

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

**ANA FLÁVIA SANTOS ALMEIDA**

**Participação do endocanabinoide  
2-araquidonoilglicerol (2-AG) nas respostas defensivas  
mediadas pela substância cinzenta periaquedutal  
dorsolateral e pelo córtex pré-frontal ventromedial.**

BELO HORIZONTE

2015

**ANA FLÁVIA SANTOS ALMEIDA**

**Participação do endocanabinoide  
2-araquidonoilglicerol (2-AG) nas respostas defensivas  
mediadas pela substância cinzenta periaquedutal  
dorsolateral e pelo córtex pré-frontal ventromedial.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Ciências Biológicas Área de Concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Daniele Cristina de Aguiar

BELO HORIZONTE  
2015

**“Participação do endocanabinoide 2-araquidonoilglicerol (2-AG) nas respostas defensivas mediadas pela substância cinzenta periaquedutal dorsolateral e pelo córtex pré-frontal ventromedial”**

**ANA FLÁVIA SANTOS ALMEIDA**

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia 25 de fevereiro de 2015, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

**PROF. DR. FRANCISCO SILVEIRA GUIMARAES**  
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**PROFA. DR<sup>a</sup>. GRACE SCHENATTO PEREIRA MORAES**  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**PROF. DR. JOÃO VINICIUS SALGADO**  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**PROF. DR. LEANDRO JOSÉ BERTOGLIO**  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

**PROF. DR. FABRÍCIO DE ARAUJO MOREIRA**  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
CO-ORIENTADOR

**PROFA. DR<sup>a</sup>. DANIELE CRISTINA DE AGUIAR**  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ORIENTADORA

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

**Belo Horizonte, 25 de fevereiro de 2015**

Dedicatória

***Aos meus pais, Afonso e Edna,  
As minhas irmãs Tereza e Isabela,  
As minhas sobrinhas, Ana Laura e Marina...***

*Olhem aonde chegamos... Não foi fácil chegar até aqui.  
Tantas vezes Nossa Senhora passou na frente.  
A presença constante em minha vida como fiel torcida,  
As palavras de força e amparo foram imprescindíveis.  
Eu não existo sem vocês. Amo-os hoje e sempre.*

**"Se a meta principal de um capitão fosse preservar seu barco, ele o conservaria no porto para sempre."**

São Tomás de Aquino

## AGRADECIMENTOS

À **Deus e a Nossa Senhora**, por nunca desistirem de mim, por serem meu sustento e lealdade.

A minha eterna gratidão a você professora **Daniele Aguiar**, ou melhor... Dani, que, desde o primeiro encontro se preocupou com meu crescimento pessoal e profissional. Sou sinceramente grata por todos os ensinamentos de vida... Muito obrigada.

Ao meu co-orientador professor **Fabício Moreira** pelas valiosas colaborações e incessantes ensinamentos.

A **banca examinadora**, pela disponibilidade e atenção dispensada na leitura deste trabalho.

Aos professores do departamento de Farmacologia, Fisiologia e Bioquímica, **Thiago Romero, Antônio Carlos, Maria José Campagnole e Fabíola Ribeiro** pelas colaborações.

Aos professores, **Gareth Hathway e Victoria Chapman**, e aos colegas, **Pete Gowler, James Burston, Charlie Kwok e Ian Devonshire**, da Universidade de Nottingham, pela oportunidade oferecida e valiosos ensinamentos durante o doutorado sanduíche na Universidade de Nottingham na Inglaterra.

Aos amigos do Laboratório de Neuropsicofarmacologia - **Rita Oliveira, Thércia Guedes, Jivago Ropke, Júlia Gomes, Juliana Bastos, Luara Batista, Pedro Gobira, Luciano Vilela, Ana Cristina Oliveira e Rafael Lima**, por todos os momentos e ensinamentos compartilhados.

Aos amigos da UFMG, **Paulo Lima, Isabel Vieira, Rosária Dias, Carla Santos, Ana Luísa Oliveira, Webster Pimenta, Clarice Veloso e Renata Mendes** pela oportunidade de conhecê-los e admirá-los... Acima de tudo, obrigada pela sabedoria adquirida e compartilhada. Sou eternamente grata.

Aos meus amigos-irmãos, **Alline Cristina Campos, Lucas Kangussu, Joel Flausino, Luciana Andrade, Yara Alvarenga, Juliana Nayara, Tereza Alves** e **Paulo Ramos** por sempre me ouvirem, me transmitirem força e coragem. Obrigada por serem exemplos de amizade, bondade, caridade, doação e fortaleza... Vocês são muito especiais!

Ao **Phelipe Diniz**, obrigada por estar sempre presente com seu cuidado, inteligência e carinho.

A **Nina Douglass, Peter, Guiga, Helene Fachim** e **Fabício Sanchez** por me adotarem de forma tão carinhosa na Inglaterra.

A minha família **Santos Almeida** por, a todo o momento, acreditarem em mim.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia - **Rinaldo**, por cuidar com tanto zelo do biotério e pelas inesquecíveis risadas, ao **Jorge**, pelos seus valiosos ajeitos técnicos, a **Cíntia** e **Nilda**, pelo excelente atendimento na secretaria.

A **CAPES, FAPEMIG** (APQ-01363-12) e **CNPq**, pelo apoio financeiro.

Muito obrigada!

Ana Flávia Santos Almeida

## RESUMO

O sistema canabinoide modula comportamentos defensivos mediados pela substância cinzenta periaquedutal dorsolateral (SCPdl) e pelo córtex pré-frontal ventromedial (CPFvm). Dentre os diversos canabinoides descritos, destacam-se a anandamida (AEA) e o 2-araquidonoilglicerol (2-AG) que exercem seus efeitos via ativação de receptores canabinoides do tipo 1 (CB1r) e do tipo 2 (CB2r). Embora a participação da AEA em respostas relacionadas a ansiedade esteja bastante consolidada na literatura, poucos trabalhos descrevem o envolvimento do 2-AG nessas respostas. Assim, o primeiro objetivo desse estudo foi verificar a hipótese de que a facilitação da sinalização do 2-AG em regiões que modulam o comportamento de defesa como a SCPdl e o CPFvm, promoverá efeitos ansiolíticos. Inicialmente verificou-se se a injeção intra-SCPdl ou intra-CPFvm do 2-AG ou do URB602 (inibidor da monoacilglicerol lipase, enzima responsável pela hidrólise do 2-AG) promoveu efeito do tipo ansiolítico e anti-aversivo nos modelos animais do labirinto em cruz elevado (LCE) e de estimulação química da SCPdl, verificando também qual receptor canabinoide estaria envolvido na modulação dessas respostas. Adicionalmente, alguns estudos sugerem que a ativação de receptores glutamatérgicos metabotrópicos do tipo 5 (mGluR5) é necessária para a síntese do 2-AG e conseqüentemente, para os efeitos desencadeados por esse endocanabinoide. Para verificar essa hipótese, nosso trabalho avaliou se o pré-tratamento com doses inefetivas com MPEP (antagonista de mGluR5) seria capaz de inibir a resposta tipo-ansiolítica promovida pelo URB602 (intra-SCPdl ou intra-CPFvm) no LCE. Através da imunofluorescência demonstramos que a enzima envolvida na síntese do 2-AG (diacilglicerol lipase) é co-expressa com receptores mGluR5 na SCPdl e no CPFvm. Em conjunto nossos resultados sugerem que a sinalização mediada pelo 2-AG também é importante na modulação de respostas defensivas via ativação tanto de CB1 quanto de CB2. Adicionalmente, nossos dados farmacológicos e da imunofluorescência na SCPdl e CPFvm reforçam a hipótese de que a via mGluR5-DGL é importante para a formação do 2-AG.

## ABSTRACT

The cannabinoid system modulates defensive behaviors mediated by the dorsolateral periaqueductal gray (dlPAG) and the ventromedial prefrontal cortex (vmPFC). Among the various cannabinoids described, anandamide (AEA) and 2-arachidonoylglycerol (2-AG), which exert their effects through activation cannabinoid receptor type 1 (CB1r) and type 2 (CB2r). Although AEA participation in responses related to anxiety disorders is very well described, little is known concerning the role of 2-AG in these responses. Thus, the first aim of this study was verify if the augmentation of 2AG signaling in brain regions responsible for defensive reactions, such as the dlPAG and vmPFC, would induce anxiolytic-like effects. For this, we verified if intra-dlPAG or intra-vmPFC injection of 2-AG or URB602 (monoacylglycerol lipase inhibitor, enzyme responsible for 2-AG hydrolysis) would induce anxiolytic-like effect in the EPM test or anti-aversive effect after chemical stimulation of dlPAG. We also verified the type of cannabinoid receptor involved in such effects. In addition, some studies have suggested that activation of metabotropic glutamate receptor type 5 (mGluR5) would be necessary for the synthesis of 2-AG and consequently, to the effects triggered by this endocannabinoid. Thus, our study also verified if the pretreatment with mGluR5 antagonist would inhibit the anxiolytic-like response promoted by URB602 (into-dlPAG or into-vmPFC) in the EPM. We also performed immunofluorescence assay that showed co-expression of diacylglycerol lipase (the enzyme involved in the synthesis of 2-AG) and the mGluR5 in dlPAG and vmPFC. Altogether, our results showed a role for 2-AG in defensive reactions similar to AEA. Their actions are mediated by both CB1 and CB2 receptors. Additionally, our pharmacological and immunofluorescence data of dlPAG and vmPFC reinforce the hypothesis of 2-AG synthesis is dependent mGluR5-DGL pathway.

## LISTA DE ABREVIATURAS

2-AG: 2-araquidonoilglicerol  
AEA: anandamida  
Ca<sup>2+</sup>: cálcio  
rCB1: receptores canabinoides do tipo 1  
rCB2: receptores canabinoides do tipo 2  
CPF: córtex pré-frontal  
CPFm: córtex pré-frontal medial  
CPFvm: córtex pré-frontal ventromedial  
DLH: ácido D,L-homocisteico  
DGL: diacilglicerol lipase  
DMSO: dimetilsulfóxido  
DSI: despolarização induzida pela supressão da inibição  
Δ<sup>9</sup>-THC: Δ<sup>9</sup>-tetrahydrocannabinol  
FAAH: hidrolase de amidas de ácido graxo  
GABA: ácido gamma amino butírico  
iGlu: receptores ionotrópicos do glutamato  
IPSC: correntes inibitórias pós-sinápticas  
K<sup>+</sup>: potássio  
LCE: labirinto em cruz elevado  
LTE: labirinto em T elevado  
LTD: depressão em longo prazo  
mGluR: receptores metabotrópicos do glutamato  
mGluR1: receptores metabotrópicos do glutamato tipo 1  
mGluR5: receptores metabotrópicos do glutamato tipo 5  
MGL: monoacilglicerol lipase  
n: número de animais por grupo  
NO: óxido nítrico  
NMDA: N-metil-D-aspartato  
PLC: fosfolipase C  
SCP: substância cinzenta periaquedutal  
SCPdl: Substância cinzenta periaquedutal dorsolateral  
SNC: sistema nervoso central

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Via de sinalização do 2-AG.

**Figura 2:** Representação esquemática dos protocolos experimentais.

**Figura 3:** Localização de sítios de injeção (SCPdl) em diagramas modificados do Atlas de Paxinos e Watson (1997).

**Figura 4:** Efeito do 2-AG (5, 50 ou 500 pmol/0.2µL) intra-SCPdl em ratos submetidos ao LCE.

**Figura 5:** Efeito do pré-tratamento de AM251 (100 pmol) seguido pelo 2-AG (50 pmol) intra-SCPdl em ratos submetidos ao LCE.

**Figura 6:** Efeito do AM630 (10, 100 ou 1000 pmol/0.2µL) intra-SCPdl em ratos submetidos ao LCE.

**Figura 7:** Efeito do pré-tratamento de AM630 (1000 pmol) seguido pelo 2-AG (50 pmol) intra-SCPdl em ratos submetidos ao LCE.

**Figura 8:** Efeito do URB602 (30, 100 ou 300 pmol/0.2 µL) intra-SCPdl em ratos submetidos ao LCE.

**Figura 9:** Efeito do AM251 (100 pmol) seguido por URB602 (100 pmol) intra-SCPdl em ratos submetidos ao LCE.

**Figura 10:** Efeito do AM630 (1000 pmol) seguido por URB602 (100 pmol) intra-SCPdl em ratos submetidos ao LCE.

**Figura 11:** Efeito do MPEP (1 ou 10 pmol/0.2µL) intra-SCPdl em ratos submetidos ao LCE.

**Figura 12:** Efeito do MPEP (10 pmol) seguido por URB602 (100 pmol) intra-SCPdl em ratos submetidos ao LCE.

**Figura 13:** Efeito do 2-AG (5, 50 ou 500 pmol/0.2 µL) na reação de fuga promovida pela injeção de NMDA (1 nmol/0.2µL) intra-SCPdl em ratos expostos a caixa de observação.

**Figura 14:** Efeito do URB602 (30, 100 ou 300 pmol/0.2µL) sobre a reação de fuga promovida pela injeção de NMDA (1 nmol/0.2µL) intra-SCPdl em ratos expostos a caixa de observação.

**Figura 15:** Efeito promovido pelo URB602 (100 pmol/0.2µL) e NMDA (1nmol/0.2µL, intra-SCPdl) sobre o número de células CB1 e c-Fos positivas em ratos expostos a caixa de observação.

**Figura 16:** Efeito promovido pelo tratamento combinado do URB602 (30 pmol/0.2µL - dose não efetiva) e 2-AG (50 pmol/0.2µL - dose não efetiva) sobre as respostas de fuga promovidas pela injeção de NMDA (1 nmol/0.2µL) intra-SCPdl em ratos expostos a caixa de observação.

**Figura 17:** Localização de sítios de injeção (CPFvm) em diagramas modificados do Atlas de Paxinos e Watson (1997).

**Figura 18:** Efeito do 2-AG (5, 50 ou 500 pmol/0.2µL) intra-CPFvm em ratos submetidos ao LCE.

**Figura 19:** Efeito do pré-tratamento com AM251 (100 pmol) seguido por 2-AG (500 pmol) intra-CPFvm em ratos submetidos ao LCE.

**Figura 20:** Efeito do pré-tratamento com AM630 (1000 pmol) seguido por 2-AG (500 pmol) intra-CPFvm em ratos submetidos ao LCE.

**Figura 21:** Efeito do URB602 (30, 100 ou 300 pmol/0.2 µL) intra-CPFvm em ratos submetidos ao LCE.

**Figura 22:** Efeito do AM251 (100 pmol) seguido por URB602 (300 pmol) intra-CPFvm em ratos submetidos ao LCE.

**Figura 23:** Efeito do AM630 (1000 pmol) seguido por URB602 (300 pmol) intra-CPFvm em ratos submetidos ao LCE.

**Figura 24:** Efeito do MPEP (10 pmol) seguido por URB602 (300 pmol) intra-CPFvm em ratos submetidos ao LCE.

**Figura 25:** Expressão e co-localização da enzima DGL-α e mGluR5 na SCPdl e CPFvm.

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
1. Respostas defensivas.....	14
2. Substratos neurais envolvidos no comportamento defensivo.....	15
2.1. Substância cinzenta periaquedutal.....	15
2.2. Córtex pré-frontal.....	16
3. Neurotransmissores envolvidos no comportamento defensivo.....	18
3.1. Sistema glutamatérgico.....	18
3.2. Sistema endocanabinoide.....	20
3.3. Interação entre a neurotransmissão canabinoide e glutamatérgica.....	25
<b>OBJETIVOS</b> .....	27
1. Objetivo geral.....	28
2. Objetivos específicos.....	28
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	29
1. Animais.....	30
2. Protocolos experimentais.....	30
2.1. Cirurgia estereotáxica.....	30
2.2. Drogas.....	30
2.3. Injeção.....	31
2.4. Testes comportamentais.....	31
2.5. Histologia.....	32
2.6. Imunofluorescência.....	33
3. Delineamento experimental.....	34
4. Análise estatística.....	40
<b>RESULTADOS SCPdl</b> .....	41
<b>RESULTADOS CPFvm</b> .....	68
<b>DISCUSSÃO</b> .....	85
<b>CONCLUSÃO</b> .....	96
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	98
<b>ANEXO</b> .....	111

---

## *INTRODUÇÃO*

## 1. Respostas defensivas

O comportamento defensivo consiste no conjunto de respostas que os animais apresentam frente a estímulos e situações que envolvem ameaça ou perigo. Estes comportamentos são altamente conservados entre os mamíferos e rapidamente condicionados a situações ameaçadoras. O tipo de resposta defensiva está correlacionado com as características do estímulo ameaçador (real *versus* potencial) e à situação no qual este é encontrado (Blanchard and Blanchard 1988).

Em seu livro, “The Expression of Emotions in Man and Animals”, Charles Darwin (1872) descreveu a semelhança entre o comportamento dos humanos e dos demais animais na expressão das emoções de natureza aversiva. Seu trabalho indicava que o estudo do comportamento de outros animais era o caminho para a compreensão das emoções no homem. A partir de então a abordagem evolutiva proposta por Darwin possibilitou o desenvolvimento de diversas teorias sobre a função e a importância que as emoções desempenham nas diferentes espécies.

Estudos de Blanchard e Blanchard (1988) sugerem que o padrão de resposta de defesa animal é determinado pela distância entre a ameaça e o animal, sendo que quando o animal encontra-se distante do predador, os comportamentos de avaliação de risco e esquiva são expressos, e, conforme essa distância diminui, a reação de defesa passa a caracterizar-se por comportamentos de luta ou fuga (Blanchard, Sakai et al. 1993). Dessa maneira, sugere-se que o estado de ansiedade, ou ainda o tipo do comportamento defensivo, está possivelmente relacionado com presença mais distal ou proximal do predador (Blanchard, Sakai et al. 1993; Faria, Muscara et al. 1997; Maren 2007).

Os comportamentos defensivos variam desde avaliação de risco, esquiva, imobilidade, luta, fuga e ativação autonômica, e são expressos em decorrência da neurotransmissão mediada pelo sistema encefálico de defesa, constituído por hipotálamo, amígdala, córtex pré-frontal e a substância cinzenta periaquedutal [SCP, (Graeff 1981; Brandao, Cardoso et al. 1994; Canteras, Ribeiro-Barbosa et al. 2001; Carobrez, Teixeira et al. 2001; Bergink, van Megen et al. 2004; Guimaraes, Beijamini et al. 2005)].

## **2. Substratos neurais envolvidos no comportamento defensivo**

### 2.1 Substância Cinzenta Periaquedutal

A substância cinzenta periaquedutal (SCP) refere-se à região mesencefálica que circunda o aqueduto cerebral (Sylvius). Essa região é dividida anatômico-funcionalmente em quatro colunas que se estendem ao longo do eixo rostro-caudal em: dorsomedial, lateral, ventrolateral e dorsolateral [SCPdl (Bandler, Keay et al. 2000)].

Devido às conexões recíprocas entre a SCP e o sistema límbico, essa região foi postulada como pertencente à chamada área límbica mesencefálica (Nauta 1958), e considerada uma das estruturas chaves na elaboração de respostas defensivas ativas ou passivas (Carrive 1993; Bandler, Keay et al. 2000). Especificamente, a porção dorsolateral da SCP possui conexões intrínsecas com outras subdivisões da SCP e essa interconectividade diversa mantém a SCP dorsal em conexão com diferentes estruturas relacionadas ao sistema motor, sensorial, límbico e autonômico (Beitz 1982), o que provavelmente possibilita o envolvimento da SCPdl na mediação do comportamento defensivo.

Sugere-se que o comportamento ativo mediado pela SCP dorsal provavelmente é impulsionado por estressores que tem um forte componente psicológico (Floyd, Price et al. 2000), o que desencadeia preferencialmente uma reação comportamental ativa - luta ou fuga. Em relação à porção lateral da SCP, essa é ativada por estressores físicos - escapáveis, desencadeando a mesma resposta ativa, no entanto, a porção ventrolateral é ativada por estressores físicos e psicológicos - inescapáveis que desencadeiam uma resposta comportamental passiva - imobilidade e quietude (Bandler, Keay et al. 2000; Keay and Bandler 2001).

Nesse sentido, trabalhos anteriores demonstraram que alguns pacientes, submetidos à estimulação elétrica da SCP dorsal relatavam sensações subjetivas de medo e perigo iminente, similares aos relatados por pacientes em quadros de ataques espontâneos de pânico (NASHOLD, WILSON et al. 1969). De forma análoga, ratos e camundongos submetidos à estimulação da SCP dorsal apresentam comportamentos semelhantes (Schenberg, De Aguiar et al.

1983; Krieger and Graeff 1985), como corrida e pulos, antecidos e seguidos por momentos de imobilidade (Schenberg, Bittencourt et al. 2001). Assim, devido à semelhança entre as reações humanas e animais, a estimulação da SCP dorsal em animais é proposta como um modelo experimental de ataques de pânico (Deakin and Graeff 1991; Lovick 1993).

Ainda estudos que utilizam a técnica de imunohistoquímica para a proteína Fos, uma proteína transcrita a partir do gene de expressão imediata c-Fos e amplamente utilizada como ferramenta para mapeamento funcional de neurônios (Morgan and Curran 1989; Chaudhuri 1997), mostraram o aumento da expressão da proteína na SCP, especialmente na coluna dorsal da SCP em situações de perigo iminente, como por exemplo, em ratos expostos ao predador (Canteras and Goto 1999; Dielenberg, Hunt et al. 2001; McGregor, Schrama et al. 2002; Beijamini and Guimaraes 2006; Aguiar, Almeida-Santos et al. 2014). Além disso, a lesão dessa região reduziu as respostas defensivas promovidas pelo odor do gato (Dielenberg, Leman et al. 2004). Nesse sentido, pode-se dizer que a SCP constitui um importante substrato neural na coordenação de respostas relacionadas à aversão, estresse e ansiedade (Behbehani 1995).

## 2.2. Córtex pré-frontal

Assim como a SCP, o córtex pré-frontal (CPF) desempenha um importante papel no controle de respostas autonômicas e comportamentais observadas durante reações de defesa (Abbruzzese, Ferri et al. 1995; Vertes 2006; Bishop 2007; Aguiar, Terzian et al. 2009).

Anatomicamente, o CPF recebe projeções de áreas corticais sensoriais, motoras e límbicas (Uylings and van Eden 1990) sendo considerado um centro capaz de regular diversas funções, tais como memória, atenção e percepção (Leonard 1972, Dalley, Cardinal et al. 2014). O CPF de roedores divide-se em duas grandes regiões: lateral e medial [CPFm (Leonard 1972; Groenewegen 1988; Sesack, Deutch et al. 1989)]. O CPFm, por sua vez, é constituído pela porção dorsal (formado pela área pré-central e anterior cingulado) e ventral [constituído pela área medial orbital, pré-límbico (PL) e infra-límbico (IL), sendo

essas duas últimas áreas conjuntas denominadas de CPF ventromedial [CPFvm (Heidbreder and Groenewegen 2003; Dalley, Cardinal et al. 2004)].

Enquanto a região dorsal do CPFm apresenta maiores conexões com áreas corticais sensoriais e motoras (Room, Russchen et al. 1985; Heidbreder and Groenewegen 2003), estudos neuroanatômicos demonstraram que o CPFvm possui conexões com estruturas responsáveis pelos comportamentos de medo e ansiedade, como por exemplo, complexo amigdalóide, hipocampo (principalmente projeções oriundas da região CA1) e SCP, sugerindo a participação dessa região na expressão desses comportamentos (Gray 1987; LeDoux 1992; Fisk and Wyss 2000; Vertes 2004; Sotres-Bayon and Quirk 2010).

Estudos que verificaram a participação do CPFvm nos comportamentos relacionados com ansiedade demonstraram que lesões nas regiões IL e PL do CPFvm promoveram efeitos tipo-ansiolítico em animais submetidos aos testes de ansiedade, o campo aberto e o labirinto em cruz elevado [LCE, (Lacroix, Spinelli et al. 2000; Stern, Do Monte et al. 2010)]. Ainda, a inativação farmacológica temporária da região PL ou IL promoveu um comportamento tipo-ansiolítico no modelo do medo condicionado ao contexto, teste de interação social e no teste de lambear punido de Vogel [VCT (Resstel, Correa et al. 2008; Lisboa, Stecchini et al. 2010, Shah and Treit 2003)].

Em oposição a esses resultados, outros estudos demonstraram que lesões nas áreas PL e IL promoveram comportamento do tipo ansiogênico em animais submetidos ao LCE e campo aberto (Heidbreder, Thompson et al. 1996; Jinks and McGregor 1997; Lisboa, Stecchini et al. 2010; de Visser, Baars et al. 2011).

Ressaltando ainda a participação do CPFvm na modulação de respostas defensivas, observou-se que animais expostos ao LCE ou ao modelo de exposição ao odor de gato apresentaram aumento da expressão da proteína Fos nessa estrutura (Duncan, Knapp et al. 1996; McGregor, Hargreaves et al. 2004).

Tais comportamentos supracitados são mediados por diversos sistemas de neurotransmissores presentes no CPFvm relacionados aos comportamentos de ansiedade, a citar, o nitrérgico, noradrenérgico, vaniloide, glutamatérgico e

canabinoide (Pellow, Chopin et al. 1985; Resstel, Correa et al. 2008; Aguiar, Terzian et al. 2009; Do-Monte, Kincheski et al. 2010).

### **3. Neurotransmissores envolvidos no comportamento defensivo**

Os circuitos neuroanatômicos responsáveis pelo comportamento defensivo são modulados por vários sistemas de neurotransmissores, a citar o hormônio liberador de corticotrofinas, neuropeptídeo Y, substância P, transmissores monoaminérgicos (noradrenalina, serotonina e dopamina), ácido gamma-aminobutírico (GABA), óxido nítrico (NO), canabinoides e glutamato (Deakin and Graeff 1991; Guimaraes, Del Bel et al. 1993; Carobrez 2003; Bergink, van Megen et al. 2004; Harro 2006; Kalueff and Nutt 2007; Moreira, Aguiar et al. 2007). Neste trabalho daremos ênfase na participação dos sistemas glutamatérgico e canabinoide presentes na SCPdl e CPFvm.

#### 3.1. Sistema glutamatérgico

Descrito inicialmente por Watkins & Collingridge, o glutamato é considerado o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central [SNC (Watkins 2000)]. Sua síntese ocorre em neurônios pré-sinápticos, onde a enzima glutaminase converte a glutamina em glutamato, sendo este armazenado em vesículas e posteriormente liberado por exocitose dependente do influxo de cálcio ( $Ca^{2+}$ ).

Uma vez liberado na fenda sináptica, o glutamato exerce seus efeitos através de seus receptores, sendo esses divididos em duas classes: metabotrópicos (mGluR) e ionotrópicos [iGluR (Nakanishi 1992)]. Os mGluRs podem ser divididos em 3 grupos, sendo o grupo I composto 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 por sua vez inibe a adenilato ciclase (Pin and Duvoisin 1995).

Já os receptores NMDA (N-metil-D-aspartato), AMPA ( $\alpha$  amino-3-hidroxi 5-metil 4-isoxazolepropionato) e Cainato, constituem a família dos receptores ionotrópicos. Os receptores AMPA são canais iônicos compostos pelas subunidades GluR1-4 permeáveis ao  $Na^+$  e  $K^+$  e a ativação destes receptores

promove a despolarização necessária para que haja abertura dos canais NMDA [constituído por várias subunidades denominadas NR1 (sítio de ligação da glicina), NR2A-D (sítio de ligação do glutamato) e a NR3A-B (Borges and Dingledine 1998; Javitt 2004)]. Os receptores Cainato são formados pelas subunidades Glu 5-7 e KA1-2 sendo localizados tanto pré quanto pós-sinápticamente e apresentam baixa permeabilidade ao  $Ca^{2+}$  (Bleakman and Lodge 1998; Huettner 2003). O término das ações do glutamato ocorre com a recaptação pelo próprio neurônio ou por astrócitos (Amara and Fontana 2002; Shigeri, Seal et al. 2004).

Dentre os diversos receptores glutamatérgicos supracitados, vários estudos demonstram principalmente a participação dos receptores do tipo NMDA e mGluR5 na modulação de respostas defensivas.

Nesse sentido, além da estimulação elétrica da SCP dorsal descrita anteriormente, a injeção de aminoácidos excitatórios como o glutamato, L-aspartato e D,L-homocisteico (DLH) na SCP de gatos também desencadeia o comportamento defensivo, como a dilatação da pupila, ereção dos pêlos, retração das orelhas e vocalização, que são semelhantes às estratégias naturais ocorridas quando esses animais são ameaçados ou atacados (Bandler 1982; Bandler and Carrive 1988; Finn, Jhaveri et al. 2003).

Em ratos, a estimulação química da SCP, através da administração de glutamato ou agonistas seletivos dos receptores NMDA promove comportamentos incondicionados, como reações de escape, fuga, congelamento e alterações autonômicas [elevação da pressão arterial e da frequência cardíaca, sudorese e piloereção (Krieger and Graeff 1985; Bandler and Carrive 1988; Schenberg, Bittencourt et al. 2001; Bittencourt, Carobrez et al. 2004; Ferreira-Netto, Borelli et al. 2005; Aguiar, Moreira et al. 2006)] enquanto que a administração do AP5 ou AP7 (antagonistas de receptores NMDA) intra-SCPdl ou intra-CPFm induz efeitos tipo-ansiolítico nos modelos animais de ansiedade, o LCE, VCT, medo condicionado ao contexto e o teste de interação social (Guimaraes, Carobrez et al. 1991; Molchanov and Guimaraes 2002; Resstel, Correa et al. 2008, Dunn, Corbett et al. 1989; Corbett and Dunn 1993; Puighermanal, Busquets-Garcia et al. 2013).

