

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

LUARA AUGUSTA DA COSTA E SILVA BRAGA BATISTA

**Efeitos de drogas que atuam no sistema endocanabinoide injetadas na
substância cinzenta periaquedutal dorsolateral na modulação de
comportamentos defensivos**

Belo Horizonte

2013

LUARA AUGUSTA DA COSTA E SILVA BRAGA BATISTA

**Efeitos de drogas que atuam no sistema endocanabinoide injetadas na substância
cinzenta periaquedutal dorsolateral na modulação de comportamentos defensivos**

Dissertação apresentada ao curso de pós-
graduação em Neurociências da
Universidade Federal de Minas Gerais,
como requisito parcial para obtenção do
título de mestre em neurociências.
Orientador: Prof. Dr. Fabrício de Araújo Moreira

Belo Horizonte

2013

- 043 Batista, Luara Augusta da Costa e Silva Braga.
Efeitos de drogas que atuam no sistema endocanabinoide injetadas na substância cinzenta periaquedutal dorsolateral na modulação de comportamentos defensivos [manuscrito] / Luara Augusta da Costa e Silva Braga Batista. – 2013.

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

Orientador: Prof. Dr. Fabrício de Araújo Moreira.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Neurociências - Teses. 2. Substância cinzenta periaquedutal. 3. Transtorno de pânico. 4. Ansiedade - Teses. 5. Receptor CB1 de canabinoide. I. Moreira, Fabrício de Araújo. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612.8



FOLHA DE APROVAÇÃO


Efeitos de drogas que atuam no sistema endocanabinoide injetadas na substância cinzenta periaquedutal dorsolateral na modulação de comportamentos defensivos

LUARA AUGUSTA DA COSTA E SILVA BRAGA BATISTA

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em NEUROCIÊNCIAS, como requisito para obtenção do grau de Mestre em NEUROCIÊNCIAS, área de concentração NEUROCIÊNCIAS CLÍNICAS.

Aprovada em 02 de agosto de 2013, pela banca constituída pelos membros:


Prof(a). Fabricio de Araújo Moreira - Orientador
Universidade Federal de Minas Gerais


Prof(a). João Vinicius Salgado
Universidade Federal de Minas Gerais


Prof(a). Fabíola Mara Ribeiro
Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte, 2 de agosto de 2013.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à minha família, aos meus pais Neuza e Robson e às minhas irmãs Raquel e Luanda por apoiarem a minha escolha em fazer mestrado e por me ajudarem de diversas formas durante todo o processo.

Devo agradecimentos também aos meus amigos da biologia que sempre estiveram presentes tanto nos momentos bons quanto nos ruins, tornando tudo mais “deboaceae”.

Obrigada à família LNP pela companhia, pela disposição em me ajudar, tirar dúvidas, discutir resultados... Obrigada Ana Flávia, Aninha, Carla, Jivago, Juliana, Luciano, Thércia, Pedro e Rita. O LNP é um laboratório especial onde fazemos não só experimentos, mas também café e amizades. Sinto-me sortuda por fazer parte desse grupo. Obrigada à professora Daniele pela ajuda nas apresentações, pela companhia nas viagens, pelos ratos (muito obrigada pelos ratos), camundongos e bate-papos.

Aos funcionários do biotério de farmacologia por cuidarem dos ratos e camundongos. Um trabalho indispensável para a feitura desta dissertação.

À secretaria de pós-graduação em neurociências pela disponibilidade e prontidão em me auxiliar. À banca examinadora por se dispor a ler, avaliar e julgar este trabalho.

Finalmente, agradeço ao meu orientador, Fabrício Moreira. O Fabrício é como um canabinoide em baixas doses, tornou o percurso muito menos aversivo e, portanto, mais agradável. A carreira acadêmica é um caminho tortuoso, escuro e cheio de armadilhas. Dá medo, mas nada que um canabinoide na dose certa, digo, um orientador com as palavras certas não resolva. Obrigada pelas palavras.

Agradeço às fontes financiadoras: FAPEMIG e CAPES.

“Orgão de ação encaminhado a fins práticos, parece o nosso cérebro haver sido construído, não para encontrar as últimas razões das coisas, senão para fixar suas causas próximas e determinar suas relações constantes. E isto, que parece pouco, é muitíssimo, porque, havendo nos concedido o supremo poder de atuar sobre o mundo, suavizando-o e modificando-o em proveito da vida, podemos dispensar-nos muito bem do conhecimento da essência das coisas.”

Santiago Ramon Y Cajal

Resumo

Os animais apresentam uma série de comportamentos defensivos frente a estímulos aversivos. Uma estrutura encefálica importante para a expressão desses comportamentos é a substância cinzenta periaquedutal dorsolateral (SCPdl). Em humanos, a estimulação da SCP causa efeitos similares a um ataque de pânico. Em ratos, causa reações de fuga que podem ser interpretadas como um comportamento do tipo pânico. Nesta mesma estrutura, a ativação de receptor CB1 induz efeitos anti-aversivos. Considerando-se esses aspectos, o presente trabalho objetivou testar a hipótese de que a ativação de receptor CB1 na SCPdl de ratos atenua a fuga. No primeiro modelo foram testados o inibidor da hidrólise do endocanabinoide anandamida, URB597 (veículo n=6; 0,3 nmol n=9; 1 nmol n=8; 3 nmol n=8) e o agonista CB1, ACEA (veículo n=8; 0,005 pmol n=9; 0,05 pmol n=5 e 0,5 pmol n=5). O ACEA (0,005 and 0,5 pmol) atenuou a fuga, indicando um efeito anti-pânico (ANOVA de duas vias com medidas repetidas). Em relação ao URB597, discreto efeito anti-pânico foi observado com a dose de 0,3nmol. O URB597 foi novamente testado, bem como o pré-tratamento com o antagonista AM251. Nesse experimento o URB597 na dose de 0,3 nmol não alterou a fuga. O URB597 foi testado, então, no modelo de fuga induzida por DLH na SCPdl, sobre o qual hipotetiza-se que há maior síntese e liberação de anandamida em comparação ao modelo do LTE. Nesse modelo, o URB597 foi capaz de atenuar a fuga reduzindo um de dois parâmetros medidos, o número de pulos em uma caixa ($P < 0,05$, teste de Mann Whitney) (veículo n=5; veículo-DLH=7; 0,3 nmol=7; 0,1 nmol=6; 0,1 nmol=6). Conclui-se que a ativação de receptor CB1 e a inibição da hidrólise de anandamida induzem efeito anti-pânico no modelo do LTE e no modelo de fuga induzida por DLH na SCPdl, respectivamente.

Abstract

Rodents present a repertoire of defensive behaviours to aversive situations. An important encephalic region involved in the expression of these behaviours is the dorsolateral periaqueductal gray matter (dlPAG). In humans, stimulation of this region causes a reaction similar to a panic attack. In rats, it causes escape reactions that can be interpreted as a panic-like response. In this same region, CB1 receptor activation induces anti-aversive effects. Considering these aspects, the objective of the present work was to test the hypothesis that CB1 receptor activation in the dlPAG attenuates the escape reaction. Dose-response curves were performed with the anandamide hydrolysis inhibitor, URB597 (vehicle n=7; 0,3 nmol n=9; 1 nmol n=8; 3 nmol n=8) and with the CB1 selective agonist, ACEA (vehicle n= 8; 0,005 pmol n=9; 0,05 pmol n=5 e 0,5 pmol n=5). ACEA (0,005 pmol and 0,5 pmol) had a panicolytic effect (two-way ANOVA with repeated measures). Concerning URB597, a discrete panicolytic effect was observed with the dose of 0,3nmol. URB597 was again tested as well as the pretreatment with the AM251 antagonist. In this experiment, 0,3nmol of URB597 didn't change the escape reaction. URB597 was then tested in the escape reaction induced by DLH in the dlPAG, a model in which, hypothetically, there is an augmented synthesis and release of anandamide relative to the ETM model. In this model, URB597 attenuated the escape reaction with the reduction of one of two parameters measured, the number of jumps in a box ($P < 0,05$, Mann Whitney 's test) (vehicle n=5; veículo-DLH=7; 0,3 nmol=7; 0,1 nmol=6; 0,1 nmol=6). It can be concluded that CB1 receptor activation and the anandamide hydrolysis inhibition induces panicolytic effect in the ETM and the escape reaction induced by DLH in the dlPAG models, respectively.

ÍNDICE

1. Introdução.....	13
1.1 Comportamentos defensivos e a relação com os transtornos da ansiedade.....	14
1.2 Substância cinzenta periaquedutal.....	18
1.3 Sistema endocanabinoide	21
2. Objetivos	28
2.1 Objetivo geral.....	29
2.2 Objetivos específicos.....	29
3. Materiais e métodos	30
3.1 Consideração ética.....	31
3.2 Animais	31
3.3 Drogas	31
3.4 Aparelhos experimentais	32
3.5 Cirurgia estereotáxica.....	34
3.6 Injeção	35
3.7 Perfusão e histologia	35
3.8 Análise estatística.....	36
4. Resultados	37
4.1 Curva dose-resposta do ACEA injetado na SCPdl no labirinto em T elevado.....	38
4.2 Curva dose-resposta do URB597 injetado na SCPdl no labirinto em T elevado	40
4.3 Efeitos do URB597 e do AM251 injetados na SCPdl no labirinto em T elevado	42
4.4 Curva dose-resposta do DLH injetado na SCPdl.....	44
4.5 Curva dose-resposta do URB597 injetado na SCPdl na fuga induzida por DLH	46

4.6 Porcentagem de animais que exibiram a fuga após tratamento com DLH ou a combinação URB597 e DLH	48
5. Discussão	50
6. Referências bibliográficas	57

1. INTRODUÇÃO

1.1 Comportamentos defensivos e a relação com os transtornos da ansiedade

Os comportamentos defensivos podem ser compreendidos como ações que o animal realiza frente a uma ameaça, a qual pode ser real ou potencial. De acordo com os pesquisadores Robert e Caroline Blanchard da Universidade do Havaí, a ameaça pode ser representada por um predador, odores do predador, contextos potencialmente perigosos (espaços abertos, por exemplo), loci do predador ou objetos perigosos (BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, 1988). Em uma situação em que a ameaça é um predador, foi observado que há uma diversidade de comportamentos defensivos que variam de acordo com a distância em que o predador encontra-se da presa. Por exemplo, quando o roedor encontra-se em um novo ambiente ou em um ambiente no qual uma ameaça real já esteve presente ele explora cautelosamente o local com o corpo estendido e o abdômen rente ao chão, tal comportamento foi nomeado avaliação de risco. Já em uma situação na qual a ameaça encontra-se longe (ameaça distal), mas foi detectada pela presa, o animal pode apresentar congelamento ou imobilidade. Quando o predador está próximo (ameaça proximal), o roedor pode fugir ou atacar, dependendo da possibilidade de escapatória (BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, 1988). Esses comportamentos são observados principalmente em ratos selvagens. Ratos que sofreram seleção artificial (ratos de laboratório) apresentam com menor frequência o comportamento de ataque e com maior frequência o comportamento de congelamento (BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, 1988)

Blanchard & Blanchard (1988) sugeriram que esses comportamentos poderiam ser interpretados como modelos para o estudo das emoções do medo e da ansiedade. Como essas emoções estão alteradas em indivíduos diagnosticados com transtornos da ansiedade, os comportamentos defensivos, por sua vez, poderiam modelar aspectos dessas psicopatologias. Foram desenvolvidos, então, modelos animais de ansiedade baseados na expressão desses comportamentos, como a bateria de teste de defesa de camundongos e o labirinto em T elevado (LTE) (BLANCHARD, R. J. et al., 1997; GRAEFF; NETTO; ZANGROSSI, 1998). No primeiro exemplo, o estímulo aversivo utilizado é um rato anestesiado enquanto no segundo exemplo, os espaços abertos de um labirinto representam o estímulo aversivo. Nesses modelos, determinados tipos de comportamentos são associados a transtornos da ansiedade distintos. Para que haja essa associação, o modelo deve preencher certos critérios de validação. São eles: a validação por critérios farmacológicos e a validação teórica (VAN DER STAAY; ARNDT; NORDQUIST, 2009).

