

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

RITA DE CÁSSIA DE OLIVEIRA LIMA

**EFEITO DO 2-ARAQUIDONOILGLICEROL NAS RESPOSTAS DEFENSIVAS  
MEDIADAS PELA SUBSTÂNCIA CINZENTA  
PERIAQUEDUTALDORSOLATERAL DE RATOS EM MODELOS ANIMAIS  
DE ANSIEDADE**

Belo Horizonte

2017

RITA DE CÁSSIA DE OLIVEIRA LIMA

**EFEITO DO 2-ARAQUIDONOILGLICEROL NAS RESPOSTAS DEFENSIVAS  
MEDIADAS PELA SUBSTÂNCIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL  
DORSOLATERAL DE RATOS EM MODELOS ANIMAIS DE ANSIEDADE**

Pró-forma de Dissertação de Mestrado apresentada ao curso de Pós Graduação em Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção de Grau de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Professora Dra. Daniele Cristina de Aguiar

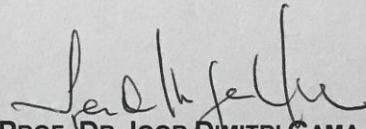
Belo Horizonte

2017

**"EFEITO DO 2-ARAQUIDONOILGLICEROL NAS  
RESPOSTAS DEFENSIVAS MEDIADAS PELA  
SUBSTÂNCIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL  
DORSOLATERAL DE RATOS EM MODELOS  
ANIMAIS DE ANSIEDADE "**

**RITA DE CÁSSIA DE OLIVEIRA LIMA**

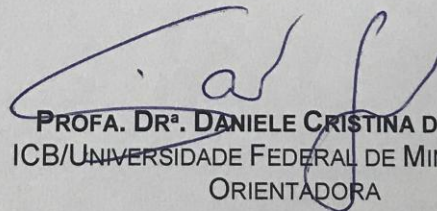
Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia 17 de agosto de 2017, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:



**PROF. DR. IGOR DIMITRI GAMA DUARTE**  
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



**PROFA. DR.ª. LUCIENE BRUNO VIEIRA**  
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



**PROFA. DR.ª. DANIELE CRISTINA DE AGUIAR**  
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ORIENTADORA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia  
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

**Belo Horizonte, 17 de agosto de 2017**

## **DEDICATÓRIA**

*Aos meus pais amados Maria Jesualda e Eivaldo José*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus: fonte de Vida e Amor, obrigada por me acompanhar durante toda essa caminhada.

À minha orientadora Daniele Aguiar por todo ensinamento e paciência desde o início da minha trajetória científica.

Ao professor Fabrício Moreira por toda colaboração e ensinamento e pelas melhores disciplinas ministradas na pós-graduação.

À Banca examinadora pelo tempo despendido para contribuir e melhorar esse trabalho.

Aos meus Amigos e companheiros de trabalho do Laboratório de Neuropsicofarmacologia da UFMG, Júlia, Juliana, Jivago, João, Felipe, Luara, Ana, Rafael, Rafaela, Thércia e Pedro. Em especial agradeço a minha querida e dedicada aluna de iniciação científica Rayssa e minha parceira Fiel de laboratório Jad, vocês foram essenciais.

A toda minha família Mãe, Pai e Irmãos, obrigada por toda Força, Confiança e Incentivo. Sem vocês nada disso seria possível.

Ao Felipe meu Amor e Companheiro, seu apoio foi fundamental.

As AML's UFMG, presente que a faculdade me deu, agradeço todo carinho e irmandade que com certeza refletiram positivamente nesse trabalho.

A CAPES pelo apoio financeiro

Enfim, o meu MUITO OBRIGADA a todos que de alguma maneira contribuíram com a realização desse trabalho e acreditaram nele junto comigo.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Mapa representativo dos sítios de Injeções naSubstância cinzenta periaquedutal dorsolateral (SCPdl).....	23
<b>Figura 2.</b> Caixa do Medo Condicionado ao Contexto.....	24
<b>Figura 3.</b> Caixa do Teste de Conflito de Vogel.....	25
<b>Figura 4.</b> Representação esquemática do protocolo experimental 1 e 2.....	26
<b>Figura 5.</b> Representação esquemática do protocolo experimental 3 e 4.....	27
<b>Figura 6.</b> Representação esquemática do protocolo experimental 5 e 6.....	28
<b>Figura 7.</b> Representação esquemática do protocolo experimental 7 e 8.....	29
<b>Figura 8.</b> Efeito do 2-AG (5, 50, 500 pmol/0,2 µL) intraSCPdl, no teste do medo condicionado ao contexto.....	31
<b>Figura 9.</b> Efeito do URB 602 (30, 100, 300 e 1000 pmol/0,2 µL) intraSCPdl no teste do medo condicionado ao contexto.....	32
<b>Figura 10.</b> Efeito do pré tratamento com antagonista CB <sub>1</sub> intra-SCPdl sobre o efeito do 2-AGno teste do medo condicionado ao contexto.....	33
<b>Figura 11.</b> Efeito do pré tratamento com antagonista CB <sub>2</sub> intra-SCPdl sobre o efeito do 2-AG no teste do medo condicionado ao contexto.....	34
<b>Figura 12.</b> Efeito da injeção intra-SCPdl do 2-AG (5, 50, 500 e 5000 pmol/0,2 µL) no teste de conflito de Vogel.....	35
<b>Figura 13.</b> Efeito do URB 602 (30, 100 e 300 pmol/0,2 µL) intraSCPdl no teste de conflito de Vogel.....	36
<b>Figura 14.</b> Efeito do pré-tratamento com antagonista CB <sub>1</sub> intra-SCPdl sobre o efeito do 2-AG no teste de conflito de Vogel.....	37
<b>Figura 15.</b> Efeito do pré-tratamento com antagonista CB <sub>2</sub> intra-SCPdl sobre o efeito do 2-AGno teste de conflito de Vogel.....	38

## LISTA DE ABREVIATURAS

AEA: N-araquidonoiletanolamida (Anandamida)

CB<sub>1</sub>: Receptores canabinoides do tipo 1

CB<sub>2</sub>: Receptores canabinoides do tipo 2

CPF: Córtex pré-frontal

CFC: Medo Condicionado ao Contexto

DGL: Diacilglicerol lipase

ECs: Endocanabinoides

FAAH: Hidrolase de amidas de ácidos graxos

GABA: Ácido gama aminobutírico

LCE: Labirinto em Cruz Elevado

MAGL: Monoacilglicerol lipase

n: Número de animais por grupo

SCP: Substância cinzenta periaquedutal

SCPdl: Substância cinzenta periaquedutal dorsolateral

SNC: Sistema Nervoso Central

2-AG: 2-araquidonoilglicerol

5-HT: 5- hidroxitriptamina

VCT: Teste de Conflito de Vogel





## SUMÁRIO

RESUMO .....	7
ABSTRACT .....	9
1 REVISÃO DE LITERATURA .....	12
1.1 Comportamento defensivo animal .....	12
1.2 Modelos animais para estudo do medo e ansiedade .....	13
1.3 Sítios neurais envolvidos no comportamento defensivo: substância cinzenta periaqueductal.....	14
1.4 Sistema Endocanabinoide .....	16
2 OBJETIVOS .....	19
2.1 Objetivo Geral .....	19
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	20
3.1 Animais .....	20
3.2 Drogas.....	20
3.3 Cirurgia Estereotáxica.....	20
<b>3.3.1 Procedimento de microinjeção .....</b>	<b>21</b>
3.4 Injeção .....	21
<b>3.4.1 Verificação do sítio de injeção .....</b>	<b>21</b>
3.5 Testes comportamentais .....	23
3.5.1 Medo condicionado ao contexto.....	23
3.5.2 Teste de conflito de Vogel .....	24
3.6 Procedimentos Experimentais .....	25
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	29
4 RESULTADOS.....	30
4.1 Efeito do tratamento com o 2-AG intraSCPdl na expressão do medo condicionado ao contexto. ....	30
4.2 Efeitos da administração do inibidor da MGL, o URB602, intra-SCPdl na expressão do medo condicionado ao contexto. ....	30
4.3 Efeito do pré-tratamento com os antagonistas de CB <sub>1</sub> ou CB <sub>2</sub> , AM251 e AM630, no efeito do 2-AG intra-SCPdl no teste de Medo Condicionado ao Contexto. ....	31

4.4 Efeito do tratamento com o agonista canabinoide, 2-AG, intra-SCPdl no teste de Conflito de Vogel.....	33
4.4 Efeito do tratamento com o inibidor da MGL o URB602 intraSCPdl no teste de Conflito de Vogel .....	34
4.5 Efeito do pré-tratamento com AM251 (antagonista CB1) e AM630 (antagonista CB2) nos efeitos promovidos pelo 2-AG intraSCPdl no teste do Conflito de Vogel .....	35
5 DISCUSSÃO .....	38
6 CONCLUSÃO.....	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43

## RESUMO

Os endocanabinoides desempenham um papel importante na regulação da expressão das respostas relacionadas ao medo e ansiedade em várias regiões encefálicas, incluindo a substância cinzenta periaquedutal dorsolateral (SCPdl). O 2-araquidonilglicerol (2-AG) e a anandamida (AEA) são os principais endocanabinoides, os quais exercem seus efeitos através da ativação dos receptores canabinoides do tipo 1 (rCB1) ou do tipo 2 (rCB2). Trabalhos prévios mostram que o aumento da sinalização da AEA intra-SCPdl inibe as respostas aversivas nessa região em diversos modelos animais de ansiedade. Porém, o envolvimento do 2-AG sobre tais respostas ainda é pouco esclarecido. Assim, este trabalho foi proposto para verificar a hipótese de que a administração de 2-AG ou URB602, um inibidor de MAGL (enzima responsável pela hidrólise 2-AG), induz efeitos do tipo ansiolítico em dois modelos animais distintos de ansiedade, o teste de Medo Condicionado ao Contexto e o teste do Conflito de Vogel. Foram utilizados ratos Wistar (220-240 gramas) que tiveram cânulas unilaterais implantadas na SCPdl através da cirurgia estereotáxica. Após o período de recuperação, os animais foram submetidos aos testes comportamentais. No teste de Medo Condicionado ao Contexto (CFC), os animais foram submetidos a choques elétricos nas patas (6 ciclos 1.5 mA randomizados com duração de 2s) em uma caixa acrílica onde permaneceram por 10 minutos. Após 24 horas, realizou-se a administração do 2-AG: 5, 50 e 500 pmol/0,2µL; URB602: 30, 100, 300 pmol/0,2µL; ou veículo (0,2µL) intra-SCPdl. Dez minutos após a injeção cada animal foi re-exposto à caixa acrílica por 10 minutos, porém, sem receber os choques. Durante esse período avaliou-se o tempo de congelamento do animal. No teste de Conflito de Vogel (VCT), o animal foi privado de água por 24 horas, e após esse período foi colocado na caixa de Vogel com livre acesso à água por 3 minutos. Após 24 horas, os animais receberam a administração intra-SCPdl do 2-AG: 5, 50, 500 e 5000 pmol/0,2µL; URB 602: 30, 100, 300 pmol/0,2µL ou veículo (0,2µL). Dez minutos após a injeção, os animais foram novamente colocados na caixa por 3 minutos, onde receberam lambidas punidas (1 choque de 0.5 mA, a cada 20 lambidas). A administração de 2-AG (50 pmol e 500 pmol) diminuiu significativamente o tempo de congelamento observado após nova exposição ao contexto aversivo, enquanto que no teste de Vogel apenas a dose de 5000 pmol aumentou o número de lambidas punidas, sugerindo um efeito tipo ansiolítico nos dois

modelos. Por outro lado, a administração intra-SCPdl de URB602 não alterou a expressão da resposta de medo contextual, e também não aumentou o número de lambidas punidas no teste do VCT. A fim de verificar qual receptor canabinoide estava mediando os efeitos do 2AG, realizamos experimentos em que os animais receberam intra-SCPdl a administração do antagonista dos rCB1 AM251: 100pmol/0,2µL ou antagonista dos rCB2 AM630 1000pmol/0,2 µL, previamente à injeção do 2-AG nos dois modelos. Nossos resultados mostraram que os efeitos do 2-AG foram decorrentes da ativação tanto de rCB1 quanto rCB2, pois ambos antagonistas atenuaram o efeito ansiolítico do 2-AG. Nossos resultados, sugerem que a facilitação da sinalização 2-AG na SPCdl, através do inibidor MAGL, parece não ser essencial para inibir respostas aversivas na SCPdl. No entanto, não podemos excluir o papel deste endocanabinoide em inibir a expressão de respostas aversivas mediadas por essa região, uma vez que o 2-AG per se foi capaz de promover efeitos ansiolíticos nos dois modelos quando administrado diretamente.

**Palavras chave:** 2-araquidonoilglicerol (2-AG), ansiedade, substância cinzenta periaquedutal dorsolateral, medo condicionado ao contexto, teste conflito de Vogel.

## ABSTRACT

The endocannabinoids have an important role on the regulation of fear expression in response to aversive stimuli, in several brain regions, including the periaqueductal gray (PAG). The 2-arachidonoylglycerol (2-AG) and anandamide (AEA) are the main endocannabinoids and exerts its effects through activation of cannabinoid receptors type 1 (rCB1) and type 2 (rCB2). Previous works have been show the anti-aversive effects induced by augmentation of AEA signalling in different animal models of anxiety. However, the role of 2-AG on the aversive reactions modulated by dlPAG is not completely understood. Thus, we verified whether the administration of 2AG or URB602, an inhibitor of MGL (enzyme responsible for 2-AG hydrolysis), will induce anxiolytic-like effect in two animal's model of anxiety, the Contextual Fear Conditioned test and Vogel Conflict test. Male *Wistar* rats with unilateral cannulae aimed at the dlPAG, were submitted to Contextual Fear Conditioning (CFC) test and VCT test. After a 7 days recovery period, the animals were submitted to behavioral tests. In the Contextual Fear Conditioned Test (CFC), the animals were exposed to an acrylic chamber where they received electrical-foot shocks (6 cycles of 1.5mA randomized with duration of 2s) in an interval of ten minutes. Twenty-four hours later the animals received intra-SCPdl injection of 2-AG5, 50 and 500 pmol/0.2  $\mu$ L, URB602 30, 100, 300 pmol/0.2  $\mu$ L or vehicle (0.2 $\mu$ L), followed by re-exposure to acrylic chamber 10 minutes after injection. The time spent in freezing behavior was evaluated during ten minutes. In the Vogel conflict test (VCT), the animal was initially deprived of water for 24 hours, after this period they were exposed to an acrylic chamber containing a bottle of water. The animals had free access to water during 3 minutes. After 24 hours, the animals received intra-SCPdl administration of 2-AG5, 50, 500 and 5000/0.2  $\mu$ Lpmol or URB 602 30, 100, 300 pmol/ 0.2 $\mu$ L or vehicle (0.2  $\mu$ L). Ten minutes later they were placed in the chamber for 3 minutes, where it received punished licks (1 shock of 0.5 mA, every 20 licks).

