



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

**UNIDAD XOCHIMILCO**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS**

**LIC. QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

Proyecto de servicio social

**Efecto neuroprotector de Clonazepam y WIN en un modelo de ansiedad inducida en ratones CD1.**

Pertenece al proyecto:

Evaluación de productos relacionados con la salud

Alumna: Leticia Eleonor Chávez Marín

Matrícula: 2143026137

Asesores: Dra. Tomasa Verónica Barón Flores      No. Económico: 26848

Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda      No. Económico 16190

Lugar de realización: Laboratorio de Neurofarmacología Molecular de la UIDIS en la UAM-X.

Fecha de inicio: 15 octubre de 2018

Fecha de termino: 15 abril de 2019

## Índice

1. MARCO TEORICO .....	3
1.1 Introducción.....	3
1.2 Ansiedad.....	3
1.3 Clonazepam.....	4
1.3.1 Farmacocinética.....	5
1.3.2 Farmacodinamia.....	6
1.4 Cannabinoides.....	7
1.5 WIN 55.212-2.....	8
1.6 Pruebas de ansiedad (enterrar canicas) .....	8
2. OBJETIVOS.....	10
2.1 Objetivo general.....	10
2.2 Objetivo específico.....	10
3. MATERIAL Y METODOS.....	10
3.1 Diseño del estudio.....	10
3.2 Modelo de enterramiento de canicas.....	10
4. RESULTADOS.....	11
4.1 Estudios de respuesta a las dosis.....	13
5. DISCUSION.....	14
6. CONCLUSION.....	16
7. REFERENCIAS.....	16

## 1. MARCO TEÓRICO

### **Introducción**

Debido a la necesidad mundial de hacer uso de fármacos innovadores que cumplan con ciertas especificaciones con el fin de otorgar eficacia y seguridad al paciente, la industria farmacéutica ha buscado alternativas efectivas y seguras para llevar a cabo los tratamientos farmacológicos.

Es por ello que la comunidad Químico-Farmacéutica tiene la tarea de buscar nuevos compuestos, sustancias y elementos que nos ofrece la naturaleza con un fin terapéutico.

Es importante el estudio farmacológico de los nuevos agentes terapéuticos, en concreto, los cannabinoides están siendo objeto de una gran cantidad de estudios debido a su potencial uso terapéutico en multitud de patologías. En este sentido, los cannabinoides, podrían ser muy útiles en el tratamiento de algunos síntomas y signos de ansiedad, la esclerosis-múltiple, el párkinson, etc.

### **Ansiedad**

Durante mucho tiempo se ha demostrado que los cannabinoides tienen una variedad de efectos terapéuticos potenciales que incluyen acciones antieméticas, analgesia y ansiolítica. La ansiedad es una alteración psiquiátrica que afecta a una gran proporción de la humanidad y que se ha incrementado en los últimos años siendo atribuible al estilo de vida impuesto actualmente, en el que predomina el ser muy competitivo. Este tema ampliamente estudiado, es complejo y multidimensional. La ansiedad también se define como un estado de malestar caracterizado por intranquilidad, expectación aprehensiva y aumento de la vigilancia en ausencia de un estímulo desencadenante. Regularmente, se acompaña de manifestaciones autonómicas como sudoración, taquicardia, alteraciones gastrointestinales, tensión muscular e insomnio, entre otras. (Nuss,2015)

Diferentes aspectos de la ansiedad están mediados por varios neurotransmisores en distintas áreas anatómicas, primordialmente, sobre el complejo del ácido gamma-aminobutírico/benzodiacepina (GABA/bzd), la noradrenalina y la

serotonina. Estos sistemas de neurotransmisores son de importancia crítica en el sistema límbico, incluyendo la amígdala cerebral, la cual es crucial en las respuestas de miedo y la ansiedad. Además, también la importancia de otros neurotransmisores, que modulan esta respuesta de manera directa o indirecta, entre los que se encuentran la colecistocinina, el factor de liberación de la corticotropina y el eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal (Nuss, 2015).

Los trastornos de ansiedad humana se agrupan ampliamente según la sintomatología y la capacidad de respuesta al tratamiento farmacológico y psicológico. El trastorno de ansiedad generalizada y el trastorno de pánico son las dos clasificaciones principales de la ansiedad patológica en los seres humanos. La característica distintiva del trastorno de ansiedad generalizada es una sensación generalizada de preocupación poco realista sobre las situaciones de la vida cotidiana (Barros M., Totnaz C, 2012).