Como neste trabalho será utilizado o modelo do labirinto em T elevado, uma breve explicação dele será dada a seguir. O LTE permite a análise de dois tipos de comportamentos defensivos distintos, a esquiva inibitória e a fuga. O modelo consiste em um labirinto no formato da letra T, no qual há um braço fechado com paredes perpendiculares a um braço aberto sem paredes. Para a expressão da esquiva inibitória, o animal é colocado no braço fechado e o tempo gasto para ele atingir o centro do labirinto (latência em segundos) é medido em três sessões consecutivas. A partir da segunda exposição, a latência aumenta progressivamente. Esse aumento da latência reflete um aprendizado do componente aversivo do contexto, o braço aberto. Já para a fuga, o animal é colocado no braço aberto do labirinto e o tempo gasto para ele atingir o centro é medido também em três sessões consecutivas. Nessa situação observa-se a

expressão de um medo inato ao espaço aberto. As validações farmacológicas indicam que a esquiva inibitória é preditiva de drogas ansiolíticas, já a fuga é preditiva de drogas anti-pânico (GRAEFF et al., 1998; POLTRONIERI; ZANGROSSI; DE BARROS VIANA, 2003). Como se vê, diferentes comportamentos são sensíveis a tratamentos distintos eficazes no transtorno da ansiedade generalizada e no transtorno do pânico.

Esses dois transtornos estão descritos no Manual de Estatística e Diagnóstico para Transtornos Mentais (DSM-IV) como transtornos da ansiedade e caracterizam-se pelos seguintes sintomas: estado de ansiedade e preocupação constantes por seis meses ou mais sem uma causa identificável para o transtorno da ansiedade generalizada; aparecimento de ataques de pânico recorrentes que podem aparecer aleatoriamente ou condicionados a locais ou situações específicas para o transtorno do pânico. Esses ataques caracterizam-se por um sentimento de medo intenso ou desconforto acompanhado de sintomas que podem ser somáticos ou cognitivos, alguns deles são: palpitações, sudorese, tremores ou abalos, sensações de falta de ar, sufocamento ou asfixia, tonturas e vertigens (AMERICAN PSYCHIATRY ASSOCIATION, 1994).

Ainda sobre a validação farmacológica do LTE, esses estudos mostraram que o benzodiazepínico diazepam diminui a latência da esquiva inibitória, mas não altera a fuga. Além disso, azapironas (buspirona e ipsapirona) também alteraram a esquiva (GRAEFF et al., 1998). Na clínica, essas duas classes de drogas são eficazes no tratamento da ansiedade generalizada (BALDWIN; WALDMAN; ALLGULANDER, 2011). Já a fuga é alterada, ou seja, a latência é aumentada, por antidepressivos inibidores seletivos da recaptação de serotonina administrados cronicamente, como a fluoxetina (POLTRONIERI et al., 2003). Esse tratamento assemelha-se ao utilizado para o transtorno do pânico (BALDWIN et al., 2005). Atualmente, no entanto, ambos os transtornos são tratados com antidepressivos da classe dos inibidores seletivos da

recaptação de serotonina (BALDWIN et al., 2005). Outra opção de tratamento para o transtorno do pânico são os benzodiazepínicos de alta potência relativa, como o alprazolam e o clonazepam (BATELAAN; VAN BALKOM; STEIN, 2011). É possível, então, em termos farmacológicos, focar nas diferenças entre os dois transtornos ou nas semelhanças. O labirinto em T elevado, portanto, ao distinguir entre duas classes de fármacos eficazes em um transtorno ou outro, é relevante para o estudo de certos aspectos desses transtornos que os tornam entidades nosológicas distintas.

A fuga, associada ao transtorno do pânico nesse modelo, pode ser induzida por outras formas além da exposição a um espaço aberto ou a um predador. Ela pode ser induzida por meio da estimulação elétrica ou química da porção dorsal de uma região encefálica denominada substância cinzenta periaquedutal (SCP) (MOREIRA et al., 2013). Como será visto no tópico a seguir, a fuga decorrente da estimulação elétrica da SCP pode ser interpretada como um modelo de ataque de pânico (SCHENBERG et al., 2001). Esse modelo possui preditabilidade farmacológica, já que antidepressivos inibidores seletivos da recaptação de serotonina e benzodiazepínicos de alta potência relativa atenuam a fuga. Além disso, há alguma similaridade entre as manifestações autonômicas que ocorrem durante um ataque de pânico e durante a estimulação da SCP de ratos, como taquicardia, hipertensão arterial e hiperventilação (SCHENBERG et al., 2001).

A injeção de aminoácidos excitatórios na SCP também induz a fuga. Tanto a injeção de agonistas seletivos para o receptor NMDA ou cainato quanto a injeção de agonistas não seletivos para receptores glutamatérgicos, como o ácido d,l-homocisteico (DLH) induzem a fuga (BANDLER; DEPAULIS; VERGNES, 1985; BANDLER; SHIPLEY, 1994; BECKETT; MARSDEN, 1995; BITTENCOURT et al., 2004; MORGAN; WHITNEY; GOLD, 1998). Diferentemente do LTE e do modelo da

estimulação elétrica na SCP, não há uma validação farmacológica envolvendo fármacos ansiolíticos, anti-pânicos e drogas ansiogênicas para a fuga induzida por aminoácidos excitatórios. Contudo, como será explicado no tópico seguinte sobre a SCP, independente da causa da estimulação, a fuga mediada pela SCP pode ser interpretada como um comportamento do tipo-pânico, distinto de um comportamento do tipo-ansiedade.

1.2 Substância cinzenta periaquedutal

A substância cinzenta periaquedutal (SCP) é uma região mesencefálica que circunda o aqueduto cerebral. Ela é dividida morfo-funcionalmente em colunas dorsomedial (SCPdm), dorsolateral (SCPdl), lateral (SCPl) e ventrolateral (SCPvl) (PAXINOS, 2004). Essa região possui um papel na modulação da dor, nas respostas a estímulos aversivos, na vocalização, na regulação autonômica e no comportamento sexual (lordose) (BEHBEHANI, 1995). As primeiras evidências que relacionaram essa região com a expressão de comportamentos defensivos foram reportadas por Fernandez de Molina e Huspenger (1959) que estimularam eletricamente a SCP de gatos acordados e observaram reações defensivas similares às reações que os gatos apresentam diante de um cachorro. Posteriormente, foi observado que em ratos a estimulação da região por meio de aminoácidos excitatórios ou por corrente elétrica induzia reações de fuga ou freezing. (BANDLER et al., 1985; JENCK; MOREAU; MARTIN, 1995). Mais tarde, notou-se que havia diferenças no tipo de resposta evocada, dependendo da localização do sítio de injeção. Essas respostas resumem-se do seguinte modo: a estimulação da porção dorsal (dorsomedial e dorsolateral) provoca reações de fuga e freezing. Já a estimulação da coluna ventrolateral provoca diminuição da atividade espontânea

(imobilidade) e uma menor responsividade aos estímulos ambientais (hiporreatividade) (Fig.1) (BRANDAO et al., 2008; KEAY; BANDLER, 2001). Uma outra forma de demonstrar o papel dessa região nas reações defensivas é estudando o efeito de lesões em determinadas porções da SCP na expressão desses comportamentos. Dessa forma, foi observado que lesão excitotóxica na SCPd inibe os comportamentos defensivos evocados por um estímulo olfatório (odor de gato) de ratas em fase de lactação (SUKIKARA et al., 2010).

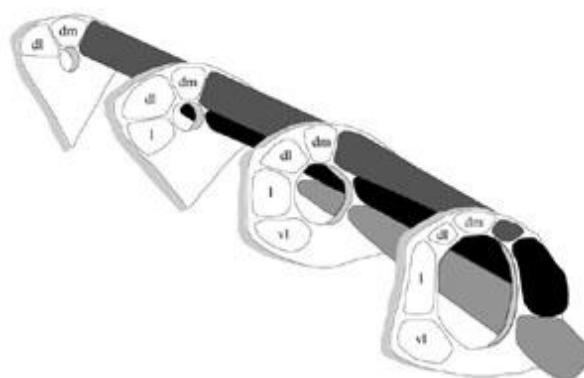


Figura 1. Desenho esquemático da SCP com destaque para as porções dorsolateral, lateral e ventrolateral. Modificado de Keay & Bandler, 2001.

Além das evidências obtidas a partir de estudos com a estimulação química ou elétrica da SCP e de um estudo envolvendo lesão, há evidências da participação dessa região nos comportamentos defensivos em estudos com a proteína Fos. Foi demonstrado que a exposição a um predador induz ativação da porção dorsal, lateral e ventrolateral e a exposição a um odor do predador induz ativação da porção dorsal e ventrolateral (CANTERAS; GOTO, 1999; DIELENBERG; CARRIVE; MCGREGOR, 2001). Além disso, foi observada a ativação da porção dorsal após a tarefa de fuga do LTE (estímulo aversivo sendo o espaço aberto) (SILVEIRA et al., 2001). Considerando-se todos esses estudos, torna-se claro que a SCP faz parte de circuitos diversos responsáveis pela elaboração de comportamentos defensivos evocados por diferentes estímulos, tais como um predador, odor do predador e espaços abertos.

(GROSS; CANTERAS, 2012). Desses circuitos, fazem parte outras regiões encefálicas como a amígdala, o hipótalamo, o córtex e o hipocampo. Um exemplo de um modelo proposto para um circuito de defesa que mediará o medo de predadores, as informações sensoriais chegarão na amígdala (*input*) que se projeta para o hipótalamo que por sua vez envia projeções para a SCPdl (*output*) (GROSS; CANTERAS, 2012).

Em relação ao papel que a SCP desempenha em humanos, foi evidenciado que a estimulação dessa região induz palpitações, hiperventilação, sensação de terror e morte iminente, vermelhidão da face e pescoço e desejo de escapar daquela situação (NASHOLD; WILSON; SLAUGHTER, 1969). Esses efeitos levaram à proposta de que essa estrutura participaria da expressão de um ataque de pânico. Além disso, as similaridades que existem entre um ataque de pânico, a estimulação da SCPd de ratos e a estimulação da SCP em humanos sugerem que o estudo da SCPd em ratos poderia ser útil para o entendimento da neurobiologia de um ataque de pânico (GENTIL, 1986; 1988 *apud* GRAEFF, 2004). Assim, foram desenvolvidos os modelos animais de pânico já citados no tópico anterior que se baseiam na fuga mediada pela SCPd.

É possível também hipotetizar a participação dessa região na expressão do medo e da ansiedade em humanos. Em um experimento de neuroimagem envolvendo seres humanos saudáveis, Mobbs e colaboradores (2007) sugeriram a participação de áreas como o córtex ventromedial e a SCP durante uma situação de ameaça distal e ameaça proximal, respectivamente (MOBBS et al., 2007). Esse resultado condiz com as observações comportamentais em ratos que mostram que a SCP é particularmente relevante para o comportamento de fuga, característico de ameaça proximal.

