

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS – FISILOGIA E FARMACOLOGIA**

**PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA
ENDOCANABINOIDE DA SUBSTÂNCIA
CINZENTA PERIAQUEDUTAL DORSOLATERAL
EM UM MODELO ANIMAL DE PÂNICO**

THÉRCIA GUEDES VIANA

BELO HORIZONTE - 2012

THÉRCIA GUEDES VIANA

**PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA
ENDOCANABINOIDE DA SUBSTÂNCIA
CINZENTA PERIAQUEDUTAL DORSOLATERAL
EM UM MODELO ANIMAL DE PÂNICO**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas – Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Fabrício de Araújo Moreira

BELO HORIZONTE – 2012

Dedicatória:

A Camilo Neiva Lages

Agradecimentos:

A **Deus**, autor da vida e fonte de todo conhecimento

Ao professor **Dr. Fabrício de Araújo Moreira**, pelos ensinamentos e pela orientação baseada no respeito, na ética e no estímulo constante ao raciocínio científico.

A professora **Dra. Daniele C. Aguiar**, pelas valorosas contribuições, empenhando-se ao máximo na realização deste trabalho.

Ao professor **Dr. Marco Antonio Peliky Fontes**, por abrir as portas do seu laboratório para que fossem conduzidos os experimentos iniciais deste trabalho.

A **banca examinadora** por investir tempo e conhecimento na avaliação desta dissertação.

Aos primeiros mestres: professor **Dr. Edson Perini** e professora **Dra. Maria das Graças Carvalho**, por me transmitirem o amor à ciência.

Aos amigos do Laboratório de Neuropsicofarmacologia: **Ana Flávia Almeida**, pela amizade que me impulsiona a ser uma pessoa melhor a cada dia; **Pedro Gobira** e **Luciano Vilela**, pelo riso fácil, pela alegria contagiante que torna o caminho mais leve; a **Carla Santos**, pelo exemplo de competência e determinação; a **Luara Braga** pelas conversas e gargalhadas.

Aos amigos da pós-graduação: **Alline Campos**, **Isabel Vieira**, **Lucas Kangussu**, **Mariana Diniz** e **Paulo Lima**.

Aos funcionários técnico-administrativos: **Cíntia**, **Nilda**, **Jorge**, **Rinaldo**, **Webster** e **Welington**

A **Antonio**, **Leticia**, **Mariana** e **Thássia** por vibrarem com minhas conquistas

A **papai**, amigo e provedor, por apostar em meus sonhos. A **mamãe** pela fé inabalável e por se alegrar a cada pequena vitória. As minhas **irmãs** pelo amor e apoio incondicionais. A **Alice**, por alegrar nossas vidas com sua chegada.

A **CAPES** pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

| | |
|---------------------------------|----|
| Lista de Figuras..... | 06 |
| Lista de Abreviaturas..... | 08 |
| Resumo..... | 09 |
| Abstract..... | 10 |
| Introdução..... | 11 |
| Objetivos..... | 27 |
| Materiais e Métodos..... | 29 |
| Resultados..... | 42 |
| Discussão..... | 58 |
| Referências Bibliográficas..... | 65 |

Lista de Figuras:

Figura 1: Representação esquemática da sinapse Canabinoide

Figura 2: Caixa de Observação

Figura 3: Fotomicrografia representativa do sítio de injeção na SCPdl

Figura 4: Diagrama do plano representativo das estruturas quantificadas

Figura 5: Representação esquemática do protocolo experimental 1

Figura 6: Representação esquemática do protocolo experimental 2

Figura 7: Representação esquemática do protocolo experimental 3

Figura 8: Representação esquemática do protocolo experimental 4

Figura 9: Efeito da administração do ACEA sobre o número de cruzamentos e pulos

Figura 10: Efeito da administração do URB 597 sobre o número de cruzamentos e pulos

Figura 11: Efeito da administração do AM 251, seguida de URB 597, sobre o número de cruzamentos e pulos

Figura 12: Efeito do URB 597(3 nmol/0,2 µL) sobre o número de células-Fos positivas na região da SCPdl.

Figura 13: Efeito do URB 597(3 nmol/0,2 µL) sobre o número de células-Fos positivas na região da SCPdm.

Figura 14: Efeito do URB 597(3 nmol/0,2 µL) sobre o número de células-Fos positivas na região da SCPvl.

Figura 15: Fotomicrografias representativas de secções coronais (40µm) da SCPdl, nas quais foram feitas quantificações da proteína Fos.

Figura 16: Efeito da administração do URB 597(3 nmol) sobre o número de cruzamentos e pulos

Figura 17:Co-relação entre expressão de Fos e número de cruzamentos e pulos.

Lista de Abreviaturas

AEA: Araquidonoil etanolamida (Anandamida)

AMPA: Ácido α -amino- 3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico

AP-7: Ácido 2-amino-7-fosfo-heptanóico

CB₁: Receptores canabinóides do tipo 1

CB₂: Receptores canabinóides do tipo 2

DLH: Ácido D, L-homocisteico

FAAH: Hidrolase de amidas de ácidos graxos

GABA: Ácido gama-aminobutírico

iGLU: Receptores ionotrópicos do glutamato

LCE: Labirinto em Cruz Elevado

LTE: Labirinto em T Elevado

mGLU: Receptores metabotrópicos do glutamato

NMDA: N-metil-D-aspartato

SCP: Substância cinzenta periaquedutal

SCPdl: Substância cinzenta periaquedutal dorsolateral

SCPdm: Substância cinzenta periaquedutal dorsomedial

SCPd: Substância cinzenta periaquedutal dorsal

SCPl: Substância cinzenta periaquedutal lateral

SCPvl: Substância cinzenta periaquedutal ventrolateral

TRPV: Receptor vanilóide de potencial transitório

Resumo

O glutamato é um neurotransmissor que facilita comportamentos defensivos relacionados à ansiedade e ao pânico, ativando receptores do subtipo N-metil-d-aspartato (NMDA, responsivos ao agonista de mesmo nome). Ao contrário, a anandamida, um endocanabinoide, é um neurotransmissor que inibe tais reações. Diversas estruturas encefálicas estão envolvidas na elaboração dessas respostas, destacando-se a Substância Cinzenta Periaquedutal (SCP). Considerando evidências de que endocanabinoides inibem a neurotransmissão glutamatérgica, o presente trabalho testou a hipótese de que a ativação de receptores canabinoides CB1 poderia inibir o efeito panicogênico induzido pela injeção de agonista NMDA na SCP dorsolateral (SCPdl), em ratos. Para tal, os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação de cânula nessa estrutura e, após 7 dias, foram submetidos a uma caixa de observação. A injeção intra-SCPdl de NMDA produziu reações de fuga caracterizadas pelo aumento no número de cruzamentos e de pulos. Tal efeito foi prevenido pela injeção local de um agonista CB1, o ACEA, ou de um inibidor da hidrólise de anandamida, o URB-597. O URB-597 também preveniu o aumento na expressão de proteína Fos, um marcador de atividade neuronal, induzido pelo NMDA. Todos os efeitos deste inibidor da hidrólise de anandamida foram bloqueados por um antagonista CB1, o AM251. Dessa forma, conclui-se que os receptores canabinoides CB1 modulam as respostas defensivas induzidas pela ativação de receptores NMDA na SCPdl.

Abstract

Glutamate is a neurotransmitter that facilitates defensive responses related to anxiety and panic, through the activation of N-methyl-d-aspartate receptors (NMDA, named after the selective agonist). On the contrary, the endocannabinoid anandamide is a neurotransmitter that inhibits such reactions. Several brain regions are involved in these responses, including the periaqueductal gray (PAG). Considering the evidence that endocannabinoids inhibit the glutamatergic neurotransmission, the present work tested the hypothesis that the activation of cannabinoid CB1 receptors could inhibit the panicogenic effects of NMDA injected into the dorsolateral PAG (dIPAG) in rats. The animals underwent stereotactic surgery for implantation of the cannula in dIPAG and after 7 days their behaviour was analyzed in an observation box. NMDA injection into the dIPAG produced escape reactions characterized by an increase in the number of crossings and jumps. This effect was prevented by local injection of a CB1 agonist, ACEA, or an anandamide-hydrolysis inhibitor, URB-597. In addition, URB-597 also prevented the increase in Fos protein expression, a marker of neural activation, induced by NMDA. All the effects of this anandamide-hydrolysis inhibitor were blocked by a CB1 receptor antagonist, AM251. It is concluded that cannabinoid CB1 receptors modulate defensive responses induced by NMDA receptor activation in the dIPAG.

INTRODUÇÃO

ANSIEDADE:

A ansiedade é caracterizada por um estado de tensão semelhante ao medo, mas em resposta a um perigo abstrato, não real. Essa sensação desagradável vem acompanhada de sintomas autonômicos como: sudorese, taquicardia, tremores, dificuldade de concentração, perturbações do sono e náuseas. Até certo ponto, a ansiedade é benéfica e pode favorecer o desempenho do indivíduo. Além desse ponto designado como ótimo, a ansiedade passa a ser patológica e contraproducente (GRAEFF, 1999).

Segundo a Classificação do Manual de Diagnóstico e Estatística dos Distúrbios Mentais (*Diagnostic Statistical Manual of Mental Disorders - DSM*) da Associação Psiquiátrica Norte Americana, os transtornos de ansiedade podem ser agrupados em categorias:

Fobia (específica ou social)

Transtorno de Pânico (com ou sem agorafobia)

Transtorno de ansiedade generalizada

Transtorno de estresse pós-traumático

Transtorno de Estresse agudo

Transtorno de estresse devido a uma condição médica geral

Transtorno de ansiedade produzido por substâncias químicas

Outros Transtornos de Ansiedade (Atípicos ou não-especificados)

TRANSTORNO DO PÂNICO:

Em humanos, o Transtorno de Pânico (TP) caracteriza-se pela presença de ataques de Pânico recorrentes e inesperados (espontâneo, não evocado), seguidos por pelo menos 1 mês de preocupação persistente acerca de se ter um outro ataque (DSM IV, 1994).

O TP inicia-se com um intenso medo ou desconforto, seguido de palpitação, aumento de frequência cardíaca, tremor, sensação de falta de ar, dor no peito, tonturas, desmaio, além da sensação de estar perdendo o controle, ficando louco ou de morte iminente (DEL-BEN & GRAEFF, 2009).

O TP está frequentemente associado à agorafobia, condição caracterizada pela esquiva de locais ou situações nas quais poderia ser difícil escapar ou obter ajuda, caso o indivíduo apresente um ataque de pânico. Estudos epidemiológicos indicam que a prevalência mundial de TP durante toda a vida (com ou sem Agorafobia) situa-se entre 1,5 e 3,5%. As taxas de prevalência anual estão entre 1 e 2% e cerca de um terço até metade dos indivíduos diagnosticados com TP também têm Agorafobia (DSM IV, 1994).

Esforços vêm sendo empregados na tentativa de se conhecer as bases neurobiológicas envolvidas nos transtornos de ansiedade, incluindo o TP. Por questões práticas, econômicas e, principalmente, éticas, estes estudos empregam a experimentação animal, mais especificamente o uso de modelos animais de ansiedade (GRAEFF, 2007). A possibilidade de se modelar transtornos de ansiedade em animais tem como base a proposta de que eles apresentariam os mesmo substratos neurais responsáveis pelas reações de

defesa dos humanos (PANKSEPP, 1990; BLANCHARD & BLANCHARD, 1990; GRAEFF, 1999)

O COMPORTAMENTO DEFENSIVO:

A relação entre emoções humanas e respostas comportamentais animais foi proposta pela primeira vez por Charles Darwin. Em seu livro intitulado *The Expression of Emotions in Man and Animals* (1872), Darwin propôs que o homem compartilharia com seus ancestrais as emoções básicas frente a situações de perigo.

As ameaças que constituem perigo para os animais podem incluir predadores, altura, ambiente iluminado, estímulos nociceptivos, novos objetos, mudança de ambiente e confronto com animais da mesma espécie (BLANCHARD & BLANCHARD, 1988).

Por meio de observações das estratégias defensivas frente a ameaças predatórias em ratos selvagens, Robert e Caroline Blanchard classificaram essas respostas de acordo com a distância que os animais se encontram da ameaça: ameaça potencial (também chamada de incerta); ameaça distal e ameaça proximal (BLANCHARD & BLANCHARD 1988; 1990; BLANCHARD et al.1997, 2001)

A ameaça potencial se dá quando a presença do predador é incerta, ou quando o animal depara-se com estímulos relacionados ao predador (odor, por exemplo, APFELBACH, 2005). Nessas condições, os animais adotam uma postura de avaliação de risco, como a exploração cautelosa do ambiente para investigar a presença de uma provável ameaça (BLANCHARD et. al 1997;

2003). Os substratos neurais envolvidos nesse tipo de resposta seriam o sistema septo-hipocampal e a amígdala (BLANCHARD et al., 2003; GRAY & McNAUGHTON, 2000; GRAEFF, 1994).

As respostas a ameaças em potencial envolvem um conflito entre duas situações distintas. A primeira envolve a exploração do ambiente e significa aproximar-se do perigo, enquanto na segunda o animal adota uma postura de esquiva, evitando o perigo. Esse comportamento tem sido relacionado com o transtorno de ansiedade generalizada, uma vez que envolve conflito para o animal (GRAY & MCNAUGHTON, 2000; GRAEFF, 2002; GRAEFF & ZANGROSSI, 2002; BLANCHARD et al., 2003).

A ameaça distal ocorre quando o perigo existe, mas encontra-se a certa distância. Nesse caso, a fuga é a resposta predominante (BLANCHARD & BLANCHARD, 1988). Quando isso não é possível, o animal adota o comportamento de *freezing* ou imobilidade, seguido de vocalização (BLANCHARD & BLANCHARD, 1980).

Davis e colaboradores propuseram que projeções que partem da amígdala rumo à porção ventrolateral da Substância Cinzenta Periaquedutal (SCP) estariam envolvidas no comportamento de *freezing* dos animais frente a estímulos aversivos (DAVIS, 1992a; 1992b, 1998). Segundo GRAEFF (1994), os comportamentos dos animais diante de ameaças proximais poderiam ser correlacionados com medo em humanos.

Em último caso, quando a ameaça é proximal, as respostas observadas são de *freezing*, fuga, vocalizações, saltos, luta e mordidas (caso haja um confronto presa-predador) (BLANCHARD & BLANCHARD, 1988, 1990; BLANCHARD et. al, 1986).

Com a demonstração de que a estimulação elétrica da SCP induzia reações de luta ou fuga, essa região passou a ser considerada o principal substrato neural envolvido na ameaça distal (HUNSPERGER, 1956 apud FERNANDEZ DE MOLINA & HUNSPERGER, 1959; SKULTETY, 1963).

Experimentos feitos com pacientes acordados submetidos à estimulação da SCP relatam sentimentos de terror, morte iminente, desejo de fugir, taquicardia e hiperventilação (YOUNG, 1989). A similaridade entre o que ocorria quando pacientes submetidos à neurocirurgia tinham a SCP estimulada e os sintomas de Transtorno de Pânico (TP), sugeriu a participação dessa estrutura na neurobiologia de ataques de pânico (GENTIL, 1988; GRAEFF, 1994; 2002; 2004).

SUBSTÂNCIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL E AS RESPOSTAS DE FUGA

A SCP localiza-se no mesencéfalo, entre o terceiro e quarto ventrículo, circundando o aqueduto cerebral. Pode ser subdividida em quatro regiões que formam uma coluna ao longo do eixo rostro-caudal: dorsomedial, dorsolateral, lateral e ventrolateral. (CARRIVE, 1993; BANDLER et al., 2000).

A porção dorsal da SCP - que compreende as colunas dorsomedial e dorsolateral - está particularmente envolvida na elaboração do comportamento defensivos de escape ou fuga (GRAEFF, 1990; 2004; ZANGROSSI et al, 2001). Como mencionado anteriormente, a estimulação elétrica desta estrutura induz comportamentos do tipo luta e/ou fuga similares àqueles evocados por situações naturais de perigo e ameaça (HESS & BRUGGER, 1943 apud FERNANDEZ DE MOLINA & HUNSPERGER, 1959).

NASHOLD e colaboradores demonstraram em 1969 que a estimulação elétrica de áreas mesencefálicas (incluindo a SCP) em humanos desencadeava sentimentos de medo, pavor e morte iminente. Essas manifestações se assemelhavam àquelas ocorridas em um ataque de pânico. Ainda reforçando a hipótese do envolvimento da SCP em reações de defesa, estudos demonstraram que lesões nessa estrutura eliminavam respostas defensivas a estímulos ameaçadores em animais experimentais (EDWARDS & ADAMS 1974; BLANCHARD et al 1981)

Em 1982, GOODCHILD e colaboradores estimularam a SCP de gatos por meio da injeção de aminoácidos excitatórios, observando a ocorrência de reações defensivas. Estudos posteriores empregando a mesma técnica confirmaram esse achado também em ratos. (KRIEGER & GRAEFF, 1985; HILTON & REDFERN, 1986). A estimulação da porção dorsal da SCP por aminoácidos excitatórios promove reações de fuga, congelamento e alterações autonômicas como: elevação da pressão arterial e da frequência cardíaca, sudorese, piloereção, vasodilatação da musculatura esquelética e dilatação pupilar (BANDLER & CARRIVE, 1988, KRIEGER & GRAEFF, 1985; SCHENBERG et al., 2001; CARRIVE, 1993).