Assim como a modulação dos receptores inotrópicos é apontada como importante na mediação do comportamento defensivo, alguns estudos

descrevem também a participação dos receptores metabotrópicos nessas respostas. A administração intra-SCPdl do antagonista de receptores metabotrópicos tipo 1 [(mGluR1), AIDA (RS 1-aminoindan-1,5-dicarboxylic acid)] e tipo 5 [(mGluR5), MPEP (2-methyl-6-phenylethynyl-pyridine)] produziu comportamento tipo-ansiolítico em ratos expostos ao VCT e ao LCE (Lima, Molchanov et al. 2008). Este mesmo efeito produzido pelo MPEP foi observado também em ratos expostos a outro modelo animal de ansiedade, a caixa claro-escuro (Perez de la Mora, Lara-Garcia et al. 2006; Mikulecka and Mares 2009) e ainda, atenuou o comportamento ansiogênico promovido pela retirada do etanol (Kumar, Hapidin et al. 2013). Adicionalmente, a administração intra-amídala basolateral do MPEP foi capaz de diminuir o tempo de *freezing* em ratos expostos ao medo condicionado ao contexto (Rea, Olango et al. 2013). Nesse sentido, diversos estudos apontam os antagonistas de mGluR como possíveis estratégias terapêuticas para tratamento dos transtornos de ansiedade (Busse, Brodtkin et al. 2004; Mitsukawa, Mombereau et al. 2006).

Além do sistema glutamatérgico, pesquisas recentes demonstram o sistema canabinoide como importante mediador do comportamento defensivo.

### 3.2. Sistema endocanabinoide

A planta *Cannabis sativa* tem sido usada há séculos tanto em circunstâncias comerciais e médicas, quanto recreativas. O primeiro relato do uso da *Cannabis* foi na China há 4000 a.C., onde as fibras da planta eram utilizadas principalmente na fabricação de cestos, cordas e outros produtos têxteis. Já o uso da *Cannabis* para fins medicinais foi primariamente descrito na farmacopeia chinesa (2800 a.C.) a qual era indicada para fins analgésicos (Carter et al. 2002). Entretanto, somente na metade do século XX que os principais constituintes químicos da *Cannabis* foram elucidados.

Essa planta possui mais de 60 componentes, dentre eles destacam-se o canabidiol e o  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC), sendo este último o responsável pelos principais efeitos psicoativos decorrentes do uso da planta (Gaoni and Mechoulam 1971; Mechoulam, Braun et al. 1972; Mechoulam, Lander et al. 1980, Mechoulam, 1990). Entretanto, o acentuado caráter lipofílico

dificultou o isolamento dos constituintes da *Cannabis*, tornando complexo o estudo das propriedades farmacológicas da planta.

A observação de que a atividade psicotrópica promovida pelos canabinoides está intrinsecamente relacionada com a estrutura química, levou-se a hipótese da expressão dos receptores canabinoides no organismo (Mechoulam, Lander et al. 1980; Devane, Dysarz et al. 1988).

Em 1984, Howlett e Fleming demonstraram que os canabinoides eram capazes de inibir a enzima adenilato ciclase em concentrações que se correlacionavam com as utilizadas em modelos animais. Posteriormente, através de ensaios com ligantes marcados (“*binding*”) e com o auxílio do ligante radioativo [3H]CP-55940 observou-se que este composto era deslocado do sítio de ligação pelos canabinoides com diferentes afinidades (Howlett et al. 1984). Além disso, identificou-se também uma correlação entre a ordem de afinidade pelo sítio de ligação e a ordem de potência para a indução de efeitos farmacológicos em humanos e em animais experimentais. Essas características preenchem os critérios para a proposta de um novo receptor, ao qual se ligariam os canabinoides (Herkenham, Lynn et al. 1990).

Em 1990, Matsuda e colaboradores clonaram o primeiro receptor canabinoide e posteriormente, estudos de Munro e colaboradores apontaram para a existência de um segundo tipo de receptor canabinoide (Munro, Thomas et al. 1993), os quais foram denominados respectivamente receptor canabinoide do tipo 1 (CB1) e do tipo 2 (CB2). Os receptores canabinoides são receptores metabotrópicos, pois estão ligados a proteína Gi/Go, e conseqüentemente, atuam inibindo a enzima adenilato ciclase (Howlett and Fleming 1984; Matsuda, Bonner et al. 1993; Howlett 2002; Pertwee 2010). Além disso, a ativação desses receptores resulta na abertura de canais para K<sup>+</sup> e reduzem a condutância de canais para Ca<sup>2+</sup>. Devido a localização pré-sináptica, os rCBs atuam como moduladores da liberação de outros neurotransmissores (Piomelli 2003).

Após a descrição dos receptores canabinoides, diversos estudos foram conduzidos com o objetivo de descobrir quais seriam os ligantes endógenos destes receptores. Em 1992 o grupo de pesquisas liderado por Raphael Mechoulam descreveu o primeiro ligante endógeno, a araquidonoil

etanolamida, uma etanolamida do ácido araquidônico, a qual foi denominado de anandamida [AEA (Devane, Hanus et al. 1992)].

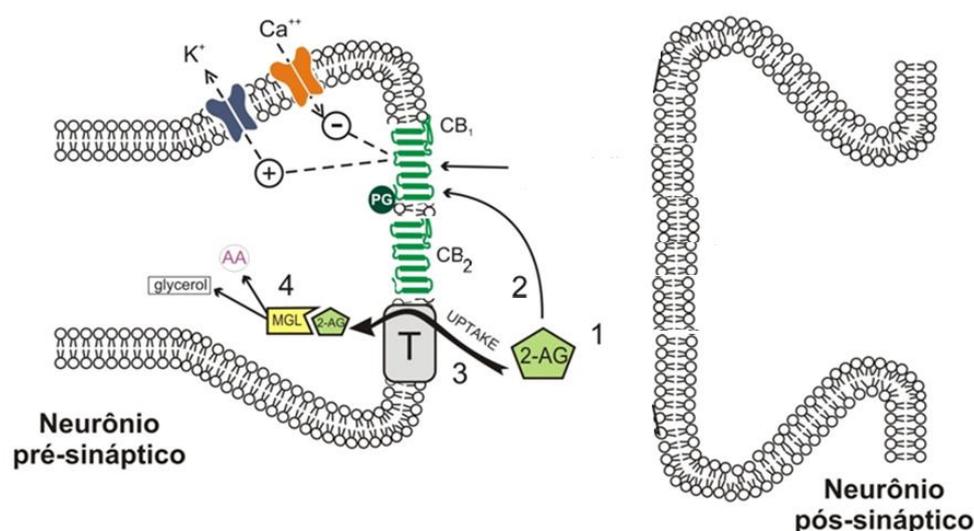
A AEA é sintetizada a partir de fosfolípidios de membrana através de processos dependentes do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  sendo degradada pela hidrolase de amidas de ácido graxo [FAAH (Di Marzo, Melck et al. 1998; Dinh, Freund et al. 2002; De Petrocellis, Cascio et al. 2004; Di Marzo, Bifulco et al. 2004; Maccarrone, Rossi et al. 2008)].

Além da AEA outros endocanabinoides encontram-se descritos na literatura, dentre esses, destaca-se o 2-araquidonoilglicerol (2-AG). O isolamento do 2-AG ocorreu a partir de intestino de cães, sendo, sua estrutura química determinada por espectrometria de massa e por comparação direta com outra amostra sintética. Observou-se também que a amostra do 2-AG se ligava aos rCB1 e rCB2 e que o 2-AG inibia a adenilato ciclase em uma potência semelhante ao  $\Delta^9$ -THC (Mechoulam, Ben-Shabat et al. 1995) sugerindo dessa forma o 2-AG como um endocanabinoide.

Estudos posteriormente demonstraram que o 2-AG é formado pela hidrólise de fosfolípidios através da fosfolipase C (PLC)  $\beta$  ou  $\delta$ , liberando diacilgliceróis e, em seguida, esses diacilgliceróis sofrem a ação da diacilglicerol lipase (DGL)  $\alpha$  ou  $\beta$  (Gao, Vasilyev et al. 2010; Tanimura, Yamazaki et al. 2010).

Embora o envolvimento de PLCs na síntese de diacilgliceróis e do 2-AG não esteja completamente elucidado, o desenvolvimento de camundongos deficientes de DGL- $\alpha$  e  $\beta$  reforçou os papéis destas enzimas na síntese de 2-AG. Aparentemente a DGL- $\alpha$  é a principal enzima no cérebro e na medula espinhal, enquanto DGL- $\beta$  desempenha um papel primário no fígado com papéis modestos no cérebro (Gao, Vasilyev et al. 2010; Tanimura, Yamazaki et al. 2010). Uma vez sintetizado, o 2-AG [Figura 1 (Mechoulam, Ben-Shabat et al. 1995; Sugiura, Kondo et al. 1995)] é metabolizado pela enzima monoacilglicerol lipase (MGL) que consiste em uma hidrolase de serina que degrada preferencialmente monoacilgliceróis e ácidos graxos, sendo sua maior expressão no cérebro, no tecido adiposo branco e no fígado (Cravatt, Demarest et al. 2001; Dinh, Freund et al. 2002; Ahn, McKinney et al. 2008). A compreensão do metabolismo e os papéis fisiológicos da MGL foi muito acelerada nos últimos anos devido à síntese de inibidores eficazes altamente

potentes e seletivos *in vivo*, tais como JZL-184 e URB602, além do desenvolvimento de camundongos nocaute para MGL (King, Duranti et al. 2007; Long, Li et al. 2009; Schlosburg, Carlson et al. 2009; Chanda, Gao et al. 2010).



**Figura 1.** Via de sinalização do 2-AG. (1) O 2-AG é sintetizado sob demanda e liberado no neurônio pós-sináptico após influxo de cálcio. (2) Uma vez sintetizado o 2-AG pode atuar sobre receptores  $CB_1$  e  $CB_2$ . (3) O 2-AG é removido da fenda sináptica pela captação pré-sináptica. (4) Uma vez no interior dos neurônios, o 2-AG é hidrolisado pela MGL. Adaptado de (Saito, Wotjak et al. 2010).

A inativação farmacológica ou genética de MGL promove o aumento da ação do 2-AG para mais de 80% na maioria dos tecidos, incluindo o cérebro, enquanto os 20% restantes decorre da ação das hidrolases de serina, como alpha/beta hidrolase [ABHD6 e ABHD12 (Dinh, Freund et al. 2002; Blankman, Simon et al. 2007)]. Embora as hidrolases ABHD6 e ABHD12 desencadeiem um papel na hidrólise do 2-AG, foi a inativação farmacológica e genética da MGL que promoveu uma grande elevação nos níveis de 2-AG no cérebro, confirmando que MGL é de fato a principal enzima envolvida na degradação de 2-AG *in vivo* (Long, Li et al. 2009; Schlosburg, Carlson et al. 2009; Nomura, Morrison et al. 2011).

Diferente da AEA, que possui maior afinidade pelos  $rCB_1$ , o 2-AG possui afinidade semelhante para ambos receptores,  $rCB_1$  e  $rCB_2$ . Nesse sentido, o

sistema endocanabinoide tem recebido destaque em estudos comportamentais com animais devido à localização dos rCB1 e rCB2 em estruturas relacionadas com a elaboração de respostas defensivas, como hipotálamo, amígdala, SCP e CPF (Herkenham 1991; Onaivi 2006; Onaivi, Ishiguro et al. 2006; Onaivi, Ishiguro et al. 2006; Moreira, Aguiar et al. 2007; Campos, Moreira et al. 2012; Almeida-Santos, Moreira et al. 2013).

Dessa forma, a administração intraperitoneal do  $\Delta^9$ -THC promoveu uma diminuição da expressão da proteína c-Fos na amígdala e no CPF (Rubino, Sala et al. 2007) e induziu comportamento tipo-ansiolítico no teste da caixa claro-escuro e no LCE (Berrendero and Maldonado 2002; Rubino, Realini et al. 2008).

A administração sistêmica ou intra-SCPdl da AEA e do AM404 (inibidor do transportador de AEA) promoveu efeito tipo ansiolítico em animais submetidos ao medo condicionado ao contexto, ao LCE e ao teste de vocalização induzida pelo isolamento (Berrendero and Maldonado 2002; Patel, Roelke et al. 2005; Bortolato, Campolongo et al. 2006; Moreira, Aguiar et al. 2007; Lisboa, Resstel et al. 2008). Esse mesmo efeito foi observado após a administração intra-CPFm do ACEA (agonista rCB1) no LCE e VCT, sendo esse efeito bloqueado pelo pré-tratamento com AM251, antagonista desse receptor (Fogaca, Aguiar et al. 2012).

Adicionalmente, estudo de Finn e colaboradores demonstrou que o pré-tratamento intra-SCP dorsal com AEA e com o agonista do rCB1, HU210, foi capaz de bloquear a resposta de fuga induzida pelo NMDA intra-SCP dorsal (Finn, Jhaveri et al. 2003). Além disso, a inibição genética e farmacológica da FAAH também induziu efeitos ansiolíticos via rCB1 (Kathuria, Gaetani et al. 2003; Moreira and Lutz 2008).

Em consonância com a hipótese de que outros endocanabinoides além da AEA poderiam também modular reações aversivas (Patel, Roelke et al. 2005; Bortolato, Campolongo et al. 2006; Patel and Hillard 2006; Lisboa, Resstel et al. 2008; Moreira and Lutz 2008; Moreira, Aguiar et al. 2012), a administração do inibidor da MGL, promoveu aumento dos níveis endógenos do 2-AG, induziu efeito tipo-ansiolítico, via rCB1, em animais submetidos ao modelo animal de ansiedade, o teste de enterrar bolinhas, caracterizado pelo comportamento repetitivo e compulsivo inerente a transtornos de ansiedade

(Kinsey, Nomura et al. 2011). Ainda, a inibição da MGL também promoveu efeito tipo-ansiolítico no LCE (Busquets-Garcia, Puighermanal et al. 2011; Sciolino, Zhou et al. 2011) e a administração crônica reverteu o comportamento de ansiedade induzido pelo estresse (Sumislawski, Ramikie et al. 2011).

Diante do exposto, os inibidores da MGL, bem como inibidores da FAAH, ou agonistas canabinoides diretos, surgem como uma possível alternativa na modulação dos comportamentos defensivos relacionados à ansiedade. Entretanto, a participação do 2-AG na SCPdl e no CPFvm em modelos animais de ansiedade ainda não foi elucidado. Dessa forma, a nossa hipótese inicial é que a administração do 2-AG nessas regiões induzirá efeito tipo-ansiolítico no modelo animal do LCE.

### 3.3 Interação entre a neurotransmissão canabinoide e glutamatérgica

Conforme descrito anteriormente, os sistemas canabinoide e glutamatérgico modulam respostas defensivas na SCPdl e CPFvm. Nesse sentido, alguns estudos sugerem uma relação entre a ativação dos receptores metabotrópicos do glutamato e a síntese do 2-AG (Calignano, Katona et al. 2000; Hajos, Katona et al. 2000; Di Marzo, Bisogno et al. 2001; Kreitzer and Regehr 2001).

Os endocanabinoides são considerados mensageiros retrógrados e fisiologicamente são capazes de promover o processo de sinalização denominado despolarização induzida pela supressão da inibição [DSI; (Ohno-Shosaku, Maejima et al. 2001; Wilson and Nicoll 2001; Wilson and Nicoll 2002)]. A DSI é produzida quando um endocanabinoide é liberado e ativa rCB1 localizados em interneurônios inibitórios promovendo a supressão de correntes inibitórias pós-sinápticas (IPSC). Em contraste a ação dos endocanabinoides, a ativação dos mGluR promove o aumento da DSI, sendo esse efeito, bloqueado por antagonistas dos mGluR e dos rCB1. Além disso, foi descrito que a DSI é ausente em camundongos nocaute para rCB1 e, surpreendentemente, que os agonistas mGluRs não têm efeito sobre IPSC nesses camundongos, sugerindo que a supressão de IPSC seja realmente mediada por endocanabinoides (Varma, Carlson et al. 2001).

Nesse sentido, Lafourcade e colaboradores (2007) utilizando a técnica de microscopia eletrônica no CPF de camundongos, demonstraram que a DGL-

$\alpha$  [enzima responsável pela síntese do 2-AG (Gao, Vasilyev et al. 2010)] é expressa nos mesmos dendritos que expressam mGluR5. Além disso, a inibição da síntese do 2-AG pelo tetrahidrolipstatin (inibidor da DGL- $\alpha$ ) bloqueou a depressão a longo prazo (LTD) induzida por endocanabinoides (Lafourcade, Elezgarai et al. 2007) sugerindo uma possível interação funcional entre mGluR5, DGL- $\alpha$  e 2-AG.

Adicionalmente, em experimentos eletrofisiológicos a administração do 2-AG induziu a LTD em fatias da amígdala basolateral e de forma oposta, a administração do inibidor da DGL- $\alpha$  promoveu a diminuição na magnitude da LTD, sendo essa diminuição também observada quando a preparação foi tratada com antagonistas de mGluR5/mGluR1. Dessa forma, sugere-se que a LTD foi mediada, em parte, pela atividade da DGL- $\alpha$  que foi dependente da sinalização de mGluR5/mGluR1 (Sumislawski, Ramikie et al. 2011).

*In vivo*, experimentos realizados por Palazzo e colaboradores (2001) demonstraram que o antagonismo de mGluR5 bloqueou o efeito antinociceptivo produzido pelo WIN 55,212-2 (agonista de rCB1 e rCB2) na SCP (Palazzo, Marabese et al. 2001) sugerindo mais uma vez que os sistemas canabinoide e glutamatérgico possam estar funcionalmente inter-relacionados.

Ainda considerando a possível interação dos sistemas glutamatérgico e canabinoide, estudo de Jung et al. (2005) demonstrou que a ativação de mGluR5 desencadeia a biossíntese do endocanabinoide 2-AG, mas não da AEA, em culturas primárias de córtex, estriado e fatias de hipocampo de ratos neonatos (Jung, Mangieri et al. 2005). Corroborando este dado, observou-se que a estimulação das fibras glutamatérgicas no hipocampo promove aumento na liberação do 2-AG (Stella, Schweitzer et al. 1997).

Dessa forma, vários estudos sugerem que a biossíntese do 2-AG é iniciada por ativação de mGluR5, sendo catalisada pela atividade da fosfolipase C e da DGL, sendo dependente de  $Ca^{2+}$  intracelular (Stella, Schweitzer et al. 1997; Bisogno, Howell et al. 2003; Hashimoto-dani, Ohno-Shosaku et al. 2005).

Considerando-se a possível interação entre estes sistemas, a outra hipótese desse trabalho é que o antagonismo de mGluR5 bloqueará os efeitos promovidos pelo aumento da sinalização do 2-AG na SCPdl e no CPFvm.

---

## *OBJETIVOS*

## 1. Objetivo Geral

Investigar o papel do endocanabinoide 2-AG na modulação de respostas defensivas mediadas pela SCPdl e CPFvm, bem como analisar a interação dos receptores mGluR5 nos efeitos mediados pelo 2-AG.

## 2. Objetivos Específicos

- Verificar se a injeção intra-SCPdl do 2-AG ou do inibidor da MGL promoverá efeito tipo-ansiolítico no LCE e anti-aversivo no modelo de estimulação química da SCPdl;
- Verificar a participação dos receptores CB1 e CB2 na modulação dessas respostas comportamentais;
- Verificar se haverá ativação de rCB1 na SCPdl após a fuga induzida pelo NMDA intra-SCPdl;
- Verificar se o pré-tratamento com o antagonista de mGluR5 (intra-SCPdl) bloqueará o efeito tipo-ansiolítico promovido pelo inibidor da MGL intra-SCP, em ratos submetidos ao LCE;
- Verificar se a injeção intra-CPFvm do 2-AG ou do inibidor da MGL também promoverá efeito tipo-ansiolítico em ratos submetidos ao LCE;
- Verificar se o pré-tratamento com o antagonista de mGluR5 (intra-CPFvm) também bloqueará o efeito tipo-ansiolítico promovido pelo inibidor da MGL, em ratos submetidos ao LCE;
- Verificar se há co-localização da enzima diacilglicerol lipase (DGL) e dos receptores mGluR5 na SCPdl e CPFvm de ratos.

---

*MATERIAIS E MÉTODOS*

## **1. Animais**

Ratos da linhagem Wistar, peso 230-240 g, provenientes do CEBIO-UFMG, após aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (protocolo 66/2010). Os ratos foram mantidos em grupos de 5 animais por gaiola, com livre acesso à água e comida, ciclo claro-escuro de 12x12 horas.

## **2. Protocolos experimentais**

### 2.1. Cirurgia estereotáxica

Os animais foram anestesiados com Ketamina (60mg/Kg) e Xilazina (8mg/Kg), *i.p* e fixados a um aparelho estereotáxico. Realizou-se uma incisão sagital para exposição da calvária e remoção do periósteo e perfuração da calota craniana para introdução da cânula guia (11 mm) dirigida à SCPdl [coordenadas: AP-lambda 0 mm, L-1,9 mm, P-4,3 mm, ângulo-16° (Paxinos 1997)], ou para introdução de duas cânulas guia (11 mm) dirigida ao CPFvm [coordenadas: AP=+3.2mm bregma, L=+2.5mm, D=-3,3 mm, ângulo-23° (Paxinos 1997)]. As cânulas foram fixadas ao crânio com cimento acrílico, conforme descrito em trabalhos prévios (Guimaraes, Carobrez et al. 1991; Aguiar, Terzian et al. 2009). Introduziu-se um mandril de aço inoxidável em cada cânula guia para evitar obstrução nos dias que antecederam os experimentos comportamentais. Os animais receberam injeção de pentabiótico e do analgésico, antitérmico e anti-inflamatório Banamine<sup>®</sup> (flunixin meglumine, 25 mg/Kg). Após a recuperação da anestesia, os animais foram alojados no biotério até seu restabelecimento (5-7 dias) e então foram submetidos aos protocolos experimentais.

### 2.2. Drogas

- 2-araquidonoilglicerol [2-AG (agonista rCB1 e rCB2)], Tocris<sup>®</sup>: 5, 50 e 500 pmol/0.2µL diluído em 50% DMSO e salina estéril (dose baseada em Moreira, Aguiar et al. 2007);
- URB602 [inibidor da monoacilglicerol lipase (MGL)], [1,1\_-biphenyl]-3-yl-carbamic acid cyclohexyl ester, Tocris<sup>®</sup>: 30, 100, 300 e 1000 pmol/0.2µL

diluído em 50% DMSO e em solução tampão fosfato (dose baseada em Moreira, Aguiar et al. 2007);

- AM251 (antagonista de rCB1), Tocris<sup>®</sup>: 100 pmol/0.2µL diluído em salina estéril (Moreira, Aguiar et al. 2007; Terzian, Aguiar et al. 2009; Fogaca, Aguiar et al. 2012);
- AM630 (antagonista de rCB2), Tocris<sup>®</sup>: 10, 100 e 1000 nmol/0.2µl; (dose baseada em Moreira, Aguiar et al. 2007);
- NMDA (agonista de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA), Sigma<sup>®</sup>: 1 nmol/0.2 µL, diluído em Salina 0.9% (Almeida-Santos, Moreira et al. 2013);
- MPEP, 2-methyl-6-(phenylethynyl)-pyridine (antagonista de mGluR5), Tocris<sup>®</sup>: 1e 10 nmol/0.2µl (Lima, Molchanov et al. 2008).

### 2.3. Injeção

A injeção foi unilateral para a SCPdl e bilateral para o CPFvm. Nesse procedimento, imobilizou-se gentilmente o animal para a retirada do mandril e introdução pela cânula guia, uma agulha odontológica gengival até atingir a SCPdl ou CPFvm, 1mm abaixo da extremidade da cânula. A agulha estava conectada a uma seringa Hamilton de 10 µl por meio de um segmento de Polietileno (P10). Realizaram-se as injeções com ajuda de uma bomba de infusão (Insight<sup>®</sup>, Brasil) no volume de 0.2 µl, a uma velocidade de 0.4µl/min.

### 2.4. Testes Comportamentais

#### ▪ Labirinto em Cruz Elevado (LCE):

O aparelho é constituído de quatro braços de madeira de iguais dimensões, sendo dois deles abertos e dois fechados situados a 50 cm de altura do solo. O LCE foi desenvolvido em 1984 e se baseia no conflito entre explorar um ambiente novo, caracterizado pela saída do braço fechado mais seguro, em contrapartida a um evento aversivo caracterizado pelos braços abertos, uma vez que o animal está mais exposto a possíveis ações de predadores (Handley and Mithani 1984). Os experimentos foram filmados com auxílio de uma câmera de vídeo (Microsoft<sup>®</sup>) localizada 1,5 metros acima do labirinto durante 5 minutos. Simultaneamente, foram analisados com auxílio do

software ANY-MAZE (versão 4.5), o qual registra a posição do animal no LCE e calcula a porcentagem de entradas nos braços abertos, a porcentagem de tempo gasto nos braços abertos e o número de entradas nos braços fechados do LCE. Foi considerado como entrada, as quatro patas do animal no braço do LCE. No intervalo entre os testes de cada animal o labirinto foi limpo com uma solução de álcool 70 %.

▪ Caixa de Observação:

Para verificar a resposta de fuga induzida pela injeção intra-SCPdl de NMDA utilizou-se uma caixa de observação constituída de acrílico transparente (29 X 19 X 34 cm) com tampa de malha plástica. O comportamento dos animais foi gravado por 2 minutos a partir do início da infusão das soluções por uma câmera de vídeo (Samsung, SMX-C10LN/XAA) localizada lateralmente à caixa, a uma distância aproximada de 50 cm. Os filmes foram depois reproduzidos em um computador, e o experimentador registrou o número de pulos e cruzamentos da linha média da caixa. O critério utilizado para considerar um pulo era de que o animal retirasse as quatro patas do chão simultaneamente, e para considerar um cruzamento era necessário que o animal atravessasse a linha média com as quatro patas (Aguiar, Moreira et al. 2006; Almeida-Santos, Moreira et al. 2013). Após cada teste a caixa foi limpa com álcool 70 %.

2.5. Histologia:

Ao término dos testes os animais sofreram perfusão intracardíaca para retirada do encéfalo e posterior análise histológica. Para isso os animais foram anestesiados com Uretana (25%, 5 ml/Kg de peso) e sofreram perfusão intracardíaca com salina 0.9 % e formol 10 %. Os cérebros foram extraídos, estocados em formol 10 % por três dias, e cortados, ao nível do sítio de injeção, em secções de 50 µm de espessura em um criostato (Microm HM 505 N). Os cortes foram montados em lâminas de vidro gelatinizadas e foram analisados para a verificação do local de injeção com o auxílio de um microscópio, segundo os diagramas do Atlas Paxinos (Paxinos 1997).

## 2.6. Imunofluorescência:

- Dupla-marcação para proteína Fos e rCB1:

Duas horas após o término do experimento comportamental os animais foram eutanasiados com injeção *i.p.* de uretana (25%, 5 ml/Kg de peso) e perfundidos com salina e paraformaldeído 4% fosfatado e tamponado em PBS 0,1 M, pH 7,4. Os encéfalos foram removidos e processados para obtenção de cortes representativos e foram obtidas secções (25 µm) em triplicata da SCP e do CPFvm (Aguiar and Guimaraes 2009; Casarotto, Terzian et al. 2012). As secções foram inicialmente lavadas por 30 min (3 lavagens de 10 min) em PBS 0,1M em seguidas incubadas em solução de PBS + glicina 0,1M por 10min, para bloqueio de sítios aldeídos formados pelo PFA. Após 2 lavagens de 5 min cada em PBS 0,1M, as secções foram incubadas com soro albumina bovina (BSA) 5% em PBS 0,1M acrescido de Triton-X 0,4%, durante 1h para bloqueio dos sítios inespecíficos, evitando marcações inespecíficas e para aumentar a permeabilidade da membrana celular. Em seguida as secções foram incubadas em solução contendo PBS + BSA5% + Triton 0,4% e os anticorpos primários: anti c-Fos policlonal produzido em coelho (1:1000, Santa Cruz<sup>®</sup>) e anti CB1r policlonal produzido em cabra (1:200, Santa Cruz<sup>®</sup>), durante 24 horas. Posteriormente, as secções foram lavadas por 30 minutos (3 lavagens de 10 min) em PBS e foram incubadas durante 1h com os seguintes anticorpos secundários: Alexa Fluor 488 anti-cabra produzido em jumento (1:1000, emissão de fluorescência verde) e Alexa Flúor 594 anti-coelho produzido em jumento (1:1000, emissão de fluorescência vermelha) ambos Invitrogen<sup>®</sup>.

Após o processo de imunofluorescência as secções foram lavadas por 30 min (6 lavagens de 5 min cada) em PBS e por último em água destilada para retirar o excesso de sal. Posteriormente, as secções foram distendidas em lâminas gelatinizadas e cobertas por lamínulas usando Fluoromount como meio de montagem.

As secções foram analisadas em microscópio para fluorescência e as imagens capturadas por câmera digital (ambos provenientes da Zeiss). A contagem, embora realizada com o auxílio de um sistema computadorizado de análise de imagem (Image J 1.42q National Institute of Health, USA), foi feita manualmente de forma cega, marcando-se os neurônios positivos, bem como aqueles com dupla-marcação.