Cambios similares en los indicadores fisiológicos y las respuestas conductuales al miedo y los estímulos dolorosos en humanos y otros animales sugieren la posibilidad de respuestas defensivas homólogas o análogas.

## **Clonazepam**

Las benzodiazepinas son una gran clase de medicamentos que tienen múltiples usos clínicos, incluida la terapia de ansiedad, insomnio, espasmo muscular, abstinencia de alcohol y convulsiones. Como clase, las benzodiazepinas no causan elevaciones significativas de las enzimas séricas y se han relacionado con casos muy raros de enfermedad hepática aguda y sintomática. Los efectos farmacológicos de las benzodiazepinas son el resultado de su interacción con el sistema nervioso central, siendo sus efectos sedación, hipnosis, disminución de la ansiedad, relajación muscular, amnesia anterógrada y actividad anticonvulsiva. A dosis altas, cuando se administra por vía intravenosa, las benzodiazepinas también pueden causar vasodilatación coronaria y bloqueo neuromuscular. Se cree que los efectos

del SNC de las benzodiazepinas están mediados por la activación de los receptores GABA A y la modulación de su inhibición de la neurotransmisión (Bethesda, 2012).

El clonazepam, una benzodiazepina, se usa comúnmente en el tratamiento de diversas afecciones, incluidos los trastornos de ansiedad y las crisis epilépticas. Sin embargo, debido a su bajo precio y fácil disponibilidad, se ha convertido en un medicamento comúnmente mal utilizado, tanto en contextos médicos como recreativos (Dokkedal et al., 2019).

El clonazepam, solo o en combinación con otras sustancias psicoactivas, puede provocar efectos no deseados en la salud, como deterioro motor y cognitivo, trastornos del sueño y agravamiento de los trastornos del estado de ánimo y ansiedad. El uso prolongado de clonazepam puede generar dependencia física y tolerancia. Por lo tanto, es necesario encontrar alternativas terapéuticas más seguras para tratar las convulsiones y los trastornos de ansiedad. También se necesita una mayor conciencia de su uso no médico frecuente para lograr un uso general más seguro de este medicamento (Dokkedal et al., 2019).

### **Farmacocinética**

El ácido gamma-aminobutírico (GABA) se considera el principal neurotransmisor inhibitorio en el cuerpo humano. Cuando GABA se une a los receptores GABA (a) que se encuentran en las sinapsis neuronales, los iones cloruro se conducen a través de las membranas celulares de las neuronas a través de un canal iónico en los receptores (Nardi AE et al., 2013).

Con suficientes iones de cloruro conducidos, los potenciales de membrana de las neuronas locales asociadas se hiperpolarizan, lo que hace que sea más difícil o menos probable que se disparen los potenciales de acción, lo que finalmente provoca una menor excitación de las neuronas (Nardi AE et al., 2013).

Posteriormente, las benzodiazepinas como el clonazepam pueden unirse a los receptores de benzodiazepinas que son componentes de varias variedades de receptores GABA (a) (Nardi AE et al., 2013).

Esta unión actúa para mejorar los efectos de GABA al aumentar la afinidad de GABA por el receptor GABA (a), lo que finalmente mejora la unión del ligando GABA en los receptores. Esta unión de ligando mejorada del neurotransmisor inhibitorio GABA a los receptores aumenta la conducción de iones cloruro mencionada anteriormente (tal vez, según se informa, a través de un aumento en la frecuencia de la apertura del canal de cloruro), lo que resulta en una membrana celular hiperpolarizada que evita la excitación adicional de las células neuronales asociadas (Jenner P. et al., 2006).

Combinado con la noción de que tales receptores GABA (a) asociados al receptor de benzodiazepinas existen tanto periféricamente como en el SNC, esta actividad facilita consecuentemente diversos efectos como sedación, hipnosis, relajación del músculo esquelético, actividad anticonvulsiva y acción ansiolítica (Jenner P. et al., 2006).

