

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

**Participação de receptores TRPV1 nas respostas  
defensivas mediadas pela substância cinzenta  
periaquedutal dorsolateral de ratos**

**ANA FLÁVIA SANTOS ALMEIDA**

**BELO HORIZONTE – 2011**

ANA FLÁVIA SANTOS ALMEIDA

**Participação dos receptores TRPV1 nas respostas defensivas mediadas pela substância cinzenta periaquedutal dorsolateral de ratos**

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

**ORIENTADORA: Profa. Dra. Daniele Cristina de Aguiar**

**BELO HORIZONTE – 2011**

## **Dedicatória**

*À minha mãe **Edna**, ao meu pai **Afonso**  
e a **Ana Laura**, amo vocês.*

*“Ainda que eu falasse a língua dos homens e dos anjos, que tivesse uma fé capaz de mover montanhas, se não tivesse o amor, de nada valeria.”*

*I Coríntios 13.*

“...Saber que a gente gosta disso e gosta daquilo é fácil. O difícil é saber qual, dentre todas, é aquela de que a gente gosta supremamente. Pois, por causa dela, todas as outras terão de ser abandonadas. A isso que se dá o nome de "vocação"; que vem do latim, vocare, que quer dizer "chamar...”

Muito Cedo Para Decidir, Rubem Alves

## **Agradecimentos:**

*A minha orientadora e mãe científica, **Dra. Daniele Cristina de Aguiar**, Obrigada pela oportunidade, confiança, atenção, disponibilidade, ensinamentos, dedicação e paciência. Não tenho palavras para descrever o quanto sou grata. Dani: meu muito obrigada, você foi imprescindível!!!*

A **Deus**, pela possibilidade da busca e realização desse sonho; obrigada também por ter me permitido conviver com pessoas tão especiais;

Ao professor **Dr. Fabrício de Araújo Moreira** pelo apoio, presença, incessantes ensinamentos e sábias palavras;

Ao professor da USP, **Dr. Francisco Silveira Guimarães** por ter disponibilizado as drogas utilizadas nesse trabalho;

A **banca examinadora**, pela atenção dispensada na leitura deste trabalho;

As minhas “irmãs”, **Isabela Almeida e Lucimar Silva** pela amizade, cumplicidade e apoio;

A família do Laboratório de Neuropsicofarmacologia – **Luciano Vilela, Diego Peixoto, Carla Santos, Ludmila Rosa, Luara Augusta e Natália Pereira**, pelos ensinamentos, discussões, lanches, danças, piadas... Enfim, por todos os momentos compartilhados;

A minha grande amiga e eterna professora **Dra. Yara Alvarenga**, pela confiança e incentivo;

Ao **Webster Pimenta, Lilian Gontijo, Raphael Gomes, Paula Ortolani, Giovane Galdino, Daniele Bernardes, Viviane Saito, Rogério Bilheiro, Rosária Dias, Francilene Lara, Celso Tarso, Tereza Alves, Jânio Almeida** e em especial ao **Paulo Lima, Lindisley Gomides e Lucas Kangussu** pelas festas, gargalhadas, amizade e constante torcida;

Aos professores do departamento de Farmacologia e Fisiologia, **Igor Dimitri, Marco Antonio Fontes, Dálton Ferreira, Grace Schenatto, André Klein e Janetti Francischi** pelos ensinamentos;

Aos funcionários **Jorge e Rinaldo**, pessoas fundamentais para a realização desse trabalho;

A toda minha **família** por, a todo o momento, acreditarem em mim;

A **CAPES**, pelo apoio financeiro;

E... jamais poderia deixar de agradecer...

Aos grandes amigos, **Rafael Rezende, Pedro Gobira e Thércia Guedes**, Obrigada pela atenção dedicada, pela amizade sempre presente, pelos ensinamentos, orações, choros, risos, segredos, confiança e paciência. Vocês são especiais!

*Quem me dará um ombro amigo quando eu precisar,  
E se eu cair, se vacilar, quem vai me levantar?  
Quem é que vai me acolher, na minha indecisão  
Se eu me perder pelo caminho, quem me dará a mão...*  
(Anjos de Resgate)

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	8
LISTA DE ABREVIATURAS.....	9
RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	11
REVISÃO DE LITERATURA.....	12
1. Comportamento Defensivo.....	13
2. Sítios neurais envolvidos no comportamento defensivo.....	13
2.1 Sustância Cinzenta Periaquedutal.....	14
3. Neurotransmissores envolvidos na mediação de respostas aversivas.....	17
3.1 Sistema glutamatérgico.....	18
3.2 Sistema vanilóide.....	21
3.3 Sistema canabinóide.....	26
OBJETIVOS.....	29
1. Objetivo Geral.....	30
2. Objetivos específicos.....	30
MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
1. Animais.....	32
2. Drogas.....	32
3. Cirurgia Estereotáxica.....	32
4. Injeção.....	33
5. Testes comportamentais.....	33
5.1 Caixa de observação.....	33
5.2 Labirinto em Cruz Elevado.....	34
5.3 Labirinto em T Elevado.....	36
5.4 Campo aberto.....	37
6. Histologia.....	38
7. Delineamento Experimental.....	39
8. Análise estatística.....	44
DESCRIÇÃO DOS RESULTADOS.....	45
1. Efeito do pré-tratamento com a capsazepina nas respostas de fuga induzidas pelo agonista de receptores NMDA intra-SCPdl.....	47
2. Efeito do tratamento com capsazepina intra-SCPdl no LTE.....	51
3. Efeito do tratamento com AM251 intra-SCPdl no LTE.....	53
4. Efeito do pré-tratamento com AM251 na resposta tipo panicolítica induzida pela capsazepina intra-SCPdl no LTE.....	55
5. Efeito do tratamento com AM251 e capsazepina intra-SCPdl no campo aberto.....	57
DISCUSSÃO.....	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Caixa de observação

**Figura 2:** Labirinto em Cruz Elevado

**Figura 3:** Labirinto em T Elevado

**Figura 4:** Campo aberto

**Figura 5:** Representação esquemática do protocolo experimental 1.

**Figura 6:** Representação esquemática do protocolo experimental 2.

**Figura 7:** Representação esquemática do protocolo experimental 3.

**Figura 8:** Representação esquemática do protocolo experimental 4.

**Figura 9:** Representação esquemática do protocolo experimental 5.

**Figura 10:** Fotografia de lâmina histológica com secção coronal representativa dos sítios de injeção na SCPdl. Localização de sítios de injeção em diagramas modificados do Atlas de PAXINOS e WATSON mostrando os sítios de injeções atingidos (●).

**Figura 11:** Efeito do NMDA (1 nmol/0,2 µL) e da capsazepina (1, 10 e 30 nmol/0,2 µL) intra-SCPdl sobre o número de cruzamentos.

**Figura 12:** Efeito do NMDA (1 nmol/0,2 µL) e da capsazepina (1, 10 e 30 nmol/0,2 µL) intra-SCPdl sobre o número de pulos.

**Figura 13:** Efeito do NMDA (1 nmol/0,2 µL) intra SCPdl e fora da SCPdl sobre o número de cruzamentos.

**Figura 14:** Efeito do NMDA (1 nmol/0,2 µL) intra SCPdl e fora da SCPdl sobre o número de pulos.

**Figura 15:** Efeito da capsazepina (1, 10, 30 e 60 nmol/0,2 µL) intra-SCPdl na tarefa de esQUIVA inibitória do LTE.

**Figura 16:** Efeito da capsazepina (1, 10, 30 e 60 nmol/0,2 µL) intra-SCPdl na tarefa de fuga do LTE.

**Figura 17:** Efeito do AM251 (1, 10 e 100 pmol/0,2 µL) intra-SCPdl na tarefa de esQUIVA inibitória do LTE.

**Figura 18:** Efeito do AM251 (1, 10 e 100 pmol/0,2 µL) intra-SCPdl na tarefa de fuga do LTE.

**Figura 19:** Efeito do pré-tratamento com AM251 (100 pmol/0,2 µL) e do tratamento com capsazepina intra-SCPdl (60 nmol/0,2 µL) na tarefa de esQUIVA inibitória do LTE.

**Figura 20:** Efeito do pré-tratamento com AM251 (100 pmol/0,2 µL) na resposta tipo panicolítica induzida pela capsazepina intra-SCPdl (60 nmol/0,2 µL) na tarefa de fuga do LTE.

**Figura 21:** Efeito do AM251 (100 pmol/0,2 µL) e da capsazepina (60 nmol/0,2 µL) na atividade locomotora utilizando o campo aberto.

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**AEA:** Araquidonoil etanolamida (anandamida)

**AAE:** Aminoácidos excitatórios

**AP-7:** Ácido 2-amino-7-fosfoheptanócio

**CAPZ:** Capsazepina

**CB<sub>1</sub>:** Receptores canabinóides do tipo 1

**CB<sub>2</sub>:** Receptores canabinóides do tipo 2

**CPF:** Córtex pré-frontal

**DLH:** D,L-homocisteico

**DMSO:** Dimetilsulfóxido

**FAAH:** Hidrolase de amidas de ácido graxo

**iGLU:** Receptores ionotrópicos do glutamato

**LCE:** Labirinto em Cruz Elevado

**LTE:** Labirinto em T Elevado

**mGLU:** Receptores metabotrópicos do glutamato

**n:** Número de animais por grupo

**NADA:** N-araquidonoildopamina

**NMDA:** N-metil-D-aspartato

**RTX:** Resiniferatoxina

**SCP:** Substância cinzenta periaquedutal

**SCPdl:** Substância cinzenta periaquedutal dorsolateral

**SCPdm:** Substância cinzenta periaquedutal dorsomedial

**SCPd:** Substância cinzenta periaquedutal dorsal

**SCPl:** Substância cinzenta periaquedutal lateral

**SCPvl:** Substância cinzenta periaquedutal ventrolateral

**SNC:** Sistema Nervoso Central

**TRPV:** Receptor vanilóide de potencial transitório

## RESUMO

As respostas comportamentais de medo e ansiedade resultam da expressão de emoções decorrentes das reações dos animais frente a estímulos aversivos que lhes apresentam perigo ou ameaça a sobrevivência. Tais respostas estão relacionadas com a liberação de neurotransmissores presentes em importantes estruturas do sistema encefálico de defesa, como a substância cinzenta periaquedutal dorsolateral (SCPdl). Diversos estudos indicam que a neurotransmissão glutamatérgica facilita reações de fuga em animais. Além disso, vários neurotransmissores, dentre eles os sistemas endovanilóide e endocanabinóide também modulam essas respostas. A ativação de receptores vanilóides tipo 1 (TRPV1) favorece a transmissão sináptica glutamatérgica na SCPdl, mas seu papel na elaboração de respostas defensivas foi pouco elucidado. Além disso, estudos sugerem que os sistemas canabinóide e vanilóide exercem efeitos opostos em modelos animais de ansiedade. Baseado nessas evidências, este trabalho investigou a participação de receptores TRPV1 em dois modelos animais de pânico: a injeção do agonista NMDA intra-SCPdl e o Labirinto em T Elevado (LTE). Os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação da cânula na SCPdl e após um período de recuperação foram submetidos aos testes comportamentais. Os resultados mostram que a injeção do NMDA intra SCPdl (1,0 nmol/0,2 µL) produziu reações de fuga caracterizadas pelo aumento no número de cruzamentos e de pulos e que esse efeito foi abolido quando os animais foram pré-tratados com a capsazepina (antagonista de receptores TRPV1) na dose de 1 nmol/0,2 µL intra SCPdl. Quando os ratos foram submetidos ao LTE, a capsazepina (60 nmol/0,2 µL) intra SCPdl promoveu efeito tipo pânico caracterizado por uma maior latência para atingir o centro do labirinto quando os animais eram expostos ao braço aberto, sendo esse efeito bloqueado quando os animais foram pré-tratados com o antagonista de receptores CB<sub>1</sub>, AM251(100 pmol/0,2 µL) intra SCPdl, sugerindo que este efeito é mediado por uma facilitação da sinalização canabinóide. Dessa forma, conclui-se que os receptores vanilóides modulam as respostas defensivas mediadas pela SCPdl, possivelmente, facilitando a neurotransmissão glutamatérgica.

## ABSTRACT

The behavioral responses of fear and anxiety results from the expression of emotions arising from the animal reactions in the face of aversive stimuli they present a danger or threat to survival. Such responses are related to the release of neurotransmitters present in key brain structures of the system of defense, as the dorsolateral periaqueductal gray (dIPAG). Several studies suggest that glutamatergic neurotransmission facilitates aversive reactions. Additionally, several other neurotransmitter systems present in dIPAG might modulate these responses, as endovanilloid and endocannabinoid systems. Activation of vanilloid receptor type 1 (TRPV1) facilitates glutamatergic synaptic transmission in dIPAG, but its role on the modulation of defensive responses was unclear. Moreover, studies have been shown that the cannabinoid and vanilloid systems exert opposite effects in several animal models of anxiety. Based on this evidence, this study investigated the involvement of TRPV1 receptors in two animal models of panic: the injection of the NMDA agonist dIPAG and the elevated T maze (ETM). The animals underwent stereotaxic surgery for implantation of the cannula guide into dIPAG and after a recovery period were subjected to behavioral tests. The results show that injection of NMDA (1.0 nmol/0.2  $\mu$ L) into dIPAG produced flight reactions characterized by increase in jumps and crossings and that this effect was abolished when animals were pretreated with capsazepine (TRPV1 receptor antagonist) at a dose of 1 nmol/ 0.2  $\mu$ L into dIPAG. When the rats were submitted to ETM, capsazepine (60 nmol/0.2  $\mu$ L) into dIPAG induced panicolytic-like effect characterized by an increased latency to reach the center of the maze when the animals were exposed to the open arm. This effect was blocked by pre-treatment of CB<sub>1</sub> antagonist, AM251 (100 pmol/0.2  $\mu$ L) into dIPAG, suggesting that this effect is dependent on cannabinoid activation. In conclusion, it appears that the vanilloid receptors modulate defensive responses mediated by dIPAG, possibly, facilitating glutamatergic neurotransmission.

*REVISÃO DE LITERATURA*

## **1. Comportamento defensivo**

O comportamento defensivo consiste em uma série de respostas defensivas que os animais apresentam frente a estímulos ameaçadores ou situações de perigo como, por exemplo, a exposição a predadores ou ainda o confronto entre animais da mesma espécie. Além desses, fatores ambientais como a iluminação, altura, exposição a lugares ou objetos novos também representam condições aversivas (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988; GRAEFF; ZANGROSSI, 2002).

Uma vez expostos a situações de perigo, os animais expressam respostas defensivas, tais como fuga, congelamento, avaliação de risco, esquiva, ameaça ou ataque defensivo (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988; GRAEFF et al, 1998; ZANOVELI, 2005). Em seu livro *“The Expression of Emotions in Man and Animals”* CHARLES DARWIN (1872) observou uma semelhança entre o comportamento dos humanos e dos demais animais na expressão das emoções de natureza aversiva.

A partir desta perspectiva, diversos trabalhos foram realizados com o intuito de determinar as bases neurobiológicas responsáveis pelo desencadeamento de respostas comportamentais, bem como as bases envolvidas nos transtornos de ansiedade e medo (CANTERAS et al, 2001; CAROBREZ et al, 2001; BRANDÃO et al, 2003; BERGINK et al, 2004; JAVITT, 2004; GUIMARÃES et al, 2005).

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

Em 1943, trabalhos iniciais de HESS e BRUGGER mostraram que a estimulação elétrica do hipotálamo medial de gatos produzia respostas

aversivas semelhantes ao comportamento que esses animais apresentavam quando exposto ao predador. Posteriormente, GRAEFF (1981) postulou que estruturas encefálicas como a amígdala, o hipotálamo e a substância cinzenta periaquedutal (SCP) constituiriam um sistema integrado responsável pela elaboração das respostas de defesa, sendo estas estruturas os principais componentes de um sistema cerebral aversivo, responsável pela elaboração de manifestações fisiológicas e psicológicas de estados motivacionais negativos.

A estimulação elétrica e química destas regiões induz padrões de comportamento defensivo espécie-específico, além de manifestações comportamentais e subjetivas semelhantes ao comportamento que os animais apresentavam durante um evento aversivo (GRAEFF et al, 1993a; BRANDÃO et al, 1994 apud FERREIRA-NETTO et al, 2005).

A partir desses dados iniciais, evidenciou-se o papel da SCP na elaboração do comportamento defensivo e atualmente essa região é considerada uma das estruturas chaves na elaboração de respostas defensivas ativas ou passivas (BANDLER et al, 2000; CARRIVE, 1993).

### 2.1 Substância Cinzenta Periaquedutal

A SCP é um importante sítio neural para um grande número de funções fisiológicas relacionadas com reações de comportamento (como o medo e a ansiedade), regulação cardiovascular, lordose reflexa e modulação da dor (BANDLER et al, 1991, apud BANDLER et al, 2000; BEHBEHANI, 1995 apud MCGARAUGHTY et al, 2003; LOVICK, 1993 apud KEAY; BANDLER, 2001). Respostas comportamentais ativas estão associadas com excitação simpática

(hipertensão e taquicardia) e respostas passivas à inibição simpática [bradicardia e hipotensão; (BANDLER et al, 2000)].

Essa estrutura refere-se à região que circunda o aqueduto cerebral (Sylvius) e devido às conexões recíprocas entre a SCP e o sistema límbico prosencefálico, a SCP foi postulada como pertencente à chamada área límbica mesencefálica (NAUTA, 1958).