▪ Dupla-marcação para DGL- $\alpha$  e mGluR5

Foram realizados os mesmos procedimentos descritos para a imunofluorescência de CB1r e da proteína Fos. Entretanto, os anticorpos primários utilizados foram: anti DGL- $\alpha$  policlonal produzido em coelho (1:200, Santa Cruz<sup>®</sup>) e anti mGluR5 policlonal produzido em cabra (1:100, Santa Cruz<sup>®</sup>), durante 24 horas. Posteriormente, as secções foram lavadas por 30 minutos (3 lavagens de 10 min) em PBS e foram incubadas durante 1h com os seguintes anticorpos secundários: Alexa Fluor 488 anti-cabra produzido em jumento (1:1000, emissão de fluorescência verde) e Alexa Fluóor 594 anti-coelho produzido em jumento (1:1000, emissão de fluorescência vermelha) ambos Invitrogen<sup>®</sup>.

3. Delineamento experimental

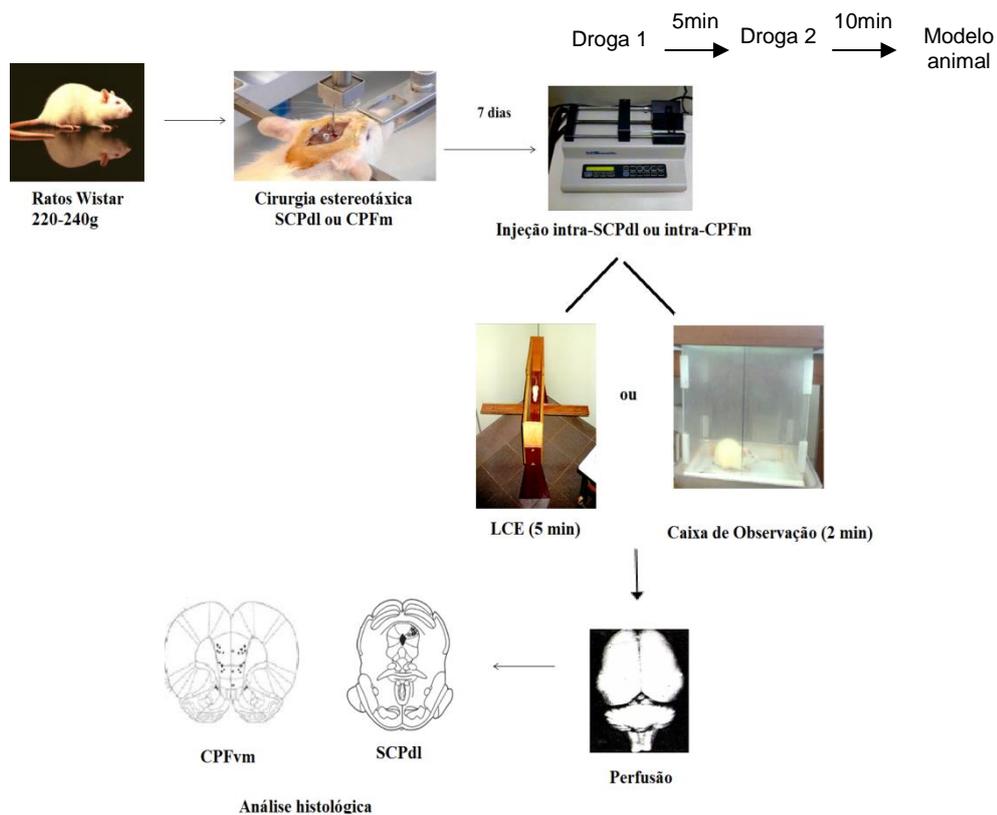


Figura 2: Representação esquemática dos protocolos experimentais.

Experimento I: Efeito da administração intra-SCPdl de 2AG em animais submetidos ao LCE.

Grupo 1) Veículo (0.2µL)

Grupo 2) 2AG (5 pmol/0.2µL)

Grupo 3) 2AG (50 pmol/0.2µL)

Grupo 4) 2AG (500 pmol/0.2µL)

Experimento II: O objetivo desse experimento foi verificar se o efeito do 2-AG era dependente da ativação de rCB1. Para isso os animais foram pré-tratados intra-SCPdl com AM251, seguido da administração de 2AG e submetidos ao LCE.

Grupo 1) Veículo (0.2µL) + Veículo (0.2µL)

Grupo 2) Veículo (0.2µL) + 2AG (50 pmol/0.2µL)

Grupo 3) AM251 (100 pmol/0.2µL) + Veículo (0.2µL)

Grupo 4) AM251 (100 pmol/0.2µL) + 2AG (50 pmol/0.2µL)

Experimento III: O objetivo desse experimento foi verificar se o efeito da administração intra-SCPdl do AM630 em animais submetidos ao LCE uma vez que, não existia na literatura dados sobre a dose deste antagonista na SCPdl.

Grupo 1) Veículo (0.2µL)

Grupo 2) AM630 (10 pmol/0.2µL)

Grupo 3) AM630 (100 pmol/0.2µL)

Grupo 4) AM630 (1000 pmol/0.2µL)

Experimento IV: O objetivo desse experimento foi verificar se o efeito do 2-AG foi dependente da ativação de rCB2. Para isso os animais foram pré-tratados intra-SCPdl com AM630, seguido da administração de 2AG e submetidos ao LCE.

Grupo 1) Veículo (0.2µL) + Veículo (0.2µL)

Grupo 2) Veículo (0.2µL) + 2AG (50 pmol/0.2µL)

Grupo 3) AM630 (1000 pmol/0.2µL) + Veículo (0.2µL)

Grupo 4) AM630 (1000 pmol/0.2µL) + 2AG (50 pmol/0.2µL)

Experimento V: Efeito da administração intra-SCPdl do URB602 em animais submetidos ao LCE.

Grupo 1) Veículo (0.2µL)

Grupo 2) URB602 (30 pmol/0.2µL)

Grupo 3) URB602 (100 pmol/0.2µL)

Grupo 4) URB602 (300 pmol/0.2µL)

Experimento VI: O objetivo desse experimento foi verificar se o efeito do URB602 foi dependente da ativação de rCB1, os animais foram pré-tratados intra-SCPdl com AM251 e submetidos ao LCE.

Grupo 1) Veículo (0.2µL) + Veículo (0.2µL)

Grupo 2) Veículo (0.2µL) + URB602 (100 pmol/0.2µL)

Grupo 3) AM251 (100 pmol/0.2µL) + Veículo (0.2µL)

Grupo 4) AM251 (100 pmol/0.2µL) + URB602 (100 pmol/0.2µL)

Experimento VII: O objetivo desse experimento foi verificar se o efeito do URB602 foi dependente da ativação de rCB2, os animais foram pré-tratados intra-SCPdl com AM630 seguido da administração de URB602 e submetidos ao LCE.

Grupo 1) Veículo (0.2µL) + Veículo (0.2µL)

Grupo 2) Veículo (0.2µL) + URB602 (100 pmol/0.2µL)

Grupo 3) AM630 (1000 pmol/0.2µL) + Veículo (0.2µL)

Grupo 4) AM630 (1000 pmol/0.2µL) + URB602 (100 pmol/0.2µL)

Experimento VIII: Efeito da administração intra-SCPdl do MPEP em animais submetidos ao LCE.

Grupo 1) Veículo (0.2µL)

Grupo 2) MPEP (1 pmol/0.2µL)

Grupo 3) MPEP (10 pmol/0.2µL)

Experimento IX: O objetivo desse experimento foi verificar se o efeito do URB602 foi dependente da ativação de mGluR5, os animais foram pré-tratados intra-SCPdl com MPEP e submetidos ao LCE.

Grupo 1) Veículo (0.2µL) + Veículo (0.2µL)

Grupo 2) Veículo (0.2µL) + URB602 (100 pmol/0.2µL)

Grupo 3) MPEP (10 pmol/0.2µL) + Veículo (0.2µL)

Grupo 4) MPEP (10 pmol/0.2µL) + URB602 (100 pmol/0.2µL)

Experimento X: O objetivo desse experimento foi verificar se o 2AG inibe as respostas de fuga induzidas pelo NMDA intra-SCPdl.

Grupo 1) Veículo (0.2µL) + Veículo (0.2µL)

Grupo 2) Veículo (0.2µL) + NMDA (1 nmol/0.2µL)

Grupo 3) 2AG (5 pmol/0.2µL) + NMDA (1 nmol/0.2 µL)

Grupo 4) 2AG (50 pmol/0.2µL) + NMDA (1 nmol/0.2µL)

Grupo 5) 2AG (500 pmol/0.2µL) + NMDA (1 nmol/0.2µL)

Experimento XI: O objetivo desse experimento foi verificar se o URB602 inibe as respostas de fuga induzidas pelo NMDA intra-SCPdl.

Grupo 1) Veículo (0.2µL) + Veículo (0.2µL)

Grupo 2) Veículo (0.2µL) + NMDA (1 nmol/0.2µL)

Grupo 3) URB602 (30 pmol/0.2µL) + NMDA (1 nmol/0.2µL)

Grupo 4) URB602 (100 pmol/0.2µL) + NMDA (1 nmol/0.2µL)

Grupo 5) URB602 (300 pmol/0.2µL) + NMDA (1 nmol/0.2µL)

Experimento XII: Efeito promovido pelo URB602 e NMDA intra-SCPdl sobre o número de células c-Fos positivas e rCB1 em ratos expostos a caixa de observação.

Grupo 1) Veículo (0.2µL) + Veículo (0.2µL)

Grupo 2) Veículo (0.2µL) + NMDA (1 nmol/0.2µL)

Grupo 3) URB602 (100 pmol/0.2µL) + Veículo (0.2µL)

Grupo 4) URB602 (100 pmol/0.2µL) + NMDA (1 nmol/0.2µL)

Experimento XIII: O objetivo desse experimento foi verificar se o tratamento combinado do URB602 e 2AG (doses ineficazes) inibe as respostas de fuga induzidas pelo NMDA intra-SCPdl.

Grupo 1) Veículo (0.2µL) + Veículo (0.2µL) + Veículo (0.2µL)

Grupo 2) Veículo (0.2µL) + Veículo (0.2µL) + NMDA (1 nmol/0.2µL)

Grupo 3) URB602 (30 pmol/0.2µL) + Veículo (0.2µL) + NMDA (1 nmol/0.2µL)

Grupo 4) Veículo (0.2µL) + 2AG (50 pmol/0.2µL) + NMDA (1 nmol/0.2µL)

Grupo 5) URB602 (30 pmol/0.2µL) + 2AG (50 pmol/0.2µL) + NMDA (1 nmol/0.2µL)

Experimento XIV: Efeito da administração intra-CPFvm de 2AG em animais submetidos ao LCE.

Grupo 1) Veículo (0.2µL)

Grupo 2) 2AG (5 pmol/0.2µL)

Grupo 3) 2AG (50 pmol/0.2µL)

Grupo 4) 2AG (500 pmol/0.2µL)

Experimento XV: O objetivo desse experimento foi verificar se o efeito do 2AG foi dependente da ativação de rCB1. Para isso os animais foram pré-tratados intra-CPFvm com AM251, seguido da administração de 2AG e submetidos ao LCE.

Grupo 1) Veículo (0.2µL) + Veículo (0.2µL)

Grupo 2) Veículo (0.2µL) + 2AG (500 pmol/0.2µL)

Grupo 3) AM251 (100 pmol/0.2µL) + Veículo (0.2µL)

Grupo 4) AM251 (100 pmol/0.2µL) + 2AG (500 pmol/0.2µL)

Experimento XVI: O objetivo desse experimento foi verificar se o efeito do 2AG foi dependente da ativação de rCB2. Para isso os animais foram pré-tratados intra-CPFvm com AM630, seguido da administração de 2AG e submetidos ao LCE.

Grupo 1) Veículo (0.2µL) + Veículo (0.2µL)

Grupo 2) Veículo (0.2µL) + 2AG (500 pmol/0.2µL)

Grupo 3) AM630 (1000 pmol/0.2µL) + Veículo (0.2µL)

Grupo 4) AM630 (1000 pmol/0.2µL) + 2AG (500 pmol/0.2µL)

Experimento XVII: Efeito da administração intra-CPFvm de URB602 em animais submetidos ao LCE.

Grupo 1) Veículo (0.2µL)

Grupo 2) URB602 (30 pmol/0.2µL)

Grupo 3) URB602 (100 pmol/0.2µL)

Grupo 4) URB602 (300 pmol/0.2µL)

Experimento XVIII: O objetivo desse experimento foi verificar se o efeito do URB602 foi dependente da ativação de rCB1. Para isso os animais foram pré-tratados intra-CPFvm com AM251, seguido da administração de URB602 e submetidos ao LCE.

Grupo 1) Veículo (0.2µL) + Veículo (0.2µL)

Grupo 2) Veículo (0.2µL) + URB602 (300 pmol/0.2µL)

Grupo 3) AM251 (100 pmol/0.2µL) + Veículo (0.2µL)

Grupo 4) AM251 (100 pmol/0.2µL) + URB602 (300 pmol/0.2µL)

Experimento XIX: O objetivo desse experimento foi verificar se o efeito do URB602 foi dependente da ativação de rCB2. Para isso os animais foram pré-tratados intra-CPFvm com AM630, seguido da administração de URB602 e submetidos ao LCE.

Grupo 1) Veículo (0.2µL) + Veículo (0.2µL)

Grupo 2) Veículo (0.2µL) + URB602 (300 pmol/0.2µL)

Grupo 3) AM630 (1000 pmol/0.2µL) + Veículo (0.2µL)

Grupo 4) AM630 (1000 pmol/0.2µL) + URB602 (300 pmol/0.2µL)

Experimento XX: O objetivo desse experimento foi verificar se o efeito do URB602 foi dependente da ativação de mGluR5, os animais foram pré-tratados intra-CPFvm com MPEP e submetidos ao LCE.

Grupo 1) Veículo (0.2µL) + Veículo (0.2µL)

Grupo 2) Veículo (0.2µL) + URB602 (300 pmol/0.2µL)

Grupo 3) MPEP (10 pmol/0.2µL) + Veículo (0.2µL)

Grupo 4) MPEP (10 pmol/0.2µL) + URB602 (300 pmol/0.2µL)

Experimento XXI: Os animais foram perfundidos e os cortes da SCP e CPF foram submetidos à técnica de imunofluorescência para verificação da co-localização da DGL-α (enzima responsável pela síntese do 2-AG) e mGluR5 na SCPdl e CPFvm.

Grupo 1) Naive

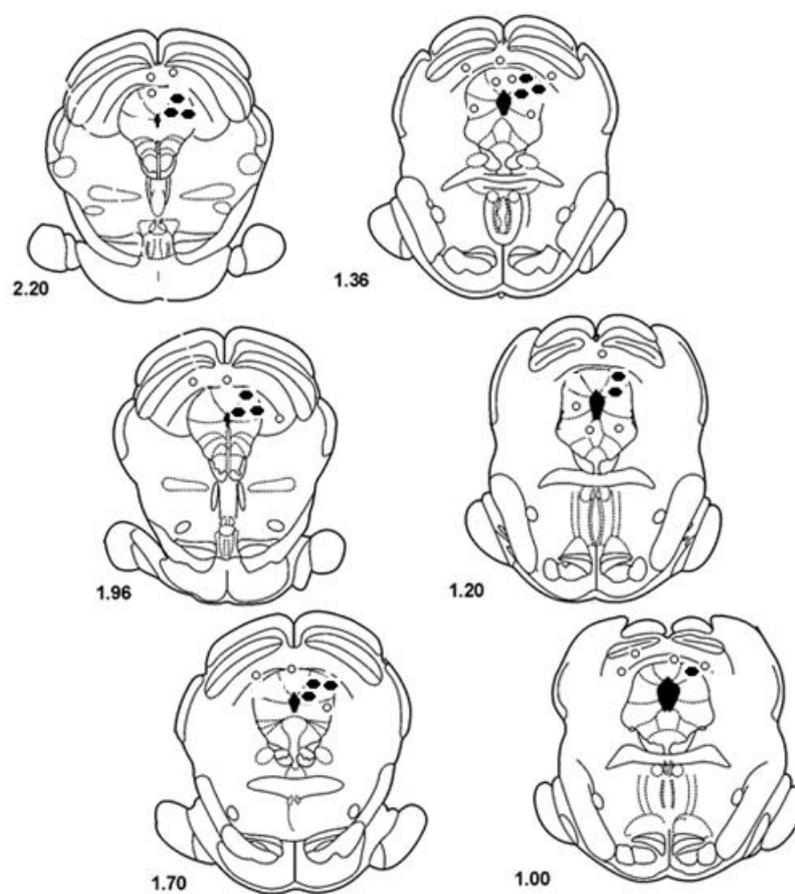
#### **4. Análise estatística**

Os resultados foram representados como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M). O nível de significância foi  $p < 0.05$ . A análise estatística foi realizada por meio do software GraphPad Prism5<sup>®</sup> para Windows. Os resultados comportamentais foram analisados por Análise de Variância (ANOVA) seguida de pós-teste de Duncan, ou pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Mann-Whitney, em caso de não haver homogeneidade entre os grupos.

Os resultados da imunofluorescência foram analisados pela Anova de duas vias seguida do pós-teste de Bonferroni.

---

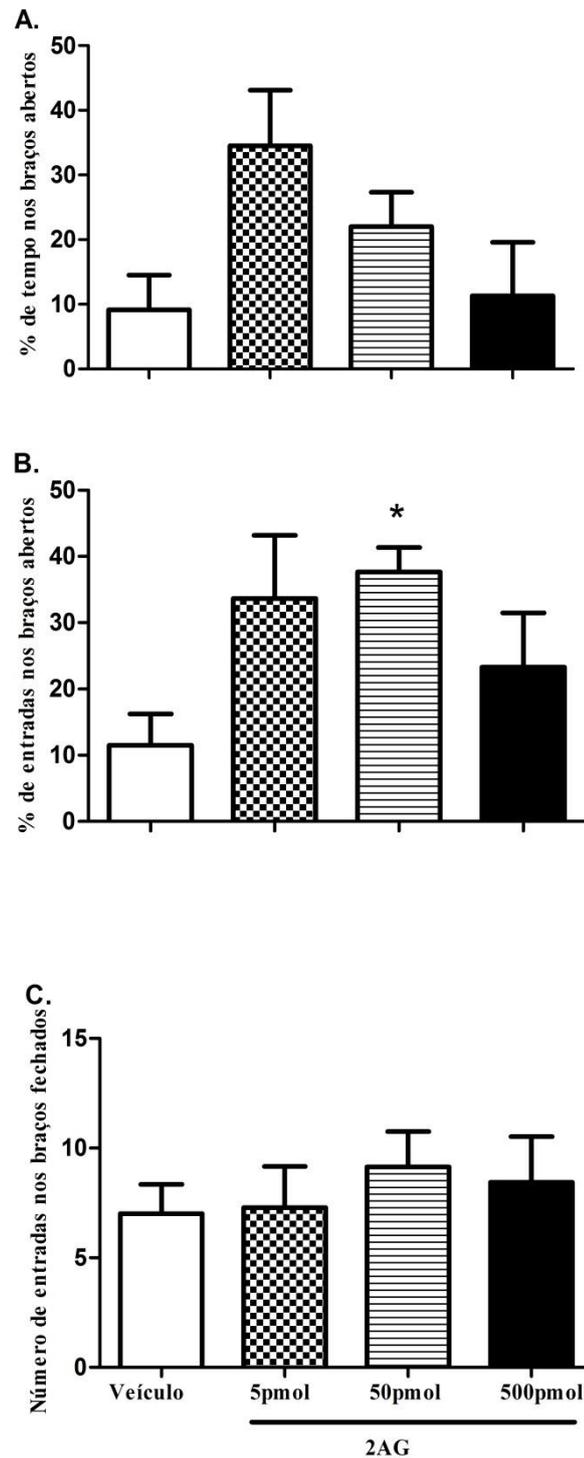
*Resultados: SCPdl*



**Figura 3:** Localização de sítios de injeção em diagramas modificados do Atlas de Paxinos e Watson (1997). (●) intra-SCPdl (○) fora-SCPdl.

**1. Efeito promovido pelo 2-AG intra-SCPdl em ratos expostos ao LCE.**

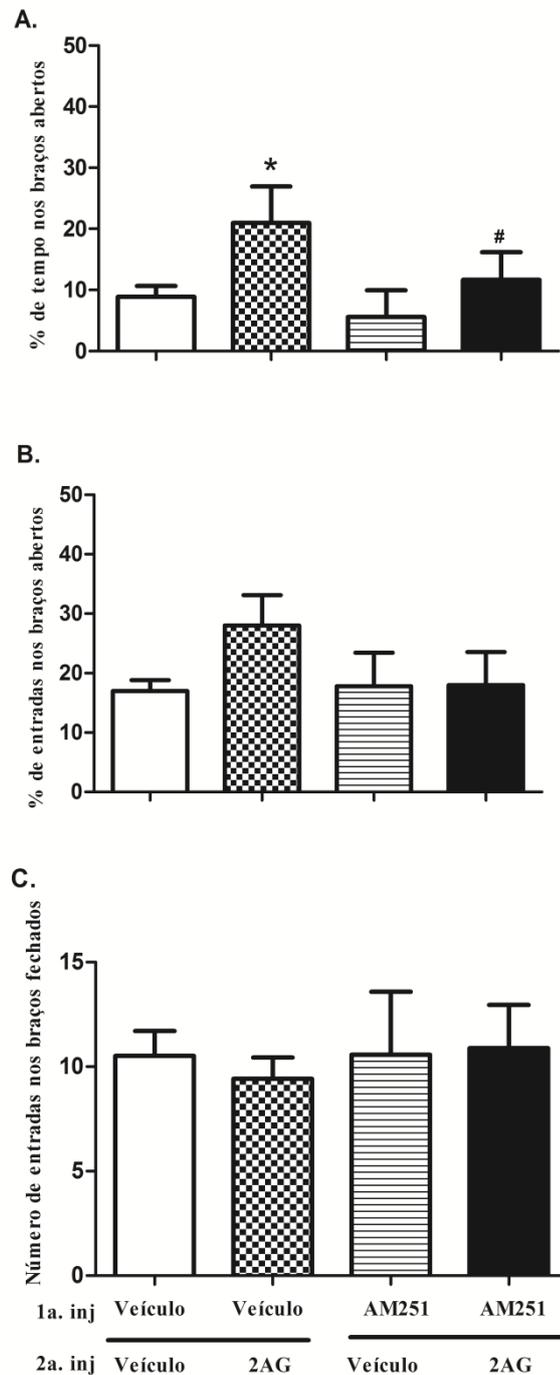
A injeção intra-SCPdl do 2-AG (50 pmol/0.2µL) não promoveu alterações significativas na porcentagem de tempo nos braços abertos do LCE ( $F_{(3,26)}=2.60$ ,  $p=0.0686$ ; ns; Figura 4A) porém, promoveu o aumento significativo da porcentagem de entradas nos braços abertos em comparação ao grupo controle ( $F_{(3,26)}=4.22$ ,  $p=0.012$ , Anova seguida do teste de Duncan, Figura 4B). Em relação ao número de entradas nos braços fechados, não houve diferença estatística entre os grupos ( $F_{(3,26)}=0.36$ , ns; Figura 4C), o que sugere que os efeitos do 2-AG não foram decorrentes de alteração da atividade locomotora basal dos animais.



**Figura 4:** Efeito do 2-AG (5, 50 ou 500 pmol/0.2µL) administrado intra-SCPdl em ratos submetidos ao LCE. As barras representam a média  $\pm$  S.E.M. da porcentagem de tempo gasto (A) e de entradas nos braços abertos (B) e o número de entradas nos braços fechados (C). \*Diferença estatisticamente significativa do grupo veículo + veículo.  $p < 0.05$ , ANOVA seguido por teste de Duncan;  $n = 7-14$ /grupo.

## **2. Efeito promovido pelo AM251 sobre o comportamento tipo-ansiolítico promovido pelo 2-AG intra-SCPdl, em ratos expostos ao LCE.**

A administração do 2-AG (50pmol/0.2µL) intra-SCPdl promoveu um efeito tipo-ansiolítico evidenciado pelo aumento significativo na porcentagem de tempo nos braços abertos do LCE ( $F_{(3,27)}=2.967$ ,  $p=0.05$ ; Anova seguida do teste de Duncan, Figura 5A). O pré-tratamento com o antagonista de rCB1, o AM251 (100 pmol/0.2µL) reverteu este efeito (teste de Duncan,  $p<0.05$ ; Figura 5A). Nenhum efeito foi encontrado no número de entradas nos braços fechados ( $F_{(3,27)}=0.156$ , ns; Figura 5C).

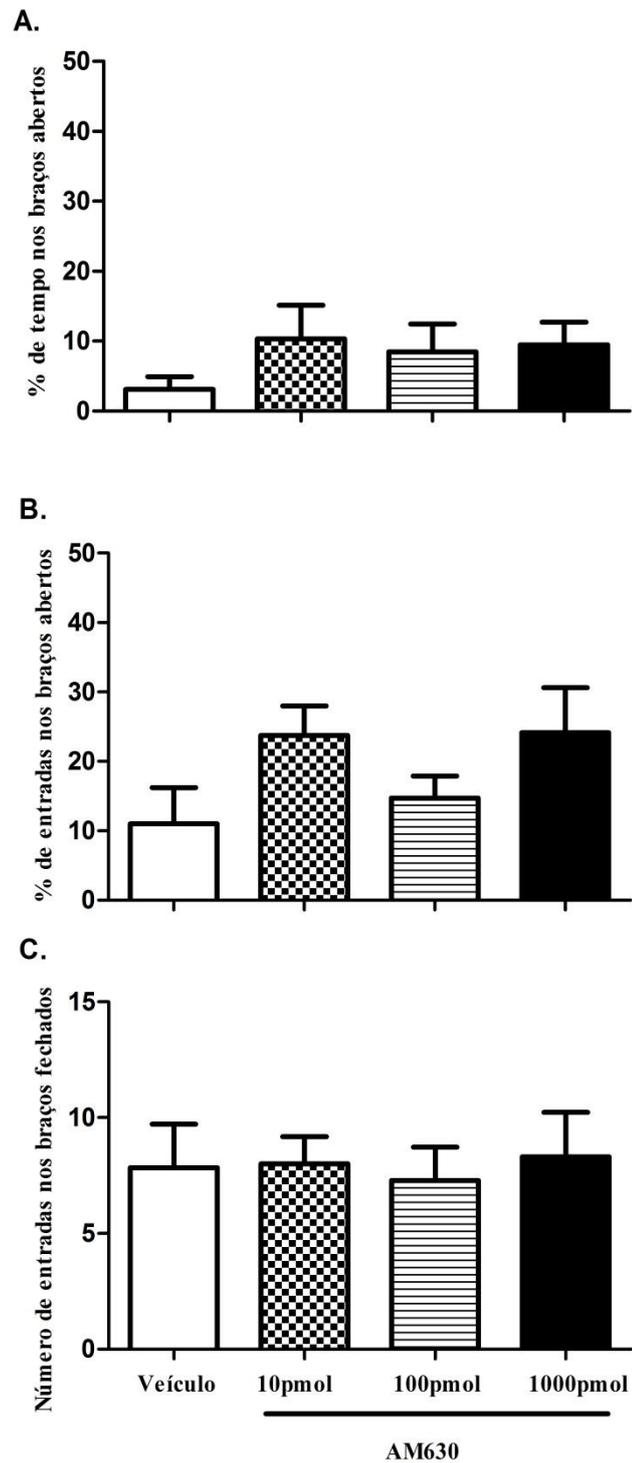


**Figura 5:** Efeito do pré-tratamento com AM251 (100 pmol), seguido por 2-AG (50 pmol) intra-SCPdl em ratos submetidos ao LCE. As barras representam a média  $\pm$  S.E.M. da porcentagem de tempo gasto (A) e de entradas nos braços abertos (B) e o número de entradas nos braços fechados (C). \*Diferença estatisticamente significativa do grupo veículo + veículo e # indica diferença estatisticamente significativa do grupo veículo + 2-AG (50 pmol,  $p < 0.05$ , ANOVA seguido por teste de Duncan;  $n = 6-10$ /grupo).

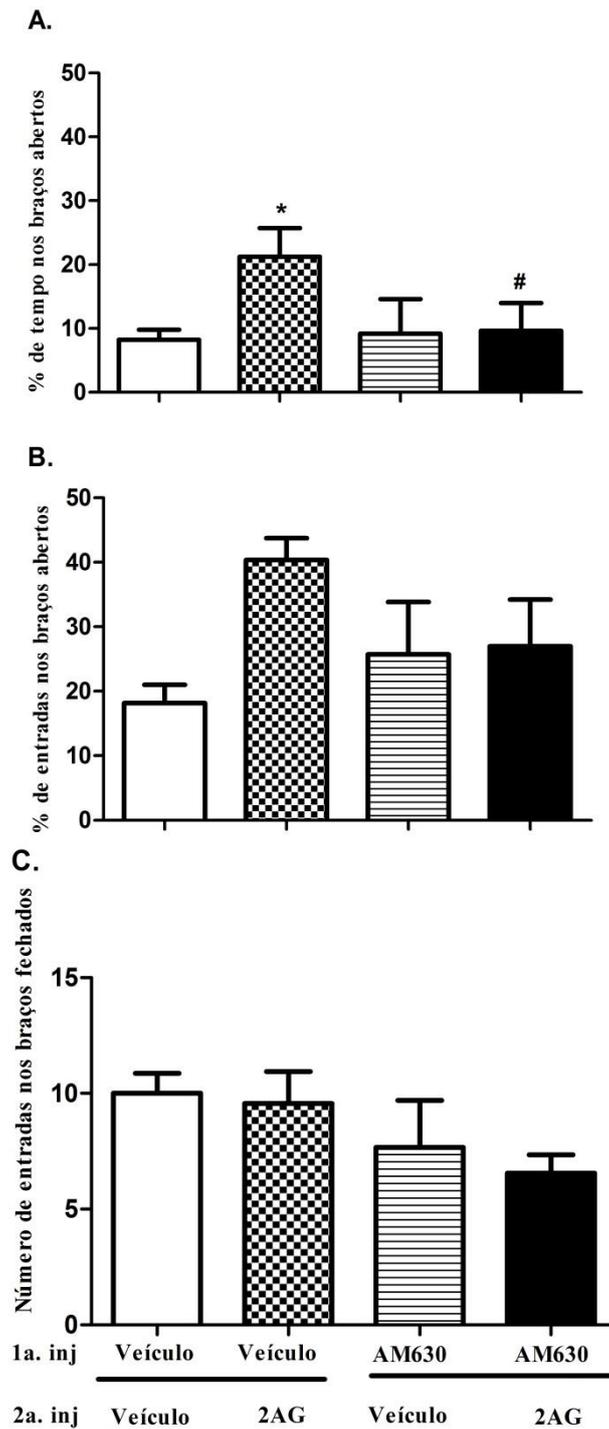
### 3. Efeito promovido pelo AM630 intra-SCPdl em ratos expostos ao LCE.

