

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

**PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA
ENDOCANABINOIDE DO
HIPOTÁLAMO DORSOMEDIAL EM
EVENTOS AVERSIVOS**

THÉRCIA GUEDES VIANA

BELO HORIZONTE – 2016

THÉRCIA GUEDES VIANA

**PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA
ENDOCANABINOIDE DO
HIPOTÁLAMO DORSOMEDIAL EM
EVENTOS AVERSIVOS**

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

Orientador: Prof. Dr. Fabrício de Araújo Moreira

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Daniele Cristina de Aguiar

BELO HORIZONTE – 2016

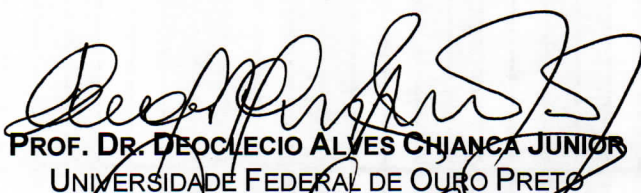
"PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA ENDOCANABINOIDE DO HIPOTÁLAMO DORSOMEDIAL EM EVENTOS AVERSIVOS"

THERCIA GUEDES VIANA

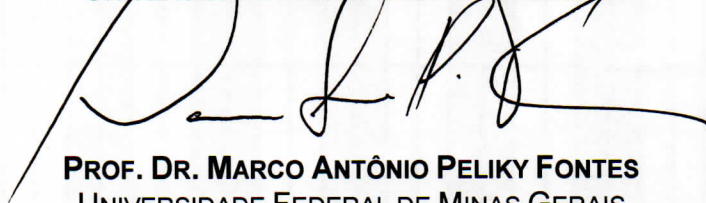
Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia 01 de abril de 2016, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:



PROF. DR. ANTÔNIO CARLOS PINHEIRO DE OLIVEIRA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



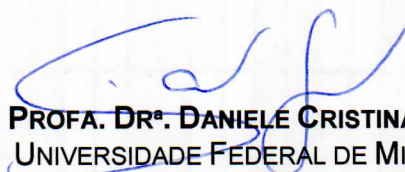
PROF. DR. DEOCLECIO ALVES CHIANCA JUNIOR
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO



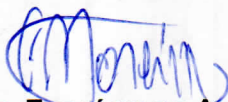
PROF. DR. MARCO ANTÔNIO PELIKY FONTES
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



PROF. DR. NEWTON SABINO CANTERAS
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



PROFA. DRª. DANIELE CRISTINA DE AGUIAR
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
CO-ORIENTADORA



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

Dedicatória:

*Para Alice, Maria Luísa e Lara,
por me ofertarem o amor mais puro e genuíno.*

Agradecimentos:

A Deus, por seu amor e misericórdia incomparáveis.

Ao Professor Dr. Fabrício Moreira, pela orientação, incentivo, respeito e amizade;

A Professora Dra. Daniele Aguiar, por suas valorosas contribuições e pela liderança nata.

A banca examinadora, pela disponibilidade e empenho na leitura deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Neuropsicofarmacologia, por compartilharem comigo alegrias e angústias do mundo acadêmico.

Aos colaboradores: Juliana Bastos, Sara Hott e Frederico Mansur, por abraçarem este trabalho, e aos professores Leonardo Resstel e Cândido Coimbra por propiciarem a realização de parte destes experimentos.

Aos servidores técnico-administrativos do Departamento de Farmacologia-ICB/UFMG

Aos meus pais pela renúncia amorosa,

Às minhas irmãs pela lealdade e incentivo,

Ao Antonio, por compartilhar dos meus sonhos,

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO:

LISTA DE FIGURAS	6
TABELAS	8
ABREVIATURAS	9
RESUMO	11
INTRODUÇÃO	15
1. O comportamento defensivo.....	16
2. Substratos neurais envolvidos no comportamento defensivo	20
2.1. A substância cinzenta periaquedutal (SCP)	20
2.2. O hipotálamo.....	22
3. Neurotransmissores envolvidos nas respostas aversivas	28
3.1. O sistema endocanabinoide	29
4. O sistema endocanabinoide e as respostas comportamentais	35
5. O sistema endocanabinoide e o hipotálamo	36
OBJETIVOS	41
MATERIAIS E MÉTODOS	44
Animais.....	43
Cirurgia estereotáxica	43
Injeção intra-encefálica	44
Drogas	44
Canulação da artéria femoral para mensuração dos parâmetros cardiovasculares	45
Registro dos parâmetros cardiovasculares	45
Teste comportamental – Caixa de observação	46
Dosagem de corticosterona plasmática	47
Perfusão intracardíaca.....	48
Histologia.....	48
Imunofluorescência – Dupla marcação c-Fos e DAGL.....	49
Grupos experimentais.....	51
Delineamento experimental	56
Análise estatística	57
RESULTADOS	59
DISCUSSÃO	84
CONCLUSÃO	101
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102

LISTA DE FIGURAS:

Figura 1: Representação tridimensional dos diversos núcleos hipotalâmicos

Figura 2: Representação esquemática da sinapse Canabinoide

Figura 3: Caixa de Observação

Figura 4: Diagrama representativo do sítio de injeção do HDM

Figura 5: Representação esquemática dos protocolos experimentais

Figura 6: Efeito do NMDA (1; 3 e 10 pmol/0,2µL) injetado intra- HDM de ratos.

Figura 7: Efeito do URB597 (0.3; 1 e 3 pmol/0,2µL) sobre as reações de fuga induzidas por NMDA (10 nmol/0,2µL).

Figura 8: Efeito do URB602 (30; 100 e 300 pmol/0,2µL) sobre as reações de fuga induzida por NMDA (10 nmol/0,2µL).

Figura 9: Efeito do pré-tratamento com URB602 (100; 300; 1000 pmol/0,2µL) sobre o aumento de frequência cardíaca e pressão arterial induzidas por NMDA.

Figura 10: Efeito das injeções de Veículo, NMDA e URB602. sobre os níveis de corticosterona.

Figura 11: Efeito do AM251 (100 pmol/0,2 µL) na reversão do bloqueio induzido por URB602 (300 pmol/0,2µL) sobre as respostas de fuga

Figura 12:. Efeito do AM630 (1000 pmol/0,2µL) na reversão do bloqueio induzido por URB602 (300 pmol/0,2µL) sobre as respostas de fuga

Figura 13: Efeito do ACEA (0,005; 0,05 e 0,5 pmol/0,2µL) na reação de fuga induzida por NMDA

Figura 14:. Efeito do JWH133 (0.3; 1 e 3 pmol/0,2µL) na reação de fuga induzida por NMDA

Figura 15: Efeito do pré-tratamento com AM251(100 pmol/0,2 µL), seguido por uma dose inefetiva de NMDA (1 nmol/0,2µL)

Figura 16: Fotomicrografias representativas de secções coronais do HDM de ratos

Figura 17: Efeito da administração do NMDA sobre o número de células fos-positivas.

Figura 18: Efeito da administração do NMDA sobre o número de células DGL-positivas.

Figura 19: Efeito da administração do NMDA sobre a co-localização de células fos/DGL-positivas.

TABELAS:

Tabela 1: Efeito do NMDA (1; 3 e 10 pmol/0,2µL) sobre o número de pulos.

Tabela 2: Efeito do URB597 (0,3; 1 e 3 pmol/0,2µL) sobre o número de pulos.

Tabela 3: Efeito do URB602 (30; 100 e 300 pmol/0,2µL) sobre o número de pulos.

Tabela 4: Efeito do AM251 (100 pmol/0,2µL) na reversão do bloqueio induzido por URB602 sobre o número de pulos.

Tabela 5: Efeito do AM630 (1000 pmol/0,2µL) na reversão do bloqueio induzido por URB602 sobre o número de pulos.

Tabela 6: Efeito do ACEA (0,005; 0,05 e 0,5 pmol/0,2µL) sobre o número de pulos.

Tabela 7: Efeito do JWH133 (0,3; 1 e 3 pmol/0,2µL) sobre o número de pulos.

Tabela 8: Efeito do pré-tratamento com AM251 (100 pmol/0,2 µL), seguido por uma dose inefetiva de NMDA (1 nmol/0,2µL)

LISTA DE ABREVIATURAS:

- 2-AG: 2-aracdonoilglicerol
- ACTH: Hormônio Adrenocorticotrófico
- AEA: Araquidonoil etanolamida (Anandamida)
- AMPC: Monofosfato Cíclico de Adenosina
- ATP: Trifosfato de Adenosina
- CB₁: Receptores canabinóides do tipo 1
- CB₂: Receptores canabinóides do tipo 2
- CRH: Hormônio Liberador de Corticotropinas
- DAGL: diacilglicerol lipase
- DLH: Ácido D, L-homocisteico
- FAAH: Hidrolase de amidas de ácidos graxos
- FC: Frequência cardíaca
- GABA: Ácido gama-aminobutírico
- HA: Hipotálamo anterior
- HDM: Hipotálamo dorsomedial
- HVM: Hipotálamo ventromedial
- HVMdm: Hipotálamo Ventromedial, porção dorsomedial
- LCE: Labirinto em Cruz Elevado
- LTE: Labirinto em T Elevado
- MAGL: Monoacil glicerol lipase
- NHA: Núcleo Hipotalâmico anterior
- NMDA: N-metil-D-aspartato
- PAM: Pressão arterial média
- PKA: Proteína Quinase A

PLC: Fosfolipase C

PVN: Núcleo Paraventricular do Hipotálamo

SCP: Substância cinzenta periaquedutal

SCPd: Substância cinzenta periaquedutal dorsal

SCPdl: Substância cinzenta periaquedutal dorsolateral

SCPdm: Substância cinzenta periaquedutal dorsomedial

SCPl: Substância cinzenta periaquedutal lateral

SCPvl: Substância cinzenta periaquedutal ventrolateral

TRPV: Receptor vanilóide de potencial transitório

VP: Vasopressina

RESUMO:

O núcleo dorsomedial do hipotálamo (HDM) é um importante componente integrativo de respostas comportamentais, endócrinas e autonômicas. A estimulação do HDM por aminoácidos excitatórios como o glutamato desencadeia respostas defensivas relacionadas à ansiedade. Em contrapartida, o sistema endocanabinoide pode inibir tais reações. Considerando essas evidências, o presente trabalho testou a hipótese de que o sistema endocanabinoide atua com um mecanismo antiaversivo nesta estrutura. Para tal, respostas aversivas foram induzidas em ratos pela administração intra-HDM de NMDA, um agonista dos receptores NMDA glutamatérgicos. Os animais foram submetidos a cirurgia estereotáxica para implantação de uma cânula nessa estrutura. Após 7 dias, foram colocados em uma caixa de observação e o comportamento foi filmado por 5 minutos. A injeção intra-HDM de NMDA produziu reações de fuga caracterizadas por cruzamentos e de pulos. Tal efeito foi prevenido pela injeção local tanto de um agonista CB₁ (ACEA), quanto CB₂ (JWH133). Esse efeito foi mimetizado por um inibidor da hidrólise do endocanabinoide 2-AG (URB602), mas não do endocanabinoide anandamida (URB597). O URB602 preveniu também o aumento de pressão arterial induzido por NMDA. Nenhum tratamento alterou os níveis de corticosterona. Os efeitos comportamentais do URB602 foram revertidos tanto por antagonistas tanto do receptor CB₁ (AM251), quanto do CB₂ (AM630). O pré-tratamento com AM251, seguido de uma dose de NMDA que por si só não promove fuga, não foi capaz de desencadear reações aversivas. A administração de NMDA induziu aumento de expressão de c-Fos nas seguintes regiões: Hipotálamo dorsomedial (HDM), hipotálamo

ventromedial (HVM), e colunas dorsomedial (SCPdm) e dorsolateral (SCPdl) da substância cinzenta periaqueductal. Já a expressão da enzima envolvida na síntese do 2-AG (DAGL) foi maior apenas no HDM e HVM. Observou-se um aumento na co-localização de células c-Fos/DAGL positivas no HDM, HVM e SCPdl. Conclui-se que o endocanabinoide 2-AG modula as respostas defensivas induzidas pela ativação de receptores NMDA no HDM, provavelmente por ativação de receptores CB₁ e CB₂.

Palavras-chave: Hipotálamo, Hipotálamo Dorsomedial, Canabinoides, Respostas aversivas, NMDA.

ABSTRACT

The dorsomedial hypothalamus (DMH) is an important integrative nucleus for behavioral, endocrine and autonomic responses. The stimulation of DMH by excitatory amino acids, such as glutamate, promotes defensive responses related to anxiety. On the other hand, the endocannabinoid system seems to inhibit these reactions. This work tested the hypothesis that the endocannabinoid system inhibit the aversive reactions in this structure. To test this hypothesis, aversive responses were induced by intra-DMH NMDA injection, an agonist of NMDA glutamatergic receptors. Animals were submitted to stereotaxic surgery for implantation of a cannula into DMH. After 7 days, they were placed in an observation box and recorded for 5 min. The injection of NMDA intra-DMH elicited escape reactions, consisting of crossings and jumps. This effect was prevented by a CB₁ agonist (ACEA) and a CB₂ agonist (JWH133). The endocannabinoid 2-AG-hydrolysis inhibitor (URB602), but not anandamide-hydrolysis inhibitor (URB597) prevented defensive behavior. URB602 reverted cardiovascular response augmentation. None of the treatments changed corticosterone levels. The behavioral effects of URB602 were prevented by both CB₁ (AM251) and CB₂ (AM630) receptors antagonists. The pretreatment with AM251 followed by a dose of NMDA that does not produce effect by itself failed to elicit aversive reactions. NMDA administration increased c-Fos expression in the Dorsomedial Hypothalamus (DMH), ventromedial hypothalamus (VMH), and dorsomedial (dmPAG) and dorsolateral (dlPAG) columns do the periaqueductal gray. The expression of the enzyme that synthesizes 2-AG (DAGL) was increased on DMH and VMH. The colocalization of c-Fos/DAGL positive cells increased on DMH, VMH and

dIPAG. It is concluded that the endocannabinoid 2-AG modulates defensive responses induced by activation of the DMH, probably through CB₁ and CB₂ cannabinoid receptors.

Key-words: Hypothalamus, Dorsomedial Hypothalamus, Cannabinoids, Aversive responses, NMDA

INTRODUÇÃO

1. O COMPORTAMENTO DEFENSIVO

As respostas de defesa consistem no conjunto de reações que os animais apresentam frente a situações que promovem risco à sobrevivência. A correlação entre as emoções humanas e as respostas comportamentais emitidas por animais foi proposta pela primeira vez por Charles Darwin. Em seu livro *The Expression of Emotions in Man and Animals* (1872), Darwin propunha que, tendo o homem e os demais animais um ancestral comum, eles deveriam guardar também as mesmas emoções básicas. Considerando as diversas espécies animais, as ameaças que desencadeariam tais emoções poderiam ser evocadas pela presença de predadores, estímulos nociceptivos, altura, luminosidade, situações de conflito ou ainda o confronto com animais da mesma espécie. (BLANCHARD and BLANCHARD, 1984; Blanchard and Blanchard, 1988; Blanchard and Blanchard, 1989; Blanchard and Blanchard, 1990; Blanchard et al., 2001a).

Diante de todas essas ameaças, os animais apresentariam as seguintes respostas: avaliação de risco, *freezing* (congelamento), fuga e ataque defensivo. A escolha de qual resposta será expressa depende da hierarquia social do animal em seu grupo, das condições do ambiente e da distância a qual o animal se encontra do estímulo ameaçador. Em roedores, por exemplo, a exposição ao predador induz comportamento de congelamento, fuga e avaliação de risco. Tais comportamentos também podem ser observados quando os animais são submetidos à estímulos mais sutis, como o odor do predador. (McGregor et al., 2004; Apfelbach et al., 2005).

O comportamento defensivo é acompanhado ainda de alterações autonômicas, como aumento de pressão arterial, frequência cardíaca e

respiratória, dilatação pupilar e vasodilatação da musculatura esquelética (Carrive, 1993). O mesmo padrão foi também observado em ratos expostos às suas ameaças naturais (Hunsperger, 1956a, b; Fernandez De Molina and Hunsperger, 1959, 1962) ou ainda quando recebiam injeções intracerebrais de aminoácidos excitatórios (Krieger and Graeff, 1985; Hilton and Redfern, 1986; Yardley and Hilton, 1986).

Com base nos padrões defensivos de ratos selvagens frente aos seus predadores naturais, Robert e Caroline Blanchard classificaram as respostas defensivas de acordo com o nível e com a distância da ameaça a qual os animais estão submetidos. Esses níveis seriam divididos em: ameaça potencial, distal e proximal (Blanchard et al., 1997; Blanchard et al., 2001b, 2003). Mais tarde, Jeffrey Gray, McNaughton e Corr propuseram que os sistemas neurais responsáveis pelo comportamento de defesa estariam organizados de acordo com a direção defensiva, com uma distinção funcional entre os comportamentos que afastam ou aproximam os animais de uma fonte de perigo (McNaughton and Corr, 2004).

No primeiro nível de ameaça, quando a presença do predador é incerta, ou quando o animal se encontra distante dos estímulos associados ao predador, há um comportamento de investigação da presença de perigo e avaliação de risco. O mesmo comportamento pode ser observado quando o animal explora ambientes nos quais a presença do predador já foi detectada. Neste caso, a resposta predominante é a esquiva. Como essas respostas envolvem um conflito entre aproximação e afastamento do perigo, foi proposto que se relacionaria com transtorno de ansiedade generalizada em humanos (Graeff, 1994; Blanchard et al., 2003). As bases neurais para a evocação

dessas respostas são o septo hipocampal e a amígdala. Enquanto o primeiro parece relacionar-se com o componente cognitivo da ansiedade, a segunda integraria o componente afetivo. (McNaughton and Gray, 2000; Zangrossi et al., 2001)

No segundo nível de ameaça o perigo é real, mas encontra-se a certa distância. O comportamento observado nesse animal é a fuga, e quando esta não é possível, o animal tende a adotar uma postura de congelamento. O comportamento de *freezing* é observado quando o animal é re-exposto a um contexto previamente associado ao predador. O grau de congelamento do animal pode ser correlacionado com medo ou fobias em humanos (Graeff, 1994, 2004). O substrato neural associado a esse comportamento compreende a via que parte do núcleo central da amígdala rumo à porção ventral da substância cinzenta periaquedutal (SCP) (Davis, 1992b, a, 1998)

O terceiro nível de ameaça (proximal) ocorre quando o animal está em contato com o predador e nesse caso, se há uma rota de saída, a fuga é a resposta predominante. Quando essa última não ocorre, o animal responde com saltos, vocalizações e confronto com o predador. Uma vez que esses comportamentos eram observados por meio da estimulação elétrica da SCP, essa estrutura tornou-se um dos principais substratos neurais para a ameaça distal (Hunsperger, 1956a, b; Fernandez De Molina and Hunsperger, 1959, 1962). Mais tarde, baseado em achados clínicos e experimentais, esses comportamentos foram relacionados ao Transtorno de Pânico em humanos, um subtipo de transtorno de ansiedade (Graeff, 1994, 2004).

Considerando-se todas estas propostas em conjunto, os substratos neurais do medo e ansiedade estariam representados pelas mesmas

estruturas, organizadas paralela e hierarquicamente, porém com níveis de ativação relacionados à distância defensiva. Assim, pequenas distâncias ativariam estruturas mais caudais, como a PAG e distâncias maiores ativariam estruturas prosencefálicas, como o córtex pré-frontal (McNaughton and Corr, 2004).

Recentemente, Mobbs e colaboradores observaram que, de maneira análoga, circuitos neurais distintos em humanos também estão envolvidos em situações de perigo distal e proximal. Nesse estudo o papel da SCP é destacado como a principal estrutura envolvida em situações de perigos proximais (Mobbs et al., 2007). Estudos que empregam a técnica de imunistoquímica para Fos – uma proteína transcrita a partir do gene de expressão imediata *c-fos* - observaram a ativação dessa proteína em diversas regiões específicas após estímulos aversivos (Morgan and Curran, 1989; Chaudhuri, 1997). Sob condições basais, o número de células *c-fos* detectáveis é muito baixo (Hughes et al., 1992), mas após estímulo, o nível máximo de expressão ocorre entre 1 e 3 horas, e desaparece gradualmente após 4-6 horas (Kovacs and Sawchenko, 1996b). A exposição de ratos ao gato ou ao seu odor aumenta a expressão de Fos em regiões sabidamente envolvidas nas respostas defensivas e nos transtornos de ansiedade em humanos, como a SCP, amígdala, e diversos núcleos hipotalâmicos (Kovacs and Sawchenko, 1996a, b; Sawchenko et al., 1996; Canteras et al., 1997; Canteras and Goto, 1999; Dielenberg et al., 2001; McGregor et al., 2004; Beijamini and Guimaraes, 2006).

O mesmo padrão de expressão é observado quando os animais são submetidos a modelos de ansiedade (Graeff et al., 1993; Sandner et al., 1993;

Silveira et al., 1993; Duncan et al., 1996) ou ainda após a injeção de drogas ansiogênicas (Singewald and Sharp, 2000; Singewald et al., 2003). Em conjuntos, estes trabalhos sustentam a hipótese de que as bases neurais responsáveis pelo comportamento defensivo são as mesmas responsáveis pelos transtornos de ansiedade.

2. SUBSTRATOS NEURAIS ENVOLVIDOS NO COMPORTAMENTO DEFENSIVO:

2.1. A SUBSTÂNCIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL (SCP):

Anatomicamente, a SCP localiza-se no mesencéfalo, circundando o aqueduto de Sylvius. Ela pode se dividir em quatro colunas situadas ao longo do eixo rostrocaudal, assim denominadas: dorsomedial (SCPdm), dorsolateral (SCPdl), lateral (SCPl) e ventrolateral (SCPvl) (Carrive, 1993; Bandler and Keay, 1996; Bandler et al., 2000b; Bandler et al., 2000a).

A SCP recebe abundante inervação e em função disso, integra as mais diversas funções, como controle cardiovascular, processamento e modulação da dor, e ainda respostas de medo e ansiedade (Bandler et al., 1991; Carrive, 1993; Bandler and Keay, 1996; Bandler et al., 2000b).

A estimulação elétrica da SCP em animais induz comportamentos do tipo luta e/ou fuga similares àqueles evocados por situações naturais de perigo e ameaça (Fernandez De Molina and Hunsperger, 1959, 1962). De modo especial, a estimulação da porção dorsal da SCP - que compreende as colunas dorsomedial e dorsolateral - está particularmente envolvida na elaboração desses comportamentos defensivos (Zangrossi et al., 2001; Graeff, 2004).

Da mesma forma, a estimulação da SCP por aminoácidos excitatórios promove reações de fuga, congelamento e alterações autonômicas como: elevação da pressão arterial e da frequência cardíaca, sudorese, piloereção, vasodilatação da musculatura esquelética e dilatação pupilar (Krieger and Graeff, 1985; Bandler and Carrive, 1988; Schmitt et al., 1990; Carrive, 1993; Graeff, 1994; Bandler and Keay, 1996; Bandler et al., 2000b; Schenberg et al., 2001; Vianna et al., 2003; Vianna and Brandao, 2003; Graeff, 2004; Pelosi et al., 2009; Graeff et al., 2015). Ainda reforçando a hipótese do envolvimento da SCP em reações de defesa, estudos demonstraram que lesões nessa estrutura eliminavam respostas defensivas a estímulos ameaçadores em animais experimentais (Edwards and Adams, 1974; Dielenberg et al., 2004).

A evocação de comportamentos defensivos pela estimulação química, elétrica ou ainda pela exposição ao predador, promove ativação de Fos, com maior aumento da expressão na SCPdl, sustentando a importância dessa região mesencefálica para a elaboração de tais respostas (Sandner et al., 1992; Silveira et al., 1993; Silveira et al., 1994; Kovacs, 1998; Singewald et al., 2003; Vianna et al., 2003; Viana et al., 2015). Em humanos, a estimulação de áreas mesencefálicas, incluindo a SCP, desencadeou alterações autonômicas, além de sensações de dor, pavor e morte eminente (Nashold and Wilson, 1966; Nashold et al., 1969; Nashold, 1974). Tais manifestações assemelhavam-se àquelas ocorridas durante um ataque de pânico. Além disso, estudos que utilizaram a Tomografia por emissão de pósitrons (PET) demonstraram que a SCPdl é ativada durante ataques de pânico induzidos por lactato e também pela administração de um agonista colecistocinérgico, o CCK-4 (Reiman et al., 1989; Javanmard et al., 1999).

Considerando as semelhanças entre os comportamentos humanos e animais frente a estímulos ameaçadores, bem como entre os comportamentos evocados pela estimulação da SCP por perigos e ameaças naturais, a estimulação desta estrutura tem sido utilizada como um modelo animal de ataques de pânico (Graeff, 1994; Lovick, 2000; Lovick et al., 2000;Moreira et al., 2013).

2.2. O HIPOTÁLAMO:

A relação entre hipotálamo e comportamento defensivo foi proposta pela primeira vez por Phillip Bard, em 1928. Em seus experimentos, Bard estimulou o hipotálamo lateral de gatos e viu que os animais apresentavam arqueamento do dorso e cauda, dilatação pupilar e ataque orientado. Em conjunto, todas essas alterações foram chamadas “reações afetivas de defesa”. Anos mais tarde, Hess & Brugger demonstraram que a estimulação elétrica do hipotálamo medial promovia comportamentos aversivos e que animais com eletrodos aí implantados aprendiam a desligar a estimulação elétrica desta região. (Bard, 1928; Hess W.R., 1943; Hess and Akert, 1955). Posteriormente, demonstrou-se, por meio de lesões eletrolíticas, que áreas como os núcleos dorsomedial e ventromedial também poderiam evocar comportamentos de defesa (Wheatley, 1944).

