

Universidade Federal de Minas Gerais
Programa de pós-graduação em Neurociências

Papel do sistema endocanabinoide em modelos animais de ataque de pânico

Aluna: Luara Augusta da Costa e Silva
Braga Batista

Orientador: Fabrício de Araújo Moreira

Co-orientadora: Andréa Siqueira
Haibara

Tese apresentada ao programa de pós-graduação em Neurociências como requisito parcial para obtenção do título de doutor

Belo Horizonte

2017

043 Batista, Luara Augusta da Costa e Silva Braga.
Papel do sistema endocanabinoide em modelos animais de ataque de pânico
[manuscrito] / Luara Augusta da Costa e Silva Braga Batista. - 2017.

109 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Fabrício de Araújo Moreira. Co-orientadora: Andréa Siqueira Haibara.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Neurociências - Teses. 2. Transtorno de Pânico. 3. Endocanabinoides. 4. Canabinóides - Teses. I. Moreira, Fabrício de Araújo. II. Haibara, Andréa Siqueira. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 612.8

Ficha elaborada pela Biblioteca do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG

Agradecimentos

Este trabalho foi realizado sob a orientação do professor Dr. Fabrício Moreira e co-orientado pela professora Andréa Haibara. Agradeço ao Fabrício pelos ensinamentos, por me guiar nessa difícil trajetória do doutorado e por me inspirar a ser uma neurocientista. Agradeço também à Andréa pela paciência, ensinamentos e disponibilidade em me ajudar com várias técnicas e protocolos utilizados neste trabalho.

Devo agradecimentos também à minha família. Meus pais e irmãos sempre me apoiaram e me incentivaram na minha decisão de seguir a carreira acadêmica. Muito obrigada a eles.

Os membros do LNP foram muito importantes para a realização deste trabalho. Em especial agradeço à Jadna e a Rayssa pela colaboração em alguns experimentos. Essa colaboração foi essencial! Em relação aos outros membros do lab, agradeço pela paciência, discussões científicas, companheirismo e companhia nos *happy-hours*. Obrigada à Júlia, Juliana, Daniele, Jivago, Rafael, Rafaela, Nícia, Felipe, Jadna, Flávio e Anna Paula.

Obrigada aos professores de Ribeirão Preto que nos doaram drogas e materiais. Aos técnicos do ICB, Rinaldo, Welington e Jorge.

Finalmente, um obrigada ao Cabral, ao Henrique Baião e aos amigos da biologia que tornam as frivolidades da vida algo da mais suma importância, mudando a todo instante nossas perspectivas de como ver e ser neste mundo.

Agradeço à CAPES, à FAPEMIG e ao CNPq pelo apoio financeiro.

“O mundo é minha representação.”

Arthur Schopenhauer

Resumo

O transtorno do pânico tem como principal característica a ocorrência de ataques de pânico. O tratamento farmacológico é feito com antidepressivos e benzodiazepínicos. O sistema endocanabinoide é um sistema de neurotransmissão envolvido na modulação de respostas aversivas. Portanto, no presente trabalho testou-se a hipótese de que este sistema inibe comportamentos tipo-pânico em animais experimentais. Na primeira parte, foi investigado o envolvimento do receptor canabinoide CB₁ nos efeitos anti-aversivos induzidos pela injeção sistêmica do benzodiazepínico alprazolam ou do agonista para receptor 5-HT_{1A} (8-OH-DPAT) na substância cinzenta periaquedutal dorsolateral (SCPdl). Em seguida, testou-se se a facilitação da sinalização endocanabinoide induz efeito panicolítico no modelo da fuga induzida por cianeto de potássio (KCN). Por fim, foi validado o modelo de pânico induzido pelo doxapram, para o estudo dos efeitos dos canabinoides. Observamos que o antagonismo de receptor CB₁ inibe os efeitos do alprazolam e do 8-OH-DPAT. No modelo do KCN, nenhum dos canabinoides induziu efeito anti-aversivo, embora o alprazolam tenha sido eficaz. Por fim, foi demonstrado que o doxapram induz efeito ansiogênico no labirinto em T elevado e ativação celular da porção ventrolateral da SCP. Também neste modelo, os canabinoides não foram eficazes. Pode-se concluir que o sistema endocanabinoide está envolvido no mecanismo de ação de drogas panicolíticas, mas não na indução de comportamentos tipo-pânico induzidos por KCN ou doxapram. Além disso, este trabalho sugere a hiperventilação induzida pelo doxapram como um modelo animal para o estudo de ataques de pânico.

Abstract

The main feature of panic disorder is the occurrence of panic attacks. Pharmacological treatment is made with antidepressants and benzodiazepines. The endocannabinoid system is a neurotransmitter system involved in the modulation of aversive responses. Therefore, in the present study we tested the hypothesis that this system inhibits panic-like behaviors in experimental animals. In the first part, we investigated the involvement of cannabinoid receptor 1 (CB1) in the antiaversive effects induced by systemic injection of alprazolam or injection of the 5-HT_{1A} agonist, 8-OH-DPAT, in the dorsolateral periaqueductal gray (dIPAG). In addition, we tested if increasing endocannabinoid signaling induces panicolytic effects in the escape induced by KCN. We observed that CB1 antagonism prevented the effects of alprazolam and 8-OH-DPAT. None of the drugs tested was efficacious in the escape reaction induced by KCN, however, alprazolam presented a panicolytic effect. In the last part, we showed that doxapram induces anxiogenic effects in the elevated T maze and cellular activation of the ventrolateral portion of the PAG. It can be concluded that the endocannabinoid system is involved in the mechanism of action of panicolytic drugs, but not in the induction of panic-like behaviors induced by KCN or doxapram. Moreover, this study suggests the utilization of the hyperventilation induced by doxapram as an animal model of panic attack.

Sumário

1. Introdução	10
1.1 Transtorno do pânico: aspectos históricos e clínicos	11
1.2 Teoria serotoninérgica do transtorno do pânico e labirinto em T elevado	13
1.3 Teoria do alarme falso de sufocação	17
1.4 Doxapram, um agente panicogênico em humanos	19
1.5 O papel do sistema endocanabinoide no transtorno do pânico	21
2. Objetivo geral	26
2.1 Objetivos específicos	26
3. Descrição dos experimentos	28
3.1 Parte 1: envolvimento do receptor CB ₁ nos efeitos anti-aversivos do alprazolam e de um agonista 5-HT _{1A}	28
3.2 Parte 2: efeitos de canabinoides na resposta de fuga induzida por KCN	28
3.3 Parte 3: caracterização do doxapram em respostas ventilatórias e comportamentais e efeitos de canabinoides	28
4. Material e métodos	31
4.1 Animais	31
4.2 Drogas	31
4.3 Cirurgia esterotáxica	32
4.4 Aparelhos experimentais.....	33
4.4.1 Labirinto em T elevado	33
4.4.2 Caixa de observação	33
4.4.3 Aversão condicionada ao lugar	34
4.5 Injeção	37
4.6 Verificação dos sítios de injeção	37
4.7 Implantação de cânula arterial e venosa	37
4.8 Injeção de KCN e registro dos parâmetros cardiovasculares e comportamentais	38
4.9 Campo aberto	38
4.10 Injeção de doxapram e registro da ventilação	39
4.11 Imunoistoquímica para c-Fos	39
4.12 Análise estatística	40
4.12.1 Parte 1: envolvimento do receptor CB ₁ nos efeitos anti-aversivos do alprazolam e de um agonista 5-HT _{1A}	40

4.12.2 Parte 2: canabinoides e KCN.....	41
4.12.3 Parte 3: caracterização dos efeitos do doxapram em respostas ventilatórias e comportamentais e efeito de canabinoides	41
5. Delineamento experimental	43
5.1 Parte 1: envolvimento do receptor CB ₁ nos efeitos anti-aversivos do alprazolam e de um agonista 5-HT _{1A}	43
5.2 Parte 2: KCN e canabinoides	44
5.3 Parte 3: caracterização dos efeitos do doxapram em respostas ventilatórias e comportamentais e efeito de canabinoides	45
6. Resultados	46
6.1 Parte 1: envolvimento do receptor CB ₁ nos efeitos anti-aversivos do alprazolam e de um agonista 5-HT _{1A}	46
6.1.1 Efeito do pré-tratamento com AM251 nos efeitos anti-aversivos do alprazolam	46
6.1.2 Efeito do pré-tratamento com AM251 nos efeitos anti-aversivos do 8-OH-DPAT	46
6.1.3 Curva dose-resposta do 8-OH-DPAT(8 e 16 nmol/0,2 µL)	47
6.1.4 Efeito do pré-tratamento com AM251 no efeito panicolítico do 8-OH-DPAT	47
6.2 Parte 2: efeitos de canabinoides na resposta de fuga induzida por KCN	52
6.2.1 Curva dose-resposta do KCN (20, 40 e 80 µg/kg)	51
6.2.2 Efeito do alprazolam na fuga induzida por KCN e nos parâmetros cardiovasculares.....	51
6.2.3 Efeito do URB597 (0,1; 0,3 e 1 mg/kg) na fuga induzida por KCN	57
6.2.4 Efeito da AA-5-HT (1; 2,5 e 5 mg/kg) na fuga induzida por KCN...57	
6.2.5 Efeito do WIN55,212-2 (0,1; 0,3 e 1 mg/kg) na fuga induzida por KCN.....	57
6.2.6 Efeito do CBD (5; 10; 20 e 40 mg/kg) na fuga induzida por KCN ..57	
6.2.7 Fuga induzida por 80 e 160 µg/0,1mL de KCN	60
6.3 Parte 3: caracterização do doxapram em respostas ventilatórias e comportamentais e efeitos de canabinoides	62
6.3.1 Efeito do doxapram na frequência respiratória.....	62

6.3.2 Efeito do doxapram na pressão arterial média e frequência respiratória.....	62
6.3.3 Efeito do alprazolam na hiperventilação induzida pelo doxapram .	62
6.3.4 Efeito do URB597 na hiperventilação induzida pelo doxapram	62
6.3.5 Efeito do doxapram na aversão condicionada ao lugar.....	62
6.3.6 Efeito do doxapram no modelo do LTE	62
6.3.7 Efeito do doxapram na locomoção basal	62
6.3.8 Efeito do doxapram na expressão da proteína c-Fos na SCP	62
7. Discussão	72
7.1 Envolvimento do receptor CB ₁ nos efeitos anti-aversivos do alprazolam e de um agonista 5-HT _{1A}	73
7.2 Efeitos de canabinoides na resposta de fuga induzida por KCN	77
7.3 Caracterização do doxapram em respostas ventilatórias e comportamentais e efeitos de canabinoides	80
8. Conclusões.....	86
9. Referências.....	89

Introdução

1. Introdução

1.1 Transtorno do pânico: aspectos históricos e clínicos

A palavra *pânico* origina-se do nome Pan, uma entidade da mitologia grega que vivia nas florestas assustando os viajantes devido à sua aparição súbita e aspecto monstruoso. Na era clássica, portanto, já havia relatos, expressados sob a forma da metáfora do mito de Pan, sobre uma sensação de terror súbita vivida por viajantes. Na era moderna, diversos psiquiatras observaram e descreveram manifestações de ansiedade aguda, angústia, terror e “medo de sentir medo” (revisado por Nardi e Freire, 2016). Diversas teorias foram elaboradas para explicar esses sintomas. Entretanto, elas possuíam um caráter mais filosófico do que empírico.

Na segunda metade do século XX, houve uma revolução na psiquiatria. Diversas drogas se mostraram eficazes em aliviar sintomas psiquiátricos e, com isso, foi possível teorizar sobre causas biológicas e neuroquímicas para os transtornos psiquiátricos (Lopez-Munoz *et al.*, 2012). A imipramina, um antidepressivo tricíclico, passou a ser utilizada para tratar sintomas depressivos, enquanto os benzodiazepínicos eram utilizados para tratar a ansiedade (Lopez-Munoz e Alamo, 2009; Lopez-Munoz *et al.*, 2011). No ano de 1964, o psiquiatra norte-americano Donald Klein publicou um artigo no qual ele relata que diversos pacientes que apresentavam o que ele chamou de “ataques de pânico” melhoravam com o tratamento crônico com a imipramina, mas não com os sedativos (Klein, 1964). De acordo com Klein, os pacientes apresentavam além do ataque de pânico, sintomas como ondas de calor e frio, respiração acelerada, palpitações, fraqueza e sensação de morte iminente (Klein e Fink, 1962; Klein, 1964).

Os estudos de Klein influenciaram a terceira edição do Manual de Estatística e Diagnóstico para Transtornos Mentais (DSM- III). Nesta edição, foi feita a distinção entre transtorno do pânico e transtorno da ansiedade generalizada. O primeiro, sensível à imipramina e o segundo, sensível aos

benzodiazepínicos. De acordo com aquela edição, o transtorno do pânico caracteriza-se pela presença de ataques de pânico recorrentes, os quais se caracterizam por sintomas somáticos, como palpitações, dores no peito, sudorese, e sintomas cognitivos, como medo de morrer, desconforto e "medo de ficar louco". O transtorno do pânico pode vir acompanhado de uma aversão a espaços públicos chamada de agorafobia. O transtorno da ansiedade generalizada, por sua vez, caracteriza-se pela presença de ansiedade crônica sem causa aparente (DSM-III). Atualmente, a quinta edição do DSM considera a agorafobia uma condição que pode se manifestar na presença ou na ausência de ataques de pânico, sendo, então, uma categoria distinta de transtorno. Além disso, o ataque de pânico passou a ser um fator de prognóstico para todos os transtornos mentais ((Asmundson *et al.*, 2014)DSM-V). Assim, o seu tratamento pode melhorar o prognóstico de diversas condições psiquiátricas

Atualmente, os medicamentos mais utilizados para o tratamento do transtorno do pânico são os antidepressivos inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS) e os benzodiazepínicos de alta potência, como o alprazolam e o clonazepam (Bandelow *et al.*, 2008; Baldwin *et al.*, 2014). Alguns dos efeitos adversos provocados pelo uso prolongado de antidepressivos são ganho de peso, sonolência, disfunção sexual e déficits na memória e concentração (Nardi *et al.*, 2011; Nardi *et al.*, 2012). Já para o alprazolam e o clonazepam, os efeitos adversos mais comuns são sonolência e déficits na memória e concentração (Nardi *et al.*, 2012). A eficácia dos ISRS indica que o sistema serotoninérgico está envolvido na etiologia ou patofisiologia do transtorno. Essa observação levou ao desenvolvimento da teoria serotoninérgica do transtorno do pânico (Deakin e Graeff, 1991; Graeff *et al.*, 1996).

Outra teoria proposta para explicar a etiologia do transtorno é a teoria do alarme falso de sufocação (AFS) (Klein, 1993). Ela propõe a existência de um sistema de detecção de sufocação que seria erroneamente ativado levando ao ataque de pânico (Klein, 1993). A teoria serotoninérgica e a teoria do AFS permitem a elaboração de hipóteses sobre os mecanismos envolvidos nas

causas do ataque de pânico, possibilitando o desenvolvimento de estratégias alternativas para o tratamento do transtorno.

1.2 Teoria serotoninérgica do TP e labirinto em T elevado

A ansiedade é uma emoção natural do ser humano, que o prepara para situações de risco, conflitos e desafios. Presente também em outros animais, como roedores e aves, a ansiedade pode se manifestar em situações de conflito através de comportamentos específicos de cada espécie (Blanchard *et al.*, 1990). O pombo, por exemplo, pode ser treinado a evitar a realizar um dado comportamento devido à apresentação contingencial de uma punição (choque) (Graeff e Schoenfeld, 1970). Dessa maneira, é colocada uma situação de conflito ao animal entre realizar o comportamento ou evitá-lo, devido ao choque. Estudos utilizando esse modelo experimental demonstraram que o bloqueio de receptores serotoninérgicos aumenta a frequência do comportamento punido, ou seja, induz um efeito ansiolítico (Graeff e Schoenfeld, 1970). Posteriormente, foi demonstrado que a depleção de fibras serotoninérgicas que projetam para o prosencéfalo também induz um aumento da frequência do comportamento punido, corroborando o efeito ansiolítico (Tye *et al.*, 1977). A hipótese formulada, portanto, foi a de que a serotonina liberada em regiões prosencefálicas apresenta um efeito ansiogênico (revisado em Graeff *et al.*, 2002)

Contraopondo tais observações, foi demonstrado que a serotonina exerce função oposta, antiaversiva, em uma estrutura mesencefálica, a substância cinzenta periaquedutal (SCP). Fibras serotoninérgicas oriundas do núcleo dorsal da rafe (NDR) projetam para a SCP. A estimulação elétrica da porção dorsal SCP (SCPd) induz aumento da atividade locomotora, exoftalmia, hiperventilação, aumento da resposta pressora e bradicardia (Graeff *et al.*, 1986). Tais respostas são aversivas, pois os ratos aprendem a evitá-la realizando comportamentos operantes, como pressionar uma barra (Kiser *et al.*, 1978; Kiser *et al.*, 1980; Jenck *et al.*, 1995). Utilizando-se a estimulação da SCPd como punição, foi demonstrado que a facilitação local dos efeitos da serotonina apresentava um efeito anti-aversivo. Ou seja, era necessário uma

corrente de maior intensidade para provocar o comportamento de pressionar a barra (Kiser *et al.*, 1978; Kiser *et al.*, 1980). Foi desenvolvida a hipótese então, de que a serotonina ao atuar no prosencéfalo teria um efeito ansiogênico, já ao atuar na SCPd, teria um efeito anti-aversivo.

Estes comportamentos foram, posteriormente, considerados correlatos de ataques de pânico (Graeff, 2004). Dentre outros, contribuíram para esta visão os pesquisadores Caroline Blanchard e Robert Blanchard que realizaram estudos sobre comportamentos defensivos em ratos (Blanchard e Blanchard, 1989b; 2003; Graeff, 2004). Os comportamentos defensivos constituem um repertório de respostas que o animal pode apresentar diante de uma ameaça, como um predador. São elas a avaliação de risco, a esquiva, o congelamento, a fuga e o ataque (Blanchard e Blanchard, 1989a). Dependendo da distância que o roedor encontra-se do predador, ele irá apresentar um ou outro comportamento. Por exemplo, com o predador a uma longa distância, a probabilidade maior é a de que o roedor apresente um comportamento de avaliação de risco e esquiva, já quando o predador encontra-se próximo do roedor e há uma rota de fuga, ele irá fugir. Caso não haja rota de fuga, o roedor irá atacar (Blanchard e Blanchard, 1989a; Blanchard *et al.*, 1990).

Em relação aos substratos neurais de cada comportamento, hipotetiza-se que o sistema septo-hipocampal e a amígdala seriam estruturas recrutadas durante os comportamentos de avaliação de risco e esquiva. Já os comportamentos de fuga e congelamento seriam mediados pela SCP (Mcnaughton e Corr, 2004). Tais estruturas comporiam o sistema neural de defesa (Gross e Canteras, 2012). De fato, em seres humanos, a estimulação da amígdala ou da SCPd provocam sensações de medo, ansiedade, terror e manifestações autonômicas simpáticas (Nashold *et al.*, 1969a; b; Davis e Whalen, 2001; Lanteaume *et al.*, 2007). As respostas mediadas pela SCP em humanos são similares aos sintomas do ataque de pânico. Dessa forma, baseado no sistema neural de defesa e no papel dessas estruturas em humanos, é possível associar os comportamentos defensivos a determinados transtornos da ansiedade (Blanchard *et al.*, 1990; Graeff e Del-Ben, 2008; Del-Ben e Graeff, 2009; Canteras e Graeff, 2014). A avaliação de risco e a esquiva estariam relacionadas à ansiedade, correlacionando-se, então, com o TAG,

enquanto a fuga induzida por estimulação da SCP e o congelamento estariam relacionados ao ataque de pânico, correlacionando-se com o TP (Graeff *et al.*, 1998; Schenberg *et al.*, 2001). De acordo com a teoria serotoninérgica, portanto, foi proposto que em modelos animais envolvendo a esquiva, a serotonina atuaria no prosencéfalo, apresentando um efeito ansiogênico, já em modelos envolvendo a fuga, a serotonina atuaria no mesencéfalo apresentando um efeito panicolítico (figura X) (Deakin e Graeff, 1991).

De forma a se testar essa hipótese, foi desenvolvido o labirinto em T elevado (LTE), um modelo animal capaz de medir a esquiva (ansiedade) e a fuga (pânico) no mesmo animal (Graeff *et al.*, 1998; Zangrossi e Graeff, 2014). O LTE foi baseado no labirinto em cruz elevado, entretanto, ele apresenta dois braços abertos e um fechado. As medidas realizadas no aparelho são a esquiva inibitória no braço fechado e a fuga do braço aberto. Para a esquiva inibitória, o animal é colocado no braço fechado e mede-se a latência para atingir o centro do labirinto, onde não há paredes. A exposição é repetida três vezes e há um aumento progressivo da latência indicando que o animal aprendeu que no centro do labirinto há um espaço aberto e, portanto, aprendeu a evitá-lo. A fuga é medida a partir da exposição do animal ao braço aberto por três vezes consecutivas. Foi demonstrado que o comportamento de fugir do braço aberto não sofre habituação e não há aprendizado (Teixeira *et al.*, 2000).

De acordo com a validação farmacológica do modelo, drogas que são utilizadas na clínica para o tratamento do TAG, como o diazepam, e alguns antidepressivos administrados cronicamente, são eficazes em reduzir a latência da esquiva inibitória, sugerindo um efeito ansiolítico. Já o alprazolam administrado de forma aguda e todos os antidepressivos administrados de forma crônica testados até então são eficazes em aumentar a latência da fuga, sugerindo um efeito panicolítico (ver tabelas em Zangrossi & Graeff, 2014). O efeito panicolítico da fluoxetina parece depender da ativação de receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT_{1A} na SCPdl (SCPd) (Zanoveli *et al.*, 2010).

Outro modelo que permite avaliar comportamentos do tipo-pânico é a fuga induzida por estimulação elétrica da SCPdl (Jenck *et al.*, 1995; Schenberg *et al.*, 2001; Schenberg *et al.*, 2014). A validação farmacológica desse modelo

mostra que a clomipramina e a fluoxetina administradas de forma aguda ou crônica e benzodiazepínicos de alta potência aumentam o limiar de corrente necessária para induzir a fuga (Jenck *et al.*, 1995; Vargas e Schenberg, 2001; Schenberg *et al.*, 2002). Uma desvantagem para o uso desse modelo é que a estimulação elétrica da região leva à ativação indiscriminada de corpos celulares e fibras de passagem. Dessa forma, a estimulação química da SCPdl por meio de agonistas excitatórios permite o estudo de populações de neurônios específicas (Aguiar *et al.*, 2006; Moreira *et al.*, 2013). Em relação à validação farmacológica, foi demonstrado que a ativação de receptores de serotonina do tipo 1A (5-HT_{1A}) na SCPdl atenua a resposta de fuga, enquanto o tratamento crônico com a imipramina não altera essa resposta. Contudo, com o tratamento combinado de um agonista para receptores 5-HT_{1A} e a imipramina, houve atenuação da fuga (Beckett e Marsden, 1997; Mongeau e Marsden, 1997). Assim, o comportamento de fuga do LTE, a fuga por estimulação química da SCPdl e a fuga por estimulação elétrica da SCPd respondem de maneira diferente a tratamentos que interferem no sistema serotoninérgico, o que indica que esses comportamentos apresentam mecanismos distintos.

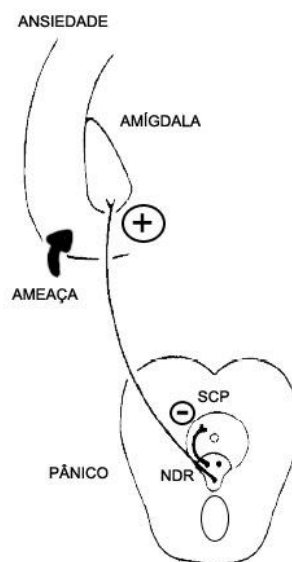


Fig 1. Representação esquemática mostrando neurônios serotoninérgicos oriundos do núcleo dorsal da rafe (NDR) atuando na SCP, inibindo o pânico, ou na amígdala, facilitando a ansiedade. Modificado de (Graeff *et al.*, 1996).

1.3 Teoria do alarme falso de sufocação

O ataque de pânico pode ser induzido em indivíduos que apresentam o transtorno por meio da exposição a certas substâncias, chamadas portanto de panicogênicas, como o CO₂, o doxapram, o lactato, o isoproterenol, a colecistocinina, a cafeína, entre outros (Fyer *et al.*, 1987; Balon *et al.*, 1988; Hollander *et al.*, 1989; Zwanzger *et al.*, 2003; Nardi *et al.*, 2008). A inalação de uma mistura de gás com alta concentração de CO₂ (hipercápnica) é o método mais utilizado para se estudar o ataque de pânico em humanos (Amaral *et al.*, 2013). Indivíduos que apresentam o transtorno e são expostos ao protocolo de inalação reportam sintomas como medo de morrer, dor no peito, respiração curta, parestesia, sensação de sufocação e vertigem, similar ao que é relatado durante um ataque de pânico espontâneo (Nardi *et al.*, 2006) (nardi et al, 2006 – psychopathological profile). A observação de que a hipercapnia induz ataques de pânico levou ao desenvolvimento da hipótese de que indivíduos diagnosticados com o transtorno são hipersensíveis a alterações da pressão parcial de CO₂ e ao pH do sangue (Papp *et al.*, 1989; Vollmer *et al.*, 2015).

Outra teoria proposta baseada nessa observação é a teoria do alarme falso de sufocação (AFS), de acordo com essa teoria, indivíduos diagnosticados com o TP apresentariam um alarme para detecção de sufocação que seria erroneamente ativado, causando os sintomas do ataque (Klein, 1993; 1994). Uma situação real de eminência de sufocação em um indivíduo não diagnosticado com o transtorno levaria a comportamentos de luta ou fuga, medo e reações autonômicas.

Outras evidências para a teoria do AFS são o fato de que o TP é mais prevalente em indivíduos asmáticos e com doença pulmonária obstrutiva crônica e fumar cigarro é um fator de risco para o desenvolvimento do transtorno (Klein, 1994; Hasler *et al.*, 2005; Willgoss e Yohannes, 2013). Os sintomas presentes na síndrome congênita de hipoventilação central sugerem a presença de um sistema central de detecção de sufocação (Klein, 1993). Essa síndrome caracteriza-se pela incapacidade de respirar durante o sono levando o indivíduo à hipoxia e possibilidade de morte. Esses indivíduos não

apresentam uma reação natural à hipóxia, como resposta de alerta e hiperventilação, sugerindo, então, que eles não apresentam um sistema de detecção de sufocação (Movahed *et al.*, 2005).