A injeção intra-SCPdl do antagonista de rCB2, AM630 (10, 100 ou 1000 pmol/0.2µL) não induziu qualquer alteração na porcentagem de tempo gasto ( $F_{(3,17)}=0.715$ , ns; Figura 6A) e de entradas ( $F_{(3,17)}=1.31$ , ns; Figura 6B) nos braços abertos. Além disso, não foi observada diferença significativa no número de entradas nos braços fechados ( $F_{(3,17)}=0.061$ , ns). Como o AM630, por si só, não promoveu nenhuma alteração nas respostas comportamentais do LCE, a dose de 1000 pmol foi escolhida para o próximo experimento.

Assim, o 2-AG induziu efeito tipo-ansiolítico e esse efeito foi bloqueado pelo pré-tratamento com AM630 (1000 pmol/0.2µL), evidenciado pela redução do aumento da porcentagem de tempo gasto nos braços abertos do LCE em relação ao grupo veículo+2-AG ( $F_{(3,27)}=2.267$ , teste de Duncan,  $p<0.05$ ; Figura 7A). Não foi observado nenhum efeito sobre o número de entradas nos braços fechados [ $F_{(3,27)}=2.035$ , ns], Figura 7C].



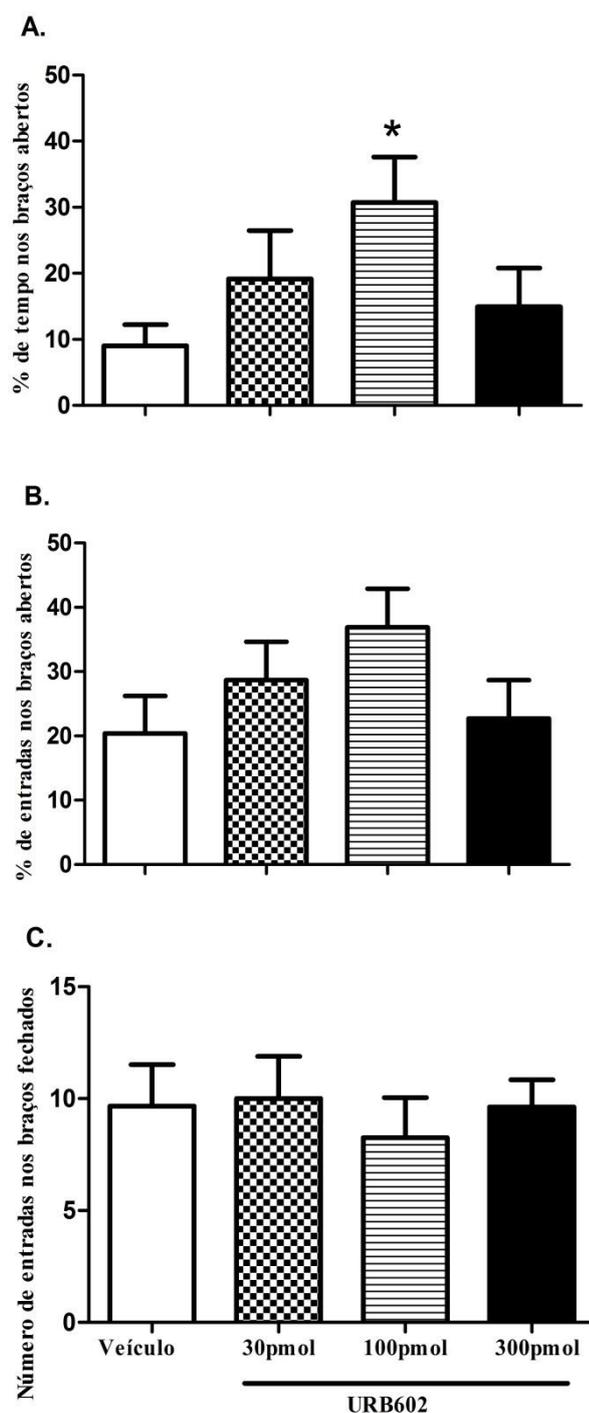
**Figura 6:** Efeito do AM630 (10, 100 ou 1000 pmol/0.2 $\mu$ L) intra-SCPdl em ratos submetidos ao LCE. As barras representam a média  $\pm$  S.E.M. da porcentagem do tempo gasto (A) e de entradas nos braços abertos (B) e o número de entradas nos braços fechados (C).  $p < 0.05$ , ANOVA seguido por teste de Duncan;  $n = 7-8$ /grupo.



**Figura 7:** Efeito do pré-tratamento com AM630 (1000 pmol), seguido por 2-AG (50 pmol), administrado intra-SCPdl de ratos submetidos ao LCE. As barras representam a média  $\pm$  S.E.M. da porcentagem de tempo gasto (A) e de entradas nos braços abertos (B) e o número de entradas nos braços fechados (C). \*Diferença estatisticamente significativa do grupo veículo + veículo e # indica diferença estatisticamente significativa do grupo veículo + 2-AG (50 pmol,  $p < 0.05$ , ANOVA seguido por teste de Duncan;  $n = 6-9$ /grupo).

#### **4. Efeito promovido pelo URB602 (inibidor da MGL, intra-SCPdl) em ratos expostos ao LCE.**

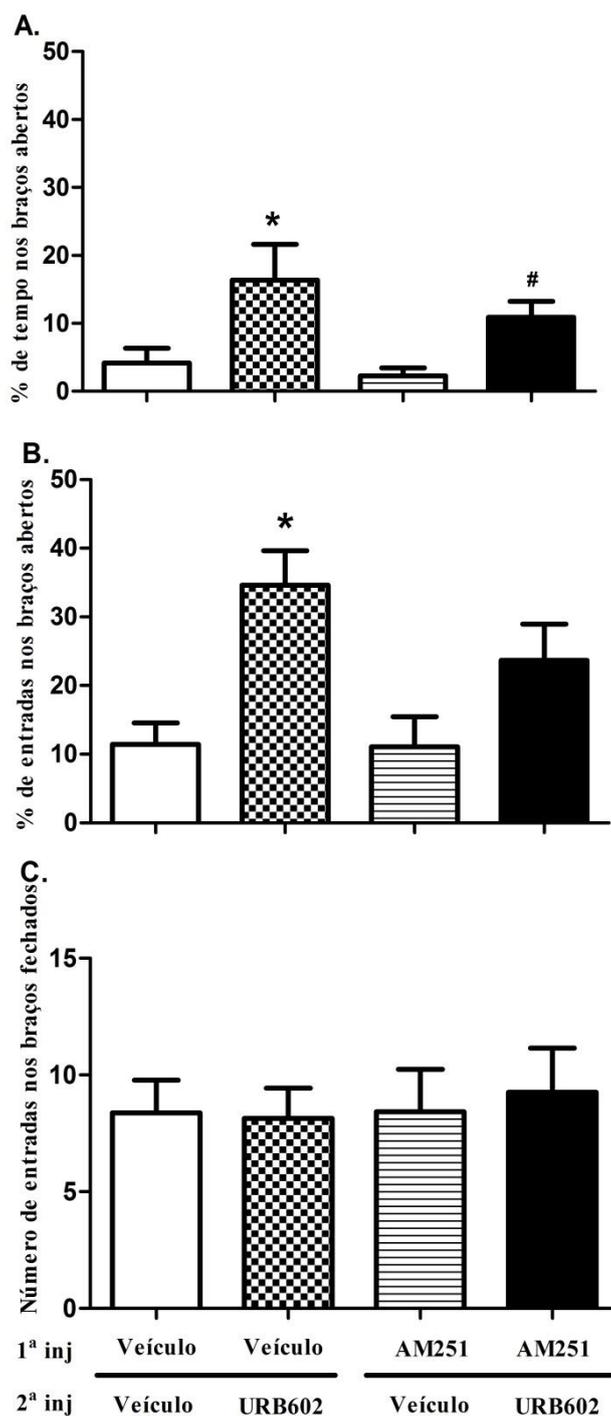
O inibidor da MGL (enzima responsável pela hidrólise do 2-AG), URB602 (100 pmol/0.2µL), intra-SCPdl, aumentou significativamente a porcentagem de tempo ( $F_{(3,26)}=2.015$ ,  $p=0.136$ , Anova seguida do teste de Duncan) gasto nos braços abertos quando comparado ao grupo controle (Figura 8A). Nenhuma alteração foi encontrada no número de entradas nos braços fechados ( $F_{(3,26)}=0.217$ , ns, Figura 8C), o que sugere que o efeito do URB602 não alterou a atividade locomotora.



**Figura 8:** Efeito do URB602 (30, 100 ou 300 pmol/0.2  $\mu$ L) intra-SCPdl de ratos submetidos ao LCE. As barras representam a média  $\pm$  S.E.M. da porcentagem de tempo gasto (A) e de entradas nos braços abertos (B) e o número de entradas nos braços fechados (C). \*Diferença estatisticamente significativa do grupo veículo ( $p < 0.05$ , ANOVA seguido por teste de Duncan;  $n = 7-14$ /grupo).

**5. Efeito promovido pelo AM251 (antagonista rCB1) sobre o comportamento tipo-ansiolítico promovido pelo URB602 intra-SCPdl, em ratos expostos ao LCE.**

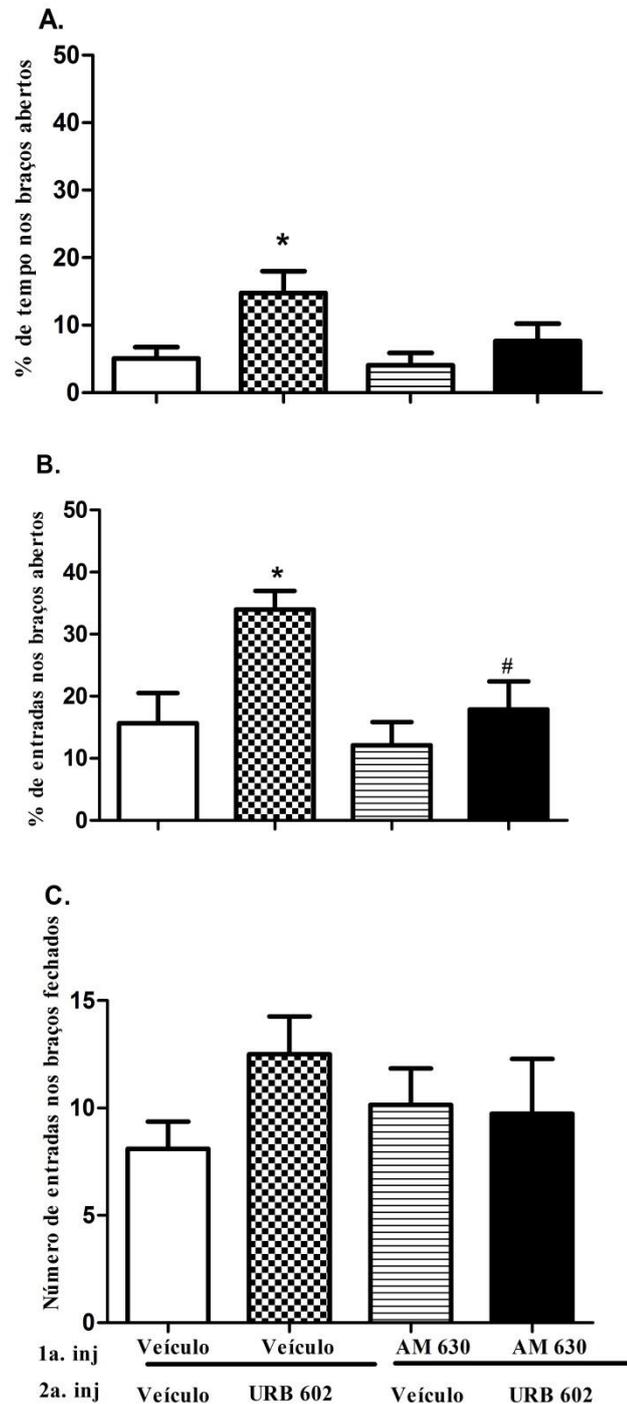
O URB602 (100 pmol/0.2µL) aumentou significativamente a percentagem de tempo ( $F_{(3,26)}=4.283$ ,  $p=0.013$ ; Anova seguida do teste de Duncan) e a percentagem de entradas nos braços abertos ( $F_{(3,26)}=5.98$ ,  $p=0.003$ ; Anova seguida do teste de Duncan). Esse efeito observado foi atenuado pela administração intra-SCPdl do AM251 (teste de Duncan,  $p<0.05$ ; Figura 9A e 9B). Nenhum efeito foi observado no número de entradas braços fechados ( $F_{(3,26)}=0.09$ , ns; Figura 9C).



**Figura 9:** Efeito do AM251 (100 pmol), seguido por URB602 (100 pmol), administrado intra-SCPdl de ratos submetidos ao LCE. As barras representam a média  $\pm$  S.E.M. da porcentagem de tempo gasto (A) e de entradas nos braços abertos (B) e o número de entradas nos braços fechados (C). \*Diferença estatisticamente significativa do grupo veículo + veículo e # indica diferença estatisticamente significativa do grupo veículo + URB602 (100 pmol,  $p < 0.05$ , ANOVA seguido por teste de Duncan;  $n = 6-9$ /grupo).

**6. Efeito promovido pelo AM630 (antagonista rCB2) sobre o comportamento tipo-ansiolítico promovido pelo URB602 intra-SCPdl, em ratos expostos ao LCE.**

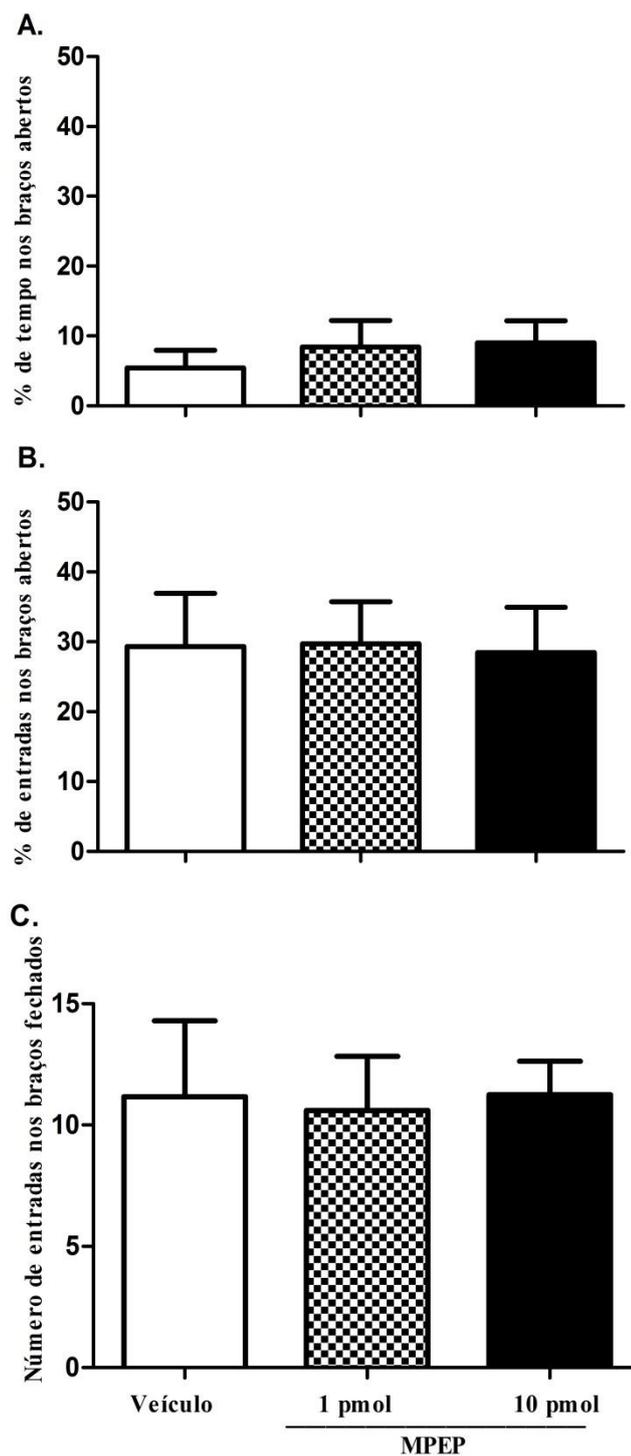
A administração do URB602 (100 pmol/ 0.2 $\mu$ L) promoveu o aumento da porcentagem de entradas nos braços abertos do LCE ( $F_{(3,31)}=4.525$ ,  $p=0.009$ ; Anova seguida do teste de Duncan). O pré-tratamento com AM630 (1000 pmol/0.2 $\mu$ L) bloqueou esse efeito (teste de Duncan,  $p<0.05$ , Figura 10B). Nenhum efeito foi observado no número de entradas nos braços fechados ( $F_{(3,31)}=0.763$ , ns; Figura 10C).



**Figura 10:** Efeito do AM630 (1000 pmol), seguido por URB602 (100 pmol), administrado intra-SCPdl de ratos submetidos ao LCE. As barras representam a média  $\pm$  S.E.M. da porcentagem de tempo gasto (A) e de entradas nos braços abertos (B) e o número de entradas nos braços fechados (C). \*Diferença estatisticamente significativa do grupo veículo + veículo e # indica diferença estatisticamente significativa do grupo veículo + URB602 (100 pmol,  $p < 0.05$ , ANOVA seguido por teste de Duncan;  $n = 6-9$ /grupo).

### **7. Efeito promovido pelo MPEP intra-SCPdl em ratos expostos ao LCE.**

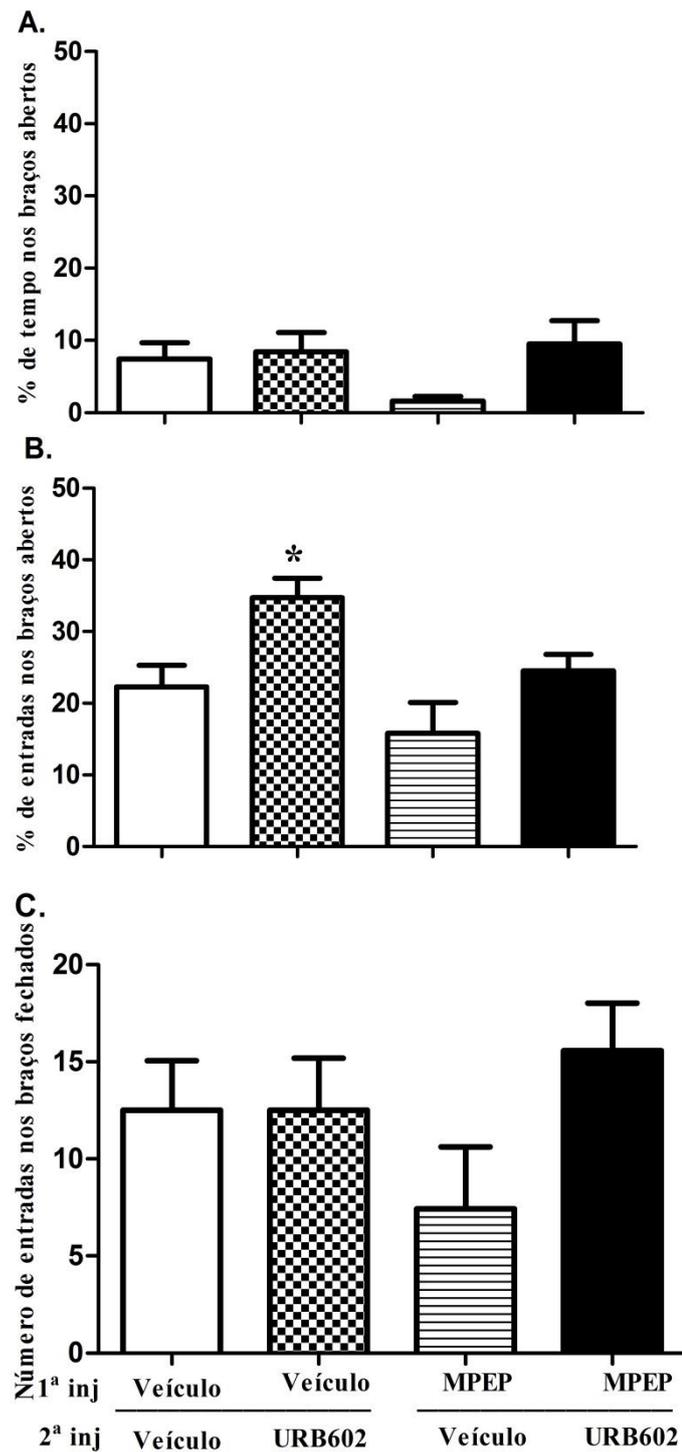
A injeção intra-SCPdl do antagonista de mGluR5, MPEP (1 ou 10 pmol/0.2µL) não promoveu nenhuma alteração na porcentagem de tempo ( $F_{(2,23)}=0.2453$ , ns; Figura 11A) e de entradas ( $F_{(2,23)}=0.1116$ , ns; Figura 11B) nos braços abertos. Além disso, não se observou diferença estatisticamente significativa no número de entradas nos braços fechados ( $F_{(2,23)}=0.0274$ , ns). Como o MPEP, por si só, não promoveu nenhuma alteração nas respostas comportamentais do LCE, a dose de 10 pmol foi escolhida para o próximo experimento.



**Figura 11:** Efeito do MPEP (1 ou 10 pmol/0.2µL) administrado intra-SCPdl em ratos submetidos ao LCE. As barras representam a média  $\pm$  S.E.M. da porcentagem de tempo gasto (A) e de entradas nos braços abertos (B) e o número de entradas nos braços fechados (C).  $p < 0.05$ , ANOVA seguido por teste de Duncan;  $n = 6-10$ /grupo.

**8. Efeito promovido pelo MPEP (antagonista mGluR5) sobre o comportamento tipo-ansiolítico promovido pelo URB602 intra-SCPdl, em ratos expostos ao LCE.**

A administração intra-SCPdl do URB602 (100 pmol/ 0.2µL) promoveu o aumento da porcentagem de entradas nos braços abertos do LCE ( $F_{(3,28)}=5.943$ ,  $p=0.0029$ ; Anova seguida do teste de Duncan). O pré-tratamento com MPEP (10 pmol/0.2µL) bloqueou esse efeito (teste de Duncan,  $p<0.05$ , Figura 12B). Nenhum efeito foi observado no número de entradas nos braços fechados ( $F_{(3,28)}=1.336$ , ns; Figura 12C).

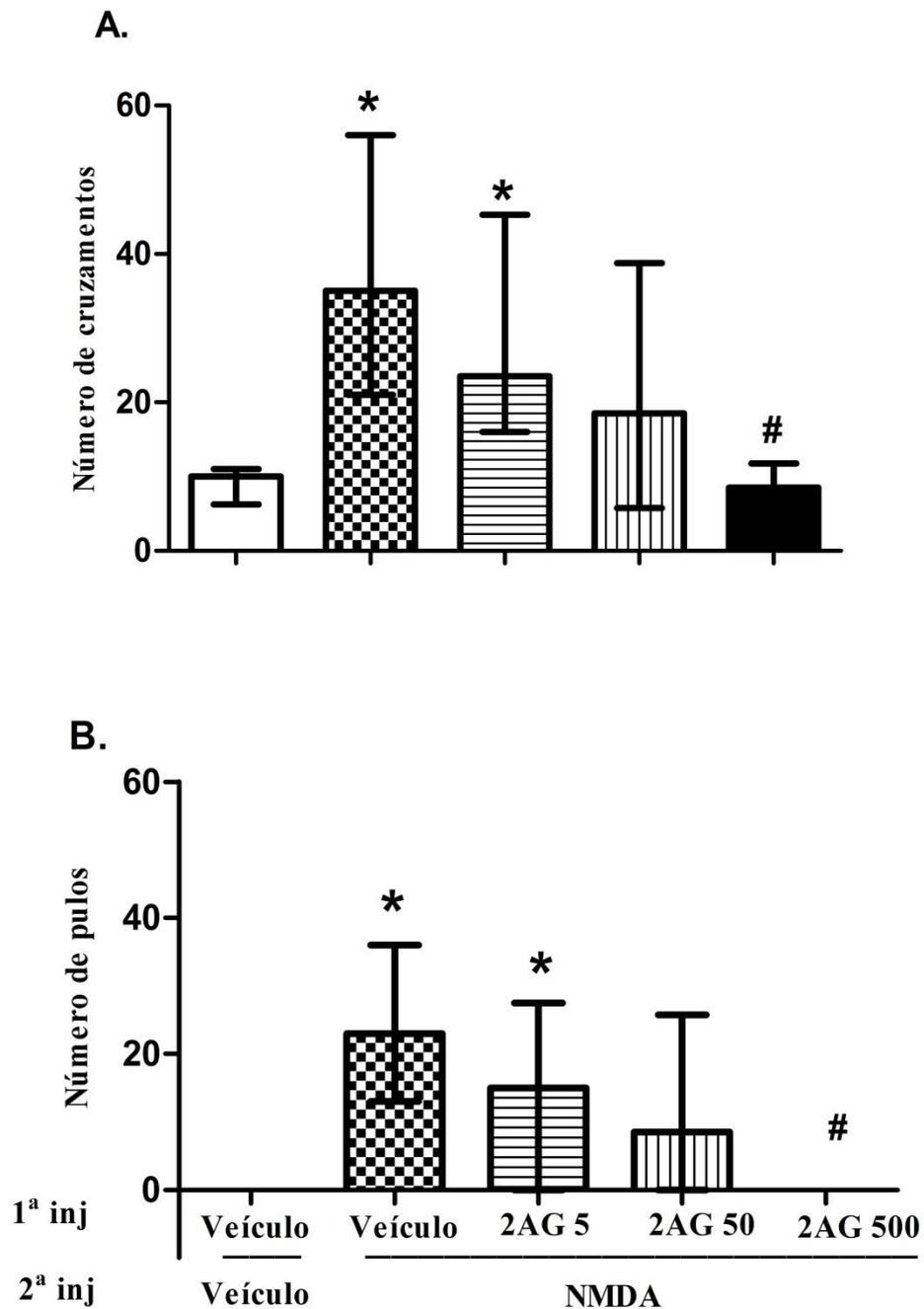


**Figura 12:** Efeito do MPEP (10 pmol), seguido por URB602 (100 pmol), administrado intra-SCPdl de ratos submetidos ao LCE. As barras representam a média  $\pm$  S.E.M. da percentagem de tempo gasto (A) e de entradas nos braços abertos (B) e o número de entradas nos braços fechados (C). \*Diferença estatisticamente significativa do grupo veículo + veículo ( $p < 0.05$ , ANOVA seguido por teste de Duncan;  $n = 7-9$ /grupo).

### **9. Efeito promovido pelo 2-AG sobre as respostas de fuga induzidas pelo NMDA intra-SCPdl em ratos expostos a caixa de observação.**

A administração do NMDA (1nmol/0.2 $\mu$ L) induziu reações de fuga que ocorreram a partir do início da injeção intra-SCPdl. Estas reações caracterizam-se por um aumento significativo no número de cruzamentos ( $H_5=13.70$ ;  $p=0.0083$ , Kruskal-Wallis, Figura 13A) e pulos ( $H_5=13.89$ ;  $p=0.0077$ , Kruskal-Wallis) nos animais quando comparados ao grupo controle (Figura 13B, Mann-Witney  $p<0.05$ ).

O pré-tratamento com 2-AG na dose de 50 pmol atenuou as respostas de fuga e a dose de 500 pmol/0.2 $\mu$ L foi capaz de bloquear significativamente estas reações induzidas pelo NMDA na SCPdl ( $p<0.01$ , Mann-Whitney), Figura 13A e 13B.