Anatomicamente, o hipotálamo é composto por três zonas longitudinais distintas (periventricular, medial e lateral), divididas em quatro níveis ou regiões rostro-caudais (pré-óptica, anterior, tuberal e mamilar) (Canteras, 2002). (FIGURA)

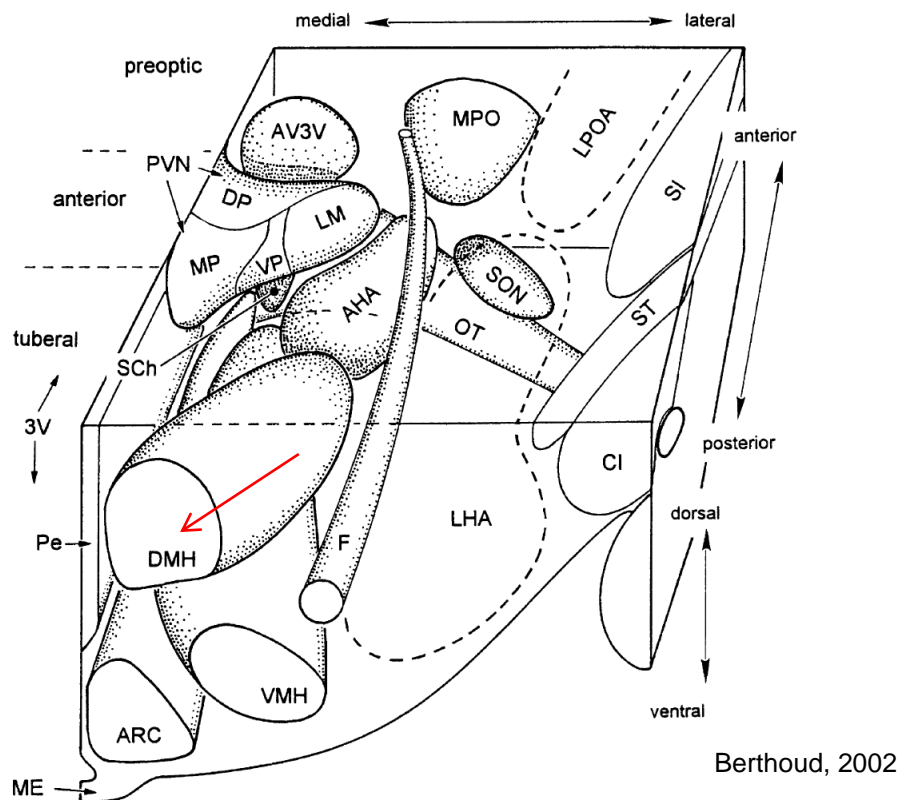


Figura 1: Representação tridimensional dos diversos núcleos do hipotálamo. Na figura, estão representadas as zonas periventricular, medial e lateral, dispostas longitudinalmente. Observa-se ainda três regiões rostro-caudais: pré-óptica, anterior, tuberal. A seta vermelha indica o núcleo dorsomedial (DMH). AHA, área hipotalâmica anterior; ARC, núcleo arqueado; AV3V, área ventral do terceiro ventrículo; CI, capsula interna; DP, subnúcleo dorsal parvocelular do núcleo paraventricular (PVN); DMH, núcleo dorsomedial; F, fórnix; LHA, área hipotalâmica lateral; LM, subnúcleo magnocelular lateral do núcleo paraventricular; LPOA, área pré-óptica lateral; ME, eminência mediana; MP, área medial parvocelular; MPO, área medial pré-óptica; OT, trato óptico; Sch, núcleo supraquiasmático; SON, núcleo supra-óptico; SI, substância inominada; ST, núcleo subtalâmico; VMH, núcleo ventromedial; VP, subnúcleo parvocelular ventral do núcleo paraventricular.

A zona hipotalâmica medial compreende uma série de grupos celulares bem definidos que possuem uma importante função em iniciar comportamentos motivados específicos, como: ingestão de comida, metabolismo, reprodução e defesa (Canteras et al., 2001; Canteras, 2002).

A região hipotalâmica medial pode ser dividida em dois circuitos, sendo que o primeiro compreende o núcleo hipotalâmico anterior (NHA), a porção dorsomedial do hipotálamo ventromedial (HVMdm) e o núcleo pré-mamilar dorsal (PMd). Tal circuito formaria o “Circuito Hipotalâmico de defesa”, responsável por integrar reações defensivas inatas em resposta a perigos ambientais. Tanto a estimulação química quanto elétrica desse circuito é capaz de evocar respostas defensivas autonômicas e motoras que se assemelham ao comportamento do animal em situações de perigo (Canteras, 2002). Um segundo circuito, que compreende a área pré-óptica medial, a porção ventrolateral do hipotálamo ventromedial e os núcleos pré-mamilares tuberal e ventral seria responsável por comportamentos reprodutivos e agonísticos sociais (Swanson, 1988; Canteras et al., 1992; Canteras and Swanson, 1992; Canteras, 2002, 2003). Por fim, a zona hipotalâmica periventricular é composta por diversos núcleos, como o dorsomedial (HDM), que contém a maior parte dos neurônios motores e neuroendócrinos, que enviam projeções para o sistema nervoso autônomo (Swanson, 1988; Thompson et al., 1996; Risold et al., 1997; Thompson and Swanson, 1998).

O HDM é subdividido em duas porções: uma difusa e uma compacta, sendo esta última localizada de modo mais caudal e que parece ser mais responsiva à microinjeção de aminoácidos excitatórios (De Novellis et al., 1995). O HDM encontra-se ativado em situações aversivas como choque, estresse de restrição, nado forçado, desidratação e exposição ao predador (Cullinan et al., 1995; Cullinan et al., 1996; Canteras et al., 1997; Li and Sawchenko, 1998). Além disso, essa região está envolvida em respostas

cardiovasculares e neuroendócrinas ao stress agudo (Shekhar, 1993; Shekhar et al., 1993; Inglefield et al., 1994; Shekhar and Katner, 1995; File et al., 1999)

Reforçando a hipótese do envolvimento do HDM nas reações aversivas, o bloqueio de receptores do tipo GABA_A nessa região promoveu aumento de atividade locomotora, frequência cardíaca, pressão arterial e frequência respiratória (DiMicco and Abshire, 1987; Lisa et al., 1989b; Lisa et al., 1989a; Wible et al., 1989). Além disso, a inibição gabaérgica induziu fuga orientada, aumento de ansiedade, diminuição da interação social, bem como aumento dos níveis de corticosterona e ACTH, sendo os dois últimos importantes marcadores de respostas neuroendócrinas ao estresse (Shekhar et al., 1987, 1990; Shekhar et al., 1993; Keim and Shekhar, 1996; Bailey and Dimicco, 2001).

Em conjunto, esses dados sugerem que o HDM possui neurônios relacionados à modulação do comportamento defensivo que se encontram sob inibição tônica GABAérgica (Di Scala et al., 1984; Brandao et al., 1986; Schmitt et al., 1986; Milani and Graeff, 1987) e que a administração de antagonistas GABA intra-HDM pode, portanto, ser utilizada como um modelo indutor de respostas aversivas em animais experimentais (DiMicco et al., 1996; Shekhar et al., 1996; Stotz-Potter et al., 1996a; DiMicco et al., 2002b). Respostas semelhantes são observadas através da microinjeção de agonistas NMDA glutamatérgicos, ácido caínico, ou pela administração de antagonista dos receptores GABA_A, a bicuculina (DiMicco et al., 1986; Silveira and Graeff, 1992; Soltis and DiMicco, 1992). Além disso, animais expostos a modelos de ansiedade apresentam uma elevação nos níveis de catecolaminas do HDM

(Sajdyk et al., 1997), enquanto lesões nesse núcleo foram capazes de promover efeitos ansiolíticos (Inglefield et al., 1994).

Reforçando a hipótese da participação do HDM em respostas aversivas, a injeção de benzodiazepínicos nessa região promove efeitos ansiolíticos. Além disso, a administração de AP7, um antagonista dos receptores NMDA, diminui a atividade exploratória no campo aberto e no Labirinto em T elevado (LTE) (Jardim and Guimaraes, 2001; Jardim and Guimaraes, 2004). Animais submetidos a modelos de stress e ansiedade apresentaram aumento da expressão de c-fos em vias hipotalâmicas (Kovacs and Sawchenko, 1996a, b; Sawchenko et al., 1996), incluindo o HDM (Beckett et al., 1997), e aqueles expostos ao seu predador natural apresentaram um aumento, de modo especial, no VMHdm (Silveira and Graeff, 1992; Silveira et al., 1995; Canteras, 2002; Martinez et al., 2008)

Em humanos, observou-se através de tomografia por emissão de pósitrons (PET) que a administração do agonista colecistocinérgico CCK-4, um agente panicogênico, promoveu a ativação de áreas hipotalâmicas que se projetavam para a SCP dorsal (Javanmard et al., 1999). O mesmo padrão de ativação foi ainda observado quando pacientes foram submetidos à infusão de lactato de sódio, outro modelo indutor de respostas panicogênicas (Reiman et al., 1989). Ainda corroborando a hipótese do envolvimento de vias hipotalâmicas nas respostas aversivas em humanos, estudos demonstraram que quando estes eram apresentados a vídeos que continham cenas ameaçadoras, era possível observar uma ativação da parte posterior do hipotálamo medial (Pichon et al., 2012)

Experimentos feitos com pacientes acordados submetidos à implantes bilaterais de eletrodos no hipotálamo demonstraram que o HVMdm possui o menor limiar para indução de ataques de pânico (Wilent et al., 2010). Assim, ameaças psicológicas em humanos parecem envolver os mesmos circuitos hipotalâmicos de ameaças predatórias observados em roedores, provavelmente envolvendo também respostas de memória ao medo (Canteras and Graeff, 2014).

Portanto, considerando as semelhanças entre os comportamentos humanos e animais frente a estímulos aversivos, bem como entre os comportamentos evocados pela estimulação do Hipotálamo e por ameaças naturais, a ativação desta estrutura tem sido utilizada como um modelo animal de ataque de pânico (Graeff, 1994; Shekhar and Katner, 1995; Shekhar et al., 2011). Cabe ressaltar, porém, que diferentemente das reações de defesa rápidas e explosivas observadas pela estimulação da SCP, a resposta induzida pela estimulação do HDM é caracterizada por aumento mais discreto de locomoção (Di Scala et al., 1984; Brandao et al., 1986; Schmitt et al., 1986; Shekhar and DiMicco, 1987; Schmitt et al., 1990).

De maneira especial, as respostas cardiovasculares induzidas pela estimulação do HDM parecem ser dependentes da SCP, uma vez que o aumento na frequência cardíaca e pressão arterial produzidos pela ativação do HDM são reduzidos após a inibição dos neurônios da SCPI/dl (da Silva et al., 2003; da Silva et al., 2006). Além disso, as alterações comportamentais observadas pela estimulação do HDM parecem ser também dependentes de projeções neuronais glutamatérgicas em direção à SCP (da Silva et al., 2006).

Assim, estruturas mesencefálicas mais dorsais como a SCP parecem desempenhar importante papel nas respostas rápidas e eficientes de defesa, levando o animal a um comportamento, primeiramente, de fuga explosiva, e em seguida, ativando regiões hipotalâmicas que exercem comportamentos de defesa mais organizados (Coimbra et al., 1992; Coimbra et al., 1996; Brandao et al., 1999).

Em conjunto, esses dados sugerem que o HDM elabora respostas aversivas possivelmente associadas à ansiedade e ao pânico, e que essa região apresenta-se como uma via mediadora de respostas comportamentais, endócrinas e cardiovasculares ao stress. (Shekhar et al., 1993; Shekhar et al., 1996).

3. NEUROTRANSMISSORES ENVOLVIDOS NAS RESPOSTAS AVERSIVAS

Diversos neurotransmissores podem modular respostas aversivas, dentre eles as monoaminas, o óxido nítrico, a substância P, o glutamato e o sistema endocanabinoide (Sonnenberg et al., 1989; Deakin and Graeff, 1991; Guimaraes et al., 1993; Carobrez, 2003; Bergink et al., 2004; Harro, 2006; Kalueff and Nutt, 2007; Moreira et al., 2007).

A presença de receptores ionotrópicos de glutamato em diversas regiões hipotalâmicas, incluindo o HDM (Eyigor et al., 2001), e a demonstração de que injeções de agonistas glutamatérgicos no HDM causavam reações de fuga (Silveira and Graeff, 1992) fizeram com que o N-metil-d-aspartato (NMDA), um agonista seletivo dos receptores glutamatérgicos com esse nome, fosse utilizado para estimular estrutura como o HDM em animais experimentais. As

reações de fuga induzidas quando o HDM é estimulado por NMDA são caracterizadas por aumento de locomoção, pulos e tentativas de fuga (Di Scala et al., 1984; Brandão et al., 1986; Milani & Graeff, 1987; Silveira & Graef, 1992).

Além do sistema glutamatérgico, o sistema endocanabinoide também exerce importante papel como mediador de comportamentos defensivos (Di Marzo et al., 2004; Pertwee, 2005; Moreira et al., 2009; Batista et al., 2014; Lim et al., 2015; Viana et al., 2015)

3.1. O SISTEMA ENDOCANABINOIDE:

A planta *Cannabis sativa*, popularmente conhecida como maconha, é extensamente utilizada como droga de abuso e para fins terapêuticos específicos. Os primeiros registros do consumo de *Cannabis* datam de aproximadamente 5000 anos, e os relatos consequentes a esse consumo são sensação de prazer, euforia, relaxamento e aumento de interação social (Pertwee, 1997; Curran et al., 2002).

Somente em 1964, Raphael Mechoulam identificou e caracterizou o composto responsável pela maioria dos efeitos da maconha: o Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC). Anos mais tarde, observou-se que o Δ^9 -THC, bem como seus análogos sintéticos, é capaz de induzir uma tétrade de efeitos: analgesia, hipotermia, hipolocomoção e catalepsia. Atualmente, mais de 70 compostos biologicamente ativos já foram isolados da *Cannabis*, sendo denominados fitocanabinoides (Mechoulam and Gaoni, 1965b, a, 1967b, a; Howlett et al., 2004).

Durante décadas, o mecanismo de ação do Δ^9 -THC permaneceu obscuro. Inicialmente pensou-se que, devido ao caráter lipofílico dos

canabinoides, ele exerceria seus efeitos por dispersão na bicamada lipídica da membrana celular, semelhante ao que ocorre com os anestésicos gerais. Porém, determinadas observações, como a de que as relações entre dose e resposta para esses compostos são muito sensíveis a alterações em suas estruturas químicas, conduziram à hipótese de que seus efeitos poderiam ser mediados por algum receptor (Roth et al., 1984; Herkenham et al., 1990; Howlett et al., 1990; Richardson et al., 1990). Outro indício que apontava para a existência de receptores canabinoides foi a descoberta de que esses compostos eram capazes de inibir a adenilato ciclase, um mecanismo bioquímico comum a vários receptores (Howlett, 1984). De fato, em 1988, Devane e colaboradores propuseram por meio de estudos de ligante marcado ("*binding*"), a existência de um receptor no qual essas substâncias se ligariam (Devane et al., 1988).

Dois anos depois, o primeiro tipo de receptor canabinoide foi identificado e clonado (Matsuda et al., 1990), sendo outro subtipo descoberto em seguida (Munro et al., 1993). O Comitê para Nomenclatura de Receptores e Classificação de Drogas da União Internacional de Farmacologia Básica e Clínica (*International Union of Basic and Clinical Pharmacology - IUPHAR*) denominou tais receptores de CB₁ e CB₂, respectivamente (Howlett et al., 2002; Pertwee et al., 2010).

Os receptores CB₁ são expressos em neurônios no sistema nervoso central, entre outros tipos celulares (Herkenham et al., 1990; Herkenham et al., 1991). A existência de receptores CB₂ em neurônios centrais ainda é controversa, sendo sua presença mais bem estabelecida em células da glia e

do sistema imune (Munro et al., 1993; Griffin et al., 1997; Xi et al., 2011; Onaivi et al., 2012).

A caracterização bioquímica destes receptores demonstrou que seu mecanismo de transdução de sinal baseava-se na ativação de uma Proteína Gi, que inibe a Adenilato Ciclase. Como consequência, há uma menor conversão de Trifosfato de Adenosina (ATP) em Monofosfato Cíclico de Adenosina (AMPc), o que leva a uma menor ativação da Proteína Quinase A (PKA). Logo, todos os efeitos biológicos mediados pela PKA estarão reduzidos (Howlett, 1984). Além disso, os receptores canabinoides também aumentam a condutância de canais para potássio e reduzem a condutância de canais para cálcio, sendo expressos em terminais pré-sinápticos e agindo como moduladores da liberação de outros neurotransmissores. (Piomelli, 2003).

Após a demonstração da existência de um receptor canabinoide e a elucidação de seu mecanismo de transdução, descobriu-se o seu primeiro ligante endógeno: a N-aracdonoil etanolamina, também chamada anandamida (Devane et al., 1992). Essa substância, isolada do encéfalo de mamíferos, era capaz de mimetizar as ações do Δ^9 -THC. Tal feito a consolidava como um equivalente endógeno do mesmo, ou seja, um endocanabinoide (Zias et al., 1993). A anandamida possui afinidade maior por receptores do tipo CB₁, embora possa se ligar também a receptores do tipo TRPV1 (*Transient Receptor Potential Vanilloid Type-1*), exercendo funções distintas em cada um desses receptores (Ross, 2003; Starowicz et al., 2007; Terzian et al., 2009).

Um segundo tipo de endocanabinoide foi identificado, o 2-aracdonoilglicerol (2-AG), que possui afinidade por receptores tanto CB₁ quanto CB₂ (Mechoulam et al., 1995; Sugiura et al., 1995). De especial importância

para este trabalho, o 2-AG é formado pela hidrólise de fosfolípidios de membrana, através da fosfolipase C (PLC) β ou δ , liberando diacilgliceróis. Os diacilgliceróis, por sua vez, sofrem a ação da diacilglicerol lipase (DAGL) α ou β e são convertidos em 2-AG (Gao et al., 2010; Tanimura et al., 2010; Reisenberg et al., 2012).

Além de 2-AG e anandamida, são também considerados endocanabinoides os seguintes compostos: N-aracdonoil dopamina, virodamina e noladina, todos derivados do ácido aracdônico (Porter et al., 2002; Di Marzo et al., 2004; Leggett et al., 2004).

Os endocanabinoides possuem características peculiares que os distinguem de outros neurotransmissores. Tradicionalmente, neurotransmissores são sintetizados em neurônios pré-sinápticos, armazenados em vesículas, de onde são liberados após ativação e consequente influxo de cálcio. De modo contrário, os endocanabinoides são sintetizados de maneira retrógrada em terminais pós-sinápticos, a partir de fosfolípidos de membrana (Piomelli, 2003). Após a síntese, os endocanabinoides se difundem para a fenda sináptica, não sendo, portanto, armazenados em vesículas. Além disso, os receptores estão localizados em neurônios pré-sinápticos, onde se ligam os endocanabinoides que são liberados sob demanda, após despolarização do neurônio pós-sináptico (Wilson and Nicoll, 2001; Piomelli, 2003; Di Marzo et al., 2004; Howlett et al., 2004).

O término da ação dos endocanabinoides se dá por meio de sua recaptação pelos terminais pré-sinápticos (no caso de 2-AG) e pós-sinápticos (no caso de anandamida). Duas possibilidades são descritas para a hidrólise dos endocanabinoides no interior de neurônios: a primeira é a de que os

endocanabinoides podem cruzar a membrana celular a favor do gradiente de concentração, em um processo passivo e não dependente de enzimas ou transportadores. A segunda é a de que existe uma proteína transportadora que favorece a entrada do endocanabinoide para o neurônio (Piomelli, 2003).

A metabolização desses compostos no interior dos neurônios ocorre pelas enzimas Hidrolase Amida de Ácidos Graxos (*Fatty Acid Amide Hydrolase*, FAAH) e Monoacilglicerol Lipase (MAGL), que metabolizam a anandamida e o 2-AG, respectivamente (Di Marzo et al., 1998; Dinh et al., 2002; De Petrocellis et al., 2004; Di Marzo et al., 2004; Maccarrone et al., 2008).

Em conjunto, os endocanabinoides, seus receptores e suas enzimas constituem o sistema endocanabinoide (Piomelli, 2003). Uma ilustração simplificada deste sistema pode ser vista na FIGURA 2.

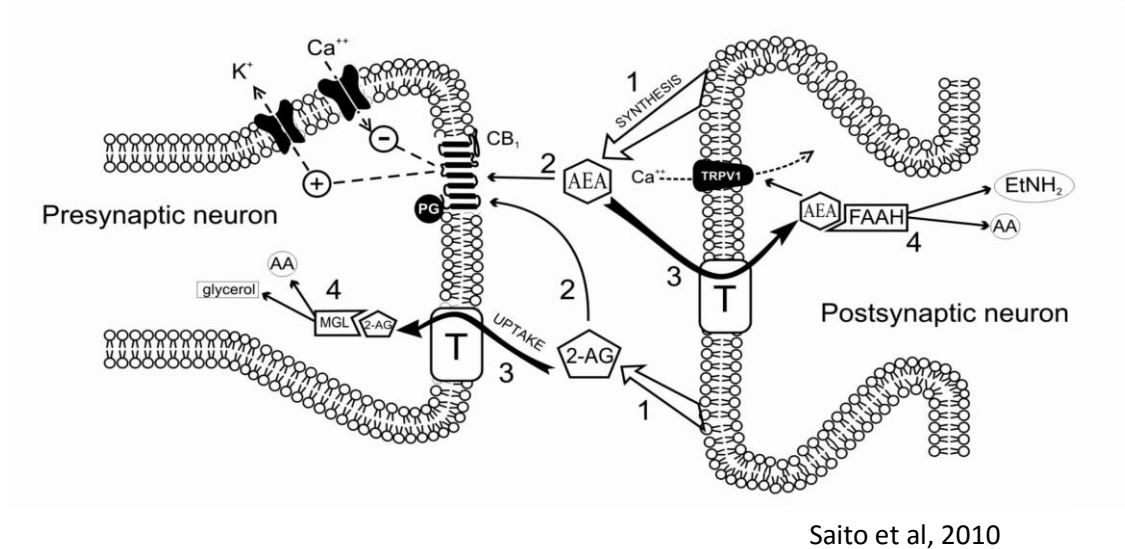


Figura 2: Representação esquemática da sinapse endocanabinoide. Anandamida (AEA) e 2-araquidonoilglicerol (2-AG) são sintetizados em neurônios pós-sinápticos, após influxo de cálcio (1). AEA e 2-AG se ligam a receptores CB_1 em neurônios pré-sinápticos (2), exercendo suas ações. O término da ação destes endocanabinoides se dá por recaptação por transportadores (3) e metabolização pela Hidrolase Amida de ácidos graxos (FAAH) e Monoacil Monoacilglicerol Lipase (MAGL), que metabolizam AEA e 2-AG respectivamente (4).

A partir da caracterização dos receptores canabinoides, foi possível sintetizar moléculas que de alguma forma pudessem interferir nesse sistema. Exemplos são os antagonistas CB₁ (Rimonabanto - SR 141716; AM251) e CB₂ (AM630); bem como os agonistas CB₁ (WIN 55-212, ACEA e HU 210) e CB₂ (JWH133) (Rinaldi-Carmona et al., 1994; Pertwee, 1999, 2000). Além disso, outra estratégia de intervenção é a inibição das enzimas que degradam os endocanabinoides, elevando, portanto, os níveis endógenos destes últimos. Como exemplo, pode-se citar o URB597 (Kathuria et al., 2003) e URB602 (Hohmann et al., 2005), que inibem a degradação da anandamida e do 2-AG, respectivamente (King et al., 2007; Long et al., 2009; Schlosburg et al., 2009; Chanda et al., 2010).

Nesse sentido, o sistema endocanabinoide tem se destacado devido à sua localização em estruturas relacionadas com comportamentos aversivos, tais como hipotálamo, SCP, amígdala e córtex pré-frontal (Herkenham, 1991; Onaivi, 2006; Onaivi et al., 2006b; Onaivi et al., 2006a; Moreira et al., 2007; Resstel et al., 2008; Campos et al., 2012; Almeida-Santos et al., 2013a; Batista et al., 2015; Viana et al., 2015).

A expressão de receptores canabinoides em diversas áreas cerebrais explica alguns dos efeitos farmacológicos destes compostos. A alta densidade no córtex e na formação hipocampal relaciona-se com os efeitos de déficit de memória e aprendizagem. A expressão nos gânglios da base pode ser relacionada com prejuízo motor, enquanto a presença na SCP e amígdala explicaria a analgesia e os efeitos comportamentais. Em contrapartida, a ausência de receptores em centros bulbares, justifica sua incapacidade em induzir depressão respiratória (Howlett, 2002).

4. O SISTEMA ENDOCANABINOIDE E AS RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS:

Evidências experimentais sugerem que o sistema endocanabinoide pode ser importante na modulação de respostas comportamentais relacionadas a transtornos de ansiedade, incluindo o transtorno do pânico. Finn e colaboradores demonstraram que o tratamento com o canabinoide sintético HU 210 foi capaz de reverter a fuga induzida pelo aminoácido excitatório Ácido D, L-homocisteico (DLH), ambos injetados na SCP (Finn et al., 2003). Além disso, o aumento da neurotransmissão canabinoide nessa região atenuou os efeitos comportamentais e autonômicos da fuga induzida por NMDA (Almeida-Santos et al., 2013b; Almeida-Santos et al., 2013a; Viana et al., 2015). Além disso, a administração de anandamida na SCPdl promoveu efeito do tipo-ansiolítico, evidenciado pelo aumento do número de entradas no braço aberto do Labirinto em Cruz Elevado (LCE). Esse efeito foi mimetizado pelo agonista seletivo CB₁, ACEA; potencializado pelo inibidor do transportador de anandamide, AM 404, e revertido pelo pré-tratamento com o antagonista CB₁, AM251 (Moreira et al., 2007; Moreira et al., 2009).

Os efeitos ansiolíticos da AEA e do AM 404 na SCP puderam ser confirmados em outros modelos de ansiedade, como o teste de conflito de Vogel, medo condicionado ao contexto e teste de vocalização induzida pelo isolamento (Berrendero and Maldonado, 2002; Patel et al., 2005; Bortolato et al., 2006; Moreira et al., 2007; Lisboa et al., 2008). O mesmo efeito foi observado após a administração de tais drogas no córtex pré-frontal medial (CPFm), e revertido pelo pré-tratamento com antagonista CB₁ (Fogaca et al., 2012). Não somente a inibição farmacológica da AEA, mas também a genética,

evidenciada pela utilização de animais nocaute para a FAAH, foi capaz de exercer efeito ansiolítico mediado por CB₁ (Kathuria et al., 2003; Moreira et al., 2008).

Além da anandamida, o 2-AG também parece modular reações aversivas. O aumento de seus níveis endógenos, por meio da inibição da MAGL, promoveu efeito tipo-ansiolítico no LCE (Busquets-Garcia et al., 2011; Sciolino et al., 2011). Esse efeito parece ser mediado tanto por receptores CB₁ quanto CB₂ (Almeida-Santos et al., 2013b). Já a sua administração crônica reverteu o comportamento de ansiedade induzida pelo estresse (Sumislawski et al., 2011).

Estudos anteriores de nosso grupo demonstraram que injeções de 2-AG na SCPdl aboliram o efeito panicogênico do NMDA. Essa ação foi mimetizada pelo URB602 e revertida pelo pré-tratamento com um antagonista CB₁. Além disso, o URB602 foi capaz de reverter o aumento na expressão de c-fos induzido por NMDA (Gobira et al., 2016).

Em conjunto, esses dados revelam que o aumento da neurotransmissão endocanabinoide é capaz de atenuar comportamentos aversivos, emergindo como uma possível alternativa no manejo de comportamentos relacionados à ansiedade.

5. O SISTEMA ENDOCANABINOIDE E O HIPOTÁLAMO

A presença de receptores canabinoides no hipotálamo foi descrita pela primeira vez por Herkenham e colaboradores em 1991 (Herkenham et al., 1991). Esses receptores estão envolvidos em diversas respostas, como a adaptação ao stress, respostas imunes, ansiedade e resposta cardiovascular

induzida por eventos aversivos (Crosby and Bains, 2012; Hill and Tasker, 2012; Grzeda et al., 2015; Rabasa et al., 2015a; Rabasa et al., 2015b).