Considerando as semelhanças entre os comportamentos de humanos e de animais frente a estímulos ameaçadores, bem como entre os comportamentos evocados pela estimulação da SCP e por perigos e ameaças naturais, a estimulação desta estrutura tem sido utilizada como um modelo animal de ataques de pânico (GRAEFF, 1994).

Nesse contexto, estudos que empregam a técnica de imunistoquímica para Fos, uma proteína transcrita a partir do gene de expressão imediata *c-fos*,

vêm sendo amplamente utilizados como ferramenta para marcação de ativação neuronal (MORGAN & CURRAN, 1989). Sob condições basais, o número de células c-fos detectáveis é muito baixo (HUGHES et al., 1992), mas após estímulo o nível máximo de expressão de FOS ocorre entre 1 e 3 horas e desaparece gradualmente após 4-6 horas (KOVÁCS & SAWCHENKO,1996)

Estudos demonstram que há aumento na expressão de Fos após comportamento de fuga desencadeado pela estimulação elétrica ou química de regiões envolvidas em comportamentos defensivos (SANDER et al., 1998). Além disso, há aumento de expressão de Fos também quando ratos são expostos ao seu predador natural (CANTERAS et al., 1997).

Com relação à SCP, diversos estudos demonstram que a evocação de comportamentos defensivos promove ativação de Fos principalmente na coluna dorsolateral, sustentando a importância dessa região mesencefálica para a elaboração de tais respostas (Kovács, 1998; Silveira et al., 1994; Singewald & Sharp,2000; Vianna et al., 2003)

Diversos neurotransmissores podem modular tais respostas, dentre eles o glutamato (CAROBREZ et al., 2001; GUIMARÃES et al., 1991) e o sistema endocanabinoide (MOREIRA et al.,2012)

NEUROTRANSMISSORES ENVOLVIDOS NAS RESPOSTAS DEFENSIVAS

SISTEMA GLUTAMATÉRGICO:

O Glutamato é um dos mais importantes neurotransmissores excitatórios do Sistema Nervoso Central (WATKINS & COLLINGRIDGE, 1994; JAVITT,

2004). É sintetizado a partir da Glicose proveniente do Ciclo de Krebs, ou da Glutamina (sintetizada pelas células da Glia e captada por neurônios).

A síntese do Glutamato ocorre em neurônios pré-sinápticos, onde a enzima Glutaminase converte Glutamina em Glutamato. Esse último é armazenado em vesículas por meio do transportador do Glutamato e sua liberação se dá por exocitose dependente do cálcio. O término das ações do Glutamato ocorre quando ele é recaptado pelo próprio neurônio ou por astrócitos. (AMARA & FONTANA, 2002; SHIGERI et al, 2004).

Existem duas classes de receptores Glutamatérgicos: metabotrópicos (mGluR) e ionotrópicos (iGluR) (NAKANISHI, 1992). Os mGluRs podem ser divididos em 3 classes, conforme os tipos de segundos mensageiros que modulam.

A classe I é composta pelos receptores mGluR1 e mGluR5, que são acoplados a uma proteína Gq estimuladora da fosfolipase C. Os demais pertencem ao grupo II (mGluR2 e mGluR3), e ao grupo III (mGluR4, mGluR6, mGluR7 e mGluR8) e são acoplados a uma proteína Gi que inibe a adenilato ciclase (PIN & DUVOISIN, 1995) .

Os iGluR podem ser classificados em NMDA (N-metil-D-aspartato), AMPA (α amino-3-hidroxi 5-metil 4-isoxazolepropionato) e Cainato, de acordo com seus agonistas específicos.(CONN & PINN, 1997).

Os receptores NMDA, de especial interesse para este trabalho, possuem dois tipos de subunidades: NR1 e NR2, podendo existir ainda diversas isoformas dessas subunidades. São permeáveis ao Ca^{2+} e bloqueados pelo Mg^{+2} (JAVIT, 2004).

Os receptores AMPA são canais iônicos compostos pelas subunidades GluR1-4, permeáveis ao Na⁺ e K⁺. A ativação dos receptores AMPA promove a despolarização necessária para que haja abertura dos canais NMDA (BORGES & DINGLELINE, 1998; JAVITT, 2004). Já os receptores Cainato são formados pelas subunidades Glu 5-7 e KA1-2. Possuem localização pré e pós- sináptica e baixa permeabilidade ao cálcio (BLEAKMAN & LODGE, 1998; HUETTNER, 2003).

A presença de receptores Glutamatérgicos, principalmente na porção dorsolateral da SCP (ALBIN, 1990) e o papel facilitador do Glutamato nas reações de fuga (GOODCHILD, 1982; KRIEGER & GRAEFF, 1985; HILTON & REDFERN, 1986) evidenciaram a importância deste neurotransmissor na elaboração de comportamentos defensivos.

Posteriormente, observou-se que reações de fuga também poderiam ser desencadeadas por administração de agonistas específicos dos rNMDA, como o NMDA na SCPdl (AGUIAR et al. 2006; BITTENCOURT et al., 2004; ZHANG et al., 1990). Essas reações foram acompanhadas por aumento de expressão da proteína Fos em regiões relacionadas com o comportamento defensivo (FERREIRA-NETTO et al., 2005).

Além disso, a injeção intra-SCPdl de AP-7, um antagonista dos rNMDA , induz efeitos ansiolíticos em diversos modelos animais de ansiedade (AGUIAR & GUIMARÃES 2009, BEIJAMINI & GUIMARÃES, 2006; GUIMARAES et al., 1991; MORAES et. al,2008).

Em conjunto, todos estes trabalhos reforçam a participação dos receptores NMDA do Glutamato na elaboração das respostas defensivas.

SISTEMA ENDOCANABINOIDE:

A planta *Cannabis sativa*, popularmente conhecida como maconha, tem sido usada por muitos anos para determinados fins terapêuticos e, principalmente, de forma recreacional. Todavia, seu mecanismo de ação permaneceu incerto até 1964, quando GOANI & MECHOULAM isolaram e identificaram o seu principal constituinte ativo: o Δ -9-tetrahidrocanabinol (Δ -9-THC) (GOANI & MECHOULAM, 1964). Tal composto é o principal responsável pela maioria dos efeitos da maconha (MARTIN, 1991; COMPTON et al., 1992).

Devido ao caráter lipofílico do Δ -9-THC e seus análogos sintéticos (denominados canabinoides), pensou-se inicialmente que seus efeitos seriam mediados por mecanismo de ação semelhante aos anestésicos gerais, ou seja, dispersão na bicamada lipídica da membrana celular. Porém, determinadas observações, como a de que as relações entre dose e resposta para esses compostos são muito sensíveis a alterações em suas estruturas químicas, conduziram à hipótese de que seus efeitos poderiam ser mediados por algum receptor.

Outro indício que apontava para a existência de receptores canabinoides foi a descoberta de que esses compostos eram capazes de inibir a adenilato ciclase, um mecanismo bioquímico comum a vários receptores, em células de neuroblastoma (HOWLETT & FLEMING, 1984). De fato, em 1988, Devane e colaboradores propuseram a existência de um receptor no qual essas substâncias se ligariam (DEVANE et al., 1988).

Dois anos depois, o primeiro tipo de receptor canabinoide foi identificado e clonado (MATSUDA et. al, 1990), sendo outro subtipo descoberto em seguida

(MUNRO et al., 1993). O Comitê para Nomenclatura de Receptores e Classificação de Drogas da União Internacional de Farmacologia Básica e Clínica (*International Union of Basic and Clinical Pharmacology - IUPHAR*) denominou tais receptores de CB1 e CB2, respectivamente (HOWLETT et. al, 2002; PERTWEE et. al, 2010).

Os receptores CB1 localizam-se principalmente no Sistema Nervoso Central (HERKENHAM et al., 1991), enquanto os receptores CB2 localizam-se em células do sistema imune (MUNRO et al., 1993), embora estudos mais recentes apontem para a existência de receptores CB2 também no Sistema Nervoso Central (ONAIVI et al., 2012).

O mecanismo de transdução de sinal para os receptores canabinoides baseia-se na ativação de uma Proteína Gi, que inibe a Adenilato Ciclase. Como consequência, há uma menor conversão de Trifosfato de Adenosina (ATP) em Monofosfato Cíclico de Adenosina (AMPc), o que leva a uma menor ativação da Proteína Quinase A (PKA). Logo, todos os efeitos biológicos mediados pela PKA estarão reduzidos (HOWLETT & FLEMING, 1984). Além disso, os receptores Canabinoides também aumentam a condutância de Canais para Potássio e reduzem a condutância de canais para Cálcio, agindo como moduladores da liberação de outros neurotransmissores (PIOMELLI, 2003).

Após a demonstração da existência de um receptor canabinoide e a elucidação de seu mecanismo de transdução, descobriu-se o primeiro ligante endógeno desse receptor: a N-araquidonoil etanolamina, também chamada Anandamida (DEVANE et al., 1992) A demonstração de que esta substância, isolada do encéfalo de mamíferos, era capaz de mimetizar os efeitos do Δ -9-

THC, consolidava a ideia de que ela seria um equivalente endógeno deste composto, ou seja, um endocanabinoide (Fride e Mechoulam, 1993).

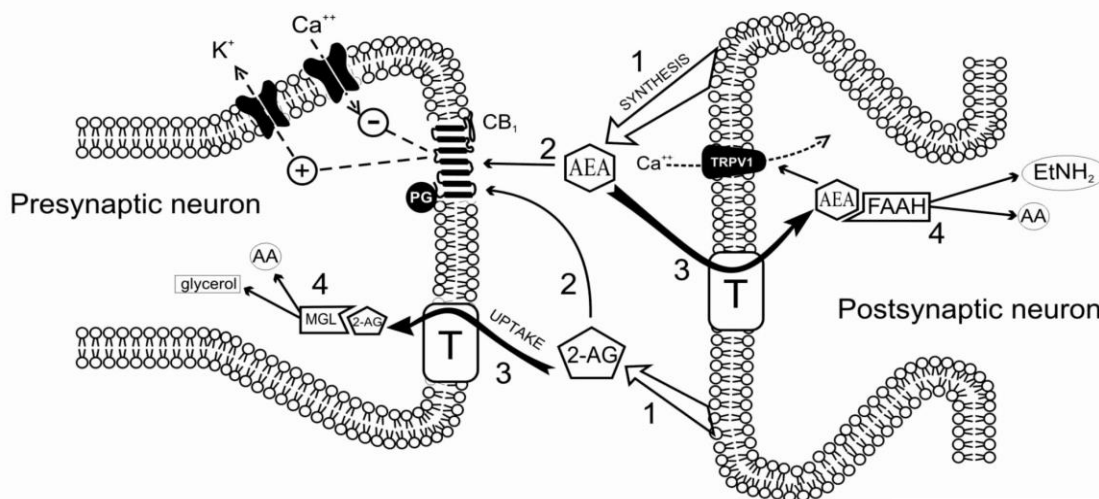
A Anandamida pode ainda se ligar ao receptor do tipo TRPV1 (*Transient Receptor Potential Vanilloid Type-1*; ROSS, 2003), onde exerce funções opostas àquelas exercidas quando se liga aos receptores CB1 (STAROWICZ et al., 2007; TERZIAN et al., 2009). Além disso, outros endocanabinoides foram identificados, a exemplo o 2-araquidonoilglicerol (2-AG) (SUGIURA et al. 1995). Enquanto a Anandamida possui afinidade maior por receptores do tipo CB1, 2-AG possui afinidade semelhante para ambos receptores (MECHOULAM, 1995). Além deles, também são considerados endocanabinoides os seguintes compostos: 2-aracdonil-glicerol-éter (Noladina), Oleamida e O-aracdonil etanolamina (Viroadamina) (PORTER et al. 2002; LEGGETT et al. 2004).

A síntese dos endocanabinoides ocorre a partir de fosfolípidos de membrana e inicia-se com a despolarização neuronal e consequente entrada de cálcio. Tão logo sejam sintetizados em neurônios pós-sinápticos, os endocanabinoides se difundem para o meio extracelular, uma vez que não são armazenados em vesículas (síntese sob demanda). Eles exercem sua ação em neurônios pré-sinápticos caracterizando uma neurotransmissão do tipo Retrógrada (WILSON & NICOLL, 2001; PIOMELLI, 2003).

O término da ação dos endocanabinoides se dá por meio de sua recaptação pelos terminais sinápticos e metabolização pelas enzimas Hidrolase Amida de Ácidos Graxos (*Fatty Acid Amide Hydrolase*, FAAH) e Monoacilglicerol Lipase (MGL), que metabolizam a Anandamida e o 2-AG, respectivamente (PIOMELLI, 2003).

Em conjunto, os endocanabinoides, seus receptores e suas enzimas constituem o sistema endocanabinoide (Piomelli, 2003). Uma ilustração simplificada desse sistema de neurotransmissão pode ser vista na FIGURA 1.

Com a caracterização dos receptores foi possível sintetizar moléculas que de alguma forma pudessem interferir no sistema endocanabinoide. Exemplos são os antagonistas CB1 Rimonabanto (SR 141716; RINALDI-CARMONA et al, 1994) e AM 251 (GATLEY et al, 1996) e os agonistas WIN 55-212, ACEA e HU 210 (PERTWEE, 1999; 2000). Além disso, outra estratégia de intervenção no sistema se dá por meio de drogas que inibem as enzimas que degradam os endocanabinoides. Como exemplo, pode-se citar o URB 597 (KATHURIA et al., 2003) e URB 602 (HOHMANN et al., 2005), que inibem a degradação da Anandamida e do 2-AG, respectivamente.



Saito et al, 2010

Figura 1: Representação esquemática da sinapse canabinoide. N-araquidonoil etanolamina - Anandamida (AEA) e 2- araquidonoilglicerol (2-AG) são sintetizados em neurônios pós-sinápticos, após influxo de cálcio (1). AEA e 2-AG se ligam a receptores CB1 em neurônios pré-sinápticos (2), exercendo suas ações. O término da ação destes endocanabinoides se dá por recaptação por transportadores (3) e metabolização pela Hidrolase Amida de ácidos graxos (FAAH) e Monoacil Monoacilglicerol Lipase (MGL), que metabolizam AEA e 2-AG respectivamente (4).

SISTEMA ENDOCANABINOIDE E ANSIEDADE:

Diversos estudos têm demonstrado a participação do sistema endocanabinoide na modulação dos transtornos de ansiedade, incluindo o Transtorno do Pânico.

FINN e colaboradores demonstraram que o tratamento com o Canabinoide sintético HU 210 foi capaz de reverter a fuga induzida pelo aminoácido excitatório Ácido D, L-homocisteico (DLH), ambos injetados na SCP (FINN et al, 2003). Além disso, MOREIRA e colaboradores (2007) demonstraram que a administração do agonista Canabinoide Anandamida na coluna dorsolateral da SCP promoveu efeitos do tipo ansiolítico, evidenciado pelo aumento do número de entradas no braço aberto do Labirinto em Cruz Elevado. Esse efeito foi revertido pelo tratamento prévio com o antagonista AM 251 (MOREIRA et al., 2007). Os efeitos ansiolíticos da Anandamida foram mimetizados pelo agonista seletivo CB1 - ACEA - e potencializados pelo AM 404 (um inibidor do transportador de Anandamida) injetados na SCP (MOREIRA et al., 2007).

Os efeitos ansiolíticos da injeção de Anandamida na SCP puderam ser confirmados em outro modelo de ansiedade, o teste de conflito de Vogel (LISBOA et al., 2008). Corroborando esses estudos, RESSTEL e colaboradores demonstraram que a tanto a Anandamida quanto o AM 404 reduziram a porcentagem de congelamento ("freezing") quando os animais foram re-expostos a um contexto previamente associado com choque. Houve ainda uma atenuação significativa na elevação da frequência cardíaca e pressão arterial média quando os animais eram tratados com Anandamida e AM 404 e re-expostos ao contexto (RESSTEL et al, 2008).

Não somente a Anandamida, mas drogas que modulam o sistema canabinoide sem atuar diretamente sobre receptores CB1, também se mostraram capazes de exercer efeito ansiolítico. De particular interesse é a inibição da hidrólise de anandamida, bloqueando-se a atividade da FAAH. A inibição farmacológica ou genética dessa enzima aumenta os níveis de anandamida e induz efeito tipo ansiolítico em animais, sendo este mediado pelo receptor CB1 (KATHURIA et al., 2003; MOREIRA et al,2008).

Em conjunto, esses resultados sugerem fortemente que o sistema endocanabinoide desempenha um importante papel no comportamento defensivo mediado pela SCP.

OBJETIVOS

Objetivo Geral:

Verificar a participação do Sistema Endocanabinoide da Substância Cinzenta Periaquedutal dorsolateral na modulação de respostas defensivas

Objetivos Específicos:

1. Testar a hipótese de que a administração local de ACEA (um agonista canabinoide seletivo para receptores CB1) atenuaria a resposta de fuga induzida pela administração de NMDA na SCPdl.
2. Testar a hipótese de que o URB597, um inibidor da hidrólise da Anandamida, poderia atenuar a resposta de fuga induzida por NMDA.
3. Testar a hipótese de que o pré-tratamento com o AM251, um antagonista dos receptores canabinóides, poderia reverter os efeitos produzidos pelo URB 597.
4. Testar a hipótese de que o URB 597 atenua a ativação neuronal induzida por NMDA.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Animais:

Foram utilizados ratos Wistar, pesando entre 230-250 gramas, provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, com livre acesso à água e comida. Os animais foram mantidos em um ciclo claro-escuro de 12x12 horas, com início às 7:00 e temperatura controlada (24° C).