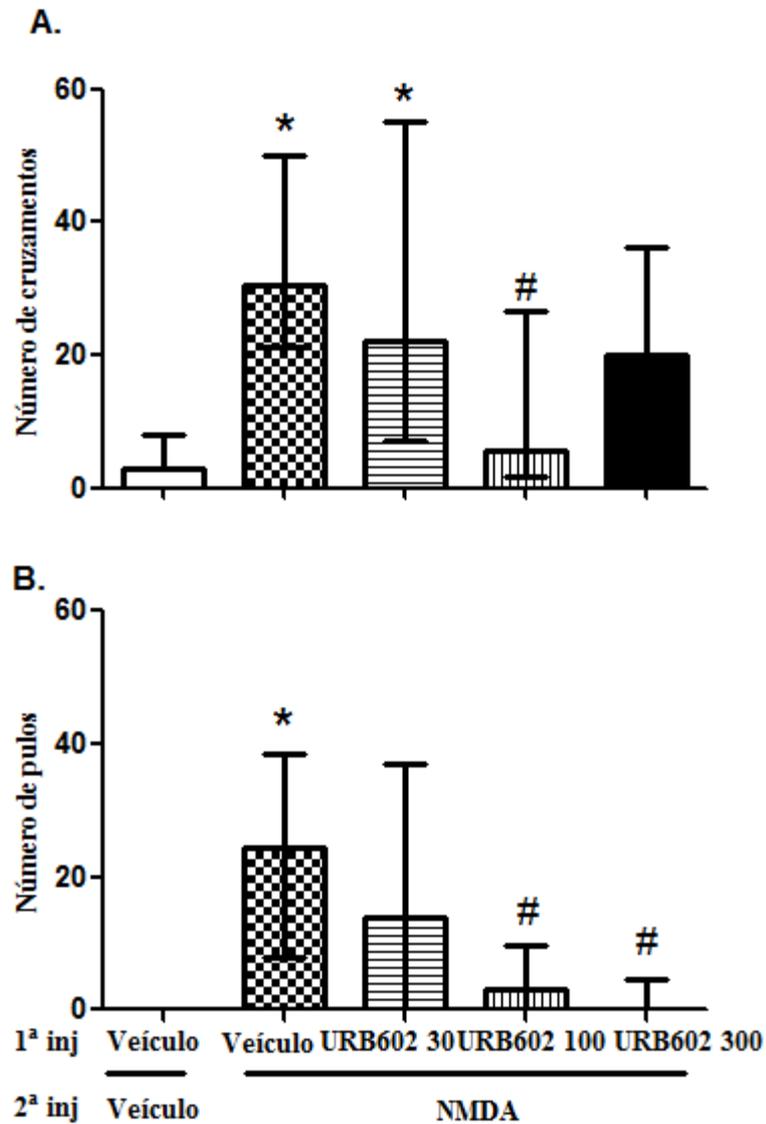


**Figura 13:** Efeito do 2-AG (5, 50 ou 500 pmol/0.2  $\mu$ L) na reação de fuga promovida pela injeção de NMDA (1 nmol/0.2 $\mu$ L) na SCPdl de ratos observados na caixa durante dois minutos a partir do início das injeções. As barras representam mediana  $\pm$  I.R do número de cruzamentos (A) e de pulos (B). (\* $p$ <0.001 em relação ao grupo veículo+veículo; # $p$ <0.01 em relação ao grupo veículo+NMDA; Kruskal Wallis seguido de Mann-Whitney;  $n$ =6-7/grupo).

#### **10. Efeito promovido pelo URB602 sobre as respostas de fuga induzidas pelo NMDA na SCPdl em ratos expostos a caixa de observação.**

A injeção intra-SCPdl do NMDA (1nmol/0.2µL) produziu reações de fuga caracterizadas por um aumento significativo no número de cruzamentos ( $H_5=13.16$ ;  $p=0.0105$ , Kruskal-Wallis) e pulos ( $H_5=12.75$ ;  $p=0.0126$ , Kruskal-Wallis) em relação ao grupo controle (Figura 14A e 14B respectivamente).

O pré-tratamento com URB602 (100 pmol/0.2µL) reduziu significativamente estas respostas induzidas pelo NMDA, demonstrado, pela diminuição do aumento no número de cruzamentos ( $p<0.05$ , Mann-Whitney; Figura 14A) e pulos ( $p<0.05$ , Mann-Whitney; Figura 14B). A dose de 300 pmol/0.2µL também reduziu o número de pulos ( $p<0.05$ , Mann-Whitney; Figura 14B).

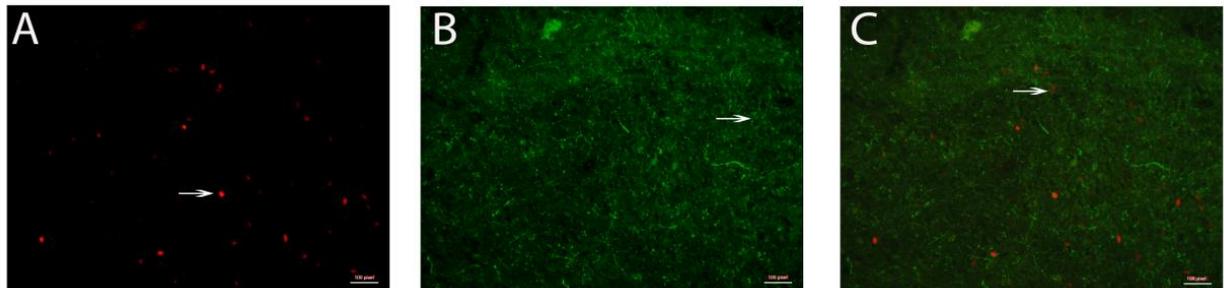


**Figura 14:** Efeito do URB602 (30, 100 ou 300 pmol/0.2µL) sobre a reação de fuga promovida pela injeção de NMDA (1 nmol/0.2µL) na SCPdl de ratos observados na caixa durante dois minutos a partir do início das injeções. As barras representam mediana ± I.R do número de cruzamentos (A) e de pulos (B). (\* $p < 0.001$  em relação ao grupo veículo+veículo; # $p < 0.01$  em relação ao grupo Veículo+NMDA; Kruskal Wallis seguido de Mann-Whitney;  $n=6-7$ /grupo).

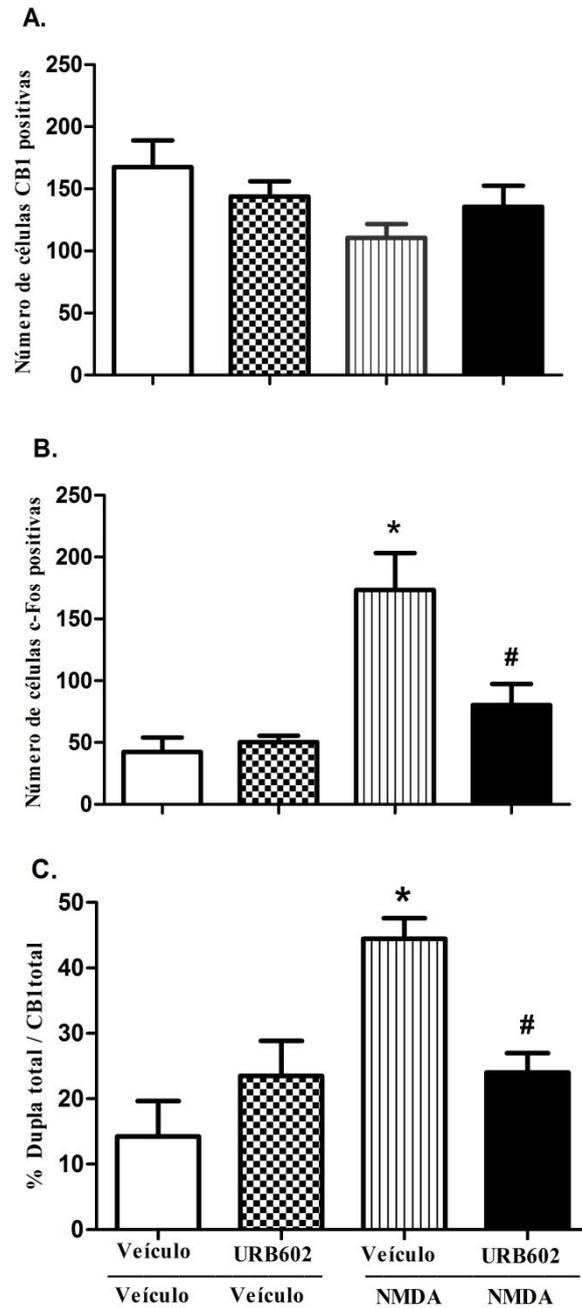
### 11. Efeito promovido pelo NMDA (1nmol/0.2 $\mu$ L, intra-SCPdl) sobre o número de células c-Fos positivas e rCB1 em ratos expostos a caixa de observação.

A ANOVA de duas vias revelou que injeção intra-SCPdl do NMDA [ $F_{(3,18)}=9.646$ ;  $p=0.0005$ ] promoveu um aumento no número de células c-Fos positivas na coluna dorsolateral da SCP em relação ao grupo veículo, enquanto, a administração intra-SCPdl do URB602 promoveu uma diminuição do número de células c-Fos em relação aos animais tratados com NMDA [ $F_{(3,18)}=9.646$ ;  $p=0.0005$ ], Figura 15B. Nenhuma alteração em relação a expressão de células CB1 foi observada, [ $F_{(3,18)}=2.211$ ; ns], Figura 15A.

Foi observado também que o NMDA [ $F_{(3,18)}=9.532$ ;  $p=0.0005$ ] induziu o aumento no número de células duplamente marcadas para CB1 e c-Fos na coluna dorsolateral da SCP, Figura 15C.



Fotomicrografias representativas de secções coronais da SCPdl. As amostras foram processadas para imunofluorescência para a detecção da proteína Fos (A), receptor CB1 (B) e dupla marcação Fos/CB1 (C). Aumento= 20x.

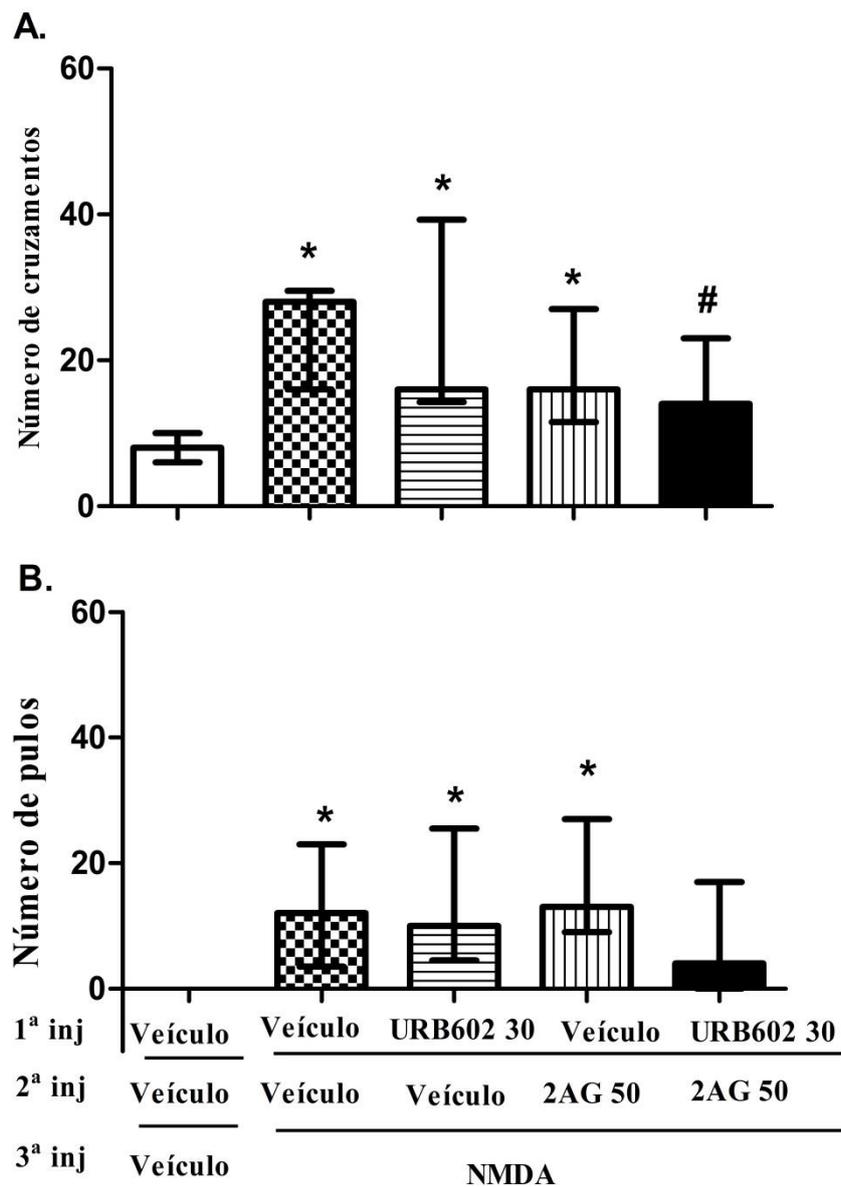


**Figura 15:** Efeito promovido pelo URB602 (100pmol/0.2µL) e NMDA (1nmol/0.2µL, intra-SCPdl) sobre o número de células CB1 e c-Fos positivas em ratos expostos a caixa de observação durante dois minutos a partir do início da injeção. As barras representam a média  $\pm$  S.E.M do número de células marcadas (\* $p < 0.01$  em relação ao grupo veículo+veículo, # $p < 0.01$  em relação ao grupo veículo+NMDA. Anova de duas vias, seguido do pós-teste de Bonferroni;  $n = 5-6$ /grupo).

**12. Efeito promovido pelo tratamento combinado do URB602 (30 pmol/0.2µL - dose não efetiva) e 2-AG (50 pmol/0.2µL - dose não efetiva) sobre as respostas de fuga promovidas pelo NMDA na SCPdl em ratos expostos a caixa de observação.**

A injeção intra-SCPdl do NMDA (1nmol/0.2µL) produziu reações de fuga caracterizadas por um aumento significativo no número de cruzamentos ( $H_5=17.17$ ;  $p=0.0018$ , Kruskal-Wallis) e pulos ( $H_5=16.54$ ;  $p=0.0024$ , Kruskal-Wallis) em relação ao grupo controle (Figura 16A e 16B, respectivamente).

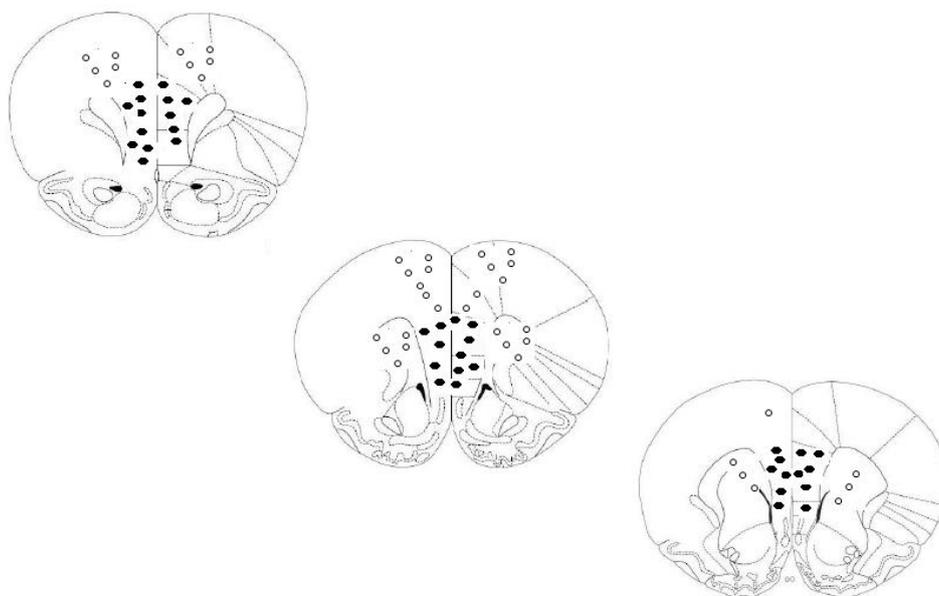
Tanto a injeção do URB602 (30 pmol/0.2µL) quanto a injeção de 2-AG (50 pmol/0.2µL) administradas isoladamente não reverteram o aumento do número de cruzamentos ( $p>0.05$ , Mann-Whitney) e pulos ( $p>0.05$ , Mann-Whitney) promovidos pelo NMDA. Porém, o pré-tratamento com URB602 (30 pmol/0.2µL) seguido da injeção de 2-AG (50 pmol/0.2µL), reverteu o aumento do número de cruzamentos promovido pelo NMDA ( $p<0.05$ , Mann-Whitney), Figura 16A.



**Figura 16:** Efeito promovido pelo tratamento combinado do URB602 (30 pmol/0.2 $\mu$ L - dose não efetiva) e 2-AG (50 pmol/0.2 $\mu$ L - dose não efetiva) sobre as respostas de fuga promovidas pela injeção de NMDA (1 nmol/0.2 $\mu$ L) na SCPdl de ratos observados na caixa durante dois minutos a partir do início das injeções. As barras representam mediana  $\pm$  I.R do número de cruzamentos (A) e de pulos (B). (\* $p$ <0.001 em relação ao grupo controle; # $p$ <0.01 em relação ao grupo Veículo+NMDA; Kruskal Wallis seguido de Mann-Whitney;  $n$ =6-7/grupo).

---

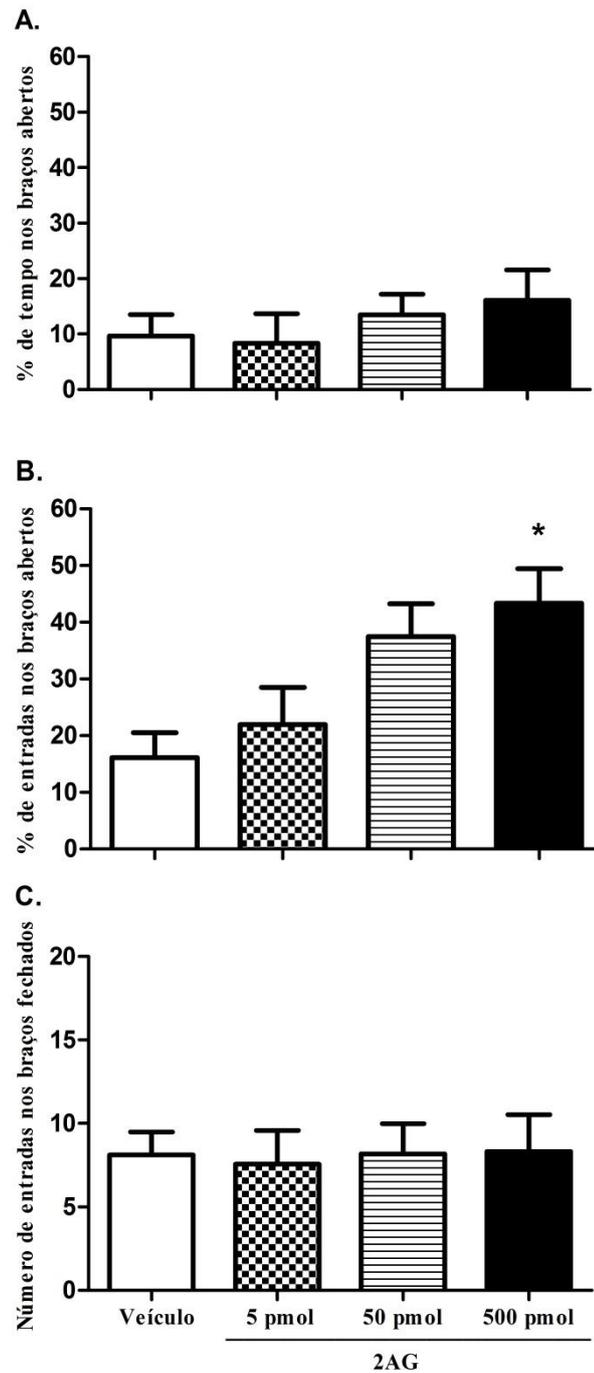
*RESULTADOS: CPFvm*



**Figura 17:** Localização de sítios de injeção em diagramas modificados do Atlas de PAXINOS e WATSON (1997). (●) intra-CPFvm. (○) fora-CPFvm.

**1. Efeito promovido pelo 2-AG intra-CPFvm em ratos expostos ao LCE.**

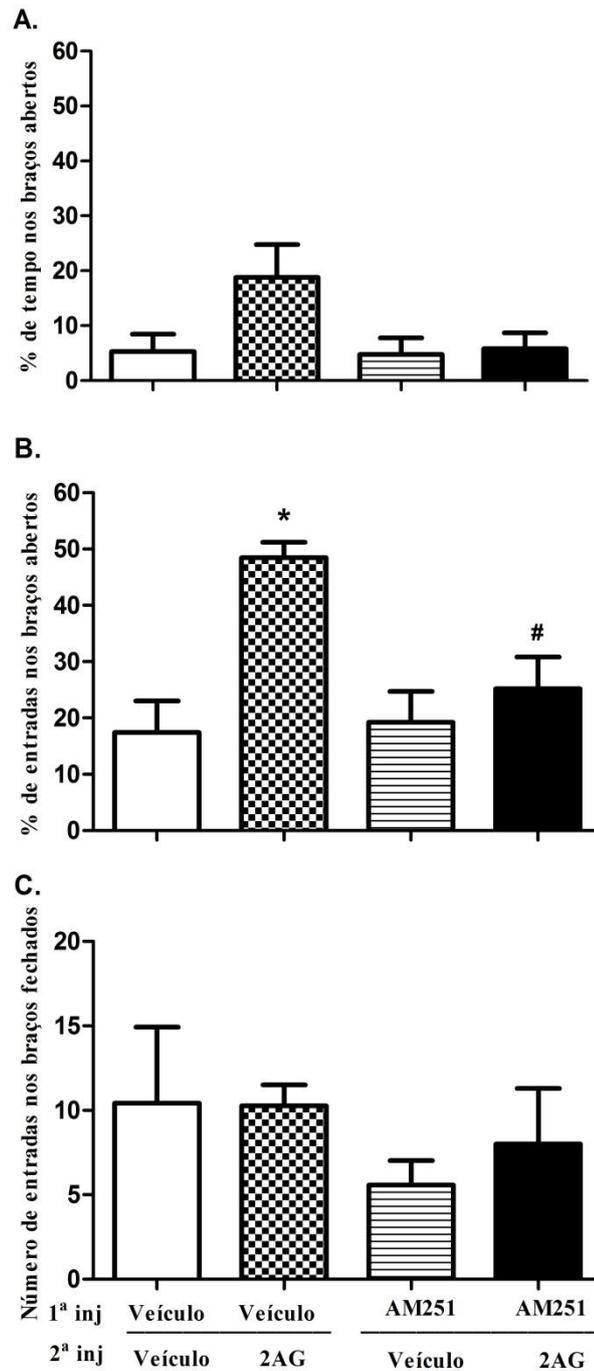
A injeção intra-CPFvm do 2-AG (500 pmol/0.2µL) promoveu o aumento significativo da porcentagem de entradas nos braços abertos em comparação ao grupo controle ( $F_{(3,35)}=4.704$   $p=0.0075$ , Anova seguida do teste de Duncan, Figura 18B). Em relação ao número de entradas nos braços fechados, não houve diferença estatística entre os grupos ( $F_{(3,35)}=0.0314$ , ns; Figura 18C), o que sugere que o 2-AG intra-CPFvm não é capaz de alterar a atividade locomotora basal dos animais.



**Figura 18:** Efeito do 2-AG (5, 50 ou 500 pmol/0.2µL) administrado intra-CPFvm em ratos submetidos ao LCE. As barras representam a média ± S.E.M. da porcentagem de tempo gasto (A) e de entradas nos braços abertos (B) e o número de entradas nos braços fechados (C). \*Diferença estatisticamente significativa do grupo veículo ( $p < 0.05$ , ANOVA seguido por teste de Duncan;  $n = 9-11$ /grupo).

## **2. Efeito promovido pelo AM251 sobre o comportamento tipo-ansiolítico promovido pelo 2-AG intra-CPFvm, em ratos expostos ao LCE.**

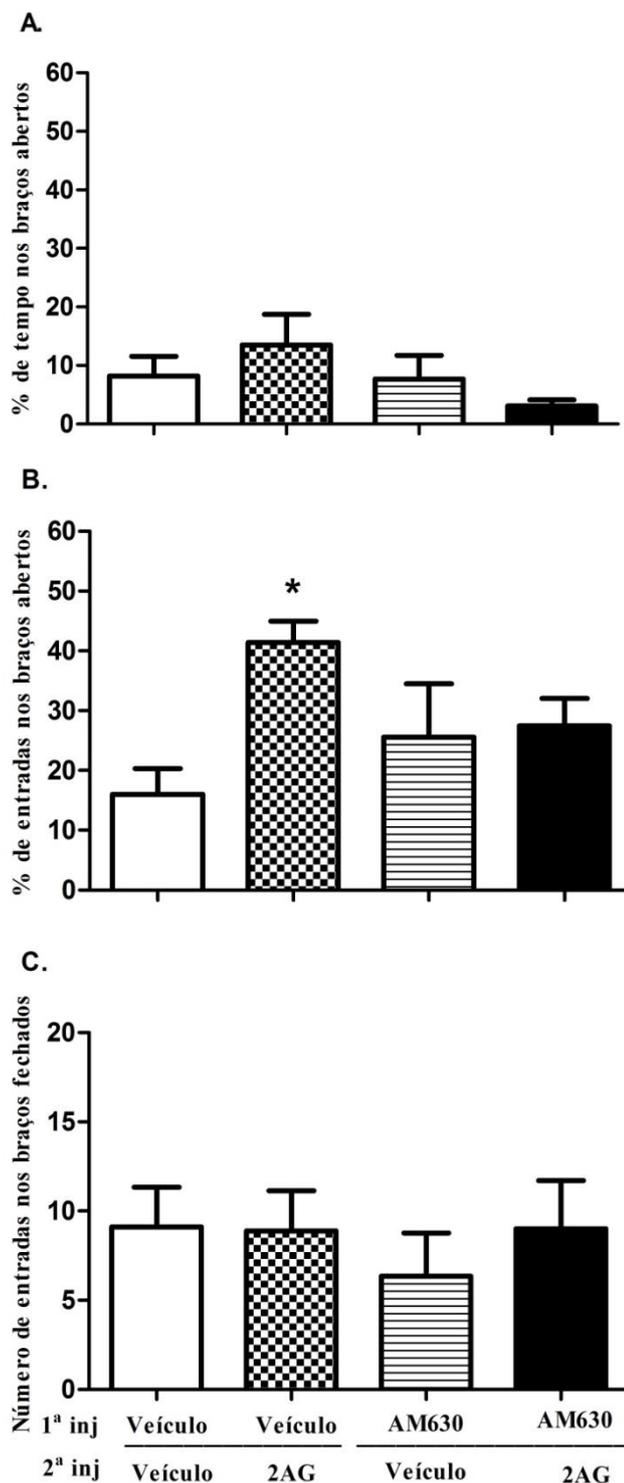
A administração do 2-AG (500 pmol/0.2µL) intra-CPFvm promoveu um efeito tipo-ansiolítico evidenciado pelo aumento na percentagem de entradas nos braços abertos do LCE ( $F_{(3,27)}=9.539$ ,  $p=0.0002$ ; Anova seguida do teste de Duncan, Figura 19B), sendo que o pré-tratamento com o antagonista de rCB1, o AM251 (100 pmol/0.2µL), bloqueou este efeito (teste de Duncan,  $p<0.05$ , Figura 19A). Nenhum efeito foi encontrado no número de entradas nos braços fechados ( $F_{(3,27)}=0.6593$ , ns), Figura 19C.



**Figura 19:** Efeito do pré-tratamento com AM251 (100 pmol), seguido por 2-AG (500 pmol) intra-CPFvm em ratos submetidos ao LCE. As barras representam a média  $\pm$  S.E.M. da porcentagem de tempo gasto (A) e de entradas nos braços abertos (B) e o número de entradas nos braços fechados (C). \*Diferença estatisticamente significativa do grupo veículo + veículo e # indica diferença estatisticamente significativa do grupo veículo + 2-AG (500 pmol,  $p < 0.05$ , ANOVA seguido por teste de Duncan;  $n = 6-8$ /grupo).