Evidências apontam também que a regulação do eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HPA) induzida por determinados tipos de estresse poderia envolver os endocanabinoides. O eixo HPA é composto por neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) e células da hipófise anterior e córtex da adrenal, essas últimas liberadoras de corticosteróides. Os corticosteróides possuem diversas ações tanto no SNC (processamento de respostas cognitivas e comportamentais) quanto na periferia (mobilização e armazenamento de glicose, alterações no fluxo sanguíneo) (McEwen, 2000).

A estimulação neuronal induzida pelo stress resulta na ativação da porção parvocelular do PVN, que sintetiza e libera o Hormônio Liberador de Corticotropina (CRH) e a Vasopressina (VP). O CRH é transportado via eminência mediana até a hipófise anterior, onde estimula a liberação do Hormônio Adrenocorticotrófico (ACTH) na corrente sanguínea. O ACTH, por sua vez, induz a liberação de corticosteroides (cortisol em humanos e corticosterona, em roedores) no córtex da supra-renal (Pecoraro et al., 2006).

A resposta hormonal ao estresse prepara o indivíduo para possíveis ameaças, levando a uma mobilização de reservas energéticas, aumentando a concentração e a capacidade cognitiva, enquanto reduz funções digestivas, imunes e reprodutivas (Pecoraro et al., 2006; (Keller-Wood and Dallman, 1984; Watts, 2005).

Por meio de uma alça de retroalimentação negativa, os corticosteróides inibem a liberação de CRH/VP e ACTH no PVN e Hipófise anterior, respectivamente. Este processo é de extrema importância, uma vez que a

hiperatividade do eixo, com manutenção dos altos níveis de corticosteroides, relaciona-se com prejuízo de memória, transtornos de ansiedade, depressão, hipertensão e diabetes tipo 2 (Drolet et al., 1995; Engelmann et al., 1996; McEwen, 1998; Lupien et al., 1999; Hill et al., 2010a).

A modulação negativa do eixo HPA parece ser dependente do sistema endocanabinoide. Segundo esta teoria, os glicocorticoides são capazes de induzir a liberação de AEA e 2-AG no PVN. Esses endocanabinoides agem sobre receptores CB₁ pré-sinápticos em neurônios glutamatérgicos, inibindo a neurotransmissão excitatória para neurônios pós-sinápticos do PVN. Dessa forma, haveria uma menor liberação de CRF e uma regulação negativa do eixo (Gorzalka and Hill, 2009; Evanson et al., 2010; Hill and McEwen, 2010; Riebe and Wotjak, 2011; Hill and Tasker, 2012; Manduca et al., 2015; Morena et al., 2016).

Corroborando a hipótese de que o sistema endocanabinoide modula a regulação do eixo HPA, estudos demonstraram que exposições sucessivas ao stress levam a uma redução dos níveis de corticosterona, em consequência de uma adaptação do eixo. Todavia, o bloqueio farmacológico de receptores CB₁ parece impedir a habituação endócrina ao stress (Patel and Hillard, 2008). Do mesmo modo, camundongos nocaute para CB₁ possuem uma adaptação deficiente ao estresse, além de respostas ansiogênicas mais acentuadas, alterações no eixo HPA, hipersensibilidade a fatores estressores e menor responsividade a drogas ansiolíticas (Urighuen et al., 2004).

Ainda nesse sentido, animais nocaute para o receptor CB₁ ou tratados com antagonistas desses receptores apresentam aumento nos níveis de corticosterona, ACTH e CRF (Patel et al., 2004; Atkinson et al., 2010; Hill et al.,

2010b; Cota et al., 2003; Barna et al., 2004; Cota et al., 2007). Além disso, a administração sistêmica de antagonistas CB₁ aumenta a expressão de c-Fos no PVN, sugerindo que o aumento da atividade do eixo HPA é mediado pela ativação de células secretoras de CRH no PVN (Patel et al., 2004; Doyon et al., 2006)

A presença de glicocorticoides em experimentos com fatias de PVN resulta em uma rápida supressão da neurotransmissão glutamatérgica excitatória em neurônios que liberam CRF. Tal resposta é abolida quando um antagonista canabinoide também é adicionado ao banho (Di et al., 2003; Wamsteeker et al., 2010)

Embora o PVN seja um núcleo crucial para as respostas integrativas ao estresse, outros núcleos, como o HDM estão diretamente envolvidos na regulação neuroendócrina e autonômica a agentes estressores. De fato, o HDM envia extensas projeções para a porção parvocelular do PVN. Além disso, a estimulação do HDM resulta em um aumento significativo de células positivas para c-Fos no PVN, reforçando a estreita conectividade entre estas áreas (Thompson et al., 1996; Boudaba et al., 1997; Mihaly et al., 2001; Zaretskaia et al., 2008).

Embora o HDM desempenhe um importante papel integrativo em condições de estresse, o envolvimento da sinalização endocanabinoide dessa região ainda é pouco explorado.

OBJETIVOS:

Objetivo Geral:

Testar a hipótese de que o sistema endocanabinoide modula respostas defensivas no hipotálamo dorsomedial.

Objetivos Específicos:

1. Verificar o envolvimento dos endocanabinoides anandamida e 2-AG na resposta de fuga induzida por NMDA.
2. Testar a hipótese de que o URB602, um inibidor da hidrólise de 2-AG, poderia atenuar a resposta cardiovascular induzida por NMDA em animais anestesiados.
3. Testar a hipótese de que a administração de NMDA intra-HDM poderia elevar os níveis de corticosterona e tal resposta poderia ser atenuada pelo pré-tratamento com URB602.
4. Avaliar o envolvimento dos receptores CB₁ e CB₂ nas respostas induzidas por URB602.
5. Testar a hipótese de que administração local de ACEA (agonista seletivo CB₁) e JWH133 (agonista seletivo CB₂) atenuaria a resposta de fuga induzida pela administração de NMDA no HDM.
6. Testar a hipótese de que há aumento na expressão de c-Fos em neurônios que expressam a enzima diacil-glicerol-lipase (DAGL) em regiões cerebrais envolvidas na circuitaria de defesa.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados ratos Wistar, pesando entre 290-330 gramas, provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, com livre acesso à água e comida. Os animais foram mantidos em um ciclo claro-escuro de 12x12 horas, com início às 7:00 e temperatura controlada (24° C). Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa e Experimentação Animal (CETEA), protocolo número 059/11.

Cirurgia Estereotáxica

Os animais foram anestesiados com Ketamina (60 mg/Kg) e Xilazina (8 mg/Kg) via intraperitoneal e fixados a um aparelho estereotáxico (David Kopf®). Após injeção subcutânea de anestésico local (Lidocaína + Epinefrina 1:2000), e intramuscular de Pentabiótico (0,2 mL/rato), foi feita uma incisão sagital para exposição da calota craniana. Dois parafusos foram fixados ao crânio e uma cânula-guia (16,5 mm) foi implantada no HDM, segundo coordenadas estabelecidas pelo Atlas Paxinos & Watson (2007): 0,5 mm lateral; 8,3 mm dorso-ventral, 3 mm ântero-posterior em relação ao Bregma. A cânula foi fixada à calota craniana por meio de uma massa acrílica. Um mandril de aço inoxidável foi introduzido na cânula para evitar a oclusão da mesma. Ao término da cirurgia, os animais receberam o analgésico e antiinflamatório Banamine® (Flunixin meglumina, 1 mL/Kg), permanecendo no laboratório até completa recuperação. Após esse período, foram levados ao biotério, onde permaneceram por 7 dias, depois dos quais foram submetidos aos procedimentos experimentais.

Injeção intra-encefálica

Após a retirada do mandril, foi introduzida pela cânula guia uma agulha odontológica gengival (17,5 mm). A agulha foi conectada a um segmento de Polietileno (P10) e este a uma seringa Hamilton® de 10 µl. As injeções foram realizadas por uma bomba de infusão (Insight®), sendo o volume injetado 0,2 µl, a uma taxa de infusão de 0.4 µl/min. Após a administração, a agulha permaneceu no interior da cânula-guia por 30 segundos, para evitar refluxo da droga. Após cada injeção, a bomba de infusão era novamente acionada, com a finalidade de se verificar se a agulha não estava entupida.

Drogas

- NMDA - agonista de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA – (Sigma®) 1,0; 3,0; 10,0 nmol/0,2 µL diluído em Salina 0,9% (Viana et al., 2015)
- URB597- inibidor da hidrólise da Anandamida – (Cayman®) 0,3; 1,0; 3,0 nmol/0,2 µL, diluído em 1 Etanol: 1 Cremofor : 18 Salina (Rubino et al., 2008)
- URB602- inibidor da hidrólise do 2-AG- (Tocris®) 30; 100; 300; 1000 pmol/0.2µL diluído em 50% DMSO em solução tampão fosfato (Moreira et al., 2007)
- AM251 - antagonista seletivo CB₁- (Sigma®) 100 pmol/0.2µL diluído em salina estéril (Viana et al., 2015)
- AM630 - antagonista seletivo CB₂ - (Sigma®) 10; 100; 1000 nmol/0.2µl diluído em salina estéril (Moreira et al., 2007)
- ACEA - agonista seletivo CB₁- (Cayman®) 0,005; 0,05; 0,5 pmol/0,2 µL, solução em metil-acetato, diluído em salina (Casarotto et al., 2012)

- JWH133 - agonista seletivo CB₂ - (Cayman®) 0,3; 1; 3 nmol/0.2µl diluído em salina estéril (Xi et al., 2011)

Canulação da artéria femoral para mensuração dos parâmetros cardiovasculares

Uma hora antes do registro cardiovascular foi realizada a canulação da artéria femoral. A cânula foi confeccionada a partir de um tubo de polietileno PE-10 de 4 cm soldado por aquecimento a um tubo de polietileno PE- 50 de 13 cm. Antes de ser implantada, as cânulas foram preenchidas com solução salina (0,9%) e os animais foram anestesiados com Uretana i.p. (1,25g/Kg). A ausência de reflexos motores após leve pressão na cauda do animal foi o indicativo de anestesia geral e profunda. A cânula de polietileno foi introduzida na aorta abdominal, através da artéria femoral. Com o auxílio de um trocáter, a cânulas traspassou o tecido subcutâneo até sua exteriorização na região interescapular. As incisões foram fechadas com pequenas suturas e, em seguida, procedeu-se o registro dos parâmetros cardiovasculares.

Registro dos parâmetros cardiovasculares

Uma hora após a anestesia, a cânula arterial previamente heparinizada (1/20 em salina) foi conectada a um transdutor de pressão (AECAD E 04 P) ligado a um sistema de aquisição de dados analógico-digital (Power Lab, USA) para o registro da pressão arterial média (PAM) e da frequência cardíaca (FC). Os animais receberam injeções unilaterais de 20 µL das drogas ou respectivo veículo intra-HDM, com intervalo de 10 minutos. Os valores de PAM e FC

foram continuamente registrados a partir de 5 minutos antes da primeira injeção, até 10 minutos após a segunda injeção.

Teste Comportamental - Caixa de Observação

Para se avaliar o comportamento dos animais após injeção das drogas, foi utilizada uma caixa de acrílico transparente (29 x 19 x 34 cm), acoplada a uma tampa de malha plástica com um orifício que permite a passagem do polietileno P10 (FIGURA 2).

Durante cinco minutos, a reação dos animais foi gravada por uma câmera de vídeo (Samsung, SMX-C10LN/XAA) localizada em frente à caixa de observação. Os parâmetros quantificados em cada vídeo foram cruzamentos e pulos. Considerou-se cruzamento quando o animal atravessou a linha média da caixa com as quatro patas e pulo quando o animal retirou as quatro patas do chão simultaneamente (Aguiar et al., 2006). Após a retirada do animal da caixa, o chão e as paredes da mesma foram limpos com álcool 70%.

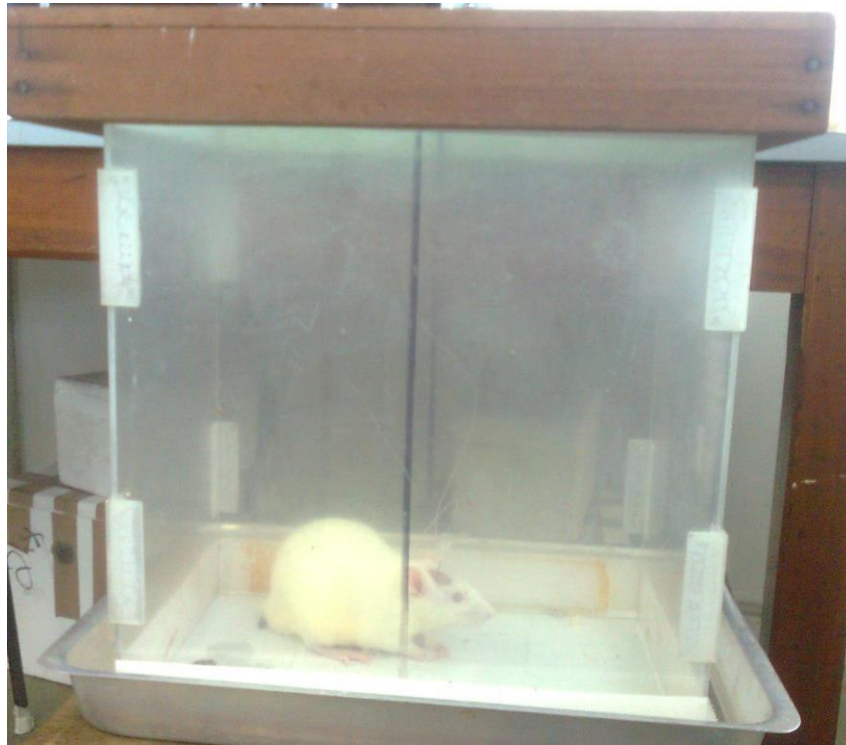


Figura 3: Caixa de Observação

Dosagem de corticosterona plasmática

Trinta minutos após saírem da caixa de observação os animais foram decapitados e o sangue coletado em tubos heparinizados estocados em gelo. Os tubos foram centrifugados a 4°C para separação do plasma e estocados em freezer -80°C. No dia do experimento, as amostras foram incubadas por 2 horas em temperatura ambiente com corticosterona conjugada com acetilcolinesterase e anti-soro específico em placas de 96 poços (Cayman n. 500655), revestidos de anticorpo anti-IgG de coelho, sob agitação de 500 rpm.

Após esse tempo, a amostra foi reconstituída com reagente de Ellman e conjugado de corticosterona, seguido de incubação no escuro por uma hora, sem agitação. A densidade óptica das soluções foi determinada em leitor de

ELISA (412 nm) e a concentração de corticosterona foi calculada utilizando-se uma curva padrão.

Perfusão intracardíaca:

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

Histologia:

Os cérebros estocados em formol 25 % foram cortados em um criostato (Microm HM 505 N) ao nível do sítio de injeção, em secções de 50 µm de espessura. Em seguida, os cortes foram montados em lâminas de vidro gelatinizadas e analisados em um microscópio (Zeiss Axio Imager A1) para a verificação do sítio, de acordo com os diagramas do Atlas Paxinos (Paxinos, 1997), conforme a FIGURA 3.

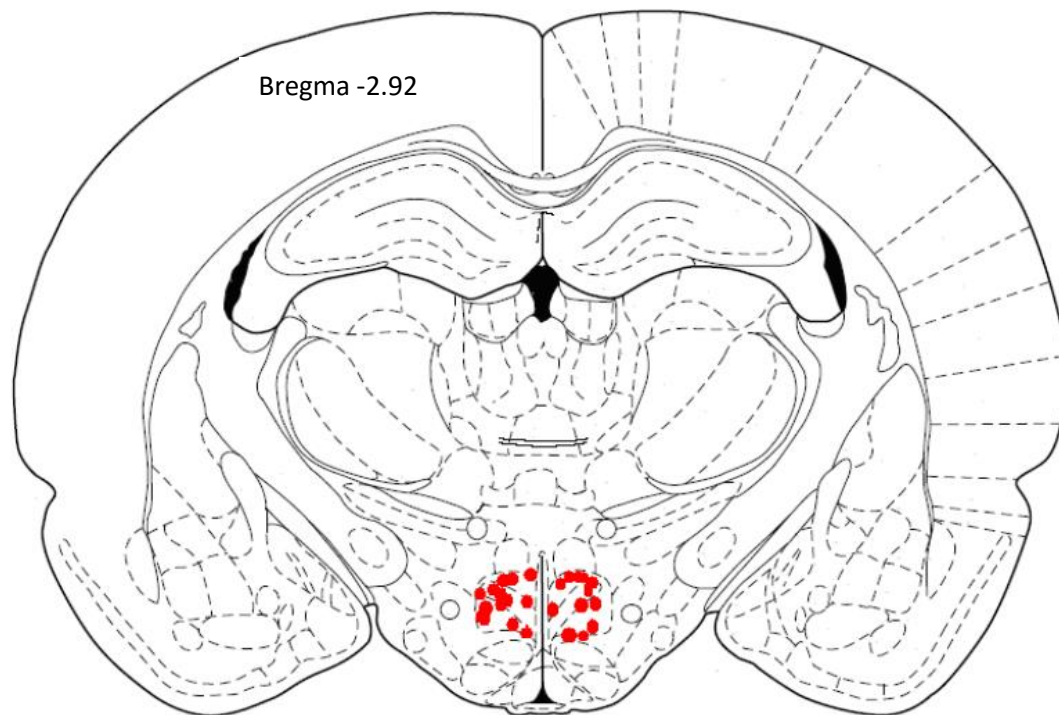


Figura 4: Diagrama do plano representativo dos sítios de injeção do HDM (Modificado de Paxinos & Watson, 1997).

Imunofluorescência – Dupla marcação c-Fos e DAGL

Duas horas após o término do experimento comportamental, os animais foram sacrificados com injeção *i.p.* de uretana (25%, 5 ml/Kg de peso) e perfundidos com salina e paraformaldeído (PFA) 4% tamponado em PBS 0,1 M, pH 7,4. Os encéfalos foram removidos e estocados em solução de sacarose 30% por 48h. Decorrido esse tempo, foram congelados em isopentana e estocados a -80°C. Procederam-se os cortes de 25 µm em triplicata, por meio do criostato Leica 3050 S (CAPI/UFMG).

As secções foram lavadas 3 vezes, por 10 minutos em PBS 0,1M. Em seguida, foram incubadas em solução de PBS + glicina 0,1M por 10min, para bloqueio de sítios inespecíficos 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. Essa etapa

visa evitar marcações inespecíficas e 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 DAGL policlonal produzido em coelho (1:1000, Santa Cruz[®]) e anti c-Fos policlonal produzido em cabra (1:200, Santa Cruz[®]), durante 24 horas, sob agitação e refrigeração. 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 coelho produzido em jumento (1:1000, emissão de fluorescência verde) e Alexa Fluor 594 anti-cabra produzido em jumento (1:1000, emissão de fluorescência vermelha) ambos Invitrogen[®].

Após o processo de imunofluorescência as secções foram lavadas por 30 min (6 lavagens de 5 minutos cada) em PBS e finalmente por 5 minutos em água destilada. Posteriormente, as secções foram distendidas em lâminas gelatinizadas e cobertas por lamínulas usando Fluoromount[®] como meio de montagem.

As secções foram analisadas em microscópio (Zeiss[®]) para fluorescência e as imagens capturadas por câmera digital. A contagem de neurônios positivos para DAGL, para c-Fos e a dupla-marcação foi realizada manualmente com o auxílio do programa Image J (versão 1.42q National Institute of Health, USA).

Grupos experimentais:

Experimento 1: Efeito do tratamento com NMDA sobre o número de cruzamentos e pulos (n= 6-7/grupo)

Grupos:

- Veículo (0,2 µL) + Veículo (0,2 µL)
- Veículo (0,2 µL) + NMDA (1 nmol/0,2 µL)
- Veículo (0,2 µL) + NMDA (3 nmol/0,2 µL)
- Veículo (0,2 µL) + NMDA (10 nmol/0,2 µL)

Experimento 2: Efeito do pré-tratamento com URB597 (Inibidor da hidrólise de anandamida) nas respostas de fuga induzidas pelo NMDA no HDM (n=6-7/grupo).

Grupos:

- Veículo (0,2 µL) + Veículo (0,2 µL)
- Veículo (0,2 µL) + NMDA (10 nmol/0,2 µL)
- URB597 (0,3 pmol/0,2 µL) + NMDA (10 nmol/0,2 µL)
- URB597 (1 pmol/0,2 µL) + NMDA (10 nmol/0,2 µL)
- URB597 (10 pmol/0,2 µL) + NMDA (10 nmol/0,2 µL)

Experimento 3: Efeito do pré-tratamento com URB602 (Inibidor da hidrólise de 2-AG) nas respostas de fuga induzidas pelo NMDA no HDM (n=6-7/grupo)

Grupos:

- Veículo (0,2 µL) + Veículo (0,2 µL)
- Veículo (0,2 µL) + NMDA (10 nmol/0,2 µL)

- URB602 (30 pmol/0,2 µL) + NMDA (10 nmol/0,2 µL)
- URB602 (100 pmol/0,2 µL) + NMDA (10 nmol/0,2 µL)
- URB602 (300 pmol/0,2 µL) + NMDA (10 nmol/0,2 µL)

Experimento 4: Efeito do pré-tratamento com URB602 na resposta cardiovascular induzida por NMDA no HDM de animais anestesiados (n=6-7/grupo)

Grupos:

- Veículo (0,2 µL) + Veículo (0,2 µL)
- Veículo (0,2 µL) + NMDA (10 nmol/0,2 µL)
- URB602 (100 pmol/0,2 µL) + NMDA (10 nmol/0,2 µL)
- URB602 (300 pmol/0,2 µL) + NMDA (10 nmol/0,2 µL)
- URB602 (1000 pmol/0,2 µL) + NMDA (10 nmol/0,2 µL)

Experimento 5: Efeito do pré-tratamento com URB602 (300 pmol) sobre os níveis de corticosterona (n=6/grupo)

Grupos:

- Veículo (0,2 µL) + Veículo (0,2 µL)
- Veículo (0,2 µL) + NMDA (10 nmol/0,2 µL)
- URB602 (300 pmol/0,2 µL) + NMDA (10 nmol/0,2 µL)
- URB602 (300 pmol/0,2 µL) + Veículo (0,2 µL)

Experimento 6: Efeito do pré-tratamento com AM251 (antagonista do receptor CB₁) sobre o bloqueio do URB602 nas respostas de fuga induzidas por NMDA no HDM (n=6/grupo).

Grupos:

- Veículo (0,2 µL) + Veículo (0,2 µL) + Veículo (0,2 µL)
- Veículo (0,2 µL) + Veículo (0,2 µL) + NMDA (10 nmol/0,2 µL)
- Veículo (0,2 µL) + URB602 (300 pmol/0,2 µL) + NMDA (10 nmol/0,2 µL)
- AM251 (100 pmol/0,2 µL) + URB602 (300 pmol/0,2 µL) + NMDA (10 nmol/0,2 µL)

• Experimento 7: Efeito do pré-tratamento com AM630 (antagonista do receptor CB₂) sobre o bloqueio do URB602 nas respostas de fuga induzidas por NMDA no HDM (n=6/grupo)

Grupos:

- Veículo (0,2 µL) + Veículo (0,2 µL) + Veículo (0,2 µL)
- Veículo (0,2 µL) + Veículo (0,2 µL) + NMDA (10 nmol/0,2 µL)
- Veículo (0,2 µL) + URB602 (300 pmol/0,2 µL) + NMDA (10 nmol/0,2 µL)
- AM630 (1000 pmol/0,2 µL) + URB602 (300 pmol/0,2 µL) + NMDA (10 nmol/0,2 µL)

• Experimento 8: Efeito do pré-tratamento com o agonista CB₁ seletivo ACEA sobre as respostas de fuga induzidas pelo NMDA no HDM (n=6-7/grupo)

Grupos:

- Veículo (0,2 µL) + Veículo (0,2 µL)
- Veículo (0,2 µL) + NMDA (10 nmol/0,2 µL)
- ACEA (0.005 pmol/0,2 µL) + NMDA (10 nmol/0,2 µL)
- ACEA (0.05 pmol/0,2 µL) + NMDA (10 nmol/0,2 µL)
- ACEA (0.5 pmol/0,2 µL) + NMDA (10 nmol/0,2 µL)

Experimento 9: Efeito do pré-tratamento com o agonista CB₂ seletivo JWH133 sobre as respostas de fuga induzidas pelo NMDA no HDM.
(n=6/grupo)

Grupos:

- Veículo (0,2 µL) + Veículo (0,2 µL)
- Veículo (0,2 µL) + NMDA (10 nmol/0,2 µL)
- JWH133 (0.3 pmol/0,2µL) + NMDA (10 nmol/0,2 µL)
- JWH133 (1 pmol/0,2µL) + NMDA (10 nmol/0,2 µL)
- JWH133 (3 pmol/0,2µL –NMDA (10 nmol/0,2 µL)

Experimento 10: Efeito do tratamento com AM251 seguido de uma subdose de NMDA

Grupos:

- Veículo (0,2 µL) + Veículo (0,2 µL)
- Veículo (0,2 µL) + NMDA (10 nmol/0,2 µL)
- Veículo (0,2 µL) + NMDA (1 nmol/0,2 µL)
- AM251(100 pmol/0,2µL) + NMDA (1 nmol/0,2 µL)

Experimento 11: Avaliação da expressão de células DAGL positivas, c-Fos positivas e da co-localização c-Fos/DAGL.