Our results showed that the administration of 2-AG (50pmol and 500pmol) significantly decreased the freezing time (s) observed during the re-exposure to the aversive conditioned context, and only the dose of 5000 pmol increased the number of punished licks suggesting an anxiolytic-like effect of 2-AG. These injection of URB 602 did not induced these effects in both models. In order to verify which cannabiboid receptor was involved in 2-AG effects, we performed experiments where the animals received the

pre-treatment of CB1 receptor antagonist, AM 251 100pmol/0.2  $\mu$ L, or CB2 antagonist, AM 630 1000/0.2 $\mu$ L before 2-AG injection. The anxiolytic-like effects of 2-AG were dependent upon activation of rCB<sub>1</sub> and rCB<sub>2</sub> since their antagonists prevented the effects induced by 2-AG in the CFC and VCT.

Our results suggest that facilitation of 2-AG signaling in the dIPAG, through MGL inhibitor, may not be essential to inhibit aversive stimuli in the dIPAG. However, we cannot exclude the role of this endocannabinoid in aversive responses modulated by this region, since the 2-AG injected directly induced anxiolytic-like effects.

Key words: 2-AG, anxiety, dorsolateral periaqueductal gray, endocannabinoides, fear conditioned context, Vogel conflict test



## **1 REVISÃO DE LITERATURA**

### **1.1 Comportamento defensivo animal**

O comportamento defensivo caracteriza-se como a expressão de respostas fisiológicas e comportamentais que os animais apresentam frente a situações que promovem risco à sua sobrevivência (BANDLER e CARRIVE, 1988; BELZUNG e GRIEBEL, 2001; DEPAULIS et al., 1989). A presença de predadores, lugares desconhecidos e outros perigos provenientes do ambiente como altura e luminosidade podem levar a tais comportamentos (BLANCHARD et al., 1990). Assim, sugere-se que as repostas comportamentais defensivas que os animais apresentam em determinadas situações de perigo e aversão, correlaciona-se com os comportamentos de medo e ansiedade nos humanos (BLANCHARD e BLANCHARD, 1988; BLANCHARD e BLANCHARD, 1989). Adicionalmente, a compreensão do comportamento defensivo animal a partir de diferentes situações, permite a identificação das bases neurais envolvidas nesses transtornos, conseqüentemente, permitindo a identificação de novos alvos terapêuticos (UYS et al., 2003).

De acordo com a proposta de Blanchard e Blanchard (1988), as respostas defensivas podem ser classificadas em potenciais (incerta) e reais, sendo as respostas reais variáveis de acordo com a presença do perigo em proximais ou distais. Ainda de acordo com a proposta desses pesquisadores, os padrões de respostas variam de acordo com os diferentes estados emocionais. Assim, perigos potenciais induzem respostas de avaliação de risco (*risk-assessment*), em que há a exploração cautelosa do ambiente para investigar a presença de uma provável ameaça, tais comportamentos assemelham-se com a ansiedade (BLANCHARD e BLANCHARD, 1988; MCNAUGHTON e CORR, 2004). Na ameaça real, com a fonte de perigo distante, o comportamento predominante é o de fuga, na impossibilidade de fugir o animal adota a postura de congelamento seguido de vocalização (BLANCHARD e BLANCHARD, 1988). Por fim, se a ameaça é real e proximal, o animal tende a ficar imóvel (*freezing*), fugir, saltar, lutar ou morder em caso de confronto direto. Tais comportamentos estariam relacionados ao sentimento de medo e pânico (BLANCHARD e BLANCHARD, 1988; BLANCHARD et al., 1986).



## 1.2 Modelos animais para estudo do medo e ansiedade

O medo e ansiedade são estudados nos animais através da avaliação do comportamento defensivo utilizando-se modelos experimentais (MCKINNEY, 1984). Tais modelos podem ser utilizados em diferentes espécies, sendo as diferentes espécies deroedores as mais empregadas (MCKINNEY, 1984).

Nos animais o medo e a ansiedade como conceituados anteriormente, são o conjunto de respostas, que eles apresentam frente a fontes de perigos e ameaças reais (medo) ou potenciais (ansiedade). Tais respostas são acompanhadas de alterações fisiológicas, como por exemplo, o aumento da frequência cardíaca, aumento da pressão arterial e redução da temperatura da cauda (BELZUNG e GRIEBEL, 2001).

Os modelos animais desenvolvidos para estudo do medo e ansiedade baseiam-se em avaliações comportamentais (BOURIN et al., 2007) Esses comportamentos podem ser agrupados em duas classes: a primeira envolve respostas condicionadas, quando ocorre o pareamento entre o estímulo incondicionado aversivo com um ambiente neutro os animais são submetidos a estímulos aversivos dolorosos como choque nas patas; a segunda avalia comportamentos etológicos, onde os animais são expostos a situações naturalmente aversivas como locais altos e iluminados (BELZUNG e GRIEBEL, 2001; BOURIN et al., 2007; CAMPOS et al., 2013; LISTER, 1990; SANGER et al., 1991).

O labirinto em cruz elevado (LCE), é um clássico modelo etológico e devido a sua facilidade de execução e outras vantagens, tornou-se um dos mais utilizados para estudo de ansiedade nos animais (CAROBREZ e BERTOGLIO, 2005). Foi desenvolvido a partir de observações prévias de padrões exploratórios, em que ambientes novos ou desconhecidos evocam medo e curiosidade, criando uma situação de conflito entre explorar os ambientes abertos e inseguros e permanecer nos braços fechados do aparato (PELLOW e FILE, 1986).

Em relação aos modelos condicionados, esses se diferenciam dos modelos descritos acima pela necessidade de treinamento e submissão dos animais a privação de comida ou água além de estímulos nocivos (BOURIN et al., 2007; TREIT, 1985). Assim, o modelo do Medo Condicionado ao Contexto (CFC, conditioned fear contextual) envolve um condicionamento pavloviano (PAVLOV, 2010). Inicialmente, o animal é exposto a um contexto neutro pareado a um estímulo aversivo, posteriormente durante a re-exposição ao contexto neutro, esse ambiente passa a ser um estímulo condicionado e o animal apresenta respostas defensivas como, por exemplo, a postura

imóvel de congelamento, onde ele permanece imóvel com uma postura característica, somente com os movimentos da respiração (BLANCHARD e BLANCHARD, 1969; BORELLI et al., 2013; FANSELOW, 1980).

Além do modelo CFC, o teste de conflito de Vogel, o qual foi baseado nos trabalhos de Geller et al. (GELLER et al., 1962), o animal previamente privado de água, encontra-se em uma situação de conflito entre saciar a sede ou receber um choque punitivo. Nesse modelo, drogas que aliviam a ansiedade geram uma resposta inibitória ao comportamento de punição, ou seja, o animal recebe lambidas punidas a despeito da punição (CAMPOS et al., 2013; VOGEL et al., 1971).

### **1.3 Sítios neurais envolvidos no comportamento defensivo: substância cinzenta periaqueductal**

A amígdala, hipotálamo dorsomedial e substância cinzenta periaqueductal (SCP) são as principais estruturas encefálicas responsáveis pela elaboração dos comportamentos defensivos e fazem parte do chamado sistema cerebral de defesa (GRAEFF, 1990). A identificação desses sítios neurais é proveniente de estudos que verificaram que tanto a estimulação elétrica ou química dessas regiões promovia comportamentos aversivos nos animais, semelhantes às aquelas observadas em situações de pânico em humanos (GRAEFF e KRIEGER, 1985, SCHENBERG e BITTENCOURT 2001), enquanto que lesões promovia diminuição das respostas de defesas ou efeitos tipo-ansiolíticos (CANTERAS et al., 1997; CEZARIO et al., 2008; MARTINEZ et al., 2008).

Acredita-se que essas estruturas estejam organizadas paralelamente, hierarquicamente e de maneira simétrica na modulação desses comportamentos (MCNAUGHTON e CORR, 2004). Nesse sentido, pequenas distâncias da fonte de perigo ativariam estruturas mais caudais, como a SCP e distâncias maiores ativariam estruturas mais corticais, como o córtex pré-frontal (CPF), estrutura prosencefálica que atualmente também faz parte do sistema cerebral de defesa (BLANCHARD e BLANCHARD, 1988; BLANCHARD et al., 1993; MCNAUGHTON e CORR, 2004).

Especificamente a SCP é uma região mesencefálica, que circunda o aqueduto cerebral. Funções como reações defensivas, analgesia e regulação autonômica são classicamente associadas a essa estrutura (BEHBEHANI, 1995). Alguns estudos eletrofisiológicos apontaram que a SCP poderia ser dividida em quatro regiões distintas anatomicamente e funcionalmente: dorsomedial, dorsolateral, lateral e ventrolateral.

(BANDLER et al., 2000; CARRIVE, 1993). Dessa forma, a porção dorsolateral da SCP estaria envolvida nas respostas de congelamento e escape durante o comportamento defensivo, evidenciados por estudos imunohistoquímicos demonstrando pelo aumento da expressão de proteína FOS após estimulação elétrica dessa região (VIANNA et al., 2003).

Trabalhos clássicos demonstraram a participação da SCP dorsolateral na elaboração de respostas defensivas. Através da injeção de Aminoácidos Excitatórios (AE) na SCP de gatos houve a indução de respostas defensivas (FERNANDEZ DE MOLINA e HUNSPERGER, 1959), posteriormente utilizando técnica semelhante, observou-se essa mesma resposta em ratos (HILTON e REDFERN, 1986; KRIEGER e GRAEFF, 1985).

Nesse contexto os pesquisadores SCHENBERG e GRAEFF (1978) observaram que a estimulação da porção dorsal da SCP que compreende as porções dorsomedial e dorsolateral, também possui propriedades aversivas, pois ratos treinados aprendiam rapidamente a interromper a estimulação elétrica dessa região (SCHENBERG e GRAEFF, 1978).

Estudos utilizando a técnica de imunorreatividade da proteína Fos, também caracterizaram a SCP como estrutura que compõe o sistema acionado após estímulos ameaçadores, através da marcação celular (KOVACS, 1998; SILVEIRA et al., 1993; SINGEWALD e SHARP, 2000; VIANNA et al., 2003). Nos seres humanos a ativação da porção dorsal da SCP também ocorreu sob ameaças proximais evidenciadas por imagens de ressonância magnéticas publicadas por Mobbs et al. em 2007 (MOBBS et al., 2007).

Trabalhos publicados pelo nosso grupo também já demonstram a participação da SCPdl na modulação do comportamento defensivo (AGUIAR et al., 2006; MOREIRA et al., 2007). Além disso, diversos neurotransmissores presentes na SCPdl estão envolvidos nas respostas defensivas, dentre eles o GABA, Glutamato, 5-HT e os endocanabinoides (AGUIAR et al., 2006; GRAEFF et al., 1986; GUIMARAES et al., 1991; JARDIM et al., 2005; SCHUTZ et al., 1985).

#### 1.4 Sistema Endocanabinoide

Em 1964 o pesquisador Rafael Mechoulam isolou diversos compostos da planta *Cannabis sativa*, popularmente conhecida como maconha, dentre eles o  $\Delta$ -9-tetrahidrocanabinol ( $\Delta$ -9-THC), principal componente psicoativo da planta (Gaoni & Mechoulam 1964). Esse foi o primeiro passo para a descoberta do sistema atualmente conhecido como sistema endocanabinoide.

Atualmente, sabe-se que o sistema endocanabinoide é composto pelos receptores do tipo 1 (rCB<sub>1</sub>) e do tipo 2 [rCB<sub>2</sub>, (DI MARZO et al., 1998; HERKENHAM, 1991)], os compostos endógenos conhecidos como endocanabinoides, sendo os principais a N-araquidonoiletanolamida também conhecida como Anandamida [AEA, (DEVANE et al., 1992)] e o 2-araquidonoilglicerol [2-AG, (SUGIURA et al., 1995)], além das enzimas responsáveis pela degradação (DI MARZO, 2008; PIOMELLI, 2003)].

Os endocanabinoides são compostos lipofílicos produzidos a partir de fosfolípidos de membrana através de vias biossintéticas sensíveis ao Ca<sup>+2</sup>. Uma importante característica desses compostos é que os mesmos são produzidos sob demanda, diferentemente dos neurotransmissores típicos que são sintetizados e armazenados em vesículas para liberação após estímulo (MECHOULAM et al., 1998; WILSON e NICOLL, 2002). Embora o mecanismo de recaptção dos endocanabinoides não seja completamente elucidado, acredita-se envolver carreamento de membrana por proteína intracelular e possivelmente endocitose, sendo inativados por hidrolases enzimáticas (FU et al., 2011).

Trabalhos da literatura sugerem que o 2-AG é produzido pela ação consecutiva de duas enzimas encontradas nos neurônios pós-sinápticos, a fosfolipase C (PLC) e a diacilglicerol lipase [DGL, (HASHIMOTODANI et al., 2008)]. A PLC hidrolisa o segundo mensageiro fosfatidilinositol para gerar o diacilglicerol, que por sua vez é clivado pela DGL para formar o 2-AG (JUNG et al., 2007; PIOMELLI, 2003). A principal enzima responsável pela hidrólise do 2-AG é a monoacilglicerol lipase [MGL, (KANO et al., 2009)]. Compostos que inibem seletivamente a ação dessa enzima elevam as concentrações desse endocanabinoide e são atualmente importantes alvos farmacológicos (ALMEIDA-SANTOS et al., 2013; KINSEY et al., 2009; SCIOLINO et al., 2011).