### **3. Efeito promovido pelo AM630 (antagonista rCB2) sobre o comportamento tipo-ansiolítico promovido pelo 2-AG intra-CPFvm, em ratos expostos ao LCE.**

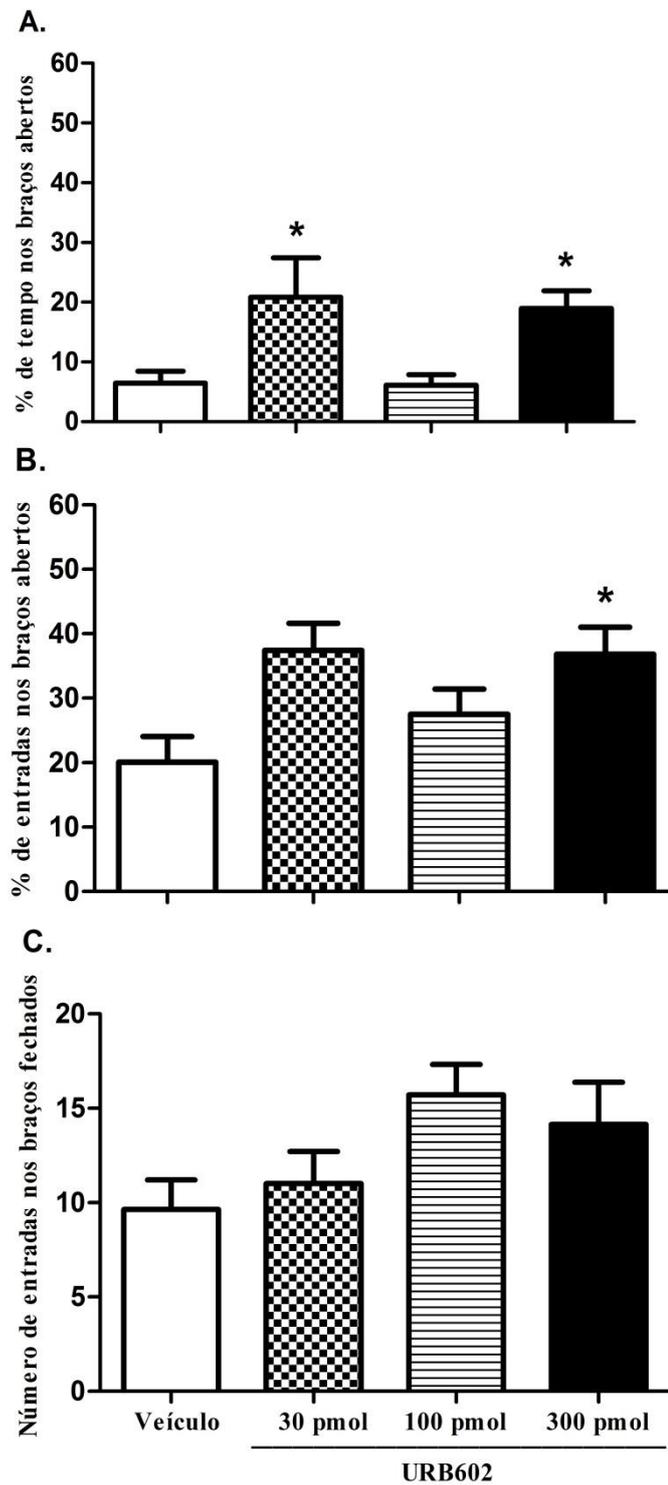
O efeito tipo-ansiolítico promovido pelo 2-AG ( $F_{(3,32)}=5.012$ ,  $p=0.0064$ , Anova seguida do teste de Duncan) foi parcialmente bloqueado pelo pré-tratamento com AM630 (1000 pmol/0.2 $\mu$ L) evidenciado pela redução do aumento da porcentagem de entradas nos braços abertos do LCE (teste de Duncan,  $p<0.05$ ; Figura 20A). Não foi observado nenhum efeito sobre o número de entradas nos braços fechados ( $F_{(3,32)}=0,2423$ , ns, Figura 20C), sugerindo que este efeito não decorre de alteração da atividade locomotora.



**Figura 20:** Efeito do pré-tratamento com AM630 (1000 pmol), seguido por 2-AG (500 pmol), administrado intra-CPFvm de ratos submetidos ao LCE. As barras representam a média  $\pm$  S.E.M. da porcentagem de tempo gasto (A) e de entradas nos braços abertos (B) e o número de entradas nos braços fechados (C). \*Diferença estatisticamente significativa do grupo veículo, ( $p < 0.05$ , ANOVA seguido por teste de Duncan;  $n = 6-9$ /grupo).

#### **4. Efeito promovido pelo URB602 (inibidor da MGL, intra-CPFvm) em ratos expostos ao LCE.**

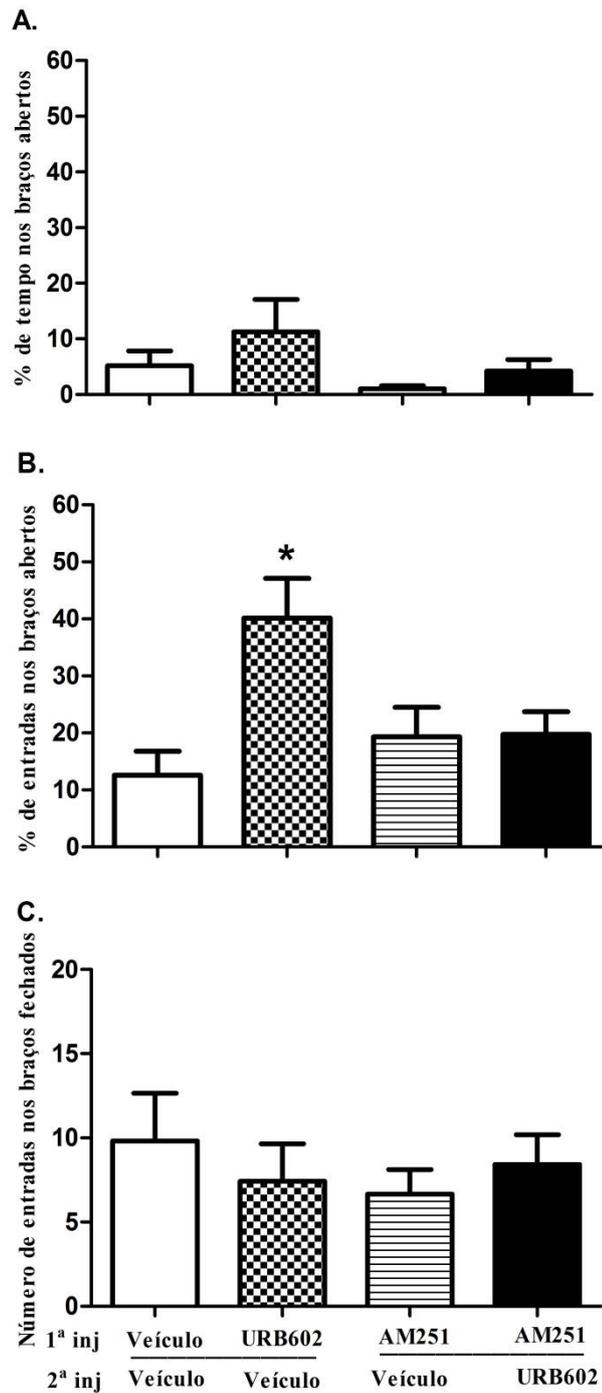
O inibidor da MGL (enzima responsável pela hidrólise do 2-AG), URB602 (30 e 300 pmol/0.2µL), intra-CPFvm, aumentou significativamente a porcentagem de tempo ( $F_{(3,27)}=6.282$ ,  $p=0.0024$ , Anova seguida do teste de Duncan) gasto nos braços abertos quando comparado ao grupo controle (Figura 21A), bem como, o URB602 (300 pmol/0.2µL) promoveu o aumento da porcentagem de entradas nos braços abertos ( $F_{(3,27)}=4.148$ ,  $p=0.0158$ , Anova seguida do teste de Duncan), Figura 21B. Nenhuma alteração foi encontrada no número de entradas nos braços fechados ( $F_{(3,27)}=2.555$ , ns, Figura 21C), o que sugere que o URB602 não alterou a atividade locomotora.



**Figura 21:** Efeito do URB602 (30, 100 ou 300 pmol/0.2  $\mu$ L) intra-CPFvm de ratos submetidos ao LCE. As barras representam a média  $\pm$  S.E.M. da porcentagem de tempo gasto (A) e de entradas nos braços abertos (B) e o número de entradas nos braços fechados (C). \*Diferença estatisticamente significativa do grupo veículo ( $p < 0.05$ , ANOVA seguido por teste de Duncan;  $n = 6-11$ /grupo).

**5. Efeito promovido pelo AM251 (antagonista rCB1) sobre o comportamento tipo-ansiolítico promovido pelo URB602 intra-CPFvm, em ratos expostos ao LCE.**

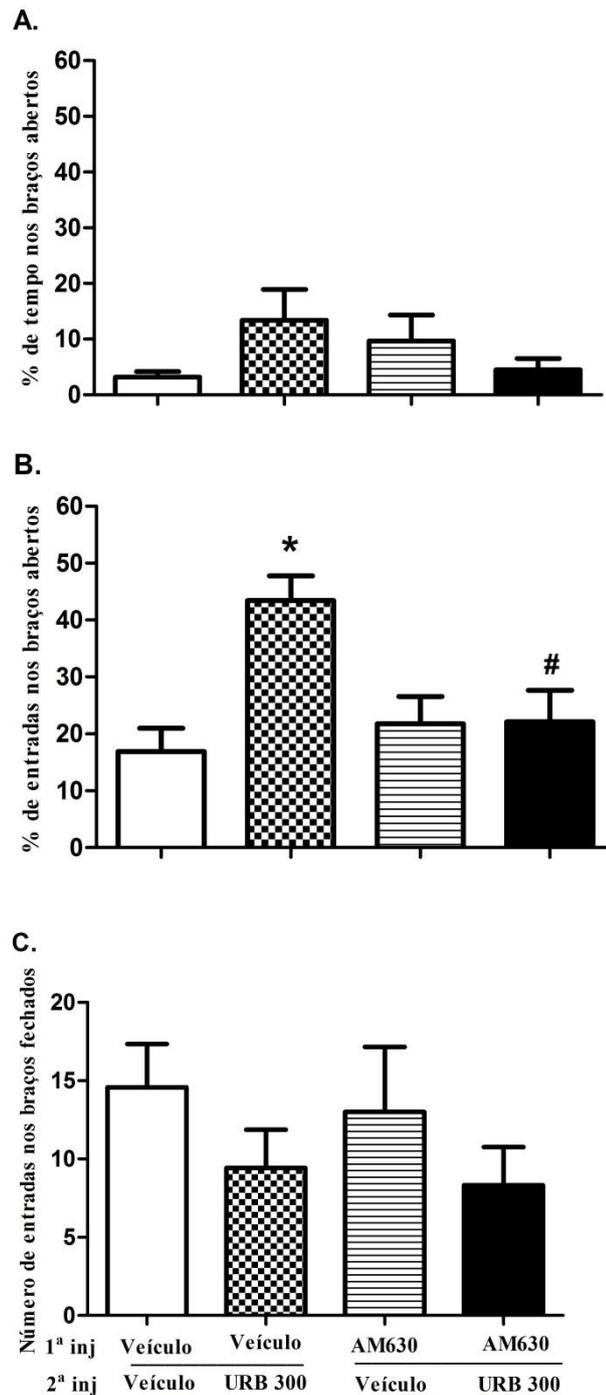
A injeção intra-CPFvm do URB602 (300 pmol/0.2µL aumentou significativamente a porcentagem de entradas nos braços abertos ( $F_{(3,22)}=5.195$ ,  $p=0.0073$ ; Anova seguida do teste de Duncan) e este efeito foi atenuado pelo AM251 (teste de Duncan,  $p<0.05$ , Figura 22B). Nenhum efeito foi observado no número de entradas braços fechados ( $F_{(3,22)}=0.3939$ , ns; Figura 22C).



**Figura 22:** Efeito do AM251 (100 pmol), seguido por URB602 (300 pmol), administrado intra-CPFvm de ratos submetidos ao LCE. As barras representam a média  $\pm$  S.E.M. da porcentagem de tempo gasto (A) e de entradas nos braços abertos (B) e o número de entradas nos braços fechados (C). \*Diferença estatisticamente significativa do grupo veículo + veículo ( $p < 0.05$ , ANOVA seguido por teste de Duncan;  $n = 6-7$ /grupo).

**6. Efeito promovido pelo AM630 (antagonista rCB2) sobre o comportamento tipo-ansiolítico promovido pelo URB602 intra-CPFvm, em ratos expostos ao LCE.**

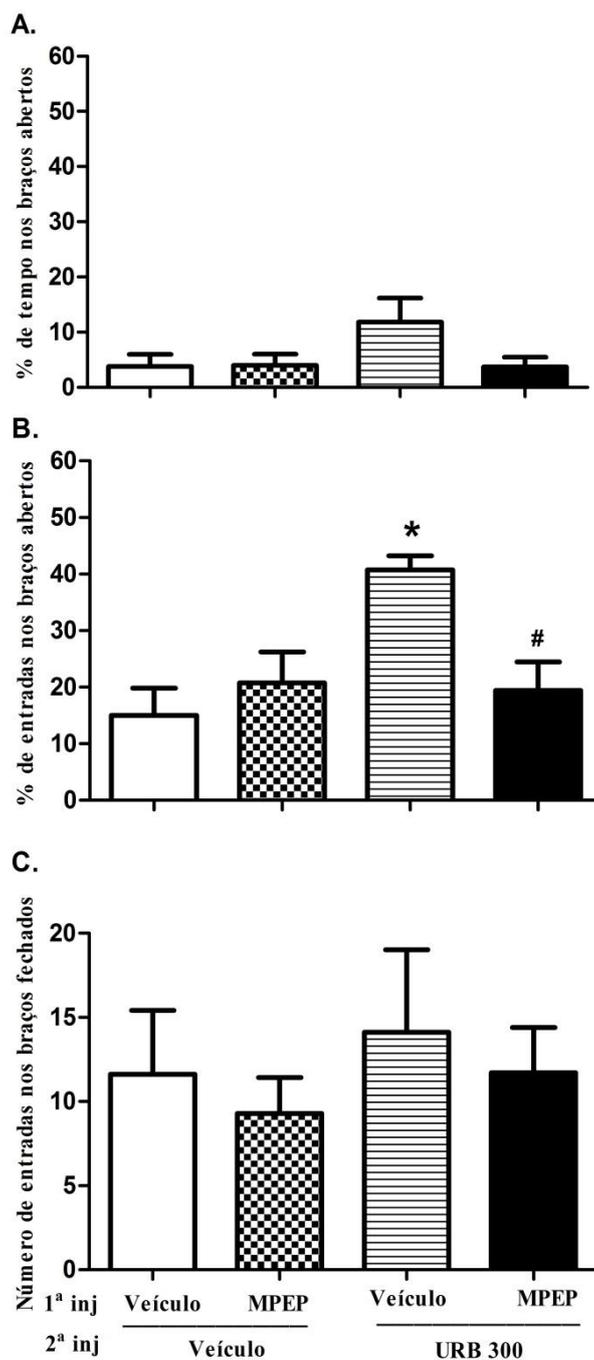
A administração do URB602 (300 pmol/ 0.2µL) promoveu o aumento da porcentagem de entradas nos braços abertos do LCE ( $F_{(3,22)}=6.809$ ,  $p=0.0020$ ; Anova seguida do teste de Duncan) sendo esse efeito, bloqueado com o pré-tratamento com AM630 (1000 pmol/0.2µL, teste de Duncan,  $p<0.05$ ), Figura 23B). Nenhum efeito foi observado no número de entradas nos braços fechados ( $F_{(3,22)}=0.9791$ , ns; Figura 23C).



**Figura 23:** Efeito do AM630 (1000 pmol), seguido por URB602 (300 pmol), administrado intra-CPFvm de ratos submetidos ao LCE. As barras representam a média  $\pm$  S.E.M. da porcentagem de tempo gasto (A) e de entradas nos braços abertos (B) e o número de entradas nos braços fechados (C). \*Diferença estatisticamente significativa do grupo veículo + veículo e # indica diferença estatisticamente significativa do grupo veículo + URB602 (300 pmol,  $p < 0.05$ , ANOVA seguido por teste de Duncan;  $n = 6-7$ /grupo).

**7. Efeito promovido pelo MPEP (antagonista mGluR5) sobre o comportamento tipo-ansiolítico promovido pelo URB602 intra-CPFvm, em ratos expostos ao LCE.**

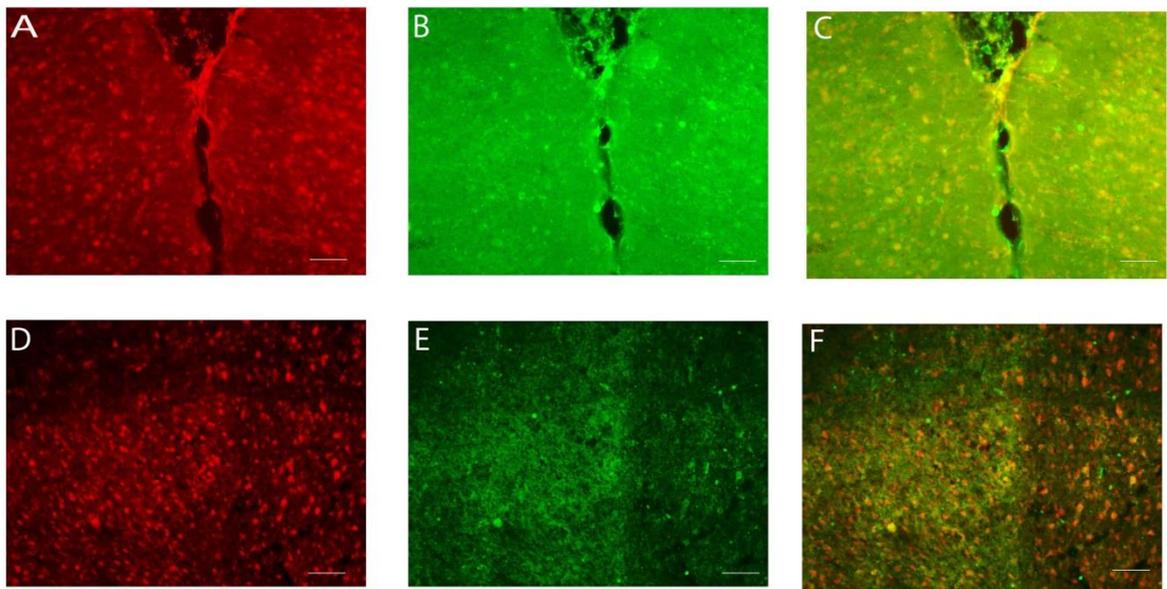
O URB602 intra-CPFvm promoveu o aumento da porcentagem de entradas nos braços abertos do LCE ( $F_{(3,30)}=6.761$ ,  $p=0.0016$ ; Anova seguida do teste de Duncan) e o pré-tratamento com MPEP (10 pmol/0.2 $\mu$ L) bloqueou esse efeito (teste de Duncan,  $p<0.05$ ), Figura 24B. Nenhum efeito foi observado no número de entradas nos braços fechados ( $F_{(3,30)}=0.2866$ , ns; Figura 24C).



**Figura 24:** Efeito do MPEP (10 pmol), seguido por URB602 (300 pmol), administrado intra-CPFvm de ratos submetidos ao LCE. As barras representam a média  $\pm$  S.E.M. da porcentagem de tempo gasto (A) e de entradas nos braços abertos (B) e o número de entradas nos braços fechados (C). \*Diferença estatisticamente significativa do grupo veículo + veículo e # indica diferença estatisticamente significativa do grupo veículo + URB602 (300 pmol,  $p < 0.05$ , ANOVA seguido por teste de Duncan;  $n = 7-8$ /grupo).

## 8. Verificação da co-expressão da DGL- $\alpha$ (enzima responsável pela síntese do 2-AG) e mGluR5 na SCPdl e CPFvm.

Os animais foram eutanasiados para remoção do encéfalo e posteriormente as secções do córtex e da substancia cinzenta periaquedutal obtidas, foram submetidas ao ensaio de imunofluorescência para marcação da enzima DGL- $\alpha$  e mGluR5.



**Figura 25:** Fotomicrografias representativas de secções coronais da SCPdl e CPFvm. As amostras foram processadas para imunofluorescência para a detecção da enzima DGL- $\alpha$  e mGluR5. Aumento= 20x. **A.** Expressão da enzima DGL- $\alpha$  no CPFvm. **B.** Expressão de mGluR5 no CPFvm. **C.** Co-expressão da enzima DGL- $\alpha$  e mGluR5 no CPFvm. **D.** Expressão da enzima DGL- $\alpha$  na SCPdl **E.** Expressão de mGluR5 na SCPdl. **F.** Co-expressão da enzima DGL- $\alpha$  e mGluR5 na SCPdl.

---

*DISCUSSÃO*

O comportamento defensivo caracteriza-se pelas respostas desencadeadas em situações ameaçadoras as quais são adaptativas ao estímulo de perigo. Por consequência, tais comportamentos manifestam-se de formas distintas, sendo que a presença do perigo iminente desencadeia respostas que variam desde fuga até mesmo ataque, enquanto que a presença distal do perigo desencadeia comportamentos de avaliação de risco e esquiva (Blanchard and Blanchard 1989; McGregor, Hargreaves et al. 2004; McNaughton and Corr 2004; Maren 2007; Blanchard and Blanchard 2008).

Neste trabalho avaliamos o comportamento animal relacionado aos transtornos de ansiedade, o LCE, modelo animal preditivo de ansiedade generalizada e o modelo de fuga induzido pelo NMDA, preditivo de ataques de pânico (Handley and Mithani 1984; Deakin and Graeff 1991; Lovick 2000).

Corroborando nossa hipótese inicial, nossos resultados demonstraram que a neurotransmissão canabinoide mediada pelo endocanabinoide 2-AG induziu respostas tipo-ansiolítica e anti-pânico.

Nesse sentido, demonstramos que a administração intra-SCPdl do endocanabinoide 2-AG promoveu efeito tipo-ansiolítico no LCE, evidenciado pelo aumento da exploração dos braços abertos (Pellow and File 1986). Esse mesmo efeito também foi observado com o URB602, que promoveu a facilitação das ações do 2-AG através da inibição da sua hidrólise. Ao investigar os mecanismos envolvidos nessa resposta, verificou-se que ambos os rCB1 e rCB2 contribuem para o efeito tipo-ansiolítico desse composto.

Esses resultados corroboram trabalhos anteriores que sugerem que o sistema endocanabinoide modula respostas de ansiedade em animais de laboratório. A injeção de anandamida intra-SCP promoveu efeito tipo-ansiolítico em animais submetidos ao LCE (Moreira, Aguiar et al. 2007) e ao VCT (Lisboa, Resstel et al. 2008) sendo esse efeito bloqueado pelo pré-tratamento com o antagonista de rCB1. Em consonância, outro estudo demonstrou que a injeção bilateral do 2-AG na amígdala basolateral reduziu o tempo de *freezing* em ratos submetidos ao teste do medo condicionado ao contexto (Rea, Olango et al. 2013).

Nossos dados demonstram que o 2-AG na dose intermediária promoveu efeito tipo-ansiolítico no teste do LCE, sendo a menor e a maior dose desse composto, ineficazes. Dessa forma, o efeito promovido pelo 2-AG intra-SCPdl

caracterizou-se por uma curva dose-resposta em forma de sino. Esse mesmo tipo de curva já foi também descrito para outros canabinoides no teste do LCE (Onaivi, Green et al. 1990; Patel and Hillard 2006; Moreira, Aguiar et al. 2007). Além disso, injeções locais do  $\Delta^9$ -THC, principal substância psicoativa presente na *Cannabis sativa*, em estruturas cerebrais responsáveis pelo controle dos comportamentos defensivos tais como a amígdala, hipocampo e CPF, também induziram esse perfil de ação (Rubino, Guidali et al. 2008).

Diversos estudos sugerem que esse efeito demonstrado pela curva em forma de sino invertida seja relacionado ao fato que os canabinoides são sintetizados sob demanda. Dessa forma, esse efeito pode ser influenciado por fatores ambientais como o nível de estresse, além da capacidade que os canabinoides apresentam de modular a liberação de outros neurotransmissores como glutamato e GABA que possuem ações opostas sobre estados de ansiedade (Krieger and Graeff 1985; Molchanov and Guimaraes 1999; Viveros, Marco et al. 2005; Di Marzo 2008; Moreira and Lutz 2008; Rey, Purrio et al. 2012).

Adicionalmente, trabalhos recentes sugerem que durante situações aversivas a sinalização do 2-AG pode ser estimulada no intuito de inibir as respostas defensivas. Nesse contexto, Gregg e colaboradores demonstraram a localização da enzima responsável pela síntese de 2-AG, a DGL- $\alpha$ , na SCPdl e que a aplicação do estímulo aversivo (choque nas patas de ratos) desencadeou a rápida formação de 2-AG nesta região, sendo este efeito revertido pela injeção local de um inibidor seletivo da DGL- $\alpha$  (Gregg, Jung et al. 2012).

Conforme descrito anteriormente, a SCP juntamente com o hipotálamo e a amígdala constituem um sistema organizado responsável pela expressão de alterações comportamentais e neurovegetativas em resposta a estímulos aversivos, denominado sistema encefálico de defesa (Graeff 1990).

Em nosso trabalho demonstramos que a administração intra-SCPdl do URB602, inibidor da hidrólise do 2-AG, induziu efeito tipo-ansiolítico em animais expostos ao LCE. Corroborando nossos dados, estudos prévios demonstraram que a injeção sistêmica do JZL-184 (outro inibidor da hidrólise do 2-AG) promoveu efeito tipo-ansiolítico no LCE e no labirinto em zero, bem como no teste de enterrar bolinhas (Busquets-Garcia, Puighermanal et al. 2011; Kinsey, Nomura et al. 2011; Aliczki, Balogh et al. 2012).

Tal efeito, induzido pelo 2-AG e pelo inibidor da MGL, foi bloqueado com a administração dos antagonistas AM251 e AM630, sugerindo que ambos os rCB1 e rCB2 respectivamente, estão envolvidos nesta resposta do LCE. Nesse contexto, outros estudos demonstraram que o efeito tipo-ansiolítico induzido pelo JZL-184 é mediado pela ativação de rCB1 e rCB2 (Busquets-Garcia, Puighermanal et al. 2011; Kinsey, O'Neal et al. 2011; Sciolino, Zhou et al. 2011; Aliczki, Balogh et al. 2012).

Dessa forma, enquanto a AEA e o inibidor da FAAH, promovem efeitos anti-aversivos através de mecanismos via rCB1, a resposta tipo-ansiolítica observada após o aumento da sinalização de 2-AG foi dependente da ativação de ambos rCB1 e rCB2. Cabe ressaltar que a administração desses antagonistas sozinhos não foi capaz de induzir nenhuma alteração comportamental nos animais submetidos ao LCE.

Assim, observamos que o efeito induzido pelo 2-AG é decorrente da participação dos rCB1 e rCB2 (Devane, Breuer et al. 1992; Felder, Briley et al. 1993; Mechoulam, Ben-Shabat et al. 1995). Os primeiros estudos que foram conduzidos relativos à descoberta e localização dos rCB1 demonstraram a localização desse tipo de receptor em diversas áreas do SNC (Devane, Dysarz et al. 1988; Herkenham 1991). De maneira diferente, a localização dos rCB2 foi inicialmente descrita em células do sistema imune (Munro, Thomas et al. 1993), entretanto, estudos recentes indicam que os rCB2 são também expressos em neurônios de diversas estruturas cerebrais e podem modular comportamentos defensivos, conforme demonstramos (Van Sickle, Duncan et al. 2005; Onaivi 2006; Garcia-Gutierrez and Manzanares 2011; Ortega-Alvaro, Aracil-Fernandez et al. 2011). Em consonância García-Gutiérrez & Manzanares demonstraram que animais que super expressam rCB2 apresentaram uma menor susceptibilidade à ansiedade (Garcia-Gutierrez and Manzanares 2011).

Além dos receptores canabinoides, diversos trabalhos demonstram que os receptores metabotrópicos do glutamato estão envolvidos na mediação de respostas defensivas [para revisão ver (Millan 2003)]. Lima e colaboradores demonstraram que a administração intra-SCPdl do tACPD e tADA (agonistas do grupo 1 de mGluR) promoveram o aumento do número de cruzamentos e pulos caracterizando respostas de fuga; esse efeito, foi bloqueado pelo pré-tratamento com o MPEP [antagonista mGluR5 (Lima, Molchanov et al. 2008)].

Ainda, a administração do MPEP induziu respostas tipo-ansiolíticas nos testes de interação social, *Geller-Seifter*, sobressalto potencializado pelo medo e na caixa claro-escuro (Spooren, Vassout et al. 2000; Tatarczynska, Klodzinska et al. 2001; Spooren and Gasparini 2004; Ballard, Woolley et al. 2005; Mikulecka and Mares 2009).

Adicionalmente, alguns estudos sugerem uma interação entre os mGluR5 e os efeitos promovidos pelo sistema endocanabinoide (Calignano, Katona et al. 2000; Hajos, Katona et al. 2000; Di Marzo, Bisogno et al. 2001; Kreitzer and Regehr 2001). Nesse sentido, a administração do antagonista de mGluR5, bloqueou o efeito antinociceptivo produzido pelo WIN 55,212-2 (agonista de rCB1 e rCB2) na SCP (Palazzo, Marabese et al. 2001).

Trabalhos *in vitro*, sugeriram pela primeira vez que a formação de 2-AG está relacionada com a ativação de receptores metabotrópicos glutamatérgicos do tipo 5 (mGluR5) pois a ativação desses receptores estimulou a formação de 2-AG a partir da enzima DGL (Chevaleyre and Castillo 2003; Jung, Mangieri et al. 2005; Jung, Astarita et al. 2007).

O papel da DGL e consequentemente dos efeitos mediados pelo 2-AG no comportamento relacionado à ansiedade foi demonstrado recentemente no estudo realizado por Shonesy e colaboradores (2014) em que camundongos nocaute para a enzima DGL- $\alpha$  apresentaram comportamento tipo-ansio gênico nos testes da caixa claro-escuro e no campo aberto (Shonesy, Bluett et al. 2014). Ressaltando a interação entre os mGluR5 e a DGL, foi observado que nas sinapses do SNC, a DGL é co-expressa com receptores mGluR5, sugerindo que a formação de 2-AG *in vivo* também relaciona-se com a ativação desse receptor (Maejima, Hashimoto et al. 2001).

Nesse sentido, estudos conduzidos por Gregg et al (2012) mostraram que a estimulação de mGluR5 na SCPdl aumentou a formação de 2-AG e aumentou a antinocicepção induzida pelo estresse por um mecanismo dependente da DGL, sugerindo mais uma vez que a ativação desses receptores é necessária para a formação de 2AG. Adicionalmente, a inibição da DGL diminuiu a formação de 2-AG sem alterar os níveis de AEA. Ainda, os receptores mGluR5 estavam co-expressos com a enzima DGL em regiões pós-sinápticas da SCP, reforçando a hipótese de que a via mGluR5-DGL é

importante para a formação de 2-AG nessa região e conseqüentemente para os seus efeitos (Gregg, Jung et al. 2012) .