Grupos:

- Veículo (0,2 µL) + Veículo (0,2 µL)
- Veículo (0,2 µL) + NMDA (10 nmol/0,2 µL)

Áreas quantificadas:

- Hipotálamo Dorsomedial (HDM)
- Hipotálamo Ventromedial (HVM)
- Núcleo Paraventricular do Hipoálamo (PVN)
- Substância Cinzenta Periaquedutal – coluna dorsolateral (SCPdl)
- Substância Cinzenta Periaquedutal – coluna dorsomedial (SCPdm)

Delineamento experimental:

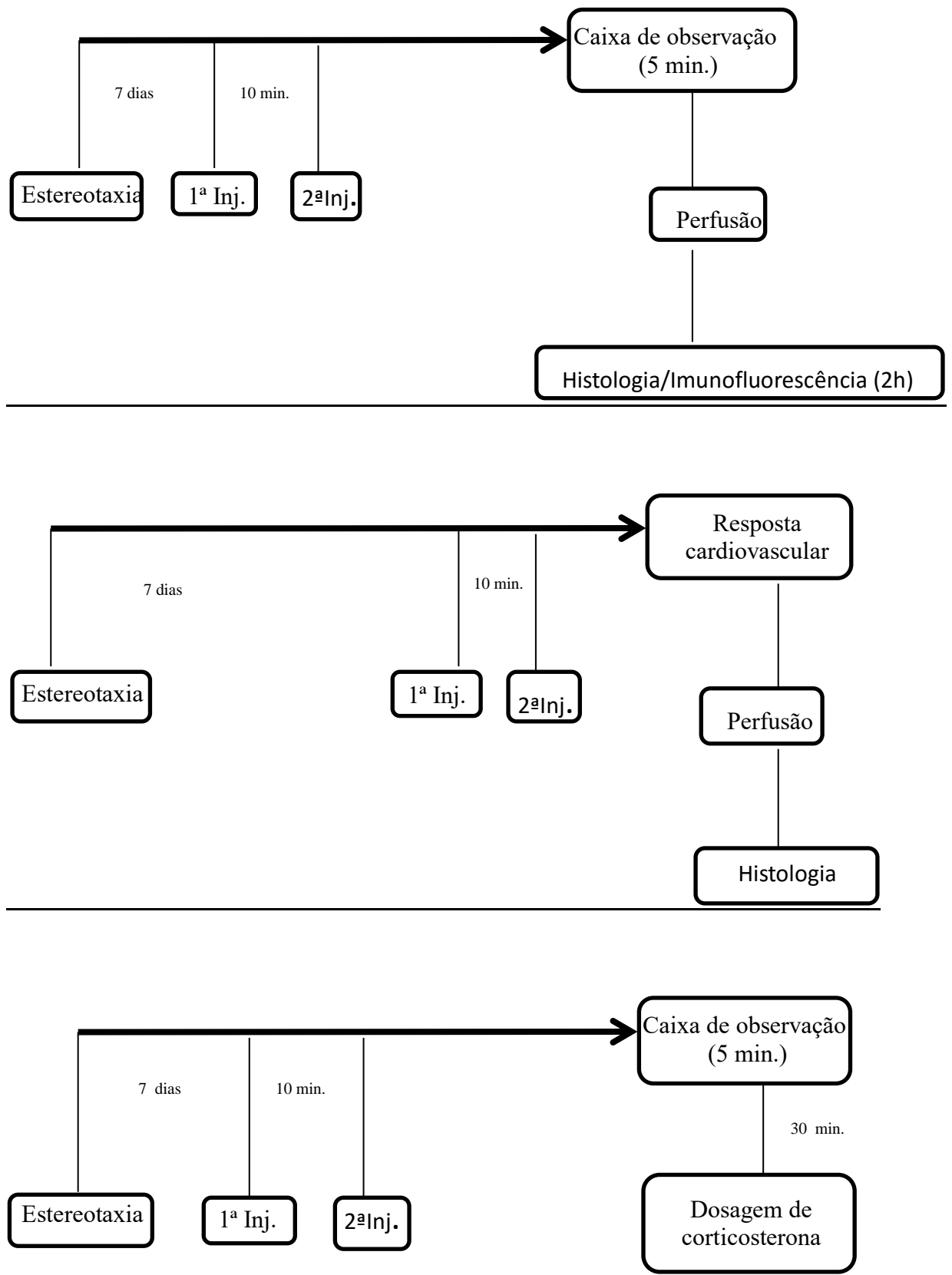


Figura 5: Representação esquemática dos protocolos experimentais

Análise estatística:

Os dados dos experimentos comportamentais realizados na caixa de observação não apresentam distribuição normal. Portanto, foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Mann-Whitney, e representados como mediana \pm intervalo interquartil (i.r.). Os dados obtidos dos parâmetros cardiovasculares foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de duas vias, considerando os fatores droga e tempo, seguida pelo pós-teste de Bonferroni. Os resultados da dosagem de corticosterona foram submetidos a ANOVA de uma via, seguida pelo pós-teste de Newman-Keuls. Por fim, os resultados de imunofluorescência foram analisados por teste t não-pareado. Excetuando os dados da caixa de observação, os demais foram representados como média \pm erro padrão da média (E.P.M). Em todas as análises utilizou-se Software GaphPad Prisma, versão 5. Em todos os testes, o nível de significância estabelecido foi $p < 0,05$.

RESULTADOS

1. Efeito do tratamento com NMDA sobre o número de cruzamentos e pulos:

No primeiro experimento, o teste de Kruskal-Wallis revelou diferença entre os grupos para os parâmetros cruzamentos ($p=0,0007$) e pulos ($p=0,0036$) (Figura 6). As injeções de NMDA 3 nmol/0,2 μ L e 10 nmol/0,2 μ L intra-HDM produziram reações de fuga, caracterizadas por um aumento significativo no número de cruzamentos e pulos em relação ao grupo controle: NMDA 3 nmol/0,2 μ L ($p=0,0012$ e $p=0,0360$, para cruzamentos e pulos, respectivamente; Mann-Whitney); 10 nmol/0,2 ($p=0,0012$ e $p=0,0026$; para cruzamentos e pulos, respectivamente). A dose de 10 nmol foi escolhida para os experimentos subsequentes.

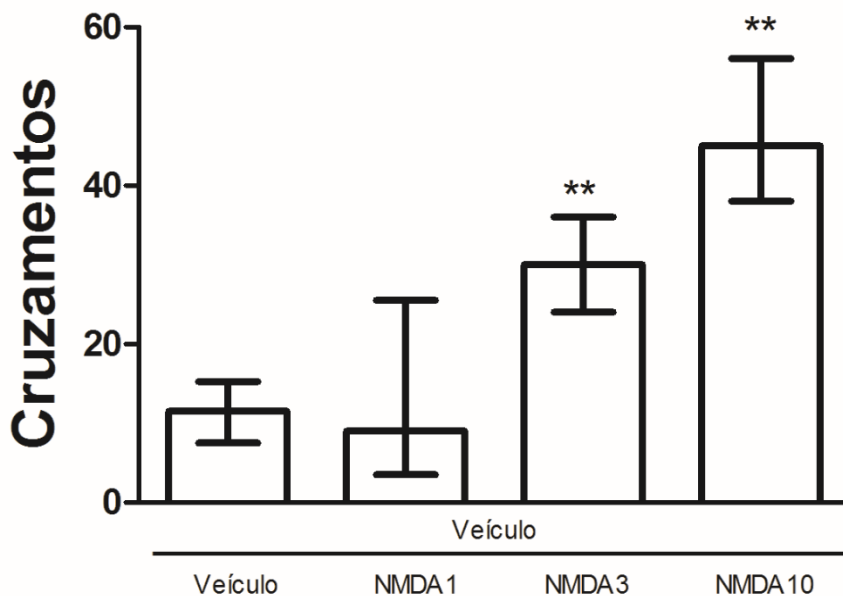


Figura 6: Efeito do NMDA (1; 3 e 10 pmol/0,2 μ L) injetado no HDM de ratos. Os dados representam mediana \pm I.R. do número de cruzamentos (* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle; Kruskal-Wallis seguido de Mann-Whitney; $n=6-7$ /grupo).

Tratamento	Pulos (p25/mediana/p75)
Veículo-Veículo	0 /0/ 0
Veículo-NMDA 1	0 /1/ 16
Veículo- NMDA 3	2 /6/ 11 *
Veículo-NMDA 10	3 /22/ 38 **

Tabela 1: Efeito do NMDA (1; 3 e 10 pmol/0,2 μ L) injetado no HDM de ratos sobre o número de pulos. Os dados representam mediana \pm I.R. do número de pulos (* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle; ** $p < 0,01$ em relação ao grupo controle; Kruskal-Wallis seguido de Mann-Whitney; $n=6-7$ /grupo).

2. Efeito do pré-tratamento com URB597 (Inibidor da hidrólise de anandamida) nas respostas de fuga induzidas pelo NMDA no HDM.

O pré-tratamento com URB597, não foi capaz de reduzir o número de cruzamentos nas doses de 0,3 pmol/0,2µL; 1 pmol/0,2µL e 3 pmol/0,2µL ($p=0,9428$, $p=0,2227$, $p=0,9428$ respectivamente; Mann–Whitney). A mesma resposta foi observada para o número de pulos ($p=0,2833$, $p=0,1151$, $p=0,1331$; Mann–Whitney) (Figura 7)

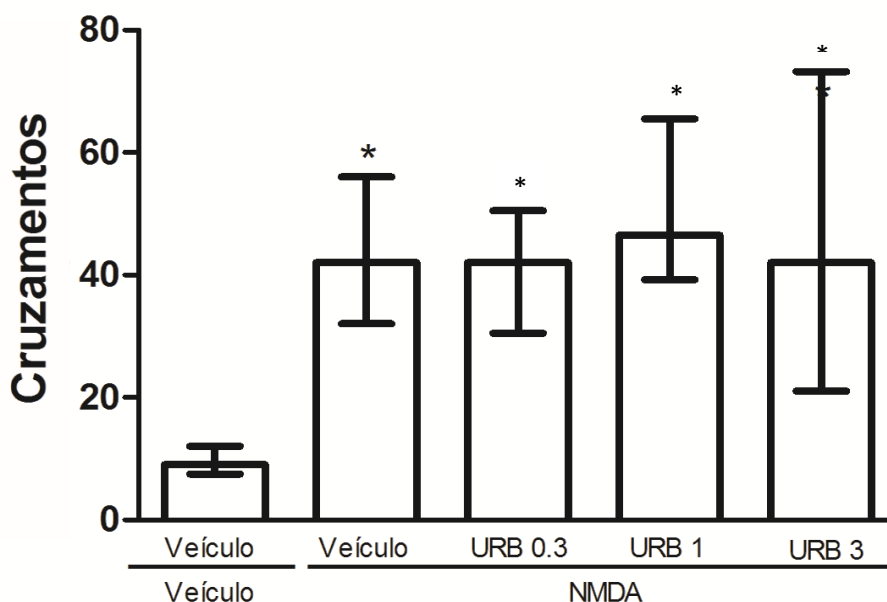


Figura 7: Efeito do URB597 (0,3; 1 e 3 pmol/0,2 μ L) sobre as reações de fuga induzidas por NMDA (10 nmol/0,2 μ L). Os dados representam mediana \pm I.R. do número de cruzamentos (* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle; Kruskal-Wallis seguido de Mann-Whitney; $n = 6-7$ /grupo).

Tratamento	Pulos (p25/mediana/p75)
Veículo-Veículo	0/0/0
Veículo-NMDA 10	21 /42/ 73.25 *
URB0.3-NMDA 10	0.75 /22/ 41.25 *
URB1-NMDA 10	0.75 /10.5/ 29.75 *
URB3-NMDA 10	0 /0/ 50.25 *

Tabela 2: Efeito do URB597 (0,3; 1 e 3 pmol/0,2 μ L) injetado no HDM de ratos sobre o número de pulos. Os dados representam mediana \pm I.R. do número de pulos (* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle; Kruskal-Wallis seguido de Mann-Whitney; $n = 6-7$ /grupo).

3. Efeito do pré-tratamento com URB602 (Inibidor da Hidrólise do 2-AG) nas respostas de fuga induzidas pelo NMDA no HDM:

Neste experimento, o teste de Kruskal-Wallis revelou diferença nos números de cruzamentos ($p=0,0008$) e pulos ($p=0.0001$) (Figura 8). A injeção de NMDA (10 nmol/0,2 μ L) intra-HDM produziu reações de fuga caracterizadas por aumento nesses parâmetros. O pré-tratamento com URB602 foi capaz de reduzir o número de cruzamentos nas doses de 100 nmol/0,2 μ L ($p=0,0264$; Mann–Whitney) e 300 nmol/0,2 μ L ($p= 0,0221$; Mann–Whitney), assim como o número de pulos ($p=0,0264$ e $p=0,0221$; Mann–Whitney). Não se observou diferença significativa no pré-tratamento com URB602 na dose de 30 nmol/0,2 μ L (Figura 8)

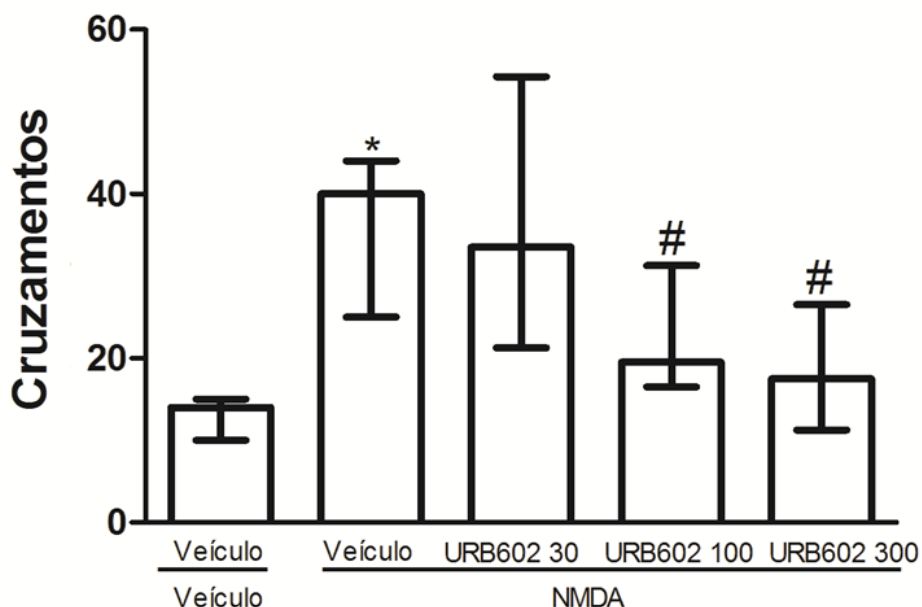


Figura 8: Efeito do URB602 (30; 100 e 300 pmol/0,2 μ L) sobre as reações de fuga induzidas por NMDA (10 nmol/0,2 μ L) no HDM de ratos. Os painéis superior e inferior representam mediana \pm I.R. do número de cruzamentos e pulos, respectivamente (* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle; # $p < 0,05$ em relação ao grupo Veículo-NMDA; Kruskal-Wallis seguido de Mann-Whitney; $n = 6-7$ /grupo).

Tratamento	Pulos (p25/mediana/p75)
Veículo-Veículo	0 /0/ 0
Veículo-NMDA 10	25 /40/ 44 **
Veículo-URB30	21.25 /33.5/ 54.25
Veículo-URB100	16.5 /19.5/ 31.25 #
Veículo-URB300	11.25 /17.5/ 26.5 #

Tabela 3: Efeito do URB602 (30; 10 e 100 pmol/0,2 μ L) injetado no HDM de ratos sobre o número de pulos. Os dados representam mediana \pm I.R. do número de pulos (* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle; # $p < 0,05$ em relação ao grupo Veículo-NMDA; Kruskal-Wallis seguido de Mann-Whitney; $n = 6-7$ /grupo).

4. Efeito do pré-tratamento com URB602 na resposta cardiovascular induzida por NMDA no HDM:

A fim de verificar se a resposta obtida pelo pré-tratamento com URB602 poderia ser observada também sobre respostas autonômicas, realizou-se medidas de parâmetros cardiovasculares. Observou-se efeito do fator tratamento ($F_{(5,495)} = 28,78$; $p \leq 0.0001$), do fator tempo ($F_{(14,495)} = 14,01$; $p \leq 0.0001$), bem como interação droga tempo ($F_{(70,495)} = 23,01$; $p \leq 0.0001$) para a pressão arterial média (PAM). De igual maneira, houve efeito do fator tratamento ($F_{(5,495)} = 4,91$; $p \leq 0.0001$), do fator tempo ($F_{(14,495)} = 16,50$; $p \leq 0.0001$), bem como interação droga tempo ($F_{(70,495)} = 17,99$; $p \leq 0.0001$) para a frequência cardíaca (FC).

A administração de NMDA (10 nmol/0,2 μ L) promoveu um aumento na pressão arterial média (PAM) ($F_{3,330}=121.4$, $p<0.0001$) e a uma diminuição na frequência cardíaca (FC) ($F_{3,330}=9.3$, $p<0.0001$). As doses de URB602 300 pmol/0,2 μ L e 1000 pmol/0,2 μ L por si só, não tiveram efeito sobre a PAM ($p>0.05$) e FC ($p>0.05$). O tratamento com URB602 nas doses de 300 pmol/0,2 μ L e 1000 pmol/0,2 μ L atenuou tanto a resposta da PAM quanto de FC (PAM $p<0.05$ and FC: $p<0.05$).. O tratamento com URB602 (300 pmol/0,2 μ L e 1000 pmol/0,2 μ L), por si só, não promoveu nenhum efeito tanto na PAM ($p>0.05$) quanto na FC($p>0.05$) (Figura 9).

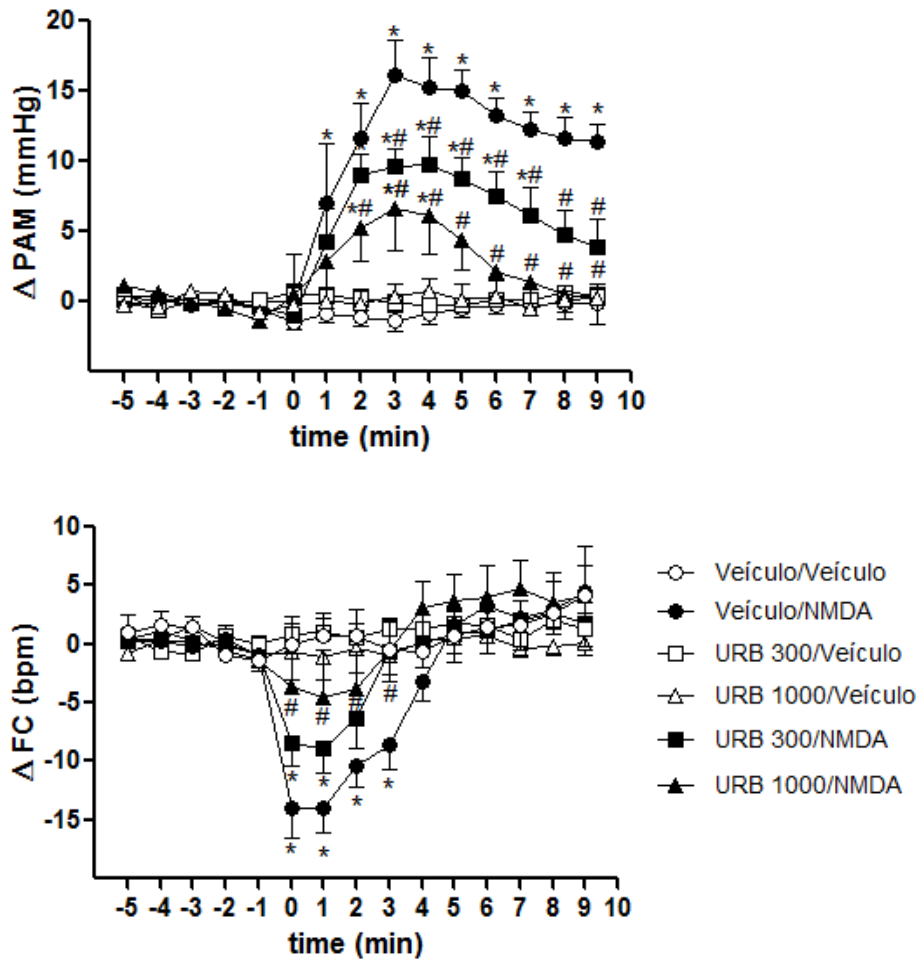


Figura 9: Efeito das injeções de Veículo e NMDA (10 nmol/0,2 μ L) na pressão arterial média (PAM, painel superior) e frequência cardíaca (FC, painel inferior) antes e após o pré-tratamento com veículo e URB602. As injeções de NMDA foram feitas no minuto -1. Os pontos representam média \pm SEM (* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle; # $p < 0,05$ em relação ao grupo Veículo-NMDA; two way ANOVA seguida de Bonferroni; n= 6-7/grupo)

5. Efeito do pré-tratamento com URB602 (300 pmol) sobre os níveis de corticosterona

Buscou-se avaliar também se a administração de NMDA no HDM seria capaz de ativar o eixo HPA e se esse efeito poderia ser revertido pelo pré-tratamento com URB602 (300 pmol). Porém, não se observou diferença significativa em nenhum dos grupos testados [$F_{3,23}=3,140$ $p=0,2814$] (Figura 10).

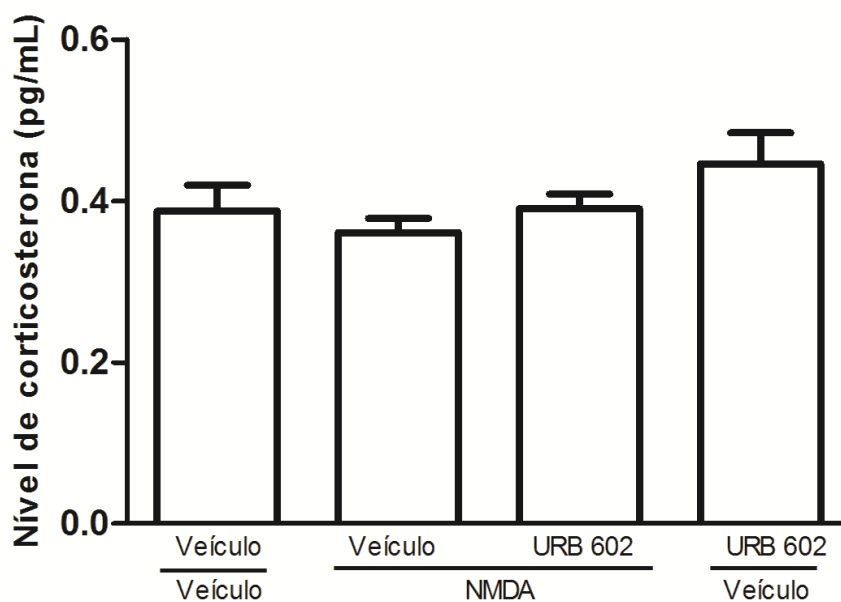


Figura 10: Efeito das injeções de Veículo e NMDA (10 nmol/0,2 μ L) sobre os níveis de corticosterona, antes e após o pré-tratamento com veículo e URB602. As barras representam média \pm SEM; *one way* ANOVA seguido de Newman-Keuls; n= 6/grupo)

6. Efeito do pré-tratamento com AM251 (antagonista de receptor CB₁) sobre o bloqueio do URB602 nas respostas de fuga induzidas por NMDA no HDM.

O tratamento com URB602 diminuiu significativamente o número de cruzamentos e pulos ($p=0,0022$ e $p=0.0304$; Mann-Whitney) quando comparado ao grupo veículo-veículo-NMDA. O tratamento com o antagonista AM251 foi capaz de reverter a atenuação no comportamento de fuga induzido por URB602. Tal resposta pode ser evidenciada pelo aumento no número de cruzamentos ($p=0,8095$; Mann-Whitney) e pulos ($p=0.2248$; Mann-Whitney), quando comparado ao grupo veículo-veículo-URB(Figura 11)

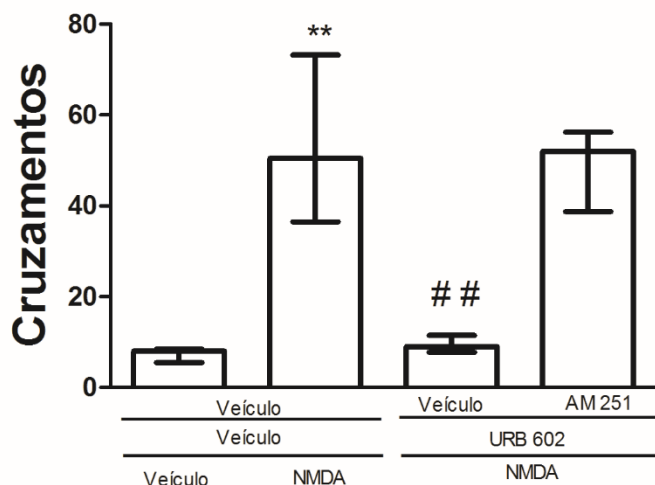


Figura 11: Efeito do AM251 (100 pmol/0,2µL) na reação de fuga induzida por NMDA (10 nmol/0,2µL) no HDM de ratos. Os dados representam mediana ± I.R. do número de cruzamentos (**p< 0,01 em relação ao grupo controle; ##p<0,01 em relação ao grupo Veículo-NMDA; Kruskal-Wallis seguido de Mann-Whitney; n=6/grupo).

Tratamento	Pulos (p25/mediana/p75)
Veículo-Veículo-Veículo	0 /0/ 0
Veículo-Veículo-NMDA 10	1 /19/ 29.25 **
Veículo-URB602- NMDA 10	0.00 /0.00/ 3.25 #
AM251- URB602 – NMDA	0 /0.5/ 24

10

Tabela 4: Efeito do AM251 (100 pmol/0,2µL) injetado no HDM de ratos sobre o número de pulos. Os dados representam mediana ± I.R. do número de pulos (**p< 0,01 em relação ao grupo controle; # p<0,05 em relação ao grupo Veículo-NMDA; Kruskal-Wallis seguido de Mann-Whitney; n=6/grupo).

7. Efeito do pré-tratamento com AM630 sobre o bloqueio do URB602 nas respostas de fuga induzidas por NMDA no HDM.

Para verificar se o efeito observado com a administração de URB602 poderia ser mediado também por receptores do tipo CB₂, administrou-se o antagonista seletivo AM630 (figura 12). A injeção de NMDA (10nmol/0,2 µL) intra-HDM produziu reações de fuga, caracterizadas por um aumento em ambas as medidas. O tratamento com URB diminuiu significativamente o número de cruzamentos e pulos ($p=0,0022$ e $p=0,0263$; Mann-Whitney). O tratamento com o antagonista AM630 foi capaz de reverter a atenuação no comportamento de fuga induzido por URB597. Tal resposta pode ser evidenciada pelo aumento no número de cruzamentos e pulos ($p=0,8082$; para cruzamentos e pulos, Mann-Whitney).

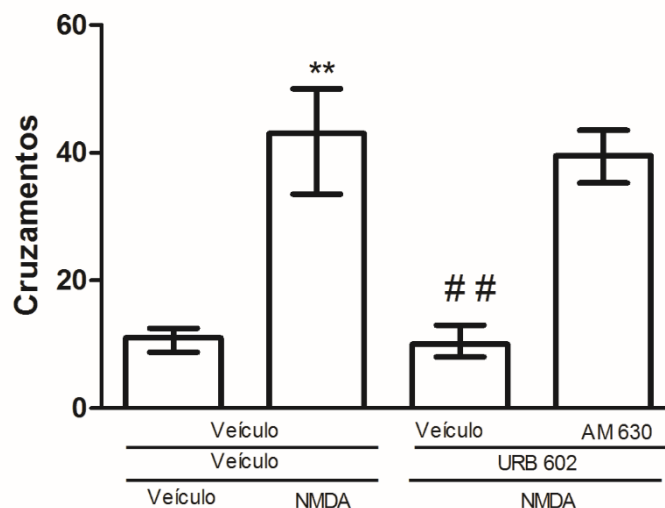


Figura 12: Efeito do AM630 (1000 pmol/0,2µL) na reação de fuga induzida por NMDA (10 nmol/0,2µL) no HDM de ratos. Os painéis superior e inferior representam mediana ± I.R. do número de cruzamentos e pulos, respectivamente (**p<0,01 em relação ao grupo controle; ##p<0,01 em relação ao grupo Veículo-NMDA; Kruskal-Wallis seguido de Mann-Whitney; n=6/grupo).