Em relação a AEA, parece ser sintetizada principalmente, a partir de N-araquidonoilfosfatidil etanol (NAPE), sendo uma das rotas de síntese identificada pela

hidrólise de NAPE por NAPE-PLD. Outra rota proposta é a clivagem da ligação fosfodiéster de NAPE por NAPE PLC seguida por defosforilação da fosfo-anandamida, (LIU et al., 2006). A principal enzima responsável pela degradação da AEA é a amidahidrolase de ácidos graxos (FAAH) (LIU et al., 2006).

Os receptores CB<sub>1</sub> são amplamente distribuídos no SNC, e são expressos em maior concentração em regiões como hipocampo, córtex, cerebelo e gânglios da base (HERKENHAM, 1991; MATSUDA et al., 1993; TSOU et al., 1998), além de estarem presentes na SCP dorsolateral (Herkenham et al. 1991; Bandler et al. 2000; Egertova et al. 2003). Tal expressão sugere que esses receptores modulem as respostas comportamentais relacionadas com ansiedade. O receptor canabinoide tipo 2 é expresso primariamente em elementos vasculares, ou seja periféricamente (REF). Porém, alguns estudos já demonstraram sua expressão e seu papel em alguns efeitos no SNC (RAMIREZ et al., 2012; WALTER et al., 2003).

Os receptores CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub> pertencem a um subtipo de proteína Gi/o, sua sinalização inclui a inibição da enzima adenilato ciclase, ocorre também a regulação de canais iônicos, através da inibição de canais de Ca<sup>+2</sup> voltagem dependentes e ativação de canais de K<sup>+</sup>. De maneira geral, promove a inibição da liberação de diversos neurotransmissores (HOWLETT e FLEMING, 1984; MACKIE, 2006). Além disso, em decorrência da ativação de CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub> ocorrem outras alterações fisiológicas celulares, incluindo função sináptica, transcrição gênica e motilidade celular (HOWLETT, 2002; HOWLETT et al., 2002).

Considerando-se a participação dos ECs nas respostas emocionais, já é bem descrito na literatura os efeitos psicotrópicos e comportamentais promovidos por agonistas canabinoides (ALMEIDA-SANTOS et al., 2013; AMERI, 1999; FINN; GUIMARAES et al., 1990; MOREIRA e WOTJAK, 2010; PERTWEE, 2008; PIOMELLI, 2003). Reforçando essa possibilidade, trabalhos que verificaram atividade neuronal através da expressão da proteína Fos, observaram o aumento expressivo dessa proteína nas regiões encefálicas relacionadas com a ansiedade após a administração sistêmica ou i.c.v. de agonistas canabinoides (MCGREGOR et al., 1998).

Em relação aos níveis dos endocannabinoides, observa-se que situações de estresse, como por exemplo, o estresse de restrição, induz aumento nos níveis de 2-AG e diminuição da AEA no CPF, hipotálamo e SCP em ratos (HILL e MCEWEN, 2010). Adicionalmente, animais que receberam choque nas patas apresentaram aumento nos

níveis de 2-AG na SCP, sendo este efeito relacionado com a analgesia mediada pelo estresse (GREGG et al., 2012; HOHMANN et al., 2005). Além disso, treinamentos que envolvem consolidação de memória revelam que apenas a AEA está elevada no treinamento em que os animais receberam choques com alta intensidade, enquanto nos níveis do 2-AG não estiveram alterados (MORENA et al., 2014).

Trabalhos recentes do nosso grupo demonstraram efeito tipo ansiolítico do 2-AG através da injeção intraSCPdl no modelo do LCE em ratos (ALMEIDA-SANTOS et al., 2013) e efeito anti-aversivo na mesma região no modelo de pânico induzido por estimulação química da SCPdl (AGUIAR et al., 2006; BATISTA et al., 2014; GOBIRA et al., 2013; GOBIRA et al., 2016; MOREIRA et al., 2006; 2007; MOREIRA et al., 2012).

Esses dados sugerem que assim como a anandamida, o 2-AG também pode participar nas respostas defensivas mediadas pela SCPdl. No entanto, a participação desse endocanabinoide em modelos animais que envolvam um componente mais aversivo, ainda não foi estabelecido.

## **2OBJETIVOS**

### **2.1Objetivo Geral**

Testar a hipótese de que o aumento da sinalização de 2-AG na SCPdl promoverá efeitos ansiolíticos em modelos animais de ansiedade que envolvem respostas condicionadas ou situações de conflito.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Verificar se a administração intra-SCPdl do 2-AG ou do URB 602 (inibidor da enzima responsável pela degradação de 2AG) promoverá efeito ansiolítico nos modelos de medo condicionado ao contexto e no teste de Conflito de Vogel
- .- Verificar qual receptor canabinoide está envolvido com os efeitos anti-aversivos promovidos por essas drogas.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar, pesando entre 220-240 gramas, mantidos agrupados (4-5 animais) em gaiolas, provenientes do CEBIO-UFMG. Projeto aprovado segundo protocolo (66/2010) pelo comitê de Ética em Pesquisa em Experimentação Animal.

#### 3.2 Drogas

- 2-araquidonoilglicerol (2-AG): 5, 50, 500 e 5000 pmol/0.2µl (ALMEIDA-SANTOS et al., 2013)
- URB602 (inibidor da lipase monoacilglicerol): 30, 100 e 300 pmol/0.2 µl (ALMEIDA-SANTOS et al., 2013)
- AM251 (antagonista de receptor CB1): 100 pmol/0.2 µL diluído em Salina 0,9% (MOREIRA et al., 2007; TERZIAN et al., 2009).
- AM630 (antagonista de rCB2, Tocris<sup>®</sup>): 1000 pmol/0.2µl; dose obtida dos dados prévios do laboratório na SCPdl (ALMEIDA-SANTOS et al., 2013)

#### 3.3 Cirurgia Estereotáxica

Os animais foram anestesiados com Ketamina (60 mg/Kg) e Xilazina (8mg/Kg), via i.p, e fixados a um aparelho estereotáxico. Foi realizada uma incisão sagital para exposição da calvária e remoção do periósteo, a calota craniana foi perfurada com um orifício (coordenadas: AP-lambda 0 mm, L-1,9 mm, P-4,3 mm, ângulo-16°, (PAXINOS e WATSON, 2007) para introdução da cânula guia (11 mm) dirigida à SCPdl. A cânula foi fixada ao crânio com cimento acrílico, conforme descrito em trabalhos prévios de (AGUIAR et al., 2006; GUIMARAES et al., 1991). Foi introduzido na cânula um mandril de aço inoxidável para evitar obstrução. Os animais receberam injeção de pentabiótico e do analgésico, antitérmico e antiinflamatório Banamine<sup>®</sup> (flunixinmaa glumina, 1 ml/Kg). Após a recuperação da anestesia, os animais foram alojados no biotério até seu restabelecimento (7 dias) e então foram submetidos aos testes comportamentais.



### 3.3.1 Procedimento de microinjeção

Após a retirada do mandril, foi introduzida pela cânula guia uma agulha odontológica gengival (12 mm). A agulha foi conectada a um segmento de Polietileno (P10) e este a uma seringa Hamilton® de 10 µl. As injeções foram realizadas por uma bomba de infusão (Insight®) sendo o volume injetado 0,2 µl, a uma taxa de infusão de 0.4µl/min. Após a injeção, a agulha permaneceu no interior da cânula-guia por 30 segundos, para evitar refluxo da droga. Após cada injeção, a bomba de infusão era novamente acionada, com a finalidade de se verificar se a agulha não estava entupida.

### 3.4 Injeção

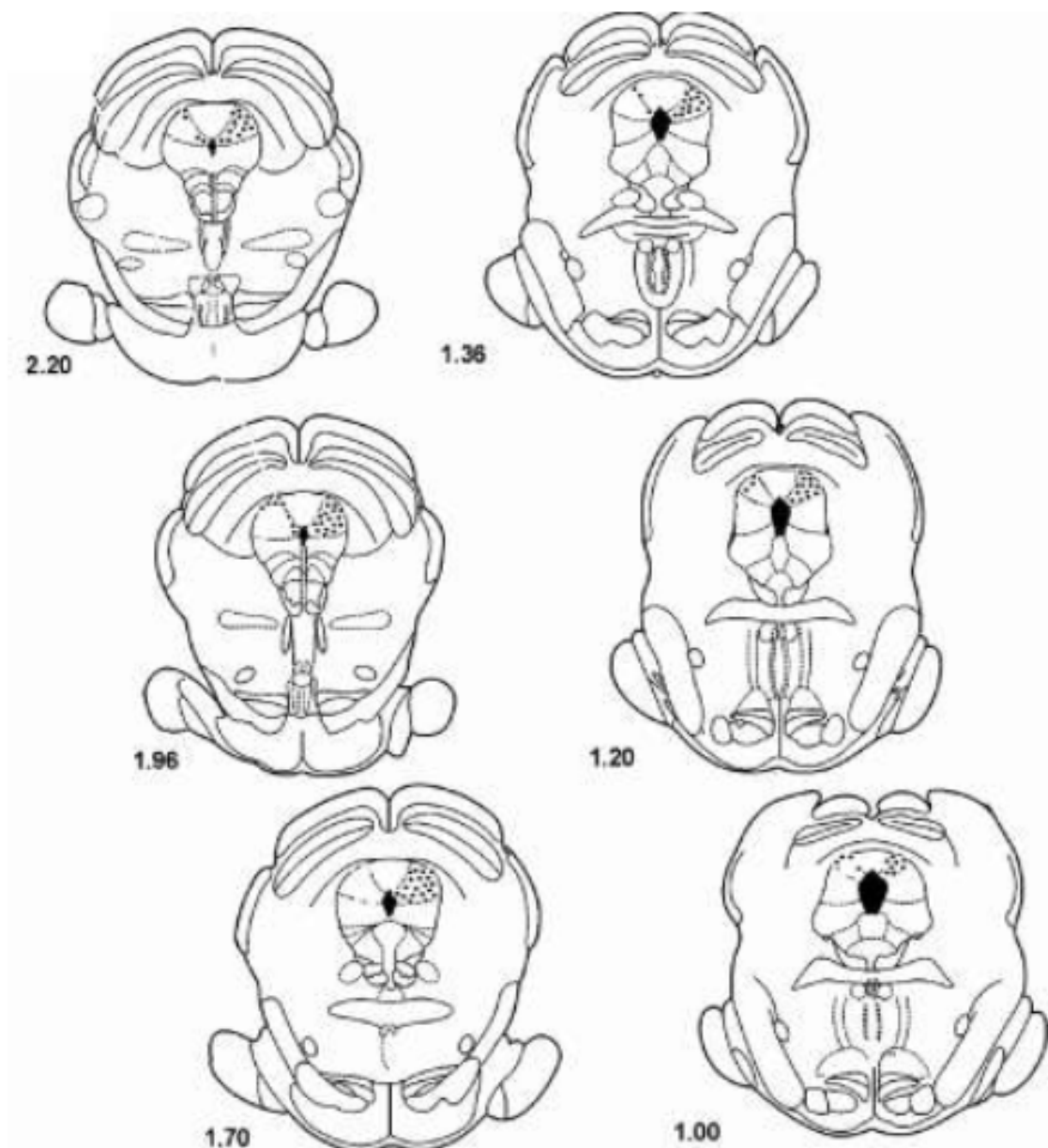
A injeção foi feita unilateral (SCPdl) segurando o animal gentilmente para retirada do mandril e introdução, pela cânula guia, de uma agulha odontológica gengival (12 mm para a SCPdl), até atingir a região desejada 1mm abaixo da extremidade das cânulas (Fig. 1). A agulha foi conectada a uma seringa Hamilton® de 10 µL por meio de um segmento de Polietileno (P10). As injeções foram realizadas com ajuda de uma bomba de infusão Insight® a uma velocidade de 1µl/min em um volume total de 0,2 µL.

#### 3.4.1 Verificação do sítio de injeção

Após os experimentos, os animais foram anestesiados por via intraperitoneal (i.p.) com Uretana (25% - 5ml/kg) e, após a constatação da anestesia profunda (verificada pela ausência do reflexo de retirada da cauda após estímulo nociceptivo), foram submetidos a uma toracotomia para exposição do coração. Uma agulha hipodérmica foi inserida no ventrículo esquerdo, por onde foram administradas as soluções de salina 0,9 % e formaldeído 25% com o auxílio de uma bomba peristáltica (Milan®), a uma taxa de perfusão de 14ml/min. Paralelamente, foi feita uma incisão no arco aórtico para permitir a saída do sangue. Os animais foram decapitados, os cérebros retirados com o auxílio de uma espátula e estocados em formaldeído 10% por 3 dias.

Após 3 dias em formol 10 % , os cérebros foram cortados em secções de 50 µm de espessura, com o auxílio de um criostato (Microm HM 505 N). Os cortes foram colocados em lâminas de vidro gelatinizadas e o sítio de injeção foi confirmado por meio dos diagramas contidos no Atlas Paxinos e Watson, 2007.

**Figura 1.** Representação dos sítios de injeção na SCPdl em diagramas adaptados a partir do Atlas de Paxinos



Fonte: (PAXINOS e WATSON, 1997;2007).

### 3.5 Testes comportamentais

#### 3.5.1 Medo condicionado ao contexto

O teste foi realizado em uma caixa de 25 × 22 × 22 cm (Fig. 2). O chão da caixa é formado por uma grade constituída por 18 barras de aço inoxidável (2 mm de diâmetro), com espaçamento de 1,5 cm de distância e ligados a um gerador de choque (Insight<sup>®</sup>, Brasil). No período da manhã, os animais foram expostos à caixa (habituação) por um período de 3 minutos e posteriormente receberam nas patas seis choques elétricos (1,5mA/3s) com duração de 20 segundos cada choque, sendo 1 minuto de intervalo entre os choques (condicionamento), totalizando o tempo de permanência dos animais na caixa de 10 minutos. Vinte e quatro horas após o condicionamento, os animais foram reexpostos (teste) à caixa por 10 minutos sem aplicação dos choques (RESSTEL et al., 2008). Durante o teste, o comportamento dos animais foi filmado com auxílio de uma câmera Samsung, SMX-C10LN/XAA, e posteriormente, o tempo que os animais permaneceram em congelamento (*freezing*), definido como a ausência completa de movimentos diferentes da respiração (FANSELOW, 1980) foi quantificado pelo experimentador. A caixa foi limpa com álcool 70% entre a exposição dos animais.