En particular, cuando se liberan señales eléctricas rápidas y repetitivas fuera de lo común en el SNC, se propone que el cerebro se sobreestime y se interrumpan las funciones ordinarias, lo que resulta en la actividad convulsiva. Al mejorar la actividad neuroinhibitoria de GABA, se cree que el clonazepam puede facilitar la disminución de cualquier actividad nerviosa eléctrica excesiva en el SNC que pueda estar contribuyendo a las convulsiones. Al mismo tiempo, también se cree que las acciones del clonazepam para mejorar los efectos del GABA pueden inhibir la actividad neuronal propuesta para ocurrir en la amígdala. circuitos de miedo centrados, por lo tanto, ayudan en el manejo de la ansiedad o el pánico (Nardi AE et al., 2013).

### **Farmacodinamia**

Las propiedades farmacodinámicas del clonazepam son comunes entre las benzodiazepinas incluyen efectos anticonvulsivos, sedantes, relajantes

musculares y ansiolíticos. Los datos de animales y las investigaciones electroencefalográficas en el hombre han demostrado que el clonazepam suprime rápidamente muchos tipos de actividad paroxística, incluidas las convulsiones de pico y descarga de onda en ausencia (petit mal), onda de pico lenta, onda de pico generalizada, picos con ubicaciones temporales u otras, así como espigas y ondas irregulares. Además, el agente también puede disminuir la frecuencia, amplitud, duración y propagación de la descarga en las convulsiones motoras menores (DeVane CL et al., 2007).

### **Cannabinoides**

Los extractos de Cannabis sativa (marihuana) se han utilizado por sus efectos calmantes y sedantes durante siglos. (Zuardi, 2006) El consumo de marihuana causa relajación y le da a uno sensación de bienestar. El uso intensivo de marihuana también ha sido vinculado a la adicción, la ansiedad y los trastornos de pánico (Keyhani S et al., 2018). El sistema endocannabinoide es una señalización de lípidos. sistema en el cerebro que consiste en endocannabinoides, receptores cannabinoides y las enzimas involucradas en el biosíntesis o inactivación endocannabinoide.

Los endocannabinoides son derivados del ácido araquidónico, y los dos ligandos endógenos principales son anandamida (N araquidonoiletanolamina) y 2-araquidonoilglicerol. Hay dos tipos de receptores cannabinoides (CB1 y CB2), que pertenecen a la familia de las proteínas G acopladas receptores. Los endocannabinoides se sintetizan postsinápticamente de las moléculas precursoras de la membrana lipídica y actúan presinápticamente en los receptores CB1 modulando el arrendamiento de neurotransmisores en el sistema nervioso central. La señalización endocannabinoide ha sido implicada en la modulación del comportamiento de alimentación, dolor, procesos cognitivos (Zou S, 2018) así como en la regulación de las respuestas conductuales al estrés (Gorzalka BB,2008). El sistema endocannabinoide juega un papel importante en la patogénesis de los trastornos depresivos, que se sabe que está acompañado de funciones cognitivas deterioradas y ansiedad. La investigación ha sugerido que la modulación de los

sistemas de señalización de cannabinoides endógenos neuronales podría representar un enfoque novedoso para el tratamiento de los trastornos relacionados con la ansiedad (Ibarra- Lecue I et al., 2018).

### **WIN 55.212-2**

Es un producto químico descrito como un derivado de aminoalquilindol, que produce efectos similares a los de los cannabinoides como el tetrahidrocannabinol (THC) pero tiene una estructura química completamente diferente. Es un potente agonista del receptor de cannabinoides que se ha encontrado que es un analgésico potente en un modelo de rata de dolor neuropático. Activa la quinasa MAP p42 y p44 a través de la señalización mediada por receptor. La evidencia experimental acumulada indica que uno de los compuestos cannabimiméticos sintéticos, WIN 55,212-2 (WIN) (un potente cannabinoide no selectivo CB1 y agonista del receptor CB2) potencia la actividad anticonvulsiva y ansiolítica de algunos fármacos antiepilépticos clásicos (es decir, diazepam, clonazepam carbamazepina, fenitoína, fenobarbital y valproato) y fármacos antiepilépticos de segunda generación (es decir, lamotrigina, pregabalina y topiramato) en el modelo de ataque tónico inducido por electrochoque (MES) (Magdalena Florek-Luszczki et al., 2014).