Tratamento	Pulos
	(p25/mediana/p75)
Veículo-Veículo-Veículo	0 /0/ 0
Veículo-Veículo-NMDA 10	1.5 /6.5/ 15.25 *
Veículo-URB602- NMDA 10	0 /0/ 0.75 #
AM630- URB602 – NMDA	0 /6/ 13.75

10

Tabela 5: Efeito do AM630 (1000 pmol/0,2µL) injetado no HDM de ratos sobre o número de pulos. Os dados representam mediana ± I.R. do número de pulos (*p< 0,05 em relação ao grupo controle; # p<0,05 em relação ao grupo Veículo-NMDA; Kruskal-Wallis seguido de Mann-Whitney; n=6/grupo).

8. Efeito do pré-tratamento com o agonista CB₁ seletivo (ACEA) sobre as respostas de fuga induzidas pelo NMDA no HDM.

O pré-tratamento com ACEA foi capaz de reduzir o número de cruzamentos e pulos apenas na dose de 0,5 pmol/0,2μL (p=0,0012 para cruzamentos e p=0,0104 para pulos; Mann – Whitney).

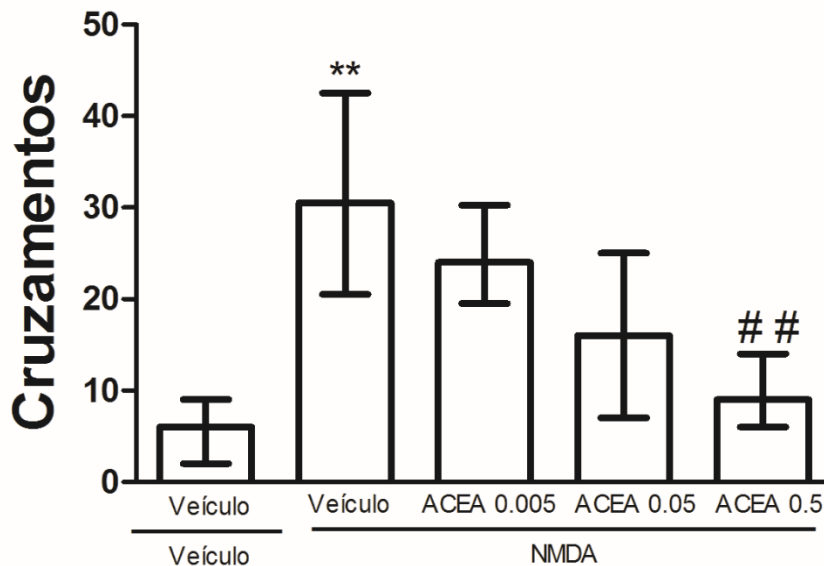


Figura 13: Efeito do ACEA (0,005; 0,05 e 0,5 pmol/0,2µL) na reação de fuga induzida por NMDA (10 nmol/0,2µL) no HDM de ratos. Os dados representam mediana ± I.R. do número de cruzamentos (**p < 0,01 em relação ao grupo controle; ## p < 0,01 em relação ao grupo Veículo-NMDA; Kruskal-Wallis seguido de Mann-Whitney; n=6=7/grupo)

Tratamento	Pulos (p25/mediana/p75)
Veículo-Veículo	0 /0/ 0
Veículo-NMDA 10	5.25 /10/ 29 *
ACEA 0.5- NMDA 10	0 /0/ 0 #
ACEA 0.05 – NMDA 10	0 /0/ 0 #
ACEA 0.005 –NMDA 10	0.0 /0.0/ 0.5 #

Tabela 6: Efeito do ACEA (0,005; 0,05 e 0,5 pmol/0,2µL) injetado no HDM de ratos sobre o número de pulos. Os dados representam mediana ± I.R. do número de pulos (*p < 0,05 em relação ao grupo controle; # p < 0,05 em relação ao grupo Veículo-NMDA; Kruskal-Wallis seguido de Mann-Whitney; n=6-7/grupo).

9. Efeito do pré-tratamento com o agonista CB₂ seletivo JWH133 sobre as respostas de fuga induzidas pelo NMDA no HDM.

O teste de Kruskal-Wallis revelou diferença entre os grupos para os parâmetros cruzamentos ($p=0,0003$) e pulos ($p=0,0049$) (Figura 14). A injeção de NMDA (10 nmol/0,2 μ L) intra-HDM produziu reações de fuga, caracterizadas por um aumento significativo no número de cruzamentos e pulos em relação ao grupo controle. O pré-tratamento com JWH133 foi capaz de reduzir o número de cruzamentos e pulos nas doses de 1 pmol/0,2 μ L ($p=0,0050$ e $p=0,0167$, para cruzamentos e pulos, respectivamente; Mann-Whitney), e 3 pmol/0,2 μ L ($p=0,0167$ e $p=0,0167$; para cruzamentos e pulos, respectivamente; Mann-Whitney).

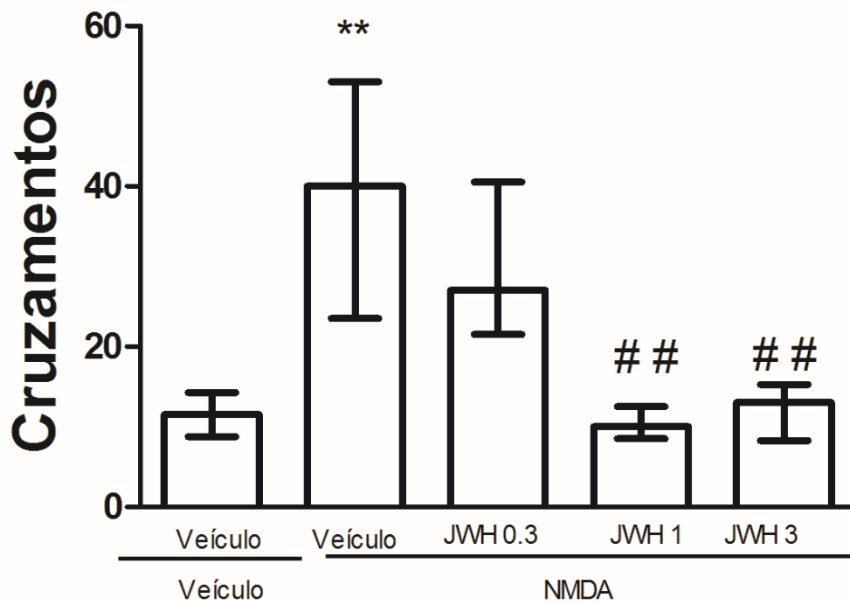


Figura 14: Efeito do JWH133 (0.3; 1 e 3 pmol/0,2µL) na reação de fuga induzida por NMDA (10 nmol/0,2µL) no HDM de ratos. Os dados representam mediana ± I.R. do número de cruzamentos e pulos, respectivamente (*p<0,05 em relação ao grupo controle; #p<0,05 em relação ao grupo Veículo-NMDA; Kruskal-Wallis seguido de Mann-Whitney; n=6/grupo)

Tratamento	Pulos (p25/mediana/p75)
Veículo-Veículo	0 /0/ 0
Veíc-NMDA 10	2.25 /20/ 50.25 *
JWH133 0.3- NMDA 10	0 /2/ 4.5
JWH133 1 – NMDA 10	0 /0/ 0 #
JWH133 3–NMDA 10	0 /0/ 0 #

Tabela 7: Efeito do JWH133 (0.3; 1 e 3 pmol/0,2µL) injetado no HDM de ratos sobre o número de pulos. Os dados representam mediana ± I.R. do número de pulos (*p< 0,05 em relação ao grupo controle; # p<0,05 em relação ao grupo Veículo-NMDA; Kruskal-Wallis seguido de Mann-Whitney; n=6/grupo).

10. Efeito do pré-tratamento com AM251 (100 pmol/0,2 µL), seguido por uma dose inefetiva de NMDA (1 nmol/0,2µL)

O teste de Kruskal-Wallis revelou diferença entre os grupos para os parâmetros cruzamentos ($p=0,0025$) e pulos ($p=0,0003$) (Figura 15). A injeção de NMDA (10 nmol/0,2 µL) intra-HDM produziu reações de fuga, caracterizadas por um aumento significativo no número de cruzamentos e pulos em relação ao grupo controle. A injeção de AM251(100 pmol/0,2 µL) seguida de NMDA (1 nmol/0,2 µL) não foi capaz de induzir um aumento no número de cruzamentos ($p=0,6879$) e pulos ($p=0,4620$) quando comparado ao grupo NMDA 1 nmol/0,2 µL. (Figura 15)

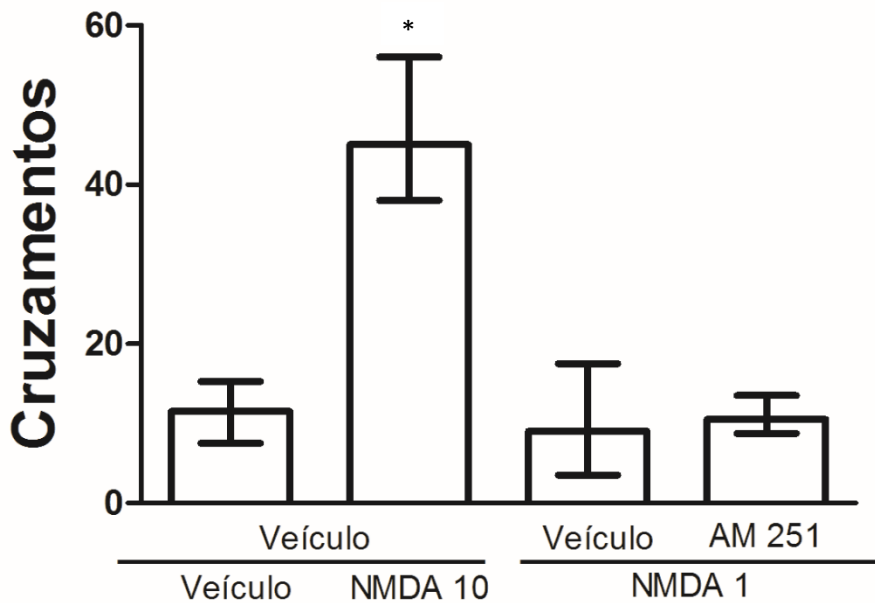


Figura 15: Efeito do pré-tratamento com AM251(100 pmol/0,2 μ L), seguido por uma dose inefetiva de NMDA (1 nmol/0,2 μ L) no HDM de ratos. Os dados representam mediana \pm I.R. do número de cruzamentos e pulos, respectivamente (* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle; Kruskal-Wallis seguido de Mann-Whitney; $n = 6-7$ /grupo)

Tratamento	Pulos (p25/mediana/p75)
Veículo-Veículo	0 /0/ 0
Veículo-NMDA 10	3 /22/ 38 *
Veículo-NMDA 1	0 /0/ 0
AM251- NMDA 1	0 /0/ 0

Tabela 8: Efeito do AM251(100 pmol/0,2 μ L), seguido por uma dose inefetiva de NMDA (1 nmol/0,2 μ L) sobre o número de pulos. Os dados representam mediana \pm I.R. do número de pulos (* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle; # $p < 0,05$ em relação ao grupo Veículo-NMDA; Kruskal-Wallis seguido de Mann-Whitney; $n = 6$ /grupo).

11. Avaliação da expressão de células DGL positivas, c-Fos positivas e da colocalização c-Fos/DGL.

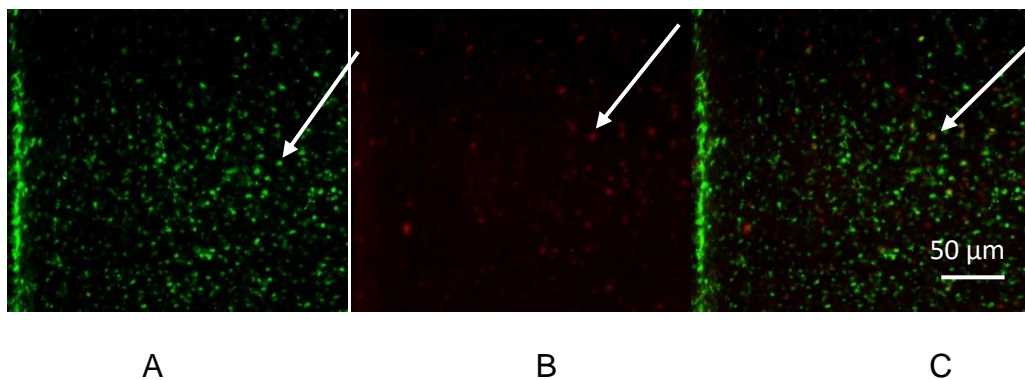


Figura 16: Fotomicrografias representativas de secções coronais (25 μm) do HDM de ratos que receberam NMDA. As setas representam: **(A)** células DGL positivas **(B)** expressão de c-fos **(C)** dupla-marcação de células c-Fos/DGL positivas. Aumento=20x.

A análise da expressão de c-Fos revelou um aumento dessa proteína nos núcleos dorsomedial ($t_{(8)} = 21,66$; $p < 0.0001$) e ventromedial ($t_{(8)} = 6,622$; $p = 0.002$) do hipotálamo, além das colunas dorsomedial ($t_{(10)} = 16,60$; $p < 0.0001$) e dorsolateral ($t_{(10)} = 17,89$; $p < 0.0001$) da substância cinzenta periaquedutal. Porém, a administração de NMDA não promoveu aumento da expressão de c-fos no núcleo paraventricular do hipotálamo ($t_{(10)} = 0,1213$; $p = 0,9059$). (Figura 17).

A análise da expressão da enzima DGL, envolvida na síntese do 2-AG, mostrou que não há aumento nos níveis dessa enzima na dIPAG ($t_{(10)} = 0,2112$; $p = 0.002$), na dmPAG ($t_{(10)} = 0,0819$; $p = 0,9363$) e no PVN ($t_{(10)} = 1,761$; $p = 0,1087$). A administração de NMDA aumentou a expressão de DGL no HDM ($t_{(10)} = 7,239$; $p = < 0.0001$) e HVM ($t_{(10)} = 8,985$; $p = < 0.0001$) (Figura 18).

Quando se observa a colocalização da expressão de c-Fos e DGL, a administração de NMDA induziu um aumento nas células fos/DGL positivas

na dIPAG ($t_{(10)} = 5,410$; $p = 0,0003$), no HDM ($t_{(10)} = 3,606$; $p = 0,0048$) e no HVM ($t_{(10)} = 5,347$; $p = 0,0003$). Contudo, não se observa diferença significativa na dmPAG ($t_{(10)} = 0,0968$; $p = 0,9248$) e no PVN ($t_{(10)} = 0,9481$; $p = 0,3654$). (Figura 19).

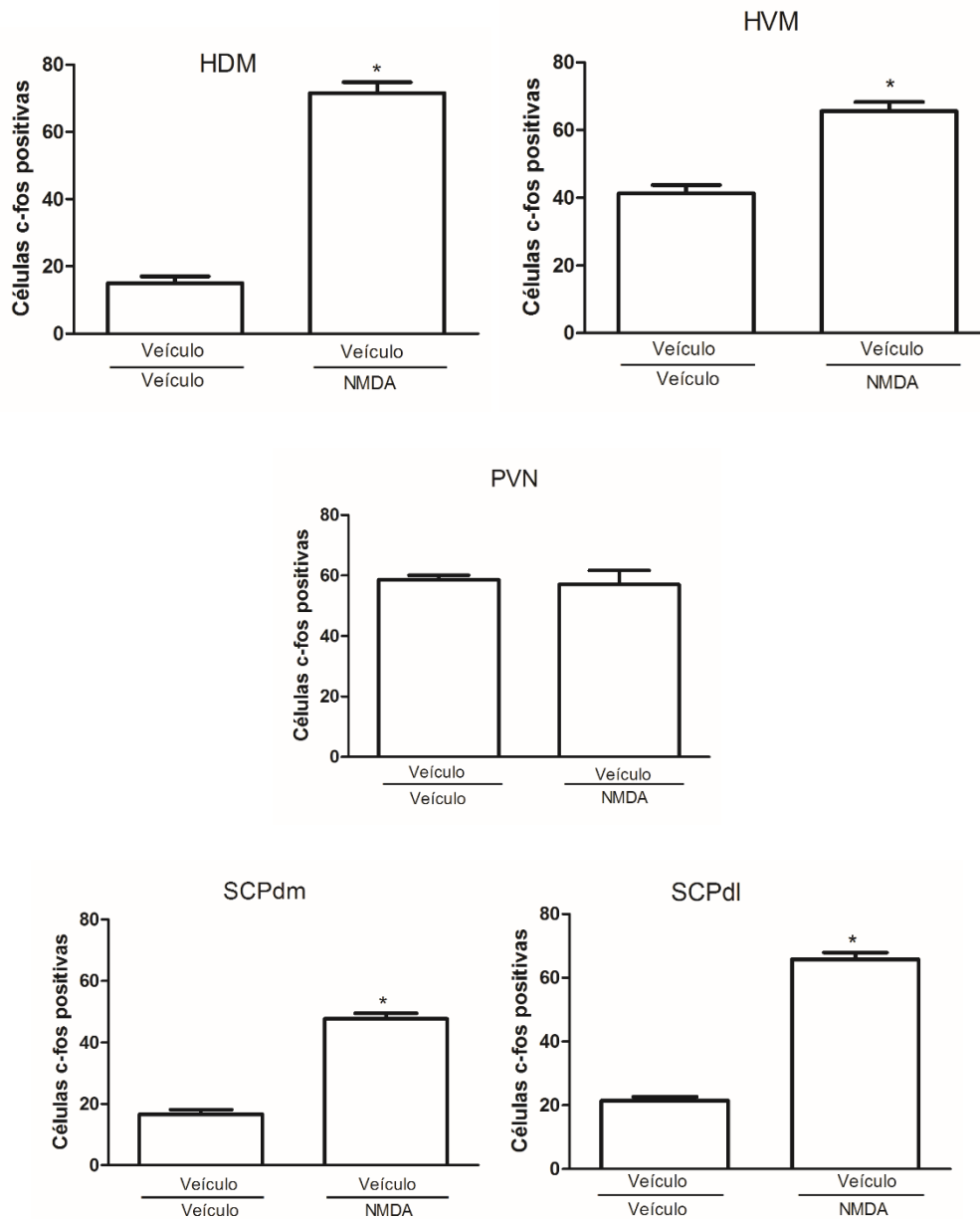


Figura 17: Efeitos da administração do NMDA sobre o número de células c-fos positivas. A injeção intra-HDM de NMDA aumenta a expressão de c-fos no HDM, HVM, dmPAG, dlPAG, mas não altera a expressão no PVN. (teste t não pareado; n= 6/grupo; *p< 0,05 em relação ao grupo controle).

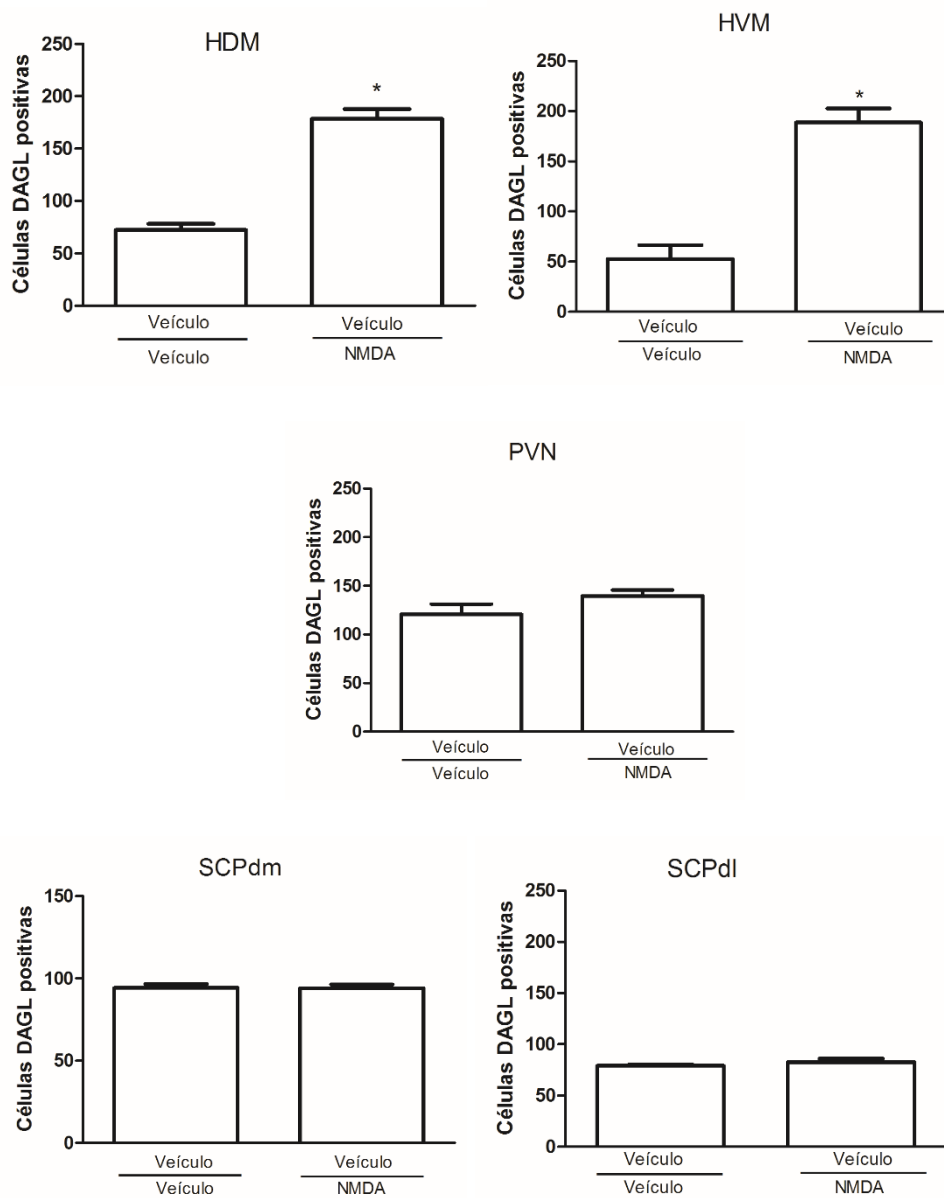


Figura 18: Efeitos da administração do NMDA sobre o número de células DGL positivas. A injeção intra-HDM de NMDA aumenta a expressão de DGL no HDM, HVM e PVN, mas não na dmPAG e dIPAG. (teste t não pareado; * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle; $n = 6$ /grupo).

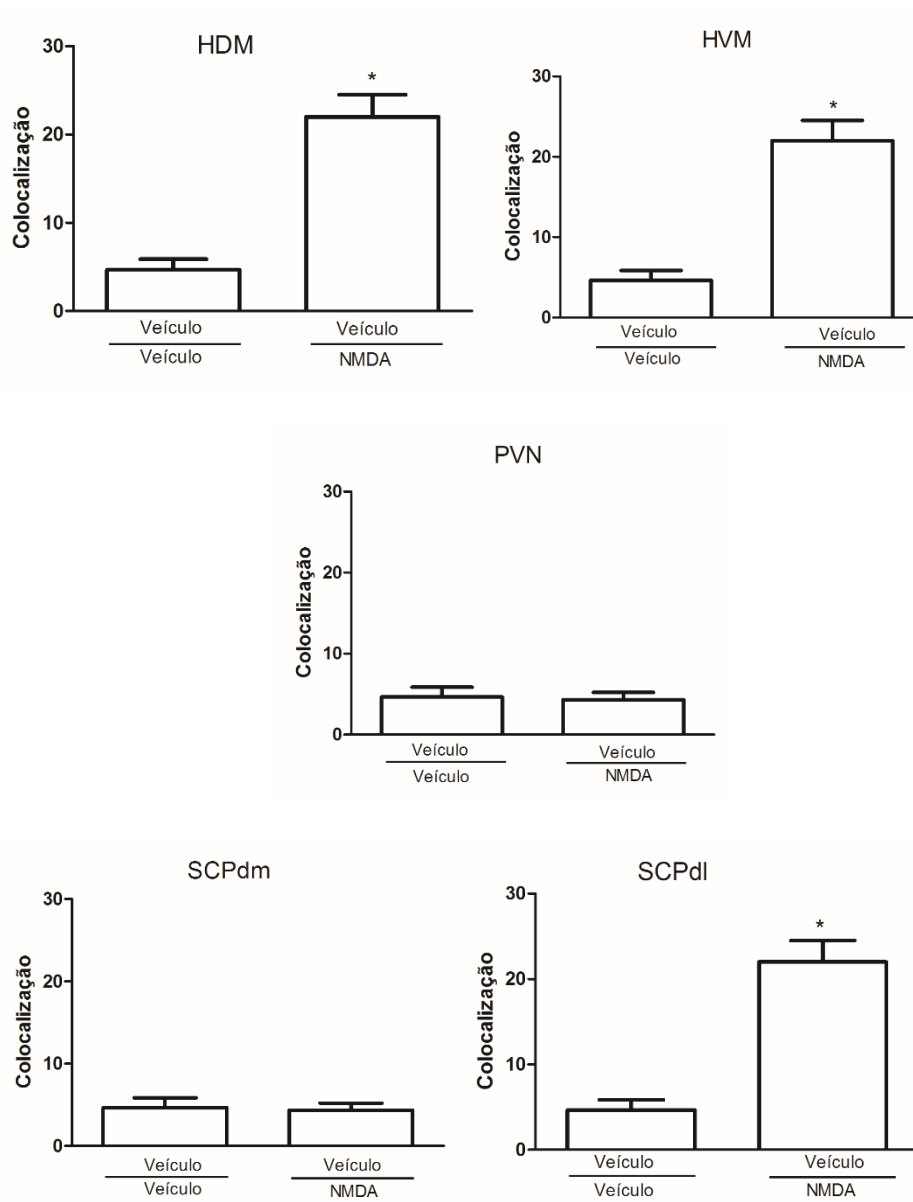


Figura 19: Efeito da administração de NMDA sobre o número de células fos/DGL positivas. A injeção intra-HDM de NMDA aumentou a colocalização de células no HDM, HVM, dIPAG, mas não na dmPAG e no PVN (teste t não pareado; * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, $n = 6$ /grupo).

Discussão:

No presente trabalho, buscou-se avaliar o envolvimento do sistema endocanabinoide frente a um modelo de fuga induzida por NMDA, um correlato de ataques de pânico em humanos. Nossos resultados demonstraram que a administração de NMDA foi capaz de induzir reações de fuga em ratos, corroborando a hipótese de que o HDM é um importante núcleo mediador de respostas defensivas. Este trabalho demonstrou ainda que o tratamento com drogas que aumentam os níveis de 2-AG bloqueou a fuga do NMDA, enquanto drogas que aumentam os níveis de anandamida não promoveram tal efeito.