Em nosso trabalho, utilizando o MPEP (intra-SCPdl) em doses ineficazes [uma vez que trabalhos anteriores já demonstraram que o antagonismo de mGluR5 é capaz de induzir respostas anti-aversivas (Spooren, Vassout et al. 2000; Tatarczynska, Klodzinska et al. 2001; Spooren and Gasparini 2004; Ballard, Woolley et al. 2005; Lima, Molchanov et al. 2008; Mikulecka and Mares 2009)], demonstramos que o efeito tipo-ansiolítico mediado pelo URB602 é dependente da ativação de mGluR5. Diante desse resultado, sugerimos que é necessária a ativação dos mGluR5 para que ocorra a síntese do 2-AG, e, uma vez sintetizado possa induzir resposta tipo-ansiolítica através da inibição da enzima responsável pela sua hidrólise (promovida pelo URB602).

Uma vez elucidado o papel do 2-AG e do inibidor da monoacilglicerol intra-SCPdl no modelo animal de ansiedade, o LCE, verificou-se o envolvimento desses compostos no modelo animal de ataque de pânico induzido pela administração intra-SCPdl do NMDA.

Desde estudos de Hunsperger nas décadas de 50 e 60, sabe-se que a SCP possui um forte envolvimento com a deflagração de comportamentos panicogênicos tanto em animais quanto em humanos (Vianna and Brandao 2003). Nesse sentido, trabalhos prévios demonstraram que a administração de glutamato ou de agonistas dos receptores NMDA em regiões relacionadas com comportamento defensivo como por exemplo, a SCPdl, induz respostas de fuga (Krieger and Graeff 1985; Carrive 1993; Bittencourt, Carobrez et al. 2004; Aguiar, Moreira et al. 2006; Almeida-Santos, Moreira et al. 2013). Essas respostas foram acompanhadas por uma intensa ativação da proteína Fos em estruturas como o núcleo pré-mamilar dorsal, hipotálamo, colículo inferior, núcleo dorsal da rafe e SCPdl (Brandao, Borelli et al. 2005; Ferreira-Netto, Borelli et al. 2005), bem como a ocorrência de reações autonômicas, como o aumento de pressão arterial e frequência cardíaca (Carrive 1993; da Silva, Menezes et al. 2006).

De igual maneira nossos resultados demonstram que a administração intra-SCPdl do NMDA promoveu reações de fuga caracterizadas pelo aumento do número de cruzamentos e pulos na caixa de observação. Tais parâmetros são propostos como reflexo de comportamento de ataques de pânico em ratos

(Vargas and Schenberg 2001; Aguiar, Moreira et al. 2006; Del-Ben and Graeff 2009; Almeida-Santos, Moreira et al. 2013).

Da mesma forma que a ativação dos receptores NMDA é capaz de induzir respostas aversivas, a administração de antagonistas de receptores NMDA atenua respostas defensivas observadas após a exposição ao odor do predador, como também induz efeitos do tipo ansiolítico em diferentes modelos de ansiedade (Guimaraes, Carobrez et al. 1991; Blanchard, Blanchard et al. 1992; Adamec, Burton et al. 1999; Moreira, Molchanov et al. 2004; Jardim, Aguiar et al. 2005; Kincheski and Carobrez 2010). Em conjunto, esses dados sustentam a hipótese do envolvimento dos receptores NMDA na elaboração das respostas defensivas, possivelmente facilitando-as.

Assim como no LCE, a administração do 2-AG intra-SCPdl inibiu as respostas aversivas, uma vez que esse endocanabinoide bloqueou as respostas de fuga evidenciadas no nosso trabalho, pela diminuição no número de cruzamentos e de pulos na caixa de observação. Entretanto, diferente do LCE, no modelo de pânico induzido pelo NMDA intra-SCPdl, apenas a maior dose do 2-AG foi capaz de induzir comportamento anti-pânico. Tal diferença pode ser atribuída ao fato que o LCE consiste em um modelo mais etológico e menos aversivo do que a estimulação química da SCP pelo NMDA, além de não alterar a atividade exploratória basal dos roedores (Handley and Mithani 1984; File 1992).

Corroborando nosso resultado, no mesmo modelo de pânico induzido por agonistas de receptores glutamatérgicos, Finn e colaboradores demonstraram que a administração intra-SCP dorsal de HU210, um canabinoide sintético, atenuou as respostas de fuga (Finn, Jhaveri et al. 2003). Nesse sentido, trabalhos do nosso grupo demonstraram que a injeção local do ACEA [agonista canabinoide (Hillard, Manna et al. 1999)] foi capaz de reverter as respostas de fuga induzidas pelo NMDA intra-SCPdl (Viana, Hott et al. 2014) e pela estimulação elétrica da SCP dorsal (Casarotto, Terzian et al. 2012), bem como promoveu efeito anti-pânico na tarefa de fuga do labirinto em T elevado [LTE (Batista et al. 2013, dados não publicados)].

O mecanismo envolvido nessa resposta anti-pânico possivelmente está relacionado com a inibição dos canais para  $Ca^{2+}$  e abertura dos canais para  $K^{+}$  decorrentes da ativação de rCBs os quais resultam na hiperpolarização

neuronal com consequente diminuição da liberação de diversos neurotransmissores, a citar o glutamato (Vaughan, Connor et al. 2000; Gerdeman and Lovinger 2001; Huang, Lo et al. 2001; Wang 2003).

De maneira similar ao 2-AG, o inibidor da MGL intra-SCPdl também induziu comportamento anti-pânico reforçando a hipótese que a sinalização do 2-AG modula diferentes respostas defensivas. Tal efeito, já foi anteriormente descrito com o inibidor da FAAH, enzima responsável pela hidrólise da anandamida, que diminuiu o aumento da expressão de c-Fos induzido pelo NMDA na SCPdl, além de promover efeito anti-pânico neste modelo (Viana, Hott et al. 2014) e no LTE (Gobira, Aguiar et al. 2013).

Acredita-se que este efeito promovido pelo inibidor da MGL seja mediado por mecanismos similares aos que ocorrem com o inibidor da FAAH. É sabido que a síntese de anandamida e 2-AG ocorre sob demanda sendo necessário um estímulo desencadeador (Di Marzo, Fontana et al. 1994). No modelo de pânico essa síntese pode ser desencadeada pelo aumento do influxo de  $Ca^{2+}$  secundário à administração de NMDA intra-SCPdl. Assim, uma vez sintetizado, o 2-AG não é hidrolisado, devido à presença do inibidor da MGL, ficando assim mais disponível para se ligar ao receptor e exercer o efeito anti-pânico. Em conjunto, esses dados sugerem a participação dos inibidores da hidrólise dos endocanabinoides em respostas de ataque de pânico.

Uma vez que observamos a participação dos receptores rCB1 na modulação do efeito tipo-ansiolítico promovido pelo inibidor da MGL, foi também investigado se esse receptor mediará as respostas anti-pânico.

Corroborando trabalhos anteriores que demonstraram que a administração do NMDA é capaz de aumentar a expressão da proteína Fos na SCP (Ferreira-Netto, Borelli et al. 2005; Viana, Hott et al. 2014) nosso trabalho também demonstrou esse aumento de expressão na SCPdl. Através da imunofluorescência com dupla marcação foi observado que a administração do NMDA induziu uma maior ativação neuronal sendo que os rCB1 encontraram-se expressos nesses neurônios. Ainda, o pré-tratamento com o URB602 reduziu esse aumento da ativação neurônios que expressam rCB1. Assim, nossos dados moleculares reforçam estudos anteriores da participação de rCB1 em comportamentos anti-pânico (Casarotto, Terzian et al. 2012; Gobira, Aguiar et al. 2013; Viana, Hott et al. 2014).

Como esperado, a administração combinada de doses ineficazes (para o modelo de ataque de pânico) do inibidor da hidrólise e do 2-AG intra-SCPdl, inibiram as respostas de fuga induzidas pelo NMDA. Dessa forma, sugere-se que a ativação da sinalização endógena é capaz de desencadear um efeito que antes não era promovido pela administração exógena de baixas doses do 2-AG. Mais uma vez, nossos resultados realçam o papel anti-pânico promovido pelo 2-AG.

Assim como a SCP, o córtex pré-frontal ventromedial também modula comportamentos defensivos sendo que essa estrutura possui um papel muito bem estabelecido de processamento emocional, em especial os aspectos temporais e cognitivos do medo. Conforme descrito anteriormente, a porção dorsal do CPFm parece estar associada com comportamentos motores, enquanto que a porção ventral (pré-límbico e infra-límbico) do CPFm estaria envolvida na coordenação de respostas relacionadas com o medo e ansiedade (Vertes 2006; Bishop 2007). Nesse sentido, observa-se que o CPFvm projeta-se principalmente para regiões subcorticais como, por exemplo, complexo amigdalóide, áreas hipotalâmicas e a SCP (Gabbott, Warner et al. 2005; Price 2007).

Estudo de Floyd e colaboradores, sobre as projeções do CPF para a SCP, sugere que, diante de uma diferença dorso-ventral, existe também uma diferença rostro-caudal, com relação às projeções do CPFm. Esses autores demonstraram que a parte rostral do PL e IL enviam projeções principalmente para a SCP ventrolateral, enquanto a parte caudal do CPFm envia projeções predominantemente para SCPdl (Floyd, Price et al. 2000).

Adicionalmente, vários estudos têm descrito aumento na expressão da proteína Fos no CPFvm durante a exposição à vários estressores, tais como, a exposição ao LCE, ao predador (ou ao odor), a um ambiente novo ou ao estresse de imobilização (Cullinan, Herman et al. 1995; Duncan, Knapp et al. 1996; Canteras, Chiavegatto et al. 1997; Dielenberg, Hunt et al. 2001).

De forma semelhante à SCP, o envolvimento do CPFvm em respostas defensivas está relacionado a participação de diversos neurotransmissores como a serotonina, GABA, glutamato e canabinóides (Bambico, Cassano et al. 2010; Beyer, Dwyer et al. 2010; Campos, Moreira et al. 2012; Elbatsh, Moklas et al. 2012; Reyes, Szot et al. 2012; Stan, Schirda et al. 2014).

Estudos de Musazzi et al (2010) demonstraram que a indução do estresse agudo (choque nas patas) induziu a liberação de glutamato no córtex frontal e pré-frontal (Musazzi, Milanese et al. 2010).

Ressaltando a modulação comportamental induzida pelo sistema canabinoide, Fogaça e colaboradores demonstraram que a administração do agonista canabinoide ACEA intra-CPFm induziu efeito tipo-ansiolítico no LCE (Fogaca, Aguiar et al. 2012). Em outro modelo animal de ansiedade, o medo condicionado ao contexto, a administração intra-CPFm da anandamida ou do AM404 (inibidor do transportador da anandamida) diminuíram o comportamento de *freezing* (Lisboa, Reis et al. 2010). Além disso, utilizando o modelo animal de depressão, o teste do nado forçado, foi demonstrado que a administração do WIN55,212-2 (agonista canabinoide) intra-CPFm diminuiu o tempo de imobilidade, sugerindo o efeito antidepressivo (Bambico, Katz et al. 2007).

Nesse sentido os efeitos tipo-ansiolítico e antidepressivo supracitados foram bloqueados pelo pré-tratamento com os antagonistas de rCB1, AM251 e rimonabanto, respectivamente (Bambico, Katz et al. 2007; Lisboa, Reis et al. 2010; Fogaca, Aguiar et al. 2012).

Corroborando esses trabalhos, nossos resultados demonstram que a administração do endocanabinoide 2-AG intra-CPFm induziu o comportamento tipo-ansiolítico em ratos submetidos ao LCE, sendo esse comportamento bloqueado pelo pré-tratamento com antagonistas de rCB1 e rCB2. Em consonância com os nossos resultados referentes ao efeito tipo-ansiolítico induzido pelo inibidor da MGL na SCPdl, a administração intra-CPFm do URB602 também induziu esse efeito, sendo esse, bloqueado também pelo pré-tratamento com o AM251 e o AM630, antagonistas de rCB1 e rCB2, respectivamente.

Interessante notar que, de forma diferente da SCPdl, doses maiores do 2-AG e do URB602 intra-CPFm induziram efeito tipo-ansiolítico no LCE, sendo que foi obtida uma curva dose-resposta crescente com as respectivas doses usadas, e não a curva em forma de sino conforme observado na SCPdl.

Uma explicação razoável para isso é que o 2-AG pode inibir a liberação de outros neurotransmissores que tem papéis opostos na modulação de comportamentos aversivos. Dessa forma podemos supor que ocorra uma maior

sensibilidade gabaérgica em resposta a transmissão mediada por esse endocanabinoide no CPFvm em oposição a SCPdl.

Outra hipótese que poderia ser levantada está relacionada ao nosso resultado que demonstra que o efeito tipo-ansiolítico induzido pelo URB602 intra-CPFvm foi bloqueado pelo pré-tratamento com MPEP, antagonista de mGluR5. Diferente da SCP em que há recentes trabalhos na literatura que demonstram a co-localização da DGL- $\alpha$  e do mGluR5 nessa região (Gregg, Junk et al. 2012), de forma inédita, com auxílio da microscopia de fluorescência nosso trabalho demonstra qualitativamente a co-localização desses mesmos no CPFvm reforçando a relação entre mGluR5-DGL-2AG. Entretanto, mais estudos seriam necessários para verificar a densidade/quantificação dos mGluR5 no CPFvm bem como na SCPdl.

Dessa forma, considerando o nosso resultado que demonstra que apenas a maior dose do 2-AG ou do URB602 intra-CPFvm induziu efeito-tipo ansiolítico, e uma vez que é necessário a ativação de mGluR5 para que ocorra a síntese do 2-AG e conseqüentemente dos efeitos desencadeados por esse, e ainda, considerando a sinalização endógena, podemos supor que possa ter uma menor expressão de mGluR5 nessa área em relação a SCPdl, sendo necessário a administração de maiores doses do 2-AG ou do URB602 para que o efeito tipo-ansiolítico possa ser observado. Nesse sentido, López-Bendito e colaboradores (2002) demonstraram que ocorre uma diminuição da expressão de mGluR5 no córtex de ratos durante o desenvolvimento (López-Bendito, Shigemoto et al. 2002), o que poderia fortalecer nossa hipótese, já que este trabalho foi conduzido com ratos adultos.

Diante do exposto, nosso trabalho reforça a participação do sistema endocanabinoide na modulação do comportamento defensivo e realça que mais trabalhos necessitam ser conduzidos para melhor compreensão dos mecanismos envolvidos nas respostas anti-aversivas induzidas pelo 2-AG na SCPdl e no CPFvm.

---

*CONCLUSÃO*

Em conclusão, o presente trabalho demonstrou que a facilitação da sinalização do 2-AG na SCPdl e no CPFvm induz efeito tipo-ansiolítico e anti-pânico em ratos submetidos ao teste do LCE e ao modelo de ataque de pânico induzido pela estimulação química da SCPdl. Esse estudo demonstrou ainda que esses efeitos são mediados pela ativação dos receptores CB1 e CB2.

Adicionalmente, nosso trabalho também sugere de forma inédita a participação dos mGluR5 na modulação do efeito tipo-ansiolítico desencadeado pelo endocanabinoide 2-AG. Em conjunto, esses dados apoiam a hipótese de que a modulação do sistema endocanabinoide nessas regiões é importante para as reações aversivas, e sugerem que drogas que interferem com a neurotransmissão canabinoide constituem uma possível estratégia terapêutica para distúrbios de ansiedade e pânico.

---

*Referências Bibliográficas*

- Abbruzzese, M., S. Ferri, et al. (1995). "Wisconsin Card Sorting Test performance in obsessive-compulsive disorder: no evidence for involvement of dorsolateral prefrontal cortex." *Psychiatry Res* **58**(1): 37-43.
- Adamec, R. E., P. Burton, et al. (1999). "NMDA receptors mediate lasting increases in anxiety-like behavior produced by the stress of predator exposure--implications for anxiety associated with posttraumatic stress disorder." *Physiol Behav* **65**(4-5): 723-737.
- Aguiar, D. C., A. F. Almeida-Santos, et al. (2014). "Involvement of TRPV1 channels in the periaqueductal grey on the modulation of innate fear responses." *Acta Neuropsychiatr*: 1-9.
- Aguiar, D. C. and F. S. Guimaraes (2009). "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**(11): 2418-2429.
- Aguiar, D. C., F. A. Moreira, et al. (2006). "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* **83**(2): 296-301.
- Aguiar, D. C., A. L. Terzian, et al. (2009). "Anxiolytic-like effects induced by blockade of transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) channels in the medial prefrontal cortex of rats." *Psychopharmacology (Berl)* **205**(2): 217-225.
- Ahn, K., M. K. McKinney, et al. (2008). "Enzymatic pathways that regulate endocannabinoid signaling in the nervous system." *Chem Rev* **108**(5): 1687-1707.
- al Maskati, H. A. and A. W. Zbrozyna (1989). "Stimulation in prefrontal cortex area inhibits cardiovascular and motor components of the defence reaction in rats." *J Auton Nerv Syst* **28**(2): 117-125.
- Aliczki, M., Z. Balogh, et al. (2012). "The temporal dynamics of the effects of monoacylglycerol lipase blockade on locomotion, anxiety, and body temperature." *Behav Pharmacol* **23**(4): 348-357.
- Almeida-Santos, A. F., F. A. Moreira, et al. (2013). "Role of TRPV1 receptors on panic-like behaviors mediated by the dorsolateral periaqueductal gray in rats." *Pharmacol Biochem Behav* **105**: 166-172.
- Amara, S. G. and A. C. Fontana (2002). "Excitatory amino acid transporters: keeping up with glutamate." *Neurochem Int* **41**(5): 313-318.
- Ballard, T. M., M. L. Woolley, et al. (2005). "The effect of the mGlu5 receptor antagonist MPEP in rodent tests of anxiety and cognition: a comparison." *Psychopharmacology (Berl)* **179**(1): 218-229.
- Bambico, F. R., T. Cassano, et al. (2010). "Genetic deletion of fatty acid amide hydrolase alters emotional behavior and serotonergic transmission in the dorsal raphe, prefrontal cortex, and hippocampus." *Neuropsychopharmacology* **35**(10): 2083-2100.
- Bambico, F. R., N. Katz, et al. (2007). "Cannabinoids elicit antidepressant-like behavior and activate serotonergic neurons through the medial prefrontal cortex." *J Neurosci* **27**(43): 11700-11711.
- Bandler, R. (1982). "Induction of 'rage' following microinjections of glutamate into midbrain but not hypothalamus of cats." *Neurosci Lett* **30**(2): 183-188.
- Bandler, R. and P. Carrive (1988). "Integrated defence reaction elicited by excitatory amino acid microinjection in the midbrain periaqueductal grey region of the unrestrained cat." *Brain Res* **439**(1-2): 95-106.
- Bandler, R., K. A. Keay, et al. (2000). "Central circuits mediating patterned autonomic activity during active vs. passive emotional coping." *Brain Res Bull* **53**(1): 95-104.

- Behbehani, M. M. (1995). "Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray." *Prog Neurobiol* **46**(6): 575-605.
- Bejjamini, V. and F. S. Guimaraes (2006). "c-Fos expression increase in NADPH-diaphorase positive neurons after exposure to a live cat." *Behav Brain Res* **170**(1): 52-61.
- Beitz, A. J. (1982). "The organization of afferent projections to the midbrain periaqueductal gray of the rat." *Neuroscience* **7**(1): 133-159.
- Bergink, V., H. J. van Megen, et al. (2004). "Glutamate and anxiety." *Eur Neuropsychopharmacol* **14**(3): 175-183.
- Berrendero, F. and R. Maldonado (2002). "Involvement of the opioid system in the anxiolytic-like effects induced by Delta(9)-tetrahydrocannabinol." *Psychopharmacology (Berl)* **163**(1): 111-117.
- Beyer, C. E., J. M. Dwyer, et al. (2010). "Depression-like phenotype following chronic CB1 receptor antagonism." *Neurobiol Dis* **39**(2): 148-155.
- Bishop, S. J. (2007). "Neurocognitive mechanisms of anxiety: an integrative account." *Trends Cogn Sci* **11**(7): 307-316.
- Bisogno, T., F. Howell, et al. (2003). "Cloning of the first sn1-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain." *J Cell Biol* **163**(3): 463-468.
- Bittencourt, A. S., A. P. Carobrez, et al. (2004). "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* **125**(1): 71-89.
- Blanchard, D. C. and R. J. Blanchard (1988). "Ethoexperimental approaches to the biology of emotion." *Annu Rev Psychol* **39**: 43-68.
- Blanchard, D. C. and R. J. Blanchard (2008). Defensive behaviors, fear and anxiety. *Handbook of Anxiety and Fear*. R. J. Blanchard, D. C. Blanchard, G. Griebel and D. Nutt. Amsterdam, Elsevier. **17**: 63-99.
- Blanchard, D. C., R. J. Blanchard, et al. (1992). "MK-801 produces a reduction in anxiety-related antipredator defensiveness in male and female rats and a gender-dependent increase in locomotor behavior." *Psychopharmacology (Berl)* **108**(3): 352-362.
- Blanchard, D. C., R. R. Sakai, et al. (1993). "Subordination stress: behavioral, brain, and neuroendocrine correlates." *Behav Brain Res* **58**(1-2): 113-121.
- Blanchard, R. J. and D. C. Blanchard (1989). "Antipredator defensive behaviors in a visible burrow system." *J Comp Psychol* **103**(1): 70-82.
- Blankman, J. L., G. M. Simon, et al. (2007). "A comprehensive profile of brain enzymes that hydrolyze the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol." *Chem Biol* **14**(12): 1347-1356.
- Bleakman, D. and D. Lodge (1998). "Neuropharmacology of AMPA and kainate receptors." *Neuropharmacology* **37**(10-11): 1187-1204.
- Borges, K. and R. Dingledine (1998). "AMPA receptors: molecular and functional diversity." *Prog Brain Res* **116**: 153-170.
- Bortolato, M., P. Campolongo, et al. (2006). "Anxiolytic-like properties of the anandamide transport inhibitor AM404." *Neuropsychopharmacology* **31**(12): 2652-2659.
- Brandao, M. L., K. G. Borelli, et al. (2005). "Gabaergic regulation of the neural organization of fear in the midbrain tectum." *Neurosci Biobehav Rev* **29**(8): 1299-1311.
- Brandao, M. L., S. H. Cardoso, et al. (1994). "Neural substrate of defensive behavior in the midbrain tectum." *Neurosci Biobehav Rev* **18**(3): 339-346.
- Busquets-Garcia, A., E. Puighermanal, et al. (2011). "Differential role of anandamide and 2-arachidonoylglycerol in memory and anxiety-like responses." *Biol Psychiatry* **70**(5): 479-486.

- Busse, C. S., J. Brodtkin, et al. (2004). "The behavioral profile of the potent and selective mGlu5 receptor antagonist 3-[(2-methyl-1,3-thiazol-4-yl)ethynyl]pyridine (MTEP) in rodent models of anxiety." *Neuropsychopharmacology* **29**(11): 1971-1979.
- Calignano, A., I. Katona, et al. (2000). "Bidirectional control of airway responsiveness by endogenous cannabinoids." *Nature* **408**(6808): 96-101.
- Campos, A. C., F. A. Moreira, et al. (2012). "Multiple mechanisms involved in the large-spectrum therapeutic potential of cannabidiol in psychiatric disorders." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **367**(1607): 3364-3378.
- Canteras, N. S., S. Chiavegatto, et al. (1997). "Severe reduction of rat defensive behavior to a predator by discrete hypothalamic chemical lesions." *Brain Res Bull* **44**(3): 297-305.
- Canteras, N. S. and M. Goto (1999). "Fos-like immunoreactivity in the periaqueductal gray of rats exposed to a natural predator." *Neuroreport* **10**(2): 413-418.
- Canteras, N. S., E. R. Ribeiro-Barbosa, et al. (2001). "Tracing from the dorsal premammillary nucleus prosencephalic systems involved in the organization of innate fear responses." *Neurosci Biobehav Rev* **25**(7-8): 661-668.
- Carobrez, A. P. (2003). "[Glutamatergic neurotransmission as molecular target in anxiety]." *Rev Bras Psiquiatr* **25 Suppl 2**: 52-58.
- Carobrez, A. P., K. V. Teixeira, et al. (2001). "Modulation of defensive behavior by periaqueductal gray NMDA/glycine-B receptor." *Neurosci Biobehav Rev* **25**(7-8): 697-709.
- Carrive, P. (1993). "The periaqueductal gray and defensive behavior: functional representation and neuronal organization." *Behav Brain Res* **58**(1-2): 27-47.
- Casarotto, P. C., A. L. Terzian, et al. (2012). "Opposing Roles for Cannabinoid Receptor Type-1 (CB1) and Transient Receptor Potential Vanilloid Type-1 Channel (TRPV1) on the Modulation of Panic-Like Responses in Rats." *Neuropsychopharmacology* **37**(2): 478-486.
- Chanda, P. K., Y. Gao, et al. (2010). "Monoacylglycerol lipase activity is a critical modulator of the tone and integrity of the endocannabinoid system." *Mol Pharmacol* **78**(6): 996-1003.
- Chaudhuri, A. (1997). "Neural activity mapping with inducible transcription factors." *Neuroreport* **8**(16): v-ix.
- Chevalyere, V. and P. E. Castillo (2003). "Heterosynaptic LTD of hippocampal GABAergic synapses: a novel role of endocannabinoids in regulating excitability." *Neuron* **38**(3): 461-472.
- Corbett, R. and R. W. Dunn (1993). "Effects of 5,7 dichlorokynurenic acid on conflict, social interaction and plus maze behaviors." *Neuropharmacology* **32**(5): 461-466.
- Cravatt, B. F., K. Demarest, et al. (2001). "Supersensitivity to anandamide and enhanced endogenous cannabinoid signaling in mice lacking fatty acid amide hydrolase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(16): 9371-9376.
- Cullinan, W. E., J. P. Herman, et al. (1995). "Pattern and time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress." *Neuroscience* **64**(2): 477-505.
- da Silva, L. G., Jr., R. C. Menezes, et al. (2006). "Excitatory amino acid receptors in the periaqueductal gray mediate the cardiovascular response evoked by activation of dorsomedial hypothalamic neurons." *Neuroscience* **139**(3): 1129-1139.
- Dalley, J. W., R. N. Cardinal, et al. (2004). "Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: neural and neurochemical substrates." *Neurosci Biobehav Rev* **28**(7): 771-784.
- De Petrocellis, L., M. G. Cascio, et al. (2004). "The endocannabinoid system: a general view and latest additions." *Br J Pharmacol* **141**(5): 765-774.