### **Prueba de ansiedad**

#### **Modelo “ Marble burying”**

Las pruebas en animales ciertamente pueden ser útiles para averiguar más sobre las bases biológicas de los trastornos de ansiedad y desarrollar tratamientos farmacológicos y/o conductuales nuevos y más eficientes. (Stein DJ., Neese RM, 2011)

Las pruebas no condicionadas no requieren de entrenamiento, por lo que son menos sensibles a procesos motivacionales y se basan en respuestas espontáneas de la conducta del ratón; éstas han permitido el desarrollo de una serie de paradigmas basados en la observación (Rejón-OrantesJ et al, 2011)

Este un modelo no condicionado y útil para neofobia, ansiedad, y comportamiento obsesivo compulsivo. A sido propuesto como una técnica válida para el descubrimiento de nuevos antidepresivos, ansiolíticos y antipsicóticos. (RejónOrantesJ et al, 2011)

Los ratones exhiben diversos comportamientos típicos de las especies, como la excavación. Cavan en el suelo para encontrar comida, para acumular comida, para crear un refugio contra los depredadores o el frío y para hacer un área de guardería. (Bailey KR, Crawley JN, 2010)

La prueba de enterramiento de canicas consiste en colocar al ratón en una caja (se puede utilizar la de campo abierto) con el piso cubierto de aserrín (5 cm), sobre el cual se distribuyen uniformemente 20 canicas de vidrio de 6 mm de diámetro. Se contabiliza el número de canicas que el ratón entierra en el aserrín durante un periodo de 30 minutos. Los roedores usan el material de su caja para enterrar los objetos que consideran nocivos o amenazantes. Sobre esta base, las canicas de vidrio se encuentran entre los estímulos que les ocasiona miedo y aversión. Esto podría ser resultado de la novedad que estos objetos representan en su medio ambiente y el entierro de las canicas se vería como la conducta apropiada porque quita la fuente del estímulo que causa aversión.

La inhibición de esta conducta ha sido propuesta como prueba para identificar compuestos ansiolíticos. Esta prueba es sensible a diazepam, fluoxetina, fluvaxamina (inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina), imipramina, clomipramina (antidepresivos triciclicos) y mianserina [36], 8-OH-DPAT (agonista del receptor 5-HT1A) [36]. Alternativamente, se ha propuesto que el enterramiento es una conducta compulsiva, porque los inhibidores de la recaptura de serotonina que se utilizan para tratar la alteración obsesivo-compulsiva en humanos inhiben esta conducta.

## 2. OBJETIVOS

**Objetivo General:** Evaluar el efecto neuroprotector de Clonazepam y WIN mediante un modelo de ansiedad en ratones CD1.

**Objetivos específicos:** Comparar el efecto ansiolítico de Clonazepam y WIN por una administración intraperitoneal.

## 3. MATERIAL Y MÉTODOS Modelo

de enterramiento de canicas

### **Procedimiento**

Para el procedimiento experimental se utilizaron ratones CD1 macho de 25.30 g, y se colocaron en cajas de acrílico en grupos de 8 ratones con agua y alimento cada respectivo grupo a una temperatura controlada.

El modelo se realizó de acuerdo a los estándares éticos de investigación NOM-062ZOO-1999, aprobados por el Comité Nacional de Cuidados Animales y contenidos en la Ley General de la Salud. Los animales fueron proporcionados por el Bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco (UPEAL). Número de protocolo 115, aprobado por el CICUAL-UAM-X (vigente)

### Diseño de Estudio

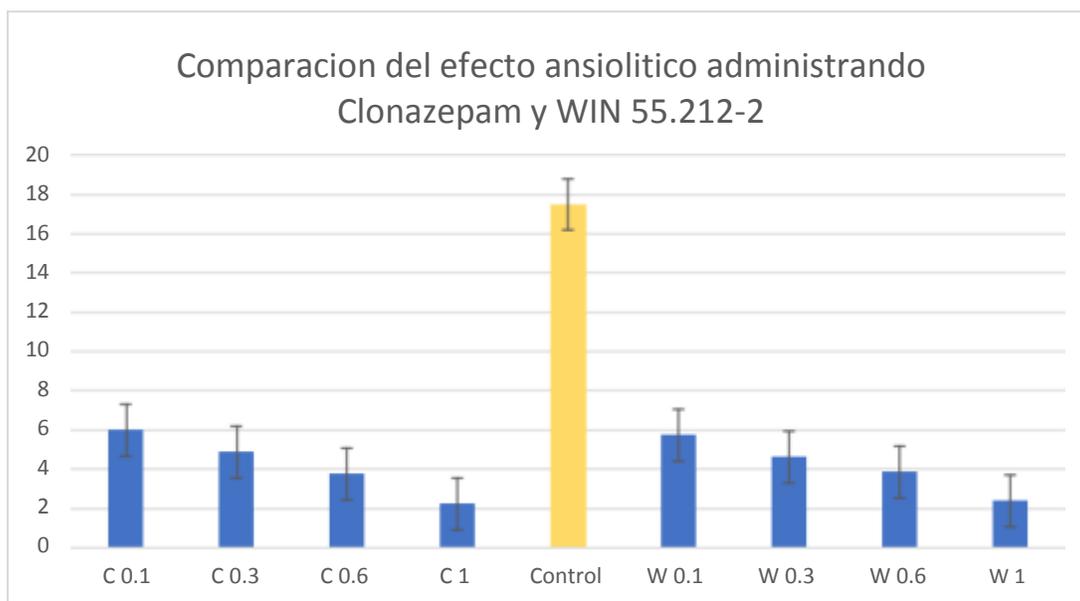
Consistió en administrar clonazepam y cannabinoide sintético (WIN-55.212-2) con las siguientes concentraciones: 0.1 mg/Kg, 0.3 mg/Kg, 0.6 mg/Kg, y 1 mg/Kg respectiva.

