance during primate evolution: receptor-mediate mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982;79:2036-40.

Cragg SJ, Hille CJ, Greenfield SA. Dopamine release and uptake dynamics within nonhuman primate striatum in vitro. *J Neurosci* 2000;20:8209-17.

de Souza Silva MA, Mello Jr EL, Müller CP, Jocham G, Maior RS, Huston JP et al. The neurokinin-3 receptor antagonist SR142801 blocks the behavioral effects of cocaine in marmoset monkeys. *Eur J Pharmacol* 2006a;536:269-78.

de Souza Silva MA, Mello Jr EL, Müller CP, Jocham G, Maior RS, Huston JP et al.

Interaction of the tachykinin NK3 receptor agonist senktide with behavioral effects of cocaine in marmosets (*Callithrix penicillata*). *Peptides* 2006b;27:2214-23.

de Souza Silva MA, Topic B, Lamounier-Zepter V, Huston JP, Tomaz C, Barros M. Evidence for hemispheric specialization in the marmoset (*Callithrix penicillata*) based on lateralization of behavioral/neurochemical correlations. *Brain Res Bull* 2007;74:416-28.

Farfel GM, Kleven MS, Woolverton WL, Seiden LS, Perry BD. Effects of repeated injections of cocaine on catecholamine receptor binding sites, dopamine transporter binding sites and behavior in rhesus monkey. *Brain Res* 1992;578:235-43.

Haber SN, McFarland NR. The concept of the ventral striatum in nonhuman primates. *Ann NY Acad Sci* 1999;877:33-48.

Joel D, Weiner I. The connections of the dopaminergic system with the striatum in rats and primates: an analysis with respect to the functional and compartmental organization of the striatum. *Neurosci* 2000;96:451-74.

Kleven MS, Woolverton WL. Effects of continuous infusions of SCH 23390 on cocaine- or food-maintained behavior in rhesus monkeys. *Behav Pharmacol* 1990;1:365-73.

Lee B, Tiefenbacher S, Platt DM, Spealman RD. Role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in reinstatement of cocaine-seeking behavior in squirrel monkeys. *Psychopharmacology* 2003;168:177-83.

Leyton M. Conditioned and sensitized responses to stimulant drugs in humans. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry* 2007;31:1601-13.

1
2 Lima D, Spíndola DB, Dias LO, Tomaz C, Barros M. Effects of acute systemic cocaine
3 administration on the cortisol, ACTH and prolactin levels of black tufted-ear marmosets.
4
5 Psychoneuroendocrinol 2008;33:321-7.
6
7

8
9
10 Lyons D, Friedman DP, Nader MA, Porrino LJ. Cocaine alters cerebral metabolism within the
11 ventral striatum and limbic cortex of monkeys. J Neurosci 1996;16:1230-8.
12
13

14
15
16
17 Maior RS, Barros M, Tomaz C. Contributions of non-human primates to the understanding of
18 cocaine addiction. In: Uehara T, editors. Psychiatry disorders - trends and developments.
19
20 Croácia: InTech; 2011. p. 339-66.
21
22

23
24
25
26 Marinelli M, Piazza PV. Interaction between glucocorticoid hormones, stress and
27 psychostimulant drugs. Eur J Neurosci 2002;16:387-94.
28
29

30
31
32
33 Mello NK, Mendelson JH. Cocaine, hormones and behavior: clinical and preclinical studies.
34
35 Horm Brain Behav 2002;5:665-745.
36
37

38
39
40 Miller GM, Yatin SM, De La Garza R, Goulet M, Madras BK. Cloning of dopamine,
41 norepinephrine and serotonin transporters from monkey brain: relevance to cocaine
42 sensitivity. Brain Res: Mol Brain Res 2001;87:124-43.
43
44

45
46
47
48 Norcross JL, Newman JD. Effects of separation and novelty on distress vocalizations and
49 cortisol in the common marmoset (*Callithrix jacchus*). Am J Primatol 1999;47:209-22.
50
51

52
53
54
55 Palamarchouk V, Smagin G, Goeders NE. Self-administered and passive cocaine infusions
56 produce different effects on corticosterone concentrations in the medial prefrontal cortex
57 (MPC) of rats. Pharmacol Biochem Behav 2009;94:163-8.
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2 Platt DM, Rowlett JK, Spealman RD. Noradrenergic mechanisms in cocaine-induced
3
4 reinstatement of drug seeking in squirrel monkeys. J Pharmacol Exp Ther 2007;322:894-902.
5
6

7
8
9 Ridley RM, Baker HF, Owen F, Cross AJ, Crow TJ. Behavioural and biochemical effects of
10
11 chronic amphetamine treatment in the vervet monkey. Psychopharmacology 1982;78:245-
12
13 51.
14
15