**Figura 2.** Caixa do Medo Condicionado ao Contexto



Fonte: Fotografia da autora

### 3.5.2 Teste de conflito de Vogel

Os animais foram privados de água durante 48 h antes do teste. Após as primeiras vinte e quatro horas de privação, eles foram expostos a uma caixa 470x260x225 mm (Fig. 3) contendo um bebedouro, onde após encontrá-lo beberam água livremente durante 3 minutos. Os animais que não encontram o bico do bebedouro foram excluídos do experimento. Vinte e quatro horas após as drogas foram injetadas intra-SCPdl e, após 10 minutos, os animais foram colocados na caixa de teste. O teste consistia em uma sessão de 5 minutos, onde os animais recebiam uma lambida punida com um choque de intensidade 0,5 mA a cada 20 lambidas após cada teste a caixa foi limpa com uma solução de álcool (70 %). O número de lambidas e choques foram registrado automaticamente (Insight<sup>®</sup>, Brasil).

**Figura 3.** Caixa do Teste de Conflito de Vogel



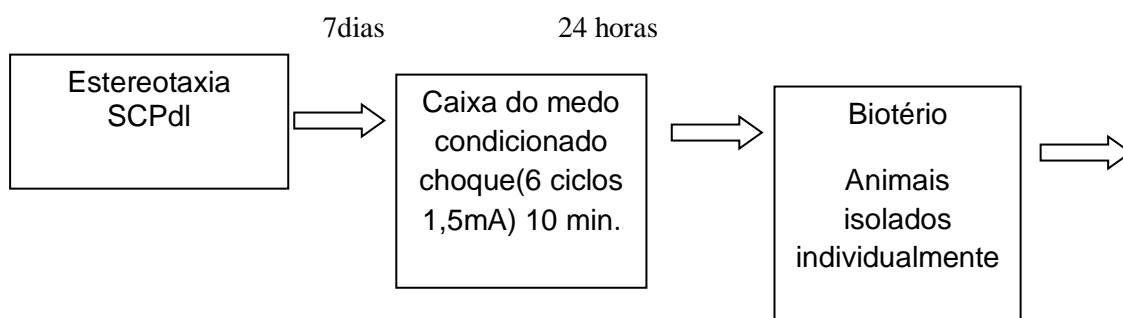
Fonte: site <http://www.insightltda.com.br>

### 3.6 Procedimentos Experimentais

**Experimentos 1 e 2** – Efeito da administração de 2-AG e URB 602 (inibidor da hidrólise do 2-AG) intra-SCPdl em animais expostos ao Teste do Medo Condicionado ao Contexto (n= 8/10grupo) (Fig. 4).

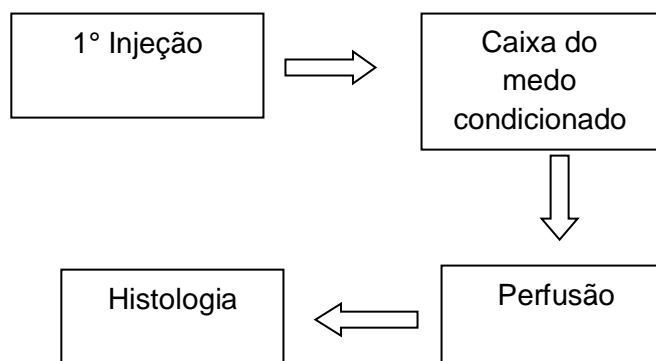
- Veículo, 2-AG (5pmol), 2-AG (50 pmol) e 2-AG (500 pmol).
- Veículo, URB602 (30 pmol), URB602 (100 pmol), URB602 (300 pmol) URB602 (1000pmol).

**Figura 4.** Representação esquemática dos protocolos experimentais 1 e 2 (n= 8/10 grupo).



Teste

10 minutos

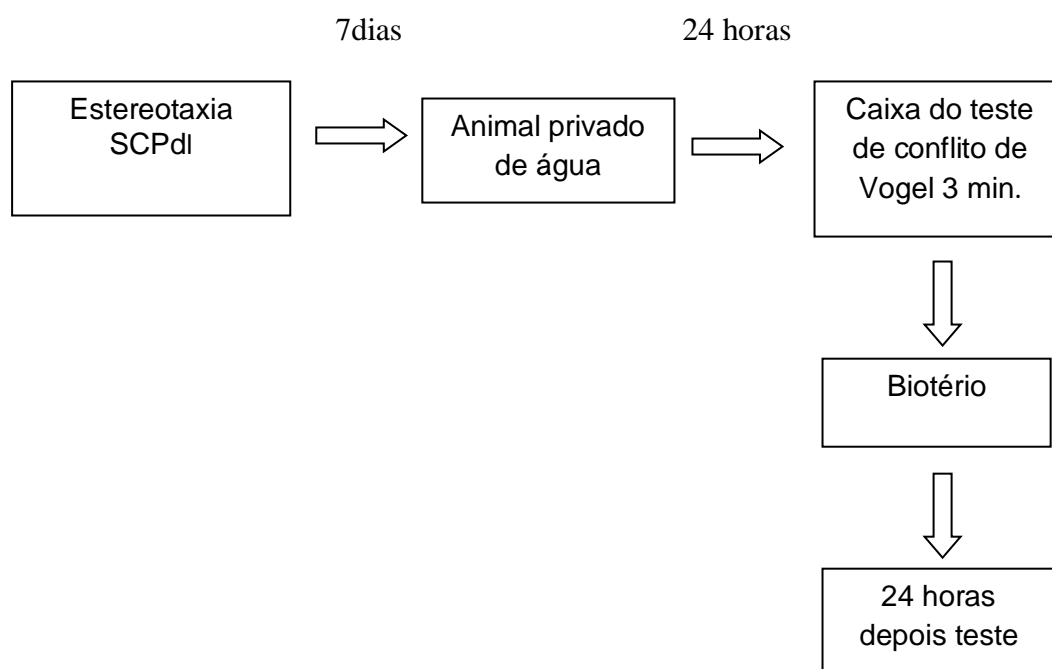


Fonte: Criada pela autora

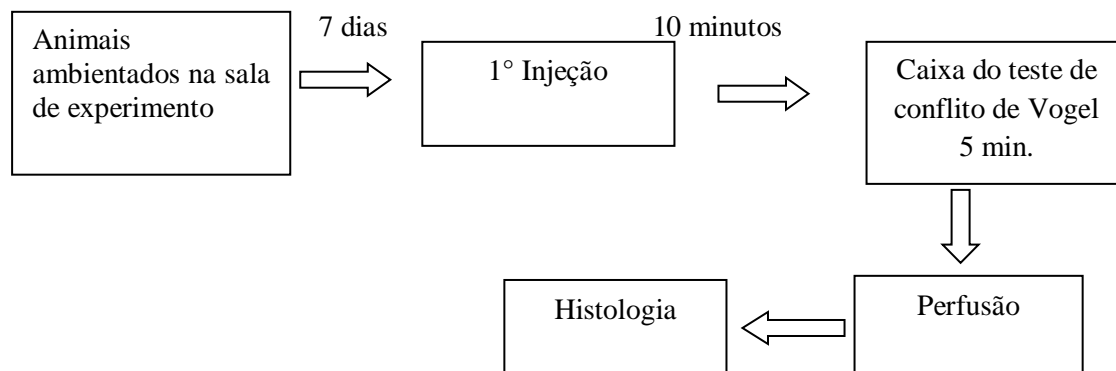
**Experimentos 3 e 4** - Efeito da administração de 2-AG e URB 602 (inibidor da hidrólise do 2-AG) intra-SCPdl em animais expostos ao Teste de conflito de Vogel (n=6-13/grupo) (Fig. 5).

- Veículo, 2-AG (5pmol), 2-AG (50 pmol), 2-AG (500 pmol) e 2-AG (5000 pmol)
- Veículo, URB602 (30 pmol), URB602 (100 pmol) e URB602 (300 pmol)

**Figura 5.** Representação esquemática do protocolo experimental 3 e 4 (n= 6/13 grupo).



Teste

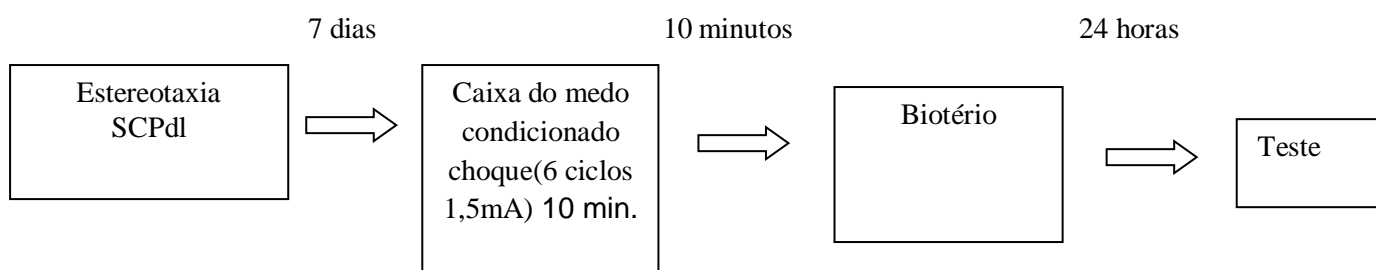


Fonte: Criada pela autora

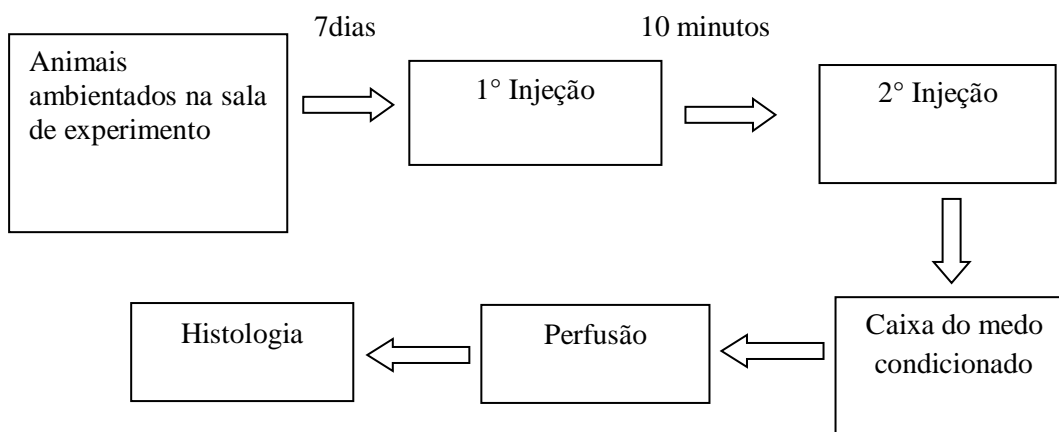
**Experimentos 5 e 6** – Efeito do pré-tratamento com AM251 (antagonista CB<sub>1</sub> ou AM630 (antagonista CB<sub>2</sub>) sobre as respostas promovidas pelo 2AG intra-SCPdl no Teste de Medo Condicionado ao Contexto (Fig. 6).

- Veículo + Veículo (0,2 µl).
- Veículo + AM630 (1000 pmol) ou AM251 (100 pmol).
- Veículo + 2AG (50 pmol).
- AM251 (100 pmol) ou AM630 (1000 pmol) + 2-AG (50 pmol).

**Figura 6.** Representação esquemática do protocolo experimental 5 e 6 (n= 6/12 grupo).



Teste

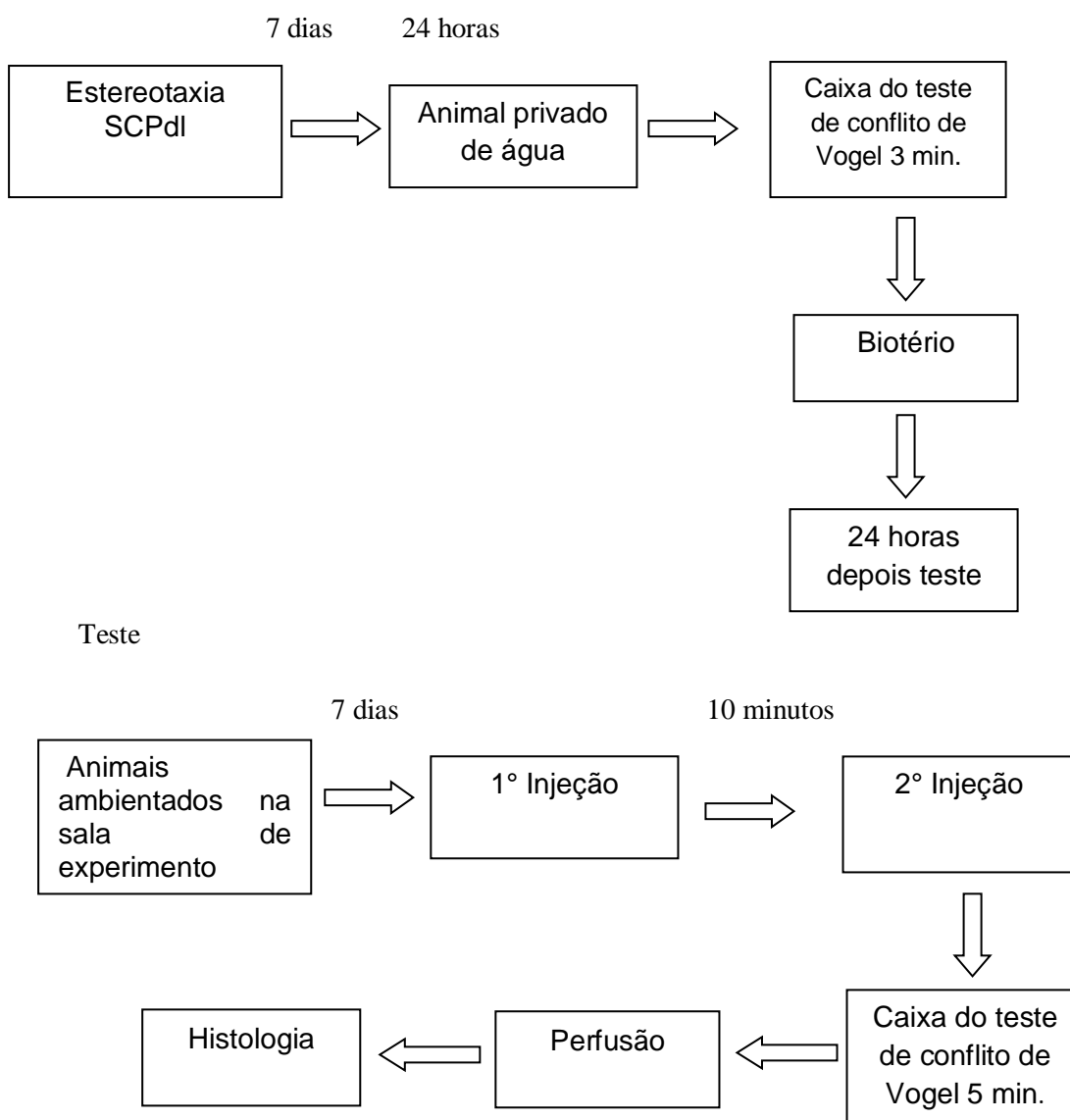


Fonte: Criada pela autora

**Experimento 7 e 8**– Efeito do pré-tratamento com AM251(antagonista CB1 ou AM630 antagonista CB2) sobre as respostas promovidas pelo 2AG intra-SCPdl no teste de Conflito de Vogel (Fig. 7).