La administración se realizó por vía intraperitoneal con jeringas de insulina de 1 mL, administrando la dosis correspondiente durante 3 días a cada grupo.

En el último día la administración se llevó a cabo 30 minutos antes de realizar el modelo experimental de entierro de canicas.

#### 4. RESULTADOS

El efecto farmacológico que se obtuvo al realizar el estudio con Clonazepam, WIN 55.212-2 en un modelo de enterramiento de canicas arrojaron los siguientes resultados:

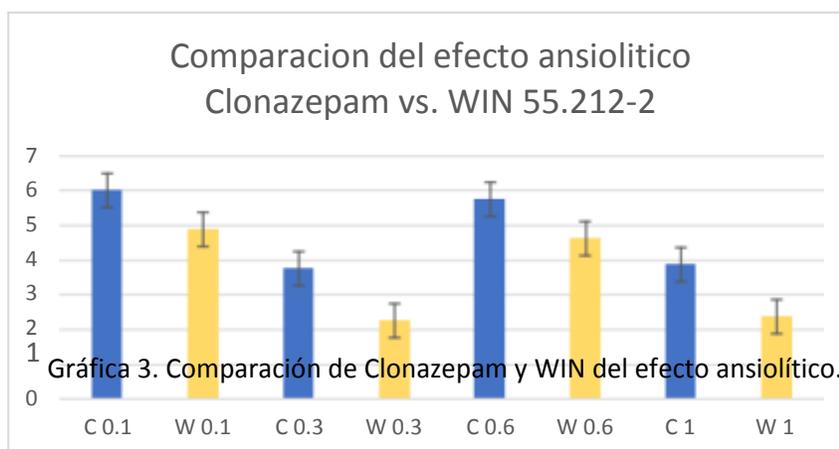


Grafica 1. Prueba para evaluar la ansiedad de ratón CD1 en tres grupos: Control, Clonazepam y WIN 55.212-2.

Los resultados arrojaron que a una menor concentración de Clonazepam se entierra un mayor número de canicas como se puede observar en la Gráfica 1. Por lo contrario, a una mayor concentración de Clonazepam los niveles de ansiedad disminuyen visiblemente, demostrando su efecto ansiolítico.

El grupo control que fue administrado con Solución salina obtuvo un 85% de canicas enterradas. Mientras que podemos observar una disminución constante del enterramiento en la administración de diferentes dosis de Clonazepam. A menor concentración de Clonazepam 0.1 mg/Kg se entierran un 30% de las canicas mientras que en la dosis más alta 1mg/Kg se observa que se entierran un 5% de las

canicas. A las concentraciones de 0.3 mg/Kg y 0.6 mg/Kg se obtuvo un porcentaje de 25% y 15% respectivamente.