O comportamento aversivo induzido por NMDA foi acompanhado de elevação na resposta cardiovascular, sem, entretanto, alterar os níveis de corticosterona. A elevação na FC e PAM foi reduzida por meio da administração do inibidor da hidrólise de 2-AG, URB602. Vale ressaltar que a administração isolada de URB602 não alterou os parâmetros já mencionados. Com a finalidade de verificar através qual receptor o URB602 exerceria seus efeitos, realizou-se o pré-tratamento com antagonistas CB₁ e CB₂. Em nosso estudo, ambos foram capazes de reverter o efeito antiaversivo do URB602, demonstrando a participação destes dois receptores na elaboração de comportamentos motivados.

Por fim, a administração de NMDA intra-HDM promoveu a ativação de regiões cerebrais relacionadas ao comportamento defensivo, como o HDM, HVM, SCPdl, SCPdm. Além disso, observou-se que houve uma maior ativação de células que expressam a enzima DAGL, responsável pela síntese de 2-AG, nas seguintes regiões: HDM, HVM e SCPdl.

A resposta aversiva induzida por NMDA observada neste trabalho foi evidenciada pelo aumento no número de cruzamentos e pulos apresentados pelos animais. Nossos resultados estão de acordo com trabalhos anteriores nos quais a injeção de NMDA ou ácido caínico, que é também um agonista de receptores glutamatérgicos, foi capaz de aumentar a locomoção bem como comportamentos relacionados à defesa (Silveira & Graeff, 1992). O mesmo padrão de resposta foi observado através da administração de outros agonistas glutamatérgicos e antagonistas gabaérgicos, assim como pela estimulação elétrica dessa estrutura (Di Scala et al., 1984; Brandao et al., 1986; DiMicco et al., 1986; Schmitt et al., 1986; Milani and Graeff, 1987; Silveira and Graeff, 1992; Soltis and DiMicco, 1992).

Ainda nesse sentido, a administração de agonistas GABA_A no HDM foi capaz de induzir efeitos ansiolíticos no LCE, sem alterar a atividade locomotora dos animais (Shekhar, 1993). De modo antagônico, Jardim e Guimarães demonstraram que a administração do antagonista glutamatérgico AP-7 não promoveu comportamento antiaversivo no LTE, no LCE, bem como no teste de Vogel, mas reduziu a atividade exploratória dos animais (Jardim and Guimaraes, 2001, 2004). De fato, o aumento da atividade locomotora visto no presente trabalho justifica-se pelas conexões do HDM com áreas motoras do córtex e cerebelo (Watts, 2015).

Cabe ressaltar que, diferentemente das reações induzidas pela estimulação da SCP, a estimulação do HDM não promoveu comportamento motor vigoroso ou ataque explosivo. Os comportamentos hipotalâmicos, quando comparados à SCP, caracterizam-se por resposta motora mais sutil, levantamentos, e um menor número de cruzamentos e pulos (Di Scala et al.,

1984; Brandao et al., 1986; Brandao et al., 1999). Possivelmente, enquanto estruturas mesencefálicas dorsais, como a SCPdl parecem desempenhar a função de engajar o animal em um comportamento de fuga explosiva, a ativação de vias hipotalâmicas integraria respostas mais organizadas e bem elaboradas, (Brandao et al., 1999; Coimbra et al., 2006; Biagioni et al., 2012; Biagioni et al., 2013).

Outra grande diferença quando se compara a fuga induzida por SCP e HDM é o limiar necessário para desencadear as respostas. Estudos anteriores de nosso grupo que empregaram o modelo de estimulação química da SCP utilizaram a dose 1 nmol de NMDA (Almeida-Santos et al., 2013a; Viana et al., 2015), enquanto no presente trabalho, a dose necessária para estimular o HDM foi de 10 nmol. Essa diferença justifica-se, possivelmente, pelo fato de que a SCP é uma via de integração que recebe aferências de diversas áreas responsáveis pelo comportamento defensivo, incluindo o HDM (Bandler and Carrive, 1988; Bandler et al., 1991; Carrive, 1993; Bandler and Keay, 1996; Bandler et al., 2000b; Bandler et al., 2000a). Quando se compara esse mesmo limiar para diferentes estruturas hipotalâmicas, observa-se que o HDM parece ser menos responsivo do que o HA na elaboração de comportamentos defensivos. Porém, assim como ocorre na SCP, a fuga induzida pela estimulação do HDM parece ser seguida de antinocicepção (Biagioni et al., 2012; Biagioni et al., 2013). Em conjunto, esses fatores colaboram para que a SCP seja uma área mais excitável e que necessita, portanto, de uma menor dose para ser estimulada.

Embora as ações comportamentais dos endocanabinoides sobre o hipotálamo ainda sejam pouco investigadas, já está bem estabelecido que a

administração de URB597 é capaz de reduzir a liberação de vasopressina, CRF e ACTH, hormônios liberados mediante situações de stress (Cota et al., 2003; Barna et al., 2004; Patel et al., 2004; Cota et al., 2007; Atkinson et al., 2010; Hill et al., 2010b ; Patel and Hillard, 2008; Luce et al., 2014). No entanto, como observado neste trabalho, o aumento nos níveis endógenos de anandamida pela administração de URB597 não foi capaz de inibir a fuga induzida por NMDA no HDM. Semelhante aos achados deste trabalho, uma ausência de resposta foi observada também com a administração sistêmica de URB597 no LCE (Naidu et al., 2007; Haller et al., 2009). Ainda nesse sentido, estudos de Batista e colaboradores indicaram que URB597 inibiu a fuga induzida por DLH sem inibir a fuga no LTE, demonstrando que a resposta é provavelmente dependente da natureza do estímulo aversivo (Batista et al., 2015).

De modo contrário, o aumento dos níveis de 2-AG reduziu o número de cruzamentos e pulos, sugerindo que não a anandamida, mas o 2-AG parece modular comportamentos aversivos que envolvam a estimulação química do HDM. Porém, diferentemente do hipotálamo, a administração de URB597 intra-SCP aboliu a fuga induzida por NMDA, efeito que foi revertido pelo pré-tratamento com AM251 (Viana et al., 2015). Do mesmo modo, Gobira e colaboradores observaram que injeções intraperitoneais de URB597 promoviam efeito panicolítico no LTE (Gobira et al., 2013). Outros estudos demonstraram também os efeitos ansiolíticos dessa substância no LCE e no Labirinto em zero elevado (Kathuria et al., 2003; Patel and Hillard, 2006; Busquets-Garcia et al., 2011). Não somente a inibição farmacológica, mas também a inibição genética da FAAH é capaz de promover efeitos ansiolíticos

uma vez que camundongos nocaute para FAAH apresentaram comportamento tipo-ansiolítico (Moreira et al., 2008; Cassano et al., 2011).

Uma possível explicação para o fato de que o 2-AG, mas não a anandamida, exerce efeito antiaversivo no DMH pode ser proposta a partir de observações feitas por Hill e colaboradores. Enquanto a anandamida modularia uma resposta tônica, o 2-AG modularia respostas mais intensas (Hill et al., 2010b; Gorzalka, 2008). Em determinadas regiões parece haver uma síntese tônica de anandamida quando os animais não estão submetidos a nenhum tipo de stress. Por isso, durante o evento aversivo, haveria uma oferta limitada da desse endocanabinoide, e sua subsequente degradação. Essa hipótese sugere uma capacidade limitada para a síntese sob demanda (Patel and Hillard, 2008). Sendo assim, devido a pouca produção de anandamida, a administração de URB597 não seria capaz de exercer sua ação. Esta parece ser a hipótese mais plausível, já que nesses casos, nem a densidade de receptores, nem a hidrólise do 2-AG parecem estar diminuídas (Patel and Hillard, 2008; Rademacher et al., 2008).

Reforçando a hipótese da participação do 2-AG em comportamentos defensivos mediados pelo hipotálamo, animais submetidos a episódios únicos de stress de restrição por 30 minutos não tiveram alteração nos níveis de 2-AG em regiões como o córtex pré-frontal e amígdala, mas houve um importante decréscimo no hipotálamo. De maneira oposta, quando os animais são submetidos ao stress crônico, esses níveis tendem a se elevar (Patel et al., 2004; Patel et al., 2005). A administração de URB602 também promoveu efeito tipo-ansiolítico no LCE, atenuou comportamentos ansiogênicos, de hiperlocomoção, elevação da temperatura corporal e reverteu o

comportamento de ansiedade induzido pelo stresse (Busquets-Garcia et al., 2011; Sumislowski et al., 2011; Aliczki et al., 2012; Almeida-Santos et al., 2013b).

Corroborando a hipótese da participação do 2-AG em reações aversivas, Hohmann e colaboradores observaram que animais submetidos a estímulos estressores apresentam uma elevação nos níveis desse endocanabinoide (Hohmann et al., 2005), bem como uma elevação nas enzimas responsáveis por sua síntese (Gregg et al., 2012). Sendo assim, durante situações aversivas, a sinalização do 2-AG parece ser estimulada no intuito de inibir as respostas defensivas. Ainda nesse contexto, Gregg e colaboradores demonstraram que a aplicação do estímulo aversivo (choque nas patas de ratos) desencadeou a rápida formação da enzima responsável pela síntese de 2-AG (DAGL- α) na SCPdl, efeito revertido pela injeção local de um inibidor seletivo da DAGL- α (Gregg et al., 2012).

Estudos anteriores de nosso grupo demonstraram que a administração tanto de 2-AG quanto de URB602 na SCPdl foi capaz de bloquear a fuga induzida por NMDA, quando administrado nesta estrutura. Tal efeito foi revertido pela administração do antagonista CB₁, AM251. O NMDA promoveu ainda uma elevação no número de células fos-positivas, efeito que foi revertido pelo pré-tratamento com URB602. (Gobira et al., 2016). Em conjunto, esses dados suportam a hipótese de que a facilitação da sinalização do 2-AG pode inibir respostas aversivas, incluindo comportamentos que são correlatos de ataque de pânico em humanos, como a estimulação química por NMDA.

No presente trabalho, os efeitos do URB602 foram revertidos pelo pré-tratamento com AM251 e AM630, demonstrando que 2-AG parece mediar respostas tanto por receptores CB₁ quanto CB₂. Esses dados corroboram os achados de Almeida-Santos e colaboradores, onde a administração de antagonistas de ambos receptores foi capaz de reverter os efeitos ansiolíticos do 2-AG no modelo do LCE (Almeida-Santos et al., 2013b). Ainda nesse sentido, a administração de URB602 induziu efeito tipo-ansiolítico através dos receptores CB₁ em animais submetidos ao modelo animal do Marble burying, caracterizado pelo comportamento repetitivo e compulsivo inerente aos transtornos de ansiedade (Kinsey et al., 2011b). Além do URB602, outro inibidor da hidrólise do 2-AG, o JZL-184 também induziu efeitos ansiolíticos mediados por receptores CB₁ e CB₂ (Busquets-Garcia et al., 2011; Kinsey et al., 2011a; Sciolino et al., 2011; Aliczki et al., 2012).

A possível participação de receptores CB₂ nas respostas aversivas merece particular atenção. Isso se deve ao fato de que os primeiros estudos relativos à descoberta desses receptores demonstraram que enquanto CB₁ estaria presente em regiões do SNC relacionadas ao comportamento defensivo (Devane et al., 1988; Herkenham et al., 1990; Herkenham et al., 1991), CB₂ se localizaria em células do sistema imune (Munro et al., 1993). Todavia, estudos recentes indicam que receptores CB₂ são também expressos em neurônios e glia, onde também poderiam modular comportamentos defensivos (Van Sickle et al., 2005; Fernandez-Ruiz et al., 2007; Ortega-Alvaro et al., 2011; Onaivi et al., 2012). Além disso, animais que super expressam receptores CB₂ apresentam uma menor susceptibilidade ao comportamento tipo-ansioso (Garcia-Gutierrez and Manzanares, 2011). Outro

indício é o de que camundongos que receberam injeção sistêmica de JZL-184 apresentaram efeitos ansiolíticos mediados apenas por receptores CB₂, e não CB₁ (Busquets-Garcia et al., 2011). Em conjunto, esses dados reforçam a hipótese de que o 2-AG pode modular respostas aversivas por meio dos receptores CB₂.

No presente estudo, a fim de testar a ativação tônica dos receptores canabinoides, administrou-se uma dose inefetiva de NMDA, precedida do antagonista CB₁ AM251. Não se observou qualquer indução no número de cruzamentos e pulos nos animais testados. Este dado difere de resultados anteriores encontrados por nosso grupo, onde o tratamento combinado com antagonista levou a indução de fuga explosiva por uma dose de NMDA que por si só não promovia efeito (Viana et al., 2015). Mais uma vez, esse resultado reforça diferenças entre as fugas induzidas por HDM e SCPdl, destacando o baixo limiar de excitabilidade desta última.

Além dos efeitos comportamentais já descritos acima, o sistema endocanabinoide parece modular também respostas cardiovasculares e neuroendócrinas (Patel et al., 2004; Resstel et al., 2006; Patel and Hillard, 2008; Resstel et al., 2008; Resstel et al., 2009; Hill and McEwen, 2010; Hill et al., 2010b; Hill et al., 2010a; Hill and Tasker, 2012). Diversos trabalhos já demonstraram que a administração central de NMDA promove um aumento na pressão arterial média, acompanhado por uma bradicardia reflexa (Resstel and Correa, 2006; Viana et al., 2015). Em contrapartida a facilitação da neurotransmissão canabinoide reduz os parâmetros cardiovasculares induzidos pela estimulação química de áreas envolvidas em respostas aversivas (Viana et al., 2015). Neste trabalho, 2-AG bloqueou não só a

resposta comportamental, mas também a resposta cardiovascular. Cabe ressaltar que tal efeito ocorreu em uma dose bastante superior àquela utilizada para reduzir o comportamento aversivo.

Nossos resultados estão em acordo com a proposta de que o HDM constitui uma área integrativa das vias centrais mediadoras da resposta cardiovascular e comportamental ao estresse (Shekhar, 1993; Shekhar et al., 1996; Stotz-Potter et al., 1996a; DiMicco et al., 1996; DiMicco et al., 2002b). A elevação nos parâmetros de PAM e FC em consequência da estimulação do HDM parece, todavia, depender de outras estruturas como a SCP (de Menezes et al., 2009). Menezes e colaboradores demonstraram que o pré-tratamento das porções l/dl da SCP com antagonistas glutamatérgicos é capaz de reduzir a taquicardia e os efeitos pressores da estimulação do HDM por Bicuculina. (da Silva et al., 2006). De modo similar, experimentos realizados pelo mesmo grupo demonstraram que injeções de muscimol no HDM são capazes de abolir a elevação da FC, PAM e temperatura corporal induzida por injeções de NMDA na SCPI/dl. Em contraste, injeções de muscimol no PVN não reduziram as alterações provocadas a partir da estimulação da SCP, reforçando a hipótese de que as resposta autonômicas evocadas pela SCP requerem atividade neuronal do HDM e que o oposto também seria verdadeiro (de Menezes et al., 2009).

Sendo assim, as respostas simpáticas decorrentes da ativação de neurônios do HDM parecem estar integradas em diferentes relés sinápticos. O componente vasomotor parece ser dependente do bulbo rostroventrolateral (Fontes et al., 2001; Horiuchi et al., 2004), enquanto os componentes

cardíacos são dependentes de neurônios da rafe (DiMicco et al., 2002a; Samuels et al., 2002; Cao et al., 2004; Horiuchi et al., 2004)

Baseado em estudos anatômicos e funcionais, propõe-se que as vias descendentes capazes de mediar respostas aversivas no HDM são primeiramente integradas na porção dorsolateral da SCP, as quais podem se distribuir em componentes vasomotores e cardíacos para o bulbo e a rafe, respectivamente. Existem ainda estudos que propõem uma subpopulação específica de neurônios que se projetam para a *Rafe pallidus*, chamada Área Hipotalâmica Dorsal. Nessa região, a injeção de aminoácidos excitatórios poderia evocar o maior aumento de frequência cardíaca (Samuels et al., 2002). Este núcleo localiza-se dorsalmente ao HDM, sugerindo uma possível via que parte do HDM para a *Rafe pallidus*, envolvida no tônus simpático cardíaco (Samuels et al., 2004). Adicionalmente, o presente estudo corrobora estudos anteriores que demonstram que a estimulação química do HDM por NMDA promove um padrão de resposta pressora semelhante à estimulação da SCPdl, acompanhado de aumento de atividade locomotora e reações de fuga, reforçando a hipótese de que essas regiões estão interconectadas por uma via excitatória glutamatérgica e destacando o papel do HDM em respostas defensivas. (Carrive et al., 1989; Carrive, 1993; da Silva et al., 2003; Viana et al., 2015),

Mais recentemente, o HDM vem sendo estudado como um importante núcleo envolvido na circuitaria do pânico, uma vez que a inibição Gabaérgica crônica dessa região leva a reações tipo-panicogênicas em animais experimentais (Shekhar et al., 1996). Essa inibição mimetiza as alterações observadas em ataques de pânico em humanos: taquicardia, aumento de

pressão arterial, taquipnéia e aumento da liberação de hormônios relacionados ao stress no plasma (catecolaminas, ACTH e corticosterona) (Gorman et al., 1986b; Gorman et al., 1986a; Liebowitz et al., 1986a; Liebowitz et al., 1986c; Liebowitz et al., 1986b; Keim and Shekhar, 1996; Stotz-Potter et al., 1996b). Tais respostas induzidas pelo bloqueio Gabaérgico crônico no HDM parecem ser sítio-específicas, uma vez que a ativação de regiões como o hipotálamo lateral não evocam tais reações (DiMicco et al., 2002a).

Embora as reações tipo-panicogênicas observadas pela estimulação do HDM promovam ativação neuroendócrina (Keim and Shekhar, 1996; Stotz-Potter et al., 1996b), existe uma grande controvérsia acerca do fato de ataque de pânico ativar ou não o eixo HPA. No presente trabalho, não se observou um aumento nos níveis de corticosterona em animais que foram tratados com NMDA. Ainda nesse sentido, não houve aumento da expressão de c-Fos no PVN, outro indicativo de que em nosso modelo, não houve ativação do eixo.

Tais dados corroboram a hipótese de Graeff e colaboradores, em que modelos de ataques de pânico mais espontâneos, como aqueles induzidos pela administração de CO₂ e Lactato não ativam o eixo HPA (Graeff et al., 2005). Já modelos que utilizam os agonistas do receptor de colecistocinina do tipo B, aumentam os hormônios do estresse, independentemente da ocorrência de ataques de pânico, e, dessa forma, parecem ativar diretamente o eixo HPA (Graeff et al., 2005). Em contrapartida, estudos realizados por Lim e colaboradores demonstraram que a estimulação elétrica da SCPdl foi capaz de induzir a liberação de corticosterona em ratos, efeito que foi revertido pelo tratamento com escitalopram (Lim et al., 2010). Em humanos, a presença de

cortisol foi detectada na saliva de pacientes que sofreram ataque de pânico (Bandelow et al., 2000) e em pacientes saudáveis que inalaram CO₂ a 35% (Argyropoulos et al., 2002; Kaye et al., 2004).

Embora ataques de pânico possam ser considerados como estressores de magnitude elevada (McNally and Lukach, 1992), onde poderia se esperar uma liberação de ACTH e cortisol, isso parece não ocorrer, uma vez que em pacientes adultos com transtorno de pânico a responsividade do eixo a fatores estressores é baixa (Battaglia, 1997; Stones, 1999; Schreiber, 1996). Uma possível explicação seria a de que após exposições repetidas aos ataques, o eixo se torna progressivamente sub-sensibilizado (van Duinen, 1996; Coplan, 1995).

Nosso trabalho demonstrou uma elevação no número de células c-Fos positivas nos núcleos dorsomedial e ventromedial do hipotálamo, bem como nas porções dorsomedial e dorsolateral da SCP. Este padrão de expressão está de acordo com trabalhos anteriores que demonstram conexões do HDM para a SCP (Fontes et al., 2001; de Menezes et al., 2009; Carrive et al., 1989; Carrive, 1993; da Silva et al., 2003;). Embora o HDM envie projeções para a porção parvocelular do PVN (responsável pela liberação de corticotropina) e esse, por sua vez, envie projeções para o tronco cerebral e medular (responsáveis pelas respostas autonômicas) (Thompson et al., 1996), como já discutido anteriormente, a ausência de expressão no núcleo paraventricular reflete, provavelmente, a não ativação do eixo HPA.

Quanto ao HVM, particularmente sua porção dorsomedial (dmHVM), este núcleo constitui, juntamente com o Hipotálamo anterior e o Núcleo pré-mamilar dorsal, o Sistema hipotalâmico de defesa e encontra-se ativado

quando animais são expostos ao predador ou ao seu odor (Canteras et al., 1997; Dielemborg et al., 2001). O dmHVM parece integrar informações provenientes da amígdala, relevantes para a percepção de um predador (Canteras and Swanson, 1992; Canteras et al., 1994; Risold et al., 1994; Canteras et al., 2001;). De fato, ele envia extensas projeções para a SCPdl (Canteras and Swanson, 1992; Canteras et al., 1994) e também para o HDM (Canteras and Swanson, 1992; Canteras et al., 1994; Risold et al., 1994; Thompson and Swanson, 1998), justificando assim o aumento na ativação celular nessas estruturas.

Ainda nesse sentido, nossos resultados demonstraram que os neurônios ativados na SCPdl, no HDM e no HVM também expressaram, em maior quantidade, a enzima responsável pela síntese de 2-AG. Esses dados corroboram trabalhos anteriores nos quais eventos aversivos elevaram a síntese de DAGL e 2-AG na SCP. Adicionalmente, a inibição da DAGL diminuiu a formação de 2-AG sem alterar os níveis de anandamida (Gregg, Jung et al. 2012). O papel da DAGL e conseqüentemente dos efeitos mediados pelo 2-AG no comportamento relacionado à ansiedade foi demonstrado também nos estudos realizados por Shonesy e colaboradores, em que camundongos nocaute para a enzima DAGL- α apresentaram comportamento tipo-ansiosgênico nos testes da caixa claro-escuro e no campo aberto (Shonesy, Bluett et al. 2014).

Além disso, um aumento na expressão de DAGL relaciona-se também com um aumento na produção de 2-AG (Jung et al. 2007). De modo contrário, animais nocaute para DGL tiveram liberação de endocanabinoides afetada no hipocampo, cerebelo e estriado, resultando em supressão das ações

retrógradas e temperatura corporal reduzida (Won et al., 2009). Em conjunto, esses dados sugerem que DAGL e conseqüentemente o 2-AG são necessários para a sinalização endocanabinoide (Gao et al., 2010 ; Tanimura, 2010).

Em suma, esse trabalho dá suporte à hipótese de que o sistema endocanabinoide modula os componentes comportamentais e cardiovasculares de respostas aversivas no HDM. O mecanismo envolvido nessa resposta possivelmente consiste na produção de 2-AG e ativação receptores CB₁ e CB₂, cuja ativação ocasionaria inibição dos canais para Ca²⁺ e abertura dos canais para K⁺. Isso resultaria na hiperpolarização neuronal com conseqüente diminuição da liberação do glutamato por neurônios responsáveis pela elaboração de respostas aversivas (Vaughan, Connor et al. 2000; Gerdeman and Lovinger 2001; Huang, Lo et al. 2001; Wang 2003).

Conclusão:

Em conclusão, o presente trabalho demonstrou que a facilitação da sinalização do 2-AG no HDM induz efeitos antiaversivos em ratos submetidos à estimulação química do HDM por NMDA. Esse estudo demonstrou ainda que esses efeitos são mediados pela ativação dos receptores CB₁ e CB₂, possivelmente envolvendo regiões mesencefálicas como a SCPdl.

Em conjunto, esses dados apoiam a hipótese de que a modulação do sistema endocanabinoide no HDM é importante para as reações aversivas, e sugerem que drogas que interferem com o sistema endocanabinoide constituem uma possível estratégia terapêutica para transtornos de ansiedade e pânico.

Referências:

- Aliczki M, Balogh Z, Tulogdi A, Haller J (2012) The temporal dynamics of the effects of monoacylglycerol lipase blockade on locomotion, anxiety, and body temperature. *Behav Pharmacol* 23:348-357.
- Almeida-Santos AF, Moreira FA, Guimaraes FS, Aguiar DC (2013a) Role of TRPV1 receptors on panic-like behaviors mediated by the dorsolateral periaqueductal gray in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 105:166-172.
- Almeida-Santos AF, Gobira PH, Rosa LC, Guimaraes FS, Moreira FA, Aguiar DC (2013b) Modulation of anxiety-like behavior by the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol (2-AG) in the dorsolateral periaqueductal gray. *Behav Brain Res* 252:10-17.
- Apfelbach R, Blanchard CD, Blanchard RJ, Hayes RA, McGregor IS (2005) The effects of predator odors in mammalian prey species: a review of field and laboratory studies. *Neurosci Biobehav Rev* 29:1123-1144.
- Atkinson HC, Leggett JD, Wood SA, Castrique ES, Kershaw YM, Lightman SL (2010) Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis circadian rhythm by endocannabinoids is sexually diergic. *Endocrinology* 151:3720-3727.
- Bailey TW, Dimicco JA (2001) Chemical stimulation of the dorsomedial hypothalamus elevates plasma ACTH in conscious rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 280:R8-15.
- Bandler R, Carrive P (1988) Integrated defense reaction elicited by excitatory amino acid microinjection in the midbrain periaqueductal grey region of the unrestrained cat. *Brain Res* 439:95-106.
- Bandler R, Keay KA (1996) Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray and the integration of emotional expression. *Prog Brain Res* 107:285-300.
- Bandler R, Carrive P, Zhang SP (1991) Integration of somatic and autonomic reactions within the midbrain periaqueductal grey: viscerotopic, somatotopic and functional organization. *Prog Brain Res* 87:269-305.
- Bandler R, Price JL, Keay KA (2000a) Brain mediation of active and passive emotional coping. *Prog Brain Res* 122:333-349.
- Bandler R, Keay KA, Floyd N, Price J (2000b) Central circuits mediating patterned autonomic activity during active vs. passive emotional coping. *Brain Res Bull* 53:95-104.
- Bard P (1928) A diencephalic mechanism for the expression of rage with special reference to the sympathetic nervous system. *Am J Physiol* 84:490-515.
- Barna I, Zelena D, Arszovszki AC, Ledent C (2004) The role of endogenous cannabinoids in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis regulation: in vivo and in vitro studies in CB₁ receptor knockout mice. *Life Sci* 75:2959-2970.
- Batista LA, Bastos JR, Moreira FA (2015) Role of endocannabinoid signalling in the dorsolateral periaqueductal grey in the modulation of distinct panic-like responses. *J Psychopharmacol* 29:335-343.
- Batista LA, Gobira PH, Viana TG, Aguiar DC, Moreira FA (2014) Inhibition of endocannabinoid neuronal uptake and hydrolysis as strategies for developing anxiolytic drugs. *Behav Pharmacol* 25:425-433.
- Beckett SR, Duxon MS, Aspley S, Marsden CA (1997) Central c-fos expression following 20kHz/ultrasound induced defence behaviour in the rat. *Brain Res Bull* 42:421-426.
- Beijamini V, Guimaraes FS (2006) c-Fos expression increase in NADPH-diaphorase positive neurons after exposure to a live cat. *Behav Brain Res* 170:52-61.
- Bergink V, van Megen HJ, Westenberg HG (2004) Glutamate and anxiety. *Eur Neuropsychopharmacol* 14:175-183.
- Berrendero F, Maldonado R (2002) Involvement of the opioid system in the anxiolytic-like effects induced by Delta(9)-tetrahydrocannabinol. *Psychopharmacology (Berl)* 163:111-117.