A partir da década de 70, a citoarquitetura da SCP passou a ser alvo de muito interesse, e observando-se as respostas neurovegetativas e comportamentais evocadas pela administração local de aminoácidos excitatórios (AAE) sugeriu-se que esta estrutura poderia ser subdividida de forma radial em cinco regiões distintas: dorsomedial, dorsolateral, lateral, ventrolateral e ventral, cada uma delas formando uma coluna ao longo do seu eixo rostro-caudal (BANDLER et al, 2000). Atualmente destacam-se apenas as primeiras 4 regiões.

O envolvimento da SCP em respostas comportamentais foi demonstrado inicialmente por FERNANDEZ DE MOLINA e HUSPENGER (1959), que ao estimularem eletricamente a SCP de gatos, observaram comportamentos defensivos. Posteriormente, SCHENBERG e GRAEFF (1978) observaram que a estimulação da porção dorsal da SCP (SPCd - que compreende as porções dorsomedial e dorsolateral) em ratos também possui propriedades aversivas, pois, ratos treinados aprendiam rapidamente a interromper a estimulação elétrica dessa região.

Anatomicamente, sugere-se que o comportamento ativo mediado pela SCPd provavelmente é impulsionado por estressores que tem um forte componente psicológico (FLOYD et al, 2000 apud KEAY; BANDLER, 2001) o

que desencadeia preferencialmente uma reação comportamental ativa - luta ou fuga.

Em relação à porção lateral da SCP (SCPI) essa é ativada por estressores físicos “escapáveis”, desencadeando a mesma resposta ativa, no entanto, a porção ventrolateral SCPvl é ativada por estressores físicos e psicológicos “inescapáveis” que desencadeiam uma resposta comportamental passiva – imobilidade e quietude (BANDLER et al, 2000; KEAY; BANDLER, 2001).

Além da estimulação elétrica, a injeção de aminoácidos excitatórios (AAE) como o glutamato, L-aspartato e D,L-homocisteico (DLH) na SCP de gatos também promove comportamento defensivo, como a dilatação da pupila, ereção dos pêlos, retração das orelhas e vocalização, que são semelhantes às estratégias naturais ocorridas quando esses animais são ameaçados ou atacados (FINN, 2003; BANDLER, 1982; BANDLER, 1988; apud BANDLER et al, 2000). Em ratos observam-se comportamentos incondicionados, como reações de escape ou fuga, congelamento e alterações autonômicas [elevação da pressão arterial e da frequência cardíaca, sudorese e piloereção (BANDLER, 1988; KRIEGER; GRAEFF, 1985; SCHENBERG et al, 2001)].

Esses comportamentos são remanescentes de ataques de pânico experimentais e clínicos em humanos, sugerindo que porção dorsal da SCP modula respostas de luta e fuga em situações de medo extremo (DEAKIN; GRAEFF, 1991), e partir da semelhança dessas repostas em humanos e animais a estimulação dessa região tem sido proposta como um modelo experimental de ataques de pânico (GRAEFF, 1991; LOVICK, 1993).

De forma similar ao modelo de estimulação aversiva na SCPd, o Labirinto em T Elevado (LTE) associa a resposta de escape ou fuga ao pânico (GRAEFF et al, 1998). Diversos estudos validaram esse modelo animal, tanto do ponto de vista farmacológico quanto comportamental (GRAEFF et al, 1993b, 1998; VIANA et al, 1994; ZANGROSSI; GRAEFF, 1997; SANSON; CAROBREZ, 1999; ZANGROSSI et al, 2001; ZANOVELI et al, 2003; DE PAULA SOARES; ZANGROSSI, 2004). A administração crônica (21 dias) da fluoxetina (POLTRONIERI et al, 2003) e da imipramina (TEIXEIRA et al, 2000) promovem efeito inibitório sobre o comportamento de fuga no LTE, o que está de acordo com as evidências clínicas que demonstram o efeito panicolítico dessas drogas em pacientes com o transtorno do pânico (KLEIN; FINK, 1962; LEPOLA et al, 2003; LYDIARD; BALLENGER, 1987).

Diversos estudos empregando a utilização desses modelos animais têm descrito a participação de alguns neurotransmissores na mediação de respostas defensivas (BANDLER, 1988; KRIEGER; GRAEFF, 1985; SCHENBERG et al, 2001; AGUIAR et al, 2006; CASAROTTO et al, 2011; ZANOVELI et al, 2003).

### **3. Neurotransmissores envolvidos na mediação de respostas aversivas**

Os circuitos neuroanatômicos responsáveis pelas respostas defensivas são modulados por diversos neurotransmissores, como o hormônio liberador de corticotrofinas, neuropeptídeo Y, substância P, transmissores monoaminérgicos (noradrenalina, serotonina e dopamina), ácido gamma-aminobutírico (GABA), óxido nítrico, glutamato, vanilóides e canabinóides (BERGINK et al, 2004; DEAKIN; GRAEFF, 1991; GUIMARAES et al, 2005; MIGUEL, 2010).

### 3.1 Sistema glutamatérgico

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso dos mamíferos e aproximadamente 60% dos neurônios utilizam esse aminoácido como neurotransmissor (JAVITT, 2004). CURTIS e colaboradores (1959; 1960) foram os primeiros pesquisadores a obter evidências concludentes sobre a ação excitatória do glutamato e do aspartato sobre neurônios. Porém, somente a partir da década de 70, o glutamato tornou-se amplamente conhecido por ser o principal neurotransmissor excitatório dentro do sistema nervoso central (SNC) de vertebrados (MELDRUM, 2000).

Ao longo dos últimos anos, experimentos realizados mostraram envolvimento do glutamato na plasticidade sináptica (COTMAN et al, 1988), aprendizado, memória (MORRIS, 1989), epilepsia (MELDRUM, 1985), ansiedade (MATHEUS et al, 1994) e depressão (MAES et al, 1995). Esse AAE pode ser encontrado em vesículas sinápticas e é liberado de forma dependente do influxo de  $Ca^{2+}$  ou como precursor do GABA em sinapses inibitórias (para revisão ver CAROBREZ, 2003). No interior das células gliais o glutamato é convertido em glutamina e liberado no fluido extracelular, onde é recaptado para o terminal pré-sináptico, e convertido novamente em glutamato via ação da enzima glutaminase neuronal (AMARA; FONTANA, 2002).

O glutamato pode exercer muitos papéis centrais, atuando em diversos receptores específicos para AAE (COLLINGRIDGE; LESTER, 1989). Através de estudos farmacológicos, sugeriu-se pela primeira vez, a existência de múltiplos receptores para o glutamato (MCLENNAN et al, 1968). Atualmente, os receptores glutamatérgicos são classificados como metabotrópicos (mGluR) e ionotrópicos [iGluR;(NAKANISHI, 1992; OZAWA; KAMIYA; TSUZUKI, 1998)].

Os receptores mGLU são acoplados à proteína G e constituem uma classe de oito subtipos de receptores, classificados em três grupos: I, II e III (MONAGHAN et al, 1989). Os receptores do grupo I (mGLU1 e mGLU5) são acoplados a proteína Gq que ativa a fosfolipase C e conseqüentemente há a formação de segundos mensageiros e liberação de  $Ca^{2+}$  de reservas intracelulares; já os receptores do grupo II (mGLU2 e mGLU3) e do grupo III (mGLU4, mGLU6, mGLU7 e mGLU8) são acoplados a proteína Gi, que inibem a adenilato ciclase e conseqüentemente a formação do monofosfato cíclico de adenosina [AMPC; (SPOOREN et al, 2003)].

Já os receptores iGLU foram subseqüentemente classificados de acordo com o agonista mais seletivo e subdivididos em NMDA (N-metil-D-aspartato), AMPA (ácido  $\alpha$ -amino- 3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiônico) e cainato (WATKINS, 2000). Todos esses receptores constituem canais iônicos que são permeáveis a cátions, embora a permeabilidade relativa aos íons  $Na^+$  e aos íons  $Ca^{2+}$  varie de acordo com a família e a composição de subunidades do receptor (MELDRUM, 2000). O subtipo NMDA possui várias subunidades denominadas NR1 (onde se liga a glicina), NR2A-D (onde se liga o glutamato) e a NR3A-B; os receptores AMPA são formados por subunidades GLUR1-4 e os receptores cainato são formados por subunidades GLUR5-7 ou  $GLU_{KA}5-7$ ,  $KA1-2$  ou  $GLU_{KA}1-2$  (HUETTNER, 2003).

Dentre os receptores glutamatérgicos, o subtipo NMDA tem sido o mais estudado, em virtude da existência de drogas altamente seletivas para esse receptor (LEESON, 1993).

O complexo do receptor NMDA está envolvido em muitos processos funcionais, tais como: memória, aprendizado, desenvolvimento neuronal

(MORRIS, 1989; COTMAN; MONAGHAN, 1988; BLISS; COLLINGRIDGE, 1993), epilepsia (MELDRUM, 1985) e distúrbios afetivos como depressão e ansiedade (GRAEFF et al, 1988; GRAEFF, 1991; MATHEUS et al, 1994; para revisão ver, BERGINK et al, 2004).

Nos últimos anos, estudos comportamentais destacam o envolvimento dos receptores NMDA na mediação das reações defensivas (BANDLER, 1982; DEPAULIS; BANDLER; VERGNES, 1989; SILVEIRA; GRAEFF, 1992; ZHANG; BANDLER; CARRIVE, 1990; MOREIRA et al, 2004; AGUIAR et al, 2006). De maneira complementar, estudos revelaram que os receptores NMDA estão presentes em toda a extensão rostrocaudal da coluna dorsolateral da SCP [SCPdl (ALBIN et al, 1990)].

Diversas evidências sugerem que o glutamato desempenha um papel facilitador nas reações de defesa na SCPdl. Trabalhos iniciais mostraram a ocorrência de respostas comportamentais de luta ou fuga após administração de glutamato na SCPdl de gatos (CARRIVE, 1987) e ratos (KRIEGER; GRAEFF 1985) bem como a ocorrência de reações autonômicas, como o aumento de pressão arterial e frequência cardíaca (CARRIVE, 1993; DA SILVA et al, 2006). Esse mesmo comportamento foi observado com a administração do NMDA [agonista seletivo do receptor NMDA do glutamato (BITTENCOURT et al, 2004; FERREIRA-NETTO et al, 2005, AGUIAR et al, 2006)].

No LTE, a administração intra-SCPdl do agonista seletivo de receptores NMDA promoveu o aumento do comportamento da esquiva inibitória, sugerindo um efeito tipo ansiogênico, que foi bloqueado pelo antagonista desses receptores (BERTOGLIO; ZANGROSSI, 2006).

De maneira oposta, a injeção de um antagonista do receptor NMDA (rNMDA), o AP-7, administrado na SCPdl produz efeitos ansiolíticos (GUIMARÃES et al, 1991) nos modelos animais de ansiedade, o Labirinto em Cruz Elevado (LCE) e o teste de lambem punido de Vogel (MOLCHANOV; GUIMARÃES, 2002), além de efeitos anti-aversivos durante a exposição ao predador (AGUIAR; GUIMARÃES, 2009), sugerindo que a neurotransmissão glutamatérgica na SCPdl exerce um papel facilitatório nas reações de defesa promovidas pela SCPdl.

### 3.2. Sistema vanilóide

Em 1997, o receptor vanilóide subtipo 1 foi clonado a partir de células de ratos localizadas no glânglio da raiz dorsal e os autores demonstraram ser um subtipo não seletivo de canais para cátions que estão relacionados com a família de receptores de potencial transitório [TRP; (CATERINA et al, 1997; CORTRIGHT; SZALLASI, 2004; ROBERTS et al, 2004; STAROWICZ et al, 2007b)]. Este receptor foi denominado pelos autores como "receptor vanilóide tipo 1" (VR1) e, posteriormente renomeado pela União Internacional de Farmacologia Básica e Clínica (IUPHAR) como receptor vanilóide de potencial transitório subtipo 1 [TRPV1; (CLAPHAM et al, 2005)].

O TRPV1 foi o primeiro membro da família de receptores vanilóides (TRPV1 à TRPV6) a ser caracterizado. São denominados de receptores vanilóides pelo fato de seus principais agonistas, a capsaicina [(8-methyl-N-vanilil-6-nonanamida) principal e mais irritante constituinte ativo da *Capsicum sp*, popularmente conhecida como pimenta vermelha] e o seu potente análogo,

a resiniferatoxina (RTX), possuírem em sua estrutura química o grupamento homovanilil (SZALASSI; BLUMBERG, 1999).

Dentre os ligantes endógenos dos receptores TRPV1 (endovanilóides) estão a anandamida (AEA), a N-araquidonoildopamina (NADA), 12-S-ácido hidroperoxieicosatetranoico (12-HPETE), oleoiletanolamida e N-oleoildopamina (VAN DER STELT; DI MARZO 2004; STAROWICZ et al, 2007b; HWANG et al, 2000; HUANG et al, 2002; CHU et al, 2003).

O principal endovanilóide que tem sido foco de muitos estudos é a anandamida, que é sintetizada a partir de fosfolípidos de membrana, sendo o influxo de  $Ca^{2+}$  o fator desencadeante para a sua síntese. Desta forma, o passo limitante para o início de sua ação é a própria síntese, e não a liberação vesicular (a síntese ocorre conforme a demanda). Esse endovanilóide pode ainda ser degradado pela ação da enzima hidrolase de amida de ácidos graxos (FAAH), responsável pela sua metabolização e que possivelmente está localizada em neurônios pós-sinápticos (DI MARZO et al, 1994). Tal composto é também considerado um endocanabinóide uma vez que é capaz de ativar receptores canabinóides.

Além de serem ativados por endovanilóides, os receptores TRPV1 também podem ser ativados pelo calor, baixos níveis de pH e substâncias exógenas (CATERINA et al, 1997; SMART et al, 2000; TOMINAGA; CATERINA 2004; VAN DER STELT; DI MARZO, 2004; CALIXTO et al, 2005).

Os receptores TRPV1 são altamente expressos nas fibras aferentes primárias de pequeno diâmetro (HOLZER, 1991). Dessa forma, a capsaicina, agonista TRPV1, age por duas maneiras distintas, inicialmente induzindo a nocicepção devido ao aumento da condutância do canal com consequente

liberação de mediadores pró-inflamatórios (SOUTHALL et al, 2003) e, depois de repetidas administrações, essa ação é seguida por uma resposta oposta, sendo a antinocicepção, que ocorre por dessensibilização dos receptores (SZALLASI; BLUMBERG, 1999; SZALLASI; DI MARZO, 2000; DRAY, 1992; GREEN, 1989; HAYES et al, 1984).

A injeção local de capsaicina na SCPdl induz respostas antinoceptivas (PALAZZO et al, 2002). Na SCPvl, a capsaicina aumentou o limiar nociceptivo térmico, enquanto o antagonista de TRPV1, 5-iodo-resiniferatoxina facilitou as respostas nociceptivas e bloqueou a resposta da capsaicina (STAROWICZ et al, 2007a). A elevação dos níveis de AEA na SCP, promovida pela utilização de um inibidor da enzima que degrada a AEA, a FAAH, provocou analgesia mediada por receptores TRPV1 (STAROWICZ et al, 2007b).

Esses receptores também são expressos em várias regiões do SNC que não estão associadas a neurônios sensoriais primários (SZALLASI; BLUMBERG, 1999), como por exemplo, o bulbo olfatório, córtex, hipocampo, hipotálamo e mesencéfalo (TOTH et al, 2005), sugerindo que os receptores TRPV1 estejam envolvidos em diversas funções do SNC. A presença dos TRPV1 em estruturas envolvidas na elaboração dos comportamentos defensivos como o córtex pré-frontal, complexo amigdalóide, hipocampo, hipotálamo e SCP (MEZEY et al, 2000; MCGARAUGHTY et al, 2003; TOTH et al, 2005) sugere que esses receptores também controlam os estados emocionais relacionados ao medo e ansiedade.

Em um estudo realizado por KASCKOW e colaboradores (2004), a administração sistêmica da capsazepina, um antagonista de receptores TRPV1, promoveu efeito tipo ansiolítico em animais expostos ao LCE,

sugerindo que a ativação desses receptores facilita os comportamentos relacionados com ansiedade em animais. Utilizando camundongos nocautes para TRPV1, MARSCH et al (2007), observaram o comportamento tipo ansiolítico desses animais no LCE e na caixa claro-escuro, quando comparado aos animais selvagens, além de apresentarem menor congelamento no modelo do medo condicionado auditivo.

No intuito de verificar quais seriam os sítios neurais responsáveis pelos efeitos promovidos pelos TRPV1 nas respostas aversivas, TERZIAN et al (2009) observaram que a injeção local da capsazepina na SCPdl promoveu efeito ansiolítico em ratos submetidos ao LCE e ao teste de lambar punido de Vogel. Resultados semelhantes também foram observados após a administração desse antagonista no córtex pré-frontal medial [CPFm; (AGUIAR et al, 2009)]. Em conjunto, esses dados confirmaram o envolvimento dos receptores vanilóides na modulação dos estados emocionais relacionados à ansiedade e sugerem o CPF e a SCPdl como substratos neurais desses comportamentos.