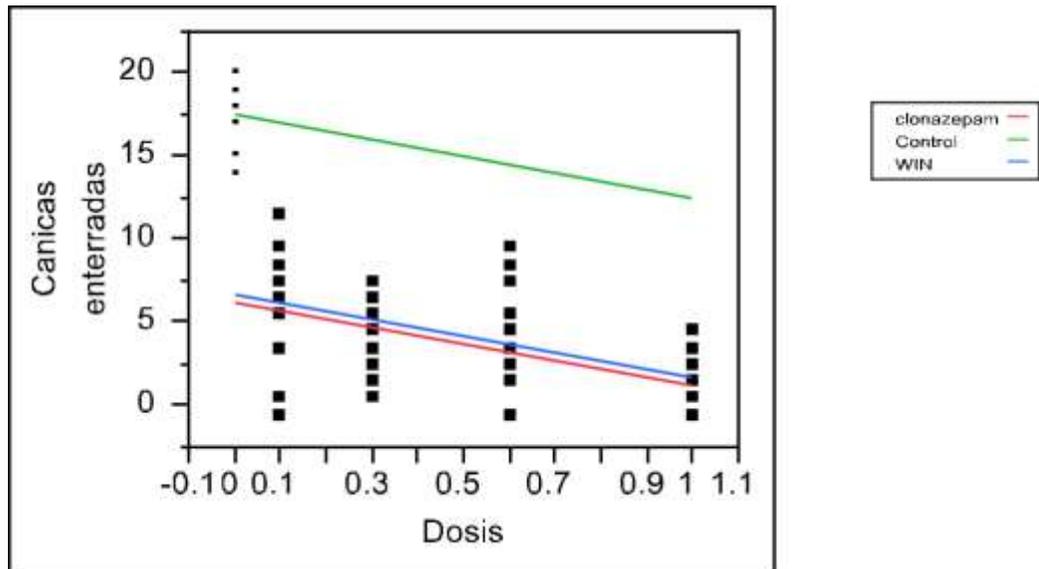
Gráfica 1. Prueba para evaluar la ansiedad de ratón CD1 administrando Clonazepam y WIN 55.212-2.

Análisis comparativo del comportamiento farmacológico de Clonazepam y WIN mostrando un porcentaje menor de canicas enterradas por parte de WIN en las concentraciones de 0.1 y 0.3 mg/Kg.

Grupo			Media
Control	A		17.5
C 0.1		B	6
W 0.1		B	5.75
C 0.3		B C	4.875
W 0.3		B C	4.625
W 0.6		B C	3.875
C 0.6		B C	3.75
W 1		B C	2.375
C1		C	0

Llevando a cabo la comparación entre grupos y tomando en cuenta media que corresponde a las canicas que fueron enterradas podemos observar que existe una

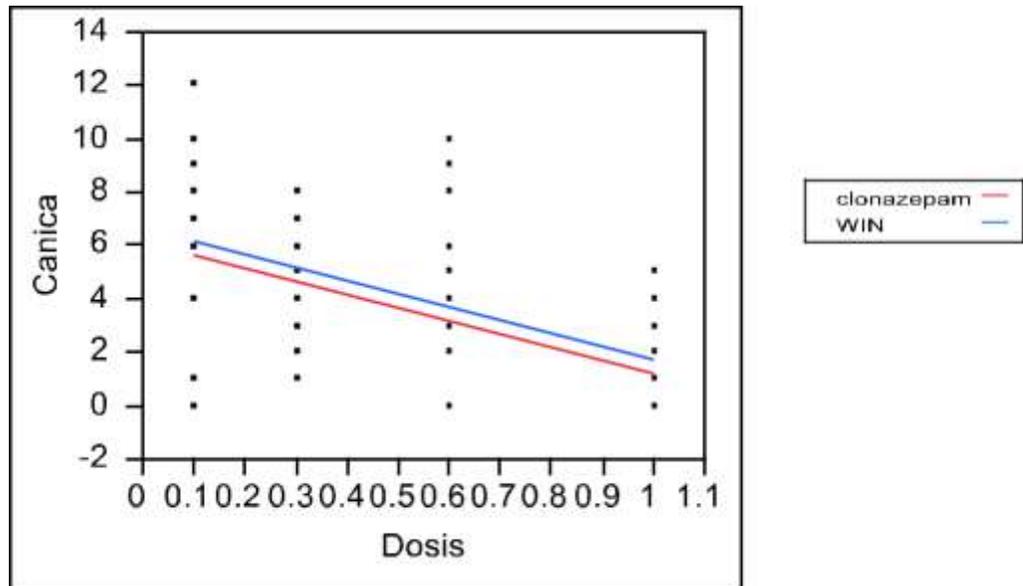
diferencia entre el grupo Clonazepam 1mg/Kg y el control, Clonazepam 0.1 mg/Kg y WIN 0.1 mg/Kg. Mientras que en el resto de los grupos podemos decir que son similares de acuerdo con su nivel de ansiedad en el entierro de las canicas.