- Biagioni AF, Silva JA, Coimbra NC (2012) Panic-like defensive behavior but not fear-induced antinociception is differently organized by dorsomedial and posterior hypothalamic nuclei of *Rattus norvegicus* (Rodentia, Muridae). *Braz J Med Biol Res* 45:328-336.
- Biagioni AF, de Freitas RL, da Silva JA, de Oliveira RC, de Oliveira R, Alves VM, Coimbra NC (2013) Serotonergic neural links from the dorsal raphe nucleus modulate defensive behaviours organised by the dorsomedial hypothalamus and the elaboration of fear-induced antinociception via locus coeruleus pathways. *Neuropharmacology* 67:379-394.
- Blanchard C, Blanchard R, Fellous JM, Guimaraes FS, Irwin W, Ledoux JE, McGaugh JL, Rosen JB, Schenberg LC, Volchan E, Da Cunha C (2001a) The brain decade in debate: III. Neurobiology of emotion. *Braz J Med Biol Res* 34:283-293.
- BLANCHARD DC, BLANCHARD RJ (1984) Affect and aggression: an animal model applied to human behavior. In *Advances in the Study of Aggression* 1 1-58.
- Blanchard DC, Blanchard RJ (1988) Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. *Annu Rev Psychol* 39:43-68.
- Blanchard DC, Griebel G, Blanchard RJ (2001b) Mouse defensive behaviors: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. *Neurosci Biobehav Rev* 25:205-218.
- Blanchard DC, Griebel G, Blanchard RJ (2003) The Mouse Defense Test Battery: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. *Eur J Pharmacol* 463:97-116.
- Blanchard RJ, Blanchard DC (1989) Attack and defense in rodents as ethoexperimental models for the study of emotion. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 13 Suppl:S3-14.
- Blanchard RJ, Blanchard DC (1990) An ethoexperimental analysis of defense, fear, and anxiety. In: McNaughton, N & Andrews, G (eds) *Anxiety*. University of Otago Press: Dunedin,:124-133.
- Blanchard RJ, Griebel G, Henrie JA, Blanchard DC (1997) Differentiation of anxiolytic and panicolytic drugs by effects on rat and mouse defense test batteries. *Neurosci Biobehav Rev* 21:783-789.
- Bortolato M, Campolongo P, Mangieri RA, Scattoni ML, Frau R, Trezza V, La Rana G, Russo R, Calignano A, Gessa GL, Cuomo V, Piomelli D (2006) Anxiolytic-like properties of the anandamide transport inhibitor AM404. *Neuropsychopharmacology* 31:2652-2659.
- Boudaba C, Schrader LA, Tasker JG (1997) Physiological evidence for local excitatory synaptic circuits in the rat hypothalamus. *J Neurophysiol* 77:3396-3400.
- Brandao ML, Di Scala G, Bouchet MJ, Schmitt P (1986) Escape behavior produced by the blockade of glutamic acid decarboxylase (GAD) in mesencephalic central gray or medial hypothalamus. *Pharmacol Biochem Behav* 24:497-501.
- Brandao ML, Anseloni VZ, Pandossio JE, De Araujo JE, Castilho VM (1999) Neurochemical mechanisms of the defensive behavior in the dorsal midbrain. *Neurosci Biobehav Rev* 23:863-875.
- Busquets-Garcia A, Puighermanal E, Pastor A, de la Torre R, Maldonado R, Ozaita A (2011) Differential role of anandamide and 2-arachidonoylglycerol in memory and anxiety-like responses. *Biol Psychiatry* 70:479-486.
- Campos AC, Moreira FA, Gomes FV, Del Bel EA, Guimaraes FS (2012) Multiple mechanisms involved in the large-spectrum therapeutic potential of cannabidiol in psychiatric disorders. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 367:3364-3378.
- Canteras NS (2002) The medial hypothalamic defensive system: hodological organization and functional implications. *Pharmacol Biochem Behav* 71:481-491.
- Canteras NS (2003) [Critical analysis of the neural systems organizing innate fear responses]. *Rev Bras Psiquiatr* 25 Suppl 2:21-24.
- Canteras NS, Swanson LW (1992) The dorsal preamillary nucleus: an unusual component of the mammillary body. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:10089-10093.

- Canteras NS, Goto M (1999) Fos-like immunoreactivity in the periaqueductal gray of rats exposed to a natural predator. *Neuroreport* 10:413-418.
- Canteras NS, Graeff FG (2014) Executive and modulatory neural circuits of defensive reactions: implications for panic disorder. *Neurosci Biobehav Rev* 46 Pt 3:352-364.
- Canteras NS, Simerly RB, Swanson LW (1992) Projections of the ventral premammillary nucleus. *J Comp Neurol* 324:195-212.
- Canteras NS, Ribeiro-Barbosa ER, Comoli E (2001) Tracing from the dorsal premammillary nucleus prosencephalic systems involved in the organization of innate fear responses. *Neurosci Biobehav Rev* 25:661-668.
- Canteras NS, Chiavegatto S, Ribeiro do Valle LE, Swanson LW (1997) Severe reduction of rat defensive behavior to a predator by discrete hypothalamic chemical lesions. *Brain Res Bull* 44:297-305.
- Cao WH, Fan W, Morrison SF (2004) Medullary pathways mediating specific sympathetic responses to activation of dorsomedial hypothalamus. *Neuroscience* 126:229-240.
- Carobrez AP (2003) [Glutamatergic neurotransmission as molecular target in anxiety]. *Rev Bras Psiquiatr* 25 Suppl 2:52-58.
- Carrive P (1993) The periaqueductal gray and defensive behavior: functional representation and neuronal organization. *Behav Brain Res* 58:27-47.
- Carrive P, Bandler R, Dampney RA (1989) Somatic and autonomic integration in the midbrain of the unanesthetized decerebrate cat: a distinctive pattern evoked by excitation of neurones in the subtentorial portion of the midbrain periaqueductal grey. *Brain Res* 483:251-258.
- Casarotto PC, Terzian AL, Aguiar DC, Zangrossi H, Guimaraes FS, Wotjak CT, Moreira FA (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* 37:478-486.
- Cassano T, Gaetani S, Macheda T, Laconca L, Romano A, Morgese MG, Cimmino CS, Chiarotti F, Bambico FR, Gobbi G, Cuomo V, Piomelli D (2011) Evaluation of the emotional phenotype and serotonergic neurotransmission of fatty acid amide hydrolase-deficient mice. *Psychopharmacology (Berl)* 214:465-476.
- Chanda PK, Gao Y, Mark L, Btsh J, Strassle BW, Lu P, Piesla MJ, Zhang MY, Bingham B, Uveges A, Kowal D, Garbe D, Kouranova EV, Ring RH, Bates B, Pangalos MN, Kennedy JD, Whiteside GT, Samad TA (2010) Monoacylglycerol lipase activity is a critical modulator of the tone and integrity of the endocannabinoid system. *Molecular pharmacology* 78:996-1003.
- Chaudhuri A (1997) Neural activity mapping with inducible transcription factors. *Neuroreport* 8:iii-vii.
- Coimbra NC, Tomaz C, Brandao ML (1992) Evidence for the involvement of serotonin in the antinociception induced by electrical or chemical stimulation of the mesencephalic tectum. *Behav Brain Res* 50:77-83.
- Coimbra NC, Eichenberger GC, Gorchinski RT, Maisonnnette S (1996) Effects of the blockade of opioid receptor on defensive reactions elicited by electrical stimulation within the deep layers of the superior colliculus and DPAG. *Brain Res* 736:348-352.
- Coimbra NC, De Oliveira R, Freitas RL, Ribeiro SJ, Borelli KG, Pacagnella RC, Moreira JE, da Silva LA, Melo LL, Lunardi LO, Brandao ML (2006) Neuroanatomical approaches of the tectum-reticular pathways and immunohistochemical evidence for serotonin-positive perikarya on neuronal substrates of the superior colliculus and periaqueductal gray matter involved in the elaboration of the defensive behavior and fear-induced analgesia. *Exp Neurol* 197:93-112.
- Cota D, Steiner MA, Marsicano G, Cervino C, Herman JP, Grubler Y, Stalla J, Pasquali R, Lutz B, Stalla GK, Pagotto U (2007) Requirement of cannabinoid receptor type 1 for the basal

- modulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis function. *Endocrinology* 148:1574-1581.
- Cota D, Marsicano G, Tschop M, Grubler Y, Flachskamm C, Schubert M, Auer D, Yassouridis A, Thone-Reineke C, Ortman S, Tomassoni F, Cervino C, Nisoli E, Linthorst AC, Pasquali R, Lutz B, Stalla GK, Pagotto U (2003) The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. *J Clin Invest* 112:423-431.
- Crosby KM, Bains JS (2012) The intricate link between glucocorticoids and endocannabinoids at stress-relevant synapses in the hypothalamus. *Neuroscience* 204:31-37.
- Cullinan WE, Helmreich DL, Watson SJ (1996) Fos expression in forebrain afferents to the hypothalamic paraventricular nucleus following swim stress. *J Comp Neurol* 368:88-99.
- Cullinan WE, Herman JP, Battaglia DF, Akil H, Watson SJ (1995) Pattern and time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress. *Neuroscience* 64:477-505.
- Curran HV, Brignell C, Fletcher S, Middleton P, Henry J (2002) Cognitive and subjective dose-response effects of acute oral Delta 9-tetrahydrocannabinol (THC) in infrequent cannabis users. *Psychopharmacology (Berl)* 164:61-70.
- da Silva LG, de Menezes RC, dos Santos RA, Campagnole-Santos MJ, Fontes MA (2003) Role of periaqueductal gray on the cardiovascular response evoked by disinhibition of the dorsomedial hypothalamus. *Brain Res* 984:206-214.
- da Silva LG, Jr., Menezes RC, Villela DC, Fontes MA (2006) Excitatory amino acid receptors in the periaqueductal gray mediate the cardiovascular response evoked by activation of dorsomedial hypothalamic neurons. *Neuroscience* 139:1129-1139.
- Davis M (1992a) The role of the amygdala in fear-potentiated startle: implications for animal models of anxiety. *Trends Pharmacol Sci* 13:35-41.
- Davis M (1992b) The role of the amygdala in fear and anxiety. *Annu Rev Neurosci* 15:353-375.
- Davis M (1998) Anatomic and physiologic substrates of emotion in an animal model. *J Clin Neurophysiol* 15:378-387.
- de Menezes RC, Zaretsky DV, Fontes MA, DiMicco JA (2009) Cardiovascular and thermal responses evoked from the periaqueductal grey require neuronal activity in the hypothalamus. *J Physiol* 587:1201-1215.
- De Novellis V, Stotz-Potter EH, Morin SM, Rossi F, DiMicco JA (1995) Hypothalamic sites mediating cardiovascular effects of microinjected bicuculline and EAAs in rats. *Am J Physiol* 269:R131-140.
- De Petrocellis L, Cascio MG, Di Marzo V (2004) The endocannabinoid system: a general view and latest additions. *British journal of pharmacology* 141:765-774.
- Deakin JFW, Graeff FG (1991) 5-HT and mechanisms of defence. *Journal Psychopharmacology* 5:305-315.
- Devane WA, Dysarz FA, 3rd, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC (1988) Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol* 34:605-613.
- Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R (1992) Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 258:1946-1949.
- Di Marzo V, Bifulco M, De Petrocellis L (2004) The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat Rev Drug Discov* 3:771-784.
- Di Marzo V, Melck D, Bisogno T, De Petrocellis L (1998) Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. *Trends Neurosci* 21:521-528.

- Di S, Malcher-Lopes R, Halmos KC, Tasker JG (2003) Nongenomic glucocorticoid inhibition via endocannabinoid release in the hypothalamus: a fast feedback mechanism. *J Neurosci* 23:4850-4857.
- Di Scala G, Schmitt P, Karli P (1984) Flight induced by infusion of bicuculline methiodide into periventricular structures. *Brain Res* 309:199-208.
- Dielenberg RA, Hunt GE, McGregor IS (2001) "When a rat smells a cat": the distribution of Fos immunoreactivity in rat brain following exposure to a predatory odor. *Neuroscience* 104:1085-1097.
- Dielenberg RA, Leman S, Carrive P (2004) Effect of dorsal periaqueductal gray lesions on cardiovascular and behavioral responses to cat odor exposure in rats. *Behav Brain Res* 153:487-496.
- DiMicco JA, Abshire VM (1987) Evidence for GABAergic inhibition of a hypothalamic sympathoexcitatory mechanism in anesthetized rats. *Brain Res* 402:1-10.
- DiMicco JA, Stotz-Potter EH, Monroe AJ, Morin SM (1996) Role of the dorsomedial hypothalamus in the cardiovascular response to stress. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 23:171-176.
- DiMicco JA, Samuels BC, Zaretskaia MV, Zaretsky DV (2002a) The dorsomedial hypothalamus and the response to stress: part renaissance, part revolution. *Pharmacol Biochem Behav* 71:469-480.
- DiMicco JA, Samuels BC, Zaretskaia MV, Zaretsky DV (2002b) The dorsomedial hypothalamus and the response to stress: part renaissance, part revolution. *Pharmacol Biochem Behav* 71:469-480.
- DiMicco JA, Abshire VM, Hankins KD, Sample RH, Wible JH, Jr. (1986) Microinjection of GABA antagonists into posterior hypothalamus elevates heart rate in anesthetized rats. *Neuropharmacology* 25:1063-1066.
- Dinh TP, Freund TF, Piomelli D (2002) A role for monoglyceride lipase in 2-arachidonoylglycerol inactivation. *Chemistry and physics of lipids* 121:149-158.
- Doyon C, Denis RG, Baraboi ED, Samson P, Lalonde J, Deshaies Y, Richard D (2006) Effects of rimonabant (SR141716) on fasting-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis and neuronal activation in lean and obese Zucker rats. *Diabetes* 55:3403-3410.
- Drolet G, Beaulieu J, Mansi JA, Champagne D, Laforest S (1995) [Relationship between exposure to stress and development of hypertension]. *Ann Endocrinol (Paris)* 56:187-191.
- Duncan GE, Knapp DJ, Breese GR (1996) Neuroanatomical characterization of Fos induction in rat behavioral models of anxiety. *Brain Res* 713:79-91.
- Edwards MA, Adams DB (1974) Role of midbrain central gray in pain-induced defensive boxing of rats. *Physiol Behav* 13:113-121.
- Engelmann M, Thirvikraman KV, Su Y, Nemeroff CB, Montkowski A, Landgraf R, Holsboer F, Plotsky PM (1996) Endocrine and behavioral effects of airpuff-startle in rats. *Psychoneuroendocrinology* 21:391-400.
- Evanson NK, Tasker JG, Hill MN, Hillard CJ, Herman JP (2010) Fast feedback inhibition of the HPA axis by glucocorticoids is mediated by endocannabinoid signaling. *Endocrinology* 151:4811-4819.
- Eyigor O, Centers A, Jennes L (2001) Distribution of ionotropic glutamate receptor subunit mRNAs in the rat hypothalamus. *J Comp Neurol* 434:101-124.
- Fernandez-Ruiz J, Romero J, Velasco G, Tolon RM, Ramos JA, Guzman M (2007) Cannabinoid CB₂ receptor: a new target for controlling neural cell survival? *Trends Pharmacol Sci* 28:39-45.
- Fernandez De Molina A, Hunsperger RW (1959) Central representation of affective reactions in forebrain and brain stem: electrical stimulation of amygdala, stria terminalis, and adjacent structures. *J Physiol* 145:251-265.

- Fernandez De Molina A, Hunsperger RW (1962) Organization of the subcortical system governing defence and flight reactions in the cat. *J Physiol* 160:200-213.
- File SE, Gonzalez LE, Gallant R (1999) Role of the dorsomedial hypothalamus in mediating the response to benzodiazepines on trial 2 in the elevated plus-maze test of anxiety. *Neuropsychopharmacology* 21:312-320.
- Finn DP, Jhaveri MD, Beckett SR, Roe CH, Kendall DA, Marsden CA, Chapman V (2003) Effects of direct periaqueductal grey administration of a cannabinoid receptor agonist on nociceptive and aversive responses in rats. *Neuropharmacology* 45:594-604.
- Fogaca MV, Aguiar DC, Moreira FA, Guimaraes FS (2012) The endocannabinoid and endovanilloid systems interact in the rat prelimbic medial prefrontal cortex to control anxiety-like behavior. *Neuropharmacology* 63:202-210.
- Fontes MA, Tagawa T, Polson JW, Cavanagh SJ, Dampney RA (2001) Descending pathways mediating cardiovascular response from dorsomedial hypothalamic nucleus. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280:H2891-2901.
- Gao Y et al. (2010) Loss of retrograde endocannabinoid signaling and reduced adult neurogenesis in diacylglycerol lipase knock-out mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30:2017-2024.
- Garcia-Gutierrez MS, Manzanares J (2011) Overexpression of CB₂ cannabinoid receptors decreased vulnerability to anxiety and impaired anxiolytic action of alprazolam in mice. *J Psychopharmacol* 25:111-120.
- Gobira PH, Aguiar DC, Moreira FA (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* 110:33-39.
- Gobira PH, Almeida-Santos AF, Guimaraes FS, Moreira FA, Aguiar DC (2016) Role of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol in aversive responses mediated by the dorsolateral periaqueductal grey. *Eur Neuropsychopharmacol* 26:15-22.
- Gorman JM, Liebowitz MR, Fyer AJ, Fyer MR, Klein DF (1986a) Possible respiratory abnormalities in panic disorder. *Psychopharmacol Bull* 22:797-801.
- Gorman JM, Cohen BS, Liebowitz MR, Fyer AJ, Ross D, Davies SO, Klein DF (1986b) Blood gas changes and hypophosphatemia in lactate-induced panic. *Arch Gen Psychiatry* 43:1067-1071.
- Gorzalka BB, Hill MN (2009) Integration of endocannabinoid signaling into the neural network regulating stress-induced activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Curr Top Behav Neurosci* 1:289-306.
- Graeff FG (1994) Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviors and related emotions in mammals. *Braz J Med Biol Res* 27:811-829.
- Graeff FG (2004) Serotonin, the periaqueductal gray and panic. *Neurosci Biobehav Rev* 28:239-259.
- Graeff FG, Sant'Ana AB, Vilela-Costa HH, Zangrossi H, Jr. (2015) New Findings on the Neurotransmitter Modulation of Defense in the Dorsal Periaqueductal Gray. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 14:988-995.
- Graeff FG, Silveira MC, Nogueira RL, Audi EA, Oliveira RM (1993) Role of the amygdala and periaqueductal gray in anxiety and panic. *Behav Brain Res* 58:123-131.
- Gregg LC, Jung KM, Spradley JM, Nyilas R, Suplita RL, 2nd, Zimmer A, Watanabe M, Mackie K, Katona I, Piomelli D, Hohmann AG (2012) Activation of type 5 metabotropic glutamate receptors and diacylglycerol lipase- α initiates 2-arachidonoylglycerol formation and endocannabinoid-mediated analgesia. *J Neurosci* 32:9457-9468.
- Griffin G, Fernando SR, Ross RA, McKay NG, Ashford ML, Shire D, Huffman JW, Yu S, Lainton JA, Pertwee RG (1997) Evidence for the presence of CB₂-like cannabinoid receptors on peripheral nerve terminals. *Eur J Pharmacol* 339:53-61.
- Grzeda E, Schlicker E, Luczaj W, Harasim E, Baranowska-Kuczko M, Malinowska B (2015) Bi-directional CB₁ receptor-mediated cardiovascular effects of cannabinoids in

- anaesthetized rats: role of the paraventricular nucleus. *J Physiol Pharmacol* 66:343-353.
- Guimaraes FS, Del Bel EA, Padovan CM, Netto SM, de Almeida RT (1993) Hippocampal 5-HT receptors and consolidation of stressful memories. *Behav Brain Res* 58:133-139.
- Haller J, Barna I, Barsvari B, Gyimesi Pelczer K, Yasar S, Panlilio LV, Goldberg S (2009) Interactions between environmental aversiveness and the anxiolytic effects of enhanced cannabinoid signaling by FAAH inhibition in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 204:607-616.
- Harro J (2006) CCK and NPY as anti-anxiety treatment targets: promises, pitfalls, and strategies. *Amino Acids* 31:215-230.
- 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, Lynn AB, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, Rice KC (1991) Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J Neurosci* 11:563-583.
- Herkenham M, Lynn AB, Little MD, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, Rice KC (1990) Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:1932-1936.
- Hess W.R. BM (1943) Das subkortikake Zenrrumder affektriven Abwehrreaktion. *Helv Physiol Pharmacol Acta* 1:33-52.
- Hess WR, Akert K (1955) Experimental data on role of hypothalamus in mechanism of emotional behavior. *AMA Arch Neurol Psychiatry* 73:127-129.
- Hill MN, McEwen BS (2010) Involvement of the endocannabinoid system in the neurobehavioural effects of stress and glucocorticoids. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 34:791-797.
- Hill MN, Tasker JG (2012) Endocannabinoid signaling, glucocorticoid-mediated negative feedback, and regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Neuroscience* 204:5-16.
- Hill MN, Patel S, Campolongo P, Tasker JG, Wotjak CT, Bains JS (2010a) Functional interactions between stress and the endocannabinoid system: from synaptic signaling to behavioral output. *J Neurosci* 30:14980-14986.
- Hill MN, McLaughlin RJ, Bingham B, Shrestha L, Lee TT, Gray JM, Hillard CJ, Gorzalka BB, Viau V (2010b) Endogenous cannabinoid signaling is essential for stress adaptation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:9406-9411.
- Hilton SM, Redfern WS (1986) A search for brain stem cell groups integrating the defence reaction in the rat. *J Physiol* 378:213-228.
- Hohmann AG, Suplita RL, Bolton NM, Neely MH, Fegley D, Mangieri R, Krey JF, Walker JM, Holmes PV, Crystal JD, Duranti A, Tontini A, Mor M, Tarzia G, Piomelli D (2005) An endocannabinoid mechanism for stress-induced analgesia. *Nature* 435:1108-1112.
- Horiuchi J, McAllen RM, Allen AM, Killinger S, Fontes MA, Dampney RA (2004) Descending vasomotor pathways from the dorsomedial hypothalamic nucleus: role of medullary raphe and RVLM. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287:R824-832.
- Howlett AC (1984) Inhibition of neuroblastoma adenylate cyclase by cannabinoid and nantradol compounds. *Life Sci* 35:1803-1810.
- Howlett AC (2002) The cannabinoid receptors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 68-69:619-631.
- Howlett AC, Bidaut-Russell M, Devane WA, Melvin LS, Johnson MR, Herkenham M (1990) The cannabinoid receptor: biochemical, anatomical and behavioral characterization. *Trends Neurosci* 13:420-423.
- Howlett AC, Breivogel CS, Childers SR, Deadwyler SA, Hampson RE, Porrino LJ (2004) Cannabinoid physiology and pharmacology: 30 years of progress. *Neuropharmacology* 47 Suppl 1:345-358.

- Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, Felder CC, Herkenham M, Mackie K, Martin BR, Mechoulam R, Pertwee RG (2002) International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev* 54:161-202.
- Hughes P, Lawlor P, Dragunow M (1992) Basal expression of Fos, Fos-related, Jun, and Krox 24 proteins in rat hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res* 13:355-357.
- Hunsperger RW (1956a) Role of substantia grisea centralis mesencephali in electrically-induced rage reactions. *Prog Neurobiol*:289-294.
- Hunsperger RW (1956b) [Affective reaction from electric stimulation of brain stem in cats]. *Helv Physiol Pharmacol Acta* 14:70-92.
- Inglefield JR, Schwarzkopf SB, Kellogg CK (1994) Alterations in behavioral responses to stressors following excitotoxin lesions of dorsomedial hypothalamic regions. *Brain Res* 633:151-161.
- Jardim MC, Guimaraes FS (2001) GABAergic and glutamatergic modulation of exploratory behavior in the dorsomedial hypothalamus. *Pharmacol Biochem Behav* 69:579-584.
- Jardim MC, Guimaraes FS (2004) Role of glutamate ionotropic receptors in the dorsomedial hypothalamic nucleus on anxiety and locomotor behavior. *Pharmacol Biochem Behav* 79:541-546.
- Javanmard M, Shlik J, Kennedy SH, Vaccarino FJ, Houle S, Bradwejn J (1999) Neuroanatomic correlates of CCK-4-induced panic attacks in healthy humans: a comparison of two time points. *Biol Psychiatry* 45:872-882.
- Kalueff AV, Nutt DJ (2007) Role of GABA in anxiety and depression. *Depress Anxiety* 24:495-517.
- Kathuria S, Gaetani S, Fegley D, Valino F, Duranti A, Tontini A, Mor M, Tarzia G, La Rana G, Calignano A, Giustino A, Tattoli M, Palmery M, Cuomo V, Piomelli D (2003) Modulation of anxiety through blockade of anandamide hydrolysis. *Nat Med* 9:76-81.
- Keim SR, Shekhar A (1996) The effects of GABAA receptor blockade in the dorsomedial hypothalamic nucleus on corticotrophin (ACTH) and corticosterone secretion in male rats. *Brain Res* 739:46-51.
- Keller-Wood ME, Dallman MF (1984) Corticosteroid inhibition of ACTH secretion. *Endocr Rev* 5:1-24.
- King AR, Duranti A, Tontini A, Rivara S, Rosengarth A, Clapper JR, Astarita G, Geaga JA, Luecke H, Mor M, Tarzia G, Piomelli D (2007) URB602 inhibits monoacylglycerol lipase and selectively blocks 2-arachidonoylglycerol degradation in intact brain slices. *Chemistry & biology* 14:1357-1365.
- Kinsey SG, O'Neal ST, Long JZ, Cravatt BF, Lichtman AH (2011a) Inhibition of endocannabinoid catabolic enzymes elicits anxiolytic-like effects in the marble burying assay. *Pharmacol Biochem Behav* 98:21-27.
- Kinsey SG, Nomura DK, O'Neal ST, Long JZ, Mahadevan A, Cravatt BF, Grider JR, Lichtman AH (2011b) Inhibition of monoacylglycerol lipase attenuates nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced gastric hemorrhages in mice. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 338:795-802.
- Kovacs KJ (1998) c-Fos as a transcription factor: a stressful (re)view from a functional map. *Neurochem Int* 33:287-297.
- Kovacs KJ, Sawchenko PE (1996a) Regulation of stress-induced transcriptional changes in the hypothalamic neurosecretory neurons. *J Mol Neurosci* 7:125-133.
- Kovacs KJ, Sawchenko PE (1996b) Sequence of stress-induced alterations in indices of synaptic and transcriptional activation in parvocellular neurosecretory neurons. *J Neurosci* 16:262-273.
- Krieger JE, Graeff FG (1985) Defensive behavior and hypertension induced by glutamate in the midbrain central gray of the rat. *Braz J Med Biol Res* 18:61-67.