- . Veículo + Veículo (0,2  $\mu$ l).
- Veículo + AM630 (1000 pmol) ou AM251 (100 pmol).
- Veículo + 2-AG (50 pmol).
- AM251 (100 pmol) ou AM630 (1000 pmol) + 2-AG (50 pmol).

**Figura 7.**Representação esquemática do protocolo experimental 7 e 8 (n= 7/10 grupo).



Fonte: Criada pela autora



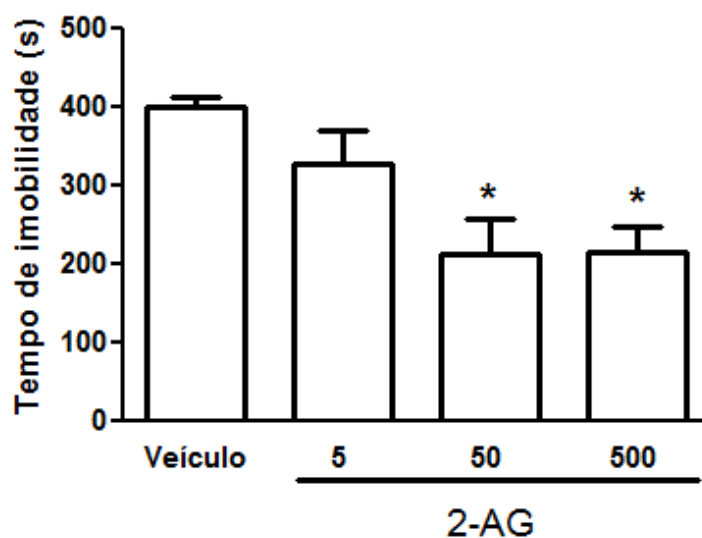
### **3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

O resultado de ambos os testes foram analisados pela Análise de Variância (ANOVA) seguida do pós teste de Bonferroni e o nível de significancia estabelecido foi de  $p < 0,05$ . O programa utilizado para as análises estatísticas e elaboração dos gráficos foi o GraphPadPrism 5 ®.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Efeito do tratamento com o 2-AG intraSCPdl na expressão do medo condicionado ao contexto.

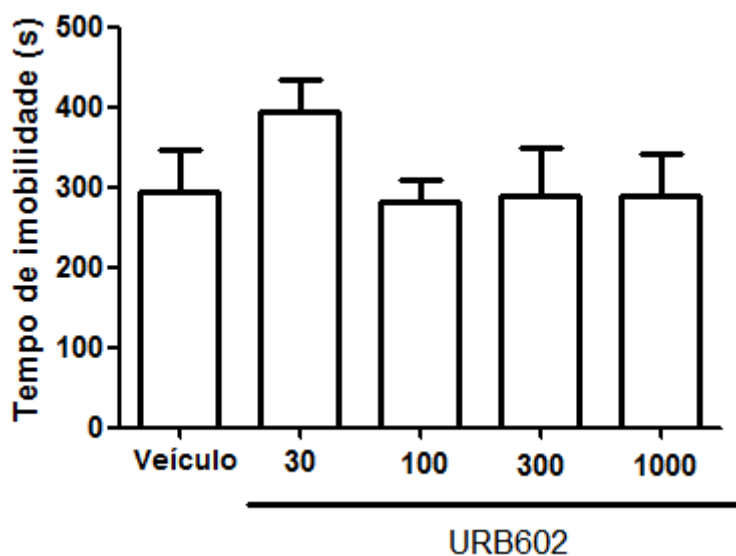
A injeção intraSCPdl do 2-AG (50 e 500 pmol/0,2  $\mu$ L) reduziu o tempo de imobilidade do animal após segunda exposição ao contexto aversivo ( $F_{(3,31)}=6,49$   $p=0,001$ , ANOVA seguido do teste de Bonferroni)(Fig. 8).



**Figura 8.** Efeito do 2-AG (5, 50, 500 pmol/0,2  $\mu$ L) intraSCPdl no tempo de imobilidade dos animais expostos ao teste do medo condicionado ao contexto. As colunas representam a média  $\pm$  EPM do tempo de imobilidade dos animais (\* $p<0,005$  em relação ao veículo; ANOVA seguido do teste de Bonferroni,  $n=8-10$ /grupo).

### 4.2 Efeitos da administração do inibidor da MGL, o URB602, intra-SCPdl na expressão do medo condicionado ao contexto.

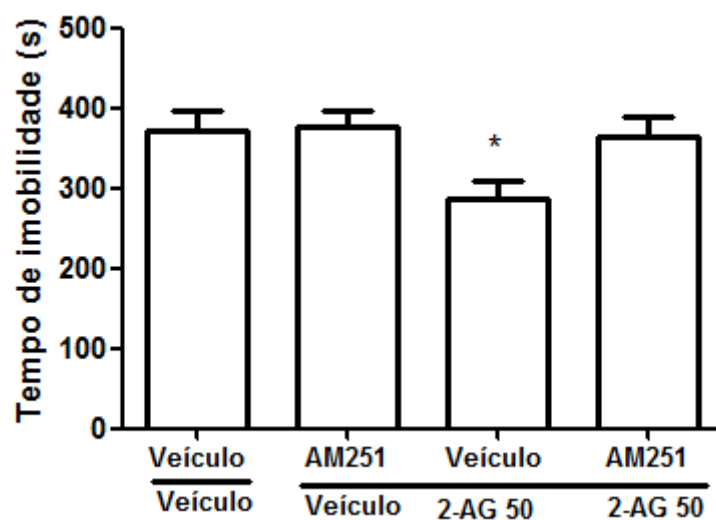
A injeção intra-SCPdl do URB602 (30, 100, 300 e 1000 pmol/0,2  $\mu$ L) não modificou em nenhuma das doses utilizadas o tempo de imobilidade dos animais expostos ao contexto aversivo ( $F_{(4,37)}=0,77$   $p=0,55$ , ANOVA)(Fig. 9).



**Figura 9.** Efeito do URB 602 (30, 100, 300 e 1000 pmol/0,2 µL) intraSCPdl no teste do Medo Condicionado ao Contexto. As colunas representam a média ± EPM do tempo de imobilidade dos animais (n= 6-10/grupo).

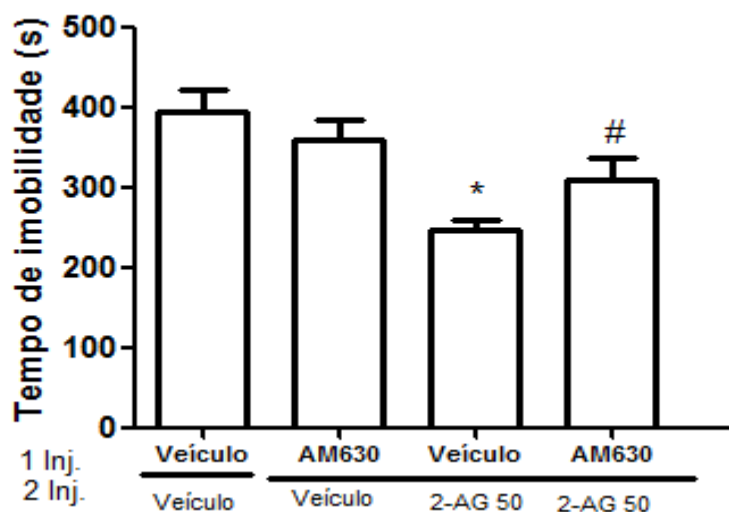
#### **4.3 Efeito do pré-tratamento com os antagonistas de CB<sub>1</sub> ou CB<sub>2</sub>, AM251 e AM630, no efeito do 2-AG intra-SCPdl no teste do Medo Condicionado ao Contexto.**

A administração de 2-AG, foi capaz de reduzir o tempo de imobilidade dos animais no modelo de condicionamento ao contexto. ( $F_{(3,39)}=3,27$   $p=0,03$ , ANOVA seguido do Teste de Bonferroni) (Fig.10). Os animais que receberam o pré-tratamento com AM251 não diferiram dos animais que receberam veículo (Bonferroni,  $p>0,05$ ).



**Figura 10.** Pré-tratamento com AM251 intra-SCPdl sobre o efeito promovido pelo 2-AG intra-SCPdl no teste do Medo Condicionado ao Contexto. As colunas representam a média  $\pm$  EPM do tempo de imobilidade dos animais (\*  $p < 0,05$  em relação ao grupo veículo+veículo; ANOVA seguida de Bonferroni,  $n=8-10$ /grupo).

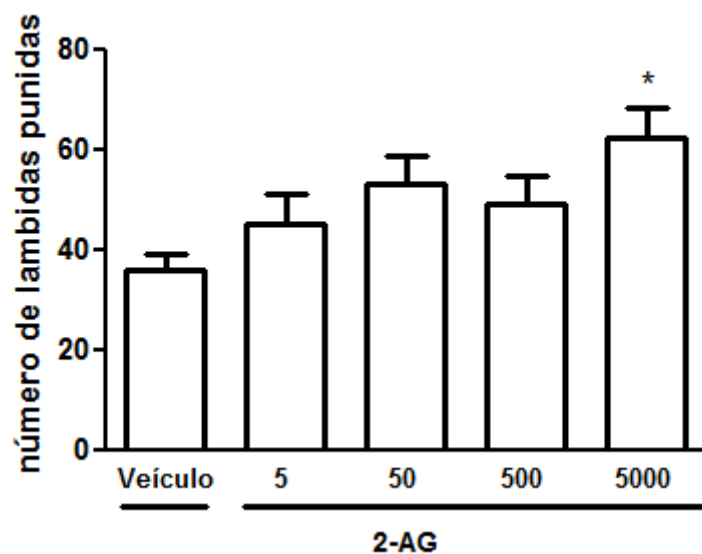
No experimento subsequente, observamos novamente que o 2-AG foi capaz de reduzir o tempo de imobilidade dos animais durante a reexposição ao contexto aversivo ( $F_{(3,21)}=6,99$   $p=0,001$ , ANOVA seguida do teste de Bonferroni)(Fig. 11). O pré-tratamento com o antagonista de  $CB_2$  reverteu significativamente esse efeito. ( $p < 0,05$  teste de Bonferroni).



**Figura 11.** Pré-tratamento com AM630 intra-SCPdl sobre o efeito promovido pelo 2-AG intraSCPdl no teste do Medo Condicionado ao Contexto. As barras representam a média  $\pm$  EPM do tempo de imobilidade dos animais (\* $p < 0,05$  em relação ao grupo veículo+veículo, #  $p < 0,05$  em relação ao grupo veículo + 2-AG; ANOVA seguida de Bonferroni,  $n=6-7$ /grupo).

#### 4.4 Efeito do tratamento com o agonista canabinoide, 2-AG, intra-SCPdl no teste de Conflito de Vogel

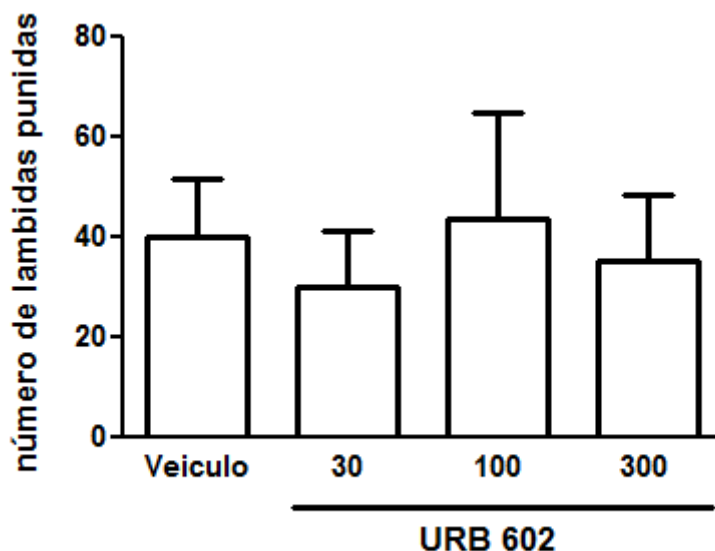
No teste de Vogel a administração de 2-AG (5000 pmol/0,2  $\mu$ L)intra-SCPdl aumentou significativamente o número de lambidas punidas ( $F_{(4,53)}=3,04$   $p=0,02$ , ANOVA seguida do teste de Bonferroni)(Fig. 12) dos animais durante o teste.



**Figura 12.** Efeito da injeção intra- SCPdl do 2-AG (5, 50, 500 e 5000 pmol/0,2  $\mu$ L) no teste de conflito de Vogel. As barras representam a média  $\pm$  EPM do número de lambidas punidas ( $p < 0,05$  em relação ao grupo veículo; ANOVA seguida de Bonferroni= 9-13/grupo).