- de Visser, L., A. M. Baars, et al. (2011). "Transient inactivation of the medial prefrontal cortex affects both anxiety and decision-making in male wistar rats." *Front Neurosci* **5**: 102.
- Deakin, J. F. W. and F. G. Graeff (1991). "5-HT and mechanisms of defence." *Journal Psychopharmacology* **5**: 305-315.
- Del-Ben, C. M. and F. G. Graeff (2009). "Panic disorder: is the PAG involved?" *Neural Plast* **2009**: 108135.
- Devane, W. A., A. Breuer, et al. (1992). "A novel probe for the cannabinoid receptor." *J Med Chem* **35**(11): 2065-2069.
- Devane, W. A., F. A. Dysarz, 3rd, et al. (1988). "Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain." *Mol Pharmacol* **34**(5): 605-613.
- Devane, W. A., L. Hanus, et al. (1992). "Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor." *Science* **258**(5090): 1946-1949.
- Di Marzo, V. (2008). "Targeting the endocannabinoid system: to enhance or reduce?" *Nat Rev Drug Discov* **7**(5): 438-455.
- Di Marzo, V., M. Bifulco, et al. (2004). "The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation." *Nat Rev Drug Discov* **3**(9): 771-784.
- Di Marzo, V., T. Bisogno, et al. (2001). "Anandamide: some like it hot." *Trends Pharmacol Sci* **22**(7): 346-349.
- Di Marzo, V., A. Fontana, et al. (1994). "Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons." *Nature* **372**(6507): 686-691.
- Di Marzo, V., D. Melck, et al. (1998). "Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action." *Trends Neurosci* **21**(12): 521-528.
- Dielenberg, R. A., G. E. Hunt, et al. (2001). "'When a rat smells a cat': the distribution of Fos immunoreactivity in rat brain following exposure to a predatory odor." *Neuroscience* **104**(4): 1085-1097.
- Dielenberg, R. A., S. Leman, et al. (2004). "Effect of dorsal periaqueductal gray lesions on cardiovascular and behavioral responses to cat odor exposure in rats." *Behav Brain Res* **153**(2): 487-496.
- Dinh, T. P., T. F. Freund, et al. (2002). "A role for monoglyceride lipase in 2-arachidonoylglycerol inactivation." *Chem Phys Lipids* **121**(1-2): 149-158.
- Do-Monte, F. H., G. C. Kincheski, et al. (2010). "Role of beta-adrenergic receptors in the ventromedial prefrontal cortex during contextual fear extinction in rats." *Neurobiol Learn Mem* **94**(3): 318-328.
- Duncan, G. E., D. J. Knapp, et al. (1996). "Neuroanatomical characterization of Fos induction in rat behavioral models of anxiety." *Brain Res* **713**(1-2): 79-91.
- Dunn, R. W., R. Corbett, et al. (1989). "Effects of 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonists and NMDA receptor antagonists in the social interaction test and the elevated plus maze." *Eur J Pharmacol* **169**(1): 1-10.
- Elbatsh, M. M., M. A. Moklas, et al. (2012). "Antidepressant-like effects of Delta(9)-tetrahydrocannabinol and rimonabant in the olfactory bulbectomised rat model of depression." *Pharmacol Biochem Behav* **102**(2): 357-365.
- Faria, M. S., M. N. Muscara, et al. (1997). "Acute inhibition of nitric oxide synthesis induces anxiolysis in the plus maze test." *Eur J Pharmacol* **323**(1): 37-43.
- Felder, C. C., E. M. Briley, et al. (1993). "Anandamide, an endogenous cannabimimetic eicosanoid, binds to the cloned human cannabinoid receptor and stimulates receptor-mediated signal transduction." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(16): 7656-7660.
- Ferreira-Netto, C., K. G. Borelli, et al. (2005). "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* **1031**(2): 151-163.
- File, S. (1992). Behavioural detection of anxiolytic action. J. M. H. In: Elliot, D.J. Marsden, C.A. (Eds.). New York: 25-44.
- Finn, D. P., M. D. Jhaveri, et al. (2003). "Effects of direct periaqueductal grey administration of a cannabinoid receptor agonist on nociceptive and aversive responses in rats." *Neuropharmacology* **45**(5): 594-604.
- Fisk, G. D. and J. M. Wyss (2000). "Descending projections of infralimbic cortex that mediate stimulation-evoked changes in arterial pressure." *Brain Res* **859**(1): 83-95.
- Floyd, N. S., J. L. Price, et al. (2000). "Orbitomedial prefrontal cortical projections to distinct longitudinal columns of the periaqueductal gray in the rat." *J Comp Neurol* **422**(4): 556-578.
- Fogaca, M. V., D. C. Aguiar, et al. (2012). "The endocannabinoid and endovanilloid systems interact in the rat prelimbic medial prefrontal cortex to control anxiety-like behavior." *Neuropharmacology* **63**(2): 202-210.
- Gabbott, P. L., T. A. Warner, et al. (2005). "Prefrontal cortex in the rat: projections to subcortical autonomic, motor, and limbic centers." *J Comp Neurol* **492**(2): 145-177.
- Gao, Y., D. V. Vasilyev, et al. (2010). "Loss of retrograde endocannabinoid signaling and reduced adult neurogenesis in diacylglycerol lipase knock-out mice." *J Neurosci* **30**(6): 2017-2024.
- Gaoni, Y. and R. Mechoulam (1971). "The isolation and structure of delta-1-tetrahydrocannabinol and other neutral cannabinoids from hashish." *J Am Chem Soc* **93**(1): 217-224.
- Garcia-Gutierrez, M. S. and J. Manzanares (2011). "Overexpression of CB2 cannabinoid receptors decreased vulnerability to anxiety and impaired anxiolytic action of alprazolam in mice." *J Psychopharmacol* **25**(1): 111-120.
- Gerdeman, G. and D. M. Lovinger (2001). "CB1 cannabinoid receptor inhibits synaptic release of glutamate in rat dorsolateral striatum." *J Neurophysiol* **85**(1): 468-471.
- Gobira, P. H., D. C. Aguiar, et al. (2013). "Effects of compounds that interfere with the endocannabinoid system on behaviors predictive of anxiolytic and panicolytic activities in the elevated T-maze." *Pharmacol Biochem Behav* **110C**: 33-39.
- Graeff, F. G. (1981). "Minor tranquilizers and brain defense systems." *Braz J Med Biol Res* **14**(4-5): 239-265.
- Graeff, F. G. (1990). Brain defense system and anxiety. *Handbook of anxiety*. M. Roth, G. D. Burrows and R. Noyes. Amsterdam, Elsevier: 307-354.
- Gray, J. A. (1987). "[The neuropsychology of the emotions and personality structure]." *Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova* **37**(6): 1011-1024.
- Gregg, L. C., K. M. Jung, et al. (2012). "Activation of type 5 metabotropic glutamate receptors and diacylglycerol lipase- $\alpha$  initiates 2-arachidonoylglycerol formation and endocannabinoid-mediated analgesia." *J Neurosci* **32**(28): 9457-9468.
- Groenewegen, H. J. (1988). "Organization of the afferent connections of the mediodorsal thalamic nucleus in the rat, related to the mediodorsal-prefrontal topography." *Neuroscience* **24**(2): 379-431.
- Guimaraes, F. S., V. Bejamini, et al. (2005). "Role of nitric oxide in brain regions related to defensive reactions." *Neurosci Biobehav Rev* **29**(8): 1313-1322.
- Guimaraes, F. S., A. P. Carobrez, et al. (1991). "Anxiolytic effect in the elevated plus-maze of the NMDA receptor antagonist AP7 microinjected into the dorsal periaqueductal grey." *Psychopharmacology (Berl)* **103**(1): 91-94.
- Guimaraes, F. S., E. A. Del Bel, et al. (1993). "Hippocampal 5-HT receptors and consolidation of stressful memories." *Behav Brain Res* **58**(1-2): 133-139.

- Hajos, N., I. Katona, et al. (2000). "Cannabinoids inhibit hippocampal GABAergic transmission and network oscillations." *Eur J Neurosci* **12**(9): 3239-3249.
- Handley, S. L. and S. Mithani (1984). "Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour." *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **327**(1): 1-5.
- Harro, J. (2006). "CCK and NPY as anti-anxiety treatment targets: promises, pitfalls, and strategies." *Amino Acids* **31**(3): 215-230.
- Hashimoto, Y., T. Ohno-Shosaku, et al. (2005). "Phospholipase C $\beta$  serves as a coincidence detector through its Ca<sup>2+</sup> dependency for triggering retrograde endocannabinoid signal." *Neuron* **45**(2): 257-268.
- Heidbreder, C. A. and H. J. Groenewegen (2003). "The medial prefrontal cortex in the rat: evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics." *Neurosci Biobehav Rev* **27**(6): 555-579.
- Heidbreder, C. A., A. C. Thompson, et al. (1996). "Role of extracellular dopamine in the initiation and long-term expression of behavioral sensitization to cocaine." *J Pharmacol Exp Ther* **278**(2): 490-502.
- Herkenham, M. (1991). "Characterization and localization of cannabinoid receptors in brain: an in vitro technique using slide-mounted tissue sections." *NIDA Res Monogr* **112**: 129-145.
- Herkenham, M., A. B. Lynn, et al. (1990). "Cannabinoid receptor localization in brain." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(5): 1932-1936.
- Hillard, C. J., S. Manna, et al. (1999). "Synthesis and characterization of potent and selective agonists of the neuronal cannabinoid receptor (CB1)." *J Pharmacol Exp Ther* **289**(3): 1427-1433.
- Howlett, A. C. (2002). "The cannabinoid receptors." *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **68-69**: 619-631.
- Howlett, A. C. and R. M. Fleming (1984). "Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Pharmacology of the response in neuroblastoma cell membranes." *Mol Pharmacol* **26**(3): 532-538.
- Huang, C. C., S. W. Lo, et al. (2001). "Presynaptic mechanisms underlying cannabinoid inhibition of excitatory synaptic transmission in rat striatal neurons." *J Physiol* **532**(Pt 3): 731-748.
- Huettner, J. E. (2003). "Kainate receptors and synaptic transmission." *Prog Neurobiol* **70**(5): 387-407.
- Jardim, M. C., D. C. Aguiar, et al. (2005). "Role of glutamate ionotropic and benzodiazepine receptors in the ventromedial hypothalamic nucleus on anxiety." *Pharmacol Biochem Behav* **82**(1): 182-189.
- Javitt, D. C. (2004). "Glutamate as a therapeutic target in psychiatric disorders." *Mol Psychiatry* **9**(11): 984-997, 979.
- Jinks, A. L. and I. S. McGregor (1997). "Modulation of anxiety-related behaviours following lesions of the prelimbic or infralimbic cortex in the rat." *Brain Res* **772**(1-2): 181-190.
- Jung, K. M., G. Astarita, et al. (2007). "A key role for diacylglycerol lipase- $\alpha$  in metabotropic glutamate receptor-dependent endocannabinoid mobilization." *Mol Pharmacol* **72**(3): 612-621.
- Jung, K. M., R. Mangieri, et al. (2005). "Stimulation of endocannabinoid formation in brain slice cultures through activation of group I metabotropic glutamate receptors." *Mol Pharmacol* **68**(5): 1196-1202.
- Kalueff, A. V. and D. J. Nutt (2007). "Role of GABA in anxiety and depression." *Depress Anxiety* **24**(7): 495-517.

- Kathuria, S., S. Gaetani, et al. (2003). "Modulation of anxiety through blockade of anandamide hydrolysis." *Nat Med* **9**(1): 76-81.
- Keay, K. A. and R. Bandler (2001). "Parallel circuits mediating distinct emotional coping reactions to different types of stress." *Neurosci Biobehav Rev* **25**(7-8): 669-678.
- Kincheski, G. C. and A. P. Carobrez (2010). "The dorsal periaqueductal gray modulates the increased fear-like behavior exhibited by experienced rats in the elevated plus-maze." *Behav Brain Res* **206**(1): 120-126.
- King, A. R., A. Duranti, et al. (2007). "URB602 inhibits monoacylglycerol lipase and selectively blocks 2-arachidonoylglycerol degradation in intact brain slices." *Chem Biol* **14**(12): 1357-1365.
- Kinsey, S. G., D. K. Nomura, et al. (2011). "Inhibition of monoacylglycerol lipase attenuates nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced gastric hemorrhages in mice." *J Pharmacol Exp Ther* **338**(3): 795-802.
- Kinsey, S. G., S. T. O'Neal, et al. (2011). "Inhibition of endocannabinoid catabolic enzymes elicits anxiolytic-like effects in the marble burying assay." *Pharmacol Biochem Behav* **98**(1): 21-27.
- Kreitzer, A. C. and W. G. Regehr (2001). "Retrograde inhibition of presynaptic calcium influx by endogenous cannabinoids at excitatory synapses onto Purkinje cells." *Neuron* **29**(3): 717-727.
- Krieger, J. E. and F. G. Graeff (1985). "Defensive behavior and hypertension induced by glutamate in the midbrain central gray of the rat." *Braz J Med Biol Res* **18**(1): 61-67.
- Kumar, J., H. Hapidin, et al. (2013). "Effects of the mGluR5 antagonist MPEP on ethanol withdrawal induced anxiety-like syndrome in rats." *Behav Brain Funct* **9**: 43.
- Lacroix, L., S. Spinelli, et al. (2000). "Differential role of the medial and lateral prefrontal cortices in fear and anxiety." *Behav Neurosci* **114**(6): 1119-1130.
- Lafourcade, M., I. Elezgarai, et al. (2007). "Molecular components and functions of the endocannabinoid system in mouse prefrontal cortex." *PLoS One* **2**(8): e709.
- LeDoux, J. E. (1992). "Brain mechanisms of emotion and emotional learning." *Curr Opin Neurobiol* **2**(2): 191-197.
- Leonard, C. M. (1972). "The connections of the dorsomedial nuclei." *Brain Behav Evol* **6**(1): 524-541.
- Lima, V. C., M. L. Molchanov, et al. (2008). "Modulation of defensive responses and anxiety-like behaviors by group I metabotropic glutamate receptors located in the dorsolateral periaqueductal gray." *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **32**(1): 178-185.
- Lisboa, S. F., D. G. Reis, et al. (2010). "Cannabinoid CB1 receptors in the medial prefrontal cortex modulate the expression of contextual fear conditioning." *Int J Neuropsychopharmacol* **13**(9): 1163-1173.
- Lisboa, S. F., L. B. Resstel, et al. (2008). "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**(1-3): 73-78.
- Lisboa, S. F., M. F. Stecchini, et al. (2010). "Different role of the ventral medial prefrontal cortex on modulation of innate and associative learned fear." *Neuroscience* **171**(3): 760-768.
- Long, J. Z., W. Li, et al. (2009). "Selective blockade of 2-arachidonoylglycerol hydrolysis produces cannabinoid behavioral effects." *Nat Chem Biol* **5**(1): 37-44.
- López-Bendito G., R. Shigemoto, et al (2002). "Differential distribution of group I metabotropic glutamate receptors during rat cortical development." *Cereb Cortex* **12**(6):625-38.

- Lovick, T. A. (1993). "The periaqueductal gray-rostral medulla connection in the defence reaction: efferent pathways and descending control mechanisms." *Behav Brain Res* **58**(1-2): 19-25.
- Lovick, T. A. (2000). "Panic disorder – A malfunction of multiple transmitter control systems within the midbrain periaqueductal gray matter ?" *Neuroscientist* **6**: 48-59.
- Maccarrone, M., S. Rossi, et al. (2008). "Anandamide inhibits metabolism and physiological actions of 2-arachidonoylglycerol in the striatum." *Nat Neurosci* **11**(2): 152-159.
- Maejima, T., K. Hashimoto, et al. (2001). "Presynaptic inhibition caused by retrograde signal from metabotropic glutamate to cannabinoid receptors." *Neuron* **31**(3): 463-475.
- Maren, S. (2007). "Neuroscience. The threatened brain." *Science* **317**(5841): 1043-1044.
- Matsuda, L. A., T. I. Bonner, et al. (1993). "Localization of cannabinoid receptor mRNA in rat brain." *J Comp Neurol* **327**(4): 535-550.
- McGregor, I. S., G. A. Hargreaves, et al. (2004). "Neural correlates of cat odor-induced anxiety in rats: region-specific effects of the benzodiazepine midazolam." *J Neurosci* **24**(17): 4134-4144.
- McGregor, I. S., L. Schrama, et al. (2002). "Not all 'predator odours' are equal: cat odour but not 2,4,5 trimethylthiazoline (TMT; fox odour) elicits specific defensive behaviours in rats." *Behav Brain Res* **129**(1-2): 1-16.
- McNaughton, N. and P. J. Corr (2004). "A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance." *Neurosci Biobehav Rev* **28**(3): 285-305.
- Mechoulam, R., S. Ben-Shabat, et al. (1995). "Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors." *Biochem Pharmacol* **50**(1): 83-90.
- Mechoulam, R., P. Braun, et al. (1972). "Syntheses of 1 -tetrahydrocannabinol and related cannabinoids." *J Am Chem Soc* **94**(17): 6159-6165.
- Mechoulam, R., N. Lander, et al. (1980). "Stereochemical requirements for cannabinoid activity." *J Med Chem* **23**(10): 1068-1072.
- Mikulecka, A. and P. Mares (2009). "Effects of mGluR5 and mGluR1 antagonists on anxiety-like behavior and learning in developing rats." *Behav Brain Res* **204**(1): 133-139.
- Millan, M. J. (2003). "The neurobiology and control of anxious states." *Prog Neurobiol* **70**(2): 83-244.
- Mitsukawa, K., C. Mombereau, et al. (2006). "Metabotropic glutamate receptor subtype 7 ablation causes dysregulation of the HPA axis and increases hippocampal BDNF protein levels: implications for stress-related psychiatric disorders." *Neuropsychopharmacology* **31**(6): 1112-1122.
- Molchanov, M. L. and F. S. Guimaraes (1999). "Defense reaction induced by a metabotropic glutamate receptor agonist microinjected into the dorsal periaqueductal gray of rats." *Braz J Med Biol Res* **32**(12): 1533-1537.
- Molchanov, M. L. and F. S. Guimaraes (2002). "Anxiolytic-like effects of AP7 injected into the dorsolateral or ventrolateral columns of the periaqueductal gray of rats." *Psychopharmacology (Berl)* **160**(1): 30-38.
- Moreira, F. A., D. C. Aguiar, et al. (2007). "Anxiolytic-like effect of cannabinoids injected into the rat dorsolateral periaqueductal gray." *Neuropharmacology* **52**(3): 958-965.
- Moreira, F. A., D. C. Aguiar, et al. (2012). "Cannabinoid type 1 receptors and transient receptor potential vanilloid type 1 channels in fear and anxiety-two sides of one coin?" *Neuroscience* **204**: 186-192.
- Moreira, F. A. and B. Lutz (2008). "The endocannabinoid system: emotion, learning and addiction." *Addict Biol* **13**(2): 196-212.

- Moreira, F. A., M. L. Molchanov, et al. (2004). "Ionotropic glutamate-receptor antagonists inhibit the aversive effects of nitric oxide donor injected into the dorsolateral periaqueductal gray of rats." *Psychopharmacology (Berl)* **171**(2): 199-203.
- Morgan, J. I. and T. Curran (1989). "Stimulus transcription coupling in neurons: role of cellular immediate-early genes." *Trends Neuroscience* **12**: 459-462.
- Munro, S., K. L. Thomas, et al. (1993). "Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids." *Nature* **365**(6441): 61-65.
- Musazzi, L., M. Milanese, et al. (2010). "Acute stress increases depolarization-evoked glutamate release in the rat prefrontal/frontal cortex: the dampening action of antidepressants." *PLoS One* **5**(1): e8566.
- Nakanishi, S. (1992). "Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function." *Science* **258**(5082): 597-603.
- Nashold, B. S., W. P. Wilson, et al. (1969). "Sensations evoked by stimulation in the midbrain of man." *Journal Neurosurgery* **30**: 14-24.
- Nauta, W. J. (1958). "Hippocampal projections and related neural pathways to the midbrain in the cat." *Brain* **81**(3): 319-340.
- Nomura, D. K., B. E. Morrison, et al. (2011). "Endocannabinoid hydrolysis generates brain prostaglandins that promote neuroinflammation." *Science* **334**(6057): 809-813.
- Ohno-Shosaku, T., T. Maejima, et al. (2001). "Endogenous cannabinoids mediate retrograde signals from depolarized postsynaptic neurons to presynaptic terminals." *Neuron* **29**(3): 729-738.
- Onaivi, E. S. (2006). "Neuropsychobiological evidence for the functional presence and expression of cannabinoid CB2 receptors in the brain." *Neuropsychobiology* **54**(4): 231-246.
- Onaivi, E. S., M. R. Green, et al. (1990). "Pharmacological characterization of cannabinoids in the elevated plus maze." *J Pharmacol Exp Ther* **253**(3): 1002-1009.
- Onaivi, E. S., H. Ishiguro, et al. (2006). "Discovery of the presence and functional expression of cannabinoid CB2 receptors in brain." *Ann N Y Acad Sci* **1074**: 514-536.
- Onaivi, E. S., H. Ishiguro, et al. (2006). "Methods to study the behavioral effects and expression of CB2 cannabinoid receptor and its gene transcripts in the chronic mild stress model of depression." *Methods Mol Med* **123**: 291-298.
- Ortega-Alvaro, A., A. Aracil-Fernandez, et al. (2011). "Deletion of CB2 cannabinoid receptor induces schizophrenia-related behaviors in mice." *Neuropsychopharmacology* **36**(7): 1489-1504.
- Palazzo, E., I. Marabese, et al. (2001). "Metabotropic and NMDA glutamate receptors participate in the cannabinoid-induced antinociception." *Neuropharmacology* **40**(3): 319-326.
- Patel, S. and C. J. Hillard (2006). "Pharmacological evaluation of cannabinoid receptor ligands in a mouse model of anxiety: further evidence for an anxiolytic role for endogenous cannabinoid signaling." *J Pharmacol Exp Ther* **318**(1): 304-311.
- Patel, S., C. T. Roelke, et al. (2005). "Inhibition of restraint stress-induced neural and behavioural activation by endogenous cannabinoid signalling." *Eur J Neurosci* **21**(4): 1057-1069.
- Paxinos, G., Watson, C (1997). *The rat brain in stereotaxic coordinates*, New York, Academic Press.
- Pellow, S., P. Chopin, et al. (1985). "Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat." *J Neurosci Methods* **14**(3): 149-167.
- Pellow, S. and S. E. File (1986). "Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat." *Pharmacol Biochem Behav* **24**(3): 525-529.

- Perez de la Mora, M., D. Lara-Garcia, et al. (2006). "Anxiolytic-like effects of the selective metabotropic glutamate receptor 5 antagonist MPEP after its intra-amygdaloid microinjection in three different non-conditioned rat models of anxiety." *Eur J Neurosci* **23**(10): 2749-2759.
- Pertwee, R. G. (2010). "Receptors and channels targeted by synthetic cannabinoid receptor agonists and antagonists." *Curr Med Chem* **17**(14): 1360-1381.
- Pin, J. P. and R. Duvoisin (1995). "The metabotropic glutamate receptors: structure and functions." *Neuropharmacology* **34**(1): 1-26.
- Piomelli, D. (2003). "The molecular logic of endocannabinoid signalling." *Nat Rev Neurosci* **4**(11): 873-884.
- Price, J. L. (2007). "Definition of the orbital cortex in relation to specific connections with limbic and visceral structures and other cortical regions." *Ann N Y Acad Sci* **1121**: 54-71.
- Puighermanal, E., A. Busquets-Garcia, et al. (2013). "Dissociation of the pharmacological effects of THC by mTOR blockade." *Neuropsychopharmacology* **38**(7):1334-43.
- Rea, K., W. M. Olango, et al. (2013). "Evidence for a role of GABAergic and glutamatergic signalling in the basolateral amygdala in endocannabinoid-mediated fear-conditioned analgesia in rats." *Pain* **154**(4): 576-585.
- Resstel, L. B., F. M. Correa, et al. (2008). "The expression of contextual fear conditioning involves activation of an NMDA receptor-nitric oxide pathway in the medial prefrontal cortex." *Cereb Cortex* **18**(9): 2027-2035.
- Rey A. A., M Purrio, et al. (2012). "Biphasic effects of cannabinoids in anxiety responses: CB1 and GABA(B) receptors in the balance of GABAergic and glutamatergic neurotransmission." *Neuropsychopharmacology*. **37**(12):2624-34.
- Reyes, B. A., P. Szot, et al. (2012). "Stress-induced sensitization of cortical adrenergic receptors following a history of cannabinoid exposure." *Exp Neurol* **236**(2): 327-335.
- Room, P., F. T. Russchen, et al. (1985). "Efferent connections of the prelimbic (area 32) and the infralimbic (area 25) cortices: an anterograde tracing study in the cat." *J Comp Neurol* **242**(1): 40-55.
- Rubino, T., C. Guidali, et al. (2008). "CB1 receptor stimulation in specific brain areas differently modulate anxiety-related behaviour." *Neuropharmacology* **54**(1): 151-160.
- Rubino, T., N. Realini, et al. (2008). "Role in anxiety behavior of the endocannabinoid system in the prefrontal cortex." *Cereb Cortex* **18**(6): 1292-1301.
- Rubino, T., M. Sala, et al. (2007). "Cellular mechanisms underlying the anxiolytic effect of low doses of peripheral Delta9-tetrahydrocannabinol in rats." *Neuropsychopharmacology* **32**(9): 2036-2045.
- Saito, V. M., C. T. Wotjak, et al. (2010). "[Pharmacological exploitation of the endocannabinoid system: new perspectives for the treatment of depression and anxiety disorders?]." *Rev Bras Psiquiatr* **32 Suppl 1**: S7-14.
- Schenberg, L. C., A. S. Bittencourt, et al. (2001). "Modeling panic attacks." *Neurosci Biobehav Rev* **25**(7-8): 647-659.
- Schenberg, L. C., J. C. De Aguiar, et al. (1983). "GABA modulation of the defense reaction induced by brain electrical stimulation." *Physiol Behav* **31**(4): 429-437.
- Schlosburg, J. E., B. L. Carlson, et al. (2009). "Inhibitors of endocannabinoid-metabolizing enzymes reduce precipitated withdrawal responses in THC-dependent mice." *AAPS J* **11**(2): 342-352.
- Sciolino, N. R., W. Zhou, et al. (2011). "Enhancement of endocannabinoid signaling with JZL184, an inhibitor of the 2-arachidonoylglycerol hydrolyzing enzyme monoacylglycerol lipase, produces anxiolytic effects under conditions of high environmental aversiveness in rats." *Pharmacol Res* **64**(3): 226-234.

- Sesack, S. R., A. Y. Deutch, et al. (1989). "Topographical organization of the efferent projections of the medial prefrontal cortex in the rat: an anterograde tract-tracing study with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin." *J Comp Neurol* **290**(2): 213-242.
- Shah, A. A. and D. Treit (2003). "Excitotoxic lesions of the medial prefrontal cortex attenuate fear responses in the elevated-plus maze, social interaction and shock probe burying tests." *Brain Res* **969**(1-2): 183-194.
- Shigeri, Y., R. P. Seal, et al. (2004). "Molecular pharmacology of glutamate transporters, EAATs and VGLUTs." *Brain Res Brain Res Rev* **45**(3): 250-265.
- Shonesy, B. C., R. J. Bluett, et al. (2014). "Genetic disruption of 2-arachidonoylglycerol synthesis reveals a key role for endocannabinoid signaling in anxiety modulation." *Cell Rep* **9**(5): 1644-1653.
- Sotres-Bayon, F. and G. J. Quirk (2010). "Prefrontal control of fear: more than just extinction." *Curr Opin Neurobiol* **20**(2): 231-235.
- Spooren, W. and F. Gasparini (2004). "mGlu5 receptor antagonists: a novel class of anxiolytics?" *Drug News Perspect* **17**(4): 251-257.
- Spooren, W. P., A. Vassout, et al. (2000). "Anxiolytic-like effects of the prototypical metabotropic glutamate receptor 5 antagonist 2-methyl-6-(phenylethynyl)pyridine in rodents." *J Pharmacol Exp Ther* **295**(3): 1267-1275.
- Stan, A. D., C. V. Schirda, et al. (2014). "Glutamate and GABA contributions to medial prefrontal cortical activity to emotion: implications for mood disorders." *Psychiatry Res* **223**(3): 253-260.
- Stella, N., P. Schweitzer, et al. (1997). "A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation." *Nature* **388**(6644): 773-778.
- Stern, C. A., F. H. Do Monte, et al. (2010). "Activity in prelimbic cortex is required for adjusting the anxiety response level during the elevated plus-maze retest." *Neuroscience* **170**(1): 214-222.
- Sugiura, T., S. Kondo, et al. (1995). "2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain." *Biochem Biophys Res Commun* **215**(1): 89-97.
- Sumislawski, J. J., T. S. Ramikie, et al. (2011). "Reversible gating of endocannabinoid plasticity in the amygdala by chronic stress: a potential role for monoacylglycerol lipase inhibition in the prevention of stress-induced behavioral adaptation." *Neuropsychopharmacology* **36**(13): 2750-2761.
- Tanimura, A., M. Yamazaki, et al. (2010). "The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol produced by diacylglycerol lipase alpha mediates retrograde suppression of synaptic transmission." *Neuron* **65**(3): 320-327.
- Tatarczynska, E., A. Klodzinska, et al. (2001). "Potential anxiolytic- and antidepressant-like effects of MPEP, a potent, selective and systemically active mGlu5 receptor antagonist." *Br J Pharmacol* **132**(7): 1423-1430.
- Terzian, A. L., D. C. Aguiar, et al. (2009). "Modulation of anxiety-like behaviour by Transient Receptor Potential Vanilloid Type 1 (TRPV1) channels located in the dorsolateral periaqueductal gray." *Eur Neuropsychopharmacol* **19**(3): 188-195.
- Uylings, H. B. and C. G. van Eden (1990). "Qualitative and quantitative comparison of the prefrontal cortex in rat and in primates, including humans." *Prog Brain Res* **85**: 31-62.
- Van Sickle, M. D., M. Duncan, et al. (2005). "Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors." *Science* **310**(5746): 329-332.
- Vargas, L. C. and L. C. Schenberg (2001). "Long-term effects of clomipramine and fluoxetine on dorsal periaqueductal grey-evoked innate defensive behaviours of the rat." *Psychopharmacology (Berl)* **155**(3): 260-268.
- Varma, N., G. C. Carlson, et al. (2001). "Metabotropic glutamate receptors drive the endocannabinoid system in hippocampus." *J Neurosci* **21**(24): RC188.

- Vaughan, C. W., M. Connor, et al. (2000). "Actions of cannabinoids on membrane properties and synaptic transmission in rat periaqueductal gray neurons in vitro." *Mol Pharmacol* **57**(2): 288-295.
- Vertes, R. P. (2004). "Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat." *Synapse* **51**(1): 32-58.
- Vertes, R. P. (2006). "Interactions among the medial prefrontal cortex, hippocampus and midline thalamus in emotional and cognitive processing in the rat." *Neuroscience* **142**(1): 1-20.
- Viana, T. G., S. C. Hott, et al. (2014). "Anti-aversive role of the endocannabinoid system in the periaqueductal gray stimulation model of panic attacks in rats." *Psychopharmacology (Berl)*.
- Vianna, D. M. and M. L. Brandao (2003). "Anatomical connections of the periaqueductal gray: specific neural substrates for different kinds of fear." *Braz J Med Biol Res* **36**(5): 557-566.
- Viveros, M. P., E. M. Marco, et al. (2005). "Endocannabinoid system and stress and anxiety responses." *Pharmacol Biochem Behav* **81**(2): 331-342.
- Wang, S. J. (2003). "Cannabinoid CB1 receptor-mediated inhibition of glutamate release from rat hippocampal synaptosomes." *Eur J Pharmacol* **469**(1-3): 47-55.
- Watkins, J. C. (2000). "l-glutamate as a central neurotransmitter: looking back." *Biochem Soc Trans* **28**(4): 297-309.
- Wilson, R. I. and R. A. Nicoll (2001). "Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses." *Nature* **410**(6828): 588-592.
- Wilson, R. I. and R. A. Nicoll (2002). "Endocannabinoid signaling in the brain." *Science* **296**(5568): 678-682.

---

*ANEXO*