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa e Experimentação Animal (CETEA), protocolo número 059/11.

2. Drogas:

- Arachidonyl-2-chloroethylamide - ACEA (agonista seletivo para o receptor CB1, Cayman®): 0,005 ; 0,05; 0,5 pmol/0,2 µL, solução em metil-acetato, diluído em salina (CASAROTTO et al., 2012)
- 3´(aminocarbonyl)[1,1´- biphenyl]-3-yl)-cyclohexylcarbamate URB 597 (Inibidor da Hidrólise da Anandamida, Cayman®) 0,3; 1,0; 3,0 nmol/0,2 µL, diluído em 1 Etanol: 1 Cremofor : 18 Salina (RUBINO, 2007)
- N-(piperidin-1yl)-5-(4-iodophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methyl-pyrazole-3-carboxamide, AM251(antagonista de receptor CB1, Sigma®): 100 pmol/0,2 µL diluído em 1 DMSO : 9 Salina (MOREIRA et al, 2007).
- NMDA (agonista de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, Sigma®) 1nmol/0,2 µL diluído em Salina 0,9% (ALMEIDA-SANTOS & AGUIAR, dados não publicados).

- Pentilenotretazol (PTZ, Sigma): 55 mg/Kg. Esta droga foi utilizada como controle positivo para os ensaios de imunistoquímica para c-Fos, dissolvida em salina 0,9% estéril

3. Cirurgia Estereotáxica

Os animais foram anestesiados com Ketamina – Xilazina (3:5; 1mL/Kg) via intraperitoneal e fixados a um aparelho estereotáxico (David Kopf®). Após injeção subcutânea de anestésico local (Xilocaína + Epinefrina 1:2000), e intramuscular de Pentabiótico (0,2 mL/rato), foi feita uma incisão sagital para exposição da calota craniana . Dois parafusos foram fixados ao crânio e uma cânula-guia (11 mm) foi implantada na SCPdl segundo coordenadas estabelecidas de acordo com o Atlas Paxinos & Watson (2007): 1,9 mm lateral; 4,3 mm dorso-ventral, 0 mm ântero-posterior em relação ao Lambda. Com a finalidade de evitar perfuração do seio venoso, o aparelho estereotáxico foi angulado em 16°. A cânula foi fixada à calota craniana por meio de uma massa acrílica. Um mandril de aço inoxidável foi introduzido na cânula para evitar a oclusão da mesma.

Ao término da cirurgia, os animais receberam o analgésico e antiinflamatório Banamine® (Flunixin meglumina, 1 mL/Kg), permanecendo no laboratório até completa recuperação. Após esse período, foram levados ao biotério, onde permaneceram por 7 dias, depois dos quais foram submetidos aos procedimentos experimentais.

4. 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.

5. Teste Comportamental: Caixa de Observação

Para se avaliar o comportamento dos animais após injeção das drogas, foi utilizada 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 P10 (FIGURA 2).

Durante dois minutos, a reação dos animais foi gravada por uma câmera de vídeo (Samsung, SMX-C10LN/XAA) localizada em frente a caixa de observação. Os parâmetros quantificados em cada vídeo foram cruzamentos e pulos. Considerou-se cruzamento quando o animal atravessou a linha média da caixa com as quatro patas e pulo quando o animal retirou as quatro patas do chão simultaneamente (AGUIAR et al., 2006).

Após a retirada do animal da caixa, o chão e as paredes da mesma foram limpos com álcool 70%.



Figura 2: Caixa de Observação

6. Perfusão Intracardíaca

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

7. Histologia

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. Um sítio representativo pode ser visto na FIGURA 3.

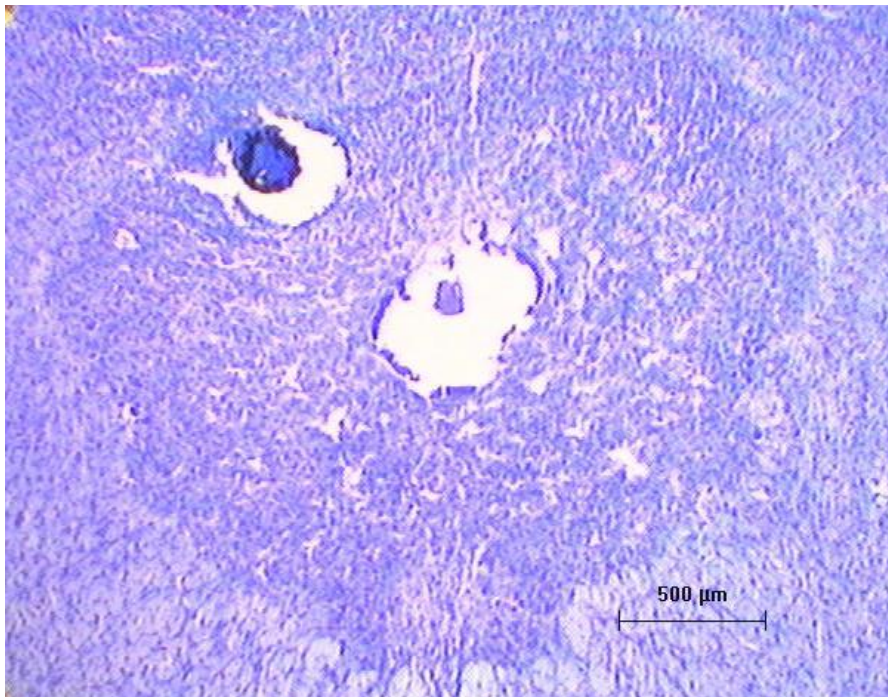


Figura 3: Fotomicrografia representativa do sítio de injeção na SCPdl.

8. Imunohistoquímica para Fos

Duas horas após o término da exposição à caixa de fuga, os animais foram anestesiados via i.p. com Uretana (25%, 5 ml/Kg) e perfundidos transcardiacamente com salina 0,9 % e paraformaldeído 4% (fosfatado e tamponado em PBS 0,1 M, pH 7,4) .

Os encéfalos foram removidos e processados conforme procedimento descrito por DE OLIVEIRA et al., (2001). Os animais cuja cânula não estava devidamente implantada na SCPdl foram excluídos.

As secções foram inicialmente pré-tratadas com H₂O₂ 1% em PBS 0,05M durante 10 minutos, para redução da atividade da peroxidase endógena. Após 4 lavagens de 5 minutos cada em PBS 0,05M (pH 7,4) as secções foram incubadas com soro albumina bovina (BSA) 1% em PBS 0,05M durante 30 minutos. Em seguida foi realizada 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 novamente 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.

Uma vez removido o anticorpo secundário, através de sucessivas lavagens em PBS 0,05M (3 lavagens de 5 minutos), 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 adequadas, as fatias foram distendidas em lâminas previamente gelatinizadas. Em seguida, as Lâminas foram desidratadas através de uma série de álcoois (70%, 80%, 95% e 100%, 5 minutos cada), clareadas no xilol (2 x 10 minutos) e cobertas com Entellan® e lamínulas

A imunorreatividade para Fos (Fos-IR) foi visualizada como um produto castanho depositado no interior dos núcleos neuroniais. Quantificou-se a expressão de Fos nas colunas dorsomedial, dorsolateral e ventrolateral da SCP (ipsi e contralateral à injeção) procurando focalizar o plano 48 ou o mais próximo dele possível. O experimentador estava cego em relação aos grupos experimentais e a contagem foi feita com o auxílio do Software Image J (Versão 5.0). Um diagrama do plano e as colunas da SCP quantificadas estão representados conforme a FIGURA 4

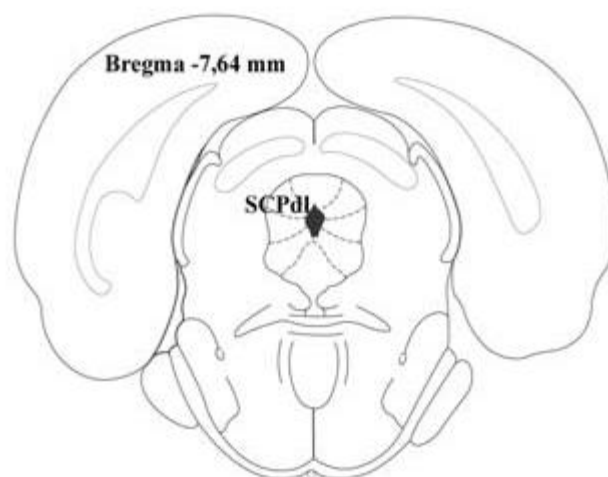


Figura 4: Diagrama do plano representativo das estruturas quantificadas (modificado de Paxinos e Watson, 1997)

9. Grupos Experimentais:

Experimento 1: Efeito do ACEA, agonista seletivo CB1, sobre as respostas de fuga induzidas pelo NMDA na SCPdl (n= 4-6 animais/ grupo).

Grupo experimental 1:

- Veículo (0,2 μ L) + Veículo (0,2 μ L)
- Veículo (0,2 μ L) + NMDA (1 nmol/0,2 μ L)
- ACEA (0,005 pmol/0,2 μ L) + NMDA (1 nmol/0,2 μ L)
- ACEA (0,05 pmol/0,2 μ L) + NMDA (1 nmol/0,2 μ L)
- ACEA (0,5 pmol/0,2 μ L) + NMDA (1 nmol/0,2 μ L)

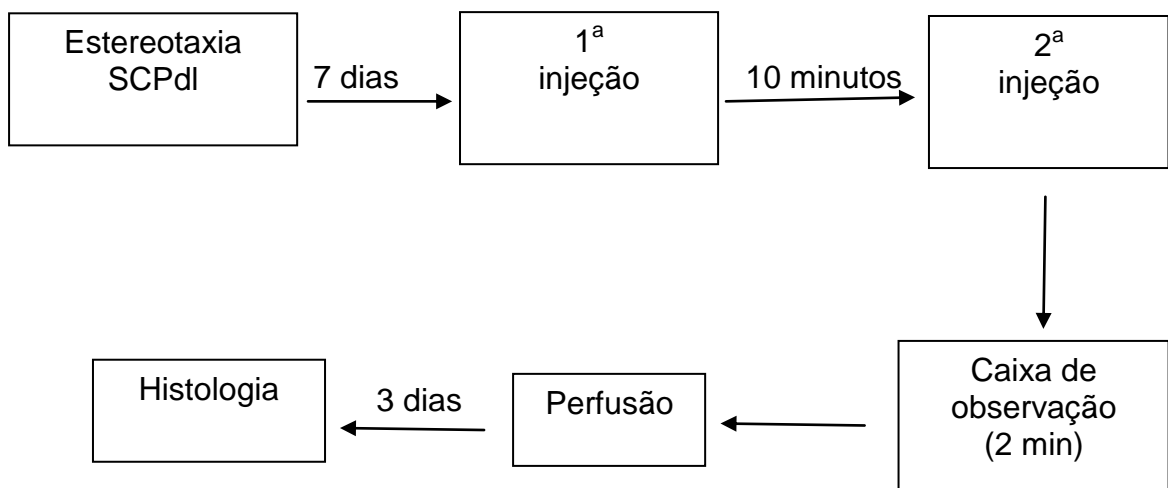


Figura 5: Representação esquemática do protocolo experimental 1

Experimento 2: Efeito do URB 597 sobre as respostas de fuga induzidas pelo NMDA na SCPdl (n= 4-6 animais/ grupo).

Grupo experimental 2:

- Veículo (0,2 μ L) + Veículo (0,2 μ L)
- Veículo (0,2 μ L) + NMDA (1 nmol/0,2 μ L)
- URB (0,3 nmol/0,2 μ L) + NMDA (1 nmol/0,2 μ L)
- URB (1 nmol/0,2 μ L) + NMDA (1 nmol/0,2 μ L)
- URB (3 nmol/0,2 μ L) + NMDA (1 nmol/0,2 μ L)

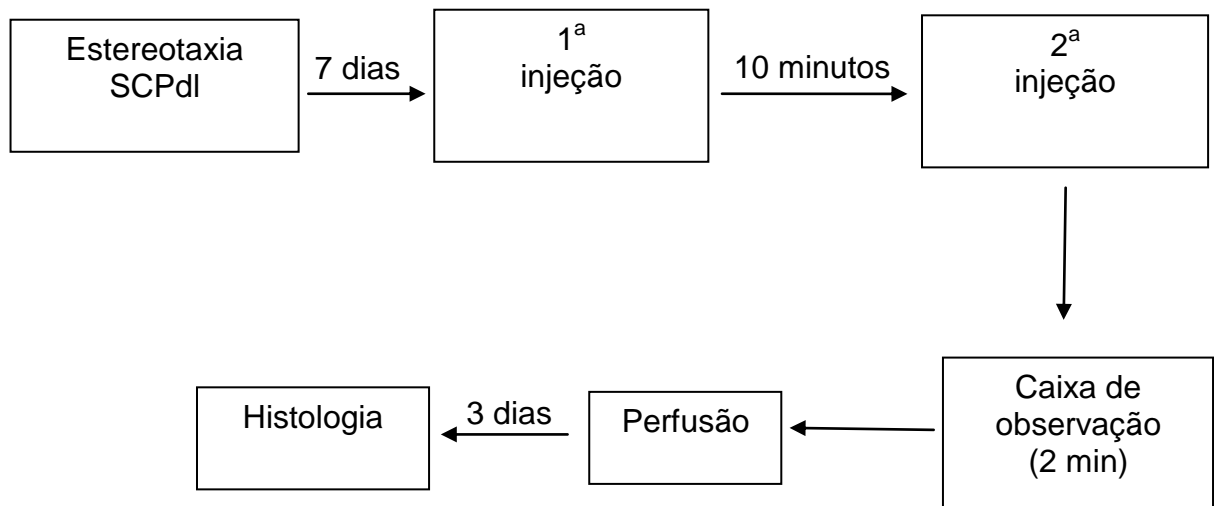


Figura 6: Representação esquemática do protocolo experimental 2

Experimento 3: Efeito do AM251 sobre a reversão do bloqueio das respostas de fuga provocadas pelo URB 597 na SCPdl (n= 4-6 animais/grupo).

Grupo experimental 3:

- Veículo (0,2 μ L) + Veículo (0,2 μ L) + Veículo (0,2 μ L)
- Veículo (0,2 μ L) + Veículo (0,2 μ L) + NMDA (1 nmol/0,2 μ L)
- Veículo (0,2 μ L) + URB (3 nmol/0,2 μ L) + NMDA (1 nmol/0,2 μ L)
- AM251(100 pmol/0,2 μ L) + Veículo (0,2 μ L) + NMDA (1 nmol/0,2 μ L)
- AM251(100 pmol/0,2 μ L) + URB (3 nmol/0,2 μ L) + NMDA (1 nmol/0,2 μ L)

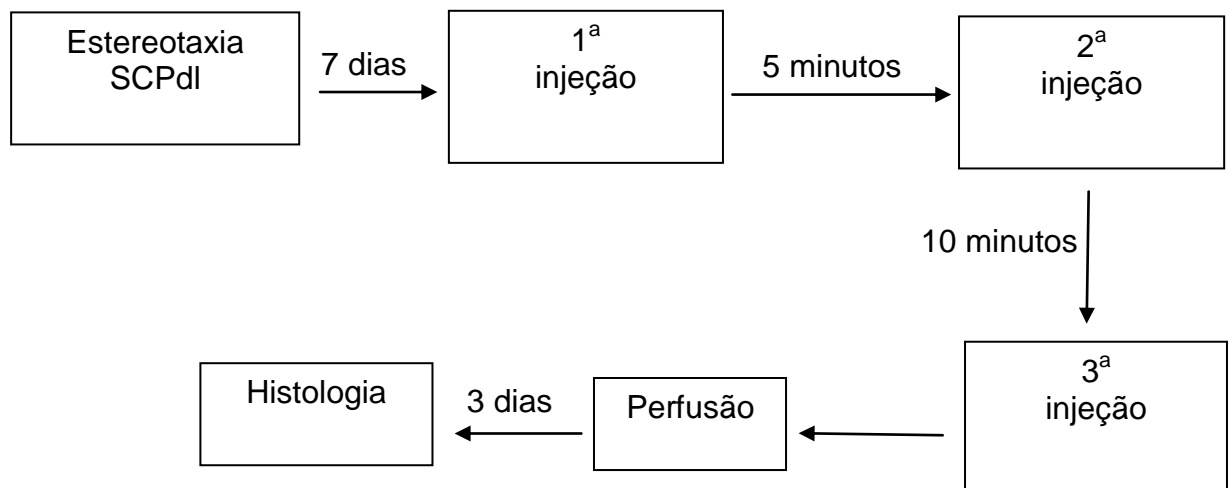


Figura 7: Representação esquemática do protocolo experimental 3

Experimento 4: Efeito do ACEA e do URB 597, injetados na SCPdl, sobre a atividade motora (n= 5-6 animais/ grupo).