No SNC a ativação dos TRPV1 estaria relacionada com o aumento da liberação de neurotransmissores, especialmente facilitando a neurotransmissão glutamatérgica devido ao influxo de íons  $Ca^{2+}$  nos neurônios pós-sinápticos (MARINELLI et al, 2003; STAROWICZ et al, 2007a; XING, LI, 2007). Nesse sentido, trabalhos prévios demonstraram que a ativação dos receptores TRPV1 pode regular a liberação do glutamato em diversas estruturas encefálicas (TOHDA; SASAKI et al, 2001; DOYLE et al, 2002; JENNINGS et al, 2003; XING; LI 2007). SASAMURA et al (1998) demonstraram que a capsaicina promove a liberação de glutamato em fatias de hipotálamo e no corno dorsal da

medula espinhal, sendo que essa resposta é dependente de  $Ca^{2+}$  e inibida pelo antagonista de receptores TRPV1, a capsazepina. Em outro estudo realizado foi observado que a administração da capsaicina em fatias da SCPdl também facilita a liberação do glutamato, sendo que esse efeito deixa de ser observado com o pré-tratamento de 5-iodo-resiniferatoxina [antagonista específico de receptores TRPV1; (XING; LI, 2007)], sugerindo assim que os receptores TRPV1 são expressos em neurônios pré-sinápticos glutamatérgicos, onde sua ativação pode potencializar a liberação desse neurotransmissor.

Adicionalmente, a administração da capsaicina intra-SCPdl induziu nocicepção, efeito que foi revertido pelo pré-tratamento com capsazepina (PALAZZO et al, 2002). A resposta comportamental induzida pelo agonista TRPV1 foi acompanhada por um aumento local de glutamato, efeito este similar ao obtido *in vitro* em outras estruturas encefálicas, como por exemplo, substância nigra e locus coeruleus (MARINELLI et al, 2002; PALAZZO et al, 2002; MARINELLI et al, 2003). Recentemente, STAROWICZ et al (2007a) observaram que neurônios localizados na SCPvl são imunorreativos para os receptores TRPV1, além de estarem circundados por neurônios glutamatérgicos. Além disso, esses neurônios glutamatérgicos respondem à estimulação de TRPV1 através da liberação de glutamato, e são bloqueados pelo pré-tratamento com um antagonista vanilóide. Em conjunto, esses dados sugerem que a ativação dos receptores TRPV1 facilita a neurotransmissão glutamatérgica.

Assim, considerando que o glutamato facilita as respostas defensivas mediadas pela SCPdl e que a ativação de TRPV1 possivelmente facilita a neurotransmissão glutamatérgica, uma hipótese desse trabalho foi verificar

uma possível interação entre esses dois sistemas na modulação das respostas defensivas promovidas pela SCPdl.

### 3.3 Sistema canabinóide

Conforme mencionado anteriormente a anandamida, além de ser um composto endovanilóide, é também um dos ligantes endógenos do sistema canabinóide (DEVANE et al, 1992). Os receptores canabinóides foram identificados através de estudos empregando radioisótopos marcados e identificados como dois subtipos principais: tipo 1 (CB<sub>1</sub>) e tipo 2 (CB<sub>2</sub>) (HOWLETT; FLEMING, 1984; HERKENHAM et al, 1990).

O mecanismo de transdução de sinal dos receptores canabinóides consiste na ativação de uma proteína Gi que, por sua vez, inibe a atividade da adenilato ciclase. O resultado é a menor conversão de trifosfato de adenosina (ATP) em monofosfato cíclico de adenosina (AMPc), com conseqüente redução de atividade da proteína quinase A (PKA) e dos efeitos biológicos mediados por ela (DEVANE et al, 1988). Os receptores canabinóides podem também aumentar a condutância de canais para potássio e inibir canais para cálcio modulando a atividade neuronal e a liberação de outros neurotransmissores (PIOMELLI, 2003) como GABA (KATONA et al, 1999) e glutamato (DOMENICI et al, 2006; MELIS et al, 2004; SHEN et al, 1996; TAKAHASHI; CASTILLO, 2006; VAUGHAN et al, 2000).

Os efeitos de compostos canabinóides naturais e sintéticos são complexos e variados em diversos modelos animais de ansiedade. Geralmente, esses compostos exercem efeitos bifásicos em vários modelos,

como por exemplo, o LCE, LTE, labirinto zero, caixa claro-escuro e no teste de lambear punido de Vogel (MOREIRA et al, 2009a, 2009b; VIVEROS et al, 2005). Geralmente, efeitos ansiolíticos são observados com doses baixas, enquanto que efeitos ansiogênicos ou ausência de efeito são observados com altas doses (MOREIRA; LUTZ, 2008; MOREIRA et al, 2009a, 2009b; VIVEROS et al, 2005).

Efeitos bifásicos também são observados após a injeção de AEA intra-SCPdl (MOREIRA et al, 2007, LISBOA et al, 2008). Efeitos ansiolíticos são observados com baixas doses e mediados pela ativação de receptores CB<sub>1</sub>, enquanto que este efeito desaparece com doses maiores possivelmente devido à ação desse composto também em receptores TRPV1 (MOREIRA et al, 2007). Nesse sentido, dados da literatura sugerem que a anandamida liga-se aos receptores TRPV1 com uma menor afinidade em relação a sua ligação em receptores CB<sub>1</sub>, o que explicaria os efeitos ansiolíticos observados em baixas doses e a ausência de efeito em altas doses (MOREIRA et al, 2007).

Até o momento, a maioria dos estudos tem investigado a participação dos receptores CB<sub>1</sub> e TRPV1, isoladamente, na modulação dos comportamentos relacionados ao medo e ansiedade. Porém, há várias evidências que esses dois sistemas possam atuar concomitantemente na modulação de diversas respostas comportamentais (MAIONE et al, 2006; MICALE et al, 2009; RUBINO et al, 2008; MOREIRA et al, 2011). Dados da literatura mostram que receptores CB<sub>1</sub> e TRPV1 são co-expressos em regiões responsáveis pelo controle dos comportamentos aversivos, como por exemplo, CPF, complexo amigdalóide, hipocampo e SCPdl (CRISTINO et al, 2006; MICALE et al, 2009; CASAROTTO et al, 2011) como também na SCPvl onde

estes compostos estão envolvidos com respostas nociceptivas (CRISTINO et al, 2006; MAIONE et al, 2006).

Dessa forma pode-se sugerir que os sistemas vanilóide e canabinóide modulam as respostas defensivas mediadas pela SCPdl de maneiras opostas. Enquanto a ativação de receptores CB<sub>1</sub> inibe os estados de medo e ansiedade e, conseqüentemente promovem efeitos ansiolíticos, a ativação de receptores TRPV1 facilita o comportamento aversivo (MOREIRA et al, 2011). Nesse sentido, dados recentes do nosso grupo indicaram que o efeito tipo panicolítico promovido por antagonistas TRPV1 é dependente da sinalização do receptor CB<sub>1</sub>, pois, este efeito é bloqueado pelo antagonista desses receptores (CASAROTTO et al, 2011).

Considerando-se o exposto acima, outra hipótese deste trabalho foi de testar se os efeitos promovidos pelo bloqueio dos receptores TRPV1 no Labirinto em T Elevado também são dependentes da ação de receptores CB<sub>1</sub>.

*OBJETIVOS*

## **1. Objetivo geral**

O objetivo geral do presente trabalho foi verificar a participação dos receptores vanilóides TRPV1 na modulação das respostas defensivas mediadas pela SCPdl.

## **2. Objetivos específicos**

- A) Testar a hipótese de que o pré-tratamento com antagonista TRPV1 atenuará as respostas de fuga induzidas pelo agonista de receptores NMDA na SCPdl.
- B) Testar a hipótese de que o tratamento com antagonista de receptor TRPV1 atenuará as respostas de fuga no Labirinto em T Elevado.
- C) Testar a hipótese de que o pré-tratamento com antagonista de receptor CB<sub>1</sub> bloqueará os efeitos promovidos pelo antagonista de receptor TRPV1 no Labirinto em T Elevado.

## *MATERIAIS E MÉTODOS*

## **1. Animais**

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar, pesando entre 220-240 gramas, provenientes do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, após aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Experimentação Animal (protocolo 250 /2010).

Os ratos foram mantidos em grupos de 5 animais por gaiola, com livre acesso à água e comida, sob ciclo claro-escuro de 12 h (início às 7:00 h) e temperatura controlada ( $24 \pm 2^\circ\text{C}$ ).

## **2. Drogas**

Foram utilizadas as seguintes drogas:

- Capsazepina (antagonista de receptores TRPV1, Tocris<sup>®</sup>): 1, 10, 30 e 60 nmol/0,2  $\mu\text{L}$ , diluída em Dimetilsulfóxido (DMSO) 100% (TERZIAN et al, 2009).
- N-metil-D-Aspartato, NMDA (agonista de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, Sigma<sup>®</sup>): 1 nmol/0,2  $\mu\text{L}$ , diluído em Salina 0,9% (AGUIAR et al, 2006).
- N-(piperidin-1yl)-5-(4-iodophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methyl-1pyrazole-3-carboxamide, AM251(antagonista de receptor CB<sub>1</sub>, Sigma<sup>®</sup>): 1, 10 e 100 pmol/0,2  $\mu\text{L}$  diluído em Salina 0,9% (MOREIRA et al, 2007; LISBOA et al, 2008).

## **3. Cirurgia estereotáxica**

Os animais foram anestesiados com Ketamina (60 mg/Kg) e Xilazina (8 mg/Kg), via i.p e fixados a um aparelho estereotáxico. Foi realizada uma

incisão sagital para exposição da calvária e remoção do perióstio, a calota craniana foi perfurada com um orifício (coordenadas: AP-lambda 0 mm, L-1,9 mm, P-4,3 mm, ângulo-16°, PAXINOS; WATSON, 1997) para introdução da cânula guia (11 mm) dirigida à SCPdl, a qual foi fixada ao crânio com cimento acrílico, conforme descrito em trabalhos prévios (GUIMARÃES et al, 1991; AGUIAR et al, 2006). Foi introduzido na cânula um mandril de aço inoxidável para evitar obstrução. Os animais receberam injeção de pentabiótico e do analgésico, antitérmico e antiinflamatório Banamine<sup>®</sup> (flunixin meglumine, 1 ml/Kg). Após a recuperação da anestesia, os animais foram alojados no biotério até seu restabelecimento (7 dias) e então foram submetidos à injeção na SCPdl.

#### **4. Injeção**

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

#### **5. Testes Comportamentais**

##### **5.1 Caixa de observação**

A caixa de observação é constituída de acrílico transparente (29 X 19 X 34 cm) com tampa de malha plástica (Figura 1). O comportamento dos animais

foi gravado por 2 minutos a partir do início da infusão das soluções por uma câmera de vídeo (Samsung, SMX-C10LN/XAA) localizada lateralmente à caixa, a uma distância aproximada de 50 cm. Os filmes foram depois reproduzidos em um computador, registrando-se o número de pulos e cruzamentos da linha média da caixa. O critério utilizado para considerar um pulo era de que o animal retirasse as quatro patas do chão simultaneamente e para considerar um cruzamento era necessário que o animal atravessasse a linha média com as quatro patas (MOLCHANOV, 1999; AGUIAR et al, 2006). Após cada teste a caixa foi limpa com álcool (70 %).



**Figura 1:** Caixa de observação

## 5.2 Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

O aparelho é dotado de quatro braços de iguais dimensões, sendo dois deles abertos e dois fechados situados a 50 cm de altura do solo. O LCE

(Figura 2) foi desenvolvido por HANDLEY e MITHANI (1984) e se baseia no conflito entre explorar um ambiente novo, caracterizado pela saída do braço fechado mais seguro, em contrapartida a um evento aversivo caracterizado pelos braços abertos, uma vez que o animal está mais exposto a possíveis ações de predadores (MONTGOMERY, 1955). Os experimentos foram filmados com auxílio de uma câmera de vídeo (Microsoft®) localizada 1,5 metros acima do labirinto durante 5 minutos. Simultaneamente, foram analisados com auxílio do software ANY-MAZE (versão 4.5), o qual registra a posição do animal no LCE e calcula a porcentagem de entradas nos braços abertos, a porcentagem de tempo gasto nos braços abertos e o número de entradas nos braços fechados do LCE. No intervalo entre os testes de cada animal o labirinto foi limpo com uma solução de álcool (70 %).

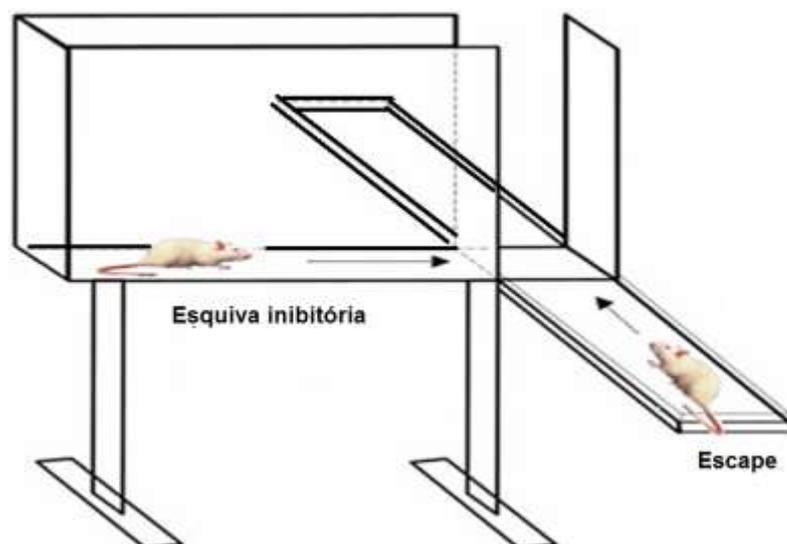


**Figura 2:** Labirinto em Cruz Elevado

### 5.3 Labirinto em T Elevado (LTE)

O aparelho experimental utilizado foi um labirinto de madeira (“Labirinto em T Elevado”, GRAEFF et al, 1998), que consiste em um modelo animal que avalia dois comportamentos relacionados a transtornos de ansiedade: a esquiva no braço fechado, relacionada à ansiedade generalizada, e o escape do braço aberto, relacionado ao pânico (Figura 3). O LTE é formado por um braço fechado e dois braços abertos, de 50 cm de comprimento por 10 cm de largura cada um e elevados 50 cm do solo. O braço fechado possui parede de madeira de 40 cm de altura que o circunda e está perpendicular aos braços abertos que não possuem uma borda lateral.

Antes de serem submetidos ao labirinto, os animais foram habituados ao experimentador por 3 dias, durante 3 minutos. No quarto dia cada animal foi pré-exposto por 30 minutos a um dos braços abertos. O teste foi realizado no quinto dia e nele cada animal foi submetido a três sessões partindo da extremidade do braço fechado, com a presença de uma barreira e três sessões partindo da extremidade do braço aberto ao qual o animal havia sido pré-exposto no dia anterior. Foi avaliada então, a latência para o animal chegar ao centro do labirinto (GRAEFF et al, 1998). No intervalo entre os testes o labirinto foi limpo com uma solução de álcool (70%).



**Figura 3:** Labirinto em T Elevado

#### 5.4 Campo aberto

O campo aberto consiste em uma caixa de madeira (60cm x 60cm) com paredes de altura de 40cm (Figura 4). Os experimentos foram filmados com auxílio de uma câmera de vídeo (Microsoft®) localizada 2,0 metros acima do campo aberto durante 5 minutos. Simultaneamente, foram registrados com auxílio do software ANY-MAZE (versão 4.5), a distância total percorrida pelo animal durante o teste. No intervalo entre cada animal o campo aberto foi limpo com uma solução de álcool (70 %).



**Figura 4:** Campo aberto

## **6. Histologia**

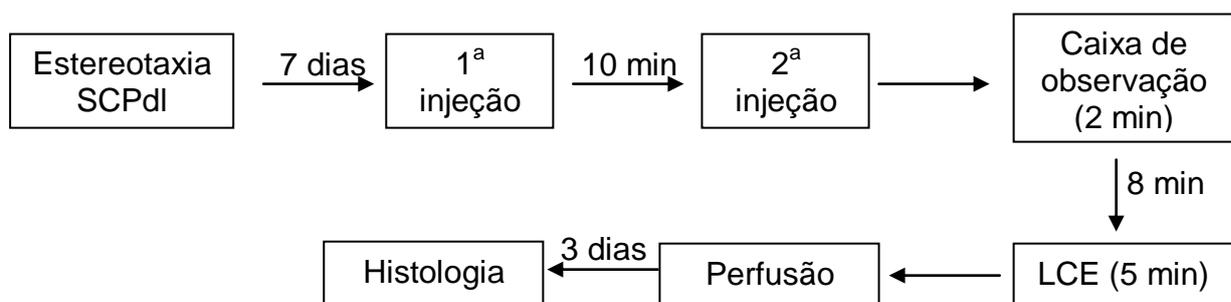
Ao término dos testes realizou-se a verificação do local da injeção. Os animais foram anestesiados com Uretana (25%, 5 mL/Kg de peso) e sofreram perfusão intracardíaca com salina 0,9 % e formol 10 %. Os cérebros foram extraídos, estocados em formol 10 % por três dias, e cortados, ao nível do sítio de injeção, em secções de 50  $\mu$ m de espessura em um criostato (Microm HM 505 N). Os cortes foram montados em lâminas de vidro gelatinizadas e foram analisados para a verificação do local de injeção com o auxílio de um microscópio, segundo os diagramas do Atlas PAXINOS e WATSON, 1997.