Em uma tentativa de se investigar estruturas cerebrais que comporiam o sistema de detecção de sufocação, a resposta comportamental do quimiorreflexo foi proposta como um modelo animal de ataque de pânico (Schimitel *et al.*, 2012). O quimiorreflexo constitui uma reação reflexa a uma situação de hipóxia (Costa *et al.*, 2014). Em roedores, a hipóxia pode ser induzida tanto por uma mistura de gás com baixa concentração de O₂ quanto pela injeção intravenosa de cianeto de potássio (KCN). O KCN gera uma hipóxia citotóxica cuja resposta reflexa é caracterizada por aumento da pressão arterial, hiperventilação, bradicardia e um breve aumento da atividade locomotora (Haibara *et al.*, 1999). A figura 2 mostra a anatomia do quimiorreflexo.

O aumento da atividade locomotora induzida pelo KCN é dependente do hipotálamo dorsomedial (HDM) e da porção dorsolateral da SCP (Schimitel *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2015). De forma similar à SCP, a estimulação do HDM provoca uma reação de fuga, além disso, essa estrutura é recrutada quando o roedor encontra-se diante de um predador (gato), sugerindo que essa estrutura também pode estar envolvida na gênese do ataque de pânico (Canteras, 2002; Freitas *et al.*, 2009; De Bortoli *et al.*, 2013). Devido ao fato do substrato neural da atividade locomotora induzida pelo KCN depender de estruturas do sistema neural de defesa, sugeriu-se que essa resposta representaria um comportamento defensivo de fuga (Schimitel *et al.*, 2012). De forma a se propor a resposta de fuga induzida por KCN como um modelo animal de ataque de pânico, foi feita uma validação farmacológica com o clonazepam administrado de forma aguda e a fluoxetina administrada cronicamente. Ambos os tratamentos reduziram a duração da fuga (Schimitel *et al.*, 2014). Isso indica que o modelo pode apresentar boa preditabilidade farmacológica para drogas panicolíticas. Como os efeitos do KCN dependem da SCPdl, essa estrutura foi proposta como parte do suposto sistema de detecção de sufocação. Tal proposição permite a convergência entre a teoria do sistema neural de defesa e

a teoria do alarme falso de sufocação (Schimitel *et al.*, 2012; Schenberg *et al.*, 2014).

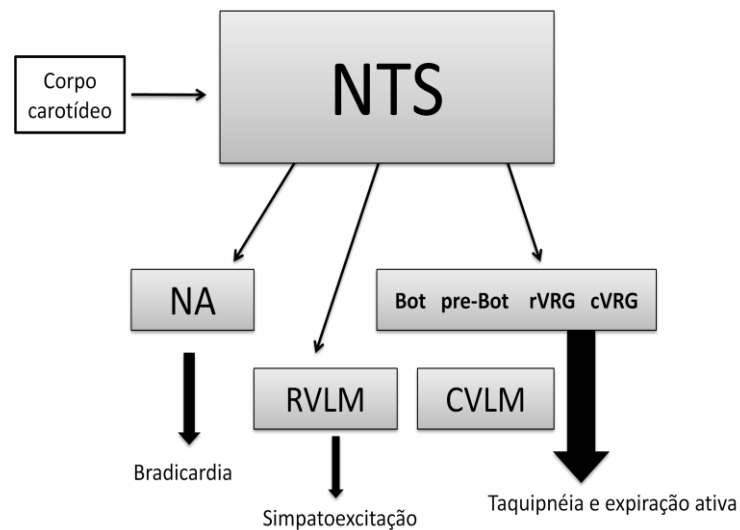


Fig. 2 Representação esquemática da anatomia do quimiorreflexo. Alterações na pressão parcial de O_2 ou pH do sangue ativam quimiorreceptores periféricos no corpo carotídeo que sinalizam ao núcleo do trato solitário (NTS). O NTS, por sua vez, envia projeções a diversas estruturas do bulbo, como o núcleo ambíguo (NA), área Bötzing, pre-Böt, grupamento respiratório ventral rostral e caudal (rVRG e cVRG), porção ventrolateral rostral do bulbo (RVLM) e porção ventrolateral caudal do bulbo (CVLM). Modificado de (Costa *et al.*, 2014)

1.4 Doxapram, um agente panicogênico em humanos

O ataque de pânico constitui um fenômeno complexo que envolve tanto sintomas cognitivos e comportamentais quanto respostas autonômicas, sintomas vestibulares, entre outros (revisado por Perna *et al.*, 2016). Diversos estudos enfatizam o papel das respostas fisiológicas na etiologia do transtorno (Perna *et al.*, 2004; Esquivel *et al.*, 2010). A hipersensibilidade ao CO_2 , as comorbidades com doenças pulmonares e cardíacas e os sintomas somáticos sugerem que alterações nos sistemas respiratório, cardíaco e de equilíbrio

estão envolvidas no desenvolvimento do transtorno (Perna *et al.*, 2001; Katerndahl, 2008; Amaral *et al.*, 2013).

A heterogeneidade de sintomas do ataque de pânico e a proeminência de sintomas respiratórios permitiram uma classificação entre transtorno do pânico do subtipo respiratório e não-respiratório (Briggs *et al.*, 1993). O subtipo respiratório caracteriza-se pela presença dos seguintes sintomas: medo de morrer, falta de ar, parestesias, dor ou desconforto no peito e sensação de sufocação. Já no subtipo não-respiratório, esses sintomas estão ausentes (Zugliani *et al.*, 2015). Alguns estudos, entretanto, não observaram essa distinção (revisado em Zugliani *et al.*, 2016). Apesar disso, é possível que alterações no sistema cardiorespiratório exerçam algum papel na etiologia ou no processo de desenvolvimento do transtorno, especialmente para o subtipo respiratório.

Além da hipercapnia, outra forma de se induzir um ataque de pânico em indivíduos diagnosticados com o transtorno é por meio da injeção intravenosa de doxapram (Lee *et al.*, 1993; Abelson, Weg, *et al.*, 1996; Gutman *et al.*, 2005). O doxapram é um estimulante respiratório (analéptico) utilizado em seres humanos e outros animais para recuperação do efeito de anestésicos no pós-operatório (Yost, 2006). Ele aumenta a frequência respiratória, o volume corrente e a ventilação minuto de indivíduos acordados (Burki, 1984; Martinez *et al.*, 2015). A terapia cognitivo comportamental é capaz de atenuar os efeitos panicogênicos desta substância (Abelson, Nesse, *et al.*, 1996).

O efeito panicogênico do doxapram constitui mais uma evidência para o envolvimento do sistema cardiorrespiratório na etiologia ou fisiopatologia do transtorno (Kinkead *et al.*, 2014). Investigações acerca do mecanismo de ação e da caracterização dos efeitos centrais do doxapram podem contribuir para um melhor entendimento do transtorno do pânico. Entretanto, poucos estudos em roedores foram realizados. Esses estudos mostram que o doxapram apresenta propriedades aversivas nos modelos de interação social, campo aberto e no medo condicionado em ratos (Sullivan, Gregory M. *et al.*, 2003). Além disso, a injeção de doxapram leva a um aumento da expressão da proteína c-Fos e do hormônio liberador de corticotrofina na amígdala central de ratos (Sullivan,

Gregory M. *et al.*, 2003; Choi *et al.*, 2005). A avaliação do efeito de drogas potencialmente panicolíticas nos efeitos provocados pelo doxapram pode ajudar a elucidar quais neurotransmissores estão envolvidos na gênese do ataque de pânico. Portanto, mais estudos em roedores são necessários para se investigar os mecanismos envolvidos nos efeitos do doxapram.

1.5 O papel do sistema endocanabinoide no transtorno do pânico

O sistema endocanabinoide é um sistema de neurotransmissão atípica (Alger e Kim, 2011). Ele é constituído por receptores canabinoides do tipo 1 e 2 (CB₁ e CB₂), pelos ligantes endógenos anandamida (AEA) e 2-araquidonoil glicerol (2-AG), pelas enzimas de síntese e degradação dos ligantes e pelo transportador de anandamida (Devane *et al.*, 1988; Devane *et al.*, 1992; Cravatt *et al.*, 1996; Dinh *et al.*, 2002; Howlett *et al.*, 2002; Gong *et al.*, 2006; Fowler, 2012). A AEA é um agonista parcial de receptores CB₁ e CB₂, enquanto o 2-AG é um agonista pleno desses receptores (Mackie *et al.*, 1993; Felder *et al.*, 1995; Reggio, 2010). Ambos os endocanabinoides são sintetizados em neurônios pós-sinápticos e, ao serem liberados, ligam-se aos receptores canabinoides em neurônios pré-sinápticos, sendo, então, uma neurotransmissão retrógrada (Katona *et al.*, 1999; Katona e Freund, 2012). Esses receptores são acoplados à proteína Gi, sendo que a ativação do receptor CB₁ está associada a uma redução na liberação de neurotransmissor pelo neurônio pré-sináptico (Hoffman e Lupica, 2000). A AEA pode ser degradada pela enzima hidrolase amida de ácidos graxos (FAAH), enquanto o 2-AG pode ser degradado pela monoacilglicerol lipase (MAGL) (Cravatt *et al.*, 1996; Dinh *et al.*, 2002) (fig 3).

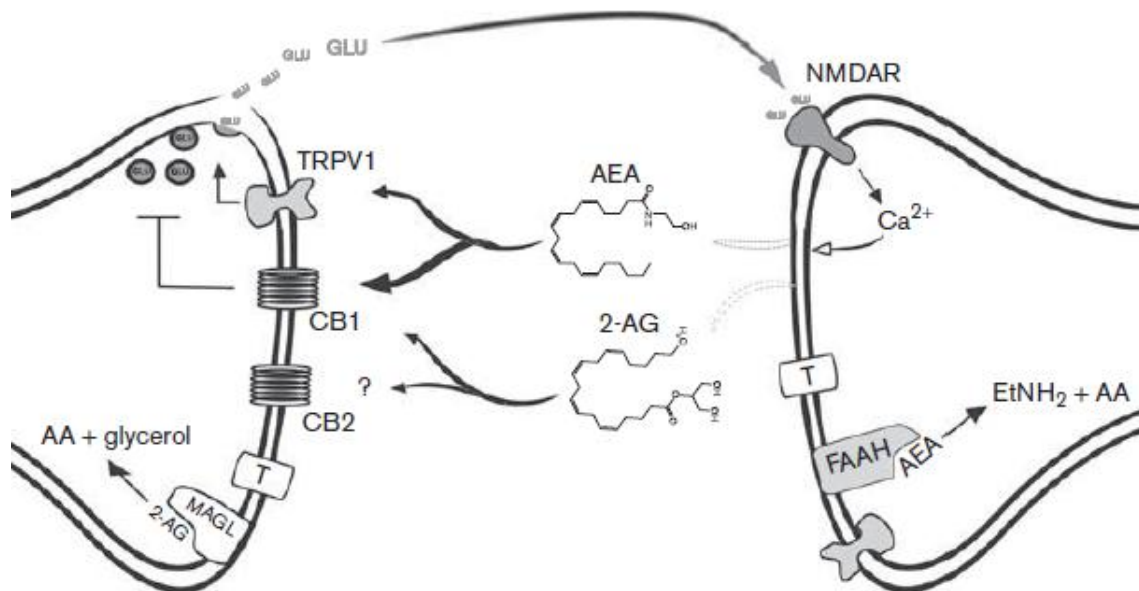


Fig 3. Representação esquemática do sistema endocanabinoide. AEA (anandamida) 2-AG (2-araquidonoil glicerol), NMDAR (receptores NMDA), FAAH (hidrolase amida de ácidos graxos), EtNH₂ (etanolamida), AA (ácido araquidônico), T (transportador de anandamida), MAGL (monoacilglicerol lípase), TRPV1 (receptor vaniloide de potencial transiente 1), CB1 (receptor CB1), CB2 (receptor CB2), GLU (glutamato). A liberação de endocanabinoides pode levar à redução da liberação de glutamato pelo neurônio pré-sináptico via receptor CB1.

Atualmente, os receptores e as enzimas de degradação são considerados alvos farmacológicos com potencial terapêutico para o tratamento de transtornos da ansiedade (Batista *et al.*, 2014; Fowler, 2015b). Agonistas e antagonistas para o receptor CB₁ foram exaustivamente testados em diversos modelos de ansiedade sensíveis aos benzodiazepínicos, revisado em (Viveros *et al.*, 2005; Griebel e Holmes, 2013). Em síntese, foi demonstrado que agonistas para receptor CB₁ em modelos animais de ansiedade exibem uma curva em U invertido, ou seja, doses intermediárias são mais eficazes em atenuar os comportamentos do tipo-ansiedade do que doses baixas ou altas – revisado em (Viveros *et al.*, 2005).

Experimentos envolvendo injeções centrais sugerem que estruturas como a amígdala e a SCPdl estão envolvidas nesse efeito ansiolítico (Moreira *et al.*, 2007; Rubino *et al.*, 2007; Griebel e Holmes, 2013; Batista *et al.*, 2014). Os antagonistas podem apresentar um efeito ansiogênico ou nenhum efeito nesses modelos. Os inibidores da degradação de AEA também apresentam efeitos ansiolíticos, entretanto, tal efeito pode depender do nível de “aversividade” que o modelo possui, ou seja, em alguns estudos o efeito ansiolítico foi observado apenas em protocolos com estímulos aversivos mais intensos (Haller *et al.*, 2009; Batista *et al.*, 2015). Os inibidores da degradação do 2-AG também parecem apresentar um efeito ansiolítico, embora mais estudos sejam necessários para se confirmar essa hipótese (Busquets-Garcia *et al.*, 2011; Almeida-Santos, Gobira, *et al.*, 2013).

Em relação a modelos animais de ataque de pânico, os resultados mostram um efeito panicolítico tanto de agonistas para o receptor CB₁ quanto de inibidores da degradação de AEA e 2-AG (Finn *et al.*, 2003; Finn *et al.*, 2004; Casarotto *et al.*, 2012; Almeida-Santos, Gobira, *et al.*, 2013; Almeida-Santos, Moreira, *et al.*, 2013; Batista *et al.*, 2015; Viana *et al.*, 2015). Até o presente momento, os estudos sugerem que a facilitação da sinalização do receptor CB₁ parece promover um efeito panicolítico. De acordo com a maioria dos estudos, esse efeito depende da ativação de receptores CB₁ em neurônios da SCPdl revisado em (Batista *et al.*, 2014). A partir desses resultados é possível propor a hipótese de que uma menor ativação de receptores CB₁ na SCPdl poderia predispor o indivíduo a um ataque de pânico (Batista *et al.*,

2015; Viana *et al.*, 2015; Morena *et al.*, 2016). Drogas panicolíticas, como antidepressivos e benzodiazepínicos, portanto, exerceriam seu efeito terapêutico aumentando a ativação de receptor CB₁ nessa estrutura (Garcia-Gutierrez e Manzanares, 2010; Gunduz-Cinar *et al.*, 2015). Uma das hipóteses testadas no presente trabalho é se o efeito panicolítico mediado pela ativação de receptor 5-HT_{1A} na SCPdl e pelo alprazolam dependem da ativação de receptores CB₁.

Até o momento, o papel do sistema endocanabinoide no ataque de pânico foi investigado em modelos baseados na teoria do sistema neural de defesa. Entretanto, a utilização de modelos de ataque de pânico baseados em outras teorias pode revelar um papel diferente para o sistema nos comportamentos tipo-pânico. Assim, devido à relevância do sistema cardiorrespiratório na patofisiologia do TP, neste trabalho também foi avaliado se a ativação do receptor CB₁ apresenta um efeito panicolítico no modelo da fuga induzida pela injeção de KCN. Além das abordagens comportamentais, também foi testada a hipótese de que a facilitação da sinalização endocanabinoide atenua as respostas ventilatórias induzidas pelo doxapram. Dessa forma, este trabalho complementa os estudos prévios sobre o papel do sistema endocanabinoide em modelos baseados na teoria do sistema neural de defesa e investiga pela primeira vez este papel em modelos baseados na teoria do AFS.

Objetivos

2. Objetivo geral

Investigar o papel do sistema endocanabinoide em modelos animais de ataque de pânico e caracterizar os efeitos do doxapram como uma nova abordagem para o estudo do ataque de pânico em ratos

2.1 Objetivos específicos:

- a) Testar a hipótese de que o efeito anti-aversivo do alprazolam, injetado de forma sistêmica, depende de receptores CB₁.
- b) Testar a hipótese de que o efeito anti-aversivo induzido por ativação de receptor 5-HT_{1A} na SCPdl, no modelo do labirinto em T elevado, depende de receptores CB₁ nessa estrutura.
- c) Testar a hipótese de que o efeito anti-aversivo induzido por ativação de receptor 5-HT_{1A}, no modelo de fuga induzida por estimulação química da SCPdl, depende de receptores CB₁ nessa estrutura.
- d) Testar a hipótese de que o alprazolam atenua a fuga e as respostas cardiovasculares induzidas por KCN.
- e) Testar a hipótese de que drogas que facilitam o sistema endocanabinoide (WIN55,212-2, URB597, AA-5-HT e o CBD) atenuam a duração da fuga induzida por KCN.
- f) Caracterizar os efeitos do doxapram injetado via intravenosa nas respostas cardiorespiratórias.
- g) Testar a hipótese de que o alprazolam atenua as respostas ventilatórias induzidas pelo doxapram.
- h) Testar a hipótese de que o URB597 atenua as respostas ventilatórias induzidas pelo doxapram.
- i) Testar a hipótese de que o doxapram, injetado via intraperitoneal, apresenta propriedades aversivas no modelo do labirinto em T elevado e da aversão condicionada ao lugar.
- j) Testar a hipótese de que a injeção intravenosa de doxapram induz aumento da expressão de proteína c-Fos na SCPdl.

Experimentos

3. Descrição dos experimentos

3.1 Parte 1: Envolvimento do receptor CB₁ nos efeitos anti-aversivos do alprazolam e de um agonista 5-HT_{1A}

O objetivo deste grupo de experimentos foi testar a hipótese de que o receptor CB₁ está envolvido nas respostas anti-aversivas mediadas pela injeção sistêmica de alprazolam e pela ativação do receptor 5-HT_{1A} na SCPdl. Para isso, foi utilizado o modelo do LTE e a fuga induzida por estimulação da SCPdl. O protocolo consistia em administrar uma dose ineficaz de AM251 via intraperitoneal, seguido da administração de uma dose eficaz de alprazolam também via intraperitoneal. Posteriormente, os animais foram expostos ao LTE. O outro protocolo consistiu em injetar via intra-SCPdl uma dose ineficaz de antagonista para receptor CB₁, AM251, seguido da administração intra-SCPdl de uma dose eficaz de agonista para receptor 5-HT_{1A}, 8-OH-DPAT. Após as injeções, os animais foram expostos ao LTE ou à caixa de observação para a avaliação da fuga induzida por estimulação da SCPdl. A fig. X mostra o delineamento experimental relativo a esses experimentos

3.2 Parte 2: efeito de canabinoides na resposta de fuga induzida por KCN

Neste grupo de experimentos foi testada a hipótese de que drogas que atuam no sistema endocanabinoide atenuam a fuga induzida por KCN. Inicialmente, o alprazolam foi testado como validação farmacológica na fuga e nos parâmetros cardiovasculares. Posteriormente, foi feita uma curva dose-resposta das seguintes drogas injetadas via intraperitoneal: WIN55212-2, URB597, AA-5-HT e CBD, seguido da injeção iv de KCN. Apenas o comportamento foi medido. A fig. X mostra o delineamento experimental relativo a esses experimentos

3.3 Parte 3: Caracterização do doxapram em respostas ventilatórias e comportamentais e efeitos de canabinoides

Pouco se sabe sobre os efeitos do doxapram em ratos acordados, assim, neste grupo de experimentos foram avaliados os efeitos do doxapram

nos seguintes parâmetros: resposta cardiorrespiratória, aversão condicionada ao lugar, LTE e expressão da proteína c-Fos na SCP. Para a resposta cardiorrespiratória e a expressão da proteína c-Fos, o doxapram foi administrado via intravenosa, enquanto para os experimentos comportamentais, a droga foi injetada via intraperitoneal. A fig. X mostra o delineamento experimental relativo a esses experimentos

Além das abordagens comportamentais, o URB597 e o alprazolam foram testados nas respostas ventilatórias induzidas pelo doxapram. A frequência respiratória foi avaliada por meio da técnica da pletismografia de corpo inteiro. Para isso, os animais receberam alprazolam ou URB597 via intraperitoneal e em seguida, o doxapram foi injetado via iv. A fig. X mostra o delineamento experimental relativo a esses experimentos

Material e métodos

4. Material e métodos

4.1 Animais

Foram utilizados ratos *Wistar* machos (220 – 300 gramas) fornecidos pelo centro de bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas (CEBIO). Eles foram mantidos no biotério do Departamento de Farmacologia da UFMG com ciclo claro-escuro de 12 horas e livre acesso à ração e à água. Os protocolos foram aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA) da UFMG, sob os protocolos 059/2011 e 259/2013.

4.2 Drogas

- a) AM251 (Cayman Chemicals®, EUA): antagonista/agonista inverso CB₁
 - Doses: 100 pmol/0,2 µL e 0,3 mg/kg
 - Diluição: etanol, cremophor e salina (1:1:18)
- b) 8-OH-DPAT (Tocris®, UK,): agonista 5-HT_{1A}
 - Doses: 3,2; 8 e 16 nmol/0,2 µL
 - Diluição: salina
- c) NMDA (Sigma Aldrich®, EUA, doação): agonista NMDA
 - Doses: 1 nmol/0,2 µL
 - Diluição: salina
- d) Alprazolam (doação): benzodiazepínico modulador alostérico de receptor GABA.
 - Doses: 1, 2 e 4 mg/kg
 - Diluição: Tween 2% e salina.
- e) WIN55,212-2 (Cayman Chemicals®, EUA): agonista CB₁ e CB₂
 - Doses: 0,1; 0,1 e 1 mg/kg
 - Diluição: etanol, cremophor e salina (1:1:18)
- f) URB597 (Cayman Chemicals®, EUA): inibidor da enzima FAAH.
 - Doses: 0,1; 0,3 e 1 mg/kg
 - Diluição: etanol, cremophor e salina (1:1:18)
- g) AA-5-HT (Cayman Chemicals®, EUA): inibidor da enzima FAAH e antagonista TRPV1.
 - Doses: 1; 2,5 e 5 mg/kg

- Diluição: etanol, cremophor e salina (1:1:18)
- h) Canabidiol (THC Pharm®, ALE, doação): agonista 5-HT_{1A} e inibidor da enzima FAAH.
- Doses: 5, 10, 20, 40 mg/kg
 - Diluição: Tween 5% e salina
- i) Cianeto de potássio (KCN; Cromoline®, BRA, doação): estimulador dos quimiorreceptores periféricos.
- Doses: 80 µg/0,1 mL e 160 µg/0,1 mL
 - Diluição: salina
- j) Cloridrato de doxapram (Viviram-V®, Holliday-Scott, BRA): analéptico, possível estimulador de quimiorreceptores periféricos.
- Doses: 5, 10, 20 mg/kg
 - Diluição: salina

4.3 Cirurgia estereotáxica

Os animais foram anestesiados com cetamina (Cetaminol®, Syntec, BRA) e xilazina (Anasedan®, Vetbrands, BRA) na proporção de 3:5 (0,01g/mL e 0,023g/mL) em um volume de 1 mL/kg. Em seguida, foram colocados no aparelho estereotáxico e aplicados: anestésico e vasoconstritor (cloridrato de lidocaína e hemitartrato de epinefrina 2%), Alphacaine 100®, DFL, BRA via subcutânea; antibiótico (Agrosil 5 mega® Vansil) em um volume de 0,2uL por animal via intramuscular; analgésico, antitérmico e antiinflamatório (Banamine®, Schering Plough, BRA) na dose de 0,05 mL/kg via subcutânea. Para expor a calota craniana, foi feito um pequeno corte na pele da cabeça do animal e todo o tecido que envolve a calota foi retirado para a visualização das suturas no crânio, onde encontram-se os pontos de referência lambda e bregma de acordo com o atlas Paxinos & Watson (2006). A inclinação da cabeça do animal no aparelho foi ajustada de modo que o lambda e o bregma estivessem no mesmo plano horizontal. Tendo o lambda como ponto de referência, as medidas lateral (-1.9) e dorsoventral (-4.8) foram feitas. Uma cânula de 11 mm foi colocada em um ângulo de 16°, além de um mandril para a obstrução do ducto da cânula. A cânula e o mandril foram fixados à cabeça

do animal através de cimento acrílico para dentista fixados a dois parafusos. Os animais foram mantidos no biotério por no mínimo 5 dias até o experimento comportamental para os experimentos com a estimulação da SCPdl ou por 3-4 dias para os experimentos com o LTE.

4.4 Aparelhos experimentais

4.4.1 Labirinto em T Elevado (LTE): o labirinto em T Elevado (Fig. 2) possui um braço com paredes laterais opacas perpendicular a dois braços sem paredes com 50cm de comprimento por 12cm de largura elevados a 50cm do chão. O protocolo experimental consistia nos seguintes passos: os animais eram manipulados durante 3 dias por 3 minutos para habituação ao experimentador. No dia seguinte, os ratos eram expostos ao braço aberto do labirinto, esse procedimento visa eliminar o componente exploratório do comportamento no dia do teste comportamental no qual é medida a fuga. No quinto dia, o teste era realizado da seguinte maneira: para a esquivia inibitória, o animal era colocado no braço fechado do labirinto e o tempo gasto até ele atingir o centro era medido em três sessões consecutivas intercaladas por um intervalo de 30 segundos. Antes de se começar a medir o tempo da esquivia, uma barreira de madeira era colocada na frente do animal por 30 segundos de modo a evitar uma fuga imediata do animal da mão do experimentador após a exposição ao labirinto. Caso o animal não se locomovesse até o centro em um tempo máximo de 300 segundos, ele era retirado do labirinto. 30 segundos após a terceira e última exposição, o animal era colocado no braço aberto para a fuga. As latências para sair do braço aberto do labirinto eram medidas também em três sessões consecutivas intercaladas por um intervalo de 30 segundos, o tempo máximo de permanência no braço aberto também era de 300 segundos.

4.4.2 Caixa de observação: para os experimentos com o modelo da fuga induzida por estimulação da SCPdl, os animais foram colocados em uma caixa de acrílico transparente (29 x 19 x 34 cm), acoplada a uma tampa de malha plástica com um orifício que permite a passagem do polietileno P-10 (Fig.X). Após a injeção das drogas, a reação dos animais foi gravada por uma câmera

de vídeo localizada em frente a caixa de observação durante 2 minutos. Foi quantificado o número de pulos que o animal exibiu na caixa, o pulo foi considerado quando o animal retirou as quatro patas do chão (AGUIAR et al., 2006). Após a retirada do animal da caixa, o chão e as paredes da mesma eram limpas com álcool 70%.