Grupo experimental 4

- Veículo (0,2 μ L) + Veículo (0,2 μ L)
- ACEA (0,5 pmol/0,2 μ L) + Veículo (0,2 μ L)
- URB (3 nmol/0,2 μ L) + Veículo (0,2 μ L)

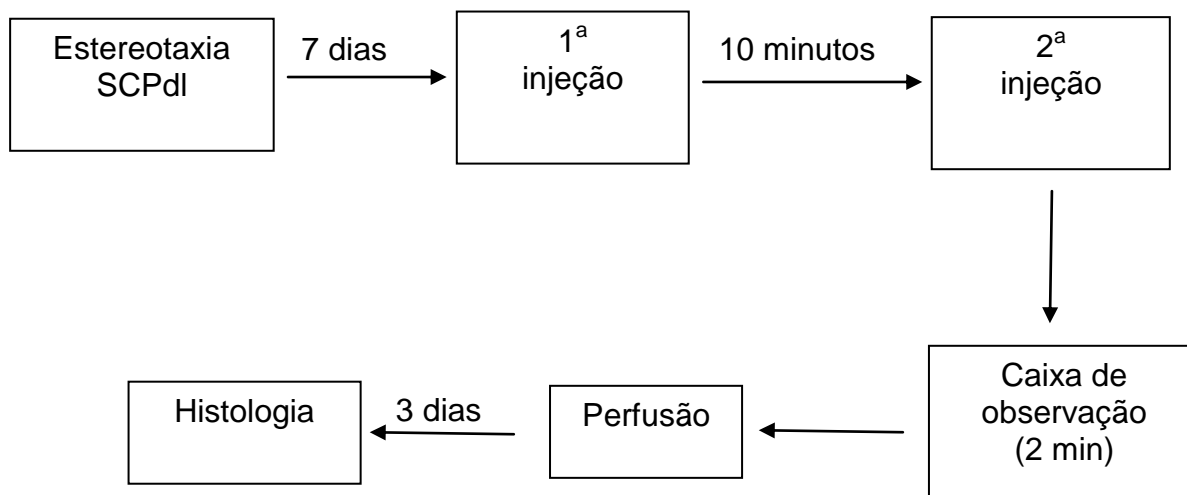


Figura 8: Representação esquemática do protocolo experimental 4

10. ANÁLISE ESTATÍSTICA:

As variáveis analisadas foram as comportamentais, sendo estas o número de cruzamentos e o de pulos na caixa de observação, ou imunohistoquímicas, qual seja o número de células positivas para Fos em diferentes colunas da SCP. Por não apresentarem distribuição normal (segundo teste de Kolmogorov-Smirnov), os dados foram comparados por análise estatística não-paramétrica e estão apresentados na forma de mediana e intervalos interquartis.

Os testes utilizados foram o de Kruskal-Wallis para comparações múltiplas, seguido de Mann-Whitney para comparações entre dois grupos. Além disso, foram realizadas análises de correlação de Spearman (r) entre os dados comportamentais e o número de células positivas para Fos nas colunas dorsolateral, dorsomedial e ventrolateral da SCP. Para todos os testes, o nível de significância estabelecido foi $p < 0,05$. O programa utilizado para as análises estatísticas e elaboração dos gráficos foi o GraphPad Prism 5[®].

RESULTADOS

1. Efeito do pré-tratamento com ACEA nas respostas de fuga induzidas pelo NMDA na SCPdl.

No primeiro experimento, o teste de Kruskal-Wallis revelou diferença entre os grupos para os parâmetros cruzamentos ($p= 0,0089$) e pulos ($p= 0,0043$) (Figura 9). A injeção de NMDA ($1\text{nmol}/0,2\ \mu\text{L}$) intra-SCPdl produziu reações de fuga, caracterizadas por um aumento significativo no número de cruzamentos e pulos em relação ao grupo controle.

O pré-tratamento com ACEA foi capaz de reduzir o número de cruzamentos e pulos nas doses de $0,005\ \text{pmol}/0,2\mu\text{L}$ ($p=0,0152$ e $p= 0,0043$, para cruzamentos e pulos, respectivamente; Mann–Whitney), $0,05\ \text{pmol}/0,2\mu\text{L}$ ($p = 0,01$ e $p=0,0303$; para cruzamentos e pulos, respectivamente; Mann–Whitney) e $0,5\ \text{pmol}/0,2\mu\text{L}$ ($p= 0,0095$ para cruzamentos e pulos; Mann – Whitney).

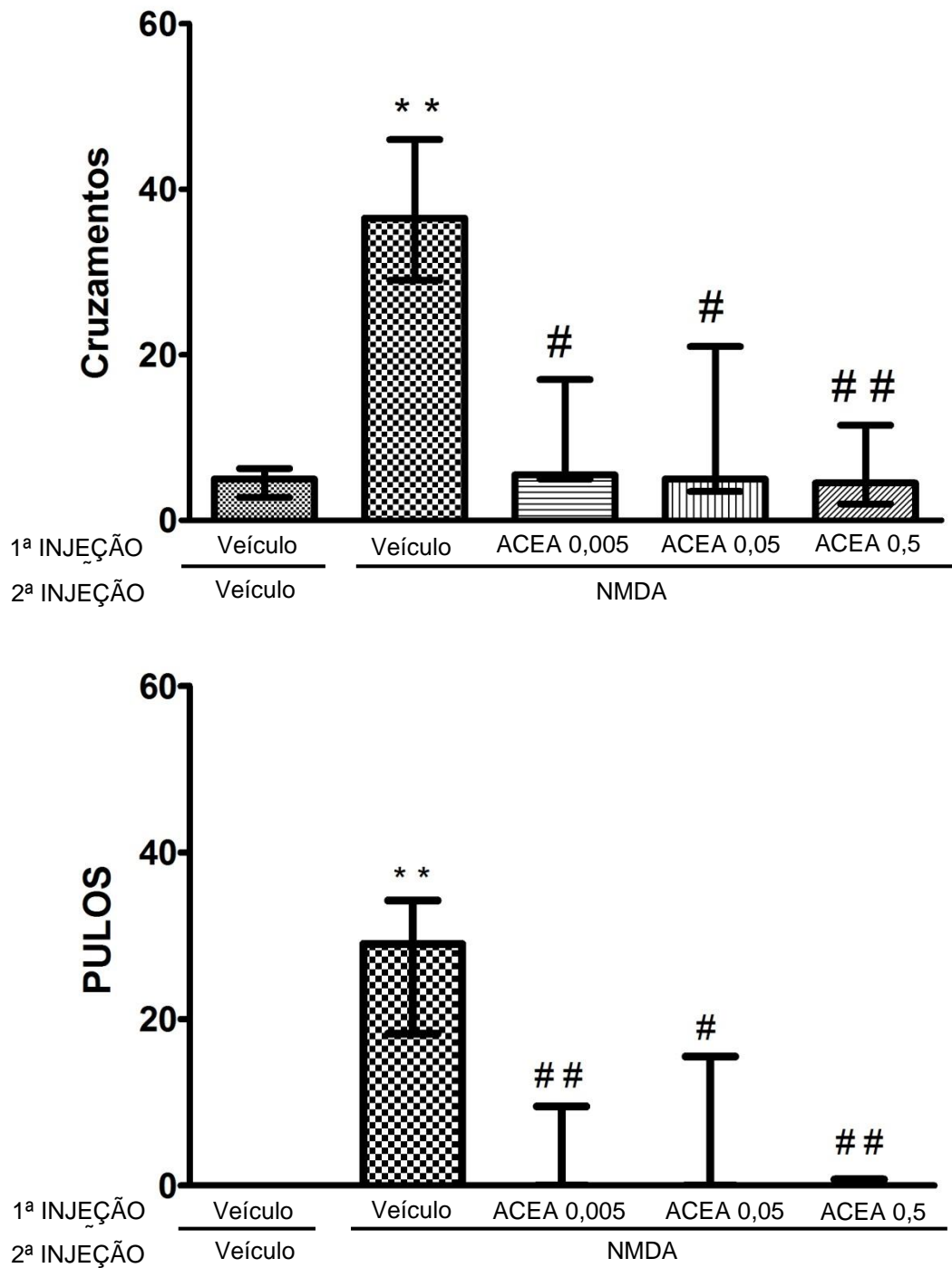


Figura 9: Efeito do ACEA (0,005; 0,05 e 0,5 pmol/0,2µL) na reação de fuga induzida por NMDA (1 nmol/0,2µL) na SCPdl de ratos observados durante dois minutos a partir do início das injeções. As colunas nos painéis superior e inferior representam mediana ± I.R. do número de cruzamentos e pulos, respectivamente (**p < 0,05 em relação ao grupo controle; # p < 0,05 em relação ao grupo Veículo-NMDA; Kruskal-Wallis seguido de Mann-Whitney; n=4-6).

Efeito do pré-tratamento com URB 597 nas respostas de fuga induzidas pelo NMDA na SCPdl.

Neste experimento, o teste de Kruskal-Wallis revelou diferença nos números de cruzamentos ($p=0,01$) e pulos ($p=0,001$) (Figura 10). A injeção de NMDA (1nmol/0,2 μ L) intra-SCPdl produziu reações de fuga caracterizadas por aumento nesses parâmetros.

O pré-tratamento com URB 597 foi capaz de reduzir o número de cruzamentos nas doses de 0,3 nmol/0,2 μ L ($p=0,0411$; Mann-Whitney), 1 nmol/0,2 μ L ($p= 0,0281$; Mann-Whitney) e 3 nmol/0,2 μ L ($p= 0,0043$; Mann-Whitney). Já para o número de pulos, apenas as doses de 0,3 nmol/0,2 μ L e 3 nmol/0,2 μ L ($p=0,0079$ e $p=0,0041$ respectivamente; Mann-Whitney) foram capazes de reverter o efeito do NMDA.

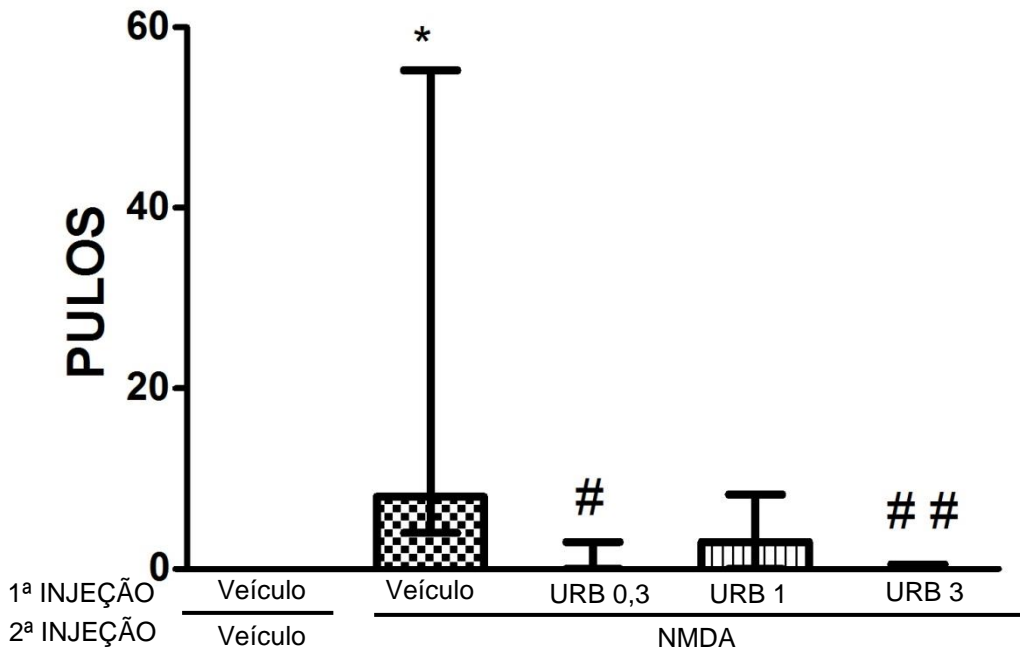
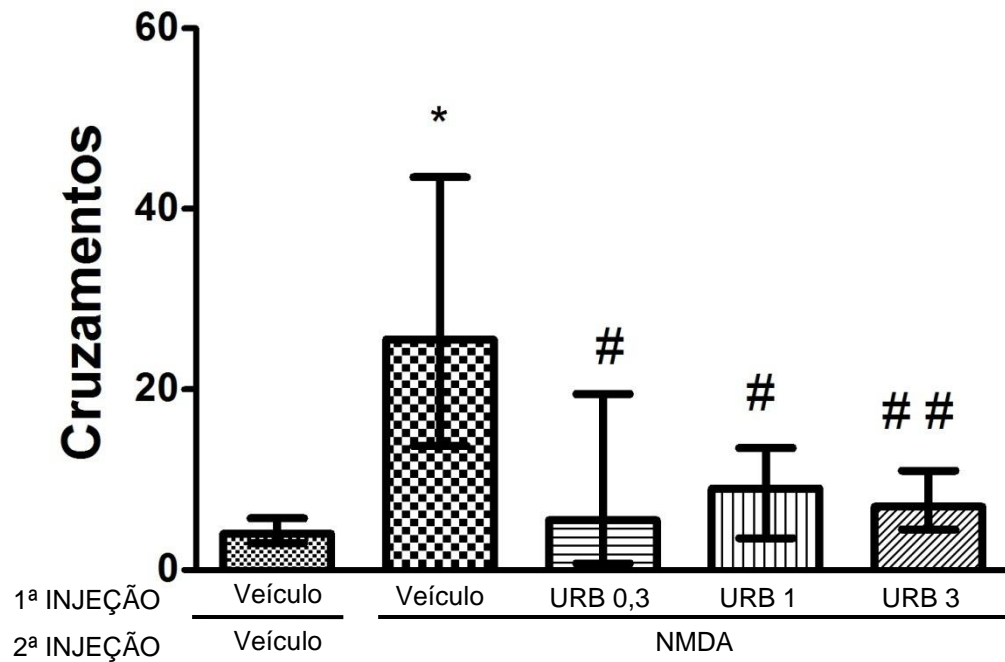


Figura 10: Efeito do URB 597(0,3; 1; 3 pmol/0,2µL) na reação de fuga induzida por NMDA (1 nmol/0,2µL) na SCPdl de ratos observados durante dois minutos a partir do início das injeções. As colunas nos painéis superior e inferior representam mediana ± I.R. do número de cruzamentos e pulos, respectivamente (*p <0,05 em relação ao grupo controle; # p <0,05 em relação ao grupo Veículo-NMDA; Kruskal-Wallis seguido de Mann-Whitney; n=4-6)

2. Efeito do pré-tratamento com AM 251 sobre o bloqueio do URB 597 nas respostas de fuga induzidas por NMDA na SCPdl.

O teste de Kruskal-Wallis revelou diferenças tanto no número de cruzamentos ($p= 0,0160$) quanto de pulos ($p= 0,0234$) (FIGURA 11). A injeção de NMDA (1nmol/0,2 μ L) intra-SCPdl produziu reações de fuga, caracterizadas por um aumento em ambas as medidas.

O tratamento com URB diminuiu significativamente o número de cruzamentos e pulos ($p= 0,0286$; Mann-Whitney) quando comparado ao grupo veículo-veículo-NMDA. Já o tratamento com Veículo-AM 251-NMDA não diferiu estatisticamente do grupo Veículo-Veículo-NMDA.

O tratamento com o antagonista AM 251 foi capaz de reverter a atenuação no comportamento de fuga induzido por URB 597. Tal resposta pode ser evidenciada pelo aumento no número de cruzamentos ($P= 0,0195$; Mann-Whitney) e pulos ($p= 0,0179$; Mann-Whitney), quando comparado ao grupo veículo-veículo-URB.