## 7. Delineamento experimental

Experimento 1: Efeito do antagonista TRPV1 sobre as respostas de fuga e de ansiedade induzidas pelo NMDA na SCPdl (n= 6-9 por grupo).

Grupos experimentais:

- Salina (0,2 µL) + DMSO (0,2 µL)
- Capsazepina (1 nmol/0,2 µL) + Salina (0,2 µL)
- Capsazepina (10 nmol/0,2 µL) + Salina (0,2 µL)
- Capsazepina (30 nmol/0,2 µL) + Salina (0,2 µL)
- DMSO (0,2 µL) + NMDA (1 nmol/0,2 µL)
- Capsazepina (1 nmol/0,2 µL) + NMDA (1 nmol/0,2 µL)
- Capsazepina (10 nmol/0,2 µL) + NMDA (1 nmol/0,2 µL)
- Capsazepina (30 nmol/0,2 µL) + NMDA (1 nmol/0,2 µL)

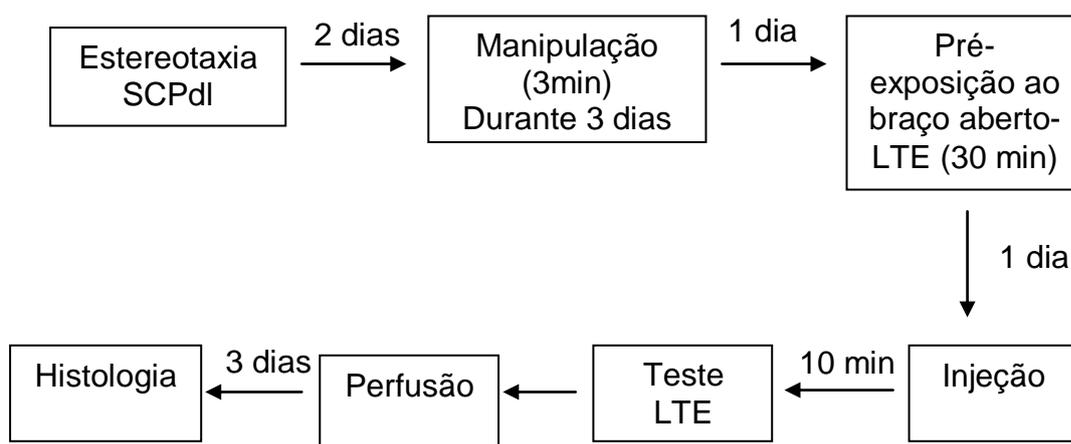


**Figura 5:** Representação esquemática do protocolo experimental 1.

Experimento 2: Efeito do antagonista TRPV1 na SCPdl no LTE (n= 6-8 por grupo).

Grupos experimentais:

- DMSO (0,2  $\mu$ L)
- Capsazepina (1 nmol/0,2  $\mu$ L)
- Capsazepina (10 nmol/0,2  $\mu$ L)
- Capsazepina (30 nmol/0,2  $\mu$ L)
- Capsazepina (60 nmol/0,2  $\mu$ L)

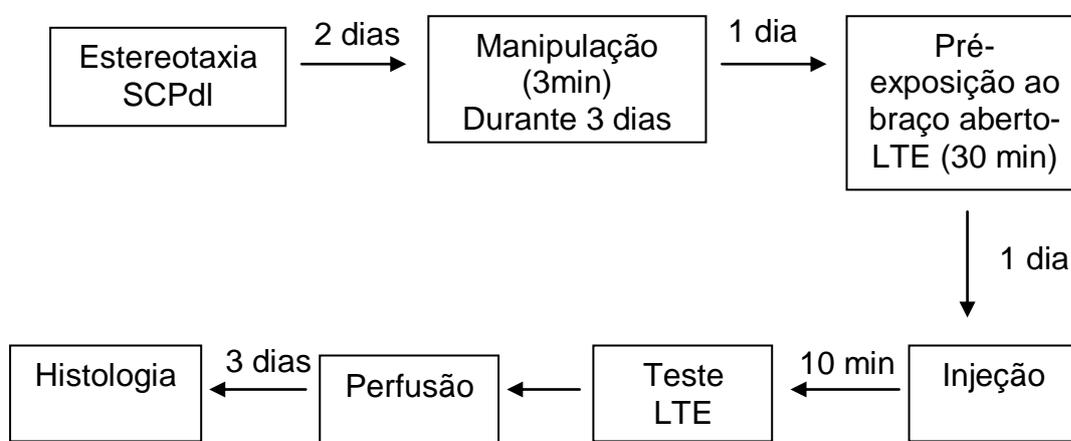


**Figura 6:** Representação esquemática do protocolo experimental 2.

Experimento 3: Efeito do antagonista CB<sub>1</sub> na SCPdl no LTE (n=6-9 por grupo).

Grupos experimentais:

- Salina (0,2 µL)
- AM251(1pmol/0,2 µL)
- AM251 (10 pmol/0,2 µL)
- AM251 (100 pmol/0,2 µL)

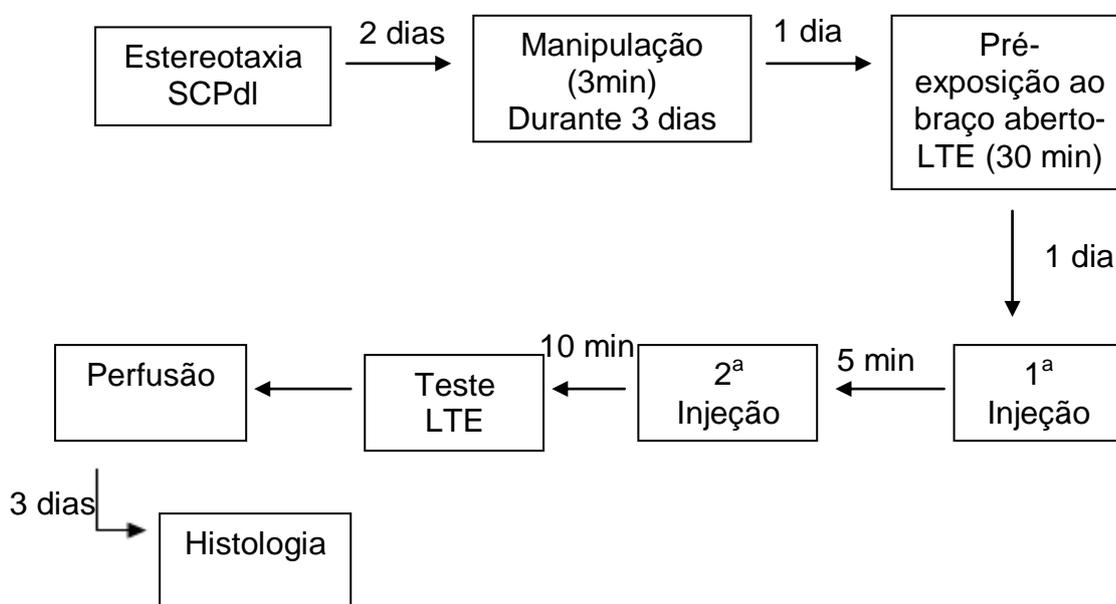


**Figura 7:** Representação esquemática do protocolo experimental 3.

Experimento 4: Efeito dos antagonistas CB<sub>1</sub> e TRPV1 na SCPdl no LTE (n= 5-9 por grupo).

Grupos experimentais:

- Salina (0,2 µL) + DMSO (0,2 µL)
- Salina (0,2 µL) + Capsazepina (60 nmol/0,2 µL)
- AM251 (100 pmol/0,2 µL) + DMSO (0,2 µL)
- AM251( 100 pmol/0,2 µL) + Capsazepina (60 nmol/0,2 µL)

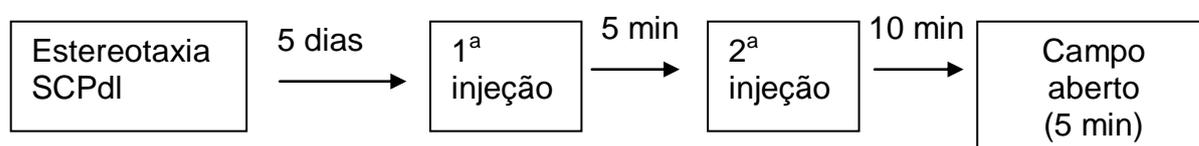


**Figura 8:** Representação esquemática do protocolo experimental 4.

Experimento 5: Efeito dos antagonistas CB<sub>1</sub> e TRPV1 na SCPdl no campo aberto (n= 3-4 por grupo).

Grupos experimentais:

- Salina (0,2 µL) + DMSO (0,2 µL)
- Salina (0,2 µL) + Capsazepina (60 nmol/0,2 µL)
- AM251 (100 pmol/0,2 µL) + DMSO (0,2 µL)
- AM251(100 pmol/0,2 µL) + Capsazepina (60 nmol/0,2 µL)



**Figura 9:** Representação esquemática do protocolo experimental 5.

## **8. Análise estatística**

Os resultados referentes à avaliação da caixa comportamental foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido de Mann-Whitney, e o nível de significância estabelecido foi de  $p < 0,05$ .

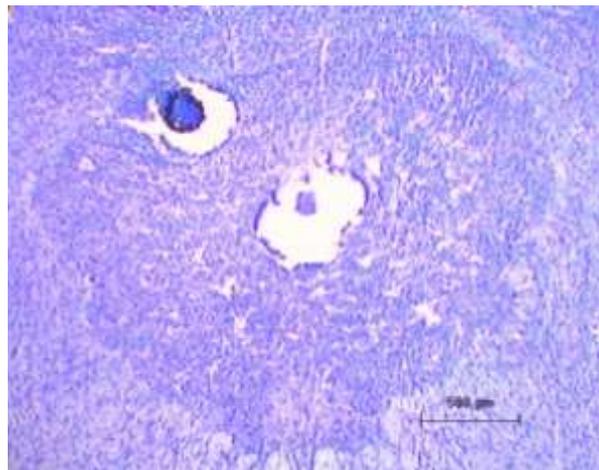
Os resultados do LCE foram analisados pela Análise de Variância (ANOVA) seguida de teste de Duncan e o nível de significância estabelecido foi de  $p < 0,05$ .

Para os resultados do LTE foram observados os tempos de latência para saída dos braços do labirinto analisados por análise de variância, levando-se em conta os fatores “tratamento” (veículo ou drogas) e “sessão” (já que 3 exposições consecutivas foram realizadas). O pós-teste realizado foi de Bonferroni e o nível de significância estabelecido foi de  $p < 0,05$ .

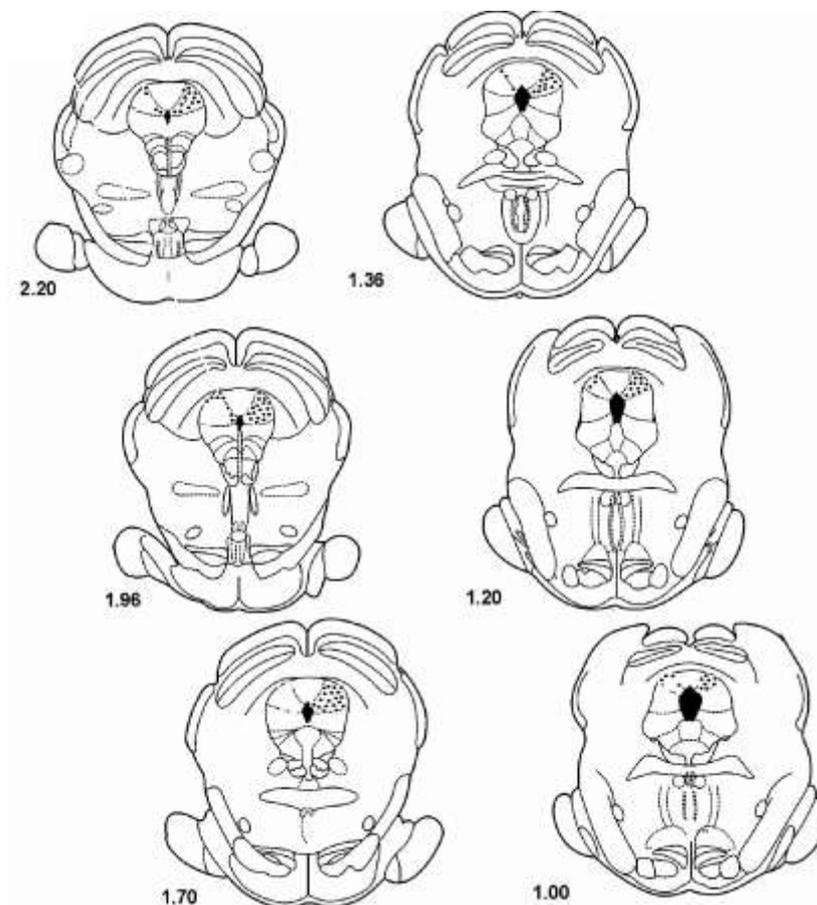
Os resultados referentes à distância total percorrida pelos animais no campo aberto foram analisados através da análise de variância de uma via seguida do teste de Bonferroni e o nível de significância estabelecido foi de  $p < 0,05$ .

## *DESCRIÇÃO DOS RESULTADOS*

A)



B)



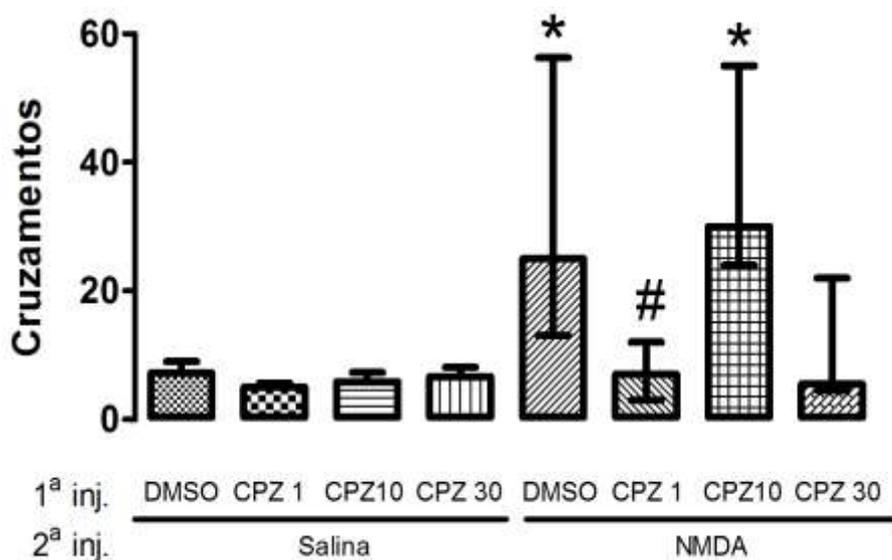
**Figura 10:** A) Fotografia de lâmina histológica com secção coronal representativa do sítio de injeção na SCPdl; técnica de coloração de Nissl. B) Localização de sítios de injeção em diagramas modificados do Atlas de PAXINOS e WATSON (1997) mostrando os sítios de injeções atingidos (●) pelas microinjeções na SCPdl.

### **1. Efeito do pré-tratamento com a capsazepina nas respostas de fuga induzidas pelo agonista de receptores NMDA intra-SCPdl.**

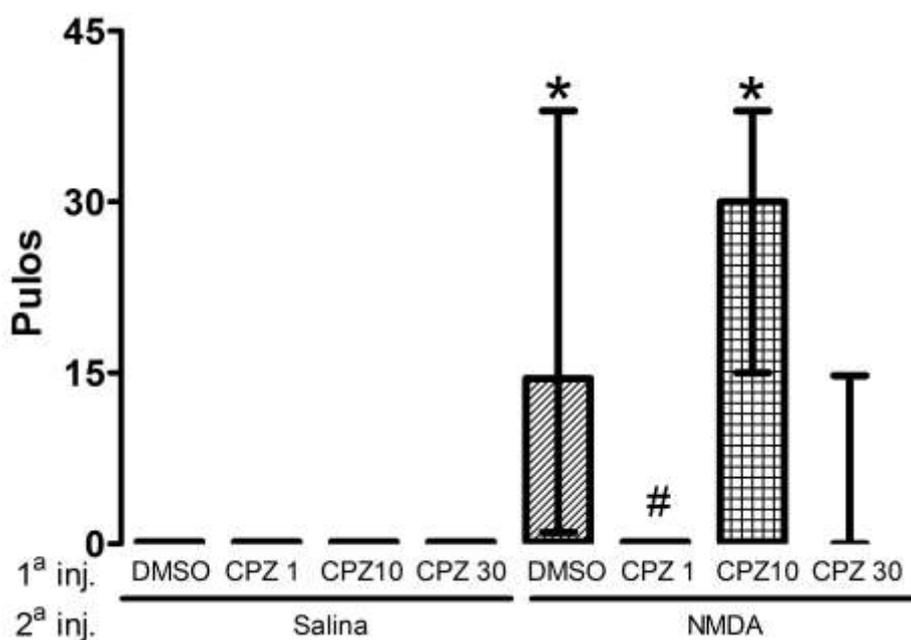
A injeção intra-SCPdl do NMDA (1nmol/0,2 µL) produziu reações de fuga que ocorreram a partir do início da injeção. Esta reação caracteriza-se por um aumento significativo no número de cruzamentos ( $H_8=24,23$ ;  $p=0,001$ , Kruskal-Wallis) e pulos ( $H_8= 33,81$ ;  $p<0,0001$ , Kruskal-Wallis) em relação ao grupo controle (Figura 11 e 12, respectivamente). Tais reações de fuga não foram observadas quando o NMDA (1nmol/0,2 µL) foi injetado fora da SCPdl [cruzamentos ( $t_{17}= 2,624$ ;  $p<0,05$ ), Figura 13 e pulos ( $t_{17}= 2,833$ ;  $p<0,05$ ), Figura 14)].