Gráfica 3. Regresión lineal de todos los grupos.

Se realizó un ANOVA para hacer la comparación de los 3 grupos. La cual nos arrojó un valor de  $Prof >F <0001^*$  lo cual nos indica que realmente existe una diferencia estadísticamente significativa. Como se puede observar en la Grafica 3. Es notable la diferencia entre el control y nuestros dos tratamientos. (Clonazepam y WIN 55.212-2)

Posteriormente se realizó el análisis entre los dos tratamientos para comprobar o descartar si entre ellos existe una diferencia significativa.



Gráfica 4. Regresión de los dos tratamientos.

Con un valor de Prob >F 0.003\* podemos decir que no existe diferencia significativa entre ambos tratamientos.

## 5. DISCUSIÓN

El presente artículo ha demostrado que el WIN 55.212-2 posee efecto ansiolítico observado en un modelo de la evaluación del trastorno de ansiedad similar al del medicamento tradicional Clonazepam.

Las emociones negativas, como la ansiedad y el miedo, alertan al organismo de estímulos potencialmente peligrosos o dañinos y, por lo tanto, pueden promover la supervivencia. Sin embargo, cuando las respuestas de ansiedad y miedo son desproporcionadas en intensidad, crónicas, irreversibles y / o no están asociadas con ningún riesgo real, pueden afectar las funciones físicas y psicológicas. Tales reacciones exageradas pueden ser sintomáticas de trastornos neuropsiquiátricos

relacionados con la ansiedad, como ansiedad generalizada, fobia y trastorno de estrés postraumático (Graham et al., 2011). Debido a que no todos los pacientes responden a las opciones de tratamiento farmacoterapéutico disponibles actualmente la búsqueda de nuevos enfoques terapéuticos merece alta prioridad.

Se ha acumulado evidencia de la participación del sistema endocannabinoide (ECS) en la ansiedad y el miedo, lo que proporciona pistas para nuevos enfoques terapéuticos. En la ansiedad, se ha informado una influencia bidireccional del ECS, por lo que se han obtenido respuestas ansiolíticas y ansiogénicas después de aumentos y disminuciones del tono endocannabinoide.

Además, Bambico et al. (2007) informaron respuestas antidepresivas después del tratamiento con el agonista del receptor CB1 WIN55,212-2 comparables a las producidas por el citalopram antidepresivo inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina (ISRS) utilizado clínicamente. Lo cual confirma en el presente trabajo que a las dosis de 0.1 mg/Kg y 0.3 mg/Kg el efecto ansiolítico fue mayor en comparación al Clonazepam.

También comenta que mientras a dosis bajas de cannabinoides los agonistas suelen tener un efecto ansiolítico, las dosis altas puede ser ansiogénico. Lisboa y col. Encontraron el efecto ansiolítico después de la administración intraperitoneal del CB1 agonista WIN55, 212-2 en un modelo en ratones, y Alteba et al. en un modelo de estrés en la vida temprana. Dosis bajas de WIN55, 212-2 potenciaron la actividad neuronal en el núcleo rafe dorsal en el tronco encefálico y el efecto antidepresivo establecido se asoció con la activación del sistema endocannabinoide en la corteza prefrontal.

## 6. CONCLUSIÓN

Se busca una alternativa farmacológica a los ansiolíticos diferente al uso tradicional de benzodiazepinas como es el caso del Clonazepam proponiendo así el cannabinoide sintético WIN 55.212-2 el cual durante el presente trabajo presentó un comportamiento similar al Clonazepam destacando que en las dosis más bajas presentó un mayor efecto ansiolítico. Por lo cual se propone para futuras investigaciones que lleven a cabo un análisis más detallado y completo.

### Referencias

Alteba S, Korem N, Akirav I. Cannabinoids reverse the effects of early stress on neurocognitive performance in adulthood. *Learn Mem.* 2016 Jun 17;23(7):349-58

Anxiety disorders and GABA neurotransmission: a disturbance of modulation  
Philippe Nuss *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2015; 11: 165–175.

Bailey KR, Crawley JN. Anxiety-Related Behaviors in Mice. In: Buccafusco JJ, editor. *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience.* 2nd edition. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2009.