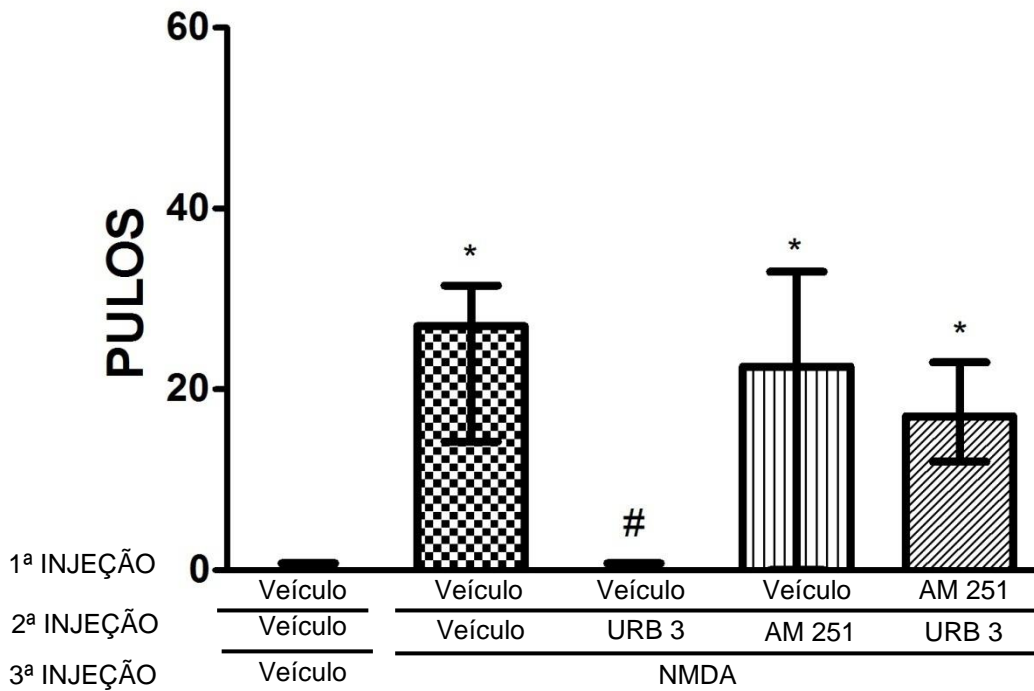
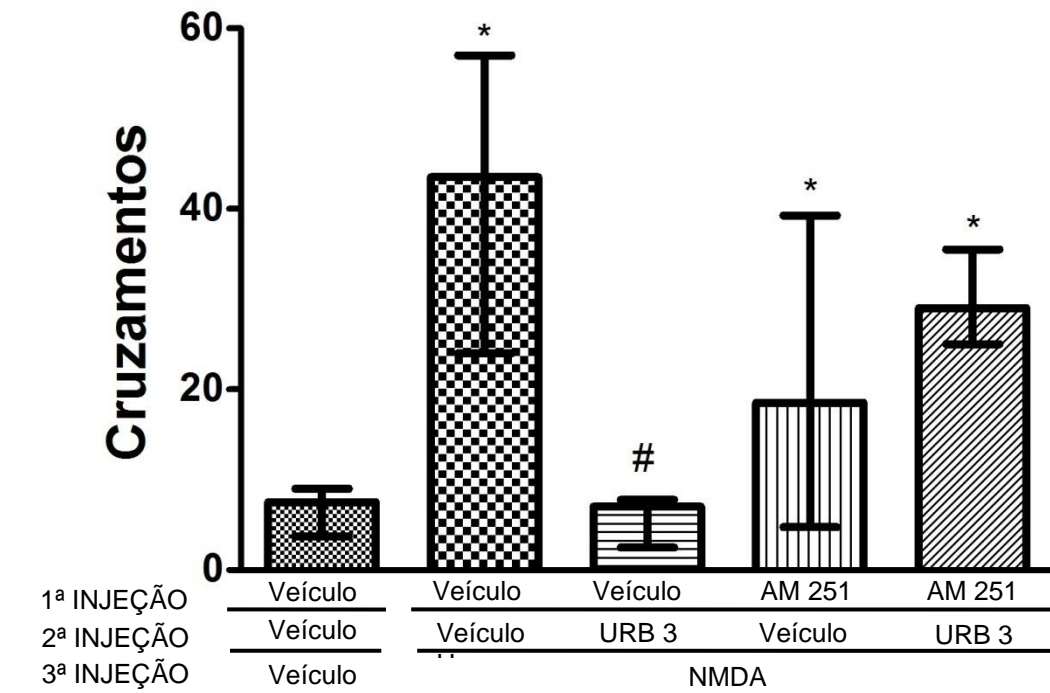


Figura 11: Efeito do AM 251 (100pmol/0,2µL) na reação de fuga induzida por NMDA (1 nmol/0,2µL) na SCPdl de ratos observados durante dois minutos a partir do início das injeções. As colunas nos painéis superior e inferior representam mediana ± I.R. do número de cruzamentos e pulos, respectivamente (*p <0,05 em relação ao grupo controle; # p <0,05 em relação ao grupo Veículo-NMDA; Kruskal-Wallis seguido de Mann-Whitney; n=4-6)

3. Efeito do tratamento com ACEA e URB 597 sobre a atividade motora

Com a finalidade de verificar se o ACEA e o URB 597 por si só poderiam alterar o número de cruzamentos e pulos nos animais, foram administradas as maiores doses dessas drogas e comparadas com o veículo. Não houve diferença significativa no número de cruzamentos (Veículo: 5,25/6,00/7,500; ACEA 0,5 pmol: 3,50/5,00/7,00; URB597 3 nmol: 5,00/7,50/9,25; $p=0,2289$, Kruskall-Wallis) nem no número de pulos, que foi de zero para todos os grupos; $p=0,9874$, Kruskall-Wallis).

4. Efeito do tratamento com URB 597 intra-SCPdl sobre a expressão de Fos em diferentes regiões da SCP de ratos submetidos a fuga pelo modelo de administração de NMDA

A administração de NMDA elevou significativamente o número de células Fos positivas na SCPdl no lado contralateral à injeção ($p= 0,0248$; Kruskal-Wallis). Essa elevação foi atenuada pelo pré-tratamento com URB 587 3nmol ($p= 0,0212$, Mann-Whitney). Não houve diferença significativa no número de células Fos positivas entre os grupos veículo-veículo e veículo-URB (FIGURA 12, painel superior).

De igual maneira, o NMDA elevou significativamente o número de células Fos positivas na SCPdl no lado ipsilateral à injeção ($p= 0,0030$; Kruskal-Wallis). Essa elevação foi atenuada pelo pré-tratamento com URB 587 3nmol ($p=0,0159$; Mann-Whitney). Não houve diferença significativa no número de células Fos positivas entre os grupos veículo-veículo e veículo-URB (FIGURA 12, painel inferior).

A administração de NMDA não foi capaz de elevar de maneira significativa o número de células Fos positivas na porção dorsomedial da SCP quando comparado ao grupo veículo-veículo. A administração do URB 597 também não alterou os níveis de expressão de c-Fos. (FIGURA13).

Com a administração de NMDA houve um aumento no número de células Fos positivas na SCPvl no lado contralateral à injeção ($p=0,0029$; Kruskal-Wallis). Porém, esse aumento não foi atenuado pelo pré-tratamento com URB 587 3nmol. Não houve diferença significativa no número de células

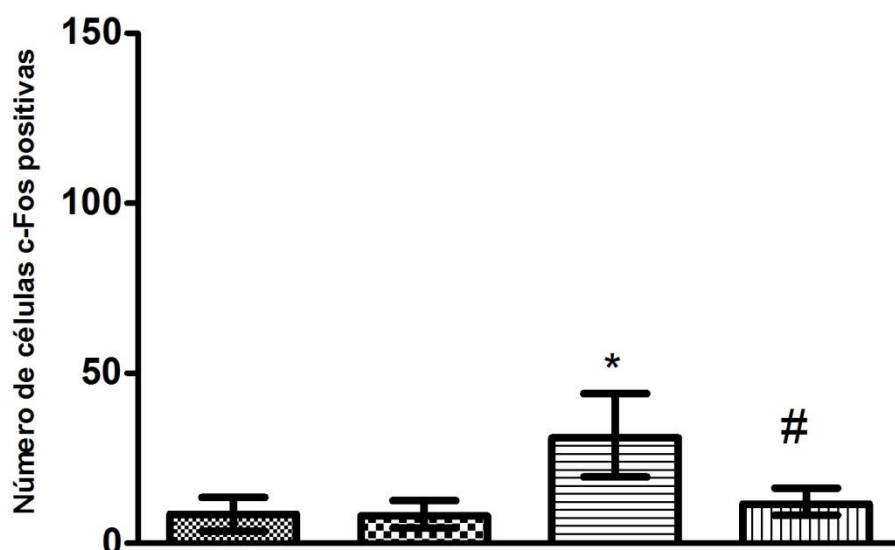
Fos positivas entre os grupos veículo-veículo e veículo- URB (FIGURA 14, painel superior).

Por fim, a administração de NMDA na SCPdl ocasionou um aumento de expressão de c-Fos na SCPvl ipsilateral ($p=0,0076$, Mann Whitney), efeito que foi atenuado pelo pré-tratamento com URB 587 3 nmol ($p=0,0159$, Mann Whitney). A administração de URB por si só não ocasionou mudanças na expressão de c-Fos, quando comparado ao grupo veículo-veículo.(FIGURA 14, painel inferior).

O aumento na expressão de Fos foi acompanhado de uma elevação no número de cruzamentos e pulos para o grupo Veículo-NMDA, quando comparado ao grupo Veículo-Veículo ($p= 0,0117$ e $p= 0,0079$, respectivamente. Figura.16). A diminuição da expressão de Fos promovida pelo pré-tratamento com URB 597 foi acompanhada de uma redução no comportamento tipo pânico dos animais, ou seja, houve uma redução no número de cruzamentos e pulos quando comparado ao grupo Veículo-NMDA ($p=0,0357$ e $p=0,0357$ para cruzamentos e pulos, respectivamente, Mann-Whitney).

A análise de Spearman demonstrou uma correlação positiva entre o número de cruzamentos, bem como de pulos, e a expressão de Fos, conforme demonstrado na Figura 17 ($r= 0,6238$, $p= 0,0054$ e $r= 0,8150$, $p<0.0001$ para a correlação de Fos com cruzamentos e pulos, respectivamente).

SCPdl Contralateral



SCPdl Ipsilateral

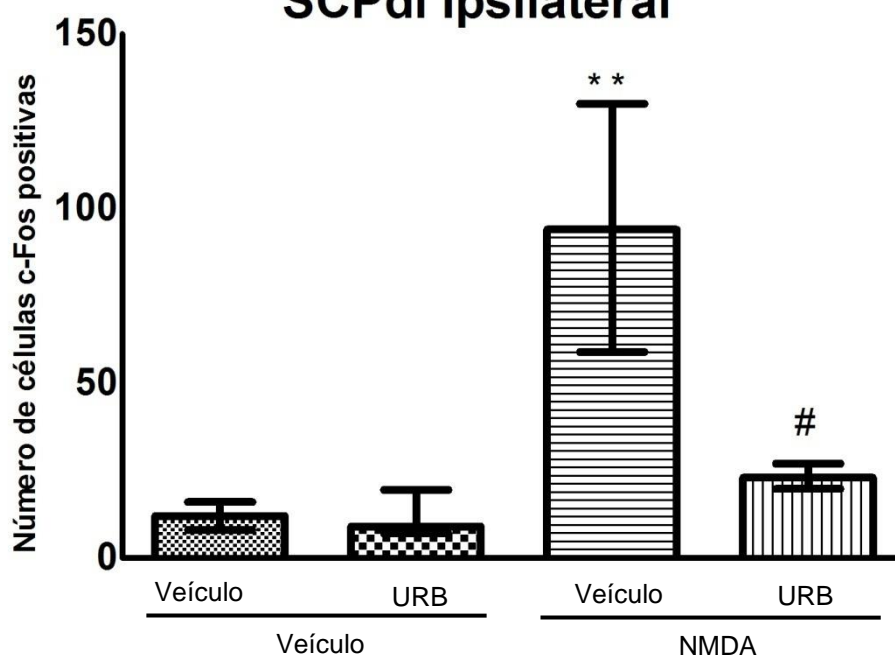


Figura 12 :Efeito do URB 597(3 nmol/0,2 μ L) no número de células c-Fos positivas em ratos submetidos à injeção intra SCPdl de veículo ou NMDA e expostos a caixa de observação durante 2 minutos.O painel superior mostra o número de células no lado contralateral à injeção e o painel inferior no lado ipsilateral. As colunas representam mediana \pm I.R. do número de células. (* p < 0,05 em relação ao grupo controle; # p < 0,05 em relação ao grupo Veículo-NMDA; Kruskal-Wallis seguido de Mann-Whitney) (n=4-5)

SCP dm

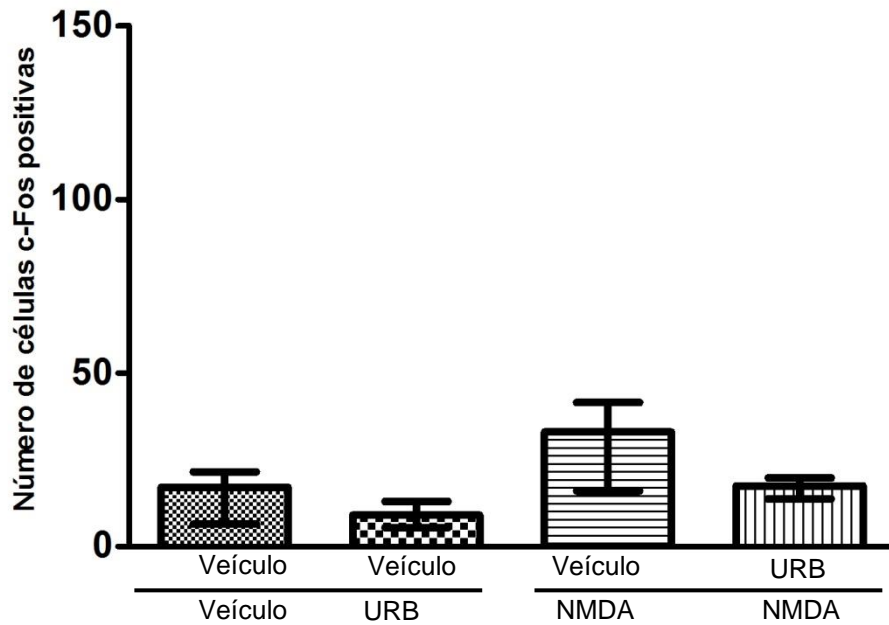
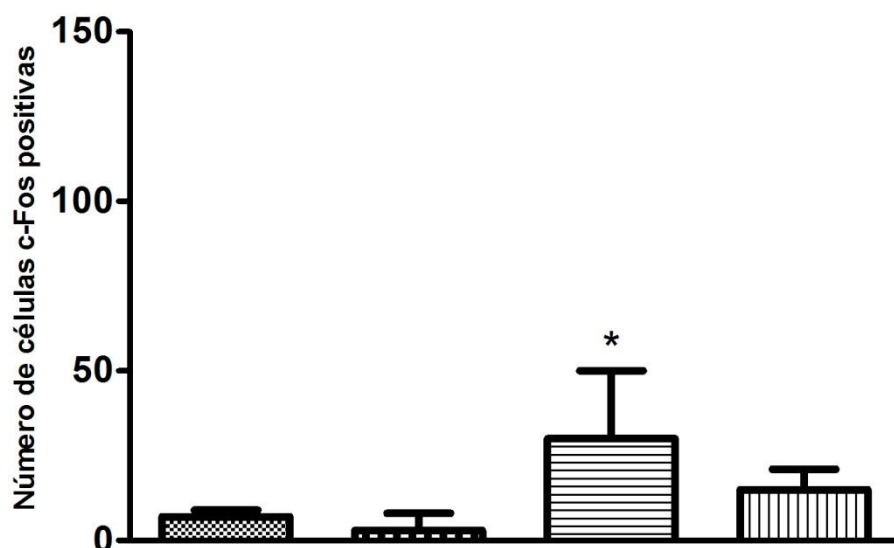


Figura 13 :Efeito do URB 597(3 nmol/0,2 μ L) no número de células c-Fos positivas em ratos submetidos à injeção intra SCPdm de veículo ou NMDA e expostos a caixa de observação durante 2 minutos. As colunas representam a mediana \pm I.R. do número de células. (* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle; # $p < 0,05$ em relação ao grupo Veículo-NMDA; Kruskal-Wallis seguido de Mann-Whitney) (n=4-5).

SCPvl contralateral



SCPvl ipsilateral

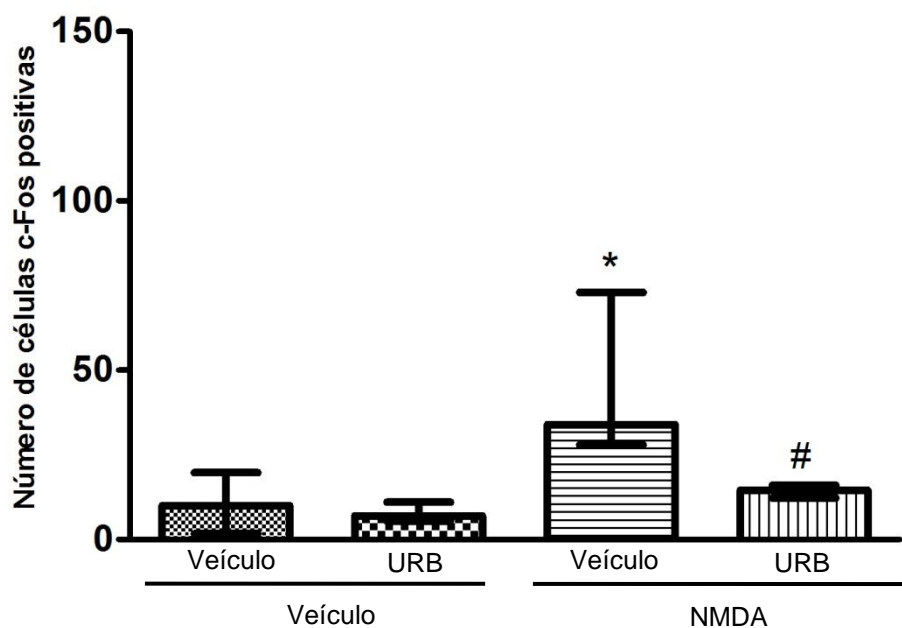
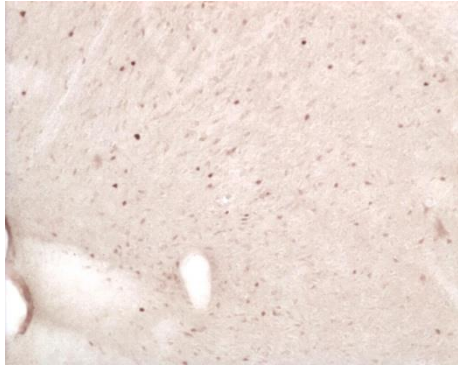
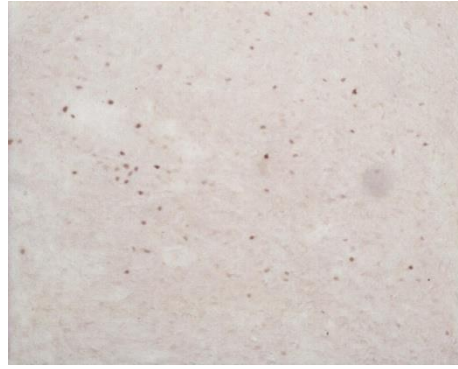


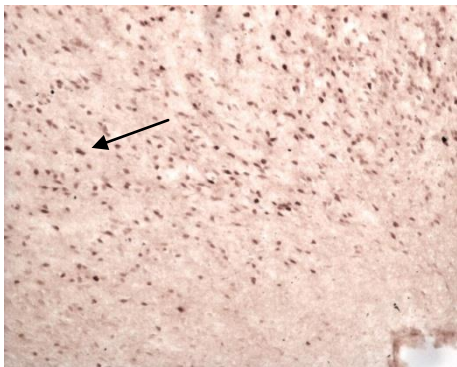
Figura 14: Efeito do URB 597(3 nmol/0,2 μ L) no número de células c-Fos positivas em ratos submetidos à injeção intra SCPvl de veículo ou NMDA e expostos a caixa de observação durante 2 minutos. O painel superior mostra o número de células no lado contralateral à injeção e o painel inferior no lado ipsilateral. As colunas representam a média \pm E.P.M. do número de células. (* p < 0,05 em relação ao grupo controle; # p < 0,05 em relação ao grupo Veículo-NMDA; Kruskal-Wallis seguido de Mann-Whitney) (n=4-5)



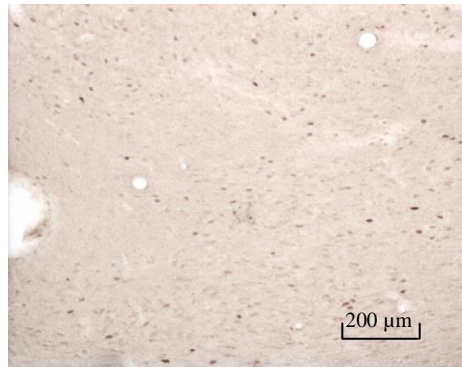
A



B



C



D

Figura 15: Fotomicrografias representativas de secções coronais (40 μ m) da SCPdl, de um rato que recebeu injeção de Veículo-Veículo (A), Veículo-URB (B), Veículo-NMDA (C) e URB-NMDA (D). As amostras foram processadas para imunistoquímica para a detecção da proteína Fos. A seta indica uma célula positiva para Fos. Aumento= 10x.