O pré-tratamento com capsazepina na dose de 1nmol/0,2 µL reduziu significativamente as reações de fuga induzidas pelo NMDA na SCPdl, cruzamentos ( $p<0,05$ , Mann – Whitney; Figura 11) e pulos ( $p<0,01$ , Mann – Whitney; Figura 12). As doses de 10 e 30 nmol não atenuaram significativamente as respostas de fuga promovidas pela injeção de NMDA (Figura 11 e 12).

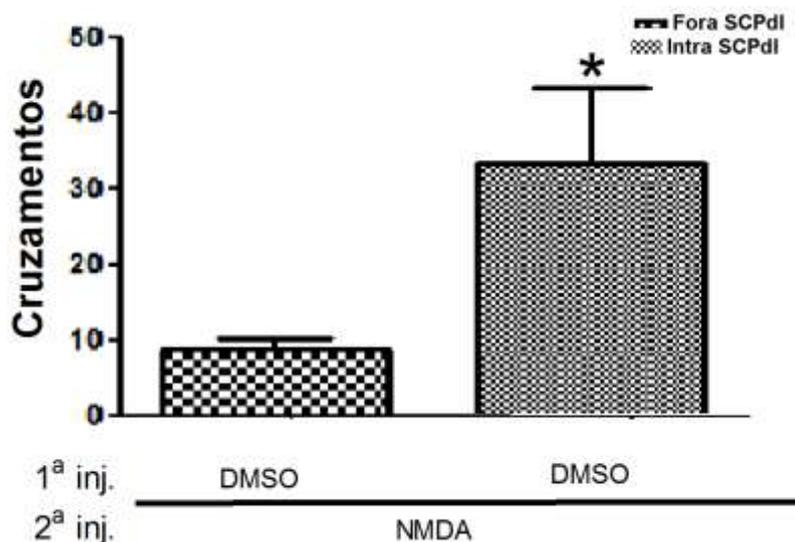
Após serem submetidos à caixa de observação, os animais foram expostos ao LCE. A Tabela 1 mostra os parâmetros avaliados no LCE em animais que receberam o pré-tratamento com capsazepina (1, 10 e 30 nmol/0,2 µL) seguido da injeção de NMDA (1 nmol/0,2 µL) intra-SCPdl e seus respectivos controles (DMSO ou salina). Pode-se observar que os tratamentos não promoveram diferença estatisticamente significativa entre os grupos no que refere à porcentagem de tempo [ $F_{(7,58)} = 1,006$ ; ns] e de frequência [ $F_{(7,58)} = 0,5404$ ; ns] nos braços abertos e no número de entradas nos braços fechados [ $F_{(7,58)} = 1,701$ ; ns].



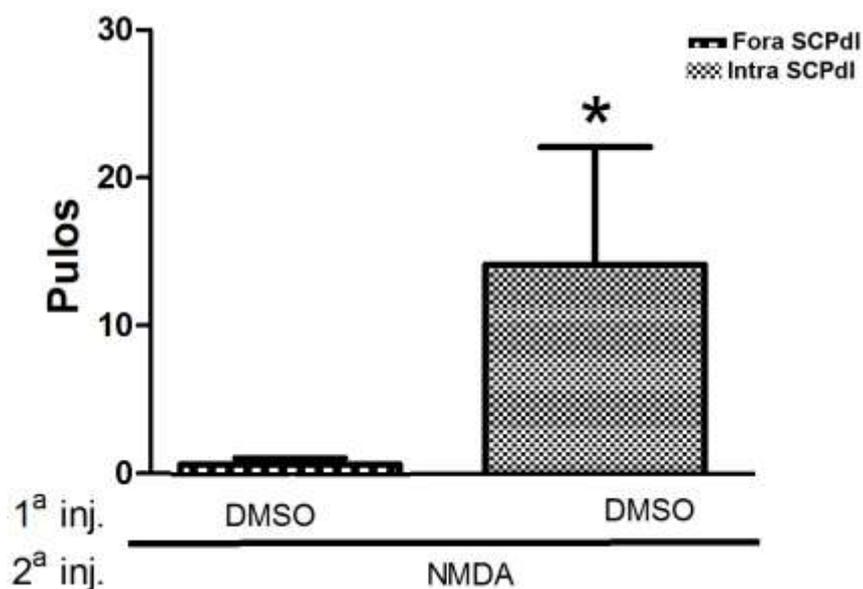
**Figura 11:** Efeito da Capsazepina (1, 10 e 30 nmol/0,2  $\mu$ L) na reação de fuga promovida pela injeção de NMDA (1 nmol/0,2  $\mu$ L) na SCPdl de ratos observados na caixa durante dois minutos a partir do início das injeções. As colunas representam mediana  $\pm$  I.R do número de cruzamentos (\* $p$ <0,001 em relação ao grupo controle; # $p$ <0,05 em relação ao grupo DMSO+NMDA; Kruskal-Wallis seguido de Mann-Whitney) (n=6-9).



**Figura 12:** Efeito da Capsazepina (1, 10 e 30 nmol/0,2  $\mu$ L) na reação de fuga promovida pela injeção de NMDA (1 nmol/0,2  $\mu$ L) na SCPdl de ratos observados na caixa durante dois minutos a partir do início das injeções. As colunas representam mediana  $\pm$  I.R do número de pulos (\* $p$ <0,0001 em relação ao grupo controle; # $p$ <0,01 em relação ao grupo DMSO+NMDA; Kruskal-Wallis seguido de Mann-Whitney) (n=6-9).



**Figura 13:** Efeito do NMDA (1 nmol/0,2  $\mu$ L) intra SCPdl e fora da SCPdl de ratos observado na caixa durante dois minutos a partir do início das injeções. As colunas representam a média dos cruzamentos e a barra vertical, o erro padrão da média. (\* $p < 0,05$  em relação ao grupo DMSO+NMDA fora da SCPdl; Student teste) (n=8-11).



**Figura 14:** Efeito do NMDA (1 nmol/0,2  $\mu$ L) intra SCPdl e fora da SCPdl de ratos observado na caixa durante dois minutos a partir do início das injeções. As colunas representam a média dos pulos e a barra vertical, o erro padrão da média. (\* $p < 0,05$  em relação ao grupo DMSO+NMDA fora da SCPdl; Student teste) (n=8-11).

**Tabela 1:** Efeito da capsazepina (1, 10 e 30 nmol/0.2 µL) e do NMDA (1 nmol/0.2 µL) intra-SCPdl no LCE.

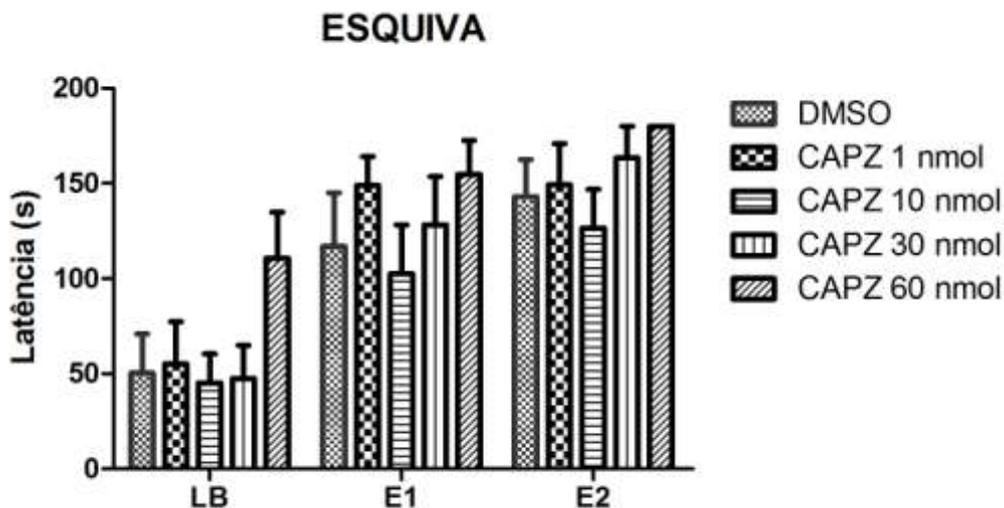
	DMSO +SAL	CAPZ 1 +SAL	CAPZ 10 +SAL	CAPZ 30 +SAL	DMSO +NMDA	CAPZ 1 +NMDA	CAPZ 10 +NMDA	CAPZ 30 +NMDA
PERTE (± EPM)	23.4647 (±4.75)	19.7967 (±5.43)	16.2871 (±6.77)	25.712 (±4.68)	31.008 (±10.66)	16.8971 (±4.73)	21.9457 (±8.88)	5.74667 (±1.87)
PERFA ± EPM	30.2314 (± 4.70)	30.6667 (± 4.54)	20.5314 (± 5.89)	38.050 (±6.60)	33.075 (± 8.94)	33.9057 (±8.42)	33.5814 (± 8.66)	23.4200 (± 8.62)
N <sup>o</sup> FECHAD ± EPM	10.2857 (±1.83)	9.2222 (±0.95)	10.7143 (±2.68)	7.1667 (±1.90)	14.800 (±2.46)	7.85714 (±1.18)	6.57143 (±1.61)	11.6667 (±2.86)

PERTE: Porcentagem de tempo no braço aberto; PERFA: Porcentagem de frequência no braço aberto; N<sup>o</sup> FECHADO: Número de entradas no braço fechado; EPM: Erro padrão da média. (p<0,05 para o fator tratamento; ANOVA seguida de teste de Duncan) (n=6-9).

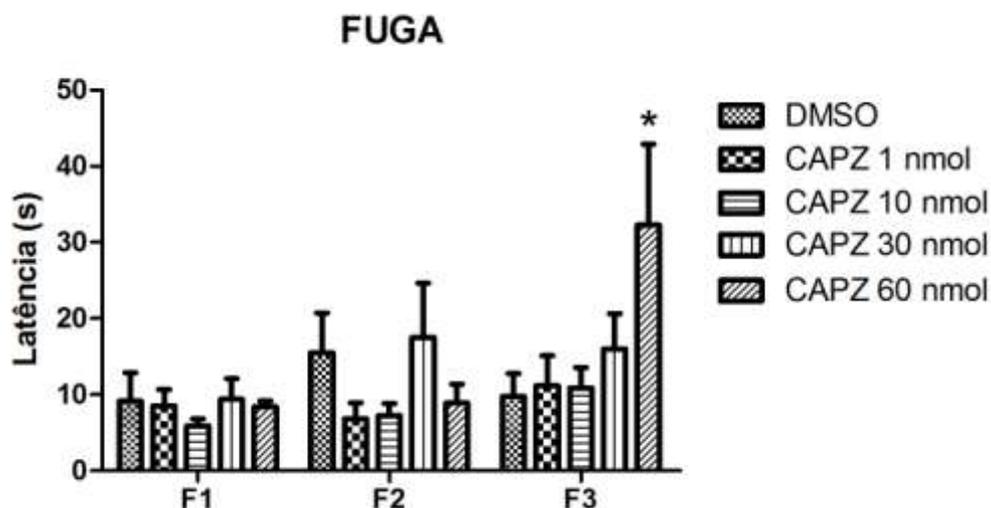
## **2. Efeito do tratamento com a capsazepina intra-SCPdl no LTE.**

A Figura 15 refere-se aos resultados obtidos a partir da avaliação do efeito de diferentes concentrações da capsazepina no LTE. A análise de variância de duas vias revelou relações significativas entre os três testes da esQUIVA inibitória (LB, E1 e E2) para todos os grupos [ $F_{(2,68)} = 46,45$ ;  $p < 0,05$ ], indicando o aprendizado da esQUIVA inibitória. Não houve efeito do fator tratamento [ $F_{(4,34)} = 1,814$ ; ns] e nem interação entre o fator tratamento *versus* fator teste [ $F_{(8,34)} = 0,58$ ; ns]. O teste de Bonferroni não detectou uma diferença significativa,  $p > 0,05$ .

A Figura 16 mostra as latências para a tarefa de fuga realizada 30 segundos após a E2. A análise de variância de duas vias revelou que o fator tratamento altera significativamente o resultado [ $F_{(4,33)} = 1,164$ ;  $p < 0,05$ ], e o pós-teste de Bonferroni revelou diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos tratados com capsazepina na dose de 60 nmol/0,2  $\mu$ L e o grupo controle, no terceiro trial. Dessa forma, a capsazepina nessa dose promoveu um comportamento tipo panicolítico evidenciado pelo aumento da latência em atingir o centro do labirinto, quando o animal foi colocado na extremidade do braço aberto que havia sido pré-exposto no dia anterior (tal pré-exposição elimina o componente exploratório inato de cada animal).



**Figura 15:** Efeito da Capsazepina (1, 10, 30 e 60 nmol/0,2  $\mu$ L) intra-SCPdl na esQUIVA inibitória. LB refere-se à linha de base, enquanto E1 e E2, o teste de esQUIVA 1 e 2, intercalados por um intervalo de 30 segundos. As colunas representam a média das latências e a barra vertical, o erro padrão da média. ( $p < 0,05$  para o fator tratamento; ANOVA seguida de teste de Bonferroni) ( $n = 6-9$ ).



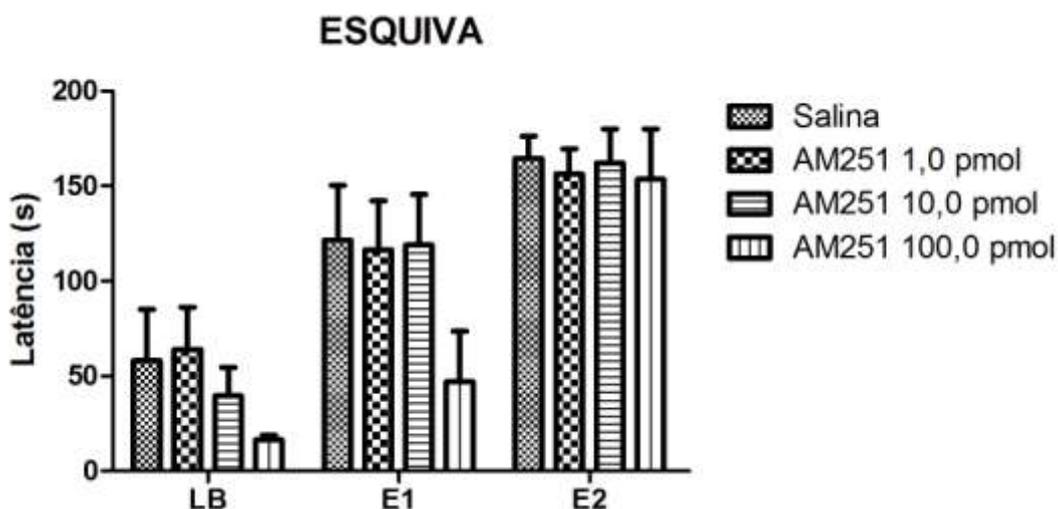
**Figura 16:** Efeito da Capsazepina (1, 10, 30 e 60 nmol/0,2  $\mu$ L) intra-SCPdl na fuga. F1, F2 e F3 referem-se ao teste de fuga 1, 2 e 3, intercalados por um intervalo de 30 segundos. As colunas representam a média de tempo e a barra vertical, o erro padrão da média. (\* $p < 0,05$  em relação ao grupo controle; ANOVA seguida de teste de Bonferroni) ( $n = 6-9$ ).

### **3. Efeito do tratamento com o AM251 intra-SCPdl no LTE.**

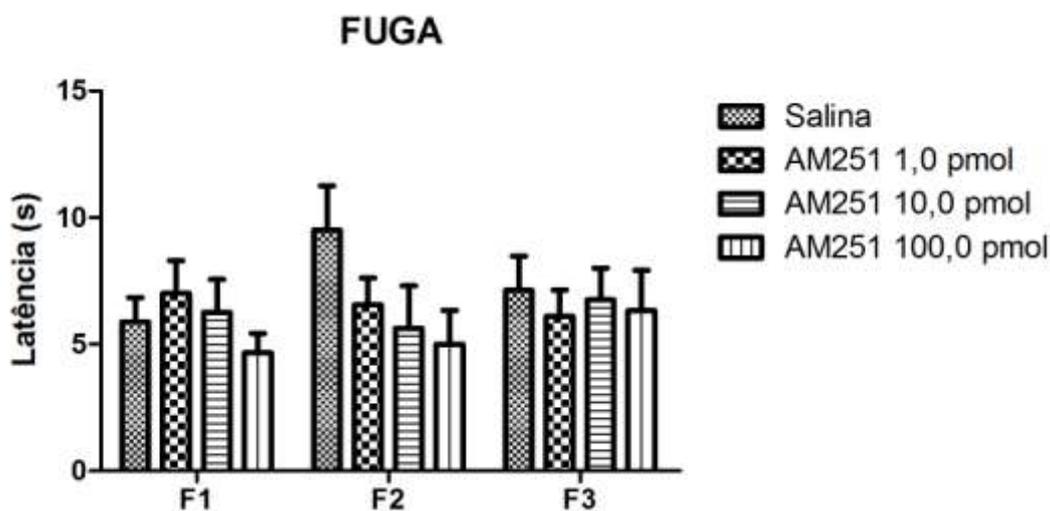
De modo a verificar se os efeitos obtidos com a capsazepina são revertidos pela administração de um antagonista de receptor canabinóide CB<sub>1</sub>, realizou-se inicialmente uma curva dose-resposta do AM251 no LTE para determinar a dose que seria utilizada no próximo experimento.