O estudo dos neurotransmissores que atuam na região e, portanto, que podem estar envolvidos com os comportamentos defensivos são úteis para o entendimento da neurobiologia de um ataque de pânico. Além disso, proporcionam novas possibilidades

de terapias farmacológicas. O tópico seguinte apresenta uma descrição de um desses sistemas, que é o sistema endocanabinoide, e a relação desse sistema com o medo e a ansiedade em humanos e com os comportamentos defensivos de ratos.

1.3 O sistema endocanabinoide

O sistema endocanabinoide compreende os ligantes endógenos, denominados endocanabinoides, as enzimas responsáveis pela síntese e pela degradação dos endocanabinoides e os receptores específicos. Os estudos sobre esse sistema originaram-se a partir de pesquisas sobre os constituintes da planta *Cannabis sativa*, a popularmente conhecida maconha. Dentre os inúmeros constituintes da maconha, os compostos da classe dos terpenofenólicos de 21 carbonos correspondem ao grupo dos fitocanabinoides (ELSOHLY; SLADE, 2005). O Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) é o principal fitocanabinoide responsável pelos efeitos psicotrópicos da maconha (MECHOULAM et al., 1970). Alguns dos efeitos são alteração na percepção temporal, euforia, prejuízo da memória de trabalho (D'SOUZA et al., 2004) e alteração do controle motor (RAMAEKERS et al., 2006). Em relação ao mecanismo de ação, sugeriu-se inicialmente que o Δ^9 -THC, devido à característica hidrofóbica, interagiria com a membrana plasmática das células de modo não específico. Contudo, em 1984 demonstrou-se que o Δ^9 -THC era capaz de inibir a enzima adenilato ciclase *in vitro* (HOWLETT; FLEMING, 1984; HOWLETT; QUALY; KHACHATRIAN, 1986). Essa evidência para a interação do composto com um sistema de sinalização intracelular sugeria a existência de um receptor ao qual se ligaria o Δ^9 -THC. Em 1988, então, por meio da técnica de ligantes marcados radioativamente (*binding*) foram identificados sítios de ligação aos quais se ligariam o Δ^9 -THC (DEVANE et al., 1988). Finalmente,

em 1990 um receptor acoplado à proteína G foi clonado, caracterizado como receptor canabinoide e nomeado CB1 (HOWLETT et al., 2002; MATSUDA et al., 1990). Os efeitos psicótropicos da maconha parecem ser causados, pelo menos em parte, pela interação de canabinoides com o receptor CB1, já que em indivíduos que fumaram maconha, a administração prévia de um antagonista seletivo para CB1 (SR141716) foi capaz de atenuar parte desses efeitos (HUESTIS et al., 2001).

Além do receptor CB1, um outro receptor canabinoide encontrado em células do sistema imune foi clonado e nomeado CB2 (HOWLETT et al., 2002; MUNRO; THOMAS; ABU-SHAAR, 1993). Atualmente, há evidências para a presença desse receptor também no sistema nervoso central (ONAIVI, 2006; VAN SICKLE et al., 2005). Ambos os receptores estão acoplados a uma proteína G inibitória. As cascatas de sinalização ativadas por agonistas CB1 ou CB2 são diversas. Alguns exemplos de eventos bioquímicos associados à ativação desses receptores e dependentes de proteína Gi são a inibição da produção de AMP cíclico, a ativação de canais iônicos para potássio retificadores de entrada, a inibição de canais iônicos para cálcio e a ativação de cinase ativada por mitógeno (MAPK) (HOWLETT et al., 2002).

A caracterização de um receptor canabinoide incitou a busca por ligantes endógenos e em 1992 foi identificada a N-aracdonoil-etanolamida como um ligante dos receptores CB1. Essa molécula recebeu o nome de anandamida, inspirado no termo Ananda que na língua indiana sânscrito significa felicidade (DEVANE et al., 1992). Em 1995, um outro ligante foi identificado, o 2-aracdonoil-glicerol (2-AG) (MECHOULAM et al., 1995; SUGIURA et al., 1995). A consequência neurofisiológica da ligação de anandamida ou 2-AG a um receptor CB1 está estritamente ligada à localização desses receptores nos neurônios. Eles foram inicialmente encontrados na membrana pré-sináptica de interneurônios gabaérgicos do

hipocampo (KATONA et al., 1999; TSOU et al., 1999). Esse resultado indicava a existência de uma neurotransmissão retrógrada na qual os ligantes endógenos interagiriam com receptores pré-sinápticos, modulando a liberação de neurotransmissores. Foi observado, então, que a ativação de receptor CB1 nos interneurônios gabaérgicos do hipocampo inibia a liberação de GABA (HOFFMAN; LUPICA, 2000; KATONA et al., 1999). Outros estudos mostraram que a ativação de receptor CB1 inibia a liberação de GABA em outras regiões do encéfalo, além de inibir a liberação de outros neurotransmissores como a acetilcolina, o glutamato, a noradrenalina e a serotonina (SCHLICKER; KATHMANN, 2001).

Em relação ao metabolismo da anandamida e do 2-AG, tem-se que eles são sintetizados a partir de fosfolipídios de membrana no neurônio pós-sináptico. O precursor da anandamida é a n-aracdonoil fosfatidiletanolamina e o precursor do 2-AG é o inositol-1,2-diacilglicerol. A síntese desses endocanabinoides é dependente de um influxo de cálcio e, como não há armazenamento em vesículas, ela ocorre sob demanda. (DI MARZO et al., 1994; STELLA; SCHWEITZER; PIOMELLI, 1997). As enzimas de degradação para o 2-AG e a anandamida são, respectivamente, a lipase monoacilglicerol localizada no neurônio pós-sináptico e a hidrolase amida de ácidos graxos localizada no neurônio pré-sináptico (CRAVATT et al., 1996; DINH; FREUND; PIOMELLI, 2002; EGERTOVA et al., 1998). Ainda debate-se sobre a presença ou não de transportadores de recaptção para a anandamida e o 2-AG (FOWLER, 2012; HERMANN; KACZOCHA; DEUTSCH, 2006). Considerando-se as características do sistema endocanabinoide citadas, a anandamida e o 2-AG não se encaixam no conceito de neurotransmissor clássico, sendo, então, neurotransmissores atípicos.

Conhecidos os elementos do sistema endocanabinoide, é possível manipulá-lo por meio de ferramentas farmacológicas, algumas delas são: o agonista seletivo para receptor CB1, ACEA; o inibidor do transportador de anandamida e 2-AG, AM404; o inibidor da degradação da anandamida, URB597 ou o inibidor da degradação do 2-AG, JZL184; os antagonistas seletivos para receptor CB1, SR141716 (rimonabanto) e AM251. Torna-se possível, então, investigar de que modo manipulações do sistema endocanabinoide podem influenciar fenômenos diversos, como os comportamentos defensivos ou as emoções.

Em humanos, os fitocanabinoides podem induzir efeitos diversos nas emoções do medo e da ansiedade, tais como aumento ou redução da ansiedade e ataques de pânico. Em uma pesquisa realizada na Nova Zelândia, Thomas (1996) concluiu que os efeitos adversos mais comuns associados ao uso da maconha eram ansiedade aguda e ataques de pânico (THOMAS, 1996). A ocorrência desses efeitos relaciona-se a uma menor chance de uso posterior da droga. Usuários crônicos, por sua vez, relatam uma redução na ansiedade e alívio da tensão após o uso, efeitos que constituem uma das razões para o uso continuado da droga, conforme revisado por Crippa e colaboradores (CRIPPA et al., 2009).

Os fitocanabinoides e canabinoides sintéticos também geram efeitos diversos em roedores, sendo descritos efeitos ansiolíticos, ansiogênicos ou anti-pânico (MOREIRA et al., 2012; VIVEROS; MARCO; FILE, 2005). De acordo com esses resultados, está a observação de que os receptores do tipo CB1 estão presentes em inúmeras regiões encefálicas, incluindo áreas descritas como tendo um papel na expressão dos comportamentos defensivos, como o córtex, a amígdala, o hipocampo, o hipotálamo e a substância cinzenta periaquedutal (HERKENHAM et al., 1991; HERKENHAM et al., 1990).

Os estudos envolvendo a injeção de agonistas canabinoides na SCPd (porções dorsomedial e dorsolateral) ou na SCPdl mostram um efeito ansiolítico ou anti-pânico dependendo do modelo empregado (MOREIRA et al., 2009; MOREIRA et al., 2012; SAITO; MOREIRA, 2010). Efeitos anti-pânico foram encontrados nos modelos de fuga induzida por estímulo elétrico ou químico da SCPd (CASAROTTO et al., 2012; FINN et al., 2003). Já efeitos ansiolíticos foram encontrados nos modelos do labirinto em cruz elevado, no teste de lambar punido de Vogel e no medo condicionado ao contexto (LISBOA et al., 2008; MOREIRA; AGUIAR; GUIMARAES, 2007; RESSTEL et al., 2008). Ambos os efeitos foram associados a uma ativação de receptor CB1.

Assim, de modo a sustentar a hipótese de que a ativação de receptor CB1 na SCPdl induz efeitos do tipo anti-pânico e, assim, reunir evidências para a proposição de hipóteses sobre o papel dos canabinoides na neurobiologia de um ataque de pânico, neste trabalho serão testadas drogas que atuam no sistema endocanabinoide na fuga gerada pelo labirinto em T elevado e na fuga gerada pela injeção de DLH. As drogas testadas, ACEA e URB597, atuam por mecanismos diferentes, a primeira é capaz de ativar diretamente o receptor CB1, enquanto a segunda promove uma maior disponibilidade de anandamida na fenda sináptica ao inibir a sua degradação. Dessa forma, o efeito do URB597 é limitado pela síntese de anandamida. Como já dito anteriormente, essa síntese se dá conforme a demanda. Há hipóteses, portanto, que tentam explicar que tipo de situação demandaria uma maior síntese e liberação de endocanabinoides e qual seria o mecanismo envolvido.

Em relação à situação, uma delas prediz que o estresse induziria a síntese e, portanto, a liberação de endocanabinoides, como a anandamida. Por exemplo, foi demonstrado que choques na pata promovem a liberação de anandamida e 2-AG na SCP de ratos, além disso, injeção de formalina via intradérmica e estimulação elétrica das

colunas lateral e dorsal da SCP também induzem a liberação de anandamida nessas mesmas colunas (HOHMANN et al., 2005; WALKER et al., 1999). De modo interessante, níveis aumentados de anandamida periférica também foram encontrados em humanos após uma tarefa de indução de estresse (*Trier Social Stress Test*) (DLUGOS et al., 2012). Essa hipótese, portanto, considera o sistema endocanabinoide como um “sistema de tamponamento do estresse”, no qual os ligantes, ao alterarem a liberação de outros neurotransmissores, restaurariam o equilíbrio homeostático prejudicado pelo estresse (RUEHLE et al., 2012).

No modelo de fuga induzida por DLH na SCPdl, tem-se que o comportamento gerado seria mais intenso e, aparentemente, mais estressante em comparação à fuga do LTE, o que levaria à maior síntese de anandamida. Em relação ao mecanismo que levaria ao aumento da síntese de endocanabinoides, existem evidências que relatam que a ativação de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA no hipocampo induz a síntese e a liberação de endocanabinoides, como a anandamida (OHNO-SHOSAKU et al., 2007). O DLH exerce seu efeito ao ligar-se principalmente em receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, embora haja evidências para a ligação em receptores AMPA, cainato e metabotrópicos também (PARPURA; VERKHRATSKY, 2013; YUZAKI; CONNOR, 1999). Assim, o DLH é um agonista não-seletivo de receptores glutamatérgicos. Hipotetizamos, portanto, que o DLH, ao ativar principalmente receptores do tipo NMDA, elevaria os níveis intracelulares de cálcio levando à síntese e à liberação de endocanabinoides, como a anandamida a exemplo do que ocorre no hipocampo. A anandamida, por sua vez, na presença de URB597 acumularia-se na fenda sináptica e ligaria-se a receptores do tipo CB1 atenuando o comportamento de fuga, ou seja, exercendo um efeito anti-pânico. Esse acúmulo de anandamida na fenda sináptica seria relativamente maior do que o acúmulo de anandamida proporcionado pelo estímulo do

LTE. A partir dessa hipótese, portanto, é que se justifica o teste do URB597 em dois modelos com graus de aversão distintos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Testar a hipótese de que a ativação de receptor CB1 na substância cinzenta periaquedutal dorsolateral induz efeitos do tipo anti-pânico no labirinto em T elevado e no modelo de fuga induzida por DLH.