Bambico, FR, Katz, N, Debonnel, G, Gobbi, G (2007) Cannabinoids elicit antidepressant-like behavior and activate serotonergic neurons through the medial prefrontal cortex. *J Neurosci* 27: 11700–11711.

Barros M., Totnaz C. Non-human primate models for investigating fear and anxiety. *Neurosci Biobehav Rev.* 2002;26:187–201.

DeVane CL, Ware MR, Lydiard RB: Pharmacokinetics, pharmacodynamics, and treatment issues of benzodiazepines: alprazolam, adinazolam, and clonazepam. *Psychopharmacol Bull.* 2007;27(4):463-73.

Dokkedal-Silva V<sup>1</sup>, Berro LF, Galduróz JCF, Tufik S, Andersen ML. **Clonazepam: Indications, Side Effects, and Potential for Nonmedical Use.** *Harv Rev Psychiatry.* 2019 Sep/Oct;27(5):279-289. doi: 10.1097/HRP

Graham, BM, Langton, JM, Richardson, R (2011) Pharmacological enhancement of fear reduction: preclinical models. *Br J Pharmacol* 164: 1230–1247.

Guindon, J, Hohmann, AG (2009) The endocannabinoid system and pain. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 8: 403–421.

Haj-Mirzaian A, Amini-Khoei H, Haj-Mirzaian A, Amiri S, Ghesmati, Zahir M, et al. Activation of cannabinoid receptors elicits antidepressant like effects in a mouse model of social isolation stress. *Brain Res Bull.* 2017 Apr;130:200-210.

Haller, J, Varga, B, Ledent, C, Barna, I, Freund, TF (2004a) Context-dependent effects of CB1 cannabinoid gene disruption on anxiety-like and social behaviour in mice. *Eur J Neurosci* 19: 1906–1912

Hodgson, R.A., et al., Comparison of the V1b antagonist, SSR149415, and the CRF1 antagonist, CP-154,526, in rodent models of anxiety and depression. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 2007. 86(3):431

Jenner P, Pratt JA, Marsden CD: Mechanism of action of clonazepam in myoclonus in relation to effects on GABA and 5-HT. *Adv Neurol.* 2006;43:629-43.

Lisboa SF, Niraula A, Resstel LB, Guimaraes FS, Godbout JP, Sheridan JF. Repeated social defeat-induced neuroinflammation, anxiety-like behavior and resistance to fear extinction were attenuated by the cannabinoid receptor agonist WIN55,212-2. *Neuropsychopharmacology.* 2018 Aug;43(9):1924-1933.

LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury [Internet]. Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases; 2012- 2017 Jan 24

Magdalena Florek-Luszczki, Aleksandra Wlaz, Maria W. Kondrat-Wrobel, Piotr Tutka, Jarogniew J. Luszczki Effects of WIN 55,212-2 (a non-selective cannabinoid CB1 and CB2 receptor agonist) on the protective action of various classical antiepileptic drugs in the mouse 6 Hz psychomotor seizure model *Journal of Neural Transmission*, 2014, Volume 121, Number 7, Page 707 National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=2802, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2802> (accessed Oct. 15, 2018).

Nardi AE, Machado S, Almada LF, Paes F, Silva AC, Marques RJ, Amrein R, Freire RC, Martin-Santos R, Cosci F, Hallak JE, Crippa JA, Arias-Carrion O: Clonazepam for the treatment of panic disorder. *Curr Drug Targets*. 2013 Mar;14(3):353-64.

National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=5311501, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5311501> (accessed Oct. 17, 2018).

Rejón-Orantes J., Placer Perdomo D., Roldán G., Pruebas no condicionadas en ratones para evaluar la actividad. *Univ. Méd. Bogotá (Colombia)*, 52 (1): 78-89, enero-marzo, 2011

Saadat, K.S., et al., The acute and long-term neurotoxic effects of MDMA on marble burying behaviour in mice. *J Psychopharmacol*, 2006. 20(2): p. 264- 71.-440

Stein DJ., Nesse RM. Threat detection, precautionary responses, and anxiety disorders. *Neurosci Biobehav Rev*. 2011;35:1075–1079.

Zou S, Kumar U. Cannabinoid Receptors and the Endocannabinoid System: Signaling and Function in the Central Nervous System. *Int J Mol Sci*. 2018 Mar 13;19(3), 833

Zuardi AW. History of cannabis as a medicine: a review. *Rev Bras Psiquiatr*. 2006 Jun;28(2):153-7.