#### 4.4 Efeito do tratamento com o inibidor da MGL o URB602 intraSCPdl no teste de Conflito de Vogel

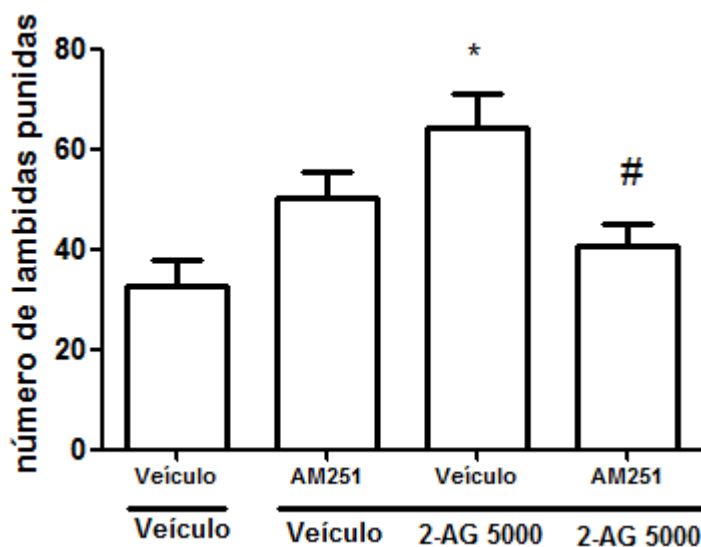
Semelhante ao resultado no modelo do medo condicionado ao contexto, a administração de URB602 também não apresentou efeito ansiolítico, pois não foi capaz de aumentar o número de lambidas punidas no teste de Vogel em nenhuma das doses utilizadas ( $F_{(3,26)}=1,05$   $p=0,29$ , ANOVA)(Fig. 13).



**Figura 13.** A administração de URB 602 (30, 100 e 300 pmol/0,2  $\mu$ L) intra- SCPdl não foi capaz de modificar o número de lambdas punidas de animais submetidos ao Teste de Conflito de Vogel. As barras representam a média  $\pm$  EPM do número de lambdas punidas dos animais ( $p > 0,05$ ; ANOVA,  $n = 7-9$ /grupo)

#### **4.5 Efeito do pré-tratamento com AM251 (antagonista CB1) e AM630 (antagonista CB2) nos efeitos promovidos pelo 2-AG intraSCPdl no teste do Conflito de Vogel**

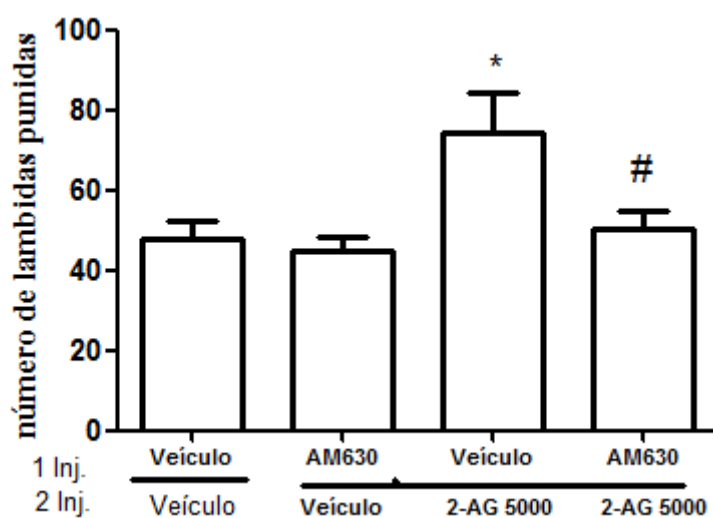
Como observado no experimento anterior, a administração de 2-AG intra-SCPdl foi capaz de aumentar significativamente o número de lambdas punidas nos animais submetidos ao teste de Vogel ( $F_{(3,30)} = 6,00$   $p = 0,002$ , ANOVA seguida do teste de Bonferroni) (Fig. 12). O antagonismo de  $CB_1$ , promovido pelo pré-tratamento com o AM251 (100 pmol) foi capaz de reverter o efeito ansiolítico nesse teste (Bonferroni,  $p < 0,05$ ) (Fig. 14).



**Figura 14.** Efeito do pré-tratamento com AM251 intra-SCPdl sobre o efeito promovido pelo 2-AG na SCPdl no teste de Conflito de Vogel. As barras a média  $\pm$  EPM do número de lambdas punidas (\*  $p < 0,05$  em relação ao grupo veículo+veículo, #  $p < 0,05$  em relação ao grupo veículo + 2-AG; ANOVA seguida de do teste deBonferroni,  $n = 8-10$ /grupo).

A fim de verificar se os efeitos do 2-AG também seriam mediados pelos receptores  $CB_2$ , realizamos o pré-tratamento com o antagonista desses receptores o AM630. Novamente, a administração intra-SCPdl de 2-AG promoveu aumento no número de lambdas punidas nesse modelo ( $F_{(3,31)}=5,01$   $p=0,006$ , ANOVA seguida do teste de Bonferroni)(Fig. 15). O pré-tratamento com AM630 reverteu significativamente esse efeito, sugerindo que os efeitos do 2-AG também são mediados pela ativação de  $CB_2$  ( $p < 0,05$ , teste de Bonferroni).





**Figura 15.** Efeito do pré-tratamento com AM630 intra-SCPdl sobre o efeito promovido pelo 2-AG na SCPdl no teste de Conflito de Vogel. As colunas representam a média  $\pm$  EPM do número de lambidas punidas (\* $p < 0,05$  em relação ao grupo veículo+veículo, #  $p < 0,05$  em relação ao grupo veículo + 2-AG; ANOVA seguida de Bonferroni ( $n=7-10$ /grupo)).

## 5 DISCUSSÃO

No presente estudo, nossos resultados demonstraram que o endocanabinoide 2-AG, em dois modelos animais distintos, foi capaz de promover efeitos ansiolíticos ao atenuar a expressão de respostas aversivas, enquanto que o URB 602, inibidor da monoacil glicerol lipase (MGL), não alterou as respostas comportamentais em nenhum dos modelos utilizados.

Apesar da semelhança do efeito ansiolítico do 2-AG, observamos que a dose efetiva no modelo de Vogel foi dez vezes maior do que a dose necessária para induzir efeito ansiolítico no modelo do Medo Condicionado ao Contexto. No CFC o animal é condicionado e recebe os choques um dia antes de passar pelo teste, ou seja, a administração da droga e o estímulo aversivo não ocorrem no mesmo dia (FANSELOW, 1980). No caso do teste de Vogel, no dia do experimento, o conflito gerado e a administração da droga ocorrem praticamente ao mesmo tempo (VOGEL et al., 1971). Assim, protocolos empregando diferentes níveis aversivos sugerem que os endocanabinoides sejam recrutados de maneira diferente dependendo do contexto (HALLER et al., 2009; HALLER et al., 2004a; NAIDU et al., 2007).

Animais nocaute para receptor CB1 apresentaram comportamento tipo ansioso apenas sob alta luminosidade caracterizando a participação do sistema canabinoide em respostas comportamentais contexto dependente (HALLER et al., 2004a). Haller e colaboradores demonstraram ainda que a AEA apresentou efeitos ansiolíticos robustos apenas sob condições mais aversivas e estressantes, como o aumento da luminosidade durante o teste e não ambientação do animal (HALLER et al., 2009).

A exploração de alvos farmacológicos que aumentam os níveis endógenos dos endocanabinoides, são importantes estratégias para produção de drogas que induzem comportamento tipo ansiolítico. (ALMEIDA-SANTOS et al., 2013; KATHURIA et al., 2003; MOREIRA et al., 2008). Com relação ao URB602, inibidor da MGL, sua não seletividade para inibição da MGL e sua baixa potência em aumentar os níveis sistêmicos do 2-AG, podem ser as causas da inefetividade dessa droga, observados nos nossos resultados. Com tudo, em algumas circunstâncias outras enzimas como a FAAH, ABHD6 e ABHD12, podem ter hidrolisado esse endocanabinoide impossibilitando os efeitos do URB 602 nesse estudo (BLANKMAN et al., 2007; MARRS et al., 2010; SUGIURA et al., 2002).

O JZL 184, outro inibidor da MGL apresentou efeitos ansiolíticos no modelo de ansiedade Marble Burying, apenas sob maior luminosidade do ambiente (SCIOLINO et al., 2011). Essa droga é mais potente e possui maior seletividade para MGL (KINSEY et al., 2009). Dessa forma, seria importante verificarmos se a administração dessa droga intra-SCPdl altera as respostas comportamentais promovidas nos modelos utilizados no presente estudo.

Os efeitos do 2-AG foram mediados pelos receptores CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub>, pois o pré-tratamento com seus respectivos antagonistas atenuaram as respostas ansiolíticas encontradas nos modelos estudados. A participação dos receptores canabinoides também foram observadas em estudos prévios do grupo tanto em modelos etológicos como o LCE (ALMEIDA-SANTOS et al., 2013) quanto em modelos mais aversivos como o Medo condicionado (RESSTEL et al., 2008). Embora o receptor CB<sub>1</sub> tenha sido proposto como principal responsável pela mediação das respostas comportamentais e mais expressivo no SNC em relação a CB<sub>2</sub> (MOREIRA et al., 2007; MOREIRA et al., 2008; PATEL e HILLARD, 2006; SCIOLINO et al., 2011) a participação do receptor canabinoide CB<sub>2</sub> também já está bem estabelecida (ALMEIDA-SANTOS et al., 2013; ONAIVI, 2006; VAN SICKLE et al., 2005). É importante ressaltar, que nas doses utilizadas nesse trabalho nenhum dos antagonistas promoveu efeito per se.

Recentemente, avaliando a ação do endocanabinoide 2-AG na SCPdl, nosso grupo demonstrou que a administração desse endocanabinoide, aumentou o tempo que o animal permanece nos braços abertos do LCE, indicando efeito tipo ansiolítico, bem como a administração do URB 602 também promoveu o mesmo efeito, possivelmente através do aumento dos níveis endógenos do 2-AG (ALMEIDA-SANTOS et al., 2013). Diferentemente, no presente trabalho o URB 602 não foi capaz de promover efeitos ansiolíticos no teste de Vogel e no CFC.

Por se tratar de um sistema complexo e recente em termos de tempo de estudo, o sistema endocanabinoide pode apresentar resultados farmacológicos não esclarecidos. Tanto as diferenças entre os protocolos experimentais e condições ambientais diferenciadas como discutido anteriormente poderiam justificar nossos dados atuais em relação aos efeitos do URB602 no LCE. No Medo Condicionado ao Contexto e no teste de Conflito de Vogel, há um estímulo aversivo mais intenso quando comparado ao modelo do LCE, logo uma proposta seria de que maior demanda e disponibilidade do 2-AG seria necessário para possível efeito ansiolítico (SCIOLINO et al., 2011; SUAREZ

et al., 2010; SUTT et al., 2008). Os parâmetros aversivos utilizados como os choques nas patas no modelo do medo condicionado, e o número de lambidas punidas, no teste do Vogel, mimetizam situações estressantes que podem levar ao recrutamento e aumento da sinalização do 2-AG na SCPdl, como consequência apresentar efeitos ansiolítico, como sugerido por Greeg e colaboradores (GREGG et al., 2012). Complementando esses dados, outras regiões cerebrais envolvidas no comportamento animal como hipocampo, amígdala e córtex pré frontal, também foram registrados aumento na sinalização canabinoide após experiências estressantes (CAMPOS et al., 2010; HILL et al., 2005; LISBOA et al., 2010). Porém o recrutamento de AEA e 2-AG sob condições aversivas podem ser diferentes, uma vez que ocorre o aumento dos níveis de AEA em animais submetidos a choques de alta intensidade, enquanto os níveis do 2-AG permanecem inalterados (MORENA et al., 2014).

Sugere-se ainda a associação entre testes experimentais que envolvem memórias aversivas e a extinção dessas memórias através do aumento da sinalização do sistema canabinoide (HALLER et al., 2004b; LARICCHIUTA et al., 2013; MARSICANO et al., 2002). A busca por métodos e fármacos que atuem na extinção dessas memórias pode ser uma boa estratégia para tratamento de medo e ansiedade. Modelos como o medo condicionado também são estudados nessa perspectiva da extinção da memória (LLORENTE-BERZAL et al., 2015).

Deve-se levar em consideração também, a participação do sistema canabinoide na modulação da dor e analgesia (CALIGNANO et al., 1998). É expressivo a quantidade de dados científicos demonstrando a participação dos canabinoides no controle da dor e ações antinociceptivas em regiões centrais como a SCP (CALIGNANO et al., 1998; HOHMANN e SUPLITA, 2006; HOHMANN et al., 2005; MENG et al., 1998; WALKER et al., 1999). O aumento dos níveis de endocanabinoides sob condições aversivas e estressantes como choques pode mediar efeitos antinociceptivos e ansiolíticos (GREGG et al., 2012; HOHMANN et al., 2005; WALKER et al., 1999).

Embora o uso desses modelos proporcione muitos conhecimentos, os mesmos apresentam certas limitações, pois não retratam a patologia em si, mas uma reação ou resposta momentânea (STEIMER, 2011). Tendo conhecimento das limitações, faz-se necessário o desenvolvimento de novos modelos animais que visem maior proximidade com os sintomas clínicos da patologia. A exemplo, estudos com animais geneticamente modificados, os quais se acredita apresentar de fato um estado permanente ansioso no

animal, são novas ferramentas para estudo do comportamento defensivo animal(SARTORI et al., 2011).

Assim, o principal objetivo desse trabalho foi investigar a ação do endocanabinoide 2-AG em modelos animais condicionados que empregam intensidade aversiva alta, como consequência caracterizar diferentes momentos e condições para a ação desse endocanabinoide.

Os resultados apresentados reforçamos efeitos ansiolíticos do 2-AG como possível fármaco para tratamento de transtornos de ansiedade em humanos.Sendo esse mais um importante passo para prosseguir com os estudos envolvendo sítios neurais específicos como a SCP e a modulação do sistema endocanabinoide nas respostas emocionais.

## **6 CONCLUSÃO**

No intuito de verificar se o aumento da sinalização do 2-AG ou a ação direta desse endocanabinoide, promoveria a inibição do comportamento aversivas no modelo de medo condicionado ao contexto e efeito ansiolítico no teste de Vogel, observamos que apenas o 2-AG injetado diretamente na SCPdl apresentou efeitos ansiolíticos, e queo inibidor da hidrólise do 2-AG administrado intra-SCPdl não foi capaz de inibir a expressão das respostas de medo associado ao contexto ou aumentar o número de lambidas punidas, sugerindo que esse endocanabinoide pode ter um efeito diferencial dependendo do modelo animal e da intensidade do estímulo aversivo empregado.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, D. C.; MOREIRA, F. A. and 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, 2006.