2.2 Objetivos específicos

- a) Testar a hipótese de que o agonista seletivo para CB1, ACEA, induz efeitos do tipo anti-pânico no labirinto em T elevado
- b) Testar a hipótese de que o inibidor da hidrólise de anandamida, URB597, induz efeitos do tipo anti-pânico no labirinto em T elevado
- c) Testar a hipótese de que o inibidor da hidrólise de anandamida, URB597, induz efeitos do tipo anti-pânico no modelo de fuga induzida por DLH.
- d) Testar a hipótese de que o efeito gerado pelo URB597 é mediado por receptores CB1 pré-tratando os animais com o antagonista seletivo AM251

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Consideração ética

Os procedimentos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG, protocolo 059/11.

3.2 Animais

Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar (220-290g) oriundos do centro de bioterismo do ICB (CEBIO – UFMG). Os animais foram divididos em 5 por gaiola com livre acesso à comida e à água, mantidos em um biotério com ciclo claro-escuro de 12 horas e temperatura controlada (24°C).

3.3 Drogas

- a) O ACEA (Cayman Chemicals) foi diluído em solução salina (0,9%). As doses para a curva dose-resposta foram 0,005 pmol; 0,05 pmol e 0,5 pmol.
- b) O URB597 (Cayman Chemicals) foi diluído em uma solução de cremophor, etanol e salina em uma proporção de 1:1:18. As doses utilizadas foram 0,3 nmol; 1 nmol e 3 nmol.
- c) O AM251 (Cayman Chemicals) foi diluído em solução salina (0,9%). A dose utilizada foi baseada em curva dose-resposta já feita no laboratório e foi de 100 pmol

3.4 Aparelhos experimentais

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

b) Caixa de observação: para se avaliar o comportamento dos animais após a injeção das drogas, foi utilizada uma caixa de acrílico transparente (29 x 19 x 34 cm), acoplada a uma tampa de malha plástica com um orifício que permite a passagem do polietileno P10 (Fig. 3). Durante quatro minutos, a reação dos animais foi gravada por uma câmera de vídeo localizada em frente a caixa de observação. Os parâmetros quantificados foram cruzamentos e pulos. Considerou-se cruzamento quando o animal

atravessou a linha média da caixa com as quatro patas e pulo quando o animal retirou as quatro patas do chão simultaneamente (AGUIAR et al., 2006). Após a retirada do animal da caixa, o chão e as paredes da mesma eram limpas com álcool 70%.

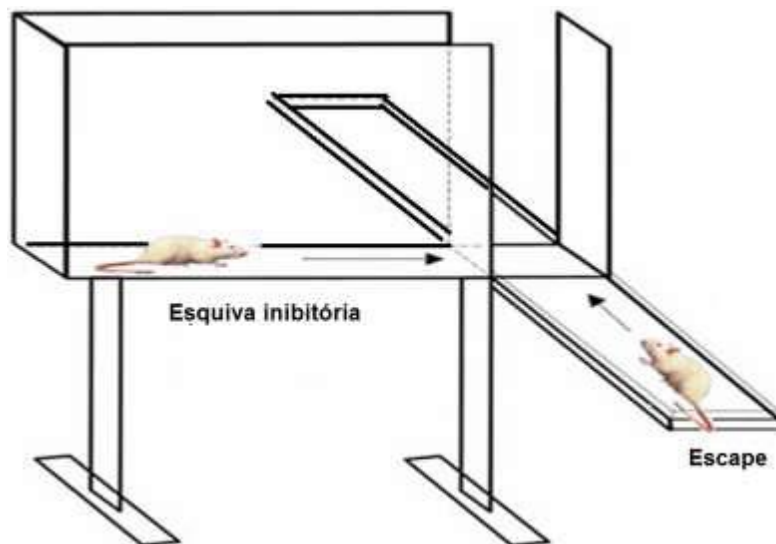


Figura 2. Labirinto em T Elevado



Figura 3. Caixa de observação

3.5 Cirurgia estereotáxica

Para a operação cirúrgica os animais foram anestesiados com cetamina (Vetnil®, Brasil) e xilazina (Calmium®, Agener União, Brasil) na proporção de 3:5 em uma dose de 1mL/kg. Em seguida, foram colocados no aparelho estereotáxico e aplicados: anestésico e vasoconstritor (cloridrato de lidocaína e hemitartrato de epinefrina, Lidostesim® 3%, Eurofarma, Brasil) via subcutânea; antibiótico (Pentabiótico®, Fort Dodge, Brasil) na dose de 2mg por animal via intramuscular; analgésico, antitérmico e antiinflamatório (Banamine®, Schering Plough, Brasil) 1mL/kg via subcutânea. Para expor a calota craniana, foi feito um pequeno corte na pele da cabeça do animal e todo o tecido que envolve a calota foi retirado para a visualização das suturas no crânio, onde encontram-se os pontos de referência lambda e bregma de acordo com o atlas Paxinos & Watson (2006). A inclinação da cabeça do animal no aparelho foi ajustada de modo que o lambda e o bregma estivessem no mesmo plano horizontal. Tendo o lambda como

ponto de referência, as medidas lateral (-1.9) e dorsoventral (-4.2) foram feitas. Uma cânula de 11mm foi colocada em um ângulo de 16°, além de um mandril para a obstrução do ducto da cânula. A cânula e o mandril foram fixados à cabeça do animal através de cimento acrílico para dentista fixados a dois parafusos. No pós-operatório, os animais foram colocados sob uma luz quente até despertarem e mantidos no biotério por no mínimo 5 dias até o experimento comportamental.

3.6 Injeção

Para a injeção das drogas foi utilizada uma agulha odontológica gengival de 12mm conectada a um tubo de polietileno (P10) preenchido com água destilada, uma bolha de ar foi deixada entre a droga e a água destilada. O tubo, por sua vez, conectava-se a uma seringa de 10 μ L Hamilton® controlada por uma bomba de infusão. O volume injetado foi de 0,2 μ L em uma frequência de 0,4uL/min. Após a injeção, a agulha permaneceu na cânula durante 30 segundos. Imediatamente após a infusão de DLH o animal já apresentava pulos e o comportamento era, então, medido. O intervalo entre a injeção e o teste comportamental foi de 10 minutos para as drogas ACEA e URB597. Quando foram realizadas duas injeções (URB597 e antagonista) o antagonista era administrado primeiro, 5 minutos depois o URB597 era injetado e após 10 minutos o DLH era injetado.

3.7 Perfusão e histologia

Um dia após o experimento comportamental os animais foram anestesiados com uma overdose de hidrato de cloral (2mL/rato) e o procedimento da injeção intracerebral foi repetido para a injeção de corante azul de Evans para a visualização do sítio de injeção. Para a retirada dos cérebros os animais foram perfundidos com solução salina 0,9% e formol 25%, em seguida foram armazenados no formol por no mínimo 2 dias. Para a observação do sítio de injeção, os cérebros foram levados a um micrótomo criostato, onde fatias de 40 μ m foram retiradas em sentido coronal até que se atingisse um plano no qual fosse possível observar o corante marcando o sítio de injeção.

3.8 Análise estatística

Para os resultados do LTE, os tempos de latência para saída dos braços do labirinto foram comparados por análise de variância (ANOVA) de duas vias com medidas repetidas, levando-se em conta os fatores tratamento (veículo ou drogas) e sessão (já que 3 exposições consecutivas foram realizadas). Foi utilizado o teste *post-hoc* de Bonferroni. Para avaliação da resposta de fuga ao DLH, os números de cruzamentos e de pulos foram analisados pelos testes não paramétricos de Kruskal-Wallis seguido de Mann-Whitney. Um teste de normalidade (Kolmogorov-Smirnov) foi realizado em todos os grupos para ambos os parâmetros. Além disso, a porcentagem de animais que exibiram a fuga foi analisada pelo teste do chi-quadrado (X^2) seguido do teste de Fischer. Para tal, a resposta de fuga foi definida como a apresentação de ao menos 1 pulo pelo animal, já que esse comportamento não é observado normalmente em animais não estimulados na SCDdl. O nível de significância estabelecido em todos os testes foi de $P < 0,05$.

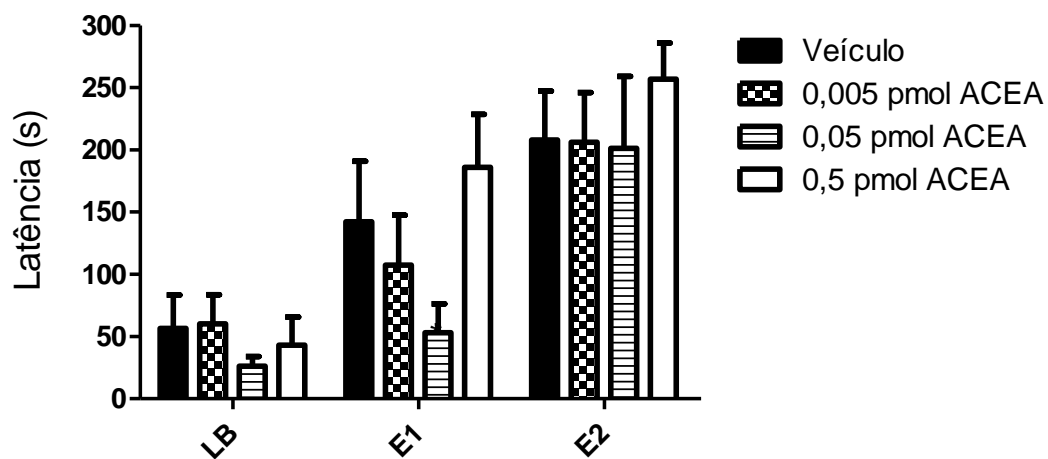
4. RESULTADOS

4.1 Curva dose-resposta do ACEA injetado na SCPdl no LTE

O gráfico da figura 4.A expõe a curva dose-resposta do agonista para CB1, ACEA. A análise de variância de duas vias revelou diferenças estatisticamente significativas entre os três testes da esQUIVA inibitória (LB, E1 e E2) para todos os grupos [$F(2,46) = 37,45$; $P < 0,01$], indicando o aprendizado da esQUIVA inibitória. Não houve efeito do fator tratamento [$F(3,46) = 0,63$; ns] e nem na interação entre o fator tratamento vs. fator teste [$F(6,46) = 0,93$; ns].

O gráfico da figura 4.B mostra as latências para a tarefa de fuga realizada 30 segundos após a E2. A análise de variância de duas vias revelou que o fator tratamento altera significativamente o resultado [$F(3,46) = 4,01$; $P = 0,01$]. O teste de Bonferroni detectou uma diferença estatisticamente significativa entre as doses de 0,005 pmol; 0,5 pmol e o veículo, indicando um efeito do tipo anti-pânico nessas doses ($P < 0,05$). Não houve interação entre os fatores [$F(6, 46) = 1,50$; ns]. Houve efeito do fator sessão [$F(2,46) = 15,77$; $P < 0,01$].