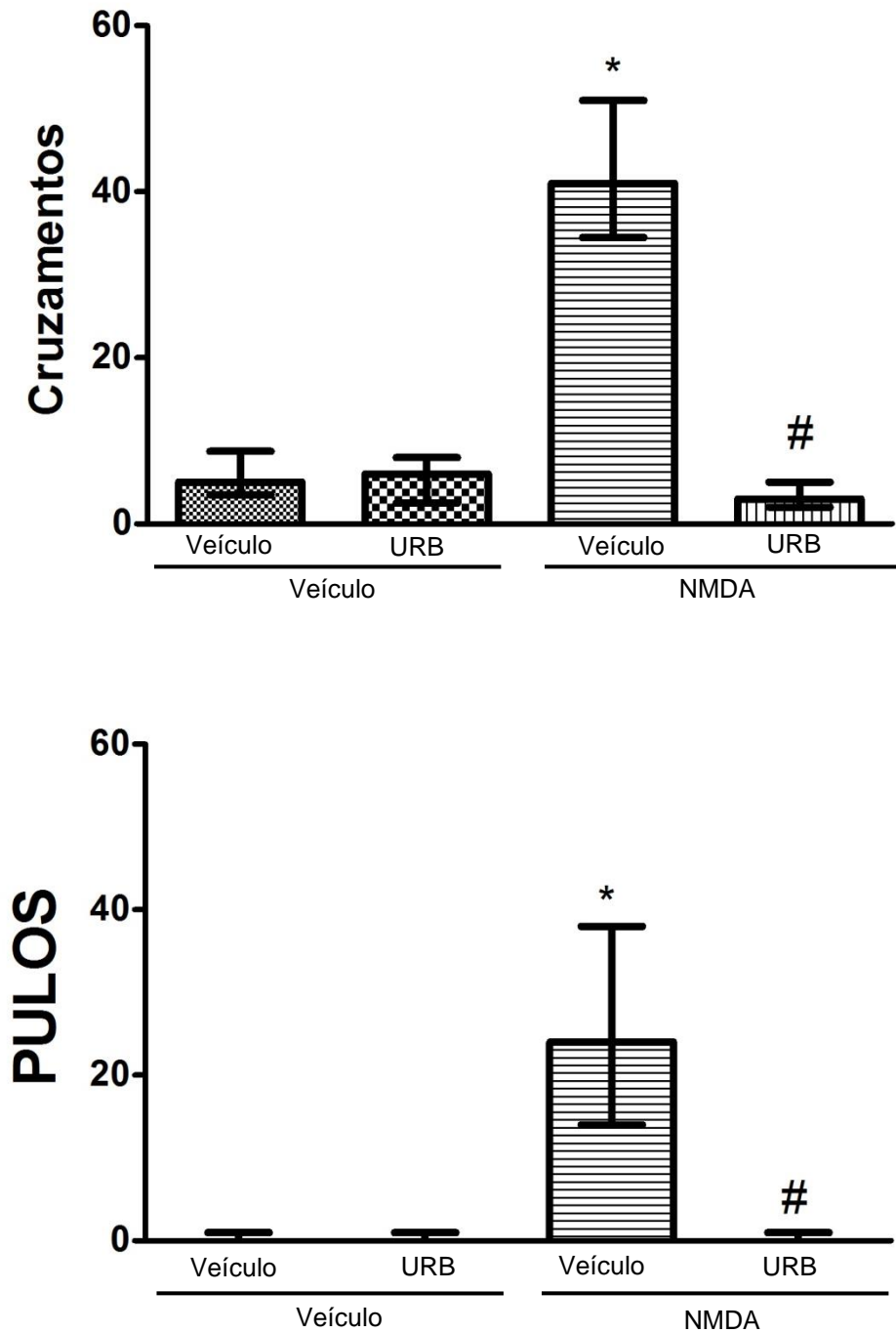


Figura 16: Efeito do URB 597(3 pmol/0,2 μ L) na reação de fuga induzida por NMDA (1 nmol/0,2 μ L) na SCPdl de ratos observados durante dois minutos a partir do início das injeções. As colunas nos painéis superior e inferior representam mediana \pm I.R. do número de cruzamentos e pulos, respectivamente (*p <0,05 em relação ao grupo controle; # p <0,05 em relação ao grupo Veículo-NMDA; Kruskal-Wallis seguido de Mann-Whitney; n=4-5)

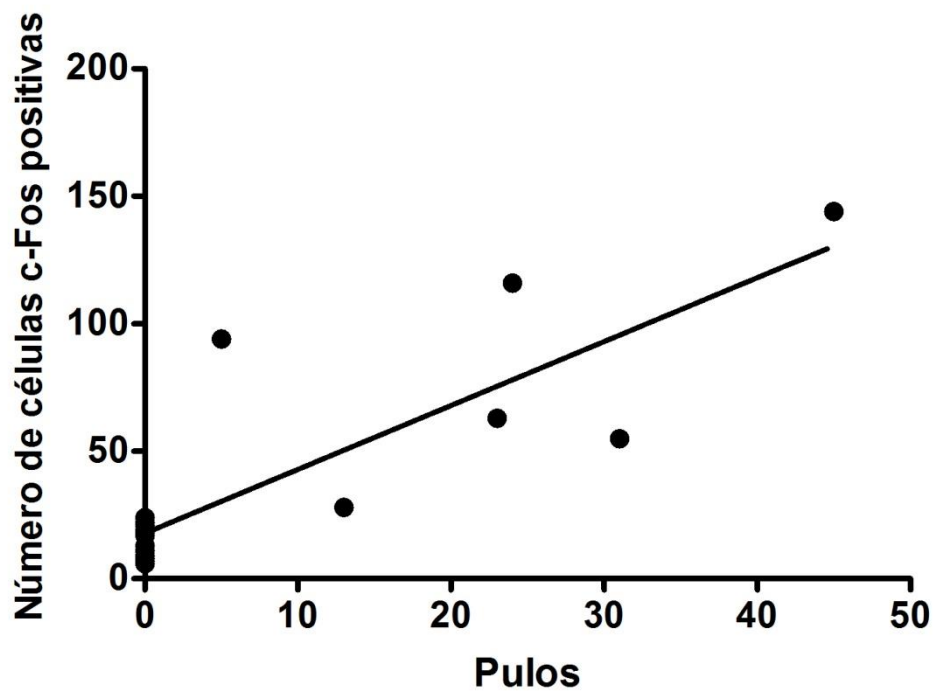
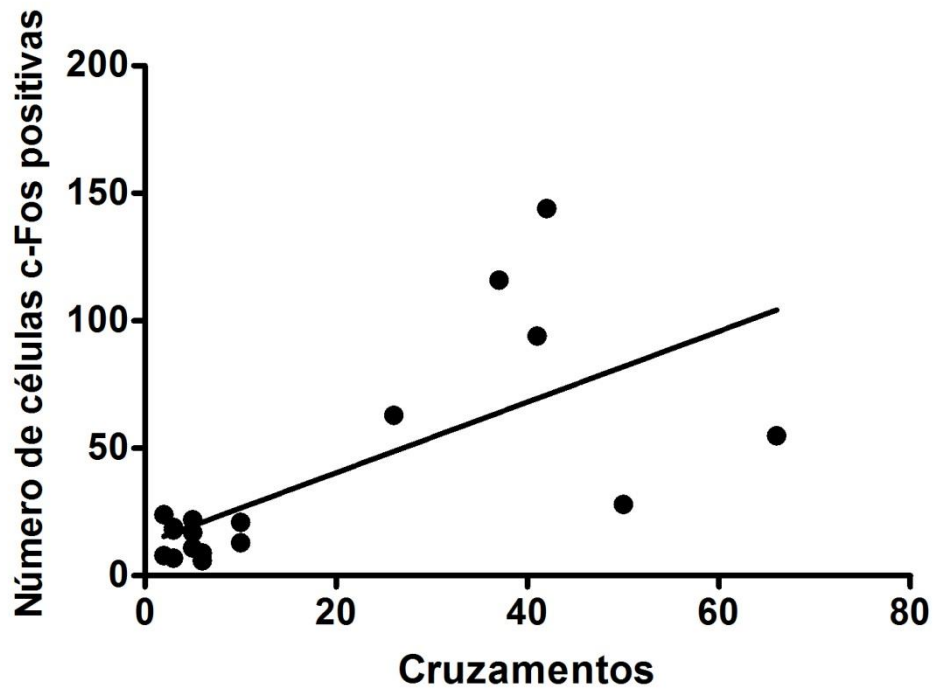


Figura 17: Correlação entre o número de células c-Fos positivas e número de cruzamentos (painel superior) e pulos (painel inferior) após microinjeção na SCPdl ($r=0,6238$, $p=0,0054$ e $r=0,8150$, $p<0,0001$ para a correlação de Fos com cruzamentos e pulos, respectivamente; correlação de Spearman).

DISCUSSÃO:

Os presentes resultados mostram que a administração intra-SCPdl de NMDA é capaz de promover reações de fuga/escape em ratos. Esses resultados estão de acordo com trabalhos anteriores nos quais a injeção de NMDA nas diversas colunas da SCP promoveu uma elevação no número de cruzamentos e pulos (AGUIAR et al, 2006; BITTENCOURT et al, 2004; FERREIRA-NETTO et al, 2005), comportamentos possivelmente correlatos ao pânico (VARGAS & SCHENBERG, 2001). A resposta de fuga pode ainda ser evocada pela administração intra-SCPdl do próprio glutamato ou de agonistas mGluR do grupo I/II (KRIEGER & GRAEFF, 1985; MOLCHANOV & GUIMARÃES, 1999), dados que reforçam o papel facilitador desse aminoácido excitatório nas respostas aversivas.

Estes efeitos parecem ser modulados por receptores CB1, uma vez que todas as doses de ACEA, um agonista seletivo desse receptor, foram capazes de atenuar as respostas de fuga, o que está de acordo com os achados de CASAROTTO et al (2012), onde o ACEA promoveu o aumento do limiar da corrente elétrica necessária para induzir o comportamento de fuga. Além disso, o ACEA foi capaz de promover efeito ansiolítico no labirinto em cruz elevado (LCE) quando injetado na SCP (MOREIRA et al., 2007) e no córtex pré-límbico (FOGAÇA et al, 2012), efeitos que foram revertidos pelo pré-tratamento com o antagonista AM 251.

Além do ACEA, outros agonistas canabinoides inibiram respostas aversivas em modelos animais de pânico e ansiedade. O agonista seletivo CB1-HU 210— quando injetado intra-SCP, foi capaz de atenuar as respostas de pânico induzidas pela administração do aminoácido excitatório DLH, e pela exposição ao ultrassom. (FINN et al, 2003; 2004). MCGREGOR e

colaboradores (1996) também demonstraram que a administração sistêmica do agonista canabinoide CP 55,940 inibe a vocalização ultrasônica, um efeito indicativo de atividade antiaversiva

Neste trabalho, o efeito panicolítico obtido com o ACEA pode ser explicado pelo fato de que este agonista age via CB1 inibindo a entrada de cálcio nos neurônios e abrindo canais para potássio, fatos que resultam em hiperpolarização neuronal e conseqüente redução da liberação de neurotransmissores, incluindo o Glutamato (VAUGHAN et al., 2000; GERDEMAN & LOVINGER, 2001; HUANG et al., 2001; WANG, 2003). Outro mecanismo pelo qual o ACEA poderia atenuar as respostas aversivas induzidas por NMDA é através da modulação do tônus Gabaérgico endógeno. Evidências mostram o papel da serotonina em respostas anti-aversivas (SCHUTZ et al., 1985; GRAEFF, 2004) e a estimulação de receptores CB1 localizados em interneurônios Gabaérgicos poderia resultar em um aumento na liberação de 5-HT via desinibição de neurônios que liberam esse neurotransmissor, com conseqüente atenuação de respostas comportamentais (LOVICK, 2000).

Quanto ao inibidor de Hidrólise da Anandamida, este trabalho demonstrou que o URB 597 exerceu efeito panicolítico, caracterizado por uma redução do número de cruzamentos e pulos em todas as doses utilizadas. Estes resultados estão de acordo com estudos anteriores do nosso grupo, que demonstraram que injeções intraperitoneais de URB 597 promoveram efeito antipânico no modelo do labirinto em T elevado (GOBIRA & MOREIRA, dados não publicados)

KATHURIA et al. (2003) e PATEL & HILLARD (2006) já haviam demonstrado previamente que o URB 597 também promovia ação ansiolítica no LCE, efeito que também foi encontrado por BUSQUETS-GARCIA (2011) no modelo do Labirinto em Zero elevado. Não somente a inibição farmacológica, mas também a inibição genética da FAAH é capaz de promover efeitos ansiolíticos (MOREIRA et al., 2008), corroborando a hipótese de que a elevação dos níveis endógenos de canabinoides favorecem comportamentos anti-aversivos em modelos animais de ansiedade e pânico.

Como a síntese de endocanabinoides ocorre sob demanda, é necessário um estímulo desencadeador (DI MARZO et al., 1994), que neste caso é o aumento do influxo de cálcio secundário à administração de NMDA. Uma vez sintetizada, a Anandamida não é hidrolizada, devido à presença do URB 597, e assim fica mais disponível para se ligar a receptores e exercer seus efeitos. Os endocanabinoides sintetizados em neurônios pós-sinápticos se difundem para os terminais pré-sinápticos, onde ativam receptores canabinoides que reduzem o influxo de Cálcio e aumentam o efluxo de potássio, fato que culmina com a redução da atividade neuronal (CHEVALEYRE et al., 2006; MARSICANO & LUTZ, 2006). Assim, a Anandamida reduz a liberação de neurotransmissores, inclusive o Glutamato (VAN DER STELT et al, 2005; FREUND et al, 2003), o que explica a ação antipânico do URB 597.

O efeito panicolítico do URB 597 encontrado no presente trabalho está ainda de acordo com os achados de CASSANO e colaboradores (2011), onde camundongos nocautes para FAAH apresentaram comportamento ansiolítico. Adicionalmente, em fatias de SCP, a Anandamida inibiu a transmissão sináptica excitatória em presença de URB 597 (KAWAHARA et al., 2011). Em

conjunto, esses dados demonstram papel inibitório na modulação dos comportamentos defensivos e reforçam a teoria de que drogas que aumentam os níveis de endocanabinoides exercem efeitos panicolíticos.

Os efeitos anti-aversivos promovidos pelo URB 597(3nmol) foram revertidos pelo pré-tratamento com um antagonista para os receptores CB₁ - AM251- sustentando a hipótese de que os receptores CB₁ modulam os estados relacionados ao medo e ansiedade e, possivelmente são ativados na SCPdl durante um evento aversivo (MOREIRA et al., 2007; 2009; 2011; PATEL & HILLARD, 2006). Nossos achados corroboram estudos anteriores que demonstram que injeções de AM 251 na SCPdl podem reverter efeitos ansiolíticos nos modelos do Labirinto em Cruz elevado, teste de conflito de Vogel e medo condicionado ao contexto (MOREIRA et al., LISBOA et al., 2008; RESSTEL et al., 2008)

MARTIN e colaboradores (2001) demonstraram que camundongos *knock-out* para CB₁ ou animais que receberam AM 251 exibiram um aumento no comportamento tipo-ansiedade, elevação na agressividade quando submetidos ao teste de interação social e maior susceptibilidade para desenvolver um estado de anedonia. Ainda nesse sentido, NAVARRO e colaboradores (1997) demonstraram que outro antagonista canabinoide, o SR141716 (Rimonabant) promove efeitos ansiogênicos no LCE, sugerindo que há uma modulação tônica do sistema canabinoide. Posteriormente, outros estudos corroboraram a hipótese de que o bloqueio do tônus canabinoide endógeno poderia promover efeito ansiogênico (HALLER et al. 2004; PATEL & HILLARD 2006)

Com a finalidade de verificar se a resposta panicolítica promovida por URB 597 (3nmol) era acompanhada de uma redução da ativação neuronal, foram feitas análises imonohistoquímicas para detecção de ativação de proteína Fos. O efeito panicogênico provocado pelo NMDA foi acompanhado de um aumento na expressão desta proteína, principalmente na porção dorsolateral da SCP. Esses dados estão de acordo com os estudos de AGUIAR & GUIMARÃES (2009), que demonstraram que a administração de antagonistas Glutamatérgicos intra-SCP atenuam respostas comportamentais e reduzem a expressão de Fos frente à exposição ao predador. Esses dados reforçam o papel facilitador do glutamato nas reações defensivas mediadas pela SCP, especialmente sua porção dorsolateral.