4.4.3 Aversão condicionada ao lugar: a aversão condicionada ao lugar foi realizada em uma caixa com três compartimentos (A, B e centro) diferenciados pela parede e assoalho. O objetivo desse modelo é avaliar se os animais tratados com o doxapram apresentam uma aversão ao lugar no qual foi injetada a droga. O protocolo consistia em 1 dia de pré-condicionamento, 6 dias de condicionamento e 1 dia de teste. No pré-condicionamento os animais eram colocados no centro da caixa por 15 minutos e exploravam a caixa livremente. Os animais que permaneciam em um lado da caixa, seja o A, B ou o centro por mais de 75% do tempo máximo eram excluídos do experimento. Na fase de condicionamento os animais receberam o doxapram em 1 lado da caixa, por exemplo, o lado A, e o veículo no lado B em dias alternados. No condicionamento os animais eram confinados no lado A ou B da caixa e lá permaneciam por 30 minutos. A fase de condicionamento foi randomizada e alternada, ou seja, metade dos animais que receberam doxapram ou veículo foram condicionados no lado A e a outra metade no lado B. No dia do teste os animais eram reexpostos à caixa com as portas dos compartimentos abertas onde era permitido explorar toda a caixa. A análise da aversão condicionada ao lugar foi feita a partir do seguinte cálculo: tempo no lado pareado com a droga de interesse no dia do teste – tempo pareado no mesmo lado no dia do pré-condicionamento.

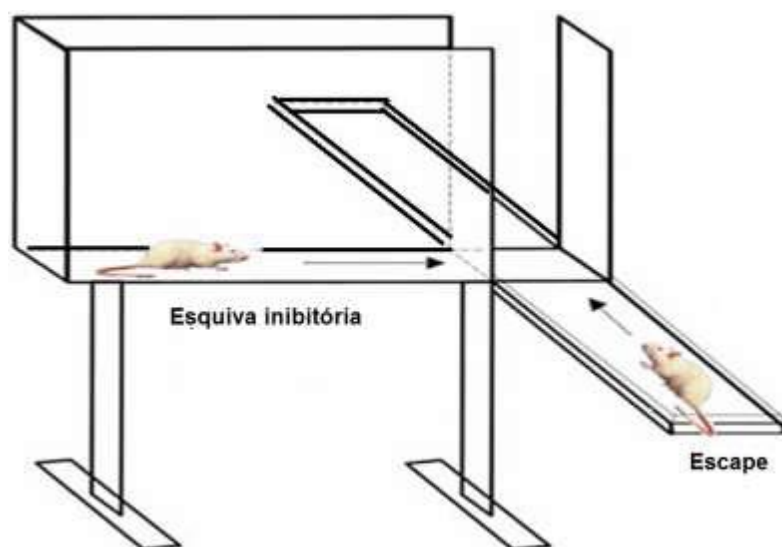


Fig. 4. Labirinto em T Elevado



Fig. 5 Caixa de observação



Figura 6. Caixa de aversão condicionada ao lugar

4.5 Injeção das drogas

Para a injeção das drogas foi utilizada uma agulha odontológica gengival de 12 mm conectada a um tubo de polietileno (P10 – Intramedic Clay Adams®, EUA) preenchido com água destilada, uma bolha de ar foi deixada entre a droga e a água destilada. O tubo, por sua vez, conectava-se a uma seringa de 10 µL (Hamilton Company®, EUA) controlada por uma bomba de infusão. O volume injetado foi de 0,2 µL em uma frequência de 0,4 µL/min. Após a injeção, a agulha permaneceu na cânula durante 30 segundos. Para os experimentos na caixa de observação, imediatamente após a infusão de NMDA o animal já apresentava pulos e o comportamento era, então, medido. Para os experimentos na caixa de observação e LTE o intervalo entre a injeção e o teste comportamental foi de 10 minutos para o 8-OH-DPAT. Quando foram realizadas duas injeções (AM251 e 8-OH-DPAT) o antagonista era administrado primeiro e 5 minutos depois o 8-OH-DPAT era injetado.

4.6 Verificação dos sítios de injeção

Um dia após o experimento comportamental os animais foram anestesiados com uma overdose de cetamina e xilazina (0.4 mL/rato) e o procedimento da injeção intracerebral foi repetido para a injeção de corante azul de Tripán para a visualização do sítio de injeção. Os cérebros, então, foram retirados e armazenados em uma solução de formalina por no mínimo 2 dias. Em seguida, os cérebros foram fatiados com um bisturi em sentido coronal até que se atingisse um plano no qual fosse possível observar o corante marcando o sítio de injeção.

4.7 Implantação de cânulas arterial e venosa

Os animais foram anestesiados com tribromoetanol (250 mg/kg ip) e cânulas de polietileno preenchidas com heparina (Liquemine®, BRA) e salina (1:5) foram introduzidas na aorta abdominal através da artéria femoral ou na veia femoral. As cânulas foram feitas a partir de um tubo de polietileno PE50

(CPL Medicals ®, BRA) de 15 cm, soldado por aquecimento a um tubo PE10 (Intramedic Clay-Adams®, EUA) de 2 ou 4 cm, para veia ou artéria femoral respectivamente, obstruídos por um alfinete de metal. As cânulas foram expostas no dorso do animal de forma subcutânea para posterior manipulação. Em seguida, as incisões foram fechadas com suturas e os animais levados ao biotério. A cânula arterial foi utilizada para se registrar a pressão arterial e a frequência cardíaca e a cânula venosa para se administrar KCN ou doxapram.

4.8 Injeção de KCN e registro dos parâmetros cardiovasculares e comportamentais

Um dia após a cirurgia, as cânulas foram conectadas a um tubo de polietileno (PE-50, CPL Medicals®, BRA) e os animais foram colocados em um campo aberto (figX). Para os experimentos comportamentais, após 10 min de habituação, os ratos receberam uma injeção *in bolus* de KCN (0,80 µg/0,1 mL). O comportamento foi gravado durante 30 segundos a partir da injeção de KCN por uma câmera localizada acima da caixa. A duração da fuga foi medida posteriormente por análise cega. Para os experimentos que envolveram o registro cardiovascular, os animais receberam uma injeção de KCN (injeção 1), seguido da injeção intraperitoneal de alprazolam. 30 minutos após a injeção, uma segunda injeção de KCN foi feita (injeção 2). Tal procedimento foi escolhido de forma a se eliminar os animais que apresentavam uma resposta anormal (hipotensão) ao KCN. Este procedimento está validado e é rotineiramente utilizado pelo grupo de pesquisa da Prof. Dr. Andréa S. Haibara para o estudo da fisiologia do quimiorreflexo. Para o registro da pressão arterial e da frequência cardíaca a cânula arterial foi conectada a um transdutor de pressão ligado a um sistema de aquisição de dados digital (Biopac Systems MP 150®). O software Acqknowledge 3.8.1 foi utilizado para a visualização da pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC).

4.9 Campo aberto

Os animais foram colocados em uma caixa quadrada de 50m² sob uma câmera colocada ao teto. A locomoção basal foi filmada durante 5 min e a distância percorrida foi avaliada automaticamente pelo software AnyMaze. O alprazolam ou o doxapram foram injetados via intraperitoneal 30 min antes da exposição ao campo aberto.

4.10 Injeção de doxapram e registro da ventilação:

Cada animal foi colocado em uma câmara pletismográfica de 61L. O espaço ocupado pelo animal o permitia mover livremente pela caixa. Os animais foram habituados por 15 min à caixa com ar ambiente. A caixa era conectada a um transdutor (espirômetro ML14, PowerLab, ADInstruments, AUS) que se conectava a um computador onde eram registrados os parâmetros ventilatórios pelo software LabChart (ADInstruments, AUS). Para os registros, a caixa era hermeticamente fechada e o transdutor captava as diferenças de pressão causadas pelos ciclos respiratórios. A frequência respiratória (FR) foi quantificada manualmente. Os ciclos de inspiração e expiração foram quantificados em intervalos de 2s por um período de 10s antes e depois da injeção de doxapram (5 mg/kg) (Granjeiro e Machado 2009; Silva 2015) . Logo após a injeção de doxapram, o animal exibia um aumento da locomoção e agitação, dessa forma, a FR foi quantificada 4s após a injeção para se evitar artefatos oriundos da movimentação do animal. A FR foi expressa sob a forma de respirações/minuto. Quando houve pré-tratamento, a droga de interesse foi injetada 30 min antes da injeção de doxapram.

4.11 Imunoistoquímica para c-Fos

Duas horas após a injeção de doxapram, os animais foram anestesiados via ip com cetamina e xilazina e perfundidos transcardiacamente com salina 0,9 % e paraformaldeído 4% (tamponado em PBS 0,1 M, pH 7,4). Os encéfalos foram removidos e processados conforme procedimento descrito por De Oliveira et al., (2001). As secções foram inicialmente pré-tratadas com H₂O₂ 1% em PBS 0,05M durante 10 minutos, para redução da atividade da

peroxidase endógena. Posteriormente, as secções foram incubadas com soro albumina bovina (BSA) 1% em PBS 0,05M durante 30 minutos. Em seguida foi realizada a incubação com o anticorpo primário policlonal de coelho anti-Fos (1:1000, Santa Cruz Biotechnology) acrescido de Triton-X 0,02% e (BSA) 1% em PBS 0,05M por 24 horas, para bloqueio dos sítios de ligações inespecíficos. Após esse tempo, as secções foram lavadas com PBS 0,05M (4 lavagens de 5 minutos cada) antes de serem incubadas com o anticorpo secundário biotilado (1:1000) por 1 hora. O anticorpo biotilado foi diluído em (BSA) 1% em PBS 0,05M acrescido de Triton-X 0,02%. Todas as incubações foram realizadas à temperatura ambiente com agitação constante. Após sucessivas lavagens com PBS as secções foram incubadas com o complexo AB avidina-biotina (1:1500, Vectastain ABC Kit, Vector Laboratories), por 90 minutos. A atividade da peroxidase foi revelada usando o tetracloreto de 3'3'-diaminobenzidina (DAB) contendo H₂O₂ 0,02%. Finalmente, após as lavagens os cortes foram montados em lâminas previamente gelatinizadas. A imunorreatividade para c-Fos foi visualizada como um produto castanho depositado no interior dos núcleos neuronais. Quantificou-se a expressão de c-Fos nas colunas dorsomedial, dorsolateral, lateral e ventrolateral da SCP em três planos distintos, rostral, intermediário e caudal. Os planos escolhidos estão representados na figura 7. A quantificação foi feita por meio do software ImageJ de forma cega.

4.12 Análise estatística

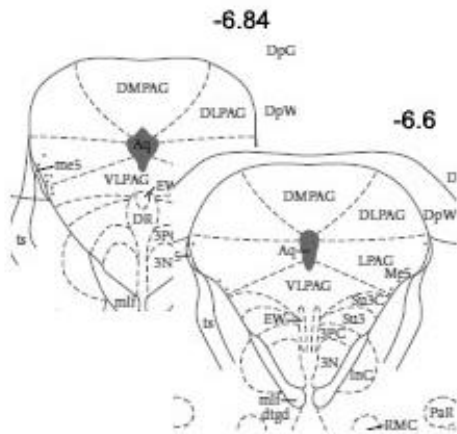
4.12.1 Parte 1 - Envolvimento do receptor CB1 nos efeitos anti-aversivos do alprazolam e de um agonista 5-HT_{1A}: a distribuição dos dados foi analisada pelo teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Como os resultados do LTE apresentaram distribuição normal, os tempos de latência para saída dos braços do labirinto foram comparados por análise de variância (ANOVA) de duas vias com medidas repetidas, levando-se em conta os fatores tratamento (veículo ou drogas) e sessão (já que 3 exposições consecutivas foram realizadas). Foi utilizado o teste *post-hoc* de Bonferroni. Os dados estão apresentados como média e erro padrão da média (EPM). Para avaliação da

resposta de fuga ao NMDA, que não apresentou distribuição normal, o número de pulos foi analisado pelos testes não paramétricos de Kruskal-Wallis seguido de Mann-Whitney e os dados estão apresentados como mediana e intervalo interquartil. O nível de significância estabelecido em todos os testes foi de $p < 0,05$.

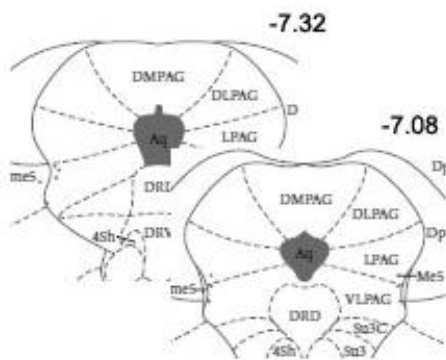
4.12.2 Parte 2 – canabinoides e KCN: a distribuição dos dados foi analisada pelo teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e os resultados apresentam distribuição normal. Para os experimentos comportamentais, foi utilizada a ANOVA de uma via seguido do teste de Newman-Keuls. Para a análise dos parâmetros cardiovasculares foi utilizado a ANOVA de duas vias, considerando os fatores tratamento e injeção de KCN seguido do teste de Bonferroni. Os dados estão apresentados como média e EPM. O nível de significância estabelecido em todos os testes foi de $p < 0,05$.

4.12.3 Parte 3 – caracterização dos efeitos do doxapram em respostas ventilatórias e comportamentais e efeito de canabinoides: a distribuição dos dados foi analisada pelo teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e os resultados apresentam distribuição normal. Para a análise da frequência respiratória foi utilizada a ANOVA de duas vias seguido do teste de Bonferroni. Os dados estão apresentados como média e EPM. Para a avaliação da pressão arterial média, da frequência cardíaca, do campo aberto e da aversão condicionada ao lugar foi utilizada a ANOVA de uma via, seguido do teste de Newman-Keuls. Para o LTE foi utilizada a ANOVA de duas vias seguido do teste de Bonferroni. Para a análise da imunohistoquímica para c-Fos foi utilizada a ANOVA de uma via. Os dados estão apresentados como média e EPM. O nível de significância estabelecido em todos os testes foi de $p < 0,05$.

A



B



C

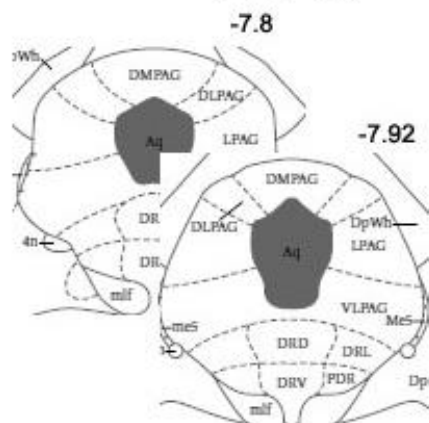
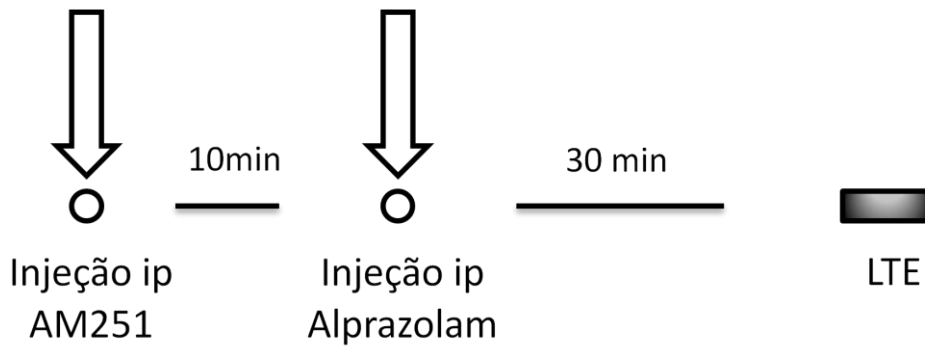


Fig. 7 Planos coronais utilizados para quantificação da proteína c-Fos na SCP em relação ao bregma (Modificado de Paxinos & Watson, 1997). (A) Plano rostral. (B) Plano intermediário. (C) Plano caudal.

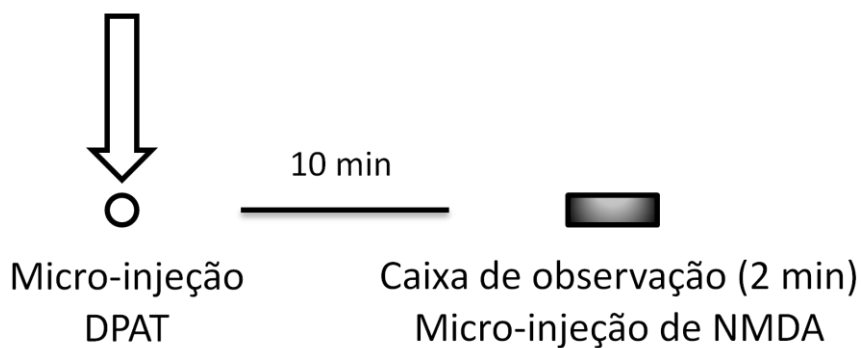
5. Delineamento experimental

5.1 Parte 1: envolvimento do receptor CB_1 nos efeitos anti-aversivos do alprazolam e de um agonista $5-HT_{1A}$

A



B



C

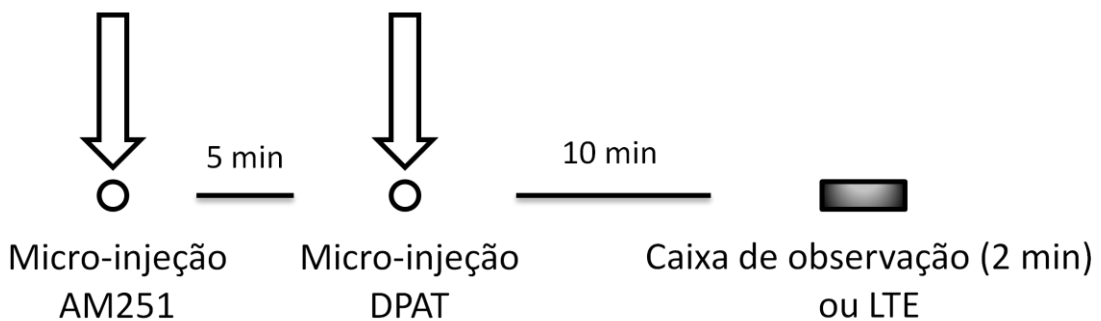


Fig. 8. (A) Protocolo para os experimentos envolvendo injeção sistêmica (B) e (C) Protocolo para os experimentos envolvendo intracerebral.

5.2 Parte 2: KCN e canabinoides

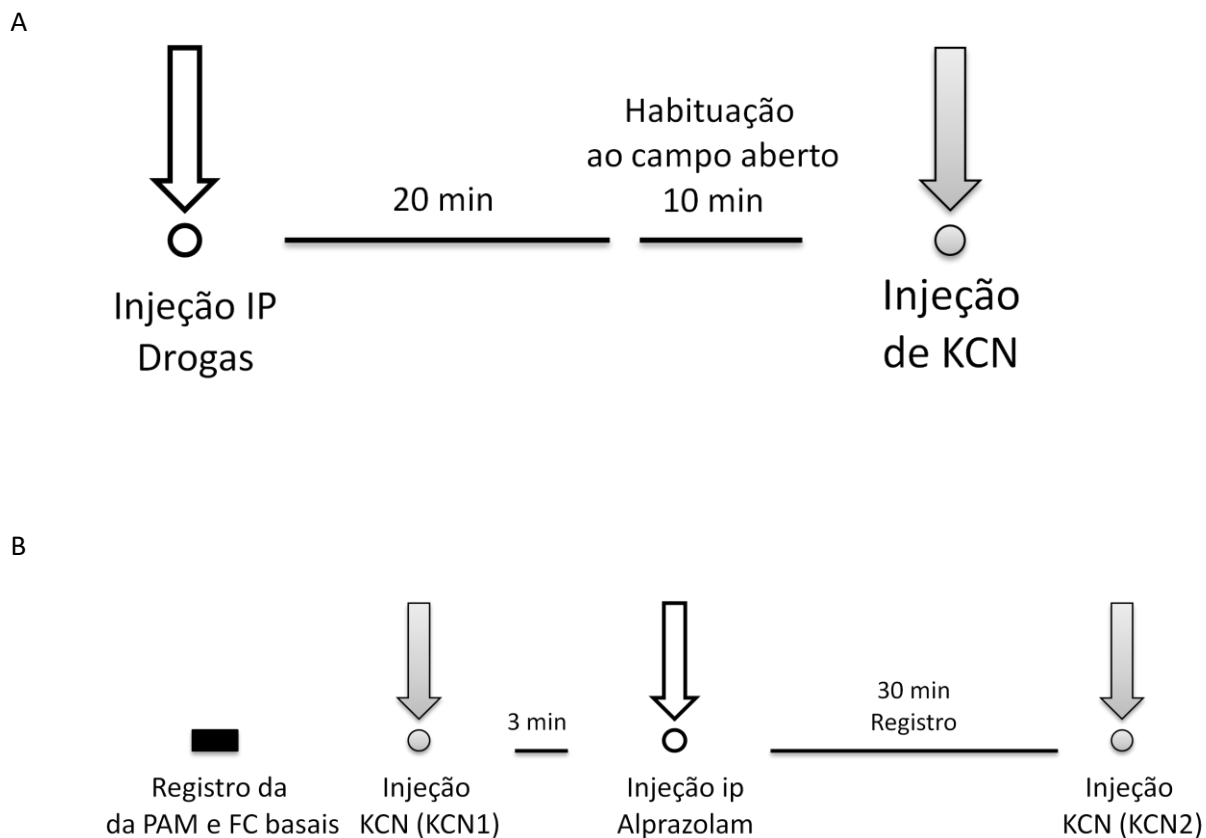
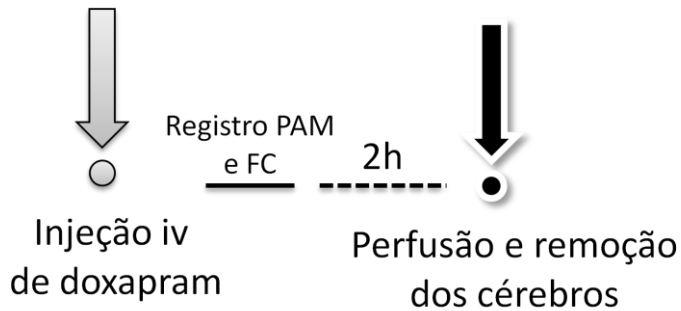


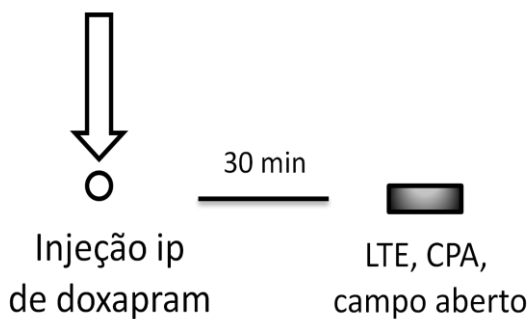
Fig.8 (A) Protocolo para os experimentos envolvendo injeção ip e fuga mediada pelo KCN. (B) Protocolo para os experimentos envolvendo injeção ip e medidas cardiovasculares.

5.3 Parte 3: caracterização dos efeitos do doxapram em respostas ventilatórias e comportamentais e efeito de canabinoides

A



B



C

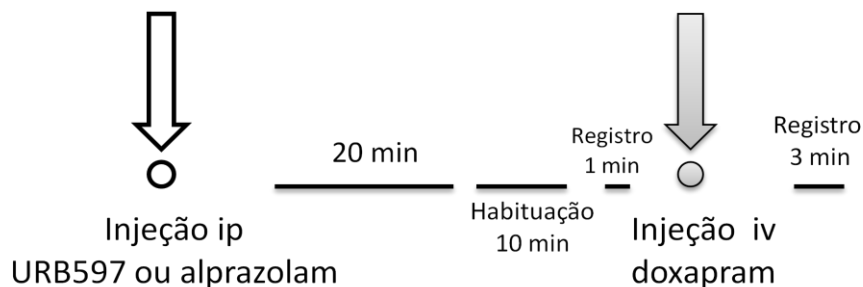


Fig 9.. (A) Protocolo para as medidas cardiovasculares do doxapram. (B) Protocolo para os experimentos comportamentais com o doxapram. (C) Protocolo para a avaliação das respostas ventilatórias do doxapram após o tratamento com URB597 ou alprazolam.

Resultados

6. Resultados

6.1 Parte 1 – Envolvimento do receptor CB_1 nos efeitos anti-aversivos do alprazolam e de um agonista $5-HT_{1A}$.

6.1.1 Efeito do pré-tratamento com AM251 no efeito anti-aversivo do alprazolam: modelo do LTE

Neste experimento objetivamos testar a participação do receptor CB_1 nos efeitos panicolíticos e ansiolíticos do alprazolam. O alprazolam (4 mg/kg) reduziu a latência da esquiva, indicando um efeito ansiolítico $F(6,64)=1.72$, ns, interação; $F(3,64)=2.59$, $p=0.06$, tratamento; $F(2,64)=25.22$, $p<0.01$, sessão. O alprazolam (4 mg/kg) aumentou a latência da fuga, indicando um efeito panicolítico $F(6,64)=2.34$, $p=0.04$, interação; $F(2,64)=5.82$, $p<0.01$, fator sessão; $F(3,64)=1.83$, ns, fator tratamento. O pré-tratamento com AM251 (0,3 mg/kg) reverteu ambos os efeitos (Figuras 10 e 11).

6.1.2 Efeito do pré-tratamento com AM251 nos efeitos anti-aversivos do 8-OH-DPAT: modelo do LTE

O objetivo deste experimento foi verificar se havia participação de receptores CB_1 no efeito panicolítico ou ansiolítico do 8-OH-DPAT (3.2 nmol/0,2 μ L). O 8-OH-DPAT reduziu a latência da E1, indicando um efeito ansiolítico. O pré-tratamento com o AM251 (100 pmol/0,2 μ L) reverteu o efeito ansiolítico do 8-OH-DPAT: ANOVA de duas vias: $F(6,46)=2$; $p=0,07$, interação; $F(2,46)=46$ $P<0,01$, fator sessão; $F(3,46)=3,9$; $p<0.05$, fator droga. O 8-OH-DPAT não alterou a latência da fuga: ANOVA de duas vias, $F(6,46)=1,1$; ns, interação; $F(2,46)= 3,2$; $p=0,04$, fator sessão; $F(3,46)=0,27$; ns, fator droga (Figuras 12 e 13). Assim, testamos essa mesma hipótese em outro modelo animal de ataque de pânico.