- Leggett JD, Aspley S, Beckett SR, D'Antona AM, Kendall DA (2004) Oleamide is a selective endogenous agonist of rat and human CB₁ cannabinoid receptors. *Br J Pharmacol* 141:253-262.
- Li HY, Sawchenko PE (1998) Hypothalamic effector neurons and extended circuitries activated in "neurogenic" stress: a comparison of footshock effects exerted acutely, chronically, and in animals with controlled glucocorticoid levels. *J Comp Neurol* 393:244-266.
- Liebowitz MR, Fyer AJ, Gorman J, Klein DF (1986a) Recent developments in the understanding and pharmacotherapy of panic attacks. *Psychopharmacol Bull* 22:792-796.
- Liebowitz MR, Gorman JM, Fyer A, Dillon D, Levitt M, Klein DF (1986b) Possible mechanisms for lactate's induction of panic. *Am J Psychiatry* 143:495-502.
- Liebowitz MR, Fyer AJ, Gorman JM, Campeas R, Levin A, Davies SR, Goetz D, Klein DF (1986c) Alprazolam in the treatment of panic disorders. *J Clin Psychopharmacol* 6:13-20.
- Lim J, Igarashi M, Jung KM, Butini S, Campiani G, Piomelli D (2015) Endocannabinoid Modulation of Predator Stress-Induced Long-Term Anxiety in Rats. *Neuropsychopharmacology*.
- Lisa M, Marmo E, Wible JH, Jr., DiMicco JA (1989a) Injection of muscimol into posterior hypothalamus blocks stress-induced tachycardia. *Am J Physiol* 257:R246-251.
- Lisa M, Filippelli A, Marmo E, Wible JH, Jr., DiMicco JA (1989b) Microinjection of muscimol into posterior hypothalamus blocks cardiovascular response to experimental stress in rats. *Pharmacol Res* 21 Suppl 1:9-10.
- Lisboa SF, Resstel LB, Aguiar DC, Guimaraes FS (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* 593:73-78.
- Long JZ, Li W, Booker L, Burston JJ, Kinsey SG, Schlosburg JE, Pavon FJ, Serrano AM, Selley DE, Parsons LH, Lichtman AH, Cravatt BF (2009) Selective blockade of 2-arachidonoylglycerol hydrolysis produces cannabinoid behavioral effects. *Nature chemical biology* 5:37-44.
- Lovick TA (2000) Panic disorder—a malfunction of multiple transmitter control systems within the midbrain periaqueductal gray matter. *Neuroscientist* 6:48–59.
- Lovick TA, Parry DM, Stezhka VV, Lumb BM (2000) Serotonergic transmission in the periaqueductal gray matter in relation to aversive behaviour: morphological evidence for direct modulatory effects on identified output neurons. *Neuroscience* 95:763-772.
- Luce V, Fernandez Solari J, Rettori V, De Laurentiis A (2014) The inhibitory effect of anandamide on oxytocin and vasopressin secretion from neurohypophysis is mediated by nitric oxide. *Regul Pept* 188:31-39.
- Lupien SJ, Nair NP, Briere S, Maheu F, Tu MT, Lemay M, McEwen BS, Meaney MJ (1999) Increased cortisol levels and impaired cognition in human aging: implication for depression and dementia in later life. *Rev Neurosci* 10:117-139.
- Maccarrone M, Rossi S, Bari M, De Chiara V, Fezza F, Musella A, Gasperi V, Prosperetti C, Bernardi G, Finazzi-Agro A, Cravatt BF, Centonze D (2008) Anandamide inhibits metabolism and physiological actions of 2-arachidonoylglycerol in the striatum. *Nat Neurosci* 11:152-159.
- Manduca A, Morena M, Campolongo P, Servadio M, Palmery M, Trabace L, Hill MN, Vanderschuren LJ, Cuomo V, Trezza V (2015) Distinct roles of the endocannabinoids anandamide and 2-arachidonoylglycerol in social behavior and emotionality at different developmental ages in rats. *Eur Neuropsychopharmacol* 25:1362-1374.
- Martinez RC, Carvalho-Netto EF, Amaral VC, Nunes-de-Souza RL, Canteras NS (2008) Investigation of the hypothalamic defensive system in the mouse. *Behav Brain Res* 192:185-190.

- Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI (1990) Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 346:561-564.
- McEwen BS (1998) Stress, adaptation, and disease. Allostasis and allostatic load. *Ann N Y Acad Sci* 840:33-44.
- McEwen BS (2000) The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. *Brain Res* 886:172-189.
- McGregor IS, Hargreaves GA, Apfelbach R, Hunt GE (2004) Neural correlates of cat odor-induced anxiety in rats: region-specific effects of the benzodiazepine midazolam. *J Neurosci* 24:4134-4144.
- McNaughton N, Gray JA (2000) Anxiolytic action on the behavioural inhibition system implies multiple types of arousal contribute to anxiety. *J Affect Disord* 61:161-176.
- McNaughton N, Corr PJ (2004) A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. *Neurosci Biobehav Rev* 28:285-305.
- Mechoulam R, Gaoni Y (1965a) Hashish. IV. The isolation and structure of cannabinolic cannabidiolic and cannabigerolic acids. *Tetrahedron* 21:1223-1229.
- Mechoulam R, Gaoni Y (1965b) A Total Synthesis of Δ^1 -Tetrahydrocannabinol, the Active Constituent of Hashish. *J Am Chem Soc* 87:3273-3275.
- Mechoulam R, Gaoni Y (1967a) Recent advances in the chemistry of hashish. *Fortschr Chem Org Naturst* 25:175-213.
- Mechoulam R, Gaoni Y (1967b) The absolute configuration of Δ^1 -tetrahydrocannabinol, the major active constituent of hashish. *Tetrahedron Lett* 12:1109-1111.
- Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR, et al. (1995) Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol* 50:83-90.
- Mihaly E, Fekete C, Legradi G, Lechan RM (2001) Hypothalamic dorsomedial nucleus neurons innervate thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the paraventricular nucleus. *Brain Res* 891:20-31.
- Milani H, Graeff FG (1987) GABA-benzodiazepine modulation of aversion in the medial hypothalamus of the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 28:21-27.
- Mobbs D, Petrovic P, Marchant JL, Hassabis D, Weiskopf N, Seymour B, Dolan RJ, Frith CD (2007) When fear is near: threat imminence elicits prefrontal-periaqueductal gray shifts in humans. *Science* 317:1079-1083.
- Moreira FA, Aguiar DC, Guimaraes FS (2007) Anxiolytic-like effect of cannabinoids injected into the rat dorsolateral periaqueductal gray. *Neuropharmacology* 52:958-965.
- Moreira FA, Kaiser N, Monory K, Lutz B (2008) Reduced anxiety-like behaviour induced by genetic and pharmacological inhibition of the endocannabinoid-degrading enzyme fatty acid amide hydrolase (FAAH) is mediated by CB₁ receptors. *Neuropharmacology* 54:141-150.
- Moreira FA, Aguiar DC, Campos AC, Lisboa SF, Terzian AL, Resstel LB, Guimaraes FS (2009) Antiaversive effects of cannabinoids: is the periaqueductal gray involved? *Neural Plast* 2009:625469.
- Morena M, Patel S, Bains JS, Hill MN (2016) Neurobiological Interactions Between Stress and the Endocannabinoid System. *Neuropsychopharmacology* 41:80-102.
- Morgan JI, Curran T (1989) Stimulus-transcription coupling in neurons: role of cellular immediate-early genes. *Trends Neurosci* 12:459-462.
- Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M (1993) Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 365:61-65.
- Naidu PS, Varvel SA, Ahn K, Cravatt BF, Martin BR, Lichtman AH (2007) Evaluation of fatty acid amide hydrolase inhibition in murine models of emotionality. *Psychopharmacology (Berl)* 192:61-70.
- Nashold BS, Jr. (1974) Central pain: its origins and treatment. *Clin Neurosurg* 21:311-322.

- Nashold BS, Jr., Wilson WP (1966) Central pain. Observations in man with chronic implanted electrodes in the midbrain tegmentum. *Confin Neurol* 27:30-44.
- Nashold BS, Jr., Wilson WP, Slaughter DG (1969) Sensations evoked by stimulation in the midbrain of man. *J Neurosurg* 30:14-24.
- Onaivi ES (2006) Neuropsychobiological evidence for the functional presence and expression of cannabinoid CB₂ receptors in the brain. *Neuropsychobiology* 54:231-246.
- Onaivi ES, Ishiguro H, Gu S, Liu QR (2012) CNS effects of CB₂ cannabinoid receptors: beyond neuro-immuno-cannabinoid activity. *J Psychopharmacol* 26:92-103.
- Onaivi ES, Ishiguro H, Sejal P, Meozzi PA, Myers L, Tagliaferro P, Hope B, Leonard CM, Uhl GR, Brusco A, Gardner E (2006a) 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.
- Onaivi ES, Ishiguro H, Gong JP, Patel S, Perchuk A, Meozzi PA, Myers L, Mora Z, Tagliaferro P, Gardner E, Brusco A, Akinshola BE, Liu QR, Hope B, Iwasaki S, Arinami T, Teasentfitz L, Uhl GR (2006b) Discovery of the presence and functional expression of cannabinoid CB₂ receptors in brain. *Ann N Y Acad Sci* 1074:514-536.
- Ortega-Alvaro A, Aracil-Fernandez A, Garcia-Gutierrez MS, Navarrete F, Manzanares J (2011) Deletion of CB₂ cannabinoid receptor induces schizophrenia-related behaviors in mice. *Neuropsychopharmacology* 36:1489-1504.
- Patel S, Hillard CJ (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* 318:304-311.
- Patel S, Hillard CJ (2008) Adaptations in endocannabinoid signaling in response to repeated homotypic stress: a novel mechanism for stress habituation. *Eur J Neurosci* 27:2821-2829.
- Patel S, Roelke CT, Rademacher DJ, Hillard CJ (2005) Inhibition of restraint stress-induced neural and behavioural activation by endogenous cannabinoid signalling. *Eur J Neurosci* 21:1057-1069.
- Patel S, Roelke CT, Rademacher DJ, Cullinan WE, Hillard CJ (2004) Endocannabinoid signaling negatively modulates stress-induced activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Endocrinology* 145:5431-5438.
- Paxinos G, Watson, C (1997) *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 3 edition Edition: New York, Academic Press.
- Pecoraro N, Dallman MF, Warne JP, Ginsberg AB, Laugero KD, la Fleur SE, Houshyar H, Gomez F, Bhargava A, Akana SF (2006) From Malthus to motive: how the HPA axis engineers the phenotype, yoking needs to wants. *Prog Neurobiol* 79:247-340.
- Pelosi GG, Resstel LL, Soares VP, Zangrossi H, Guimaraes FS, Correa FM (2009) Anxiolytic-like effect of noradrenaline microinjection into the dorsal periaqueductal gray of rats. *Behav Pharmacol* 20:252-259.
- Pertwee RG (1997) Pharmacology of cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors. *Pharmacol Ther* 74:129-180.
- Pertwee RG (1999) Pharmacology of cannabinoid receptor ligands. *Curr Med Chem* 6:635-664.
- Pertwee RG (2000) Cannabinoid receptor ligands: clinical and neuropharmacological considerations, relevant to future drug discovery and development. *Expert Opin Investig Drugs* 9:1553-1571.
- Pertwee RG (2005) The therapeutic potential of drugs that target cannabinoid receptors or modulate the tissue levels or actions of endocannabinoids. *AAPS J* 7:E625-654.
- Pertwee RG, Howlett AC, Abood ME, Alexander SP, Di Marzo V, Elphick MR, Greasley PJ, Hansen HS, Kunos G, Mackie K, Mechoulam R, Ross RA (2010) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB(1) and CB(2). *Pharmacol Rev* 62:588-631.

- Pichon S, de Gelder B, Grezes J (2012) Threat prompts defensive brain responses independently of attentional control. *Cereb Cortex* 22:274-285.
- Piomelli D (2003) The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci* 4:873-884.
- Porter AC, Sauer JM, Knierman MD, Becker GW, Berna MJ, Bao J, Nomikos GG, Carter P, Bymaster FP, Leese AB, Felder CC (2002) Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB₁ receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 301:1020-1024.
- Rabasa C, Gagliano H, Pastor-Ciurana J, Fuentes S, Belda X, Nadal R, Armario A (2015a) Adaptation of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis to daily repeated stress does not follow the rules of habituation: A new perspective. *Neurosci Biobehav Rev*.
- Rabasa C, Pastor-Ciurana J, Delgado-Morales R, Gomez-Roman A, Carrasco J, Gagliano H, Garcia-Gutierrez MS, Manzanares J, Armario A (2015b) Evidence against a critical role of CB₁ receptors in adaptation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and other consequences of daily repeated stress. *Eur Neuropsychopharmacol*.
- Rademacher DJ, Meier SE, Shi L, Ho WS, Jarrarian A, Hillard CJ (2008) Effects of acute and repeated restraint stress on endocannabinoid content in the amygdala, ventral striatum, and medial prefrontal cortex in mice. *Neuropharmacology* 54:108-116.
- Reiman EM, Raichle ME, Robins E, Mintun MA, Fusselman MJ, Fox PT, Price JL, Hackman KA (1989) Neuroanatomical correlates of a lactate-induced anxiety attack. *Arch Gen Psychiatry* 46:493-500.
- Reisenberg M, Singh PK, Williams G, Doherty P (2012) The diacylglycerol lipases: structure, regulation and roles in and beyond endocannabinoid signalling. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 367:3264-3275.
- Resstel LB, Correa FM (2006) Medial prefrontal cortex NMDA receptors and nitric oxide modulate the parasympathetic component of the baroreflex. *Eur J Neurosci* 23:481-488.
- Resstel LB, Souza RF, Guimaraes FS (2008) Anxiolytic-like effects induced by medial prefrontal cortex inhibition in rats submitted to the Vogel conflict test. *Physiol Behav* 93:200-205.
- Resstel LB, Moreira FA, Guimaraes FS (2009) Endocannabinoid system and fear conditioning. *Vitam Horm* 81:421-440.
- Resstel LB, Joca SR, Moreira FA, Correa FM, Guimaraes FS (2006) Effects of cannabidiol and diazepam on behavioral and cardiovascular responses induced by contextual conditioned fear in rats. *Behav Brain Res* 172:294-298.
- Richardson S, Mirasadeghi S, Lynn A, Johnson MR, Melvin LS, Herkenham M, Rice KC (1990) Synthetic and biological studies of potential affinity ligands for the cannabinoid receptor based on CP-55, 244. *NIDA Res Monogr* 105:140-146.
- Riebe CJ, Wotjak CT (2011) Endocannabinoids and stress. *Stress* 14:384-397.
- Rinaldi-Carmona M, Barth F, Heaulme M, Shire D, Calandra B, Congy C, Martinez S, Maruani J, Neliat G, Caput D, et al. (1994) SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. *FEBS Lett* 350:240-244.
- Risold PY, Thompson RH, Swanson LW (1997) The structural organization of connections between hypothalamus and cerebral cortex. *Brain Res Brain Res Rev* 24:197-254.
- Ross RA (2003) Anandamide and vanilloid TRPV1 receptors. *Br J Pharmacol* 140:790-801.
- Roth BL, Beinfeld MC, Howlett AC (1984) Secretin receptors on neuroblastoma cell membranes: characterization of 125I-labeled secretin binding and association with adenylate cyclase. *J Neurochem* 42:1145-1152.
- Rubino T, Realini N, Castiglioni C, Guidali C, Vigano D, Marras E, Petrosino S, Perletti G, Maccarrone M, Di Marzo V, Parolaro D (2008) Role in anxiety behavior of the endocannabinoid system in the prefrontal cortex. *Cereb Cortex* 18:1292-1301.

- Sajdyk TJ, Katner JS, Shekhar A (1997) Monoamines in the dorsomedial hypothalamus of rats following exposure to different tests of "anxiety". *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 21:193-209.
- Samuels BC, Zaretsky DV, DiMicco JA (2002) Tachycardia evoked by disinhibition of the dorsomedial hypothalamus in rats is mediated through medullary raphe. *J Physiol* 538:941-946.
- Samuels BC, Zaretsky DV, DiMicco JA (2004) Dorsomedial hypothalamic sites where disinhibition evokes tachycardia correlate with location of raphe-projecting neurons. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287:R472-478.
- Sandner G, Di Scala G, Rocha B, Angst MJ (1992) C-fos immunoreactivity in the brain following unilateral electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray in freely moving rats. *Brain Res* 573:276-283.
- Sandner G, Oberling P, Silveira MC, Di Scala G, Rocha B, Bagri A, Depoortere R (1993) What brain structures are active during emotions? Effects of brain stimulation elicited aversion on c-fos immunoreactivity and behavior. *Behav Brain Res* 58:9-18.
- Sawchenko PE, Brown ER, Chan RK, Ericsson A, Li HY, Roland BL, Kovacs KJ (1996) The paraventricular nucleus of the hypothalamus and the functional neuroanatomy of visceromotor responses to stress. *Prog Brain Res* 107:201-222.
- Schenberg LC, Bittencourt AS, Sudre EC, Vargas LC (2001) Modeling panic attacks. *Neurosci Biobehav Rev* 25:647-659.
- Schlosburg JE, Carlson BL, Ramesh D, Abdullah RA, Long JZ, Cravatt BF, Lichtman AH (2009) Inhibitors of endocannabinoid-metabolizing enzymes reduce precipitated withdrawal responses in THC-dependent mice. *The AAPS journal* 11:342-352.
- Schmitt ML, Graeff FG, Carobrez AP (1990) Anxiolytic effect of kynurenic acid microinjected into the dorsal periaqueductal gray matter of rats placed in the elevated plus-maze test. *Braz J Med Biol Res* 23:677-679.
- Schmitt P, Carrive P, Di Scala G, Jenck F, Brandao M, Bagri A, Moreau JL, Sandner G (1986) A neuropharmacological study of the periventricular neural substrate involved in flight. *Behav Brain Res* 22:181-190.
- Sciolino NR, Zhou W, Hohmann AG (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* 64:226-234.
- Shekhar A (1993) GABA receptors in the region of the dorsomedial hypothalamus of rats regulate anxiety in the elevated plus-maze test. I. Behavioral measures. *Brain Res* 627:9-16.
- Shekhar A, DiMicco JA (1987) Defense reaction elicited by injection of GABA antagonists and synthesis inhibitors into the posterior hypothalamus in rats. *Neuropharmacology* 26:407-417.
- Shekhar A, Katner JS (1995) Dorsomedial hypothalamic GABA regulates anxiety in the social interaction test. *Pharmacol Biochem Behav* 50:253-258.
- Shekhar A, Hingtgen JN, DiMicco JA (1987) Selective enhancement of shock avoidance responding elicited by GABA blockade in the posterior hypothalamus of rats. *Brain Res* 420:118-128.
- Shekhar A, Hingtgen JN, DiMicco JA (1990) GABA receptors in the posterior hypothalamus regulate experimental anxiety in rats. *Brain Res* 512:81-88.
- Shekhar A, Sims LS, Bowsher RR (1993) GABA receptors in the region of the dorsomedial hypothalamus of rats regulate anxiety in the elevated plus-maze test. II. Physiological measures. *Brain Res* 627:17-24.
- Shekhar A, Keim SR, Simon JR, McBride WJ (1996) Dorsomedial hypothalamic GABA dysfunction produces physiological arousal following sodium lactate infusions. *Pharmacol Biochem Behav* 55:249-256.

- Shekhar A, Johnson PL, Fitz SD, Nakazato A, Chaki S, Steckler T, Schmidt M (2011) A selective, non-peptide CRF receptor 1 antagonist prevents sodium lactate-induced acute panic-like responses. *Int J Neuropsychopharmacol* 14:355-365.
- Silveira MC, Graeff FG (1992) Defense reaction elicited by microinjection of kainic acid into the medial hypothalamus of the rat: antagonism by a GABAA receptor agonist. *Behav Neural Biol* 57:226-232.
- Silveira MC, Sandner G, Graeff FG (1993) Induction of Fos immunoreactivity in the brain by exposure to the elevated plus-maze. *Behav Brain Res* 56:115-118.
- Silveira MC, Graeff FG, Sandner G (1994) Regional distribution of Fos-like immunoreactivity in the rat brain after exposure to fear-inducing stimuli. *Braz J Med Biol Res* 27:1077-1081.
- Silveira MC, Sandner G, Di Scala G, Graeff FG (1995) c-fos immunoreactivity in the brain following electrical or chemical stimulation of the medial hypothalamus of freely moving rats. *Brain Res* 674:265-274.
- Singewald N, Sharp T (2000) Neuroanatomical targets of anxiogenic drugs in the hindbrain as revealed by Fos immunocytochemistry. *Neuroscience* 98:759-770.
- Singewald N, Salchner P, Sharp T (2003) Induction of c-Fos expression in specific areas of the fear circuitry in rat forebrain by anxiogenic drugs. *Biol Psychiatry* 53:275-283.
- Soltis RP, DiMicco JA (1992) Hypothalamic excitatory amino acid receptors mediate stress-induced tachycardia in rats. *Am J Physiol* 262:R689-697.
- Sonnenberg JL, Mitchelmore C, Macgregor-Leon PF, Hempstead J, Morgan JI, Curran T (1989) Glutamate receptor agonists increase the expression of Fos, Fra, and AP-1 DNA binding activity in the mammalian brain. *J Neurosci Res* 24:72-80.
- Starowicz K, Nigam S, Di Marzo V (2007) Biochemistry and pharmacology of endovanilloids. *Pharmacol Ther* 114:13-33.
- Stotz-Potter EH, Morin SM, DiMicco JA (1996a) Effect of microinjection of muscimol into the dorsomedial or paraventricular hypothalamic nucleus on air stress-induced neuroendocrine and cardiovascular changes in rats. *Brain Res* 742:219-224.
- Stotz-Potter EH, Willis LR, DiMicco JA (1996b) Muscimol acts in dorsomedial but not paraventricular hypothalamic nucleus to suppress cardiovascular effects of stress. *J Neurosci* 16:1173-1179.
- Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, Yamashita A, Waku K (1995) 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun* 215:89-97.
- Sumislawski JJ, Ramikie TS, Patel S (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* 36:2750-2761.
- Swanson LW (1988) The neural basis of motivated behavior. *Acta Morphol Neerl Scand* 26:165-176.
- Tanimura A, Yamazaki M, Hashimoto Y, Uchigashima M, Kawata S, Abe M, Kita Y, Hashimoto K, Shimizu T, Watanabe M, Sakimura K, Kano M (2010) The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol produced by diacylglycerol lipase alpha mediates retrograde suppression of synaptic transmission. *Neuron* 65:320-327.
- Terzian AL, Aguiar DC, Guimaraes FS, Moreira FA (2009) Modulation of anxiety-like behaviour by Transient Receptor Potential Vanilloid Type 1 (TRPV1) channels located in the dorsolateral periaqueductal gray. *Eur Neuropsychopharmacol* 19:188-195.
- Thompson RH, Swanson LW (1998) Organization of inputs to the dorsomedial nucleus of the hypothalamus: a reexamination with Fluorogold and PHAL in the rat. *Brain Res Brain Res Rev* 27:89-118.

- Thompson RH, Canteras NS, Swanson LW (1996) Organization of projections from the dorsomedial nucleus of the hypothalamus: a PHA-L study in the rat. *J Comp Neurol* 376:143-173.
- Uriguen L, Perez-Rial S, Ledent C, Palomo T, Manzanares J (2004) Impaired action of anxiolytic drugs in mice deficient in cannabinoid CB₁ receptors. *Neuropharmacology* 46:966-973.
- Van de Kar LD, Blair ML (1999) Forebrain pathways mediating stress-induced hormone secretion. *Front Neuroendocrinol* 20:1-48.
- Van Sickle MD, Duncan M, Kingsley PJ, Mouihate A, Urbani P, Mackie K, Stella N, Makriyannis A, Piomelli D, Davison JS, Marnett LJ, Di Marzo V, Pittman QJ, Patel KD, Sharkey KA (2005) Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB₂ receptors. *Science* 310:329-332.
- Viana TG, Hott SC, Resstel LB, Aguiar DC, Moreira FA (2015) Anti-aversive role of the endocannabinoid system in the periaqueductal gray stimulation model of panic attacks in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 232:1545-1553.
- Vianna DM, Brandao ML (2003) Anatomical connections of the periaqueductal gray: specific neural substrates for different kinds of fear. *Braz J Med Biol Res* 36:557-566.
- Vianna DM, Borelli KG, Ferreira-Netto C, Macedo CE, Brandao ML (2003) Fos-like immunoreactive neurons following electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray at freezing and escape thresholds. *Brain Res Bull* 62:179-189.
- Wamsteeker JI, Kuzmiski JB, Bains JS (2010) Repeated stress impairs endocannabinoid signaling in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *J Neurosci* 30:11188-11196.
- Watts AG (2005) Glucocorticoid regulation of peptide genes in neuroendocrine CRH neurons: a complexity beyond negative feedback. *Front Neuroendocrinol* 26:109-130.
- Watts AG (2015) 60 YEARS OF NEUROENDOCRINOLOGY: The structure of the neuroendocrine hypothalamus: the neuroanatomical legacy of Geoffrey Harris. *J Endocrinol* 226:T25-39.
- Wheatley MD (1944) The hypothalamus and affective behavior in cats. A study of the effects of experimental lesions, with anatomic correlations. *Arch Neuropsych* 52(4):296-316.
- Wible JH, Jr., DiMicco JA, Luft FC (1989) Hypothalamic GABA and sympathetic regulation in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 14:623-628.
- Wilentz WB, Oh MY, Buetefisch CM, Bailes JE, Cantella D, Angle C, Whiting DM (2010) Induction of panic attack by stimulation of the ventromedial hypothalamus. *J Neurosurg* 112:1295-1298.
- Wilson RI, Nicoll RA (2001) Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. *Nature* 410:588-592.
- Xi ZX, Peng XQ, Li X, Song R, Zhang HY, Liu QR, Yang HJ, Bi GH, Li J, Gardner EL (2011) Brain cannabinoid CB₂ receptors modulate cocaine's actions in mice. *Nat Neurosci* 14:1160-1166.
- Yardley CP, Hilton SM (1986) The hypothalamic and brainstem areas from which the cardiovascular and behavioural components of the defence reaction are elicited in the rat. *J Auton Nerv Syst* 15:227-244.
- Zangrossi H, Jr., Viana MB, Zanoveli J, Bueno C, Nogueira RL, Graeff FG (2001) Serotonergic regulation of inhibitory avoidance and one-way escape in the rat elevated T-maze. *Neurosci Biobehav Rev* 25:637-645.
- Zaretskaia MV, Zaretsky DV, Sarkar S, Shekhar A, DiMicco JA (2008) Induction of Fos-immunoreactivity in the rat brain following disinhibition of the dorsomedial hypothalamus. *Brain Res* 1200:39-50.
- Zias J, Stark H, Sellgman J, Levy R, Werker E, Breuer A, Mechoulam R (1993) Early medical use of cannabis. *Nature* 363:215.