A



B

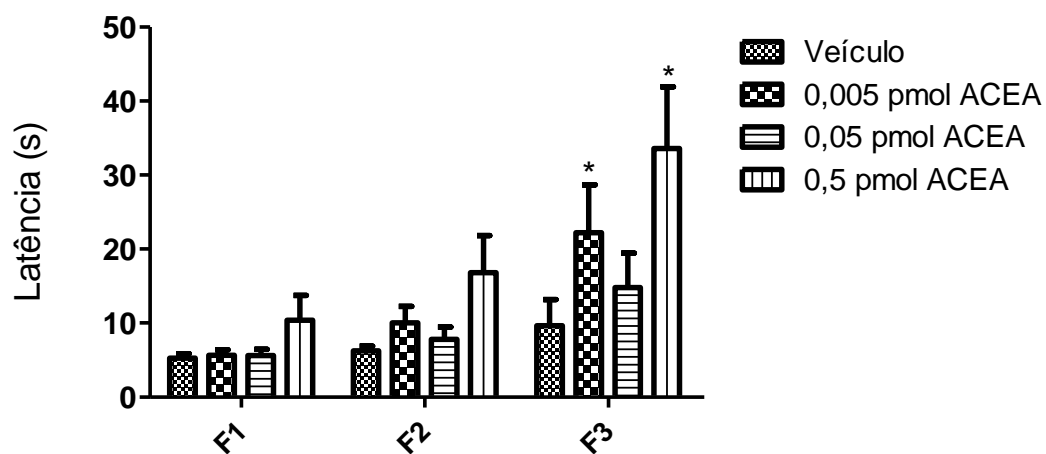


Figura 4. Efeito do ACEA na esquivia inibitória (A) e na fuga (B). LB refere-se à linha de base, enquanto E1 e E2, o teste de esquivia 1 e 2, intercalados por um intervalo de 30 segundos. F1, F2 e F3 referem-se ao teste de fuga 1, 2 e 3, intercalados por um intervalo de 30 segundos. As colunas representam a média do tempo e a barra vertical, o erro padrão da média. O ACEA e o veículo foram administrados 10 minutos antes do teste. n=5-9. *P<0,05.

4.2 Curva dose-resposta do URB597 injetado na SCPdl no LTE

O gráfico da figura 5.A expõe a curva dose-resposta do inibidor da hidrólise de anandamida, URB597. A análise de variância de duas vias revelou diferenças entre os três testes da esQUIVA inibitória (LB, E1 e E2) para todos os grupos [$F(2,56) = 71,54$; $P < 0,01$], indicando o aprendizado da esQUIVA inibitória. Não houve efeito do fator tratamento [$F(3,56) = 0,24$; ns] e nem na interação entre o fator tratamento vs. fator teste [$F(6,56) = 0,36$; ns].

O gráfico da figura 5.B mostra as latências para a tarefa de fuga realizada 30 segundos após a E2. Não houve efeito do fator tratamento [$F(3,56) = 1,60$; ns]. O teste de Bonferroni, no entanto, detectou uma diferença entre a dose de 0,3 e o veículo ($P < 0,01$). Não houve interação entre os fatores [$F(6,56) = 1,96$; ns]. Houve efeito da sessão [$F(2,56) = 6,7$; $P < 0,01$]

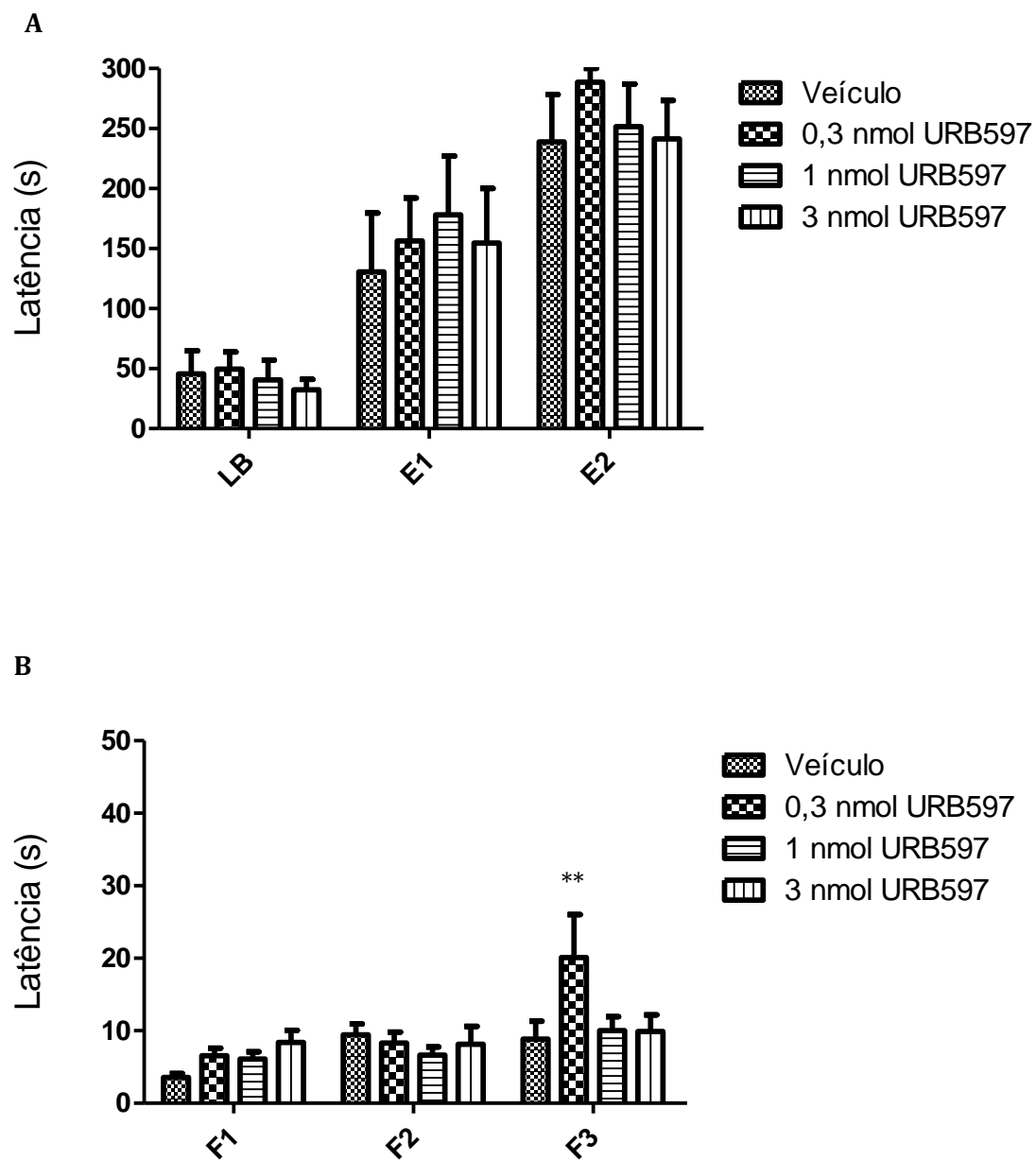


Figura 5. Efeito do URB597 na esquiva inibitória (A) e na fuga (B). LB refere-se à linha de base, enquanto E1 e E2, o teste de esquiva 1 e 2, intercalados por um intervalo de 30 segundos. F1, F2 e F3 referem-se ao teste de fuga 1, 2 e 3, intercalados por um intervalo de 30 segundos. As colunas representam a média de tempo e a barra vertical, o erro padrão da média. O URB597 e a veículo foram administradas 10 minutos antes do teste. n=7-9. **P<0,01.

4.3 Efeitos do URB597 e do AM251 no labirinto em T elevado

O gráfico da figura 6.A mostra o efeito do URB597 (0,3 nmol) e do antagonismo do AM251 (100 pmol). A análise de variância de duas vias revelou diferenças entre os três testes da esQUIVA inibitória (LB, E1 e E2) para todos os grupos [$F(2,50) = 58,23$; $P < 0,01$], indicando o aprendizado da esQUIVA inibitória. Não houve efeito do fator tratamento [$F(3,50) = 0,83$; ns] e nem na interação entre o fator tratamento vs. fator teste [$F(6,50) = 0,56$; ns].

O gráfico da figura 6.B mostra as latências para a tarefa de fuga. A análise de variância de duas vias não revelou efeito do tratamento [$F(3,50) = 1,48$; ns]. Não houve efeito na interação entre os fatores e nem efeito do fator sessão [$F(6,50) = 2,27$; ns] e [$F(2,50) = 1,30$; ns], respectivamente. O teste de bonferroni não detectou nenhuma diferença entre os grupos.

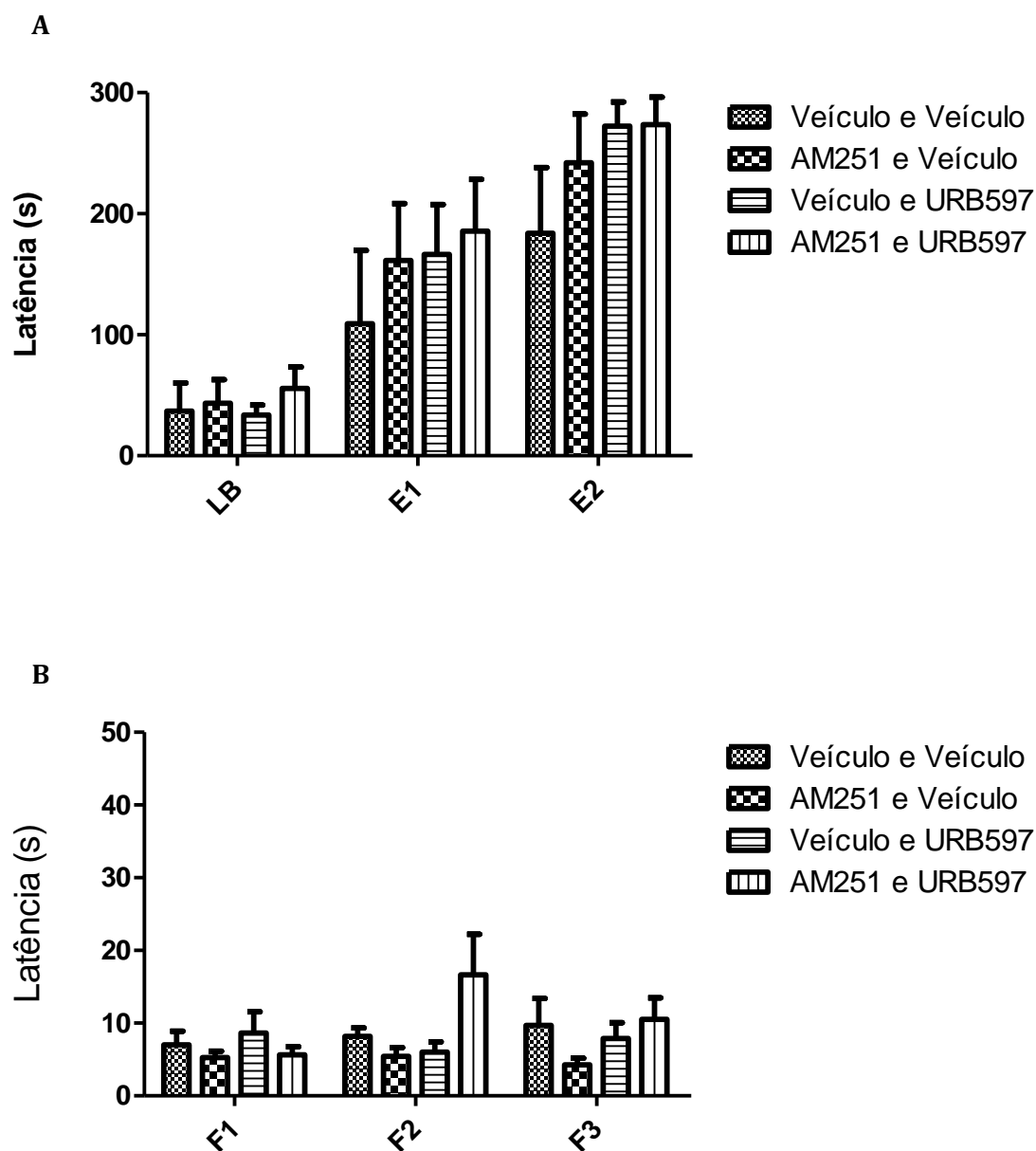


Figura 6. Efeito do AM251 (100 pmol) e do URB597 (0,3 nmol) na esquia inibitória (A) e na fuga (B). LB refere-se à linha de base, enquanto E1 e E2, o teste de esquia 1 e 2, intercalados por um intervalo de 30 segundos. F1, F2 e F3 referem-se ao teste de fuga 1, 2 e 3, intercalados por um intervalo de 30 segundos. As colunas representam a média de tempo e a barra vertical, o erro padrão da média. O AM251 foi administrado 15 minutos antes do teste, já o URB597 10 minutos antes do teste. n=6-8