6.1.3 Curva dose-resposta do 8-OH-DPAT (8 e 16 nmol/0,2 µL): modelo da fuga induzida por estimulação da SCPdl

De modo a se confirmar o efeito panicolítico da ativação de receptor 5-HT_{1A} na SCPdl, testamos duas doses de 8-OH-DPAT (8 e 16 nmol/0,2 µL) na fuga induzida por estimulação da SCPdl. A dose de 8 nmol reduziu o número de pulos de forma significativa: Kruskal-Wallis: H=8,4; p<0,05. (Figura 14)

6.1.4 Efeito do pré-tratamento com AM251 no efeito panicolítico do 8-OH-DPAT femodelo da fuga induzida por estimulação da SCPdl

O objetivo deste experimento foi verificar se havia participação de receptores CB₁ no efeito panicolítico do 8-OH-DPAT (8 nmol/0,2 µL). Confirmando a hipótese nula, o pré-tratamento com AM251 (100 pmol/0,2 µL) não reverteu o efeito produzido pelo 8-OH-DPAT: Kruskal-Wallis: H=10,75. p<0,05. (Figura 15)

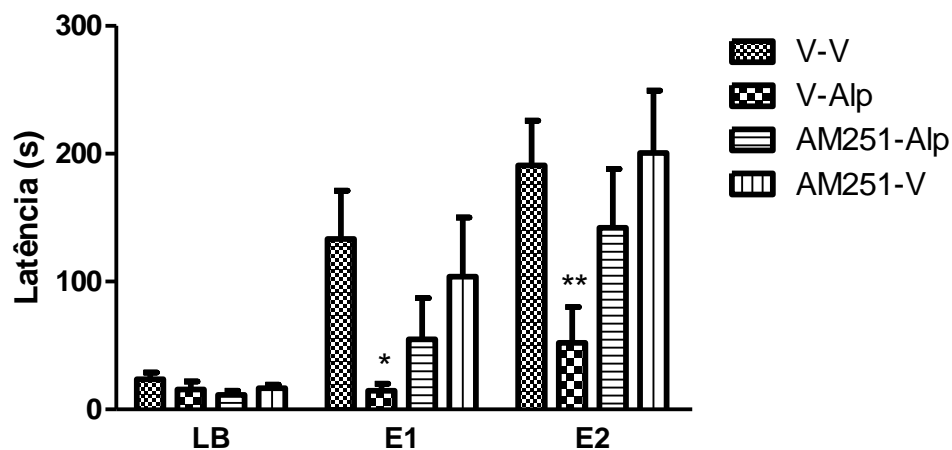


Fig. 10 Efeito do alprazolam (4 mg/kg) e do tratamento combinado com AM251 (0,3 mg/kg) e alprazolam na latência da esquia inibitória. LB refere-se à linha de base, E1 e E2 à esquia 1 e 2. Media±EPM; * $p < 0,01$, ANOVA de duas vias e teste de Bonferroni; $n = 12, 7, 9, 8$.

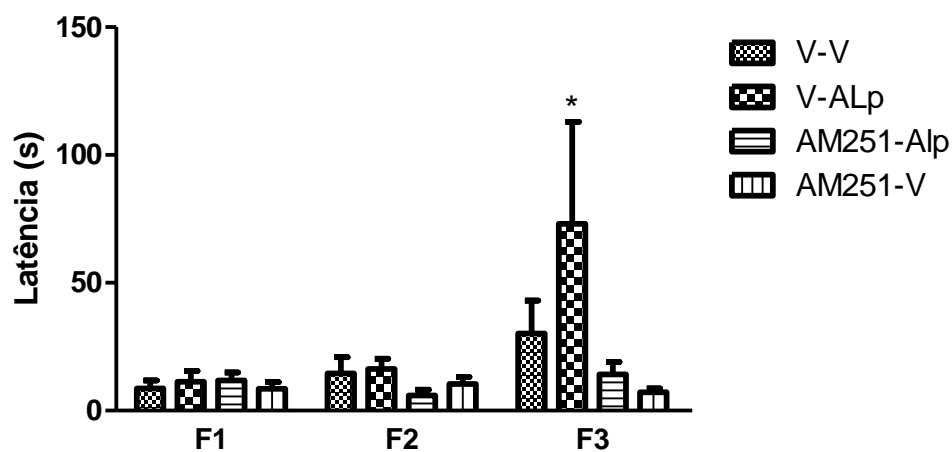


Fig. 11 Efeito do alprazolam (4 mg/kg) e do tratamento combinado com AM251 (0,3 mg/kg) e alprazolam na latência da fuga. F1, F2, F3 referem-se à fuga 1, 2 e 3. Media±EPM. $n = 12, 7, 9, 8$.

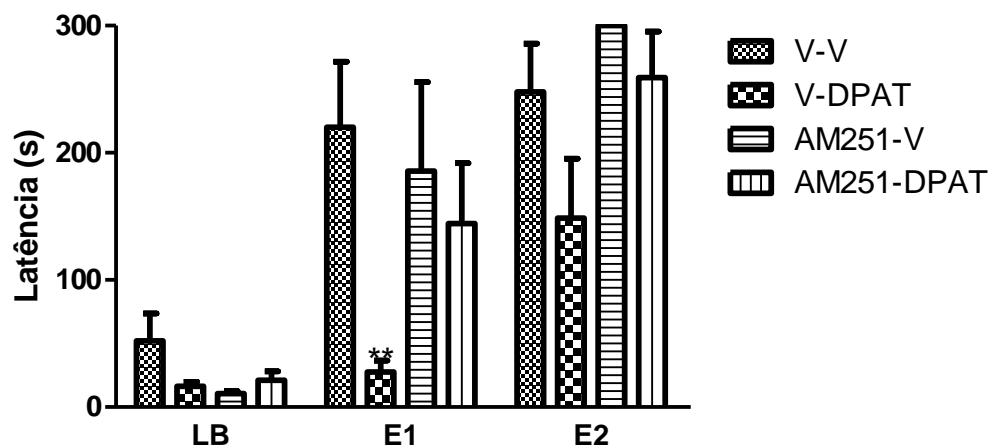


Fig. 12 Efeito do 8-OH-DPAT e do tratamento combinado com AM251 e 8-OH-DPAT na latência da esquiva inibitória. LB refere-se à linha de base, E1 e E2 à esquiva 1 e 2. Media±EPM; *p<0,01, ANOVA de duas vias e teste de Bonferroni. n=7,7,5,8.

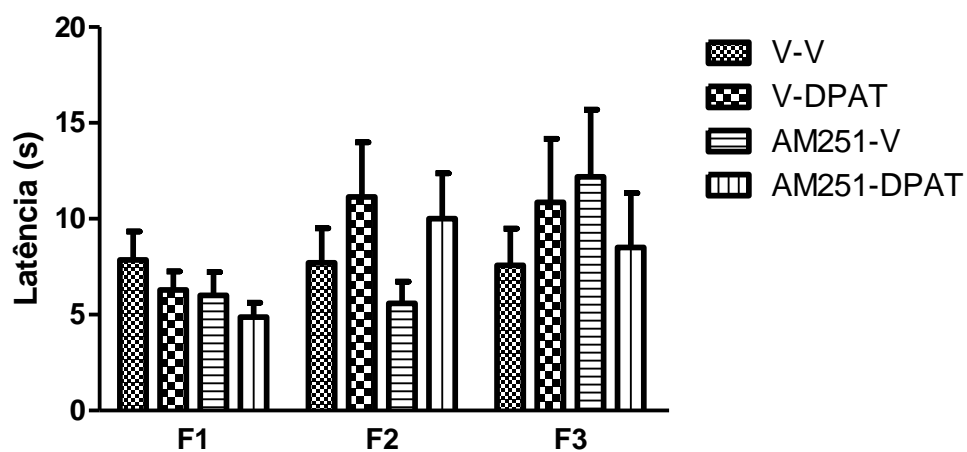


Fig. 13 Efeito do DPAT e do tratamento combinado com AM251 e DPAT na latência da fuga. F1, F2, F3 referem-se à fuga 1, 2 e 3. Media±EPM. n=7,7,5,8.

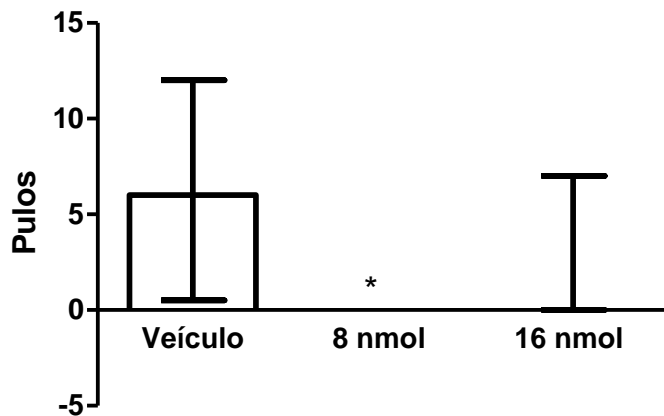


Fig. 14 Curva dose-resposta do 8-OH-DPAT na fuga induzida por estimulação da SCPdl. Mediana \pm intervalo interquartil; * $p < 0,05$, testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney; $n = 9, 8, 7$.

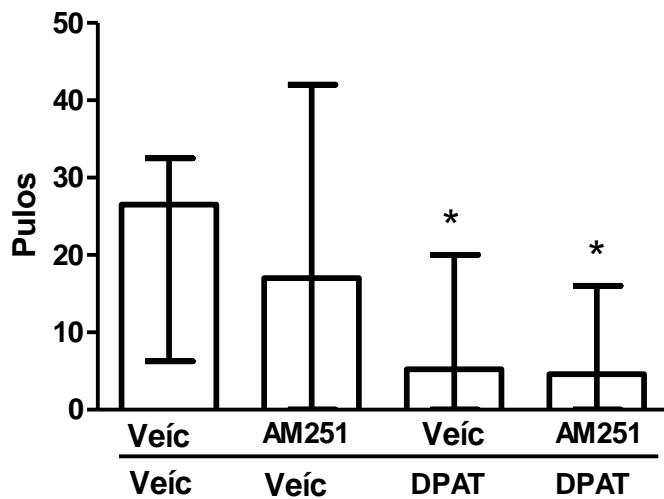


Fig. 15 Efeito do 8-OH-DPAT e do tratamento combinado com AM251 e 8-OH-DPAT na fuga induzida por estimulação da SCPdl. Mediana \pm intervalo interquartil; * $p < 0,05$, testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. $n = 8, 9, 10, 11$.

6.2 Parte 2 – KCN e canabinoides

6.2.1 Curva dose-resposta do KCN (20, 40 e 80 µg/kg)

Inicialmente foi realizada uma curva dose-resposta do KCN para se definir a dose a ser utilizada nos experimentos subsequentes. Para o parâmetro comportamental, apenas a dose de 80 µg/0,1mL levou a um aumento significativo da atividade locomotora: ANOVA de uma via: $F(3;38) = 5,05$; $p < 0,005$ (Figura 16). Já para os parâmetros cardiovasculares, todas as doses levaram a um aumento da pressão arterial, ANOVA de uma via: $F(3;38)=18,87$; $p < 0,0001$; e a uma bradicardia, sendo esta, dose-dependente, ANOVA de uma via: $F(3;38)=33,28$; $p < 0,0001$ (Figuras 17 e 18). A dose de 80 µg/0,1mL então, foi escolhida para os experimentos comportamentais.

6.2.2 Efeito do alprazolam na fuga induzida por KCN e nos parâmetros cardiovasculares

Para a validação farmacológica do modelo nas nossas condições experimentais, foi utilizado o alprazolam. O alprazolam (1, 2 e 4 mg/kg) reduziu a duração da fuga em todas as doses, ANOVA de uma via: $F(3, 38)=5,3$; $p < 0,01$. (Figura 19) A atividade locomotora basal não foi alterada pela injeção de alprazolam (1, 2 e 4 mg/kg), como avaliado pelo campo aberto, ANOVA de uma via: $F(3;23)=2,62$; $p=0,07$ (Figura 20). Como o alprazolam apresentou um efeito panicolítico, foi avaliado o efeito da droga nos parâmetros cardiovasculares do quimiorreflexo. A dose de 4 mg/kg reduziu o aumento da pressão arterial provocado pelo KCN sem alterar a bradicardia. ANOVA de duas vias para a pressão arterial: $F(1;12)=5,27$; $P=0,04$, interação entre os fatores; $F(1;12)=9,17$; $p=0,01$, fator tratamento; $F(1;12) = 8,84$; $p=0,01$, fator injeção. ANOVA de duas vias para a bradicardia: $F(1;12)=5,78$; $p=0,03$, interação entre os fatores; $F(1;12)=0,75$; $p > 0,05$, fator tratamento; $F(1;12)=0,04$; $p > 0,05$, fator injeções (Figura 21 e 22). Essa dose não alterou esses parâmetros por si só (tabela 1).

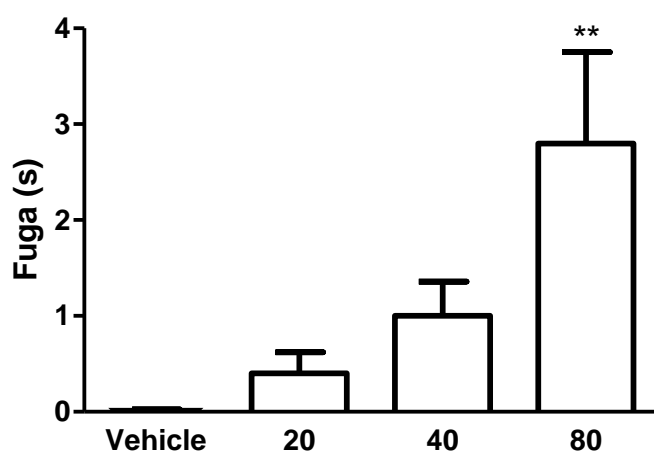


Fig.16 Duração da fuga induzida por injeção iv de KCN ou veículo. Media±EPM $p^{**}<0,01$ ANOVA de uma via e teste de Newman-Keuls. $n=8,10,11,10$.

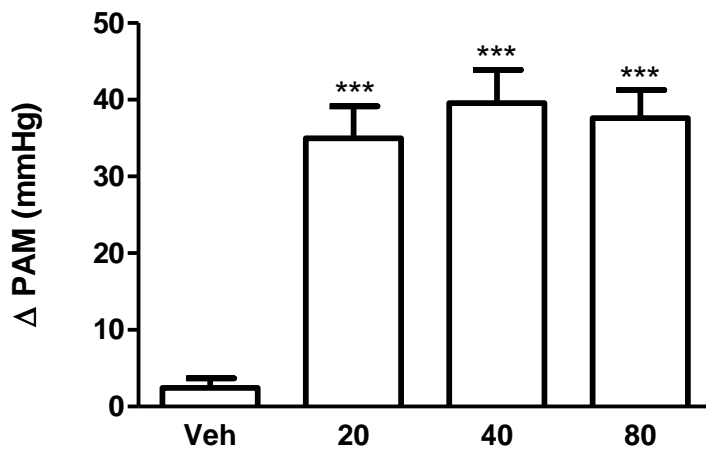


Fig. 17 Variação da pressão arterial média (PAM) após e antes da infusão iv de KCN ou veículo. $\text{Media} \pm \text{EPM}$ *** $p < 0,0001$, ANOVA de uma via e teste de Newman-Keuls. $n = 8, 10, 11, 10$.

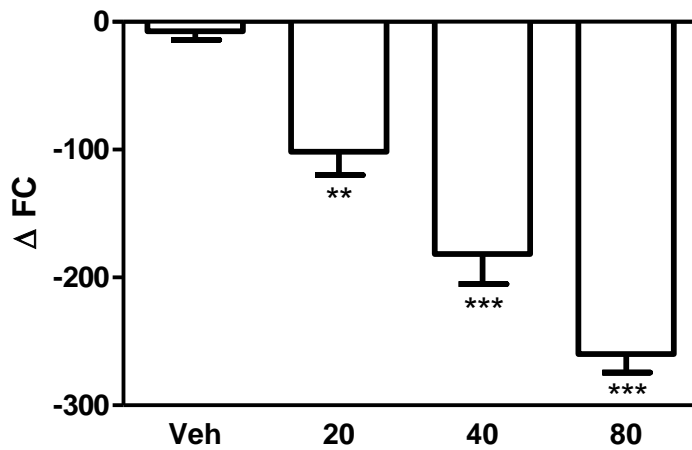


Fig. 18 Variação da frequência cardíaca (FC) após e antes da infusão iv de KCN ou veículo. $\text{Media} \pm \text{EPM}$, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$, ANOVA de uma via e teste de Newman-Keuls. $n = 8, 10, 11, 10$.

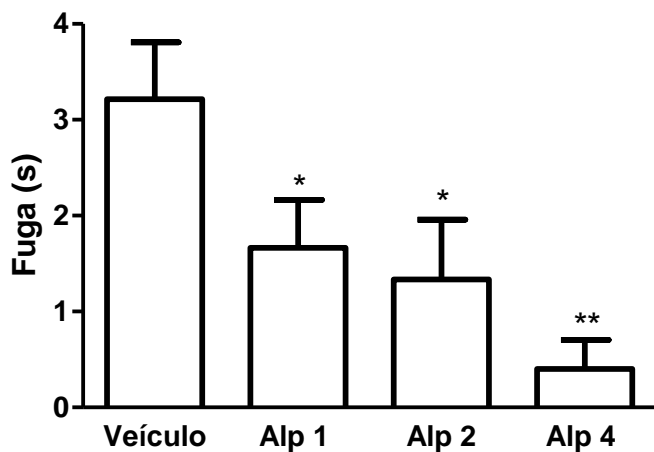


Fig 19. Efeito do alprazolam ou veículo injetado via ip na duração da fuga induzida por KCN. Média±EPM * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, ANOVA de uma via e teste de Newman-Keuls. $n=14, 9, 9, 10$.

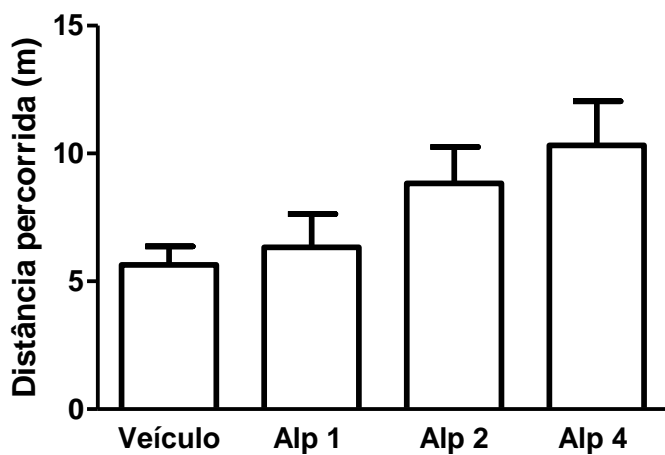


Fig.20 Efeito do alprazolam ou veículo na locomoção basal de ratos expostos ao campo aberto.

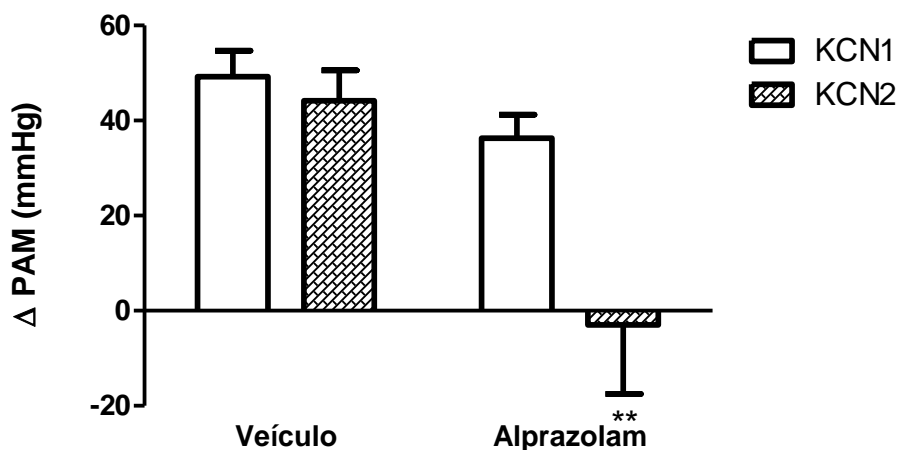


Fig. 21 Efeito do alprazolam (4 mg/kg) ou veículo injetado via ip na variação da PAM induzida pelo KCN. KCN1 refere-se à primeira injeção iv de KCN. 3 min após essa injeção, os animais receberam uma dose de alprazolam. 30 minutos depois, uma nova injeção de KCN (KCN2) foi realizada. Media±EPM **p<0,01 ANOVA de duas vias e teste de Bonferroni. n=7/grupo.

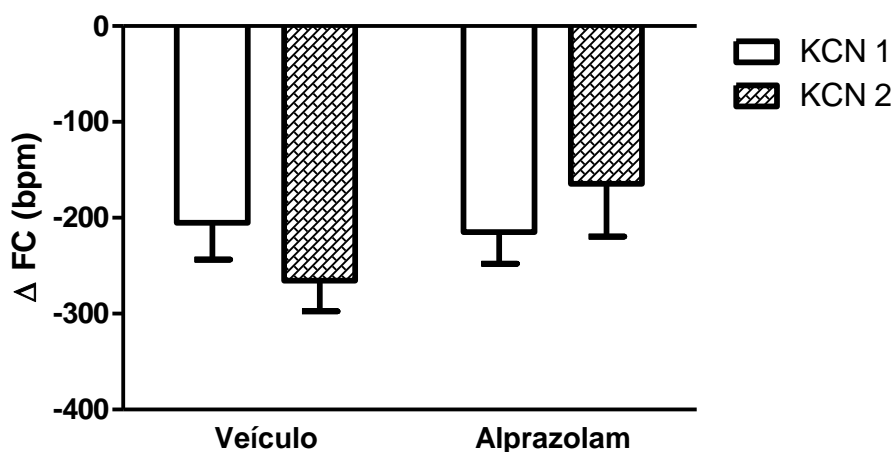


Fig. 22 Efeito do alprazolam (4 mg/kg) ou veículo injetado via ip na variação da frequência cardíaca (FC) induzida pelo KCN. KCN1 refere-se à primeira infusão iv de KCN. Logo após essa infusão, os animais receberam uma dose de alprazolam. 30 minutos depois, uma nova infusão de KCN (KCN2) foi realizada. n=7/grupo.

Tabela 1

Grupo	PAM 1	FC 1	PAM 2	FC2
Veículo	118 ± 1,7	390 ± 9,5	121 ± 3,7	439 ± 9,7
Alprazolam (4 mg/kg)	122 ± 3,4	382 ± 22,5	111 ± 4,2	426 ± 15,1

6.2.3 Efeito do URB597 (0,1; 0,3 e 1 mg/kg) na fuga induzida por KCN

Para se investigar se manipulações do sistema endocanabinoide interferem no comportamento tipo-pânico do KCN, testamos o URB597, um inibidor da hidrólise da anandamida. A administração de URB597 não interferiu com a fuga induzida por KCN, ANOVA de uma via: $F(3,42)=1,2$; $p=0,3$ (Figura 23).

6.2.4 Efeito da AA-5-HT (1; 2,5 e 5 mg/kg) na fuga induzida por KCN

A anandamida, além de ser um agonista parcial de receptores CB_1 , é um agonista de receptores TRPV1, cuja ativação está associada a comportamentos panicogênicos e ansiogênicos. Assim, objetivamos testar a hipótese de que a inibição da enzima simultaneamente ao bloqueio do receptor TRPV1 reduziria a duração da fuga. Confirmando a hipótese nula, nenhuma dose de AA-5-HT reduziu a duração da fuga, ANOVA de uma via $F(3;42)=1,07$; $p=0,3$ (Figura 24).

6.2.5 Efeito do WIN55,212-2 (0,1; 0,3 e 1 mg/kg) na fuga induzida por KCN

Considerando o fato de que a facilitação da neurotransmissão da anandamida em regiões específicas do cérebro não interferiu com a fuga, testamos a hipótese de que uma ativação de receptor CB_1 de forma generalizada atenuaria a fuga. A administração de WIN55,212-2 também não alterou a duração da fuga, ANOVA de uma via: $F(3;40)=1.45$; $p=0,2$ (Figura 25).

6.2.6 Efeito do CBD (5, 10, 20, 40 mg/kg) na fuga induzida por KCN

O CBD é uma droga com amplo espectro de ação, interferindo tanto no sistema endocanabinoide quanto no sistema serotoninérgico. A administração de CBD também não foi capaz de alterar a duração da fuga de forma estatisticamente significativa, ANOVA de uma via: $F(4;52)=2,23$; $p=0,07$ (Figura 26).

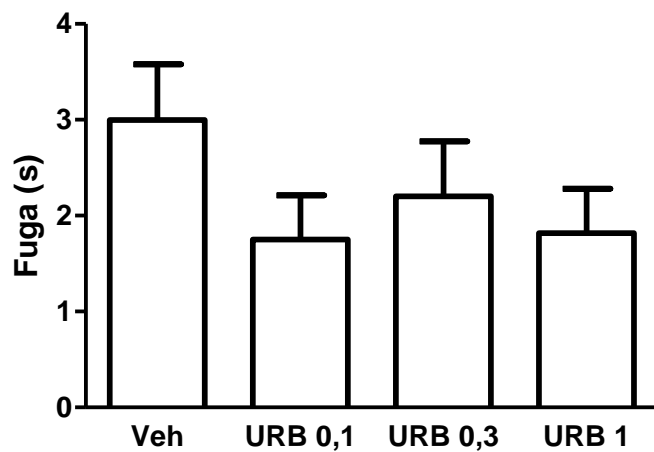


Fig.23 Efeito do URB597 ou veículo injetados via ip na fuga induzida por KCN.
n=11, 12, 10, 12.

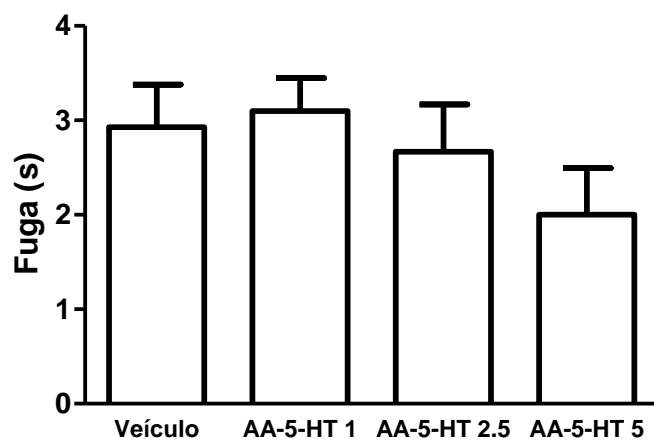


Fig.24 Efeito da AA-5-HT ou veículo injetados via ip na fuga induzida por KCN.
n=14, 10, 9, 10.