ALMEIDA-SANTOS, A. F.; GOBIRA, P. H.; ROSA, L. C.; GUIMARAES, F. S.; MOREIRA, F. A. and AGUIAR, D. C. Modulation of anxiety-like behavior by the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol (2-AG) in the dorsolateral periaqueductal gray. **Behav Brain Res**, v. 252C, p. 10-17, 2013.

AMERI, A. The effects of cannabinoids on the brain. **Prog Neurobiol**, v. 58, n. 4, p. 315-48, 1999.

BANDLER, R. and CARRIVE, P. Integrated defence reaction elicited by excitatory amino acid microinjection in the midbrain periaqueductal grey region of the unrestrained cat. **Brain Res**, v. 439, n. 1-2, p. 95-106, 1988.

BANDLER, R.; KEAY, K. A.; FLOYD, N. and PRICE, J. Central circuits mediating patterned autonomic activity during active vs. passive emotional coping. **Brain Res Bull**, v. 53, n. 1, p. 95-104, 2000.

BATISTA, L. A.; GOBIRA, P. H.; VIANA, T. G.; AGUIAR, D. C. and MOREIRA, F. A. Inhibition of endocannabinoid neuronal uptake and hydrolysis as strategies for developing anxiolytic drugs. **Behav Pharmacol**, v. 25, n. 5-6, p. 425-33, 2014.

BEHBEHANI, M. M. Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. **Prog Neurobiol**, v. 46, n. 6, p. 575-605, 1995.

BELZUNG, C. and GRIEBEL, G. Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review. **Behav Brain Res**, v. 125, n. 1-2, p. 141-9, 2001.

BLANCHARD, D. C. and BLANCHARD, R. J. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. **Annu Rev Psychol**, v. 39, p. 43-68, 1988.

BLANCHARD, R. J. and BLANCHARD, D. C. Passive and active reactions to fear-eliciting stimuli. **J Comp Physiol Psychol**, v. 68, n. 1, p. 129-35, 1969.

BLANCHARD, R. J. and BLANCHARD, D. C. Antipredator defensive behaviors in a visible burrow system. **J Comp Psychol**, v. 103, n. 1, p. 70-82, 1989.

BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C.; RODGERS, J. and WEISS, S. M. The characterization and modelling of antipredator defensive behavior. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 14, n. 4, p. 463-72, 1990.

BLANCHARD, R. J.; FLANNELLY, K. J. and BLANCHARD, D. C. Defensive behavior of laboratory and wild *Rattus norvegicus*. **J Comp Psychol**, v. 100, n. 2, p. 101-7, 1986.

BLANCHARD, R. J.; YUDKO, E. B.; RODGERS, R. J. and BLANCHARD, D. C. Defense system psychopharmacology: an ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. **Behav Brain Res**, v. 58, n. 1-2, p. 155-65, 1993.

BLANKMAN, J. L.; SIMON, G. M. and CRAVATT, B. F. A comprehensive profile of brain enzymes that hydrolyze the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. **Chem Biol**, v. 14, n. 12, p. 1347-56, 2007.

BORELLI, K. G.; ALBRECHET-SOUZA, L.; FEDOCE, A. G.; FABRI, D. S.; RESSTEL, L. B. and BRANDAO, M. L. Conditioned fear is modulated by CRF mechanisms in the periaqueductal gray columns. **Horm Behav**, v. 63, n. 5, p. 791-9, 2013.

BOURIN, M.; PETIT-DEMOULIERE, B.; DHONNCHADHA, B. N. and HASCOET, M. Animal models of anxiety in mice. **Fundam Clin Pharmacol**, v. 21, n. 6, p. 567-74, 2007.

CALIGNANO, A.; LA RANA, G.; GIUFFRIDA, A. and PIOMELLI, D. Control of pain initiation by endogenous cannabinoids. **Nature**, v. 394, n. 6690, p. 277-81, 1998.

CAMPOS, A. C.; FERREIRA, F. R.; GUIMARAES, F. S. and LEMOS, J. I. Facilitation of endocannabinoid effects in the ventral hippocampus modulates anxiety-like behaviors depending on previous stress experience. **Neuroscience**, v. 167, n. 2, p. 238-46, 2010.

CAMPOS, A. C.; FOGACA, M. V.; AGUIAR, D. C. and GUIMARAES, F. S. Animal models of anxiety disorders and stress. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 35 Suppl 2, p. S101-11, 2013.

CANTERAS, N. S.; CHIAVEGATTO, S.; VALLE, L. E. and SWANSON, L. W. Severe reduction of rat defensive behavior to a predator by discrete hypothalamic chemical lesions. **Brain Res Bull**, v. 44, n. 3, p. 297-305, 1997.

CAROBREZ, A. P. and BERTOGLIO, L. J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 29, n. 8, p. 1193-205, 2005.

CARRIVE, P. The periaqueductal gray and defensive behavior: functional representation and neuronal organization. **Behav Brain Res**, v. 58, n. 1-2, p. 27-47, 1993.

CEZARIO, A. F.; RIBEIRO-BARBOSA, E. R.; BALDO, M. V. and CANTERAS, N. S. Hypothalamic sites responding to predator threats--the role of the dorsal preammillary nucleus in unconditioned and conditioned antipredatory defensive behavior. **Eur J Neurosci**, v. 28, n. 5, p. 1003-15, 2008.



DEPAULIS, A.; BANDLER, R. and VERGNES, M. Characterization of pretentorial periaqueductal gray matter neurons mediating intraspecific defensive behaviors in the rat by microinjections of kainic acid. **Brain Res**, v. 486, n. 1, p. 121-32, 1989.

DEVANE, W. A.; HANUS, L.; BREUER, A.; PERTWEE, R. G.; STEVENSON, L. A.; GRIFFIN, G.; GIBSON, D.; MANDELBAUM, A.; ETINGER, A. and MECHOULAM, R. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. **Science**, v. 258, n. 5090, p. 1946-9, 1992.

DI MARZO, V. Targeting the endocannabinoid system: to enhance or reduce? **Nat Rev Drug Discov**, v. 7, n. 5, p. 438-55, 2008.

DI MARZO, V.; MELCK, D.; BISOGNO, T. and DE PETROCELLIS, L. Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. **Trends Neurosci**, v. 21, n. 12, p. 521-8, 1998.

FANSELOW, M. S. Conditioned and unconditional components of post-shock freezing. **Pavlov J Biol Sci**, v. 15, n. 4, p. 177-82, 1980.

FERNANDEZ DE MOLINA, A. and HUNSPERGER, R. W. Central representation of affective reactions in forebrain and brain stem: electrical stimulation of amygdala, stria terminalis, and adjacent structures. **J Physiol**, v. 145, n. 2, p. 251-65, 1959.

FINN, D. P. Endocannabinoid-mediated modulation of stress responses: physiological and pathophysiological significance. **Immunobiology**, v. 215, n. 8, p. 629-46,

FU, J.; BOTTEGONI, G.; SASSO, O.; BERTORELLI, R.; ROCCHIA, W.; MASETTI, M.; GUIJARRO, A.; LODOLA, A.; ARMIROTTI, A.; GARAU, G.; BANDIERA, T.; REGGIANI, A.; MOR, M.; CAVALLI, A. and PIOMELLI, D. A catalytically silent FAAH-1 variant drives anandamide transport in neurons. **Nat Neurosci**, v. 15, n. 1, p. 64-9, 2011.

GELLER, I.; KULAK, J. T., JR. and SEIFTER, J. The effects of chlordiazepoxide and chlorpromazine on a punishment discrimination. **Psychopharmacologia**, v. 3, p. 374-85, 1962.

GOBIRA, P. H.; AGUIAR, D. C. and 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. 110C, p. 33-39, 2013.

GOBIRA, P. H.; ALMEIDA-SANTOS, A. F.; GUIMARAES, F. S.; MOREIRA, F. A. and AGUIAR, D. C. Role of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol in aversive responses mediated by the dorsolateral periaqueductal grey. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 26, n. 1, p. 15-22, 2016.

GRAEFF, F. G.; BRANDAO, M. L.; AUDI, E. A. and SCHUTZ, M. T. Modulation of the brain aversive system by GABAergic and serotonergic mechanisms. **Behav Brain Res**, v. 22, n. 2, p. 173-80, 1986.

GREGG, L. C.; JUNG, K. M.; SPRADLEY, J. M.; NYILAS, R.; SUPLITA, R. L., 2ND; ZIMMER, A.; WATANABE, M.; MACKIE, K.; KATONA, I.; PIOMELLI, D. and HOHMANN, A. G. Activation of type 5 metabotropic glutamate receptors and diacylglycerol lipase- $\alpha$  initiates 2-arachidonoylglycerol formation and endocannabinoid-mediated analgesia. **J Neurosci**, v. 32, n. 28, p. 9457-68, 2012.

GUIMARAES, F. S.; CAROBREZ, A. P.; DE AGUIAR, J. C. and GRAEFF, F. G. Anxiolytic effect in the elevated plus-maze of the NMDA receptor antagonist AP7 microinjected into the dorsal periaqueductal grey. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 103, n. 1, p. 91-4, 1991.

GUIMARAES, F. S.; CHIARETTI, T. M.; GRAEFF, F. G. and ZUARDI, A. W. Antianxiety effect of cannabidiol in the elevated plus-maze. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 100, n. 4, p. 558-9, 1990.

HALLER, J.; BARNA, I.; BARSVARI, B.; GYIMESI PELCZER, K.; YASAR, S.; PANLILIO, L. V. and GOLDBERG, S. 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, 2009.

HALLER, J.; VARGA, B.; LEDENT, C.; BARNA, I. and FREUND, T. F. Context-dependent effects of CB1 cannabinoid gene disruption on anxiety-like and social behaviour in mice. **Eur J Neurosci**, v. 19, n. 7, p. 1906-12, 2004a.

HALLER, J.; VARGA, B.; LEDENT, C. and FREUND, T. F. CB1 cannabinoid receptors mediate anxiolytic effects: convergent genetic and pharmacological evidence with CB1-specific agents. **Behav Pharmacol**, v. 15, n. 4, p. 299-304, 2004b.

HASHIMOTODANI, Y.; OHNO-SHOSAKU, T.; MAEJIMA, T.; FUKAMI, K. and KANO, M. Pharmacological evidence for the involvement of diacylglycerol lipase in depolarization-induced endocannabinoid release. **Neuropharmacology**, v. 54, n. 1, p. 58-67, 2008.

HERKENHAM, M. Characterization and localization of cannabinoid receptors in brain: an in vitro technique using slide-mounted tissue sections. **NIDA Res Monogr**, v. 112, p. 129-45, 1991.

HILL, M. N. and MCEWEN, B. S. Involvement of the endocannabinoid system in the neurobehavioural effects of stress and glucocorticoids. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 34, n. 5, p. 791-7, 2010.

HILL, M. N.; PATEL, S.; CARRIER, E. J.; RADEMACHER, D. J.; ORMEROD, B. K.; HILLARD, C. J. and GORZALKA, B. B. Downregulation of endocannabinoid signaling in the hippocampus following chronic unpredictable stress. **Neuropsychopharmacology**, v. 30, n. 3, p. 508-15, 2005.

HILTON, S. M. and REDFERN, W. S. A search for brain stem cell groups integrating the defence reaction in the rat. **J Physiol**, v. 378, p. 213-28, 1986.

HOHMANN, A. G. and SUPLITA, R. L., 2ND. Endocannabinoid mechanisms of pain modulation. **Aaps J**, v. 8, n. 4, p. E693-708, 2006.

HOHMANN, A. G.; SUPLITA, R. L.; BOLTON, N. M.; NEELY, M. H.; FEGLEY, D.; MANGIERI, R.; KREY, J. F.; WALKER, J. M.; HOLMES, P. V.; CRYSTAL, J. D.; DURANTI, A.; TONTINI, A.; MOR, M.; TARZIA, G. and PIOMELLI, D. An endocannabinoid mechanism for stress-induced analgesia. **Nature**, v. 435, n. 7045, p. 1108-12, 2005.

HOWLETT, A. C. The cannabinoid receptors. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**, v. 68-69, p. 619-31, 2002.

HOWLETT, A. C.; BARTH, F.; BONNER, T. I.; CABRAL, G.; CASELLAS, P.; DEVANE, W. A.; FELDER, C. C.; HERKENHAM, M.; MACKIE, K.; MARTIN, B. R.; MECHOULAM, R. and PERTWEE, R. G. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. **Pharmacol Rev**, v. 54, n. 2, p. 161-202, 2002.

HOWLETT, A. C. and FLEMING, R. M. Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Pharmacology of the response in neuroblastoma cell membranes. **Mol Pharmacol**, v. 26, n. 3, p. 532-8, 1984.

JARDIM, M. C.; AGUIAR, D. C.; MOREIRA, F. A. and GUIMARAES, F. S. Role of glutamate ionotropic and benzodiazepine receptors in the ventromedial hypothalamic nucleus on anxiety. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 82, n. 1, p. 182-9, 2005.

JUNG, K. M.; ASTARITA, G.; ZHU, C.; WALLACE, M.; MACKIE, K. and PIOMELLI, D. A key role for diacylglycerol lipase-alpha in metabotropic glutamate receptor-dependent endocannabinoid mobilization. **Mol Pharmacol**, v. 72, n. 3, p. 612-21, 2007.

KANO, M.; OHNO-SHOSAKU, T.; HASHIMOTODANI, Y.; UCHIGASHIMA, M. and WATANABE, M. Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. **Physiol Rev**, v. 89, n. 1, p. 309-80, 2009.

KATHURIA, S.; GAETANI, S.; FEGLEY, D.; VALINO, F.; DURANTI, A.; TONTINI, A.; MOR, M.; TARZIA, G.; LA RANA, G.; CALIGNANO, A.; GIUSTINO, A.; TATTOLI, M.; PALMERY, M.; CUOMO, V. and PIOMELLI, D. Modulation of anxiety through blockade of anandamide hydrolysis. **Nat Med**, v. 9, n. 1, p. 76-81, 2003.