4.4 Curva dose-resposta do DLH injetado na SCPdl

O gráfico da figura 7.A expõe a curva dose-resposta do aminoácido excitatório, DLH para o parâmetro pulo. Foi encontrado um efeito geral de acordo com o teste de Kruskal-Wallis ($P<0,01$). Doses crescentes de DLH geraram um aumento significativo dos pulos em relação ao veículo de acordo com o teste de Mann-Whitney ($P<0,01$).

O gráfico da figura 7.B mostra a curva para o parâmetro cruzamento. Um efeito geral foi encontrado com o teste de Kruskal-Wallis ($P<0,01$). Todas as doses aumentaram o número de cruzamentos em relação ao veículo, sendo esse aumento progressivo de acordo com o teste de Mann-Whitney ($P<0,05$ entre a dose de 5nmol e o veículo; $P<0,01$ entre a dose de 10 nmol e 20 nmol e o veículo).

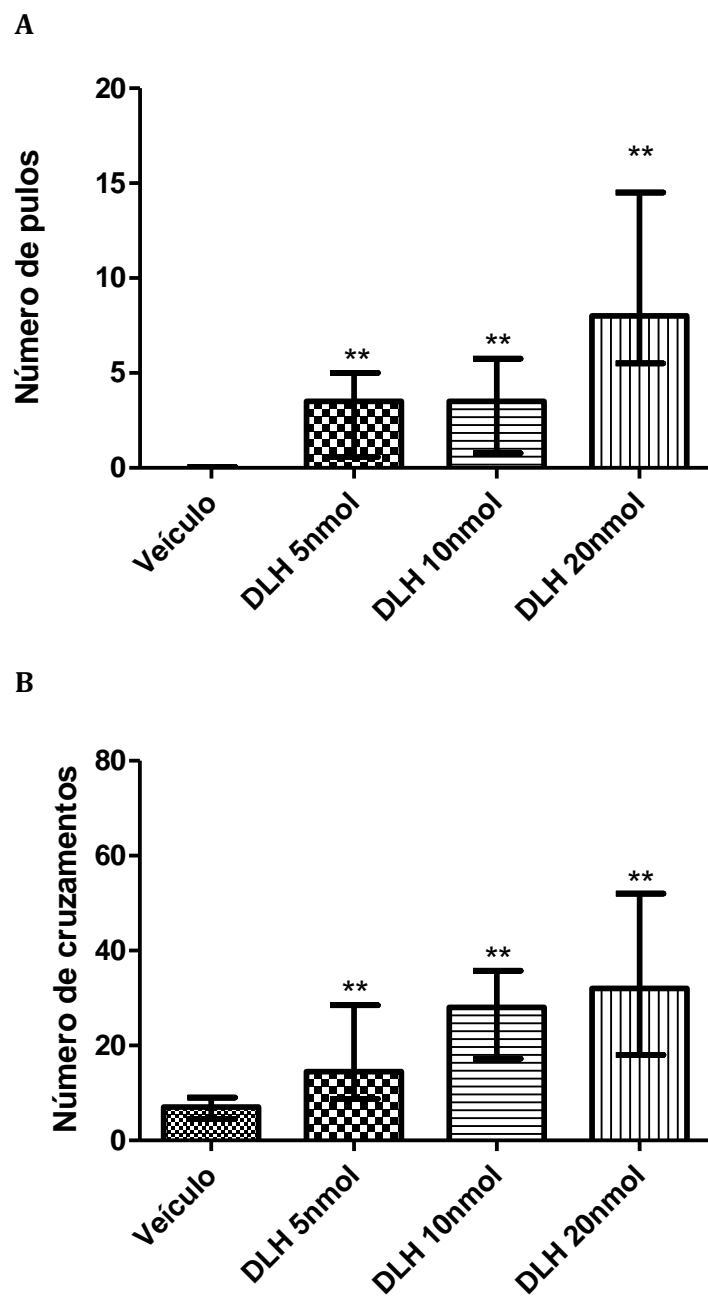


Figura 7. Doses crescentes de DLH no número de pulos (A) cruzamentos (B). As barras representam a mediana e as colunas o intervalo inter-quartil. A fuga é medida imediatamente após a injeção de DLH.

* $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$. $n = 5-8$

4.5 Curva dose-resposta do URB597 injetado na SCPdl na fuga induzida por DLH

A partir da curva dose-resposta anterior, foi estabelecida a dose de 10nmol (dose intermediária) para a avaliação do efeito do URB597. O teste de Kruskal-Wallis detectou uma diferença geral entre as medianas ($P<0,05$). Como observado no gráfico da figura 8.A, a administração de 10 nmol de DLH aumentou o número de pulos, como esperado ($P<0,05$). A dose de 0,3 nmol e 0,1 nmol de URB597 não diferiu significativamente do grupo veículo-veículo e nem do grupo veículo-DLH ($P>0,05$). Já a dose de 3 nmol diferiu significativamente do grupo veículo-DLH, indicando um efeito do tipo anti-pânico (teste de Mann-Whitney) ($P<0,05$).

Em relação ao parâmetro número de cruzamentos (fig. 8.B), O teste de Kruskal-Wallis detectou uma diferença entre as medianas ($P<0,05$). O DLH na dose de 10 nmol novamente aumentou esse número, como esperado ($P<0,05$). As doses de 0,3 nmol e 3 nmol diferiram significativamente do grupo veículo-veículo ($P<0,05$). Já a dose de 1 nmol não diferiu de nenhum grupo ($P>0,05$) (teste de Mann Whitney).

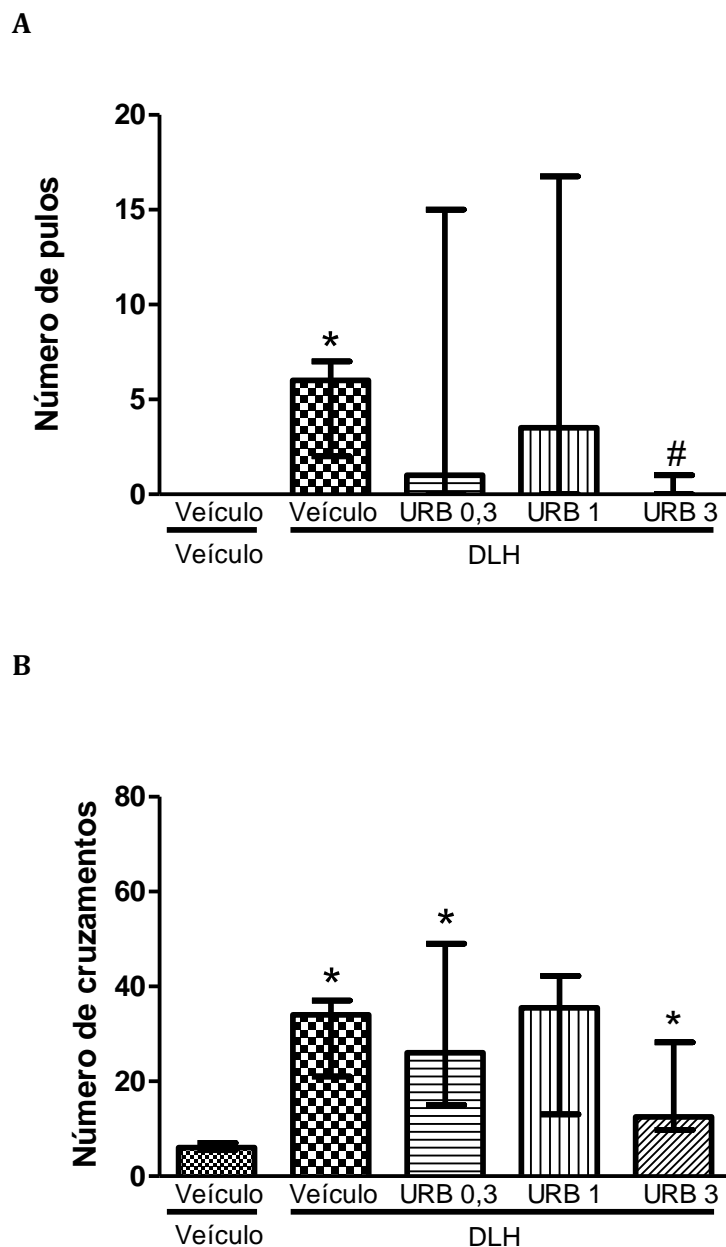


Figura 9. Efeito do URB597 no número de pulos (A) e cruzamentos (B). As barras indicam a mediana e as colunas o intervalo inter-quartil. * diferente em relação ao veículo-veículo, $P < 0,05$; # diferente em relação ao veículo-DLH, $P < 0,05$. O URB597 foi administrado 10 minutos antes da injeção de DLH. $n=5-7$

4.6 Porcentagem de animais que exibiram a fuga após o tratamento com o DLH ou a combinação URB597 e DLH

A tabela 1 mostra a porcentagem de animais que apresentaram a fuga, ou seja, que exibiram pelo menos 1 pulo. O teste de X^2 mostrou que há uma diferença geral entre as proporções [$X^2= 14,73$ $df=3$ $P<0,01$]. O teste de Fischer detectou diferenças para todos os tratamentos em relação ao veículo. Para a dose de 5 nmol, $P<0,05$; para a dose de 10 nmol, $P<0,05$ e para a dose de 20 nmol, $P<0,01$.

Em relação à tabela 2, o teste de X^2 mostrou que há uma diferença geral entre as proporções [$X^2= 11,20$ $df=4$ $P<0,01$]. O teste de Fisher detectou diferenças entre o grupo que recebeu veículo-DLH e o veículo-veículo e entre o grupo tratado com a maior dose de URB597 (3 nmol) e o grupo que recebeu veículo-DLH ($P<0,05$), indicando a atenuação da fuga pelo URB597.

Tabela 1. Porcentagem de animais que apresentaram reação de fuga, n=5-7. *P<0,05

Tratamento	Porcentagem
Veículo	0
DLH 5 nmol	75*
DLH 10 nmol	83*
DLH 20 nmol	100*

Tabela 2. Porcentagem de animais que apresentaram reação de fuga, n=5-7. *P<0,05 em relação ao grupo veículo-veículo. #P<0,05 em relação ao grupo veículo-DLH.