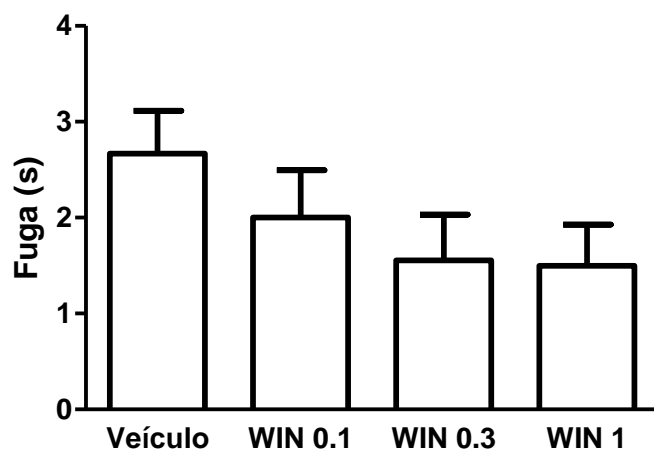


Fig.25 Efeito do WIN55,212-2 ou veículo injetados via ip na fuga induzida por KCN. n= 12, 10, 9, 10.

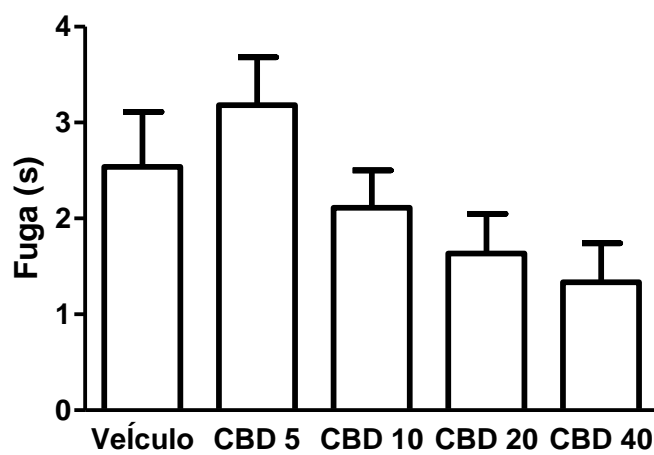


Fig.26 Efeito do CBD ou veículo injetados via ip na fuga induzida por KCN.n= 13, 11, 9, 11, 9.

6.2.7 Fuga induzida por 80 e 160 µg/0,1mL de KCN

A partir dos resultados anteriores, hipotetizamos que a linha de base para a fuga estava baixa, ou seja, a fuga estava pouco intensa, dificultando a observação de um efeito panicolítico de reduzir esse comportamento. Além disso, o sistema endocanabinoide parece ser recrutado em situações que apresentam um nível elevado de estresse e aversão. Assim, testamos se uma maior dose de KCN levaria a uma fuga com maior duração. A hipótese nula foi confirmada e uma dose 2x maior de KCN não aumentou a duração da fuga: $t(17)=0,03$. $p=0,97$ (Figura 27).

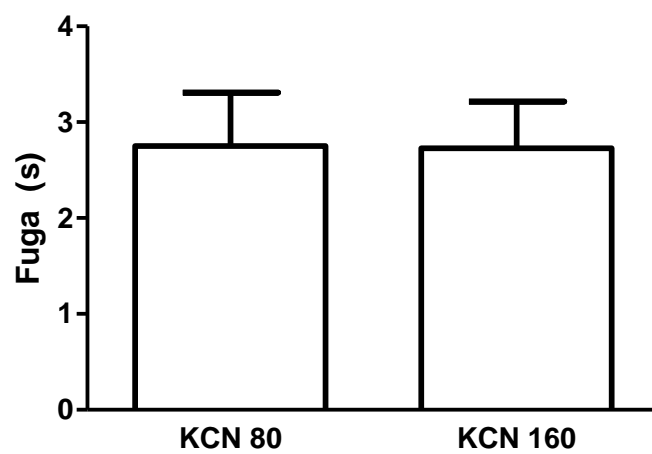


Fig. 27 Comparação entre duas doses de KCN (80 e 160 µg/0,1mL). n= 8,11.

6.3 Partes 3 e 4: caracterização dos efeitos do doxapram e do URB597

6.3.1 Efeito do doxapram na frequência respiratória

Foi realizada uma curva-dose resposta do doxapram (5, 10 e 20 mg/kg) na frequência respiratória para se confirmar o efeito típico da droga como um estimulante respiratório. De acordo com a ANOVA de duas vias, as 3 doses testadas aumentaram a frequência respiratória. Interação entre os fatores: $F(27,144)=5,12$, $p<0,0001$; tratamento: $F(3,144)=12,55$, $p<0,05$; tempo: $F(9,144)=50,83$ $p<0,0001$; (Figura 28).

6.3.2 Efeito do doxapram na pressão arterial média e frequência cardíaca

As 3 doses de doxapram (5, 10 e 20 mg/kg) testadas levaram a um aumento da pressão arterial média (PAM) e a uma bradicardia: $F(3,20)=20,79$, $p<0,01$; $F(3,20)=19,6$, $p<0,01$, respectivamente (ANOVA de uma via) (Figura 29 e 30).

6.3.3 Efeito do alprazolam na hiperventilação induzida pelo doxapram

De modo a se avaliar a preditabilidade farmacológica para drogas panicolíticas, realizamos uma curva dose-resposta do alprazolam (1, 2 e 4 mg/kg). De acordo com a ANOVA de duas vias, houve efeito do fator tempo e interação entre os fatores tempo e tratamento: $F(27,126)=2,41$, $p<0,0001$ interação; $F(9,126)=75,58$, $p<0,0001$ fator tempo; $F(3,126)=0,71$, ns, fator tratamento (Figura 31).

6.3.4 Efeito do URB597 na hiperventilação induzida pelo doxapram

Foram testadas 3 doses de URB597 (0,1; 0,3 e 1 mg/kg). De acordo com a ANOVA de duas vias, não houve interação entre os fatores, entretanto, houve efeito do fator tempo e tratamento: $F(27,153)=0,56$, ns interação; $F(9,153)=49,50$, $p<0,0001$, tempo; $F(3,153)=4,05$, $p<0,05$ tratamento (Figura 32).

6.3.5 Efeito do doxapram na aversão condicionado ao lugar

Foi realizada uma curva dose-resposta do doxapram no modelo da aversão condicionada ao lugar. Nenhuma das doses testadas provocou uma aversão condicionada ao lugar (Figura 33). A figura 34 mostra a distribuição dos dados individuais. $F(3,40)=2$; ns (ANOVA de uma via).

6.3.6 Efeito do doxapram no modelo do LTE

Foi realizada uma curva dose-resposta do doxapram no LTE. Para a esQUIVA inibitória, a ANOVA de duas vias mostra que houve efeito do fator sessão, indicando aprendizado: $F(2,60)=78$, $p<0.01$. Houve interação entre a sessão e o tratamento: $F(2,60)=78$, $p<0.01$. Não houve efeito do tratamento: $F(3,60)=2$; ns (Figura 35 e 36).

6.3.7 Efeito do doxapram na locomoção basal

Como foi observado um efeito do doxapram na esQUIVA inibitória no modelo do LTE, avaliamos o efeito das 3 doses de doxapram na locomoção basal. Nenhuma das doses alterou a locomoção basal (ANOVA de uma via), indicando que não há interferência da locomoção no efeito ansiogênico do doxapram. $F(3,21)=0.19$, ns (Figura 37).

6.3.8 Efeito do doxapram na expressão da proteína c-Fos na SCP

O número de células c-Fos positivas foi avaliado nos planos caudal, intermediário e rostral. A injeção intravenosa de doxapram levou a um aumento desse número na SCPvl no plano intermediário: $F(3,19)=5$; $p<0,05$ e caudal $F(3,19)=6,75$; $p<0.01$ (ANOVA de uma via). Não houve diferença para as outras regiões em nenhum dos planos. Plano rostral: SCPdm, $F(3,19)=0,36$, ns; SCPdl, $F(3,19)=1,13$, ns; SCPI, $F(3,19)=2,45$, ns; SCPvl, $F(3,19)=2,12$, ns.

Plano intermediário: SCPdm, $F(3,19)=1,88$, ns; SCPdl, $F(3,19)=1,49$, ns; SCPI, $F(3,19)=2,73$, ns; SCPvl(3,19)=5, $p<0,05$. Plano caudal: SCPdm, $F(3,19)=11,60$, ns; SCPdl, $F(3,19)=1,23$, ns; SCPI, $F(3,19)=1,34$, ns; SCPvl(3,19)=6,75, $p<0,01$ (Figura 38).

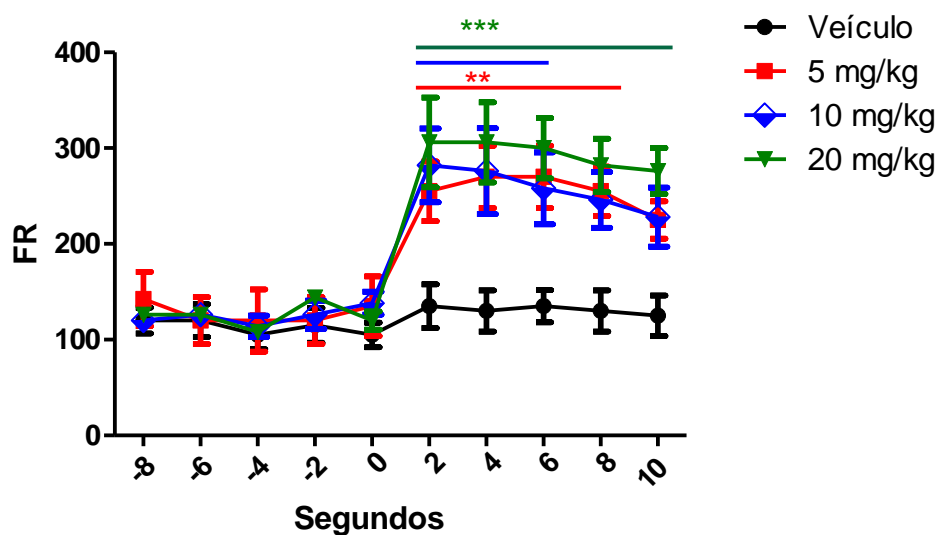


Fig. 28 Curva dose-resposta do doxapram na frequência respiratória. *** $p < 0,0001$, 20 e 10 mg/kg em relação ao veículo; $\text{Media} \pm \text{EPM}$. ** $p < 0,01$, 5 mg/kg em relação ao veículo, ANOVA de duas vias e teste de Bonferroni. $n=6,4,5,5$.

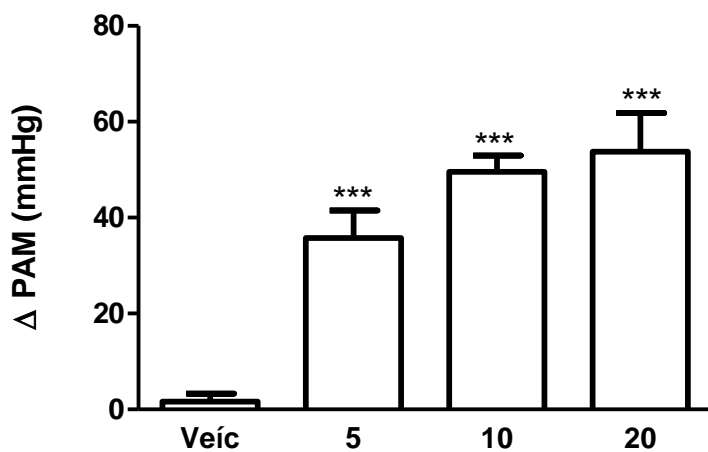


Fig. 29 Efeito do doxapram na variação da pressão arterial média (PAM) antes e após a injeção de doxapram. $\text{Media} \pm \text{EPM}$, $***p < 0,0001$, ANOVA de uma via e teste de Newman-Keuls. $n=5,5,6,5$.

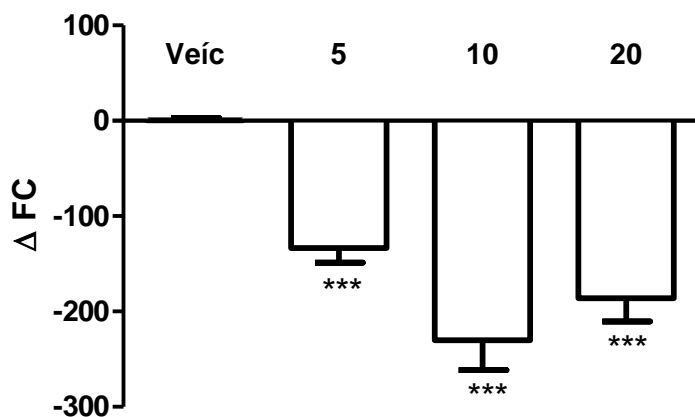


Fig. 30 Efeito do doxapram na variação da frequência cardíaca (FC) antes e após a injeção de doxapram. $\text{Media} \pm \text{EPM}$ $***p < 0,0001$, ANOVA de uma via e teste de Newman-Keuls. $N=5,5,6,5$.

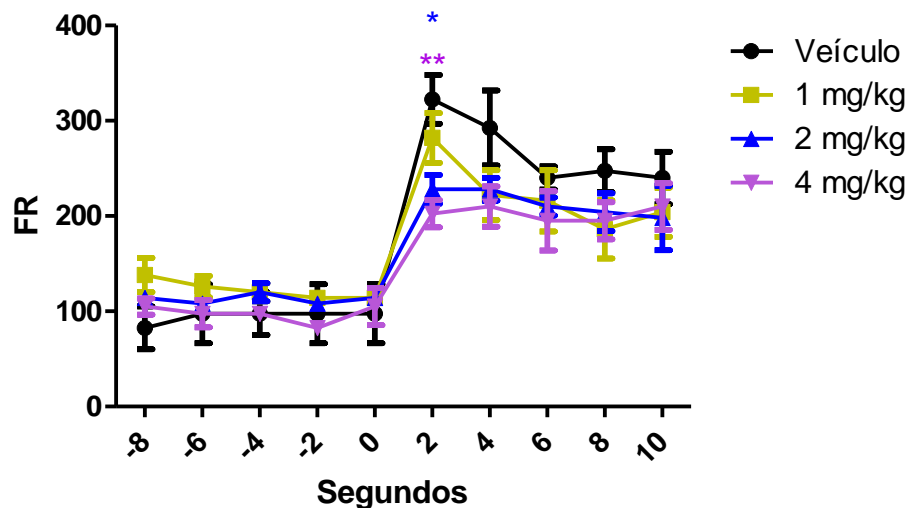


Fig. 31 Curva dose-resposta do alprazolam na hiperventilação induzida pelo doxapram (5 mg/kg). Media±EPM **p<0,01, 4 mg/kg em relação ao veículo. *p<0,05, 2 mg/kg em relação ao veículo. ANOVA de duas vias e teste de Bonferroni. n=4,5,5,4.

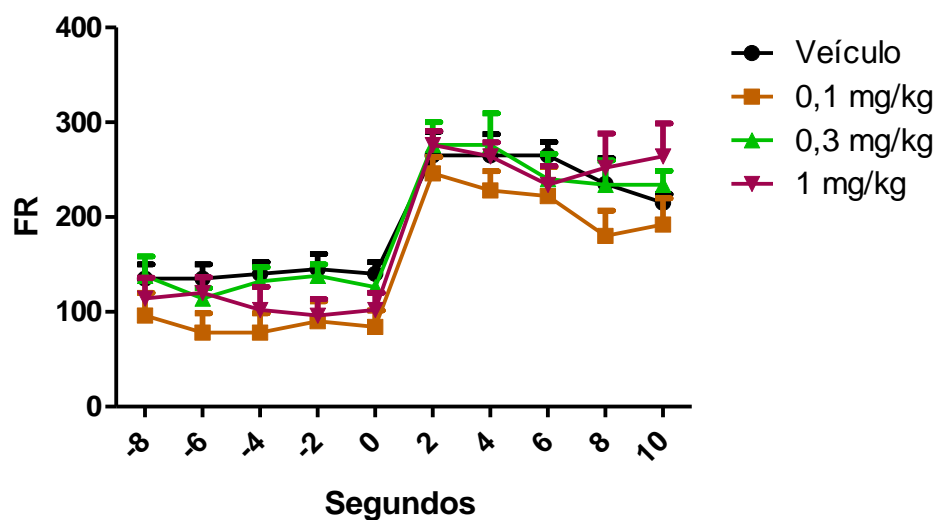


Fig. 32 Curva dose-resposta do URB597 na hiperventilação induzida pelo doxapram (5 mg/kg). N=6,5,5,5.

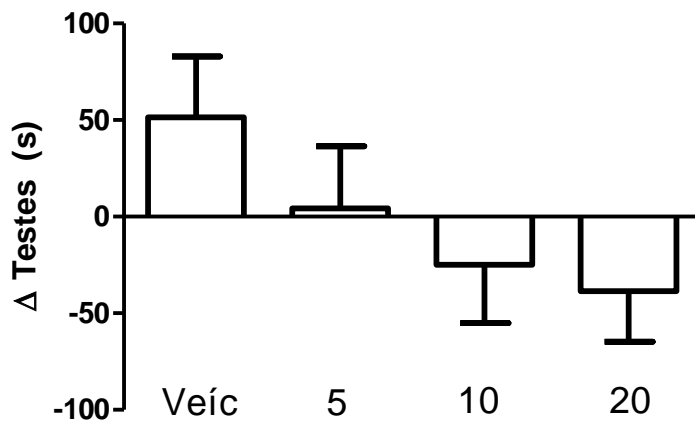


Fig. 33 Efeito do doxapram na aversão condicionada ao lugar. Variação entre os testes significa a diferença entre o tempo permanecido no lado pareado com a droga no dia do teste subtraído pelo tempo permanecido no lado pareado com a droga no dia do pré-teste. N=13,9,9,13

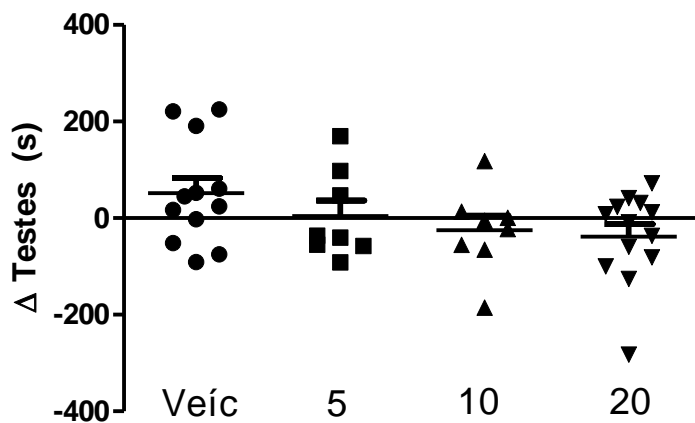


Fig. 34 Distribuição dos dados individuais relativos ao gráfico X

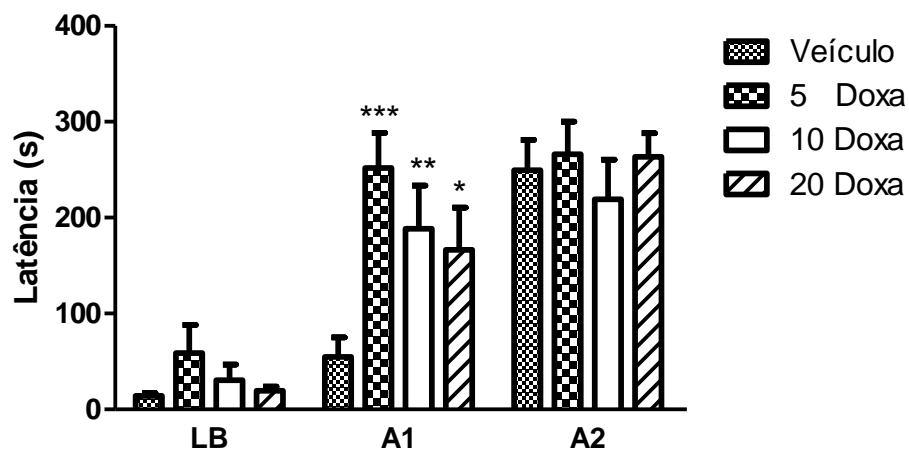


Fig 35 Efeito de 3 doses de doxapram e veículo na latência da esquiiva inibitória. LB refere-se à linha de base, E1 e E2 à esquiiva 1 e 2. Média \pm EPM, *** $p < 0,0001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$, ANOVA de duas vias e teste de Bonferroni. $n = 9, 8, 9, 9$.

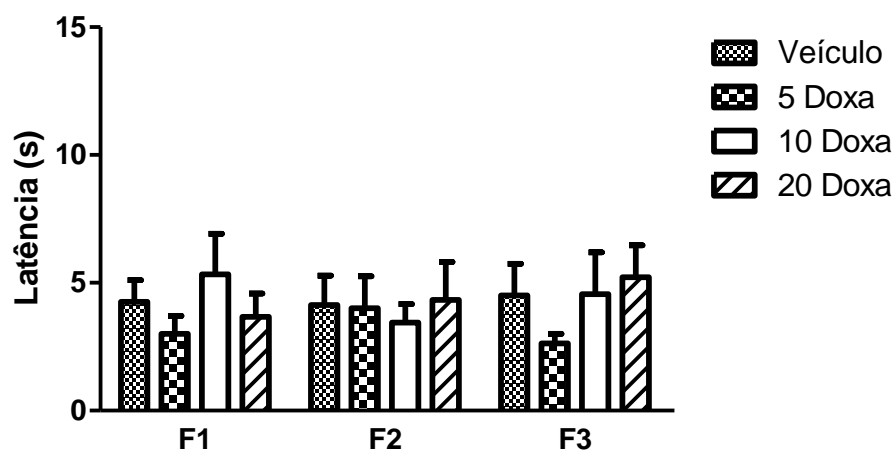


Fig 36 Efeito de 3 doses de doxapram e veículo na latência da fuga. F1, F2 e F3 referem-se à fuga 1, 2 e 3. $n = 9, 8, 9, 9$.

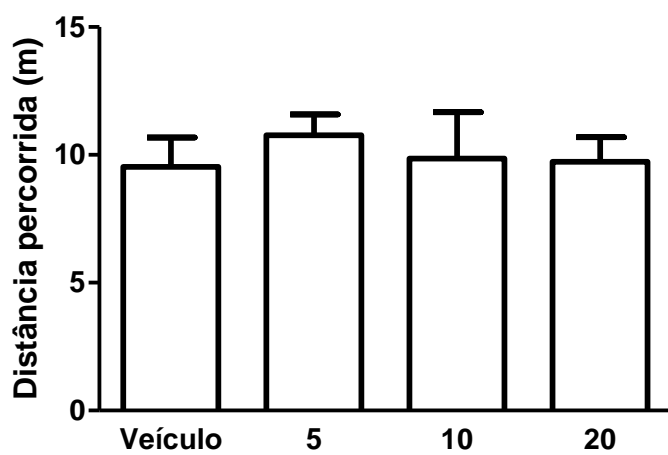
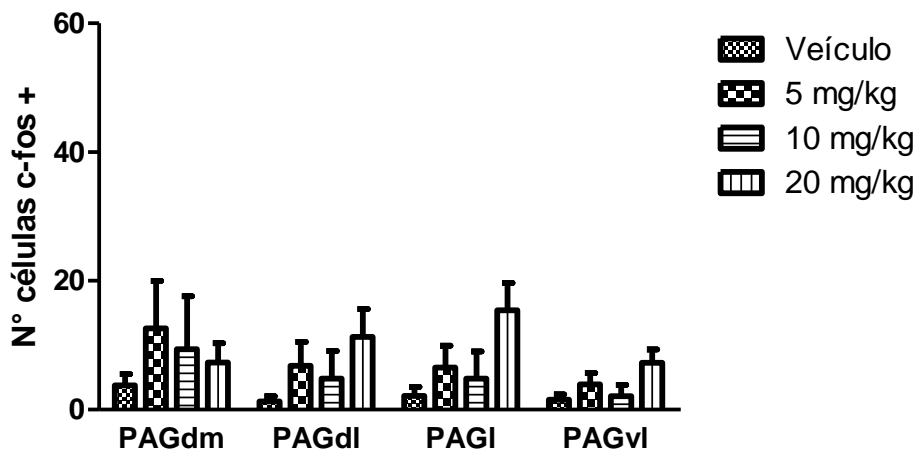
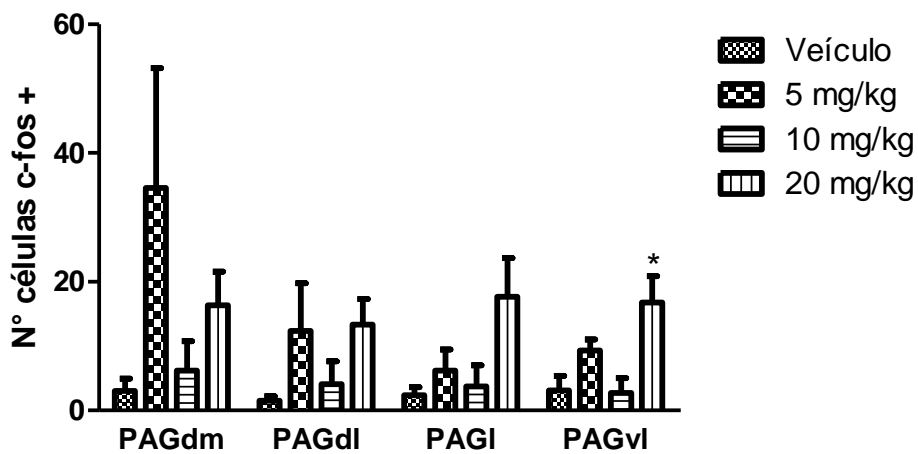


Fig. 37 Efeito de 3 doses de doxapram e veículo na locomoção basal. A locomoção foi medida durante 5 min.