KINSEY, S. G.; LONG, J. Z.; O'NEAL, S. T.; ABDULLAH, R. A.; POKLIS, J. L.; BOGER, D. L.; CRAVATT, B. F. and LICHTMAN, A. H. Blockade of endocannabinoid-degrading enzymes attenuates neuropathic pain. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 330, n. 3, p. 902-10, 2009.

KOVACS, K. J. c-Fos as a transcription factor: a stressful (re)view from a functional map. **Neurochem Int**, v. 33, n. 4, p. 287-97, 1998.

KRIEGER, J. E. and GRAEFF, F. G. Defensive behavior and hypertension induced by glutamate in the midbrain central gray of the rat. **Braz J Med Biol Res**, v. 18, n. 1, p. 61-7, 1985.

LARICCHIUTA, D.; CENTONZE, D. and PETROSINI, L. Effects of endocannabinoid and endovanilloid systems on aversive memory extinction. **Behav Brain Res**, v. 256, p. 101-7, 2013.

LISBOA, S. F.; REIS, D. G.; DA SILVA, A. L.; CORREA, F. M.; GUIMARAES, F. S. and RESSTEL, L. B. Cannabinoid CB1 receptors in the medial prefrontal cortex modulate the expression of contextual fear conditioning. **Int J Neuropsychopharmacol**, v. 13, n. 9, p. 1163-73, 2010.

LISTER, R. G. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. **Pharmacol Ther**, v. 46, n. 3, p. 321-40, 1990.

LIU, J.; WANG, L.; HARVEY-WHITE, J.; OSEI-HYIAMAN, D.; RAZDAN, R.; GONG, Q.; CHAN, A. C.; ZHOU, Z.; HUANG, B. X.; KIM, H. Y. and KUNOS, G. A biosynthetic pathway for anandamide. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 36, p. 13345-50, 2006.

LLORENTE-BERZAL, A.; TERZIAN, A. L.; DI MARZO, V.; MICALE, V.; VIVEROS, M. P. and WOTJAK, C. T. 2-AG promotes the expression of conditioned fear via cannabinoid receptor type 1 on GABAergic neurons. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 232, n. 15, p. 2811-25, 2015.

MACKIE, K. Cannabinoid receptors as therapeutic targets. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 46, p. 101-22, 2006.

MARRS, W. R.; BLANKMAN, J. L.; HORNE, E. A.; THOMAZEAU, A.; LIN, Y. H.; COY, J.; BODOR, A. L.; MUCCIOLI, G. G.; HU, S. S.; WOODRUFF, G.; FUNG, S.; LAFOURCADE, M.; ALEXANDER, J. P.; LONG, J. Z.; LI, W.; XU, C.; MOLLER, T.; MACKIE, K.; MANZONI, O. J.; CRAVATT, B. F. and STELLA, N. The serine hydrolase ABHD6 controls the accumulation and efficacy of 2-AG at cannabinoid receptors. **Nat Neurosci**, v. 13, n. 8, p. 951-7, 2010.

MARSICANO, G.; WOTJAK, C. T.; AZAD, S. C.; BISOGNO, T.; RAMMES, G.; CASCIO, M. G.; HERMANN, H.; TANG, J.; HOFMANN, C.; ZIEGLGANSBERGER, W.; DI MARZO, V. and LUTZ, B. The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. **Nature**, v. 418, n. 6897, p. 530-4, 2002.

MARTINEZ, R. C.; CARVALHO-NETTO, E. F.; AMARAL, V. C.; NUNES-DE-SOUZA, R. L. and CANTERAS, N. S. Investigation of the hypothalamic defensive system in the mouse. **Behav Brain Res**, v. 192, n. 2, p. 185-90, 2008.

MATSUDA, L. A.; BONNER, T. I. and LOLAIT, S. J. Localization of cannabinoid receptor mRNA in rat brain. **J Comp Neurol**, v. 327, n. 4, p. 535-50, 1993.

MCGREGOR, I. S.; ARNOLD, J. C.; WEBER, M. F.; TOPPLE, A. N. and HUNT, G. E. A comparison of delta 9-THC and anandamide induced c-fos expression in the rat forebrain. **Brain Res**, v. 802, n. 1-2, p. 19-26, 1998.

MCKINNEY, W. T. Animal models of depression: an overview. **Psychiatr Dev**, v. 2, n. 2, p. 77-96, 1984.

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

MECHOULAM, R.; FRIDE, E. and DI MARZO, V. Endocannabinoids. **Eur J Pharmacol**, v. 359, n. 1, p. 1-18, 1998.

MENG, I. D.; MANNING, B. H.; MARTIN, W. J. and FIELDS, H. L. An analgesia circuit activated by cannabinoids. **Nature**, v. 395, n. 6700, p. 381-3, 1998.

MOBBS, D.; PETROVIC, P.; MARCHANT, J. L.; HASSABIS, D.; WEISKOPF, N.; SEYMOUR, B.; DOLAN, R. J. and FRITH, C. D. When fear is near: threat imminence elicits prefrontal-periaqueductal gray shifts in humans. **Science**, v. 317, n. 5841, p. 1079-83, 2007.

MOREIRA, F. A.; AGUIAR, D. C. and GUIMARAES, F. S. Anxiolytic-like effect of cannabidiol in the rat Vogel conflict test. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 30, n. 8, p. 1466-71, 2006.

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

MOREIRA, F. A.; AGUIAR, D. C.; TERZIAN, A. L.; GUIMARAES, F. S. and WOTJAK, C. T. Cannabinoid type 1 receptors and transient receptor potential vanilloid type 1 channels in fear and anxiety-two sides of one coin? **Neuroscience**, v. 204, p. 186-92, 2012.

MOREIRA, F. A.; KAISER, N.; MONORY, K. and LUTZ, B. Reduced anxiety-like behaviour induced by genetic and pharmacological inhibition of the endocannabinoid-degrading enzyme fatty acid amide hydrolase (FAAH) is mediated by CB1 receptors. **Neuropharmacology**, v. 54, n. 1, p. 141-50, 2008.

MOREIRA, F. A. and WOTJAK, C. T. Cannabinoids and anxiety. **Curr Top Behav Neurosci**, v. 2, p. 429-50, 2010.

MORENA, M.; ROOZENDAAL, B.; TREZZA, V.; RATANO, P.; PELOSO, A.; HAUER, D.; ATSAK, P.; TRABACE, L.; CUOMO, V.; MCGAUGH, J. L.; SCHELLING, G. and CAMPOLONGO, P. Endogenous cannabinoid release within

prefrontal-limbic pathways affects memory consolidation of emotional training. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 111, n. 51, p. 18333-8, 2014.

NAIDU, P. S.; VARVEL, S. A.; AHN, K.; CRAVATT, B. F.; MARTIN, B. R. and LICHTMAN, A. H. Evaluation of fatty acid amide hydrolase inhibition in murine models of emotionality. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 192, n. 1, p. 61-70, 2007.

ONAIVI, E. S. Neuropsychobiological evidence for the functional presence and expression of cannabinoid CB2 receptors in the brain. **Neuropsychobiology**, v. 54, n. 4, p. 231-46, 2006.

PATEL, S. and HILLARD, C. J. Pharmacological evaluation of cannabinoid receptor ligands in a mouse model of anxiety: further evidence for an anxiolytic role for endogenous cannabinoid signaling. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 318, n. 1, p. 304-11, 2006.

PAVLOV, P. I. Conditioned reflexes: An investigation of the physiological activity of the cerebral cortex. **Ann Neurosci**, v. 17, n. 3, p. 136-41, 2010.

PAXINOS, G. and WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. 3. New York: Academic Press, 1997.

PAXINOS, G. and WATSON, C. **The rat Brain in stereotaxic coordinates**. 6. London: Academic Press/ Elsevier, 2007.

PELLOW, S. and FILE, S. E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 24, n. 3, p. 525-9, 1986.

PERTWEE, R. G. The diverse CB1 and CB2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids: delta9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and delta9-tetrahydrocannabivarin. **Br J Pharmacol**, v. 153, n. 2, p. 199-215, 2008.

PIOMELLI, D. The molecular logic of endocannabinoid signalling. **Nat Rev Neurosci**, v. 4, n. 11, p. 873-84, 2003.

RAMIREZ, S. H.; HASKO, J.; SKUBA, A.; FAN, S.; DYKSTRA, H.; MCCORMICK, R.; REICHENBACH, N.; KRIZBAL, I.; MAHADEVAN, A.; ZHANG, M.; TUMA, R.; SON, Y. J. and PERSIDSKY, Y. Activation of cannabinoid receptor 2 attenuates leukocyte-endothelial cell interactions and blood-brain barrier dysfunction under inflammatory conditions. **J Neurosci**, v. 32, n. 12, p. 4004-16, 2012.

RESSTEL, L. B.; LISBOA, S. F.; AGUIAR, D. C.; CORREA, F. M. and GUIMARAES, F. S. Activation of CB1 cannabinoid receptors in the dorsolateral periaqueductal gray reduces the expression of contextual fear conditioning in rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 198, n. 3, p. 405-11, 2008.

SANGER, D. J.; PERRAULT, G.; MOREL, E.; JOLY, D. and ZIVKOVIC, B. Animal models of anxiety and the development of novel anxiolytic drugs. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 15, n. 2, p. 205-12, 1991.

SARTORI, S. B.; LANDGRAF, R. and SINGEWALD, N. The clinical implications of mouse models of enhanced anxiety. **Future Neurol**, v. 6, n. 4, p. 531-571, 2011.

SCHENBERG, L. C. and GRAEFF, F. G. Role of the periaqueductal gray substance in the antianxiety action of benzodiazepines. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 9, n. 3, p. 287-95, 1978.

SCHUTZ, M. T.; DE AGUIAR, J. C. and GRAEFF, F. G. Anti-aversive role of serotonin in the dorsal periaqueductal grey matter. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 85, n. 3, p. 340-5, 1985.

SCIOLINO, N. R.; ZHOU, W. and HOHMANN, A. G. Enhancement of endocannabinoid signaling with JZL184, an inhibitor of the 2-arachidonoylglycerol hydrolyzing enzyme monoacylglycerol lipase, produces anxiolytic effects under conditions of high environmental aversiveness in rats. **Pharmacol Res**, v. 64, n. 3, p. 226-34, 2011.

SILVEIRA, M. C.; SANDNER, G. and GRAEFF, F. G. Induction of Fos immunoreactivity in the brain by exposure to the elevated plus-maze. **Behav Brain Res**, v. 56, n. 1, p. 115-8, 1993.

SINGEWALD, N. and SHARP, T. Neuroanatomical targets of anxiogenic drugs in the hindbrain as revealed by Fos immunocytochemistry. **Neuroscience**, v. 98, n. 4, p. 759-70, 2000.

STEIMER, T. Animal models of anxiety disorders in rats and mice: some conceptual issues. **Dialogues Clin Neurosci**, v. 13, n. 4, p. 495-506, 2011.

SUAREZ, J.; RIVERA, P.; LLORENTE, R.; ROMERO-ZERBO, S. Y.; BERMUDEZ-SILVA, F. J.; DE FONSECA, F. R. and VIVEROS, M. P. Early maternal deprivation induces changes on the expression of 2-AG biosynthesis and degradation enzymes in neonatal rat hippocampus. **Brain Res**, v. 1349, p. 162-73, 2010.

SUGIURA, T.; KOBAYASHI, Y.; OKA, S. and WAKU, K. Biosynthesis and degradation of anandamide and 2-arachidonoylglycerol and their possible physiological significance. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 66, n. 2-3, p. 173-92, 2002.

SUGIURA, T.; KONDO, S.; SUKAGAWA, A.; NAKANE, S.; SHINODA, A.; ITOH, K.; YAMASHITA, A. and WAKU, K. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 215, n. 1, p. 89-97, 1995.

SUTT, S.; RAUD, S.; AREDA, T.; REIMETS, A.; KOKS, S. and VASAR, E. Cat odour-induced anxiety--a study of the involvement of the endocannabinoid system. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 198, n. 4, p. 509-20, 2008.

TREIT, D. Animal models for the study of anti-anxiety agents: a review. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 9, n. 2, p. 203-22, 1985.

TSOU, K.; BROWN, S.; SANUDO-PENA, M. C.; MACKIE, K. and WALKER, J. M. Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. **Neuroscience**, v. 83, n. 2, p. 393-411, 1998.

UYS, J. D.; STEIN, D. J.; DANIELS, W. M. and HARVEY, B. H. Animal models of anxiety disorders. **Curr Psychiatry Rep**, v. 5, n. 4, p. 274-81, 2003.

VAN SICKLE, M. D.; DUNCAN, M.; KINGSLEY, P. J.; MOUIHATE, A.; URBANI, P.; MACKIE, K.; STELLA, N.; MAKRIYANNIS, A.; PIOMELLI, D.; DAVISON, J. S.; MARNETT, L. J.; DI MARZO, V.; PITTMAN, Q. J.; PATEL, K. D. and SHARKEY, K. A. Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. **Science**, v. 310, n. 5746, p. 329-32, 2005.

VIANNA, D. M.; BORELLI, K. G.; FERREIRA-NETTO, C.; MACEDO, C. E. and BRANDAO, M. L. Fos-like immunoreactive neurons following electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray at freezing and escape thresholds. **Brain Res Bull**, v. 62, n. 3, p. 179-89, 2003.

VOGEL, J. R.; BEER, B. and CLODY, D. E. A simple and reliable conflict procedure for testing anti-anxiety agents. **Psychopharmacologia**, v. 21, n. 1, p. 1-7, 1971.

WALKER, J. M.; HUANG, S. M.; STRANGMAN, N. M.; TSOU, K. and SANUDO-PENA, M. C. Pain modulation by release of the endogenous cannabinoid anandamide. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 21, p. 12198-203, 1999.

WALTER, L.; FRANKLIN, A.; WITTING, A.; WADE, C.; XIE, Y.; KUNOS, G.; MACKIE, K. and STELLA, N. Nonpsychotropic cannabinoid receptors regulate microglial cell migration. **J Neurosci**, v. 23, n. 4, p. 1398-405, 2003.

WILSON, R. I. and NICOLL, R. A. Endocannabinoid signaling in the brain. **Science**, v. 296, n. 5568, p. 678-82, 2002.