Tratamento	Porcentagem
Veículo + Veículo	0
Veículo + DLH 10 nmol	85*
URB597 0,3 nmol + DLH	57
URB597 1 nmol + DLH	50
URB597 3 nmol + DLH	16.6#

5. DISCUSSÃO

Neste trabalho, foram testadas duas drogas com mecanismos de ação diferentes, o ACEA e o URB597 no labirinto em T elevado. O labirinto em T elevado é um modelo que permite a distinção entre drogas eficazes no transtorno da ansiedade generalizada, tal como o benzodiazepínico, diazepam, e drogas eficazes no transtorno do pânico, tal como o inibidor seletivo da recaptação de serotonina, fluoxetina (GRAEFF et al., 1998). O fato de que diferentes classes de fármacos alteram seletivamente um comportamento ou outro está de acordo com a hipótese de que esses comportamentos possuem substratos neurais distintos. Além disso, estudos de imunohistoquímica utilizando a proteína Fos como marcador de atividade neuronal revelaram que regiões diferentes são ativadas após cada um dos comportamentos. A SCPd (colunas dorsomedial e dorsolateral) é preferencialmente ativada durante a tarefa da fuga, desse modo, a partir desse resultado, espera-se que drogas que atuem na SCPd alterem especificamente esse comportamento (SILVEIRA et al., 2001). Os resultados obtidos neste trabalho com a curva dose-resposta de ACEA estão de acordo com a hipótese de que a SCPdl está particularmente envolvida no comportamento da fuga. Isso porque a administração de ACEA intra-SCPdl causou um aumento na latência da fuga, mas não alterou a esQUIVA inibitória.

Alguns trabalhos têm demonstrado um efeito anti-pânico de agonistas para receptor CB1 injetados na SCPd ou na SCPdl. Estudos iniciais de Finn e colaboradores (2003) mostraram que o agonista HU210 atenuou a fuga induzida por DLH (FINN et al., 2003). Já o ACEA na dose intermediária (0.05pmol) foi capaz de aumentar o limiar de corrente elétrica necessário para induzir a fuga no modelo de fuga induzida por estimulação elétrica da SCPd (CASAROTTO et al., 2012) . Além disso, essa droga, em todas as doses (0.005, 0.05 e 0.5pmol) foi capaz de inibir a fuga induzida por NMDA na SCPdl (VIANA, 2012). O ACEA, portanto, foi capaz de alterar a fuga nos seguintes

modelos: labirinto em T elevado, estimulação elétrica da SCPd e injeção de NMDA na SCPdl, sendo este efeito, nos dois últimos modelos, bloqueado pelo antagonista seletivo para receptor CB1, AM251. O efeito anti-pânico da ativação de receptor CB1 também foi demonstrado por meio do URB597 na SCPdl no modelo de fuga induzida por NMDA, já que esse efeito foi bloqueado pelo AM251 (VIANA, 2012). Os dados deste trabalho, portanto, constituem mais uma evidência para um efeito anti-pânico da ativação de receptor CB1 na região.

Em relação às doses utilizadas, o efeito anti-pânico foi obtido com a menor (0,005pmol) e a maior dose (0,5pmol) de acordo com o teste de bonferroni. Esse padrão de resposta não condiz com as observações de que os agonistas canabinoides em modelos de ansiedade apresentam curva em U invertido ou respostas bifásicas, ou seja, doses intermediárias sendo eficazes e maiores doses sendo ansiogênicas ou não tendo efeito. Ainda que a maioria dos trabalhos apresentem uma curva em U invertido, sugerindo haver uma regra geral para o efeito de agonistas canabinoides em modelos de ansiedade, alguns trabalhos com injeção central não corroboram essa ideia. No modelo de fuga induzido por NMDA, o ACEA não apresentou uma curva em U invertido (VIANA, 2012). O agonista ACPA injetado na amígdala central não apresentou curva em U invertido no labirinto em cruz elevado (ZARRINDAST et al., 2011). Por fim, o HU210 injetado na SCPdl não apresentou curva em U invertido no modelo de fuga induzido por DLH (FINN et al., 2003). A diferença nas respostas observadas, portanto, pode estar associada ao emprego de diferentes modelos de ansiedade.

O ACEA injetado na SCPdl, além de induzir efeitos anti-pânico, também gera efeitos ansiolíticos no modelo do labirinto em cruz elevado (MOREIRA et al., 2007). No LTE, contudo, o ACEA não apresentou efeitos ansiolíticos. Essa aparente discrepância pode ser explicada por dois fatores: primeiramente, ambos os modelos

baseiam-se na aversão aos espaços abertos, dessa forma, o ACEA teve efeitos anti-aversivos em ambos os modelos. Segundo, provavelmente, o estado de ansiedade gerado pelo LCE é diferente do estado gerado pelo LTE. De acordo com essa hipótese, foi demonstrado que o padrão de ativação de áreas em animais expostos ao LCE é diferente do padrão de ativação de áreas em animais que executaram a esquiva inibitória no LTE, como observado por marcação da proteína Fos (SILVEIRA; SANDNER; GRAEFF, 1993; SILVEIRA et al., 2001). A substância cinzenta periaquedutal dorsal, por exemplo, é ativada durante a exposição ao LCE, mas não é ativada durante a esquiva inibitória. É importante lembrar que no LCE o animal executa dois tipos de reações defensivas, a esquiva (evitação do braço aberto) e a fuga (saída do braço aberto) sem distinguí-las, o que pode relacionar-se às diferenças no padrão de ativação das áreas e, portanto, no efeito do ACEA intra-SCPA_{dl} nesses dois modelos.

A outra droga testada no LTE foi o URB597. Essa droga, como já explicado, inibe a hidrólise da anandamida, cuja síntese se dá conforme a demanda. De acordo com a análise de variância de duas vias, o tratamento com o URB597 não afetou o resultado da esquiva inibitória e nem da fuga, contudo, o teste de bonferroni detectou uma diferença estatisticamente significativa entre a menor dose (0,3nmol) e o veículo na terceira sessão da fuga. De modo a confirmar esse resultado e também atestar a participação de receptores CB1 nesse efeito, o URB597 na dose de 0,3nmol foi novamente avaliado, bem como o pré-tratamento com o AM251.

Nessa segunda avaliação, a análise de variância de duas vias não encontrou nenhum efeito do tratamento. O teste de bonferroni também não detectou nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Esses resultados, pois, confirmam a análise obtida com a ANOVA de duas vias na primeira avaliação que mostrou que as diferenças nas latências entre os grupos constituem variações dentro de

uma distribuição normal e que, portanto, não há um efeito do tratamento. Uma hipótese que poderia explicar a ausência de efeitos do URB597 seria a de que o labirinto em T elevado não é um estímulo aversivo o suficiente para a indução da síntese de anandamida. Em um trabalho de Haller et al (2009), no qual foi avaliado o efeito do URB597 sistêmico no labirinto em cruz elevado, foi demonstrado que dependendo das condições em que o teste era realizado, a droga apresentava um efeito ansiolítico ou não. Essas mudanças relacionavam-se ao nível de aversividade dos procedimentos, assim, quando os animais eram habituados ao experimentador, à sala de experimento e uma baixa luz era empregada, a droga não apresentava nenhum efeito. Já em uma situação de maior aversividade, com alta luz, sem habituação ao experimentador ou à sala de experimento, a droga apresentava efeitos ansiolíticos (HALLER et al., 2009). Esse estudo, portanto, sugere a necessidade de condições suficientemente aversivas para se observar um efeito anti-aversivo do URB597. Ou seja, condições que levariam a um aumento da síntese e da liberação de anandamida na fenda sináptica.

O URB597 foi testado, então, no modelo de fuga induzido por DLH. Nesse modelo é medido o número de cruzamentos e o número de pulos em uma caixa gerados pela injeção da droga na SCPdl. Como esperado, o DLH aumentou o número de pulos e de cruzamentos. O URB597 na dose de 3 nmol foi capaz de atenuar a fuga, reduzindo o número de pulos. Além disso, observa-se uma redução na proporção de animais que apresentaram a fuga em todas as doses, embora essa redução só tenha alcançado significância estatística com a maior dose. Não houve diferença estatisticamente significativa para o parâmetro cruzamentos.

Em relação à hipótese inicial, esse resultado dá um indício de que há mais anandamida disponível atuando em receptores CB1, levando à atenuação da fuga. Mais experimentos, contudo, são necessários para se corroborar essa hipótese. O efeito do

pré-tratamento com um antagonista CB1 deve ser avaliado, por exemplo. Isso para demonstrar a reprodutibilidade do efeito e atestar a participação de receptores CB1 no mecanismo de ação. Além disso, seria relevante obter dados a respeito da liberação de anandamida nos dois modelos e compará-los. Mais evidências, portanto, são necessárias para corroborar a hipótese inicial de que o efeito anti-pânico gerado correlaciona-se com ou é causado pela ativação de receptor CB1 pela anandamida.

Trabalhos prévios deste laboratório demonstraram um efeito anti-pânico do URB597 no modelo de fuga induzido por NMDA (VIANA, 2012). Nesse trabalho, todas as doses testadas (0,3 nmol; 1 nmol; 0,3 nmol) atenuaram a fuga, com redução tanto do número de cruzamentos quanto do número de pulos. Nesse modelo, portanto, o URB597 parece ser mais eficaz em atenuar a fuga do que no modelo que utiliza o DLH como estímulo. A razão para essa diferença nos resultados ainda não está clara, mas uma hipótese pode ser formulada. Primeiro, a fuga gerada pelos dois estímulos ainda que similar em termos de comportamento, distingue-se em termos neuroquímicos. Isso porque o DLH é um agonista não-seletivo de receptores glutamatérgicos, enquanto o NMDA, naturalmente, é seletivo para receptores NMDA. Dessa forma, outros mecanismos que induzem a fuga são acionados, além da ativação de receptores NMDA e que podem não sofrer influências da ação de certa quantidade de anandamida em receptores CB1. Por exemplo, no modelo de fuga induzido por óxido nítrico, a maior dose testada de URB597 (0,1 nmol) foi capaz apenas de atenuar um de dois parâmetros medidos (LISBOA; GUIMARAES, 2012). Dessa forma, dependendo do mecanismo que induz a fuga, ou seja, do modelo, o URB597 tem um efeito anti-pânico mais, ou menos, evidente, o que poderia significar eficácias distintas.

Em relação à característica anti-aversiva do URB597 injetado intracerebralmente, Lisboa (2008) demonstrou que essa droga na dose de 0,01 nmol

apresenta um efeito ansiolítico no teste de conflito do lambar punido de Vogel. Em resumo, tem-se que o URB597 injetado intra-SCPdl apresenta efeitos anti-aversivos nos modelos de fuga induzido por NMDA, DLH, NO e no teste de lambar punido de Vogel. Sendo que, em se tratando do efeito anti-pânico, ele é mais evidente no modelo que utiliza o NMDA como estímulo.

Essa discussão tratou dos efeitos do URB597, do ACEA e de outros agonistas canabinoides injetados intra-cerebralmente em modelos animais de ansiedade. Em alguns estudos, o efeito anti-aversivo encontrado foi bloqueado por antagonista CB1, sugerindo um papel anti-aversivo desse receptor (MOREIRA et al., 2012; VIANA, 2012). Os estudos que envolvem injeções sistêmicas também demonstram um papel anti-aversivo do receptor CB1 (GOBIRA; AGUIAR; MOREIRA, 2013; MOREIRA et al., 2009), corroborando ainda mais essa idéia.