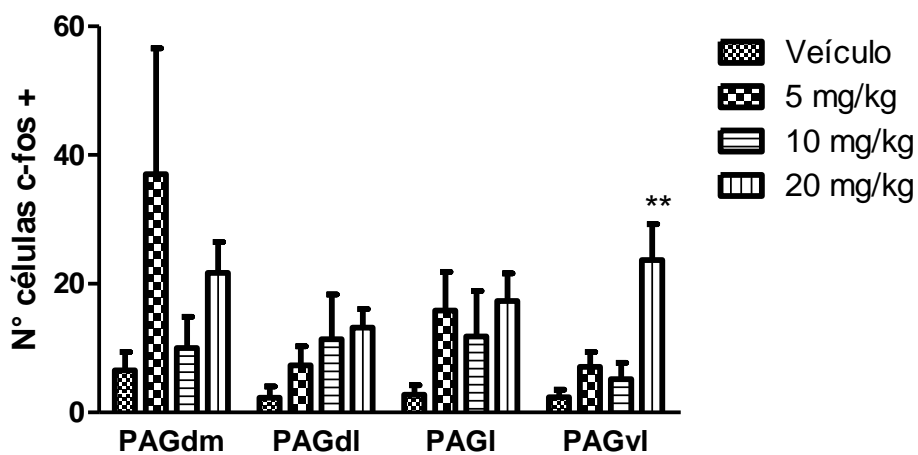
A



B



D



Fix. 38 Curva dose-resposta do doxapram na expressão de proteína c-Fos nos planos rostral (A), intermediário (B) e caudal (C) para as porções dorsomedial, dorsolateral, lateral e ventrolateral. Média±EPM *p<0,05; **p<0,01, ANOVA de uma via e teste de Newman-Keuls. n=4,5,5,6.

Discussão

7. Discussão

7.1 Envolvimento do receptor CB₁ nos efeitos anti-aversivos do alprazolam e de um agonista 5-HT_{1A}

A primeira parte desta tese objetivou avaliar a participação do receptor CB₁ nos efeitos anti-aversivos mediados pela ativação de receptores 5-HT_{1A} na dIPAG e pelo alprazolam injetado de forma sistêmica. Os resultados mostram que o efeito ansiolítico e panicolítico do alprazolam dependem de receptores CB₁. O efeito ansiolítico, mas não o panicolítico, mediado pela ativação de receptores 5-HT_{1A} na dIPAG depende de receptores CB₁ nesta estrutura.

O alprazolam é um benzodiazepínico potente e de ação rápida em relação a outras drogas desta classe, como o diazepam e o clordiazepóxido (Altamura *et al.*, 2013). Atualmente, este benzodiazepínico é considerado um fármaco de segunda escolha para o tratamento do transtorno do pânico principalmente devido aos efeitos adversos que o tratamento pode causar. Alguns desses efeitos são prejuízo psicomotor, amnésia anterógrada e sonolência (Verster *et al.*, 2002; Nardi *et al.*, 2012; Chowdhury *et al.*, 2016).

Em roedores, o alprazolam também provoca prejuízos na memória, motores e atenuação de comportamentos tipo-pânico e tipo-ansioso (Hascoet e Bourin, 1997; Vandesquille *et al.*, 2012; Gobira *et al.*, 2013). Estudos prévios demonstraram que o alprazolam apresenta um efeito ansiolítico e panicolítico no LTE (Gobira *et al.*, 2013). No presente estudo, confirmamos o efeito ansiolítico e panicolítico do alprazolam neste modelo. O pré-tratamento com o antagonista para receptor CB₁, AM251, preveniu esses efeitos anti-aversivos. De forma similar, foi demonstrado que os efeitos sedativos, ansiolíticos e amnésicos do alprazolam dependem de receptores CB₁ (Garcia-Gutierrez e Manzanares, 2010). Já em outro estudo, uma dose ineficaz de AM251 não reverteu o efeito ansiolítico do diazepam (Naderi *et al.*, 2008). Esses estudos mostram que o alprazolam e o diazepam atuam por mecanismos distintos. Tal

observação está de acordo com a utilização desses fármacos para diferentes sintomas psiquiátricos.

Em relação ao receptor CB_1 , esses resultados sugerem que o mecanismo de ação do alprazolam envolve a facilitação da sinalização endocanabinoide. Essa facilitação acontece em regiões cerebrais nas quais o alprazolam atua modulando positivamente a sinalização gabaérgica. É possível propor, portanto, que o aumento da sinalização endocanabinoide pode ser um alvo farmacológico para o tratamento do TAG e do TP.

Embora o alprazolam apresente eficácia contra o TP, o tratamento de primeira escolha é feito com antidepressivos ISRS. De acordo com a teoria serotoninérgica do transtorno do pânico, o efeito panicolítico dos antidepressivos seria mediado principalmente pela ativação de receptores $5-HT_{1A}$ na dPAG (Zangrossi *et al.*, 2001; Zanoveli *et al.*, 2010). No presente estudo, demonstramos que a ativação de receptor $5-HT_{1A}$ na dIPAG induz um efeito ansiolítico no LTE, confirmando estudos prévios. Entretanto, não observamos um efeito panicolítico. Uma explicação para essa discrepância pode ser o fato de que neste trabalho as injeções foram feitas apenas na porção dorsolateral da PAG, enquanto nos trabalhos anteriores, as injeções foram feitas na zona dorsal da PAG, o que inclui a porção dorsomedial e dorsolateral (Zanoveli *et al.*, 2003; Zanoveli, Nogueira, *et al.*, 2007). As porções dorsomedial e dorsolateral diferem em termos de projeções e neurotransmissores (Vianna e Brandao, 2003). Assim, é possível que o efeito panicolítico seja mediado por receptores $5-HT_{1A}$ principalmente na porção dorsomedial.

Os resultados deste trabalho mostram que o pré-tratamento com o AM251 preveniu o efeito ansiolítico mediado pela ativação de receptores $5-HT_{1A}$. Uma interação entre o sistema serotoninérgico e endocanabinoide já havia sido proposta para outros comportamentos. Estudos prévios demonstraram que o receptor CB_1 está envolvido no efeito agudo antidepressivo e anticomulsivo da fluoxetina (Umathe *et al.*, 2011). Além disso, a fluoxetina crônica reduz a atividade da enzima de degradação da anandamida (FAAH) na amígdala, levando a um aumento da sinalização

endocanabinoide (Gunduz-Cinar *et al.*, 2015). Um mecanismo que pode estar envolvido nos resultados observados neste trabalho é um aumento da liberação de endocanabinoides causado pela ativação de receptores 5-HT_{1A}. Outra possibilidade é uma interação molecular entre os receptores 5-HT_{1A} e CB₁. De acordo com essa ideia, foi demonstrado um prejuízo na sinalização intracelular de receptores 5-HT_{1A} no núcleo dorsal da rafe (NDR) em camundongos nocaute para o receptor CB₁ (Mato *et al.*, 2007). Outro estudo mostrou que o efeito ansiolítico e hipotérmico do agonista 8-OH-DPAT foi abolido em camundongos nocautes para receptor CB₁ (Urighuen *et al.*, 2004; Mato *et al.*, 2007). Além disso, a fluoxetina administrada de forma crônica aumenta o acoplamento de receptores CB₁ em proteínas G inibitórias via receptor 5-HT_{1A} (Mato *et al.*, 2010). Seria interessante avaliar se o efeito ansiolítico e panicolítico de antidepressivos administrados de forma crônica também dependem de receptores CB₁ na dPAG.

Como não observamos um efeito panicolítico do 8-OH-DPAT, nós avaliamos o efeito deste agonista na fuga induzida por estimulação da dPAG. A ativação de receptores do tipo NMDA na dPAG provoca um aumento da atividade locomotora e pulos, uma reação similar a que acontece quando o rato está diante de um predador (Aguiar *et al.*, 2006; Aguiar e Guimaraes, 2009). A ativação de receptores 5-HT_{1A} na dPAG atenua a fuga induzida pela injeção de ácido D,L-homocistéico, um agonista não-seletivo para receptores glutamatérgicos (Beckett e Marsden, 1997). Já o tratamento crônico com a imipramina não alterou a resposta de fuga, contudo, após tratamento com 8-OH-DPAT, a imipramina atenuou a resposta (Mongeau e Marsden, 1997). O tratamento agudo com a imipramina, entretanto, atenua a fuga induzida por estimulação elétrica da dPAG (Schenberg *et al.*, 2002). Tais resultados sugerem que a fuga induzida pela estimulação elétrica, pela ativação de receptores glutamatérgicos e pela exposição ao LTE envolvem mecanismos serotoninérgicos diferentes.

Neste trabalho, o pré-tratamento com o AM251 não reverteu o efeito panicolítico mediado por receptores 5-HT_{1A}, sugerindo que receptores CB₁ não são necessários para este efeito. Foi sugerido anteriormente que a ativação de receptores 5-HT_{1A} pode levar à síntese e liberação de endocanabinoides.

Entretanto, na presença do agonista NMDA, é possível que a quantidade de endocanabinoides liberada não seja suficiente para produzir um efeito panicolítico. De acordo com essa ideia, foi demonstrado que a ativação de receptores NMDA na medula espinhal aumenta a atividade da enzima MGL, uma enzima que degrada o endocanabinoide 2-AG (Farooqui *et al.*, 1993). Ou seja, é possível que na presença de NMDA, haja um aumento da atividade da enzima FAAH, o que prejudicaria o efeito panicolítico da anandamida. Os resultados mostram que o receptor CB₁ está envolvido no efeito ansiolítico mediado pelos receptores 5-HT_{1A} na SCPdl e nos efeitos panicolítico e ansiolítico do alprazolam.

Considerando-se os resultados apresentados até então, é possível propor a facilitação da sinalização endocanabinoide como uma possível estratégia terapêutica para o tratamento de transtornos da ansiedade. Entretanto, a utilização de um agonista pleno ou parcial para receptores CB₁ possui desvantagens similares às desvantagens do alprazolam. Agonistas plenos para receptor CB₁ produzem em roedores efeitos amnésicos, hiperlocomoção e sedação (Baek *et al.*, 2009; Polissidis *et al.*, 2013). Além disso, eles provocam sintomas tipo-psicóticos (Brosda *et al.*, 2011). Da mesma forma, o agonista parcial Δ-9-THC também produz em seres humanos efeitos amnésicos, prejuízo motor, e sintomas psicóticos (D'souza *et al.*, 2004). Uma estratégia diferente para se aumentar a sinalização endocanabinoide sem obter esses efeitos indesejados é por meio da utilização de inibidores da degradação de endocanabinoides (Batista *et al.*, 2014).

Diversas revisões foram publicadas ao longo da última década defendendo a hipótese de que os inibidores da degradação da anandamida e do 2-AG apresentam efeitos ansiolíticos e panicolíticos em modelos animais (Blankman e Cravatt, 2013; Griebel e Holmes, 2013; Batista *et al.*, 2014; Fowler, 2015b).- PATEL 2017 Neste trabalho, foi avaliado o possível efeito panicolítico da inibição da hidrólise de anandamida em dois modelos animais de ataque de pânico.

7.2 Canabinoides e KCN

Na segunda parte deste trabalho foi avaliado o potencial panicolítico de diversas drogas que atuam no sistema endocanabinoide no modelo da fuga induzida por injeção de KCN. Nenhuma das drogas testadas apresentou um efeito panicolítico. Entretanto, o alprazolam reduziu a duração da fuga e aboliu o aumento da resposta pressora provocados pelo KCN.

A validação farmacológica de modelos animais de ataque de pânico mostra que, em geral, antidepressivos administrados de forma crônica ou benzodiazepínicos de alta potência administrados de forma aguda atenuam o comportamento tipo-pânico (Schenberg *et al.*, 2001; Zangrossi e Graeff, 2014). De acordo com esses resultados, foi demonstrado que a administração aguda de clonazepam e o tratamento por 21 dias com a fluoxetina reduzem a duração da fuga induzida por KCN, indicando um efeito panicolítico (Schimitel *et al.*, 2014). No presente trabalho, todas as doses de alprazolam reduziram a duração da fuga sem alterar a locomoção basal.

Estudos prévios demonstraram que a fuga induzida pela injeção de KCN depende da integridade de neurônios da SCPdl e do HDM, ambas as regiões fazem parte do sistema neural de defesa (Queiroz *et al.*, 2011; Schimitel *et al.*, 2012). Essa observação juntamente com a validação farmacológica do modelo sugere que a resposta comportamental do quimiorreflexo pode ser interpretada como um comportamento defensivo de fuga.

Em relação ao componente cardiovascular do quimiorreflexo, os resultados mostram que o alprazolam aboliu a resposta pressora. Este benzodiazepínico também é eficaz em reduzir a resposta pressora de ratos vulneráveis ao pânico que receberam lactato de sódio (Johnson *et al.*, 2013). Esses resultados sugerem que o alprazolam atenua a resposta simpática induzida por estímulos que ativam o sistema de detecção de sufocação.

Uma hipótese plausível é que o sistema endocanabinoide seja recrutado em situações aversivas, como aquelas relacionadas à dor, à memória do medo ou a reações de fuga, a fim de se contrapor ao estado aversivo gerado (Walker *et al.*, 1999; Hohmann *et al.*, 2005; Olango *et al.*, 2012; Viana *et al.*, 2015). Neste estudo, avaliamos se a inibição da hidrólise de anandamida pelo URB597 atenuaria a reação de fuga induzida pelo KCN. O URB597 apresenta

um potencial terapêutico, pois é bem tolerado em primatas não-humanos e apresenta efeitos ansiolítico e panicolítico em modelos animais (Stewart e McMahon, 2011; Batista *et al.*, 2014; Fowler, 2015a). Entretanto, neste estudo, não foi observado um efeito panicolítico do URB597.

A literatura mostra que a anandamida também se liga a receptores TRPV1, induzindo um efeito ansiogênico e panicogênico (Aguiar *et al.*, 2014). Assim, testamos a hipótese de que a inibição da hidrólise de anandamida juntamente ao bloqueio de receptores TRPV1 poderia exercer um efeito panicolítico. Novamente, os resultados não deram suporte à hipótese. Como a anandamida é sintetizada sob demanda, hipotetizamos que o nível de anandamida sintetizada e liberada poderia não ser suficiente para induzir um efeito panicolítico, sendo assim, testamos um agonista pleno para receptor CB₁. O WIN,55-212-2 também não reduziu a duração da fuga. Finalmente, testamos o potencial panicolítico do canabidiol, uma droga com múltiplos mecanismos de ação, incluindo inibição da hidrólise de anandamida e ativação de receptores 5-HT_{1A} (Russo *et al.*, 2005; Campos *et al.*, 2013). O canabidiol não alterou a duração da fuga. Uma possível explicação para a ausência de efeitos encontrada poderia ser o fato de que a linha de base para o comportamento tipo-pânico induzida pelo KCN estaria muito baixa para se observar um efeito panicolítico. Geralmente, manipula-se o nível de aversão de modelos animais de ansiedade para facilitar a observação de um efeito anti-aversivo ou aversivo, sendo que uma maior aversão permite a observação de efeitos ansiolíticos e uma menor aversão permite a observação de efeitos ansiogênicos (Haller *et al.*, 2009; Haller *et al.*, 2013). Neste trabalho, observamos que uma maior dose de KCN não aumentou a duração da fuga.

Os resultados encontrados nesta parte do trabalho não estão em acordo uma extensa literatura que mostra que essas drogas apresentam efeitos anti-aversivos. Uma característica importante de modelos animais de ataque de pânico é a capacidade que o modelo possui de detectar novos agentes panicolíticos com mecanismos de ação diferentes (Moreira *et al.*, 2013). Caso contrário, o modelo estaria limitado a encontrar agentes farmacológicos similares aos já utilizados na prática clínica. Considerando-se essa observação,

os resultados obtidos neste estudo poderiam ser considerados falsos-negativos.

Outra interpretação para esses resultados é a de que as drogas testadas podem não ser boas candidatas ao desenvolvimento de drogas panicolíticas. Por exemplo, o Δ -9-THC, um agonista parcial de receptores CB₁, está associado a efeitos ansiogênicos em humanos (Burkey *et al.*, 1997; Martin-Santos *et al.*, 2012). Além disso, doses altas de agonistas sintéticos apresentam efeitos ansiogênicos em modelos animais de ansiedade (Viveros *et al.*, 2005; Rey *et al.*, 2012). Em relação a drogas que aumentam a sinalização da anandamida, não há uma associação com efeitos ansiogênicos, entretanto, o efeito desta droga depende da síntese do ligante, que pode não ser o suficiente para se produzir um efeito terapêutico. Mais estudos são necessários para se avaliar um possível efeito panicolítico do 2-AG.

Em relação à proposta de que a fuga mediada pela ativação de quimiorreceptores possa representar um comportamento tipo-pânico, há estudos que mostram que não há diferenças entre o limiar para a resposta do quimiorreflexo de pacientes que apresentam o transtorno do pânico e voluntários sem o transtorno (Struzik *et al.*, 2001; Katzman *et al.*, 2002; Struzik *et al.*, 2002). Como concluído pelo estudo de Katzman *et al.* (2002), o quimiorreflexo pode não estar envolvido na causa do ataque de pânico, mas sim, correlacionar-se ao fenômeno, estando envolvido, portanto, na gênese do ataque.

Recentemente, foram desenvolvidos modelos animais de ataque de pânico baseados na teoria do alarme falso de sufocação, como a fuga induzida por KCN, a fuga induzida por hipóxia e as respostas comportamentais e cardiovasculares à injeção de lactato (Johnson e Shekhar, 2006; Schimitel *et al.*, 2012; Spiacci *et al.*, 2015). Tais modelos podem refletir os mecanismos envolvidos no subtipo respiratório do ataque de pânico no qual os sintomas respiratórios são mais evidentes. De forma a complementar os resultados obtidos com o modelo da fuga induzida por KCN, avaliamos o potencial panicolítico do URB597 nas respostas ventilatórias induzidas pelo doxapram. Além disso, foi realizada uma caracterização comportamental e molecular do

doxapram para se investigar o potencial desta droga como agente panicogênico em ratos.

7.3 Doxapram e canabinoides

Os efeitos do doxapram em ratos acordados são pouco caracterizados. Este estimulante respiratório é utilizado principalmente para o estudo dos mecanismos envolvidos no quimiorreflexo. O doxapram possivelmente atua por meio da ativação de quimiorreceptores periféricos sensíveis à hipóxia, já que a deservação do corpo carotídeo abole as respostas ventilatórias induzidas pelo doxapram (Nishino *et al.*, 1982; Mizusawa *et al.*, 1994). A injeção de 2 mg/kg de doxapram em ratos provoca hiperventilação e liberação de glutamato no núcleo do trato solitário (Mizusawa *et al.*, 1994). Sugere-se que doses maiores leve à ativação direta e não-seletiva de neurônios bulbares respiratórios. Assim, o mecanismo de ação do composto varia dependendo da dose utilizada.

No presente estudo todas as doses testadas elevaram a frequência respiratória, a pressão arterial média e a frequência cardíaca. Não foi observada uma resposta comportamental consistente de fuga ou agitação, como é observado com a injeção de KCN. Entretanto, é importante salientar que em 3 animais de 6 que receberam a dose intermediária foi observado um aumento súbito e breve da locomoção em direção à borda da caixa, similar a um comportamento de fuga. Curiosamente, os animais que receberam a menor dose de doxapram, quando confinados à caixa para registro pletismográfico, apresentaram uma agitação e giros na caixa com duração de 2 a 6 segundos imediatamente após a infusão de doxapram. Essa movimentação dificultou o registro do volume corrente dos animais.

Em relação ao papel do sistema respiratório no transtorno do pânico, evidências mostram que pacientes diagnosticados com o TP apresentam irregularidades respiratória, como hiperventilação basal, maior variabilidade de volume corrente, suspiros frequentes e apneia durante o sono (Ley, 1998; Abelson *et al.*, 2001; Nardi, 2009; Grassi *et al.*, 2014). A injeção intravenosa *in*

bolus de doxapram nesses pacientes provoca uma hiperventilação que é maior do que a observada em pacientes sem o diagnóstico (Abelson, Nesse, *et al.*, 1996). Isso sugere que os mecanismos envolvidos no quimiorreflexo são mais sensíveis nos pacientes com o TP. De forma muito interessante, uma intervenção cognitiva é capaz de reduzir tanto a sensação subjetiva associada ao ataque de pânico quanto a hiperventilação e a taquicardia provocadas pelo doxapram (Abelson, Nesse, *et al.*, 1996). Tal observação sugere a possibilidade de uma modulação *top-down* dos centros respiratórios.

Baseado nos estudos que sugerem um papel para o sistema respiratório no desenvolvimento do TP, a hiperventilação provocada pelo doxapram foi utilizada como parâmetro tipo-pânico para o estudo de drogas panicolíticas (Kinkead *et al.*, 2014). Variações na pressão arterial e na frequência cardíaca também são observadas nos indivíduos com o transtorno, entretanto, manipulações farmacológicas do sistema cardiovascular, como o uso de β -bloqueadores, não apresentam eficácia no tratamento do transtorno (Johnson *et al.*, 2014; Steenen *et al.*, 2016). Esses parâmetros, portanto, apresentariam pouca preditabilidade farmacológica.

O pré-tratamento com o alprazolam atenuou a hiperventilação causada pelo doxapram nos segundos iniciais à injeção. Este resultado está de acordo com o efeito panicolítico desta droga nos modelos do LTE, da fuga induzida por estimulação da SCPd e da fuga induzida pelo KCN (Jenck *et al.*, 1995; Gobira *et al.*, 2013). Além disso, o alprazolam também reduz a hiperventilação provocada pela injeção intravenosa de lactato em ratos “vulneráveis ao pânico” (Shekhar e Keim, 2000). A hiperventilação induzida pelo doxapram parece apresentar preditabilidade farmacológica para drogas panicolíticas, embora mais estudos com outros fármacos sejam necessários para se confirmar a preditabilidade farmacológica do modelo. O alprazolam pode exercer seu efeito por meio da facilitação da sinalização gabaérgica nos centros respiratórios do bulbo ou em estruturas prosencefálicas em um mecanismo *top-down* de regulação.

De forma a complementar os resultados obtidos neste trabalho com o modelo da fuga induzida por KCN, testamos o potencial panicolítico do

URB597 na hiperventilação induzida pelo doxapram. Corroborando os resultados encontrados neste estudo, o URB597 não apresentou um efeito panicolítico. A menor dose de URB597 pareceu reduzir a frequência respiratória basal dos animais, entretanto, essa redução não levou a uma atenuação da hiperventilação após a injeção de doxapram. Poucos estudos investigaram o papel do sistema endocanabinoide no quimiorreflexo ou na modulação da respiração. Os resultados apresentados aqui sugerem que o sistema não apresenta um papel relevante na modulação do quimiorreflexo. Entretanto, estudos com injeções intra-cerebrais podem revelar outro papel para o sistema.

Além das respostas cardiorrespiratórias, foi avaliado se o doxapram apresenta propriedades aversivas no modelo da aversão condicionada ao lugar. O estudo da preferência ou aversão condicionada ao lugar permite caracterizar a droga como apresentando propriedades reforçadoras ou não (Huston *et al.*, 2013). O modelo é classicamente utilizado para o estudo das drogas de abuso, estas induzem uma preferência condicionada ao lugar (Huston *et al.*, 2013). Foi demonstrado que drogas ansiolíticas, como o diazepam e o alprazolam também induzem preferência ao lugar (File, 1986). Já drogas ansiogênicas, como a yohimbina e a picrotoxina, produzem uma aversão condicionada ao lugar (File, 1986). A estimulação da SCPd também funciona como um estímulo aversivo que induz aversão condicionada ao lugar (Zanoveli, Ferreira-Netto, *et al.*, 2007). No presente estudo, nenhuma das doses de doxapram apresentou uma propriedade aversiva no modelo da aversão condicionada ao lugar. A ausência de efeitos pode ser devido ao protocolo utilizado. É possível que um maior tempo de condicionamento induza essa aversão. Além disso, a linha de corte para a preferência basal dos animais por um dos lados da caixa pode ser alterada de modo a reduzir a variabilidade.

Em seguida, avaliamos se o doxapram apresenta propriedades aversivas no modelo do LTE. Observamos que todas as doses de doxapram aumentaram a latência da esquiva inibitória, indicando um efeito ansiogênico. Porém, a latência da fuga não foi alterada, sugerindo que a droga não apresenta um efeito panicogênico, contrariando a nossa hipótese inicial. Ainda

assim, a detecção do efeito ansiogênico não descarta a hipótese mais geral de que a droga apresenta propriedades aversivas.

Finalmente, com o objetivo de se investigar possíveis locais de ação do doxapram no sistema nervoso central, avaliamos o padrão de expressão da proteína c-Fos na SCP em três planos. A SCP foi escolhida devido ao seu possível papel na gênese do ataque de pânico, como proposto pela teoria serotoninérgica do transtorno do pânico (Paul *et al.*, 2014; Schenberg *et al.*, 2014). Nossos resultados mostram que a maior dose de doxapram aumenta a expressão de proteína c-Fos na porção ventrolateral da estrutura nos planos intermediário e caudal.

A porção ventrolateral da SCP está envolvida em respostas de defesa passiva, como a imobilidade (Zhang *et al.*, 1990; Bandler e Keay, 1996). Essa imobilidade seria posterior a um comportamento ativo de defesa, como a fuga e, portanto, estaria relacionado a um processo de recuperação de uma situação aversiva (Brandao *et al.*, 2008). Outra hipótese sugere que a SCPvl estaria relacionada ao congelamento induzido pelo protocolo de medo condicionado ao contexto (Carrive *et al.*, 1997). Esse congelamento dependeria de uma via entre a amígdala e a SCPvl (Carrive *et al.*, 2000). De acordo com essa hipótese, foi demonstrado que o doxapram injetado via intraperitoneal induz aumento da expressão de proteína c-Fos na amígdala central de ratos (Sullivan, Gregory M. *et al.*, 2003). Além disso, o doxapram aumenta o tempo de congelamento em um protocolo de medo condicionado ao contexto ou ao som (Sullivan, G. M. *et al.*, 2003). Esse efeito pró-aversivo do doxapram pode envolver tanto a amígdala central, como previamente demonstrado, e a SCPvl. Entretanto, é importante salientar que uma dose de doxapram similar à dose do estudo de Sullivan não levou ao aumento da expressão de c-Fos na SCP. Além disso, no estudo de Sullivan, a injeção foi feita via intraperitoneal. As diferentes doses e vias de administração dificultam a relação entre os dois estudos. Experimentos futuros do nosso laboratório pretendem investigar o efeito da injeção intravenosa de doxapram na expressão da proteína c-Fos na amígdala.

A injeção intravenosa de doxapram em ratos expostos a um campo aberto não induz um comportamento de fuga consistente. A maior dose de

doxapram induz uma hiperventilação visível, acompanhado de certo grau de imobilidade. Entretanto, essa imobilidade parece estar relacionada à dificuldade de locomoção durante o período de hiperventilação, não aparentando ser um comportamento defensivo.