Nossos resultados estão de acordo com a hipótese de que SCPdl é um núcleo capaz de mediar respostas defensivas evocadas pela estimulação química, elétrica, ou ainda pela exposição ao predador (CANTERAS & GOTO, 1999).

Estudos realizados por FERREIRA-NETO e colaboradores (2005) também demonstraram a ativação da porção dorsolateral da SCP após injeções de NMDA. Tal estudo demonstra ainda um aumento na expressão de FOS na porção dorsomedial, fato que não foi observado no presente trabalho. Porém, as doses de NMDA utilizadas por FERREIRA-NETO e colaboradores foram de 4 nmol e 7 nmol, enquanto que a dose aqui utilizada foi de 1nmol.

A redução do número de cruzamentos e pulos provocado pelo URB 597 na dose de 3nmol foi acompanhada de uma diminuição na expressão da proteína c-Fos quando comparada ao grupo NMDA nas porções dorsolateral e ventolateral. Esses dados estão de acordo com os trabalhos de SINGEWALD &

SHARP (2000). Nesse estudo feito em ratos, após a injeção de drogas que provocam pânico em humanos, houve aumento na expressão de c-Fos nas áreas dorsolateral e ventrolateral da SCP.

BANDLER & DEPAULIS (1988) demonstraram que a porção ventrolateral estaria envolvida na resposta de *freezing* de animais que foram submetidos à estimulação da SCP com ácido Caínico. De fato, imediatamente antes do início da fuga induzida por NMDA, os animais apresentam um período de imobilidade antes de iniciarem a resposta de fuga. Tal fato poderia explicar a alta expressão de Fos encontrada na SCPvl neste trabalho.

Nota-se uma correlação positiva entre o número de células Fos positivas e o número de cruzamentos e pulos dos animais na porção dosolateral da SCP, demonstrando, mais uma vez que essa é a região onde há maior ativação neuronal quando animais são submetidos a estímulos aversivos (VIANNA et al., 2003; FERREIRA-NETO et al., 2004; BORELLI et al., 2005).

Em conclusão, os dados aqui apresentados demonstram que agonistas canabinoides ou drogas que elevam os níveis de Anandamida promoveram efeitos anti-pânico, com conseqüente redução de atividade neuronal no modelo de estimulação química da SCPdl por NMDA. Nossos resultados sustentam a hipótese de que os receptores CB1 podem modular respostas de pânico mediadas pela SCPdl., possivelmente devido a uma redução da neurotransmissão Glutamatérgica nessa região.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, DC; 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 (2006).

AGUIAR, DC; GUIMARÃES, FS. 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* 87: 2418-2429. (2009)

ALBIN RL; MAKOWIEC RL; HOLLINGSWORTH Z; DURE LS; PENNEY JB; YOUNG AB. Excitatory amino acid binding sites in the periaqueductal gray of the rat, *Neurosci. Lett.*, 118:112–115. (1990)

AMARA SG; FONTANA AC. Excitatory amino acid transporters: keeping up with glutamate. *Neurochem Int*, v.41, n.5, p.313-8 (2002).

APFELBACH R; BLANCHARD CD; BLANCHARD RJ; HAYES RA.; MCGREGOR IS. The effects of predator odors in mammalian prey species: a review of field and laboratory studies. *Neurosci Biobehav Rev*, v.29, n.8, p.1123-44. (2005).

AZKUE JJ; KNOPFEL T; KUHN R; MATEOSA JM; GRANDESA P. Distribution of the metabotropic glutamate receptor subtype mGluR5 in rat midbrain periaqueductal grey and relationship with ascending spinofugal afferents. *Neuroscience Letters* 228:1–4(1997)

BANDLER R; KEAY KA; FLOYD N; PRICE J. Central circuits mediating patterned autonomic activity during active vs. passive emotional coping. *Brain Res. Bull.*, 53 (1): 95-104. (2000)

BANDLER R; 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 KA. Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray and the integration of emotional expression. *Prog Brain Res* 107: 285–300(1996)

BANDLER R; DE PAULIS A, "Elicitation of intraspecific defence reactions in the rat from midbrain periaqueductal grey by microinjection of kainic acid, without neurotoxic effects," *Neuroscience Letters*, vol. 88, no. 3, pp. 291–296(1988).

BANDLER R; KEAY KA; FLOYD N; PRICE J. Central circuits mediating patterned autonomic activity during active vs. passive emotional coping. *Brain Research Bulletin*, Vol. 53, No. 1, pp. 95–104(2000)

BEIJAMINI V; GUIMARAES FS. c-Fos expression increase in NADPH-diaphorase positive neurons after exposure to a live cat. *Behav Brain Res*, v.170, n.1, p.52-61(2006).

BERRINO L; OLIVA P; ROSSI F; PALAZZO E; NOBILI B, MAIONE S. Interaction between metabotropic and NMDA glutamate receptors in the periaqueductal grey pain modulatory system. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 364 :437–443(2001)

BISOGNO T. Endogenous cannabinoids: Structure and metabolism. *J Neuroendocrinol* 20(Suppl. 1):1–9(2008).

BITTENCOURT AS; CAROBREZ AP; ZAMPROGNO LP; TUFIK S; SCHENBERG L C. Organization of single components of defensive behaviors within distinct columns of periaqueductal gray matter of the rat: role of N-methyl-D-aspartic acid glutamate receptors. *Neuroscience*, v.125, n.1, p.71-89(2004).

BLANCHARD RJ; FLANNELLY KJ; BLANCHARD DC. "Defensive behavior of laboratory and wild *Rattus norvegicus*," *Journal of Comparative Psychology*, vol. 100, no. 2, pp. 101–107(1986).

BLANCHARD RJ, BLANCHARD DC. The organization and modelling of aggressive behavior. In *The Biology of Aggression*, ed. P. F. Brain, D. Benton, pp. 529-62. Alphen aan den Rijn: Noordhoff/Sijthoff (1980)

BLANCHARD DC; BLANCHARD R J. Affect and aggression: an animal model applied to human behavior. In *Advances in the Study of Aggression*, ed. R. J. Blanchard, D. C. Blanchard, 1 : 1-58. New York: Academic (1984).

BLANCHARD DC; LEE EMC; WILLIAMS G; BLANCHARD RJ. Taming of *Rattus norvegicus* by lesions of the mesencephalic central gray. *Physiol. Psychol.* 9: 1 57-63(1981)

BLANCHARD RJ; BLANCHARD DC. An ethoexperimental analysis of defense, fear, and anxiety In: McNaughton, N. & Andrews, G. (eds). Anxiety. University of Otago Press: Dunedin, p.124-133. (1990).

BLANCHARD DC; BLANCHARD R.J. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. *Annu. Rev. Psychol.*, 39: 43-68. (1988).

BLANCHARD RJ; GRIEBEL G; HENRIE A; BLANCHARD DC. Differentiation of anxiolytic and panicolytic drugs by effects on rat and mouse defense test batteries. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 21: 783-789. (1997).

BLANCHARD DC; GRIEBEL G; BLANCHARD RJ. Mouse defensive behaviors: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 25 (3): 205-218. (2001).

BLANCHARD DC; GRIEBEL G; BLANCHARD RJ. The mouse defense test battery: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. *Eur. J. Pharmacol.*, 463 (1-3): 97-116. (2003).

BLEAKMAN D; LODGE D. Neuropharmacology of AMPA and kainate receptors. *Neuropharmacology*, v.37, n.10-11, p.1187-204. (1998).

BORELLI KG, FERREIRA-NETTO C, COIMBRA NC, BRANDÃO ML. Fos-like immunoreactivity in the brain associated with freezing or escape induced by inhibition of either glutamic acid decarboxylase or GABAA receptors in the dorsal periaqueductal gray. *Brain Res.* Jul 27;1051(1-2):100-11. (2005)

BORGES K; DINGLEDINE R. AMPA receptors: molecular and functional diversity. *Prog Brain Res*, v.116, p.153-70. (1998).

BORTOLATO M, CAMPOLONGO P, MANGIERI RA. Anxiolytic-like properties of the anandamide transport inhibitor AM404. *Neuropsychopharmacology* 31:2652–2659. (2006)

BUSQUETS-GARCIA A, PUIGHERMANAL E, PASTOR A, DE LA TORRE R, MALDONADO R, OZAITA A. Differential role of anandamide and 2-arachidonoylglycerol in memory and anxiety-like responses. *Biol Psychiatry.* Sep 1;70(5):479-86(2011)

CANTERAS NS, GOTO M. Fos-like immunoreactivity in the periaqueductal gray of rats exposed to a natural predator, *Neuroreport* 10, 413–418 (1999)

CAROBREZ AP, TEIXEIRA KV, GRAEFF FG. Modulation of defensive behavior by periaqueductal gray NMDA/glycine-B receptor. *Neurosci.Biobehav. Rev.*;25(7-8):697-709 (2001)

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).

CASAROTTO; PC; TERZIAN AL; AGUIAR DC; ZANGROSSI H; GUIMARÃES F S; WOTJAK CT; MOREIRA FA. Opposing Roles for Cannabinoid Receptor Type-1 (CB(1)) and Transient Receptor Potential Vanilloid Type-1 Channel (TRPV1) on the Modulation of Panic-Like Responses in Rats. *Neuropsychopharmacology Inpress*(2011)

CASSANO T; GAETANI S; MACHEDA T; LACONCA L; ROMANO A; MORGESE MG; CIMMINO CS; CHIAROTTI F; BAMBICO FR; GOBBI G; CUOMO V; PIOMELLI D. Evaluation of the emotional phenotype and serotonergic neurotransmission of fatty acid amide hydrolase deficient mice. *Psychopharmacology* 214:465-76. (2011)

CHEVALEYRE V; TAKAHASHI KA; CASTILLO PE. Endocannabinoid-mediated synaptic plasticity in the CNS. *Annu Rev Neurosci* 29:37–76. (2006)

COMPTON DR, JOHNSON MR, MELVIN LS, MARTIN BR Pharmacological profile of a series of bicyclic cannabinoid analogs: Classification as cannabimimetic agents. *J Pharmacol Exp Ther* 260:201–209. (1992)

CONN PJ; PIN JP. Pharmacology and function of metabotropic glutamate receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37:205–237.(1997)

DAVIS, M. The role of the amygdala in fear-potentiated startle: implications for animal models of anxiety. *Trends Pharmacol. Sci.*, 13 (1): 35-41, (1992a).

DAVIS, M. The role of the amygdala in fear and anxiety. *Annu. Rev. Neurosci.*, 15: 353-375. (1992b).

DAVIS, M. Anatomic and physiologic substrates of emotion in an animal model. *J.Clin. Neurophysiol.*, 15 (5): 378-387. (1998).

DE OLIVEIRA RM; DEL BEL EA; GUIMARAES FS. Effects of excitatory amino acids and nitric oxide on flight behavior elicited from the dorsolateral periaqueductal gray. *Neurosci Biobehav Rev*, v.25, n.7-8, p.679-85. (2001).

DEL-BEN CM; GRAEFF FG. Panic Disorder: Is the PAG involved? Neural Plasticity. (2009)

DEVANE WA; DYSARZ FA; JOHNSON MR; MELVIN LS; HOWLETT AC. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. Mol Pharmacol 34:604–613(1988)

DEVANE W; HANUS L; BREUER A; PERTWEE RG; STEVENSON LA; GRIFFIN G; GIBSON D; MANDELBAUM A; ETINGER A; MECHOULAM R. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. Science 258:1946–1949 (1992)

DI MARZO V, FONTANA A, CADAS H, SCHINELLI S, CIMINO G, SCHWARTZ JC, PIOMELI D. Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. Nature 372,686-691. (1994)

DSM IV (1994). American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders. Fourth edition (Washington DC, APA Press)

EDWARDS M A; ADAMS DB. Role of midbrain central gray in pain induced defensive boxing of rats. Physiol. Behav.13:113-21(1974)

FERREIRA-NETTO C; BORELLI KG; BRANDÃO ML. Neural segregation of Fos-protein distribution in the brain following freezing and escape behaviors induced by injections of either glutamate or NMDA into the dorsal periaqueductal gray of rats. Brain Res 103: 151-163. (2005).

FERNANDEZ DE MOLINA A; HUNSPERGER RW. Central representation of affective reactions in forebrain and brain stem: electrical stimulation of amygdala, stria terminalis, and adjacent structures. J. Physiol., 145: 251-265, (1959).

FINN DP; JHAVERI MD; BECKETT SR; ROE CH; KENDALL DA; MARSDEN CA. Effects of direct periaqueductal grey administration of a cannabinoid receptor agonist on nociceptive and aversive responses in rats. Neuropharmacology 45: 594–604. (2003)

FINN DP; JHAVERI MD; BECKETT SR; KENDALL DA; MARSDEN CA; CHAPMAN V. Cannabinoids modulate ultrasound-induced aversive responses in rats. Psychopharmacology; 172:41-51. (2004)

FREUND TF; KATONA I; PIOMELLI D. Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol Rev* 83:1017-1066. (2003)

GATLEY SJ; GIFFORD AN; VOLKOW ND. ³I-labeled AM251: a radioiodinated ligand which binds in vivo to mouse brain cannabinoid CB1 receptors. *Eur J Pharmacol* 307:331-338. (1996)

GENTIL V. "The aversive system, 5HT and panic attacks," in *Animal Models of Psychiatric Disorders*. Vol. 1, P. Simon, P. Soubri e, and D. Widlocher, Eds., vol. 1, pp. 142–145, Karger, Basel, Switzerland (1988).

GERDEMAN G, LOVINGER DM. CB1 cannabinoid receptor inhibits synaptic release of glutamate in rat dorsolateral striatum. *J. Neurophysiol.* 85, 468e471(2001)

GOANI Y; MECHOULAM R. Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish. *J Am Chem Soc.*86:1646-1647. (1964).

GOODCHILD AK; DAMPNEY RAL; BANDLER R. A method of evoking physiological responses by stimulation of cell bodies but not axons of passage within localized regions of the central nervous system, *J. Neurosci. Meth.*, 6 351-363. (1982)

GRAEFF FG. Ansiedade. In: Graeff, F.G. & Brand o, M.L. (eds.). *Neurobiologia das doenas mentais*. Fifth edition. Lemos: São Paulo, p. 135-178. (1999).

GRAEFF FG. Human experimental anxiety. *Rev. Psiq. Cl n.* 34(5);251-253, 2007. (2007).

GRAEFF FG; DEL-BEN CM. Neurobiology of panic disorder: from animal models to brain neuroimaging," *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, vol. 32, no. 7, pp. 1326–1335. (2008)

GRAEFF FG. Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviors and related emotions in mammals. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 27: 811-829. (1994).

GRAEFF FG. On serotonin and experimental anxiety. *Psychopharmacology*, 163 (3-4): 467-476. (2002).

GRAEFF FG; ZANGROSSI H. Animal Models of Anxiety Disorders. In: D'haenen, H.; Den Boer, J.A.; Westenberg, H.; Willner, P (eds). Textbook of biological psychiatry Wiley and Sons: London, p. 879-893. (2002).

GRAEFF FG. Serotonin, the periaqueductal gray and panic. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 28 (3): 239-259.(2004).

GRAEFF FG. Brain defense systems and anxiety. In: Burrows, G. D.; Roth, M.; Noyes, J.R.R. (eds). Handbook of anxiety: The Neurobiology of anxiety. Elsevier Science Publishers: Amsterdam, vol.3, p. 307-354. (1990)

GRAY JA; McNAUGHTON N. Anxiolytic action on the behavioural inhibition system implies multiple types of arousal contribute to anxiety. *Journal of Affective Disorders*, 61:161-176. (2000).

GUIMARÃES FS; CAROBREZ AP; DE AGUIAR JC; GRAEFF FG. Anxiolytic effect in the elevated plus-maze of the NMDA receptor antagonist AP7 microinjected into the dorsal periaqueductal gray. *Psychopharmacology*, 103: 91-94. (1991).

GUNDLACH AL. Regional subdivisions in the midbrain periaqueductal gray of the cat revealed by in vitro receptor autoradiography, organization of the midbrain periaqueductal gray matter. In A. Depaulis and R. Bandler (Eds.), *The Midbrain Periaqueductal Gray Matter: Functional, Anatomical and Neurochemical Organization* Plenum Press, New York, pp. 449–464 (1991).