A análise de variância de duas vias revelou relações significativas entre os três testes da esquiva inibitória (LB, E1 e E2) para todos os grupos [ $F_{(2,54)} = 43,26$ ;  $p < 0,05$ ], indicando o aprendizado da esquiva inibitória. Não houve efeito do fator tratamento [ $F_{(3,27)} = 1,145$ ; ns]; e nem interação teste *versus* tratamento [ $F_{(6,27)} = 0,90$ ; ns] e a análise de Bonferroni também não revelou relações estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos e o grupo controle, Figura 17.

Já os valores obtidos para as latências de fuga estão representados na Figura 18. As análises não revelaram nenhuma relação estatisticamente significativa. Fator teste [ $F_{(2,54)} = 0,45$ ; ns], fator tratamento: [ $F_{(3,27)} = 0,85$ ; ns] e interação tratamento *versus* teste [ $F_{(6,27)} = 1,02$ ; ns].



**Figura 17:** Efeito do AM251 (1, 10 e 100 pmol/0,2  $\mu$ L) intra-SCPdl na esquiva inibitória. LB refere-se à linha de base, enquanto E1 e E2, o teste de esquiva 1 e 2, intercalados por um intervalo de 30 segundos. As colunas representam a média das latências e a barra vertical, o erro padrão da média. ( $p < 0,05$  para o fator tratamento; ANOVA seguida de teste de Bonferroni) ( $n=6-9$ ).

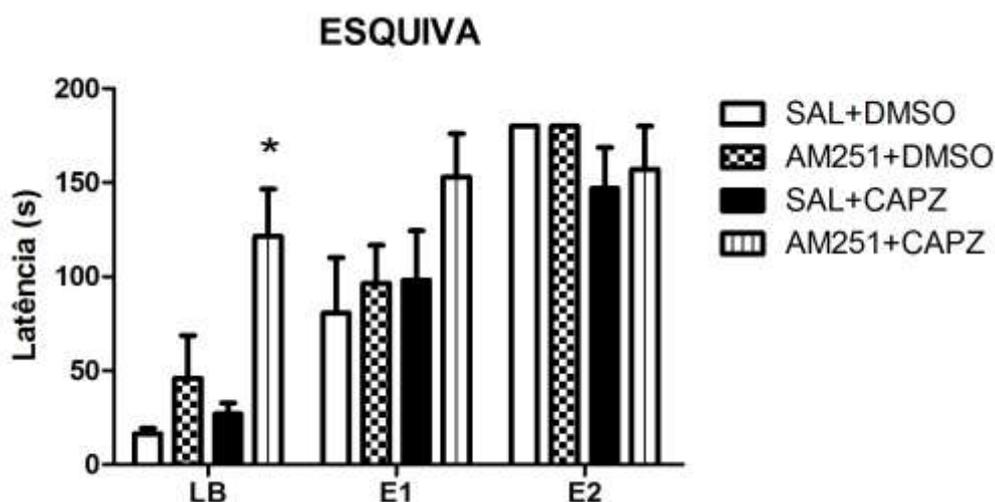


**Figura 18:** Efeito do AM251 (1, 10 e 100 pmol/0,2  $\mu$ L) intra-SCPdl na fuga. F1, F2 e F3 referem-se ao teste de fuga 1, 2 e 3, intercalados por um intervalo de 30 segundos. As colunas representam a média de tempo e a barra vertical, o erro padrão da média. ( $p < 0,05$  para o fator tratamento; ANOVA seguida de teste de Bonferroni) ( $n=6-9$ ).

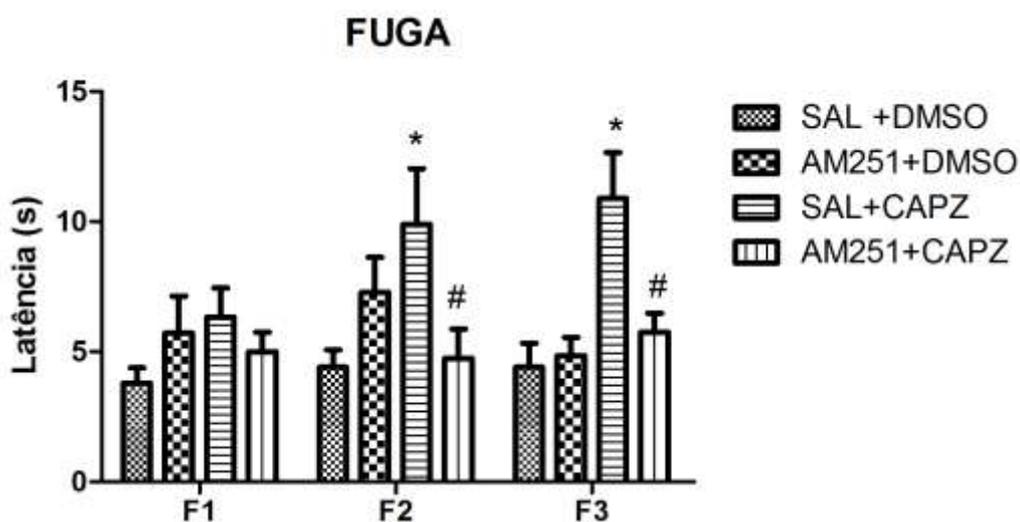
#### **4. Efeito do pré-tratamento com AM251 na resposta tipo panicolítica induzida pela capsazepina intra-SCPdl no LTE.**

A Figura 19 mostra os resultados obtidos do pré-tratamento com AM251 (100 pmol/0,2 µL) sobre o efeito obtido com a capsazepina (60 nmol/0,2 µL) no LTE. A análise de variância de duas vias revelou relações estatisticamente significativas entre os três testes da esQUIVA inibitória (LB, E1 e E2) para todos os grupos [ $F_{(2,48)} = 56,10$ ;  $p < 0,05$ ], indicando o aprendizado da esQUIVA inibitória. Não houve efeito do fator tratamento [ $F_{(3,24)} = 2,20$ ; ns], mas, foi observado efeito na interação entre o fator tratamento *versus* fator teste [ $F_{(6,24)} = 3,58$ ;  $p < 0,05$ ]. O teste de Bonferroni detectou uma diferença significativa na LB entre SAL+DMSO *versus* AM251+CAPZ ( $p < 0,05$ ); AM251+DMSO *versus* AM251+CAPZ ( $p < 0,05$ ) e entre SAL+CAPZ *versus* AM251+CAPZ ( $p < 0,05$ ).

A Figura 20 mostra as latências para a tarefa de fuga realizada 30 segundos após a E2. A análise de variância de duas vias revelou que o fator tratamento altera significativamente o desempenho [ $F_{(3,25)} = 4,01$ ;  $p < 0,05$ ], e o teste de Bonferroni demonstrou relações estatisticamente significativas entre o grupo SAL+CAPZ no segundo ( $p < 0,05$ ) e terceiro trial ( $p < 0,05$ ) em comparação ao grupo controle e diferença estatística entre os grupos AM251+DMSO *versus* SAL+CAPZ (no terceiro trial;  $p < 0,05$ ) e SAL+CAPZ *versus* AM251+CAPZ (no segundo e terceiro trial;  $p < 0,05$ ).



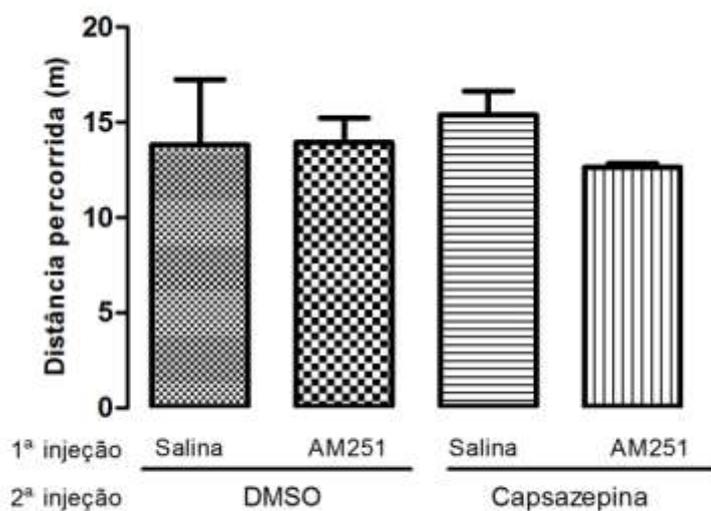
**Figura 19:** Efeito do pré-tratamento com AM251 (100 pmol/0,2  $\mu$ L) e do tratamento com capsazepina intra-SCPdl (60 nmol/0,2  $\mu$ L) na esQUIVA inibitória. LB refere-se à linha de base, enquanto E1 e E2, o teste de esQUIVA 1 e 2, intercalados por um intervalo de 30 segundos. As colunas representam a média das latências e a barra vertical, o erro padrão da média. (\* $p < 0,05$  em relação ao grupo controle; ANOVA seguida de teste de Bonferroni) (n=5-9).



**Figura 20:** Efeito do pré-tratamento com AM251 (100 pmol/0,2  $\mu$ L) na resposta tipo panicolítica induzida pela capsazepina intra-SCPdl (60 nmol/0,2  $\mu$ L) na fuga. F1, F2 e F3 referem-se ao teste de fuga 1, 2 e 3, intercalados por um intervalo de 30 segundos. As colunas representam a média de tempo e a barra vertical, o erro padrão da média. (\* $p < 0,05$  em relação ao grupo controle; # $p < 0,05$  em relação ao grupo SAL+CAPZ; ANOVA seguida de teste de Bonferroni) (n=5-9).

**5. Efeito do tratamento com AM251 e capsazepina intra-SCPdl no campo aberto.**

A fim de descartar a possibilidade de que os efeitos observados no LTE eram decorrentes de alteração da atividade exploratória, os animais foram submetidos ao teste do campo aberto onde se quantificou a distância percorrida pelos animais. Os valores encontrados indicam que os efeitos observados no LTE não foram decorrentes de alteração da atividade exploratória dos animais, uma vez que não houve diferenças significativas entre os grupos ( $F_{(3,9)} = 0,2156$ ; ns. ANOVA, seguida do teste de Bonferroni; Figura 21).



**Figura 21:** Efeito do AM251 (100 pmol/0,2  $\mu$ L) e da capsazepina (60 nmol/0,2  $\mu$ L) na atividade locomotora utilizando o campo aberto. As colunas representam as médias das distâncias percorridas e as barras verticais, o erro padrão da média ( $p < 0,05$ ; ANOVA seguida de teste de Bonferroni) ( $n=3-4$ ).

*DISCUSSÃO*

Corroborando resultados obtidos anteriormente (AGUIAR et al, 2006; BANDLER; KEAY, 1996; CARRIVE, 1993; BITTENCOURT et al, 2004; FERREIRA-NETTO et al, 2005), a injeção intra-SCPdl do agonista de receptores NMDA promoveu reações de fuga caracterizadas pelo aumento do número de cruzamentos e pulos. Tais parâmetros são propostos como reflexo de comportamento tipo pânico em ratos (VARGAS; SCHENBERG, 2001).

Reações de fuga também são observadas após a injeção intra-SCPdl de glutamato ou de agonista metabotrópico do grupo I (KRIEGER; GRAEFF, 1985; MOLCHANOV; GUIMARÃES, 1999), reforçando o papel facilitador do glutamato nas reações defensivas mediadas por esta região. Adicionalmente, o bloqueio dos receptores NMDA do glutamato produziu efeito inibitório sobre as reações de defesa em outros modelos animais como o LCE, o teste de lambes punido de Vogel e exposição ao predador (GUIMARÃES et al, 1991; MOLCHANOV; GUIMARÃES, 2002; AGUIAR; GUIMARÃES, 2009).

Os animais expostos ao LCE após a injeção de NMDA não apresentaram alterações comportamentais nos parâmetros avaliados. Esses dados corroboram com trabalhos prévios de nosso grupo os quais também não foi detectado diferenças na atividade exploratória dos animais submetidos à arena após a fuga induzida pelo NMDA nessa região (AGUIAR et al, 2006). Efeitos ansiogênicos foram descritos após a injeção de NMDA intra-SCPdl em animais expostos ao LCE ou ao LTE, mas com doses que não são capazes de promover respostas de fuga nos animais (CAROBREZ et al, 2001; BERTOGLIO; ZANGROSSI et al, 2006).

Além do glutamato, outro neurotransmissor que possivelmente está envolvido nas reações de defesa, é a anandamida, que atua sobre receptores

vanilóides e canabinóides (VAN DER STELT; DI MARZO, 2004; STAROWICZ et al, 2007a; SMART et al, 2000). A AEA, atuando no receptor TRPV1, em contraste com sua ação via receptor CB<sub>1</sub>, promove o aumento do influxo de Ca<sup>2+</sup> em sítios pós-sinápticos com consequente aumento da liberação de neurotransmissores, como o glutamato (VAN DER STELT et al, 2005; FREUND et al, 2003). Assim, a AEA pode desempenhar um papel facilitatório ou inibitório na modulação dos comportamentos defensivos, via TRPV1 ou CB<sub>1</sub> respectivamente.

Trabalhos anteriores sugerem que compostos vanilóides atuando sobre receptores TRPV1 podem regular a liberação do glutamato em diversas regiões do SNC (TOHDA; SASAKI, 2001; DOYLE et al, 2002; JENNINGS et al, 2003; MARINELLI et al, 2002; LI et al, 2004). Em um estudo eletrofisiológico, XING e LI (2007) ao incubarem fatias da SCPdl com a capsaicina, observaram o aumento da frequência da corrente pós-sináptica excitatória mínima sendo este efeito bloqueado por antagonista TRPV1, sugerindo o papel facilitatório de receptores TRPV1 na transmissão glutamatérgica. Adicionalmente, não observou-se excitação pós-sináptica induzida pela capsaicina em fatias de estriado de animais nocautes para o receptor TRPV1, sustentando a hipótese que a ativação de TRPV1 promove a liberação de glutamato (MUSELLA et al, 2009). Finalmente, o bloqueio dos rNMDA promove efeitos ansiolíticos similares aos efeitos promovidos pelos antagonistas TRPV1 em diversos modelos animais de ansiedade (AGUIAR; GUIMARÃES, 2011; MOLCHANOV; GUIMARÃES 2002; RESSTEL et al, 2008).

No modelo animal de pânico induzido pelo NMDA intra-SCPdl, a capsazepina (1nmol/0,2 µL), um antagonista de receptores TRPV1, atenuou as

reações de fuga observadas durante a injeção e que caracterizam um ataque de pânico. Assim, sugere-se que ao antagonizar os receptores TRPV1 ocorre uma diminuição da neurotransmissão glutamatérgica, como foi observado por XING e LI (2007). Dessa forma, pode-se inferir que a ativação de receptores TRPV1, favorece a transmissão sináptica glutamatérgica na SCPdl e conseqüentemente facilita a resposta a um estímulo aversivo. Nesse sentido, dados recente do nosso grupo mostram que ratos expostos ao predador tiveram um aumento significativo de neurônios ativados e positivos para TRPV1 em todas as colunas da SCP, sendo este efeito mais pronunciado na SCPdl (AGUIAR; ALMEIDA-SANTOS; GUIMARÃES, dados não publicados).

Assim, sugere-se que a sinalização dos receptores TRPV1 desempenha um papel importante na modulação de respostas relacionadas ao pânico tonicamente. Nossos resultados com o LTE corroboram essa hipótese uma vez que a capsazepina foi capaz de promover efeito do tipo panicolítico nesse modelo, sem alterar a resposta de esquiva. Esse efeito é semelhante ao efeito promovido por drogas que são utilizadas na clínica para o tratamento do transtorno de pânico, como a imipramina e a D-fenfluramina, que aumentam a latência na tarefa de fuga do LTE (SOLYOM, 1994 apud GRAEFF, 1998). Assim, de maneira similar ao modelo de estimulação aversiva na SCPdl, o LTE associa a resposta de escape ou fuga ao pânico (GRAEFF et al, 1998). Por ser motivada por estímulos ambientais de medo espécie-específicos, como a exposição a espaços abertos e elevados, a resposta de fuga avaliada no LTE pode ser considerada como de maior relevância etológica, quando comparada àquela gerada pela estimulação da SCPdl, já o comportamento da esquiva

inibitória está associado ao transtorno de ansiedade generalizada (ZANOVELLI, 2005; GRAEFF et al, 1998).

Após a primeira tarefa da esQUIVA inibitória, observou-se a mudança do comportamento do animal em relação ao contexto, refletida no aumento progressivo da latência, supostamente devido ao aprendizado do local aversivo (braços abertos). Diferentemente dos resultados obtidos por TERZIAN et al (2009) em que a capsazepina intra-SCPdl promoveu efeito tipo ansiolítico no LCE e no teste de lambear punido de Vogel, em nosso trabalho a capsazepina intra-SCPdl não exerceu nenhum efeito relativo ao comportamento tipo ansiolítico na esQUIVA inibitória do LTE, quando comparada ao grupo controle. A diferença desses resultados pode ser atribuída ao fato de que os animais executam tarefas distintas nesses aparelhos, já que constituem modelos animais diferentes.