Em relação ao papel da SCPvI na modulação da resposta à hipóxia, estudos prévios demonstraram que uma lesão nessa região não altera a resposta cardiorrespiratória à hipóxia (Lopes *et al.*, 2014). De acordo com esse resultado, outro estudo mostrou que a SCPvI não é ativada durante a estimulação do corpo carotídeo (Casanova *et al.*, 2013). É possível hipotetizar que em doses altas, o doxapram aja diretamente na SCPvI e, possivelmente, em outras regiões da SCP.

Em relação às outras regiões da estrutura, uma lesão na região dorsal (porções dorsomedial e dorsolateral) leva a um aumento da resposta ventilatória durante uma situação de hipóxia (Lopes *et al.*, 2014). No presente estudo, não foi observado um aumento significativo na expressão de c-Fos na porção dorsal, isso pode ser devido ao fato de que o número de animais por grupo está muito baixo e com alta variabilidade. Assim, mais experimentos são necessários para que se confirme o papel dessa região no efeito do doxapram.

Estudos recentes investigaram os possíveis locais de ação do KCN, um estimulador de quimiorreceptores periféricos (Muller *et al.*, 2017). A injeção intravenosa de KCN levou à ativação da porção lateral no plano rostral e da porção ventrolateral na porção caudal (Muller *et al.*, 2017). Este último resultado está de acordo com os achados encontrados neste trabalho. Dessa forma, embora estudos anteriores não tenham observado um papel relevante da SCPvI durante a hipóxia, os resultados encontrados no estudo de Muller e neste trabalho, propõe um papel para essa estrutura nos efeitos do KCN e do doxapram.

Conclusões

8. Conclusões

A primeira parte do trabalho sugere que a facilitação da sinalização mediada pelo receptor CB_1 está envolvida no mecanismo anti-aversivo do alprazolam e de agonistas do receptor $5HT_{1A}$. Os modelos utilizados para esta parte do trabalho foram extensamente validados farmacologicamente e, portanto, apresentam utilidade para o estudo do substrato neural do transtorno do pânico. Contudo, pouco se sabe sobre o potencial desses modelos para o desenvolvimento de novos fármacos. A maioria dos estudos nessa área utiliza modelos clássicos de ansiedade, como o labirinto em cruz elevado e a caixa claro-escuro. Porém, preditabilidade farmacológica para drogas ansiolíticas e panicolíticas desses modelos é baixa. Assim, estudos clínicos são necessários para que se conheça a real preditabilidade farmacológica dos modelos de pânico utilizados nesta parte do trabalho.

Estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa confirmaram o potencial panicolítico de drogas que atuam no sistema endocanabinoide. Fármacos, como o alprazolam ou antidepressivos, podem ter sua eficácia potencializada por meio de manipulações do sistema endocanabinoide, por exemplo. Entretanto, neste trabalho foi demonstrada uma ausência de efeitos panicolíticos para diversas drogas que atuam no sistema endocanabinoide. O modelo da fuga induzida por KCN e a hiperventilação induzida pelo doxapram podem estar mais relacionados ao subtipo respiratório do transtorno do pânico. Dessa forma, os canabinoides podem não apresentar eficácia para esse subtipo de transtorno. Apesar dessa observação, o sistema endocanabinoide ainda pode ser considerado como um possível alvo farmacológico para o desenvolvimento de drogas panicolíticas, haja vista a heterogeneidade do transtorno.

Em relação à caracterização dos efeitos do doxapram, conclui-se que a droga apresenta uma propriedade ansiogênica e que a hiperventilação pode ser utilizada como um parâmetro para a investigação de drogas panicolíticas. Baixas doses de doxapram parecem não recrutar a SCP, enquanto a maior dose leva à ativação da porção ventrolateral da estrutura. Mais estudos são necessários para que se esclareça o papel funcional da SCP nos efeitos do

doxapram e também para que se conheça o papel de outras estruturas, como a amígdala e o hipotálamo nos efeitos do doxapram.

Como conclusão, o ataque de pânico pode ser estudado tanto por meio de modelos que envolvem a ativação da SCP quanto por meio da estimulação do quimiorreflexo. Parâmetros autonômicos podem apresentar preditabilidade farmacológica e relevância para o estudo do substrato neural dos sintomas respiratórios do transtorno do pânico. Em relação ao sistema endocanabinoide, este parece estar mais envolvido em modelos que envolvem estimulação direta da SCP, possivelmente devido ao maior nível de aversividade do modelo. O sistema endocanabinoide, portanto, pode estar mais envolvido em alguns tipos de manifestações de ataque de pânico, como aquelas nas quais os sintomas cognitivos são mais proeminentes.

Referências

9. Referências

ABELSON, J. L. et al. Respiratory psychophysiology and anxiety: cognitive intervention in the doxapram model of panic. **Psychosom Med**, v. 58, n. 4, p. 302-13, Jul-Aug 1996. ISSN 0033-3174 (Print)

0033-3174 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8827792> >.

ABELSON, J. L. et al. Neuroendocrine responses to laboratory panic: cognitive intervention in the doxapram model. **Psychoneuroendocrinology**, v. 21, n. 4, p. 375-90, May 1996. ISSN 0306-4530 (Print)

0306-4530 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8844876> >.

_____. Persistent respiratory irregularity in patients with panic disorder. **Biol Psychiatry**, v. 49, n. 7, p. 588-95, Apr 01 2001. ISSN 0006-3223 (Print)

0006-3223 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11297716> >.

AGUIAR, D. C.; GUIMARAES, F. S. Blockade of NMDA receptors and nitric oxide synthesis in the dorsolateral periaqueductal gray attenuates behavioral and cellular responses of rats exposed to a live predator. **J Neurosci Res**, v. 87, n. 11, p. 2418-29, Aug 15 2009. ISSN 1097-4547 (Electronic)

0360-4012 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19360885> >.

AGUIAR, D. C.; MOREIRA, F. A.; GUIMARAES, F. S. Flight reactions induced by injection of glutamate N-methyl-d-aspartate receptor agonist into the rat dorsolateral periaqueductal gray are not dependent on endogenous nitric oxide. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 83, n. 2, p. 296-301, Feb 2006. ISSN 0091-3057 (Print)

0091-3057 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16546244> >.

AGUIAR, D. C. et al. Modulation of defensive behavior by Transient Receptor Potential Vanilloid Type-1 (TRPV1) channels. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 46 Pt 3, p. 418-28, Oct 2014. ISSN 1873-7528 (Electronic)

0149-7634 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24726577> >.

ALGER, B. E.; KIM, J. Supply and demand for endocannabinoids. **Trends Neurosci**, v. 34, n. 6, p. 304-15, Jun 2011. ISSN 1878-108X (Electronic)

0166-2236 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21507493> >.

ALMEIDA-SANTOS, A. F. et al. Modulation of anxiety-like behavior by the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol (2-AG) in the dorsolateral periaqueductal gray. **Behav Brain Res**, v. 252, p. 10-7, Sep 1 2013. ISSN 1872-7549 (Electronic)

0166-4328 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23714073> >.

ALMEIDA-SANTOS, A. F. et al. Role of TRPV1 receptors on panic-like behaviors mediated by the dorsolateral periaqueductal gray in rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 105, p. 166-72, Apr 2013. ISSN 1873-5177 (Electronic)

0091-3057 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23474373> >.

ALTAMURA, A. C. et al. Understanding the pharmacokinetics of anxiolytic drugs. **Expert Opin Drug Metab Toxicol**, v. 9, n. 4, p. 423-40, Apr 2013. ISSN 1744-7607 (Electronic)

1742-5255 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23330992> >.

AMARAL, J. M. et al. The carbon dioxide challenge test in panic disorder: a systematic review of preclinical and clinical research. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 35, n. 3, p. 318-31, Jul-Sep 2013. ISSN 1809-452X (Electronic)

1516-4446 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24142095> >.

ASMUNDSON, G. J.; TAYLOR, S.; SMITS, J. A. Panic disorder and agoraphobia: an overview and commentary on DSM-5 changes. **Depress Anxiety**, v. 31, n. 6, p. 480-6, Jun 2014. ISSN 1520-6394 (Electronic)

1091-4269 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24865357> >.

BAEK, J. et al. The CB1 receptor agonist, WIN 55,212-2, dose-dependently disrupts object recognition memory in adult rats. **Neurosci Lett**, v. 464, n. 1, p. 71-3, Oct 16 2009. ISSN 1872-7972 (Electronic)

0304-3940 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19666083> >.

BALDWIN, D. S. et al. Evidence-based pharmacological treatment of anxiety disorders, post-traumatic stress disorder and obsessive-compulsive disorder: a revision of the 2005 guidelines from the British Association for Psychopharmacology. **J Psychopharmacol**, v. 28, n. 5, p. 403-39, May 2014. ISSN 1461-7285 (Electronic)

0269-8811 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24713617> >.

BALON, R. et al. Lactate- and isoproterenol-induced panic attacks in panic disorder patients and controls. **Psychiatry Res**, v. 23, n. 2, p. 153-60, Feb 1988. ISSN 0165-1781 (Print)

0165-1781 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3363024> >.

BANDELOW, B. et al. World Federation of Societies of Biological Psychiatry (WFSBP) guidelines for the pharmacological treatment of anxiety, obsessive-compulsive and post-traumatic stress disorders - first revision. **World J Biol Psychiatry**, v. 9, n. 4, p. 248-312, 2008. ISSN 1562-2975 (Print)

1562-2975 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18949648> >.

BANDLER, R.; KEAY, K. A. Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray and the integration of emotional expression. **Prog Brain Res**, v. 107, p. 285-300, 1996. ISSN 0079-6123 (Print)

0079-6123 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8782526> >.

BATISTA, L. A.; BASTOS, J. R.; MOREIRA, F. A. Role of endocannabinoid signalling in the dorsolateral periaqueductal grey in the modulation of distinct panic-like responses. **J Psychopharmacol**, v. 29, n. 3, p. 335-43, Mar 2015. ISSN 1461-7285 (Electronic)

0269-8811 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25601395> >.

BATISTA, L. A. et al. Inhibition of endocannabinoid neuronal uptake and hydrolysis as strategies for developing anxiolytic drugs. **Behav Pharmacol**, v. 25, n. 5-6, p. 425-33, Sep 2014. ISSN 1473-5849 (Electronic)

0955-8810 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25083569> >.

BECKETT, S.; MARSDEN, C. A. The effect of central and systemic injection of the 5-HT_{1A} receptor agonist 8-OHDPAT and the 5-HT_{1A} receptor antagonist WAY100635 on periaqueductal grey-induced defence behaviour. **Journal of Psychopharmacology**, v. 11, n. 1, p. 35-40, 1997. ISSN 0269-8811.

BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C. Antipredator defensive behaviors in a visible burrow system. **J Comp Psychol**, v. 103, n. 1, p. 70-82, Mar 1989a. ISSN 0735-7036 (Print)

0021-9940 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2924531> >.

_____. Attack and defense in rodents as ethoexperimental models for the study of emotion. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 13 Suppl, p. S3-14, 1989b. ISSN 0278-5846 (Print)

0278-5846 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2694228> >.

_____. Bringing natural behaviors into the laboratory: a tribute to Paul MacLean. **Physiol Behav**, v. 79, n. 3, p. 515-24, Aug 2003. ISSN 0031-9384 (Print)

0031-9384 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12954446> >.

BLANCHARD, R. J. et al. The characterization and modelling of antipredator defensive behavior. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 14, n. 4, p. 463-72, Winter 1990. ISSN 0149-7634 (Print)

0149-7634 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2287483> >.

BLANKMAN, J. L.; CRAVATT, B. F. Chemical probes of endocannabinoid metabolism. **Pharmacol Rev**, v. 65, n. 2, p. 849-71, Apr 2013. ISSN 1521-0081 (Electronic)

0031-6997 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23512546> >.

BRANDAO, M. L. et al. Different patterns of freezing behavior organized in the periaqueductal gray of rats: association with different types of anxiety. **Behav Brain Res**, v. 188, n. 1, p. 1-13, Mar 17 2008. ISSN 0166-4328 (Print)

0166-4328 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18054397> >.

BRIGGS, A. C.; STRETCH, D. D.; BRANDON, S. Subtyping of panic disorder by symptom profile. **Br J Psychiatry**, v. 163, p. 201-9, Aug 1993. ISSN 0007-1250 (Print)

0007-1250 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8075912> >.

BROSDA, J. et al. Pharmacological and parametrical investigation of prepulse inhibition of startle and prepulse elicited reactions in Wistar rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 99, n. 1, p. 22-8, Jul 2011. ISSN 1873-5177 (Electronic)

0091-3057 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21447356> >.

BURKEY, T. H. et al. delta 9-Tetrahydrocannabinol is a partial agonist of cannabinoid receptors in mouse brain. **Eur J Pharmacol**, v. 323, n. 2-3, p. R3-4, Apr 4 1997. ISSN 0014-2999 (Print)

0014-2999 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9128853> >.

BURKI, N. K. Ventilatory effects of doxapram in conscious human subjects. **Chest**, v. 85, n. 5, p. 600-4, May 1984. ISSN 0012-3692 (Print)

0012-3692 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6425020> >.

BUSQUETS-GARCIA, A. et al. Differential role of anandamide and 2-arachidonoylglycerol in memory and anxiety-like responses. **Biol Psychiatry**, v. 70, n. 5, p. 479-86, Sep 1 2011. ISSN 1873-2402 (Electronic)

0006-3223 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21684528> >.

CAMPOS, A. C. et al. Involvement of serotonin-mediated neurotransmission in the dorsal periaqueductal gray matter on cannabidiol chronic effects in panic-like responses in rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 226, n. 1, p. 13-24, Mar 2013. ISSN 1432-2072 (Electronic)

0033-3158 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23007604> >.

CANTERAS, N. S. The medial hypothalamic defensive system: hodological organization and functional implications. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 71, n. 3, p. 481-91, Mar 2002. ISSN 0091-3057 (Print)

0091-3057 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11830182> >.

CANTERAS, N. S.; GRAEFF, F. G. Executive and modulatory neural circuits of defensive reactions: implications for panic disorder. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 46 Pt 3, p. 352-64, Oct 2014. ISSN 1873-7528 (Electronic)

0149-7634 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24709069> >.

CARRIVE, P.; LEE, J.; SU, A. Lidocaine blockade of amygdala output in fear-conditioned rats reduces Fos expression in the ventrolateral periaqueductal gray. **Neuroscience**, v. 95, n. 4, p. 1071-80, 2000. ISSN 0306-4522 (Print)

0306-4522 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10682714> >.

CARRIVE, P. et al. Conditioned fear to context is associated with increased Fos expression in the caudal ventrolateral region of the midbrain periaqueductal gray. **Neuroscience**, v. 78, n. 1, p. 165-77, May 1997. ISSN 0306-4522 (Print)

0306-4522 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9135098> >.

CASANOVA, J. P. et al. Effect of insular cortex inactivation on autonomic and behavioral responses to acute hypoxia in conscious rats. **Behav Brain Res**, v. 253, p. 60-7, Sep 15 2013. ISSN 1872-7549 (Electronic)

0166-4328 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23860120> >.

CASAROTTO, P. C. et al. Opposing roles for cannabinoid receptor type-1 (CB1) and transient receptor potential vanilloid type-1 channel (TRPV1) on the modulation of panic-like responses in rats. **Neuropsychopharmacology**, v. 37, n. 2, p. 478-86, Jan 2012. ISSN 1740-634X (Electronic)

0893-133X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21937980> >.

CHOI, S. H. et al. Doxapram increases corticotropin-releasing factor immunoreactivity and mRNA expression in the rat central nucleus of the amygdala. **Peptides**, v. 26, n. 11, p. 2246-51, Nov 2005. ISSN 0196-9781 (Print)

0196-9781 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16269353> >.

CHOWDHURY, Z. S. et al. The Effect of Chronic Alprazolam Intake on Memory, Attention, and Psychomotor Performance in Healthy Human Male Volunteers. **Behav Neurol**, v. 2016, p. 3730940, 2016. ISSN 1875-8584 (Electronic)

0953-4180 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27462136> >.

COSTA, K. M. et al. Evolution and physiology of neural oxygen sensing. **Front Physiol**, v. 5, p. 302, 2014. ISSN 1664-042X (Electronic)

1664-042X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25161625> >.

CRAVATT, B. F. et al. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. **Nature**, v. 384, n. 6604, p. 83-7, Nov 7 1996. ISSN 0028-0836 (Print)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8900284> >.

D'SOUZA, D. C. et al. The psychotomimetic effects of intravenous delta-9-tetrahydrocannabinol in healthy individuals: implications for psychosis. **Neuropsychopharmacology**, v. 29, n. 8, p. 1558-72, Aug 2004. ISSN 0893-133X (Print)

0893-133X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15173844> >.

DAVIS, M.; WHALEN, P. J. The amygdala: vigilance and emotion. **Mol Psychiatry**, v. 6, n. 1, p. 13-34, Jan 2001. ISSN 1359-4184 (Print)

1359-4184 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11244481> >.

DE BORTOLI, V. C.; YAMASHITA, P. S.; ZANGROSSI, H., JR. 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptor control of a panic-like defensive response in the rat dorsomedial hypothalamic nucleus. **J Psychopharmacol**, v. 27, n. 12, p. 1116-23, Dec 2013. ISSN 1461-7285 (Electronic)

0269-8811 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23787365> >.

DEAKIN, J. F.; GRAEFF, F. G. 5-HT and mechanisms of defence. **J Psychopharmacol**, v. 5, n. 4, p. 305-15, Jan 1991. ISSN 0269-8811 (Print)

0269-8811 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22282829> >.

DEL-BEN, C. M.; GRAEFF, F. G. Panic disorder: is the PAG involved? **Neural Plast**, v. 2009, p. 108135, 2009. ISSN 1687-5443 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19283082> >.

DEVANE, W. A. et al. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. **Mol Pharmacol**, v. 34, n. 5, p. 605-13, Nov 1988. ISSN 0026-895X (Print)

0026-895X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2848184> >.

DEVANE, W. A. et al. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. **Science**, v. 258, n. 5090, p. 1946-9, Dec 18 1992. ISSN 0036-8075 (Print)

0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1470919> >.

DINH, T. P.; FREUND, T. F.; PIOMELLI, D. A role for monoglyceride lipase in 2-arachidonoylglycerol inactivation. **Chem Phys Lipids**, v. 121, n. 1-2, p. 149-58, Dec 31 2002. ISSN 0009-3084 (Print)

0009-3084 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12505697> >.

ESQUIVEL, G. et al. Acids in the brain: a factor in panic? **J Psychopharmacol**, v. 24, n. 5, p. 639-47, May 2010. ISSN 1461-7285 (Electronic)

0269-8811 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19460873> >.

FAROOQUI, A. A.; ANDERSON, D. K.; HORROCKS, L. A. Effect of glutamate and its analogs on diacylglycerol and monoacylglycerol lipase activities of neuron-enriched cultures. **Brain Res**, v. 604, n. 1-2, p. 180-4, Feb 26 1993. ISSN 0006-8993 (Print)

0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8457846> >.

FELDER, C. C. et al. Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors. **Mol Pharmacol**, v. 48, n. 3, p. 443-50, Sep 1995. ISSN 0026-895X (Print)

0026-895X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7565624> >.

FILE, S. E. Aversive and appetitive properties of anxiogenic and anxiolytic agents. **Behav Brain Res**, v. 21, n. 3, p. 189-94, Sep 1986. ISSN 0166-4328 (Print)

0166-4328 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2876714> >.

FINN, D. P. et al. Cannabinoids modulate ultrasound-induced aversive responses in rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 172, n. 1, p. 41-51, Feb 2004. ISSN 0033-3158 (Print)

0033-3158 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14634713> >.

FINN, D. P. et al. Effects of direct periaqueductal grey administration of a cannabinoid receptor agonist on nociceptive and aversive responses in rats. **Neuropharmacology**, v. 45, n. 5, p. 594-604, Oct 2003. ISSN 0028-3908 (Print)

0028-3908 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12941373> >.

FOWLER, C. J. Anandamide uptake explained? **Trends Pharmacol Sci**, v. 33, n. 4, p. 181-5, Apr 2012. ISSN 1873-3735 (Electronic)

0165-6147 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22297258> >.

_____. The potential of inhibitors of endocannabinoid metabolism as anxiolytic and antidepressive drugs--A practical view. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 25, n. 6, p. 749-62, Jun 2015a. ISSN 1873-7862 (Electronic)

0924-977X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25791296> >.

_____. The potential of inhibitors of endocannabinoid metabolism as anxiolytic and antidepressive drugs-A practical view. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 25, n. 6, p. 749-762, Jun 2015b. ISSN 1873-7862 (Electronic)

0924-977X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25791296> >.

FREITAS, R. L. et al. GABA(A) receptor blockade in dorsomedial and ventromedial nuclei of the hypothalamus evokes panic-like elaborated defensive behaviour followed by innate fear-induced antinociception. **Brain Res**, v. 1305, p. 118-31, Dec 11 2009. ISSN 1872-6240 (Electronic)

0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19799880> >.

FYER, M. R. et al. CO2 challenge of patients with panic disorder. **Am J Psychiatry**, v. 144, n. 8, p. 1080-2, Aug 1987. ISSN 0002-953X (Print)

0002-953X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3111280> >.

GARCIA-GUTIERREZ, M. S.; MANZANARES, J. The cannabinoid CB1 receptor is involved in the anxiolytic, sedative and amnesic actions of benzodiazepines. **J Psychopharmacol**, v. 24, n. 5, p. 757-65, May 2010. ISSN 1461-7285 (Electronic)

0269-8811 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19825899> >.

GOBIRA, P. H.; AGUIAR, D. C.; MOREIRA, F. A. Effects of compounds that interfere with the endocannabinoid system on behaviors predictive of anxiolytic and panicolytic activities in the elevated T-maze. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 110, p. 33-9, Sep 2013. ISSN 1873-5177 (Electronic)

0091-3057 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23711591> >.

GONG, J. P. et al. Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain. **Brain Res**, v. 1071, n. 1, p. 10-23, Feb 3 2006. ISSN 0006-8993 (Print)

0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16472786> >.

GRAEFF, F. G. Serotonin, the periaqueductal gray and panic. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 28, n. 3, p. 239-59, May 2004. ISSN 0149-7634 (Print)

0149-7634 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15225969> >.

GRAEFF, F. G. et al. Modulation of the brain aversive system by GABAergic and serotonergic mechanisms. **Behav Brain Res**, v. 22, n. 2, p. 173-80, Nov 1986. ISSN 0166-4328 (Print)

0166-4328 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3024664> >.

GRAEFF, F. G.; DEL-BEN, C. M. Neurobiology of panic disorder: from animal models to brain neuroimaging. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 32, n. 7, p. 1326-35, Sep 2008. ISSN 0149-7634 (Print)

0149-7634 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18573531> >.

GRAEFF, F. G. et al. Role of 5-HT in stress, anxiety, and depression. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 54, n. 1, p. 129-41, May 1996. ISSN 0091-3057 (Print)

0091-3057 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8728550> >.

GRAEFF, F. G.; NETTO, C. F.; ZANGROSSI, H., JR. The elevated T-maze as an experimental model of anxiety. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 23, n. 2, p. 237-46, 1998. ISSN 0149-7634 (Print)

0149-7634 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9884116> >.

GRAEFF, F. G.; SCHOENFELD, R. I. Tryptaminergic mechanisms in punished and nonpunished behavior. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 173, n. 2, p. 277-83, Jun 1970. ISSN 0022-3565 (Print)

0022-3565 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5434014> >.

GRASSI, M. et al. Are respiratory abnormalities specific for panic disorder? A meta-analysis. **Neuropsychobiology**, v. 70, n. 1, p. 52-60, 2014. ISSN 1423-0224 (Electronic)

0302-282X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25247676> >.

GRIEBEL, G.; HOLMES, A. 50 years of hurdles and hope in anxiolytic drug discovery. **Nat Rev Drug Discov**, v. 12, n. 9, p. 667-87, Sep 2013. ISSN 1474-1784 (Electronic)

1474-1776 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23989795> >.

GROSS, C. T.; CANTERAS, N. S. The many paths to fear. **Nat Rev Neurosci**, v. 13, n. 9, p. 651-8, Sep 2012. ISSN 1471-0048 (Electronic)

1471-003X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22850830> >.

GUNDUZ-CINAR, O. et al. Fluoxetine Facilitates Fear Extinction Through Amygdala Endocannabinoids. **Neuropsychopharmacology**, Oct 30 2015. ISSN 1740-634X (Electronic)

0893-133X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26514583> >.

GUTMAN, D. A. et al. Doxapram-induced panic attacks and cortisol elevation. **Psychiatry Res**, v. 133, n. 2-3, p. 253-61, Feb 28 2005. ISSN 0165-1781 (Print)

0165-1781 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15741000> >.

HAIBARA, A. S.; BONAGAMBA, L. G.; MACHADO, B. H. Sympathoexcitatory neurotransmission of the chemoreflex in the NTS of awake rats. **Am J Physiol**, v. 276, n. 1 Pt 2, p. R69-80, Jan 1999. ISSN 0002-9513 (Print)

0002-9513 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9887179> >.

HALLER, J.; ALICZKI, M.; GYIMESINE PELCZER, K. Classical and novel approaches to the preclinical testing of anxiolytics: A critical evaluation. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 37, n. 10 Pt 1, p. 2318-30, Dec 2013. ISSN 1873-7528 (Electronic)

0149-7634 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22981935> >.

HALLER, J. et al. Interactions between environmental aversiveness and the anxiolytic effects of enhanced cannabinoid signaling by FAAH inhibition in rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 204, n. 4, p. 607-16, Jul 2009. ISSN 1432-2072 (Electronic)

0033-3158 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19259645> >.

HASCOET, M.; BOURIN, M. Anticonflict effect of alpidem as compared with the benzodiazepine alprazolam in rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 56, n. 2, p. 317-24, Feb 1997. ISSN 0091-3057 (Print)

0091-3057 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9050091> >.

HASLER, G. et al. Asthma and panic in young adults: a 20-year prospective community study. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 171, n. 11, p. 1224-30, Jun 01 2005. ISSN 1073-449X (Print)

1073-449X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15764721> >.

HOFFMAN, A. F.; LUPICA, C. R. Mechanisms of cannabinoid inhibition of GABA(A) synaptic transmission in the hippocampus. **J Neurosci**, v. 20, n. 7, p. 2470-9, Apr 1 2000. ISSN 1529-2401 (Electronic)

0270-6474 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10729327> >.

HOHMANN, A. G. et al. An endocannabinoid mechanism for stress-induced analgesia. **Nature**, v. 435, n. 7045, p. 1108-12, Jun 23 2005. ISSN 1476-4687 (Electronic)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15973410> >.

HOLLANDER, E. et al. Cortisol and sodium lactate-induced panic. **Arch Gen Psychiatry**, v. 46, n. 2, p. 135-40, Feb 1989. ISSN 0003-990X (Print)

0003-990X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2913972> >.