HALLER J; VARGA B; LEDENT C; FREUND TF. Context dependent effects of CB1 cannabinoid gene disruption on anxietylike and social behaviour in mice. *Eur J Neurosci* 19:1906–1912. (2004)

HALPAIN S; WIECZOREK CM; RAINBOW TC. Localization of Iglutamate receptors in rat brain by quantitative autoradiography, *J. Neurosci.*, 9:2247–2258. (1984)

HERKENHAM M; LYNN AB; LITTLE MD; JOHNSON MR; MELVIN LS; DE COSTA BR; RICE KC. Cannabinoid receptor localization in the brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:1932–1936. (1990)

HERKENHAM M, LYNN AB, JOHNSON MR, MELVIN LS, DE COSTA BR, RICE KC. Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: A quantitative in vitro autoradiographic study. *J Neurosci* 11:563–583. (1991)

HESS WR; BRÜGGER M. Das subkortikale Zentrum der affektiven Abwehrreaktion. *Helv. Physiol. Pharmacol. Acta*, 1: 33-52(1943).

HILTON SM; REDFERN WS. A search for brainstem cell groups integrating the defence reaction in the rat, *J. Physiol.*,378: 213-228. (1986)

HOHMANN AG; SUPLITA RL; BOLTON NM; NEELY MH; FEGLEY D; MANGIERI R; KREY JF; WALKER JM; HOLMES PV; CRYSTAL JD; DURANTI A; TONTINI A; MOR M; TARZIA G; PIOMELLI D. An endocannabinoid mechanism for stressinduced analgesia. *Nature.*;435(7045):1108-12. (2005)

HOWLETT AC; FLEMING RM. Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Pharmacology of the response in neuroblastoma cell membranes. *Mol Pharmacol*; 26:532-8. (1984)

HOWLETT AC; BARTH F; BONNER TI; CABRAL G; CASELAS P; DEVANE WA. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev*; 54:161-202. (2002)

HUANG CC, LO SW, HSU KS. Presynaptic mechanisms underlying cannabinoid inhibition of excitatory synaptic transmission in rat striatal neurons.*J. Physiol.* 532, 731e748. (2001)

HUETTNER JE. Kainate receptors and synaptic transmission. *Prog Neurobiol* 70: 387-407. (2003)

HUGHES P, LAWLOR P, DRAGUNOW M. Basal expression of Fos,Fos-related Jun and Krox 24 proteins in rat hippocampus.*Molecular Brain Research* 13,355-357. (1992)

HUNSPERGER RW. Affektreaktionen auf elektrische Reizung im Hirnstamm der Katze. *Helv. Physiol. Acta*,14:70-92 (1956).

JAVITT DC. Glutamate as a therapeutic target in psychiatric disorders. *Mol Psychiatry*, .9, n.11, p.984-97, 979. (2004)

KATHURIA S; GAETANI S; FEGLEY D. Modulation of anxiety through blockade of anandamide hydrolysis. *Nature Med* 9:76–81(2003).

KAWAHARA H; DREW GM; CHRISTIE MJ; VAUGHAN CW. Inhibition of fatty acid amide hydrolase unmasks CB(1) receptor and TRPV1 channel-mediated modulation of glutamatergic synaptic transmission in midbrain periaqueductal grey. *Br J Pharmacol* 163:1214-22. (2011).

KOVÁCS KJ, SAWCHENKO PE. Sequence of stress induced alterations in indices of synaptic and transcriptional activation in parvocellular neurosecretory neurons. *Journal of Neuroscience* 16,262-273. (1996)

KOVÁCS KJ. c-Fos as a transcription factor: a stressful (re)view from a functional map. *Neurochem Int.* Oct;33(4):287-97 (1998)

KRIEGER JE; GRAEFF FG. Defensive behavior and hypertension induced by glutamate in the midbrain central gray of the rat, *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 18 61-67. (1985)

LEDOUX JE, IWATA J, PEARL D; REIS DJ. Different projections of the central amygdaloid nucleus mediate behavioral and autonomic correlates of fear, *J. Neurosci.*, 8 2517-2529. (1988)

LEGGETT JD, ASPLEY S, BECKETT SRG, D'ATONA AM, KENDALL DA, KENDALL DA.. Oleamide is a selective endogenous agonist of rat and human CB1 cannabinoid receptors. *Br J Pharmacol* 141:253–262. (2004)

LOVICK TA. Panic disorder-a malfunction of multiple transmitter control systems within the midbrain periaqueductal gray matter? *Neuroscientist* 6, 48–59(2000).

LISBOA SF; RESSTEL LB; AGUIAR DC; GUIMARÃES FS Activation of cannabinoid CB1 receptors in the dorsolateral periaqueductal gray induces anxiolytic effects in rats submitted to the Vogel conflict test. *Eur J Pharmacol* 593: 73–78. (2008)

MAIONE S; MARABESE I; LEYVA J; PALAZZO E; DE NOVELLIS V; ROSSI F. Characterization of mGluRs which modulate nociception in the PAG of the mouse. *Neuropharmacology* 37:1475– 1483(1998)

MARSICANO G; LUTZ B Neuromodulatory functions of the endocannabinoid system. *J Endocrinol Invest* 29(suppl 3):27-43.(2006)

MARTIN BR; COMPTON DR; THOMAS BF; PRESCOTT WR; LITTLE PJ; RAZDAN RK; JOHNSON MR; MELVIN LS; MECHOULAM R; WARD SJ Behavioral, biochemical, and molecular modeling evaluations of cannabinoid analogs. *Pharmacol Biochem Behav* 40:471–478. (1991)

MARTIN M; LEDENT C; PARMENTIER M; MALDONADO R; VALVERDE O. Involvement of CB1 cannabinoid receptors in emotional behaviour. *Psychopharmacology (Berl)* 159:379–387. (2001)

MATSUDA LA; LOLAIT SJ; BROWNSTEIN MJ; YOUNG AC; BONNER TI.. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 346:561–564(1990)

MCGREGOR IS, DASTUR FN, MCLELLAN RA, BROWN RE. Cannabinoid modulation of rat pup ultrasonic vocalizations. *European Journal of Pharmacology* 313, 43–49. (1996)

MECHOULAM R; BEN-SHABAT S; HANUS L; LIGUMSKY M; KAMINSKI NE; SCHATZ AR. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol.* 50:83-90. (1995)

MOLCHANOV ML; GUIMARÃES FS. Defense reaction induced by a metabotropic glutamate receptor agonist microinjected into the dorsal periaqueductal gray of rats. *Braz J Med Biol Res* 32:1533–7. (1999)

MOLCHANOV ML; GUIMARÃES FS. Anxiolytic-like effect of AP7 injected into the dorsolateral or ventrolateral columns of the periaqueductal gray of rats. *Psychopharmacology (Berl)* 160:30-38. (2002)

MORAES CLK; BERTOGLIO LJ; CAROBREZ AP. Interplay between glutamate and serotonin within the dorsal periaqueductal gray modulates anxiety-related behavior of rats exposed to the elevated plus-maze. *Behavioural Brain Research* vol.194,no. 2, pp. 181–186,(2008).

MOREIRA FA; AGUIAR DC; GUIMARÃES FS. Anxiolytic-like effect of cannabinoids injected into the rat dorsolateral periaqueductal gray. *Neuropharmacology* 52:958–65(2007)

MOREIRA FA; KAISER N; MONORY K; 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*54(1):141-50(2008)

MOREIRA FA; AGUIAR DC; CAMPOS AC; LISBOA SF; TERZIAN AL; RESSTEL LB; GUIMARÃES FS. Antiaversive Effects of Cannabinoids: Is the Periaqueductal Gray Involved? *Neural plast* (2009)

MOREIRA FA, AGUIAR DC, RESSTEL LB, LISBOA SF, CAMPOS AC, GOMES FV, GUIMARÃES FS. Neuroanatomical substrates involved in cannabinoid modulation of defensive responses. *J Psychopharmacol.* Jan;26(1):40-55. (2012)

MORGAN JI; CURRAN T. Stimulus transcription coupling in neurons: role of cellular immediate-early genes. *Trends Neuroscience*,v.12, p.459-462 (1989).

MUNRO S; THOMAS KL; ABU-SHAAR M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 365: 61–65(1993)

NAIDU PS; S A VARVEL; K AHN; BF CRAVATT; BR MARTIN; AH LICHTMAN, "Evaluation of fatty acid amide hydrolase inhibition in murine models of emotionality," *Psychopharmacology*, vol. 192, no. 1, pp. 61–70 (2007).

NAKANISHI S. Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science*, v.258, n.5082, p.597-603.(1992).

NASHOLD BS; WILSON WP; SLAUGHTER DG. Sensations evoked by stimulation in the midbrain of man. *J. Neurosurg.*, 30 (1): 14-24(1969).

NAVARRO M; HERNANDEZ E; MUNOZ RM; DEL ARCO I; VILLANUA MA; CARRERA MR; RODRIGUEZ DE FONSECA F. Acute administration of the CB1 cannabinoid receptor antagonist SR141716A induces anxiety-like responses in the rat. *Neuroreport* 8:491–496 (1997)

ONAIVI ES, ISHIGURO H, GU S, LIU QR. CNS effects of CB2 cannabinoid receptors: beyond neuro-immuno-cannabinoid activity. *J. Psychopharmacol.* Jan;26(1):92-103 (2012)

PALAZZO E; MARABESE I; DE NOVELLIS V; OLIVA P; ROSSI F; BERRINO L; ROSSI F; MAIONE S. Metabotropic and NMDA glutamate receptors participate in the cannabinoid-induced antinociception. *Neuropharmacology* 40:319–326 (2001)

PANKSEPP, J. The psychoneurology of fear: evolutionary perspectives and the role of animal models in understanding human anxiety. In: Burrows, G. D., Roth, M., Noyes Jr. R. (eds). *Handbook of anxiety, vol.3: The Neurobiology of anxiety*. Elsevier Science Publishers: Amsterdam, p.3-58(1990).

PATEL S; HILLARD CJ. Pharmacological evaluation of cannabinoid receptor ligands in amouse model of anxiety: further evidence for an anxiolytic role for endogenous cannabinoid signaling. *J Pharmacol Exp Ther* 318:304–311(2006)

PAXINOS G; WATSON C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. New York: Academic Press(1997)

PERTWEE RG; HOWLETT AC; ABOOD ME; ALEXANDER SPH; DI MARZO V; ELPHICK MR; GREASLEY PJ; HANSEN HS; KUNOS G; MACKIE K, MECHOULAM R; ROSS RA. International Union of Basic and Clinical Pharmacology.LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: Beyond CB1 and CB2. *Pharmacological Reviews* 62:588-631(2010)

PERTWEE RG. Ligands that target cannabinoid receptors in the brain:from THC to anandamide and beyond. *Addict Biol* 13:147-159(2008)

PERTWEE R. G. Pharmacology of cannabinoid receptor ligands.*Curr Med Chem*; 6: 635–664(1999)

PERTWEE RG. Cannabinoid receptor ligands: clinical and neuropharmacological considerations, relevant to future drug discovery and development. *Expert Opin Invest Drugs*; 9:1553–1571(2000)

PIN JP; DUVOISIN R. The metabotropic glutamate receptors: structure and functions, *Neuropharmacology*, 34 1–26(1995)

PIOMELLI D. The molecular logic of endocannabinoid signalling.*Nat Rev Neurosci*. Nov;4(11):873-84(2003)

PORTER AC; SAUER JM; KNIERMANMD; BECKERGW; BERNA MJ; BAO J; NOMIKOS GG; CARTER P; BYMASTER FP; LEESE AB; FELDER CC. Characterization of a novel endocannabinoid, Virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 301:1020–1024(2002)

RESSTEL LB; SOUZA RF; GUIMARÃES FS. Anxiolytic-like effects induced by medial prefrontal cortex inhibition in rats submitted to the Vogel conflict test. *Physiol Behav* 93: 200–205(2008)

RIEBE CJ; WOTJAK CT. Endocannabinoids and stress. *Stress*; 14(4):384-397(2011)

RINALDI-CARMONA M; BARTH F; HÉAULME M.SR141716, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. *FEBS Lett* 350:240-244(1994)

ROSS RA Anandamide and vanilloid TRPV1 receptors. *Br J Pharmacol* 140:790-801(2003)

RUBINO T; REALINI N; CASTIGLIONI C; GUIDALI C; VIGANÓ D; MARRAS E; PETROSINO S; PERLETTI G; MACCARRONE M; DI MARZO V; PAROLARO D. Role in anxiety behavior of the endocannabinoid system in the prefrontal cortex. *Cereb Cortex*. Jun;18(6):1292-301(2008)

SANDNER G, DI SCALA G, ROCHA B, ANGST MJ. C-fos immunoreactivity in the brain following unilateral electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray in freely moving rats. *Brain Res*. Feb 28;573(2):276-83. PubMed PMID: 1504765. (1992)

SCHENBERG LC; BITTENCOURT AS; SUDRE EC; VARGAS LC. Modeling panic attacks. *Neurosci Biobehav Rev*, v.25, n.7-8, p.647-59 (2001)

SCHUTZ, M.T., DE AGUIAR, J.C., GRAEFF, F.G.,. Anti-aversive role of serotonin in the dorsal periaqueductal grey matter. *Psychopharmacology* 85, 340–345(1985)

SHIGERI Y; SEAL RP; SHIMAMOTO K. Molecular pharmacology of glutamate receptors. *Brain Res Rev* 45: 267-271(2004)

SILVEIRA MC, GRAEFF FG, SANDNER G. Regional distribution of Fos-like immunoreactivity in the rat brain after exposure to fear-inducing stimuli. *Braz J Med Biol Res*. Apr;27(4):1077-81. (1994)

SINGEWALD N; SHARP T. Neuroanatomical targets of anxiogenic drugs in the hindbrain as revealed by Fos immunocytochemistry. *Neuroscience*;98(4):759-70(2000).

SKULTETY F.M. Stimulation of periaqueductal gray and hypothalamus. *Arch.Neurol.*, 8:608-20(1963)

STAROWICZ K; NIGAM S; DI MARZO V. Biochemistry and pharmacology of endovanilloids. *Pharmacol Ther* 114:13–33 (2007)

STELLA N; SCHWEITZER P; PIOMELLI D. A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature* 388: 773–778. (1997)

SUGIURA T; KONDO S; SUKAGAWA A; NAKANE S; SHINODA A; ITOH K; YAMASHITA A.; WAKU K.. 2-Arachidonoylglycerol: A possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun* 215:89–97 (1995)

TERZIAN AL; AGUIAR DC; GUIMARÃES FS; MOREIRA FA. Modulation of anxiety-like behavior by Transient Receptor Potential Vanilloid Type 1 (TRPV1) channels located in the dorsolateral periaqueductal gray. *Eur Neuropsychopharmacol* 3: 188-195. (2009)

VAN DER STELT M; TREVISANI M; VELLANI V; DE PETROCELIS L; MORIELLO AS; CAMPI B; MCNAUGHTON P; GEPPETTI P; DI MARZO V. Anandamide acts as an intracellular messenger amplifying Ca²⁺ influx via TRPV1 channels. *EMBO J* 24:3517-3518. (2005)

VAN DER STELT M; DI MARZO V. Endovanilloids. Putative endogenous ligands of transient receptor potential vanilloid 1 channels. *Eur J Biochem* 271: 1827-1834. (2004)

VAN SICKLE MD; DUNCAN M; KINGSLEY PJ; MOUIHATE A; URBANI P; MACKIE K; STELLA N; MAKRIYANNIS A; PIOMELLI D; DAVISON JS; MARNETT LJ; DI MARZO V; PITTMAN QJ; PATEL KD; SHARKEY KA. Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science* 310:329–332. (2005)

VARGAS LC; SCHENBERG LC. Long-term effects of clomipramine and fluoxetine on dorsal periaqueductal grey-evoked innate defensive behaviours of the rat. *Psychopharmacology* 155: 260-268.(2001)

VAUGHAN CW; CONNOR M, BAGLEY EE; CHRISTIE M J. Actions of cannabinoids on membrane properties and synaptic transmission in rat periaqueductal gray neurons in vitro. *Molecular Pharmacology*, vol. 57, no. 2, pp. 288–295(2000).

VIANNA DM, BORELLI KG, FERREIRA-NETTO C, MACEDO CE, BRANDÃO ML. Fos-like immunoreactive neurons following electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray at freezing and escape thresholds. *Brain Res Bull.* Dec 30;62(3):179-89. (2003)

WANG, SJ. Cannabinoid CB1 receptor-mediated inhibition of glutamate release from rat hippocampal synaptosomes. *Eur. J. Pharmacol.* 469, 47e55. (2003)

WALKER JM; HUANG SM; STRANGMAN NM; TSOU K; SANUDO-PENA MC. Pain modulation by release of the endogenous cannabinoid anandamide. *Proc Natl Acad of Sci USA* 96:12198–12203. (1999)

WATKINS J; COLLINGRIDGE G. Phenylglycine derivatives as antagonists of metabotropic glutamate receptors. *Trends Pharmacol Sci* 15:333–1342(1994)

WILSON RI; NICOLL RA. Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. *Nature*. Mar 29;410(6828):588-92. Erratum in: *Nature* 2001 Jun 21;411(6840):974(2001)

YOUNG RF. Brain and spinal stimulation: how and to whom!," *Clinical Neurosurgery*, vol. 35, pp. 429–447(1989)

ZANGROSSI Jr H; VIANA MB; ZANOVELI J; BUENO CH; NOGUEIRA RL; GRAEFF FG. Serotonergic regulation of inhibitory avoidance and oneway escape in the elevated T-maze. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 25 (7-8): 637-645, (2001)

ZHANG SP; BANDLER R; CARRIVE P. Flight and immobility evoked by excitatory aminoacid microinjection within distinct parts of the subtentorial midbrain periaqueductal gray of the cat. *Brain Res* 520: 73-82. (1990)