Em relação aos resultados deste trabalho é possível concluir que a ativação de receptor CB1 e a inibição da hidrólise de anandamida na SCPdl induzem efeitos anti-pânico no modelo do LTE e no modelo de fuga induzida por DLH na SCPdl, respectivamente. Ademais, é possível propor a participação do sistema glutamatérgico no recrutamento do sistema endocanabinoide em situações de estresse, como a fuga. Mais experimentos são necessários para se confirmar a participação de receptores CB1 no efeito anti-pânico obtido com o URB597 e se há, de fato, um relativo maior aumento da síntese de anandamida no modelo no qual esse efeito foi encontrado.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. Diagnostic and statistical manual of mental disorders. 4^a ed. Washington, DC. 2000

BALDWIN, D. S. et al. Evidence-based guidelines for the pharmacological treatment of anxiety disorders: recommendations from the British Association for Psychopharmacology. **J Psychopharmacol**, v. 19, n. 6, p. 567-96, Nov 2005.

BALDWIN, D. S.; WALDMAN, S.; ALLGULANDER, C. Evidence-based pharmacological treatment of generalized anxiety disorder. **Int J Neuropsychopharmacol**, v. 14, n. 5, p. 697-710, Jun 2011.

BANDLER, R.; DEPAULIS, A.; VERGNES, M. Identification of midbrain neurones mediating defensive behaviour in the rat by microinjections of excitatory amino acids. **Behav Brain Res**, v. 15, n. 2, p. 107-19, Apr 1985.

BANDLER, R.; SHIPLEY, M. T. Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray: modules for emotional expression? **Trends Neurosci**, v. 17, n. 9, p. 379-89, Sep 1994.

BATELAAN, N. M.; VAN BALKOM, A. J.; STEIN, D. J. Evidence-based pharmacotherapy of panic disorder: an update. **Int J Neuropsychopharmacol**, p. 1-13, Jun 9 2011.

BECKETT, S.; MARSDEN, C. A. Computer analysis and quantification of periaqueductal grey-induced defence behaviour. **J Neurosci Methods**, v. 58, n. 1-2, p. 157-61, May 1995.

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

BITTENCOURT, A. S. et al. Organization of single components of defensive behaviors within distinct columns of periaqueductal gray matter of the rat: role of N-methyl-D-aspartic acid glutamate receptors. **Neuroscience**, v. 125, n. 1, p. 71-89, 2004.

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

BLANCHARD, R. J. et al. Differentiation of anxiolytic and panicolytic drugs by effects on rat and mouse defense test batteries. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 21, n. 6, p. 783-9, Nov 1997.

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

CANTERAS, N. S.; GOTO, M. Fos-like immunoreactivity in the periaqueductal gray of rats exposed to a natural predator. **Neuroreport**, v. 10, n. 2, p. 413-8, Feb 5 1999.

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

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

CRIPPA, J. A. et al. Cannabis and anxiety: a critical review of the evidence. **Hum Psychopharmacol**, v. 24, n. 7, p. 515-23, Oct 2009.

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

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

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

DI MARZO, V. et al. Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. **Nature**, v. 372, n. 6507, p. 686-91, Dec 15 1994.

DIELENBERG, R. A.; CARRIVE, P.; MCGREGOR, I. S. The cardiovascular and behavioral response to cat odor in rats: unconditioned and conditioned effects. **Brain Res**, v. 897, n. 1-2, p. 228-37, Apr 6 2001.

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

DLUGOS, A. et al. Acute stress increases circulating anandamide and other N-acylethanolamines in healthy humans. **Neuropsychopharmacology**, v. 37, n. 11, p. 2416-27, Oct 2012.

EGERTOVA, M. et al. A new perspective on cannabinoid signalling: complementary localization of fatty acid amide hydrolase and the CB1 receptor in rat brain. **Proc Biol Sci**, v. 265, n. 1410, p. 2081-5, Nov 7 1998.

ELSOHLY, M. A.; SLADE, D. Chemical constituents of marijuana: the complex mixture of natural cannabinoids. **Life Sci**, v. 78, n. 5, p. 539-48, Dec 22 2005.

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

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

GOBIRA, P. H.; AGUIAR, D. C.; MOREIRA, F. A. Effects of compounds that interfere with the endocannabinoid system on behaviors predictive of anxiolytic and panicolytic activities in the elevated T-maze. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 110C, p. 33-39, May 25 2013.

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

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

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

HERKENHAM, M. et al. Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. **J Neurosci**, v. 11, n. 2, p. 563-83, Feb 1991.

HERKENHAM, M. et al. Cannabinoid receptor localization in brain. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 87, n. 5, p. 1932-6, Mar 1990.

HERMANN, A.; KACZOCHA, M.; DEUTSCH, D. G. 2-Arachidonoylglycerol (2-AG) membrane transport: history and outlook. **AAPS J**, v. 8, n. 2, p. E409-12, 2006.

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

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

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

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

HOWLETT, A. C.; QUALY, J. M.; KHACHATRIAN, L. L. Involvement of Gi in the inhibition of adenylate cyclase by cannabimimetic drugs. **Mol Pharmacol**, v. 29, n. 3, p. 307-13, Mar 1986.

HUESTIS, M. A. et al. Blockade of effects of smoked marijuana by the CB1-selective cannabinoid receptor antagonist SR141716. **Arch Gen Psychiatry**, v. 58, n. 4, p. 322-8, Apr 2001.

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

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

KEAY, K. A.; BANDLER, R. Parallel circuits mediating distinct emotional coping reactions to different types of stress. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 25, n. 7-8, p. 669-78, Dec 2001.

LISBOA, S. F.; GUIMARAES, F. S. Differential role of CB1 and TRPV1 receptors on anandamide modulation of defensive responses induced by nitric oxide in the dorsolateral periaqueductal gray. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 8, p. 2455-62, Jun 2012.

LISBOA, S. F. et al. Activation of cannabinoid CB1 receptors in the dorsolateral periaqueductal gray induces anxiolytic effects in rats submitted to the Vogel conflict test. **Eur J Pharmacol**, v. 593, n. 1-3, p. 73-8, Sep 28 2008.

MATSUDA, L. A. et al. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. **Nature**, v. 346, n. 6284, p. 561-4, Aug 9 1990.

MECHOULAM, R. et al. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. **Biochem Pharmacol**, v. 50, n. 1, p. 83-90, Jun 29 1995.

MECHOULAM, R. et al. Chemical basis of hashish activity. **Science**, v. 169, n. 3945, p. 611-2, Aug 7 1970.

MOBBS, D. et al. When fear is near: threat imminence elicits prefrontal-periaqueductal gray shifts in humans. **Science (New York, N.Y.)**, v. 317, n. 5841, p. 1079-1083, 2007.

MOREIRA, F. A. et al. Antiaversive effects of cannabinoids: is the periaqueductal gray involved? **Neural Plast**, v. 2009, p. 625469, 2009.

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

MOREIRA, F. A. et al. Neuroanatomical substrates involved in cannabinoid modulation of defensive responses. **J Psychopharmacol**, v. 26, n. 1, p. 40-55, Jan 2012.

MOREIRA, F. A. et al. Modeling panic disorder in rodents. **Cell Tissue Res**, Apr 13 2013.

MORGAN, M. M.; WHITNEY, P. K.; GOLD, M. S. Immobility and flight associated with antinociception produced by activation of the ventral and lateral/dorsal regions of the rat periaqueductal gray. **Brain Res**, v. 804, n. 1, p. 159-66, Aug 31 1998.

MUNRO, S.; THOMAS, K. L.; ABU-SHAAR, M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. **Nature**, v. 365, n. 6441, p. 61-5, Sep 2 1993.

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

OHNO-SHOSAKU, T. et al. Endocannabinoid signalling triggered by NMDA receptor-mediated calcium entry into rat hippocampal neurons. **J Physiol**, v. 584, n. Pt 2, p. 407-18, Oct 15 2007.

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

PARPURA, V.; VERKHRATSKY, A. Astroglial amino acid-based transmitter receptors. **Amino Acids**, v. 44, n. 4, p. 1151-8, Apr 2013.

POLTRONIERI, S. C.; ZANGROSSI, H.; DE BARROS VIANA, M. Antipanic-like effect of serotonin reuptake inhibitors in the elevated T-maze. **Behav Brain Res**, v. 147, n. 1-2, p. 185-192, 2003.

RAMAEKERS, J. G. et al. High-potency marijuana impairs executive function and inhibitory motor control. **Neuropsychopharmacology**, v. 31, n. 10, p. 2296-303, Oct 2006.

RESSTEL, L. B. et al. Activation of CB1 cannabinoid receptors in the dorsolateral periaqueductal gray reduces the expression of contextual fear conditioning in rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 198, n. 3, p. 405-11, Jun 2008.

RUEHLE, S. et al. The endocannabinoid system in anxiety, fear memory and habituation. **J Psychopharmacol**, v. 26, n. 1, p. 23-39, Jan 2012.

SAITO, V.; MOREIRA, F. Cannabinoids, anxiety, and the periaqueductal gray. **Psychology and Neuroscience**, v. 3, n. 1, p. 39-42, 2010.

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

SCHLICKER, E.; KATHMANN, M. Modulation of transmitter release via presynaptic cannabinoid receptors. **Trends Pharmacol Sci**, v. 22, n. 11, p. 565-72, Nov 2001.

SILVEIRA, M. C.; SANDNER, G.; GRAEFF, F. G. Induction of Fos immunoreactivity in the brain by exposure to the elevated plus-maze. **Behav Brain Res**, v. 56, n. 1, p. 115-8, Jul 30 1993.

SILVEIRA, M. C. et al. Differential expression of Fos protein in the rat brain induced by performance of avoidance or escape in the elevated T-maze. **Behav Brain Res**, v. 126, n. 1-2, p. 13-21, Nov 29 2001.

STELLA, N.; SCHWEITZER, P.; PIOMELLI, D. A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. **Nature**, v. 388, n. 6644, p. 773-8, Aug 21 1997.

SUGIURA, T. et al. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 215, n. 1, p. 89-97, Oct 4 1995.

SUKIKARA, M. H. et al. The periaqueductal gray and its potential role in maternal behavior inhibition in response to predatory threats. **Behav Brain Res**, v. 209, n. 2, p. 226-33, Jun 19 2010.

THOMAS, H. A community survey of adverse effects of cannabis use. **Drug Alcohol Depend**, v. 42, n. 3, p. 201-7, Nov 1996.

TSOU, K. et al. Cannabinoid CB1 receptors are localized primarily on cholecystokinin-containing GABAergic interneurons in the rat hippocampal formation. **Neuroscience**, v. 93, n. 3, p. 969-75, 1999.

VAN DER STAAY, F. J.; ARNDT, S. S.; NORDQUIST, R. E. Evaluation of animal models of neurobehavioral disorders. **Behav Brain Funct**, v. 5, p. 11, 2009.

VAN SICKLE, M. D. et al. Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. **Science**, v. 310, n. 5746, p. 329-32, Oct 14 2005.

VIANA, G. T. Participação do sistema endocanabinoide da substância cinzenta periaquedutal dorsolateral em um modelo animal de pânico. 2012. 81 f Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2012

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

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

YUZAKI, M.; CONNOR, J. A. Characterization of L-homocysteate-induced currents in Purkinje cells from wild-type and NMDA receptor knockout mice. **J Neurophysiol**, v. 82, n. 5, p. 2820-6, Nov 1999.

ZARRINDAST, M. R. et al. Anxiolytic-like effect induced by the cannabinoid CB1 receptor agonist, arachydonilcyclopropylamide (ACPA), in the rat amygdala is mediated through the D1 and D2 dopaminergic systems. **J Psychopharmacol**, v. 25, n. 1, p. 131-40, Jan 2011. ISSN 1461-7285