HOWLETT, A. C. et al. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. **Pharmacol Rev**, v. 54, n. 2, p. 161-202, Jun 2002. ISSN 0031-6997 (Print)

0031-6997 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12037135> >.

HUSTON, J. P. et al. What's conditioned in conditioned place preference? **Trends Pharmacol Sci**, v. 34, n. 3, p. 162-6, Mar 2013. ISSN 1873-3735 (Electronic)

0165-6147 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23384389> >.

JENCK, F.; MOREAU, J. L.; MARTIN, J. R. Dorsal periaqueductal gray-induced aversion as a simulation of panic anxiety: elements of face and predictive validity. **Psychiatry Res**, v. 57, n. 2, p. 181-91, Jul 28 1995. ISSN 0165-1781 (Print)

0165-1781 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7480384> >.

JOHNSON, P. L.; FEDERICI, L. M.; SHEKHAR, A. Etiology, triggers and neurochemical circuits associated with unexpected, expected, and laboratory-induced panic attacks. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 46 Pt 3, p. 429-54, Oct 2014. ISSN 1873-7528 (Electronic)

0149-7634 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25130976> >.

JOHNSON, P. L. et al. Group II metabotropic glutamate receptor type 2 allosteric potentiators prevent sodium lactate-induced panic-like response in panic-vulnerable rats. **J Psychopharmacol**, v. 27, n. 2, p. 152-61, Feb 2013. ISSN 1461-7285 (Electronic)

0269-8811 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22914798> >.

JOHNSON, P. L.; SHEKHAR, A. Panic-prone state induced in rats with GABA dysfunction in the dorsomedial hypothalamus is mediated by NMDA receptors. **J Neurosci**, v. 26, n. 26, p. 7093-104, Jun 28 2006. ISSN 1529-2401 (Electronic)

0270-6474 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16807338> >.

KATERNDAHL, D. A. Chest pain and its importance in patients with panic disorder: an updated literature review. **Prim Care Companion J Clin Psychiatry**, v. 10, n. 5, p. 376-83, 2008. ISSN 1523-5998 (Print)

1523-5998 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19158976> >.

KATONA, I.; FREUND, T. F. Multiple functions of endocannabinoid signaling in the brain. **Annu Rev Neurosci**, v. 35, p. 529-58, 2012. ISSN 1545-4126 (Electronic)

0147-006X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22524785> >.

KATONA, I. et al. Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons. **J Neurosci**, v. 19, n. 11, p. 4544-58, Jun 1 1999. ISSN 1529-2401 (Electronic)

0270-6474 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10341254> >.

KATZMAN, M. A. et al. Central and peripheral chemoreflexes in panic disorder. **Psychiatry Res**, v. 113, n. 1-2, p. 181-92, Dec 15 2002. ISSN 0165-1781 (Print)

0165-1781 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12467957> >.

KINKEAD, R. et al. Respiratory manifestations of panic disorder in animals and humans: a unique opportunity to understand how supramedullary structures regulate breathing. **Respir Physiol Neurobiol**, v. 204, p. 3-13, Dec 1 2014. ISSN 1878-1519 (Electronic)

1569-9048 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25038523> >.

KISER, R. S. et al. Dorsal raphe nucleus stimulation reduces centrally-elicited fearlike behavior. **Brain Res**, v. 191, n. 1, p. 265-72, Jun 02 1980. ISSN 0006-8993 (Print)

0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7378757> >.

KISER, R. S.; GERMAN, D. C.; LEOVITZ, R. M. Serotonergic reduction of dorsal central gray area stimulation-produced aversion. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 9, n. 1, p. 27-31, Jul 1978. ISSN 0091-3057 (Print)

0091-3057 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/309135> >.

KLEIN, D. F. Delineation of Two Drug-Responsive Anxiety Syndromes. **Psychopharmacologia**, v. 5, p. 397-408, Jun 08 1964. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14194683> >.

_____. False suffocation alarms, spontaneous panics, and related conditions. An integrative hypothesis. **Arch Gen Psychiatry**, v. 50, n. 4, p. 306-17, Apr 1993. ISSN 0003-990X (Print)

0003-990X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8466392> >.

_____. Testing the suffocation false alarm theory of panic disorder. **Anxiety**, v. 1, n. 1, p. 1-7, 1994. ISSN 1070-9797 (Print)

1070-9797 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9160539> >.

KLEIN, D. F.; FINK, M. Psychiatric reaction patterns to imipramine. **Am J Psychiatry**, v. 119, p. 432-8, Nov 1962. ISSN 0002-953X (Print)

0002-953X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14033346> >.

LANTEAUME, L. et al. Emotion induction after direct intracerebral stimulations of human amygdala. **Cereb Cortex**, v. 17, n. 6, p. 1307-13, Jun 2007. ISSN 1047-3211 (Print)

1047-3211 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16880223> >.

LEE, Y. J. et al. Panic attacks induced by doxapram. **Biol Psychiatry**, v. 33, n. 4, p. 295-7, Feb 15 1993. ISSN 0006-3223 (Print)

0006-3223 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8471685> >.

LEY, R. Pulmonary function and dyspnea/suffocation theory of panic. **J Behav Ther Exp Psychiatry**, v. 29, n. 1, p. 1-11, Mar 1998. ISSN 0005-7916 (Print)

0005-7916 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9627820> >.

LOPES, L. T. et al. Participation of the dorsal periaqueductal grey matter in the hypoxic ventilatory response in unanaesthetized rats. **Acta Physiol (Oxf)**, v. 211, n. 3, p. 528-37, Jul 2014. ISSN 1748-1716 (Electronic)

1748-1708 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24612700> >.

LOPEZ-MUNOZ, F.; ALAMO, C. Monoaminergic neurotransmission: the history of the discovery of antidepressants from 1950s until today. **Curr Pharm Des**, v. 15, n. 14, p. 1563-86, 2009. ISSN 1873-4286 (Electronic)

1381-6128 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19442174> >.

LOPEZ-MUNOZ, F.; ALAMO, C.; GARCIA-GARCIA, P. The discovery of chlordiazepoxide and the clinical introduction of benzodiazepines: half a century of anxiolytic drugs. **J Anxiety Disord**, v. 25, n. 4, p. 554-62, May 2011. ISSN 1873-7897 (Electronic)

0887-6185 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21315551> >.

LOPEZ-MUNOZ, F. et al. The role of serendipity in the discovery of the clinical effects of psychotropic drugs: beyond of the myth. **Actas Esp Psiquiatr**, v. 40, n. 1, p. 34-42, Jan-Feb 2012. ISSN 1578-2735 (Electronic)

1139-9287 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22344494> >.

MACKIE, K.; DEVANE, W. A.; HILLE, B. Anandamide, an endogenous cannabinoid, inhibits calcium currents as a partial agonist in N18 neuroblastoma cells. **Mol Pharmacol**, v. 44, n. 3, p. 498-503, Sep 1993. ISSN 0026-895X (Print)

0026-895X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8371711> >.

MARTIN-SANTOS, R. et al. Acute effects of a single, oral dose of d9-tetrahydrocannabinol (THC) and cannabidiol (CBD) administration in healthy volunteers. **Curr Pharm Des**, v. 18, n. 32, p. 4966-79, 2012. ISSN 1873-4286 (Electronic)

1381-6128 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22716148> >.

MARTINEZ, J. M. et al. Heart rate and respiratory response to doxapram in patients with panic disorder. **Psychiatry Res**, v. 227, n. 1, p. 32-8, May 30 2015. ISSN 1872-7123 (Electronic)

0165-1781 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25819170> >.

MATO, S. et al. CB1 knockout mice display impaired functionality of 5-HT1A and 5-HT2A/C receptors. **J Neurochem**, v. 103, n. 5, p. 2111-20, Dec 2007. ISSN 1471-4159 (Electronic)

0022-3042 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17944876> >.

MATO, S. et al. Long-term fluoxetine treatment modulates cannabinoid type 1 receptor-mediated inhibition of adenylyl cyclase in the rat prefrontal cortex through 5-hydroxytryptamine 1A receptor-dependent mechanisms. **Mol Pharmacol**, v. 77, n. 3, p. 424-34, Mar 2010. ISSN 1521-0111 (Electronic)

0026-895X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19995940> >.

MCNAUGHTON, N.; CORR, P. J. A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 28, n. 3, p. 285-305, May 2004. ISSN 0149-7634 (Print)

0149-7634 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15225972> >.

MIZUSAWA, A. et al. In vivo release of glutamate in nucleus tractus solitarii of the rat during hypoxia. **J Physiol**, v. 478 (Pt 1), p. 55-66, Jul 01 1994. ISSN 0022-3751 (Print)

0022-3751 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7965835> >.

MONGEAU, R.; MARSDEN, C. A. Effect of imipramine treatments on the 5-HT1A-receptor-mediated inhibition of panic-like behaviours in rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 131, n. 4, p. 321-8, Jun 1997. ISSN 0033-3158 (Print)

0033-3158 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9226733> >.

MOREIRA, F. A.; AGUIAR, D. C.; GUIMARAES, F. S. Anxiolytic-like effect of cannabinoids injected into the rat dorsolateral periaqueductal gray. **Neuropharmacology**, v. 52, n. 3, p. 958-65, Mar 2007. ISSN 0028-3908 (Print)

0028-3908 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17156799> >.

MOREIRA, F. A. et al. Modeling panic disorder in rodents. **Cell Tissue Res**, v. 354, n. 1, p. 119-25, Oct 2013. ISSN 1432-0878 (Electronic)

0302-766X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23584609> >.

MORENA, M. et al. Neurobiological Interactions Between Stress and the Endocannabinoid System. **Neuropsychopharmacology**, v. 41, n. 1, p. 80-102, Jan 2016. ISSN 1740-634X (Electronic)

0893-133X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26068727> >.

MOVAHED, M. R.; JALILI, M.; KICIMAN, N. Cardiovascular abnormalities and arrhythmias in patients with Ondine's curse (congenital central hypoventilation) syndrome. **Pacing Clin Electrophysiol**, v. 28, n. 11, p. 1226-30, Nov 2005. ISSN 0147-8389 (Print)

0147-8389 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16359292> >.

MULLER, C. J. et al. On the verge of a respiratory-type panic attack: Selective activations of rostralateral and caudoventrolateral periaqueductal gray matter following short-lasting escape to a low dose of potassium cyanide. **Neuroscience**, v. 348, p. 228-240, Apr 21 2017. ISSN 1873-7544 (Electronic)

0306-4522 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28223243> >.

NADERI, N. et al. Interaction between cannabinoid compounds and diazepam on anxiety-like behaviour of mice. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 89, n. 1, p. 64-75, Mar 2008. ISSN 0091-3057 (Print)

0091-3057 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18096213> >.

NARDI, A. E. Panic disorder is closely associated with respiratory obstructive illnesses. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 179, n. 3, p. 256-7, Feb 1 2009. ISSN 1535-4970 (Electronic)

1073-449X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19158330> >.

NARDI, A. E. et al. A randomized, naturalistic, parallel-group study for the long-term treatment of panic disorder with clonazepam or paroxetine. **J Clin Psychopharmacol**, v. 32, n. 1, p. 120-6, Feb 2012. ISSN 1533-712X (Electronic)

0271-0749 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22198456> >.

NARDI, A. E. et al. Psychopharmacotherapy of panic disorder: 8-week randomized trial with clonazepam and paroxetine. **Braz J Med Biol Res**, v. 44, n. 4, p. 366-73, Apr 2011. ISSN 1414-431X (Electronic)

0100-879X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21344132> >.

NARDI, A. E. et al. Psychopathological profile of 35% CO2 challenge test-induced panic attacks: a comparison with spontaneous panic attacks. **Compr Psychiatry**, v. 47, n. 3, p. 209-14, May-Jun 2006. ISSN 0010-440X (Print)

0010-440X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16635650> >.

NARDI, A. E. et al. A caffeine challenge test in panic disorder patients, their healthy first-degree relatives, and healthy controls. **Depress Anxiety**, v. 25, n. 10, p. 847-53, 2008. ISSN 1520-6394 (Electronic)

1091-4269 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17823963> >.

NASHOLD, B. S., JR.; WILSON, W. P.; SLAUGHTER, D. G. Sensations evoked by stimulation in the midbrain of man. **J Neurosurg**, v. 30, n. 1, p. 14-24, Jan 1969a. ISSN 0022-3085 (Print)

0022-3085 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4885810> >.

_____. Stereotaxic midbrain lesions for central dysesthesia and phantom pain. Preliminary report. **J Neurosurg**, v. 30, n. 2, p. 116-26, Feb 1969b. ISSN 0022-3085 (Print)

0022-3085 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4889016> >.

NISHINO, T.; MOKASHI, A.; LAHIRI, S. Stimulation of carotid chemoreceptors and ventilation by doxapram in the cat. **J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol**, v. 52, n. 5, p. 1261-5, May 1982. ISSN 0161-7567 (Print)

0161-7567 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7096150> >.

OLANGO, W. M. et al. The endocannabinoid system in the rat dorsolateral periaqueductal grey mediates fear-conditioned analgesia and controls fear expression in the presence of nociceptive tone. **Br J Pharmacol**, v. 165, n. 8, p. 2549-60, Apr 2012. ISSN 1476-5381 (Electronic)

0007-1188 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21564082> >.

PAPP, L. A. et al. Hypersensitivity to carbon dioxide in panic disorder. **Am J Psychiatry**, v. 146, n. 6, p. 779-81, Jun 1989. ISSN 0002-953X (Print)

0002-953X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2499198> >.

PAUL, E. D. et al. The Deakin/Graeff hypothesis: focus on serotonergic inhibition of panic. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 46 Pt 3, p. 379-96, Oct 2014. ISSN 1873-7528 (Electronic)

0149-7634 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24661986> >.

PERNA, G.; CALDIROLA, D.; BELLODI, L. Panic disorder: from respiration to the homeostatic brain. **Acta Neuropsychiatr**, v. 16, n. 2, p. 57-67, Apr 2004. ISSN 0924-2708 (Print)

0924-2708 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26983998> >.

PERNA, G. et al. Panic disorder: the role of the balance system. **J Psychiatr Res**, v. 35, n. 5, p. 279-86, Sep-Oct 2001. ISSN 0022-3956 (Print)

0022-3956 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11591430> >.

POLISSIDIS, A. et al. The cannabinoid CB1 receptor biphasically modulates motor activity and regulates dopamine and glutamate release region dependently. **Int J Neuropsychopharmacol**, v. 16, n. 2, p. 393-403, Mar 2013. ISSN 1469-5111 (Electronic)

1461-1457 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22391102> >.

QUEIROZ, E. A. et al. Excitatory amino acid receptors in the dorsomedial hypothalamus are involved in the cardiovascular and behavioural chemoreflex responses. **Exp Physiol**, v. 96, n. 2, p. 73-84, Feb 2011. ISSN 1469-445X (Electronic)

0958-0670 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20889605> >.

REGGIO, P. H. Endocannabinoid binding to the cannabinoid receptors: what is known and what remains unknown. **Curr Med Chem**, v. 17, n. 14, p. 1468-86, 2010. ISSN 1875-533X (Electronic)

0929-8673 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20166921> >.

REY, A. A. et al. Biphasic effects of cannabinoids in anxiety responses: CB1 and GABA(B) receptors in the balance of GABAergic and glutamatergic neurotransmission. **Neuropsychopharmacology**, v. 37, n. 12, p. 2624-34, Nov 2012. ISSN 1740-634X (Electronic)

0893-133X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22850737> >.

RUBINO, T. et al. Cellular mechanisms underlying the anxiolytic effect of low doses of peripheral Delta9-tetrahydrocannabinol in rats. **Neuropsychopharmacology**, v. 32, n. 9, p. 2036-45, Sep 2007. ISSN 0893-133X (Print)

0893-133X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17287821> >.

RUSSO, E. B. et al. Agonistic properties of cannabidiol at 5-HT1a receptors. **Neurochem Res**, v. 30, n. 8, p. 1037-43, Aug 2005. ISSN 0364-3190 (Print)

0364-3190 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16258853> >.

SCHENBERG, L. C. et al. Modeling panic attacks. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 25, n. 7-8, p. 647-59, Dec 2001. ISSN 0149-7634 (Print)

0149-7634 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11801290> >.

SCHENBERG, L. C. et al. Acute effects of clomipramine and fluoxetine on dorsal periaqueductal grey-evoked unconditioned defensive behaviours of the rat. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 159, n. 2, p. 138-44, Jan 2002. ISSN 0033-3158 (Print)

0033-3158 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11862341> >.

SCHENBERG, L. C. et al. Translational approach to studying panic disorder in rats: hits and misses. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 46 Pt 3, p. 472-96, Oct 2014. ISSN 1873-7528 (Electronic)

0149-7634 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25316571> >.

SCHIMITEL, F. G. et al. Evidence of a suffocation alarm system within the periaqueductal gray matter of the rat. **Neuroscience**, v. 200, p. 59-73, Jan 3 2012. ISSN 1873-7544 (Electronic)

0306-4522 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22062132> >.

SCHIMITEL, F. G. et al. Evidence of a suffocation alarm system sensitive to clinically-effective treatments with the panicolytics clonazepam and fluoxetine. **J Psychopharmacol**, v. 28, n. 12, p. 1184-8, Dec 2014. ISSN 1461-7285 (Electronic)

0269-8811 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25277323> >.

SHEKHAR, A.; KEIM, S. R. LY354740, a potent group II metabotropic glutamate receptor agonist prevents lactate-induced panic-like response in panic-prone rats. **Neuropharmacology**, v. 39, n. 7, p. 1139-46, Apr 27 2000. ISSN 0028-3908 (Print)

0028-3908 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10760357> >.

SILVA, N. T. et al. Excitatory amino acid receptors in the dorsomedial hypothalamic area contribute to the chemoreflex tachypneic response. **Respir Physiol Neurobiol**, v. 212-214, p. 1-8, Jul 2015. ISSN 1878-1519 (Electronic)

1569-9048 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25870082> >.

SPIACCI, A., JR. et al. Serotonin in the dorsal periaqueductal gray inhibits panic-like defensive behaviors in rats exposed to acute hypoxia. **Neuroscience**, v. 307, p. 191-8, Oct 29 2015. ISSN 1873-7544 (Electronic)

0306-4522 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26319117> >.

STEENEN, S. A. et al. Propranolol for the treatment of anxiety disorders: Systematic review and meta-analysis. **J Psychopharmacol**, v. 30, n. 2, p. 128-39, Feb 2016. ISSN 1461-7285 (Electronic)

0269-8811 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26487439> >.

STEWART, J. L.; MCMAHON, L. R. The fatty acid amide hydrolase inhibitor URB 597: interactions with anandamide in rhesus monkeys. **Br J Pharmacol**, v. 164, n. 2b, p. 655-66, Sep 2011. ISSN 1476-5381 (Electronic)

0007-1188 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21449917> >.

STRUZIK, L. et al. Effects of tryptophan depletion on central and peripheral chemoreflexes in man. **Respir Physiol Neurobiol**, v. 133, n. 3, p. 183-95, Nov 19 2002. ISSN 1569-9048 (Print)

1569-9048 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12425967> >.

STRUZIK, L. et al. Central and peripheral chemoreflex characteristics: panic disorder patients vs. healthy volunteers. **Adv Exp Med Biol**, v. 499, p. 435-7, 2001. ISSN 0065-2598 (Print)

0065-2598 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11729921> >.

SULLIVAN, G. M. et al. Rodent doxapram model of panic: behavioral effects and c-Fos immunoreactivity in the amygdala. **Biol Psychiatry**, v. 53, n. 10, p. 863-870, 2003. ISSN 00063223.

SULLIVAN, G. M. et al. Rodent doxapram model of panic: behavioral effects and c-Fos immunoreactivity in the amygdala. **Biol Psychiatry**, v. 53, n. 10, p. 863-70, May 15 2003. ISSN 0006-3223 (Print)

0006-3223 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12742673> >.

TEIXEIRA, R. C.; ZANGROSSI, H.; GRAEFF, F. G. Behavioral effects of acute and chronic imipramine in the elevated T-maze model of anxiety. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 65, n. 4, p. 571-6, Apr 2000. ISSN 0091-3057 (Print)

0091-3057 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10764908> >.

TYE, N. C.; EVERITT, B. J.; IVERSEN, S. D. 5-Hydroxytryptamine and punishment. **Nature**, v. 268, n. 5622, p. 741-3, Aug 25 1977. ISSN 0028-0836 (Print)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/895875> >.

UMATHE, S. N.; MANNA, S. S.; JAIN, N. S. Involvement of endocannabinoids in antidepressant and anti-compulsive effect of fluoxetine in mice. **Behav Brain Res**, v. 223, n. 1, p. 125-34, Sep 30 2011. ISSN 1872-7549 (Electronic)

0166-4328 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21549765> >.

URIGUEN, L. et al. Impaired action of anxiolytic drugs in mice deficient in cannabinoid CB1 receptors. **Neuropharmacology**, v. 46, n. 7, p. 966-73, Jun 2004. ISSN 0028-3908 (Print)

0028-3908 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15081793> >.

VANDESQUILLE, M. et al. Effects of positive modulators of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA)-type glutamate receptors in a benzodiazepine-induced deficit of spatial discrimination in mice. **J Psychopharmacol**, v. 26, n. 6, p. 845-56, Jun 2012. ISSN 1461-7285 (Electronic)

0269-8811 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21890586> >.

VARGAS, L. C.; SCHENBERG, L. C. Long-term effects of clomipramine and fluoxetine on dorsal periaqueductal grey-evoked innate defensive behaviours of the rat. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 155, n. 3, p. 260-8, May 2001. ISSN 0033-3158 (Print)

0033-3158 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11432688> >.

VERSTER, J. C.; VOLKERTS, E. R.; VERBATEN, M. N. Effects of alprazolam on driving ability, memory functioning and psychomotor performance: a randomized, placebo-controlled study. **Neuropsychopharmacology**, v. 27, n. 2, p. 260-9, Aug 2002. ISSN 0893-133X (Print)

0893-133X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12093599> >.

VIANA, T. G. et al. Anti-aversive role of the endocannabinoid system in the periaqueductal gray stimulation model of panic attacks in rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 232, n. 9, p. 1545-53, May 2015. ISSN 1432-2072 (Electronic)

0033-3158 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25388290> >.

VIANNA, D. M.; BRANDAO, M. L. Anatomical connections of the periaqueductal gray: specific neural substrates for different kinds of fear. **Braz J Med Biol Res**, v. 36, n. 5, p. 557-66, May 2003. ISSN 0100-879X (Print)

0100-879X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12715074> >.

VIVEROS, M. P.; MARCO, E. M.; FILE, S. E. Endocannabinoid system and stress and anxiety responses. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 81, n. 2, p. 331-42, Jun 2005. ISSN 0091-3057 (Print)

0091-3057 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15927244> >.

VOLLMER, L. L.; STRAWN, J. R.; SAH, R. Acid-base dysregulation and chemosensory mechanisms in panic disorder: a translational update. **Transl Psychiatry**, v. 5, p. e572, May 26 2015. ISSN 2158-3188 (Electronic)

2158-3188 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26080089> >.

WALKER, J. M. et al. Pain modulation by release of the endogenous cannabinoid anandamide. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 21, p. 12198-203, Oct 12 1999. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10518599> >.

WILLGOSS, T. G.; YOHANNES, A. M. Anxiety disorders in patients with COPD: a systematic review. **Respir Care**, v. 58, n. 5, p. 858-66, May 2013. ISSN 1943-3654 (Electronic)

0020-1324 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22906542> >.

YOST, C. S. A new look at the respiratory stimulant doxapram. **CNS Drug Rev**, v. 12, n. 3-4, p. 236-49, Fall-Winter 2006. ISSN 1080-563X (Print)

1080-563X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17227289> >.

ZANGROSSI, H., JR.; GRAEFF, F. G. Serotonin in anxiety and panic: contributions of the elevated T-maze. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 46 Pt 3, p. 397-406, Oct 2014. ISSN 1873-7528 (Electronic)

0149-7634 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24657635> >.

ZANGROSSI, H., JR. et al. Serotonergic regulation of inhibitory avoidance and one-way escape in the rat elevated T-maze. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 25, n. 7-8, p. 637-45, Dec 2001. ISSN 0149-7634 (Print)

0149-7634 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11801289> >.

ZANOVELI, J. M.; FERREIRA-NETTO, C.; BRANDAO, M. L. Conditioned place aversion organized in the dorsal periaqueductal gray recruits the laterodorsal nucleus of the thalamus and the basolateral amygdala. **Exp Neurol**, v. 208, n. 1, p. 127-36, Nov 2007. ISSN 0014-4886 (Print)

0014-4886 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17900567> >.

ZANOVELI, J. M.; NOGUEIRA, R. L.; ZANGROSSI, H., JR. Serotonin in the dorsal periaqueductal gray modulates inhibitory avoidance and one-way escape behaviors in the elevated T-maze. **Eur J Pharmacol**, v. 473, n. 2-3, p. 153-61, Jul 25 2003. ISSN 0014-2999 (Print)

0014-2999 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12892833> >.

_____. Enhanced reactivity of 5-HT_{1A} receptors in the rat dorsal periaqueductal gray matter after chronic treatment with fluoxetine and sertraline: evidence from the elevated T-maze. **Neuropharmacology**, v. 52, n. 4, p. 1188-95, Mar 2007. ISSN 0028-3908 (Print)

0028-3908 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17313964> >.

ZANOVELI, J. M. et al. Facilitation of 5-HT_{1A}-mediated neurotransmission in dorsal periaqueductal grey matter accounts for the panicolytic-like effect of chronic fluoxetine. **Int J Neuropsychopharmacol**, v. 13, n. 8, p. 1079-88, Sep 2010. ISSN 1469-5111 (Electronic)

1461-1457 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19941697> >.

ZHANG, S. P.; BANDLER, R.; CARRIVE, P. Flight and immobility evoked by excitatory amino acid microinjection within distinct parts of the subtentorial midbrain periaqueductal gray of the cat. **Brain Res**, v. 520, n. 1-2, p. 73-82, Jun 18 1990. ISSN 0006-8993 (Print)

0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2207648> >.

ZUGLIANI, M. M. et al. Laboratory, clinical and therapeutic features of respiratory panic disorder subtype. **CNS Neurol Disord Drug Targets**, v. 14, n. 5, p. 627-35, 2015. ISSN 1996-3181 (Electronic)

1871-5273 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25924997> >.

ZWANZGER, P. et al. Effects of alprazolam on cholecystokinin-tetrapeptide-induced panic and hypothalamic-pituitary-adrenal-axis activity: a placebo-controlled study. **Neuropsychopharmacology**, v. 28, n. 5, p. 979-84, May 2003. ISSN 0893-133X (Print)

0893-133X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12700707> >.