Com a finalidade de investigar por qual mecanismo a capsazepina produz o efeito tipo panicolítico e baseando em estudos que mostram que os sistemas endovanilóide e endocanabinóide compartilham de um mesmo ligante endógeno, foi avaliado se os efeitos promovidos pelo bloqueio dos receptores TRPV1 são dependentes da sinalização de receptores CB<sub>1</sub>.

O antagonista CB<sub>1</sub> intra-SCPdl não exerceu nenhum efeito nas tarefas de esQUIVA inibitória e de escape nos animais submetidos ao LTE. Esses resultados corroboram com o trabalho de MOREIRA et al (2007), que não observaram efeitos decorrentes do bloqueio desses receptores em animais expostos ao LCE. A ausência de efeito de antagonistas CB<sub>1</sub> também nesse modelo sugere que o sistema endocanabinóide exerce uma função inibitória nas respostas defensivas em situações mais aversivas e mais estressantes,

como por exemplo, o teste de condicionamento contextual onde o bloqueio desses receptores no CPF medial foi capaz de aumentar a resposta de medo contextual quando um baixo estímulo elétrico foi empregado como estímulo aversivo (LISBOA et al, 2010).

Corroborando a nossa hipótese inicial, o pré-tratamento com antagonista CB<sub>1</sub> intra-SCPdl reverteu o efeito tipo panicolítico promovido pela capsazepina, sugerindo que os efeitos promovidos pelo bloqueio dos receptores TRPV1 são dependentes da ativação de receptores CB<sub>1</sub>, possivelmente por aumentar a ação da AEA nesses receptores.

De maneira semelhante, CASAROTTO et al (2011) demonstraram efeitos opostos mediados CB<sub>1</sub> e TRPV1 na SCPd no modelo de pânico induzido por estimulação elétrica dessa região. O ACEA, agonista de receptores CB<sub>1</sub>, promoveu o aumento do limiar da corrente elétrica para se produzir o comportamento de fuga, e o mesmo efeito foi observado com a administração de diferentes antagonistas para receptores TRPV1, sendo este último revertido quando os animais receberam o pré-tratamento com antagonista CB<sub>1</sub>.

Dados obtidos por KAWAHARA et al (2011) sustentam essa possibilidade, uma vez que os autores observaram que a anandamida pode facilitar ou inibir a transmissão sináptica excitatória através da ativação de TRPV1 ou CB<sub>1</sub>, respectivamente, na presença do inibidor da FAAH (enzima responsável pela hidrólise da AEA) em fatias da SCP. Em outro trabalho realizado por CASSANO et al (2011) camundongos nocautes para FAAH apresentaram comportamento ansiolítico possivelmente devido a maior ativação de CB<sub>1</sub> pela anandamida, no entanto, quando CB<sub>1</sub> foi antagonizado,

observou-se uma mudança nesse comportamento, provavelmente pela ligação da AEA a TRPV1.

Em conjunto esses dados, sustentam a hipótese de que os receptores CB<sub>1</sub> e TRPV1 modulam os estados relacionados ao medo e ansiedade de maneira opostas e, possivelmente são simultaneamente ativados na SCPd durante um evento aversivo (para revisão ver MOREIRA et al, 2011). Dados histológicos mostram que os receptores CB<sub>1</sub> e TRPV1 estão co-expressos em diversas regiões que controlam o comportamento defensivo reforçando essa possibilidade (CRISTINO et al 2006; MAIONE et al, 2006; MICALE et al, 2009; CASAROTTO et al, 2011).

Em conclusão, o antagonismo de receptores TRPV1 intra-SCPdl, promoveu efeitos anti-aversivos em dois modelos animais de pânico, a estimulação química da SCPdl e a tarefa de escape do LTE. Assim nossos resultados sustentam a hipótese de que os receptores TRPV1 modulam as respostas defensivas mediadas pela SCPdl, possivelmente facilitando-as através do aumento da sinalização glutamatérgica. Além disso, o bloqueio de TRPV1 nessa região permite que a anandamida atue somente sobre receptores CB<sub>1</sub> e bloqueie as respostas a estímulos aversivos.

## *REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

AGUIAR, D. C; MOREIRA, F. A; GUIMARÃES, F. S (2006). Flight reactions induced by injection of glutamate N-methyl-D-aspartate receptor agonist into the rat dorsolateral periaqueductal gray are not dependent on endogenous nitric oxide. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior** 83: 296–301.

AGUIAR, D. C; GUIMARÃES, F. S (2009). Blockade of NMDA receptors and nitric oxide synthesis in the dorsolateral periaqueductal gray attenuates behavioral and cellular responses of rats exposed to a live predator. **J Neurosci Res** 87: 2418-2429.

AGUIAR, D. C; TERZIAN, A. L; GUIMARÃES, F. S; MOREIRA, F. A (2009). Anxiolytic-like effects induced by blockade of transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) channels in the medial prefrontal cortex of rats. **Psychopharmacology (Berl)** 205: 217-225.

AGUIAR, D. C; GUIMARÃES, F. S (2011). Blockade of NMDA or NO in the dorsal premammillary nucleus attenuates defensive behaviors. **Physiol Behav** 103:279-83.

AGUIAR, D. C; ALMEIDA-SANTOS, A. F; GUIMARAES, F. S (2011). Dados não publicados.

ALBIN, R. L; MAKOWIEC, R. L; HOLLINGSWORTH, Z; DURE, L. S. T; PENNEY, J. B; YOUNG, A. B (1990). Excitatory amino acid binding sites in the periaqueductal gray of the rat. **Neurosci Lett** 118:112–5.

AMARA, S. G; FONTANA, A. C (2002). Excitatory amino acid transporters: keeping up with glutamate. **Neurochem Int** 41: 313-318.

BANDLER, R (1982). Induction of rage following microinjections of glutamate in midbrain but not hypothalamus of cats. **Neurosci Lett** 30:183-188.

BANDLER, R; CARRIVE, P; ZHANG, S. H (1991). Integration of somatic and autonomic reactions within the midbrain periaqueductal gray: viscerotopic, somatotopic and functional organization. **Prog Brain Res** 87: 269–305.

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

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

BEHBEHANI, M. M (1995). Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. **Prog Neurobiol** 46:575-605.

BERGINK, V; VAN MEGEN, H. J. G. M; WESTENBERG, G. M (2004). Glutamate and anxiety. **Eur Neuropsychopharm** 14:175-183.

BERTOGLIO, L. J; ZANGROSSI, H. J (2006). Involvement of dorsolateral Gray N-methyl-D-aspartic acid glutamate receptors in the regulation of risk assessment and inhibitory avoidance behaviors in the rat elevated T-maze **Behav Pharmacology** 17:589-596.

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

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

BLISS, T. V; COLLINGRIDGE, G. L (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. **Nature** 361:31-9.

BRANDAO, M. L; CARDOSO, S. H; MELO, L. L; MOTTA, V; COIMBRA, N.C (1994). Neural substrate of defensive behavior in the midbrain tectum. **Neurosci Biobehav Rev** 18:339-46.

BRANDAO, M. L; VIANNA, D. M; MASSON, S; SANTOS, J (2003). Organização neural de diferentes tipos de medo e suas implicações na ansiedade. **Rev Bras Psiquiatr** 25:36-41.

CALIXTO, J. B; KASSUYA, C. A; ANDRÉ, E; FERREIRA, J (2005). Contribution of natural products to the discovery of the transient receptor potential (TRP) channels family and their functions. **Pharmacol Ther** 106: 179-208.

CANTERAS, N. S; RIBEIRO-BARBOSA, E. R; COMOLI, E (2001). Tracing from the dorsal preammillary nucleus prosencephalic systems involved in the organization of innate fear responses. **Neurosci Biobehav Rev** 25:661-668.

CAROBREZ, A. P; TEIXEIRA, K. V; GRAEFF, F. G (2001). Modulation of defensive behavior by periaqueductal gray NMDA/glycine-B receptor. **Neurosci Biobehav Rev** 25:697-709.

CAROBREZ, A. P (2003). Glutamatergic neurotransmission as molecular target in anxiety. **Rev Bras Psiquiatr** 2:52-8.

CARRIVE, P; DAMPNEY, R. A; BANDLER, R (1987). Excitation of neurones in a restricted portion of the midbrain periaqueductal grey elicits both behavioural and cardiovascular components of the defence reaction in the unanaesthetised decerebrate cat. **Neurosci Lett** 29:273-8.

CARRIVE, P (1993). The periaqueductal gray and defensive behavior: Functional representation and neuronal organization. **Beh Brain Research** 58:27-47.

CASAROTTO, P. C.; TERZIAN, A. L. B.; AGUIAR, D. C.; ZANGROSSI, H.; GUIMARÃES, F. S.; WOTJAK, C. T.; MOREIRA, F. A (2011). Opposing Roles for Cannabinoid Receptor Type-1 (CB(1)) and Transient Receptor Potential Vanilloid Type-1 Channel (TRPV1) on the Modulation of Panic-Like Responses in Rats. **Neuropsychopharmacology** *Inpress*.

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

CATERINA, M. J; SCHUMACHERK, M. A; TOMINAGA, M. K; ROSEN, T. A; LEVINE, J. D; DAVID, J (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature** 389: 816–824.

CHU, C. J; HUANG, S. M; DE PETROCELLIS, L; BISOGNO, T; EWING, S. A; MILLER, J. D; ZIPKIN, R. E; DADDARIO, N; APPENDINO, G; DI MARZO, V; WALKER, J. M (2003). N-oleoyldopamine, a novel endogenous capsaicin-like lipid that produces hyperalgesia. **J Biol Chem** 278: 13633-9.

CLAPHAM, D. E; JULIUS, D; MONTELL, C; SCHULTZ, G (2005). International Union of Pharmacology. XLIX. Nomenclature and structure-function relationships of transient receptor potential channels. **Pharmacol Rev** 57:427-450.

COLLINGRIDGE, G. L; LESTER, R. A. J (1989). Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. **Pharmacol Rev** 40:143-210.

CORTRIGHT, D. N; SZALLASI, A (2004). Biochemical pharmacology of the vanilloid receptor TRPV1. **Eur J Biochem** 271: 1814-1819.

COTMAN, C. W; MONAGHAN, D. T (1988). Excitatory amino acid neurotransmission: NMDA receptors and Hebb-type synaptic plasticity. **Annu Rev Neurosci** 11:61-80.

CRISTINO, L; DE PETROCELLIS, L; PRYCE, G; BAKER, D; GUGLIEMOTTI, V; DI MARZO, V (2006). Immunohistochemical localization of cannabinoid type 1 and vanilloid transient receptor potential vanilloid type 1 receptors in the mouse brain. **Neuroscience** 139:1405-15.

CURTIS, D. R; PHILLIPS, J. W; XINS, J. C (1959). Chemical excitation of spinal neurones. **Nature** 183:611-612.

CURTIS, D. R; PHILLIPS, J. W; WATKINS, J. C (1960). The chemical excitation of spinal neurons by certain acidic amino acids. **J Physiol** 150:656-682.

DARWIN, C. The expression of emotion in man and animals. New York: Philosophical Library; 1985. 1872.

DA SILVA JR. L. G; MENEZES; R. C. A; VILLELA, D. C; FONTES, M. A. P (2006). Excitatory amino acid receptors in the periaqueductal gray mediate the cardiovascular response evoked by activation of dorsomedial hypothalamic neurons. **Neuroscience** 139: 1129–1139.

DE PAULA SOARES, V; ZANGROSSI, H. JR (2004). Involvement of 5-HT1A and 5-HT2 receptors of the dorsal periaqueductal gray in the regulation of the defensive behaviors generated by the elevated T-maze. **Brain Res Bull** 64: 181-188.

DEAKIN, J. F; GRAEFF, F. G (1991). 5-HT and mechanisms of defense. **J Psychopharmacol** 5:305-15.

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

DEVANE, W. A; DYSARZ, F. A; JOHNSON, M. R; MELVIN, L. S; HOWLETT. A. C (1988). Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. **Mol Pharmacol** 34:605-13.

DEVANE, W. A; HANUS, L; BREUER, A; PERTWEE, R. G; STEVENSON, L. A; 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; FONTANA, A; CADAS, H; SCHINELLI, S; CIMINO, G; SCHWARTZ, J. C; PIOMELLI, D (1994). Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. **Nature** 372:686-91.

DOMENICI M. R; AZAD, S. C; MARSICANO, G; SCHIERLOH, A; WOTJAK, C. T; DODT, H. U; ZIEGLGÄNSBERGER, W; LUTZ, B; RAMMES, G (2006). Cannabinoid receptor type 1 located on presynaptic terminals of principal neurons in the forebrain controls glutamatergic synaptic transmission. **J Neurosci** 26:5794-5799.

DOYLE, M. W; BAILEY, T. W; YOUNG-HO, J; ANDRESEN, M. C (2002). Vanilloid receptors presynaptically modulate cranial visceral afferent synaptic transmission in nucleus tractus solitarius. **J Neurosci** 22: 8222-8229.

DRAY, A (1992). Neuropharmacological mechanisms of capsaicin and related substances. **Biochem Pharmacol** 44: 611-5.

FERNANDEZ DE MOLINA, A; HUNSPERGER, R. W (1959). Central representation of affective reaction in forebrain and brainstem: electrical stimulation of amygdala, stria terminalis and adjacent structures. **J Physiol** 145:251-265.

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

FINN, D.P; JHAVERI, M. D; BECKETT, S. R; ROE, C. H; KENDALL, D. A; MARSDEN, C. A; 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.

FLOYD, N. S; PRICE, J. L; FERRY, A. T; KEAY, K. A; BANDLER, R (2000). Orbitomedial prefrontal cortical projections to distinct longitudinal columns of the periaqueductal gray in the rat. **J Comp Neurol** 422: 556-78.

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

GRAEFF, F. G (1981). Minor tranquilizers and brain defense systems. **Braz J Med Biol Res** 14:239-265.

GRAEFF, F. G; CAROBREZ, A. P; SILVEIRA, M. C. L (1988). Excitatory amino acids and the brain aversive system. In: Cavalheiro EA, Lehmann J, Turski L (eds). *Neurology and neurobiology*, vol 46. *Frontiers in excitatory amino acids research*. New York: Liss, p.325-332.

GRAEFF, F. G (1991). Neurotransmitters in the dorsal periaqueductal gray and animal model of panic anxiety. In: Briley M, File SE (eds). *New Concepts in anxiety*. London: Macmillan, p.288-312.

GRAEFF, F. G; SILVEIRA, M. C; NOGUEIRA, R. L; AUDI, E. A; OLIVEIRA, R. M (1993). Role of the amygdala and periaqueductal gray in anxiety and panic. **Behav Brain Res** 58:123-31.

GRAEFF, F. G; VIANA, M. B; TOMAZ, C (1993). The elevated T maze, a new experimental model of anxiety and memory: effect of diazepam. **Braz J Med Biol Res** 26: 67-70.

GRAEFF, F. G; FERREIRA-NETO, C; ZANGROSSI, H, JR (1998) The Elevated T-maze as an experimental model of anxiety. **Neuroscience and Behavioral Reviews** 23:237-246.

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

GREEN, B. G (1989) Capsaicin sensitization and desensitization on the tongue produced by brief exposures to a low concentration. **Neurosci Lett** 107: 173-8.

GUIMARÃES, F. S; CAROBREZ, A. P; DE AGUIAR, J. C; GRAEFF, F. G (1991). Anxiolytic effect in the elevated plus-maze of NMDA receptor antagonist

AP7 microinjected into the dorsal periaqueductal grey. **Psychopharmacology** 103 :91-94.

GUIMARÃES, F. S; BEIJAMINI, V; MOREIRA, F. A; AGUIAR, D. C; DE LUCCA, A. C. B (2005) Role of nitric oxide in brain regions related to defensive reactions. **Neuroscience and Behavioral Reviews** 29:1313-1322.

HANDLEY, S. L.; MITHANI, S (1984). Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol** 327:1-5.

HAYES, A. G; HAWCOCK, A. B; HILL, R. G (1984) The depolarising action of capsaicin on rat isolated sciatic nerve. **Life Sci** 35: 1561-8.

HERKENHAM, M; LYNN, A. B; LITTLE, M. D; JOHNSON, M. R; MELVIN, L. S; COSTA, B. R; RICE, K. C (1990) Cannabinoid receptor localization in brain. **Proc Natl Acad Sci USA** 87:1932-1936

HESS, W. R; BRUGGER, M (1943) Das subcorticale zentrum der affectiven abwerreaktion. **Helv Psysiol Pharmacol Acta** 1:33-52.

HOLZER, P (1991). Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. **Pharmacol Rev** 43: 143-201.

HOWLETT, A. C; FLEMING, R. M (1984). Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Pharmacology of the response in neuroblastoma cell membranes. **Mol Pharmacol** 26: 532-538.

HUANG, S. M; BISOGNO, T; TREVISANI, M; AL-HAYANI, A; DE PETROCELLIS, L; FEZZA, F; TOGNETTO, M; PETROS, T. J; KREY, J. F; CHU, C. J; MILLER, J. D; DAVIES, S. N; GEPPETTI, P; WALKER, J. M; DI MARZO, V (2002). An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. **Proc Natl Acad Sci U S A** 99: 8400-5.

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

HWANG, S. W; CHO, H; KWAK, J; LEE, S. Y; KANG, C. J; JUNG, J. J; CHO, S; MIN, K. H; SUH, Y. G; OH, U (2000). Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA** 97: 6155-6160.