16
17
18 Saltzman W, Schultz-Darken NJ, Sheffler G, Wegner FH, Abbott DH. Social and reproductive
19
20 influences on plasma cortisol in female marmoset monkeys. Pharmacol Biochem Behav
21
22 1994;56:801-10.
23
24

25
26
27 Sarnyai Z, Mello NK, Mendelson JH, Eros-Sarnyai M, Mercer G. Effects of cocaine on
28
29 pulsatile activity of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis in male rhesus monkeys:
30
31 neuroendocrine and behavioral correlates. J Pharmacol Exp Ther 1996;277:225-34.
32
33

34
35
36 Scammell JG, Denny WB, Valentine DL, Smith DF. Overexpression of the FK506-binding
37
38 immunophilin FKBP51 is the common cause of glucocorticoid resistance in three New World
39
40 primates. Gen Comp Endocrinol 2001;124:152-65.
41
42

43
44
45 Steketee JD, Kalivas PW. Drug wanting: behavioral sensitization and relapse to drug-seeking
46
47 behavior. Pharmacol Rev 2011;63:348-65.
48
49

50
51
52 Strakowski SM, Sax KW. Progressive behavioral response to repeated d-amphetamine
53
54 challenge: further evidence for sensitization in humans. Biol Psychiatry 1998;44:1171-7.
55
56

57
58
59 Stevenson MF, Poole TB. Ethogram of common marmoset (*Callithrix jacchus jacchus*) -
60
61 general behavioral repertoire. Animal Behav 1976;24:428-51.
62
63
64
65

1
2 Stevenson MF, Rylands AB. The marmosets, genus *Callithrix*. In: Mittermeier RA, Rylands
3 AB, Coimbra-Filho A, Fonseca GAB, editors. Ecology and behavior of neo-tropical primates,
4 vol. 2. Contagem/Brazil: Littera Maciel Ltda/WWF; 1988. p. 131-222.
5
6
7

8
9
10 Tiefenbacher S, Lee B, Meyer JS, Spealman RD. Noninvasive technique for the repeated
11 sampling of salivary free cortisol in awake, unrestrained squirrel monkeys. Am J
12 Primatol 2003;60:69-75.
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Figure Legends

1
2 **Fig. 1.** Mean (\pm SEM) scan duration (in seconds), as well as the number of scans, glances
3 and leg stands observed in the saline and cocaine-treated marmosets during each of the
4 nine cocaine administrations and four withdrawal trials. n=5/group; *p<0.05 cocaine vs.
5 saline; #p<0.05 vs. cocaine test trial 1.
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Table 1. Locomotor parameters in the saline and cocaine-treated marmosets during the nine test and four withdrawal trials.

	Distance traveled ^a		Sections crossed		Average speed ^b	
	saline	cocaine	saline	cocaine	saline	cocaine
<i>test trials</i>						
1	75±16	90±21	316±62	432±92	0.11±0.04	0.12±0.02
2	60±20	95±42	279±62	480±158	0.07±0.02	0.11±0.05
3	56±25	86±47	248±91	383±157	0.06±0.03	0.12±0.04
4	53±19	58±18	245±66	343±79	0.09±0.05	0.09±0.02
5	60±18	81±38	298±72	442±107	0.07±0.02	0.09±0.04
6	50±21	72±24	254±71	436±109	0.06±0.02	0.08±0.03
7	65±26	64±17	281±96	367±77	0.07±0.03	0.07±0.02
8	62±15	45±21	341±96	261±86	0.08±0.02	0.05±0.02
9	53±12	29±12	275±85	199±61	0.08±0.02	0.03±0.01
<i>withdrawal trials</i>						
1	33±18	57±17	164±65	257±54	0.04±0.02	0.06±0.02
2	50±16	33±8	219±66	176±39	0.06±0.02	0.04±0.01
3	54±11	28±7	298±52	205±49	0.08±0.01	0.03±0.01
4	74±21	49±21	303±81	186±51	0.06±0.03	0.09±0.02

^a in meters, ^b in meters/second (mean±SEM)

Table 2. Serum levels of cortisol in saline- and cocaine-treated marmosets on each of the five blood samples obtained during the course of the experimental procedure; mean \pm SEM (μ g/dL).

Blood sample	Treatment-group	
	saline	cocaine
baseline	92 \pm 14	84 \pm 16
post-test trial 1	102 \pm 7	94 \pm 8
post-test trial 4	91 \pm 6	89 \pm 6
post-extinction trial 4	102 \pm 10	91 \pm 8
12 weeks post-extinction	103 \pm 18	103 \pm 17

Figure 1

[Click here to download Figure\(s\): Cagni et al_03 Figure 1.pdf](#)