JAVITT, D. C (2004). Glutamate as a therapeutic target in psychiatric disorders. **Mol Psychiatry** 9:984-997.

JENNINGS, E. A; VAUGHAN, C. W; ROBERTS, L. A; CHRISTIE, M. J (2003). The actions of anandamide on rat superficial medullary dorsal horn neurons in vitro. **J Physiol** 548: 121-129.

KASCKOW, J. W; MULCHAHEY, J. J; GERACIOTI, T. D, JR (2004). Effects of the vanilloid agonist olvanil and antagonist capsazepine on rat behaviors. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**. 28:291-5.

KATONA, I; SPERLÁGH, B; SÍK, A; KÁFALVI, A; VIZI, E. S; MACKIE, K; FREUND, T. F (1999). Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons. **J Neurosci** 19:4544-4558.

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

KEAY, K; BANDLER, R (2001) Parallel circuits mediating distinct emotional coping reactions to different types of stress. **Neuroscience and Behavioral Reviews** 25:669-678.

KLEIN, D. F; FLINK, M (1962). Psychiatric reaction patterns to imipramine. **J Psychiatry** 119: 432-438.

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

LEESON, P. D (1993). Glycine-site N-methyl-D-aspartate receptor antagonists. In: *Drug Design for Neuroscience*. New York: Raven Press, p.339-381.

LEPOLA, U; ARATO, M; ZHU, Y; AUSTIN, C (2003). Sertraline versus imipramine treatment of comorbid panic disorder and major depressive disorder. **J Clin Psychiatry** 64 (6): 654-626.

LI, D. P; CHEN, S. R; PAN, H. L (2004). VR1 receptor activation induces glutamate release and postsynaptic firing in the paraventricular nucleus. **J Neurophysiol** 92:1807-1816.

LISBOA, S. F; RESSEL, L. B; AGUIAR, D. C; GUIMARAES, F. S (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.

LISBOA, S. F; REIS, D. G; DA SILVA, A. L; CORRÊA, F. M; GUIMARÃES, F. S; RESSEL, L. B (2010). Cannabinoid CB1 receptors in the medial prefrontal cortex modulate the expression of contextual fear conditioning. **Int J Neuropsychopharmacol** 13:1163-73.

LOVICK, T. A (1993). Integrated activity of cardiovascular and pain regulatory systems: role in adaptive behavioural responses. **Prog Neurobiol** 40:631-44.

LYDIARD, R. B; BALLENGER, J. C (1987). Antidepressants in panic disorder and agoraphobia. **J Affect Disord** 13 (2): 153-68.

MAES, M; DEBACKER, G; SUY, E; MINNER, B (1995). Increased plasma serine concentrations in depression. **Neuropsychobiology** 31:10-15.

MAIONE, S; BISOGNO, T; DE NOVELLIS, V; PALAZZO, E; CRISTINO, L; VALENTI, M; PETROSINO, S; GUGLIELMOTTI, V; ROSSI, F; DI MARZO, V (2006). Elevation of endocannabinoid levels in the ventrolateral periaqueductal grey through inhibition of fatty acid amide hydrolase affects descending nociceptive pathways via both cannabinoid receptor type 1 and transient receptor potential vanilloid type-1 receptors. **J Pharmacol Exp Ther** 316:969-82.

MARINELLI, S; VAUGHAN, W. C; CHRISTIE M. J; CONNOR, M (2002). Capsaicin activation of glutamatergic synaptic transmission in the rat locus coeruleus in vitro. **J Physiol** 543: 531-540.

MARINELLI, S; DI MARZO, V; BERRETTA, N; MATIAS, I; MACCARRONE, M; BERNARDI, G; MERCURI, N. B (2003). Presynaptic facilitation of glutamatergic synapses to dopaminergic neurons of the rat substantia nigra by endogenous stimulation of vanilloid receptors. **J Neurosci** 23: 3136-3144.

MARSCH, R; FOELLER, E; RAMMES, G; BUNCK, M; KÖSSL, M; HOLSBOER, F; ZIEGLGÄNSBERGER, W; LANDGRAF, R; LUTZ, B; WOTJAK, C. T (2007). Reduced anxiety, conditioned fear, and hippocampal long-term potentiation in transient receptor potential vanilloid type 1 receptor-deficient mice. **J Neurosci**. 27:832-9.

MATHEUS, M. G; NOGUEIRA, R. L; CAROBREZ, A. P; GRAEFF, F. G; GUIMARÃES, F. S (1994). Anxiolytic effect of glycine antagonists microinjected into the dorsal periaqueductal grey of the cat. **Psychopharmacology** 113:565-569.

MCGARAUGHTY, S; CHU, K. L; BITNER, R. S; MARTINO, B; EL KOUHEN, R; HAN, P; NIKKEL, A. L; BURGARD, E. C; FALTYNEK, C. R; JARVIS, M. F (2003). Capsaicin infused into the PAG affects rat tail flick responses to noxious heat and alters neuronal firing in the RVM. **J Neurophysiol** 90: 2702-2710.

MCLENNAN, H; HUFFMAN, R. D; MARSHALL, K. C (1968). Patterns of excitation of thalamic neurones by amino-acids and by acetylcholine. **Nature** 219: 387-8.

MELDRUM, B. S (1985). Possible therapeutic applications of antagonists of excitatory amino acid neurotransmitters. **Clin Sci** 68:113-122.

MELDRUM B. S (2000). Glutamate as a neurotransmitter in the brain: Review of Physiology and Pathology. **J Nutr** 130:1007-1015.

MELIS, M; PISTIS, M; PERRA, S; MUNTONI, A. L; PILLLOLA, G; GESSA, G. L (2004). Endocannabinoids mediate presynaptic inhibition of glutamatergic transmission in rat ventral tegmental area dopamine neurons through activation of CB1 receptors. **J Neurosci** 24:53-62.

MEZEY, E; TOTH, Z. E; CORTRIGHT, D. N; ARZUBI, M. K; KRAUSE, J. E; ELDE, R; GUO, A; BLUMBERG, P. M; SZALLASI, A (2000). Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human. **Proc Natl Acad Sci U S A** 97: 3655-3660.

MICALE, V; CRISTINO, L; TAMBURELLA, A; PETROSINO, S; LEGGIO, G. M; DRAGO, F; DI MARZO, V (2009). Anxiolytic effects in mice of a dual blocker of fatty acid amide hydrolase and transient receptor potential vanilloid type-1 channels. **Neuropsychopharmacology** 34:593-606.

MIGUEL, T. T (2010). **Papel dos mecanismos mediados pelo fator de liberação de corticotrofina e pelo complexo receptor N-metil-D-aspartato-óxido nítrico nas reações associadas a estímulos aversivos.** Tese apresentada a UFSCAR e UNESP-Araraquara.

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

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

MONAGHAN D. T; BRIDGES, R. J; COTMAN, C. W (1989). The excitatory amino acids receptors: their classes, pharmacology and distinct properties in the function of the central nervous system. **Annu Rev Pharmacol Toxicol** 29:365- 402.

MOREIRA, F. A; MOLCHANOV, M. L; GUIMARÃES, F. S (2004). Ionotropic glutamate receptor antagonists inhibit the aversive effects of nitric oxide donor injected into the dorsolateral periaqueductal gray of rats. **Psychopharmacology** 171:199-203.

MOREIRA, F. A; AGUIAR, D. C; GUIMARAES, F. S (2007). Anxiolytic-like effect of cannabinoids injected into the rat dorsolateral periaqueductal gray. **Neuropharmacology** 52:958–965.

MOREIRA, F. A; LUTZ, B (2008). The endocannabinoid system: emotion, learning and addiction. **Addict Biol** 13:196-212.

MOREIRA, F. A; AGUIAR, D. C; CAMPOS, A. C; LISBOA, S. F; TERZIAN, A. L; RESSTEL, L. B; GUIMARÃES, F. S (2009a). Antiaversive effects of cannabinoids: is the periaqueductal gray involved? **Neural Plast** 2009: 625469.

MOREIRA, F. A; GRIEB, M; LUTZ, B (2009b). Central side-effects of therapies based on CB1 cannabinoid receptor agonists and antagonists: focus on anxiety and depression. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab** 23:133-44.

MOREIRA, F.A; AGUIAR, D. C; TERZIAN, A. L; GUIMARÃES, F. S; WOTJAK, C. T (2011). Cannabinoid type 1 receptors and transient receptor potential vanilloid type 1 channels in fear and anxiety-two sides of one coin? **Neuroscience**. *Inpress*

MORRIS, R. G. M (1989). Synaptic plasticity and learning: selective impairment of learning in rats and blockade of long-term potentiation in vivo by N-methyl-D-aspartate receptor antagonist AP5. **J Neurosci** 9:3040-3057.

MONTGOMERY, K. C (1955). The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. **J Comp Physiol Psychol** 48:254-60.

MUSELLA, A; DE CHIARA, V; ROSSI, S; PROSPERETTI, C; BERNARDI, G; MACCARRONE, M; CENTONZE, D (2009). TRPV1 channels facilitate glutamate transmission in the striatum. **Mol Cell Neurosci** 40:89-97.

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

NAUTA, W. J. H (1958). Hippocampal projections and related neural pathways to the midbrain in the cat brain. **Brain** 81:319-340.

OZAWA, S; KAMIYA, H; TSUZUKI, K (1998). Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. **Prog Neurobiol** 54:581-618.

PALAZZO, E; DE NOVELLIS, V; MARABESE, I; CUOMO, D; ROSSI, F; BERRINO, L; ROSSI, F; MAIONE, S (2002). Interaction between vanilloid and glutamate receptors in the central modulation of nociception. **Eur. J. Pharmacol.** 439: 69—75.

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

PIOMELLI, D (2003). The molecular logic of endocannabinoid signalling. **Nature Review Neuroscience** 4: 873-84.

POLTRONIERI, S. C; ZANGROSSI, H. JR; VIANA, M. B (2003). Antipanic-like effect of serotonin reuptake inhibitors in the elevated T-maze. **Behav Brain Res** 147 (1-2): 185-192.

RESSTEL, L. B. M; LISBOA, S. F; AGUIAR, D. C; CORRÊA, F. M. A; GUIMARÃES, F. S (2008). Activation of CB1 cannabinoid receptors in the dorsolateral periaqueductal gray reduces the expression of contextual fear conditioning in rats. **Psychopharmacology** 198:405-411

ROBERTS, J. C; DAVIS, J. B; BENHAM, C. D (2004). [3H]Resiniferatoxin autoradiography in the CNS of wild-type and TRPV1 null mice defines TRPV1 (VR-1) protein distribution. **Brain Res** 995: 176-183.

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** 18:1292-301.

SANSON, L. T; CAROBREZ, A. P (1999). Long-lasting inhibitory avoidance acquisition in rats submitted to the elevated T-maze model of anxiety. **Behav Brain Res** 101:59-64.

SASAMURA, T; SASAKI, M; TOHDA, C; KURASHI, Y (1998). Existence of capsaicin-sensitive glutamatergic terminals in rat hypothalamus. **Neuroreport**. 9:2045-8.

SCHENBERG, L. C; GRAEFF, F. G (1978). Role of the periaqueductal gray substance in the antianxiety action of benzodiazepines. **Pharmacol Biochem Behav** 9:287-95.

SCHENBERG, L. C; BITTENCOURT, A. S; SUDRÉ, E. C; VARGAS, L. C (2001). Modeling panic attacks. **Neurosci Biobehav Rev** 25:647-59.

SHEN, M; PISER, T. M; SEYBOLD, V. S; THAYER, S. A (1996). Cannabinoid receptor agonists inhibit glutamatergic synaptic transmission in rat hippocampal cultures. **J Neurosci** 16:4322-4334.

SILVEIRA M. C; GRAEFF, F. G (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** 57:226-32.

SMART, D; GUNTHORPE, M. J; JERMAN, J. C; NASIR, S; GRAY, J; MUIR, A. I; CHAMBERS, J. K; RANDALL, A. D; DAVIS, J. B (2000). The endogenous lipid anandamide is a full agonist at the human vanilloid receptor (hVR1). **Br J Pharmacol** 129: 227-230.

SOLYOM, L (1994). Controlling panic attacks with fenfluramine. **Am. J. Psychiat** 151:621-622.

SOUTHALL, M. D; LI, T; GHARIBOVA, L. S; PEI, Y; NICOL, G. D; TRAVERS, J. B (2003). Activation of epidermal vanilloid receptor-1 induces release of proinflammatory mediators in human keratinocytes. **J Pharmacol Exp Ther** 304: 217-22.

SPOOREN, W; BALLARD, T; GASPARINI, F; AMALRIC, M; MUTEL, V; SCHREIBER, R (2003). Insight into the function of Group I and Group II metabotropic glutamate (mGLU) receptors; behavioural characterization and implications for the treatment of CNS disorders. **Behav Pharmacol** 14:257-77.

STAROWICZ, K; MAIONE, S; CRISTINO, L; PALAZZO, E; MARABESE, I; ROSSI, F; DE NOVELLIS, V; DI MARZO, V (2007a). Tonic endovanilloid facilitation of glutamate release in brainstem descending antinociceptive pathways. **J Neurosci** 27:13739-49.

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

SZALLASI, A; BLUMBERG, P. M (1999). Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. **Pharmacol Rev** 51: 159-212.

SZALLASI, A; DI MARZO, V (2000). New perspectives on enigmatic vanilloid receptors. **Trends Neurosci** 23: 491-497.

TEIXEIRA, R. C; ZANGROSSI, H. JR; GRAEFF, F.G (2000). Behavioral effects of acute and chronic imipramine in the elevated T-maze model of anxiety. **Pharmacol Biochem Behav** 65: 571-576.

TAKAHASHI, K. A; CASTILLO, P. E (2006). The CB1 cannabinoid receptor mediates glutamatergic synaptic suppression in the hippocampus. **Neurosci** 139:795-802.

TERZIAN, A. L; AGUIAR, D. C; GUIMARAES, F. S; MOREIRA, F. A (2009). Modulation of anxiety-like behaviour by Transient Receptor Potential Vanilloid Type 1 (TRPV1) channels located in the dorsolateral periaqueductal gray. **Eur Neuropsychopharmacol** 3: 188-195.

TOHDA, C; SASAKI, M (2001). Axonal transport of VR1 capsaicin receptor mRNA in primary afferents and its participation in inflammation-induced increase in capsaicin sensitivity. **J Neurochem** 76: 1628-1635.

TOMINAGA, M; CATERINA, M. J (2004). Thermosensation and pain. **J Neurobiol** 61: 3-12.

TOTH, A; BOCZAN, J; KEDEI, N; LIZANECZ, E; BAGI, Z; PAPP, Z; EDES, I; CSIBA, L; BLUMBERG, P. M (2005). Expression and distribution of vanilloid receptor 1 (TRPV1) in the adult rat brain. **Brain Res Mol Brain Res** 135: 162-168.

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

VAN DER STELT, M; TREVISANI, M; VELLANI, V; DE PETROCELIS, L; MORIELLO, A. S; CAMPI, B; MCNAUGHTON, P; GEPETTI, P; DI MARZO, V (2005). Anandamide acts as an intracellular messenger amplifying Ca<sup>2+</sup> influx via TRPV1 channels. **EMBO J** 24:3517-3518.

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

VAUGHAN, C. W; CONNOR, M; BAGLEY, E. E; CHRISTIE, M. J (2000). Actions of cannabinoids on membrane properties and synaptic transmission in rat periaqueductal gray neurons in vitro. **Mol Pharmacol** 57: 288-295.

VIANA, M. B; TOMAZ, C; GRAEFF, F. G (1994). The elevated T-maze: a new animal model of anxiety and memory. **Pharmacol Biochem Behav** 49: 549-554.

VIVEROS, M. P; MARCO, E. M; FILE, S. E (2005). Endocannabinoid system and stress and anxiety responses. **Pharmacol Biochem Behav** 81:331-42.

WATKINS, J. C (2000). I-glutamate as a central neurotransmitter: looking back. **Biochem Soc Trans** 28: 297-309.

XING, J; LI, J (2007). TRPV1 receptor mediates glutamatergic synaptic input to dorsolateral periaqueductal gray (dl-PAG) neurons. **J Neurophysiol** 97: 503-511.

ZANGROSSI, H. JR; GRAEFF, F. G (1997). Behavioral validation of the elevated T-maze, a new model of anxiety. **Brain Res Bull** 44 (1): 1-5.

ZANGROSSI, H. JR; VIANA, M. B; ZANOVELI, J; BUENO, C. H; NOGUEIRA, R. L; GRAEFF, F. G (2001). Serotonergic regulation of inhibitory avoidance and oneway escape in the elevated T-maze. **Neurosci Biobehav Rev** 25 (7-8): 637-645.

ZANOVELI, J. M; NOGUEIRA, R. L; ZANGROSSI, H. JR (2003). Serotonin in the dorsal periaqueductal gray modulates inhibitory avoidance and one-way escape behaviors in the elevated T-maze. **Eur J Pharmacol** 473 (2-3): 153-161.

ZANOVELI, J. M (2005). **Envolvimento dos receptores serotoninérgicos 5-HT1A e 5-HT2A localizados na substância cinzenta periaqueductal dorsal no efeito de drogas usadas na terapêutica do transtorno do pânico: evidências obtidas em ratos submetidos ao labirinto em T elevado**. Tese apresentada à Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto.

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