

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

**EFEITOS DE FÁRMACOS QUE ATUAM NO SISTEMA**  
**CANABINOIDE SOBRE A MODULAÇÃO DOS**  
**COMPORTAMENTOS DEFENSIVOS AVALIADOS**  
**NO LABIRINTO EM T ELEVADO**

**PEDRO HENRIQUE GOBIRA NUNES**

**BELO HORIZONTE – 2012**

**PEDRO HENRIQUE GOBIRA NUNES**

**EFEITOS DE FÁRMACOS QUE ATUAM NO SISTEMA  
CANABINOIDE SOBRE A MODULAÇÃO DOS  
COMPORTAMENTOS DEFENSIVOS AVALIADOS  
NO LABIRINTO EM T ELEVADO**

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

**ORIENTADOR: Prof. Dr. FABRÍCIO DE ARAÚJO MOREIRA**

**Belo Horizonte – 2012**

## **Dedicatória**

*Às amadas e saudosas mamãe e vovó*

*“Ando devagar porque já tive pressa e levo esse sorriso porque já chorei de mais.”*

*Almir Sater*

## **Agradecimentos:**

Agradeço a **Deus**, por ter guiado meus passos desde o princípio dessa jornada, e que a **Ele** sejam dadas toda a honra e toda glória.

Ao meu **pai** agradeço pelo exemplo de hombridade, e por apoiar todas as minhas decisões, inclusive a de seguir a longínqua carreira acadêmica. Aos **meus irmãos** pelo carinho e confiança, e a **Tia Cina** por ter se tornado a minha referência de mãe.

Agradeço aos **companheiros de república** pela convivência tão alegre e por compartilhar comigo minhas tristezas e minhas alegrias. À **Luana** agradeço pela compreensão, apoio e carinho sempre presentes;

Aos **amigos irmãos da graduação** pela torcida e pelas gargalhadas daquele tempo e que se mantém até hoje. Aos **amigos da pós**, agradeço pelas vezes que compartilhamos nossas angústias, preocupações e alegrias;

A **família do Laboratório de Neuropsicofarmacologia** pela paciência, pelas acusações e pelo aprendizado. Em especial agradeço ao **Luciano** pelas risadas, a **Thércia** pela espiritualidade, a **Flávia** pelo exemplo de superação, a **Luara** e **Carla** agradeço pelas sessões terapêuticas que me ajudaram a ter mais paciência;

Ao professor **Dr. Fabrício de Araújo Moreira** pelos ensinamentos, e pela orientação pautada no respeito e na amizade;

A professora **Dra. Daniele Cristina de Aguiar**, pelo respeito e por ter ensinado que é possível, desde que se corra atrás.

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

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

A **CAPES**, pelo apoio financeiro.

Tenho absoluta certeza de que sem a participação de cada um de vocês essa etapa da minha vida não seria concluída.

## Sumário

|  |           |
|--|-----------|
| <b>LISTA DE FIGURAS</b>                                | <b>6</b>  |
| <b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>                           | <b>7</b>  |
| <b>RESUMO</b>  | <b>8</b>  |
| <b>ABSTRACT</b>  | <b>9</b>  |
| <b>INTRODUÇÃO</b>                                      | <b>10</b> |
| ▪ Ansiedade  | <b>11</b> |
| ▪ Ansiedade experimental: neurobiologia e farmacologia | <b>14</b> |
| ▪ Modelos animais de Ansiedade                         | <b>15</b> |
| ▪ Cannabis, canabinoides e sistema endocanabinoide     | <b>21</b> |
| ▪ Canabinoides e Ansiedade                             | <b>26</b> |
| <b>OBJETIVOS</b>                                       | <b>30</b> |
| <b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>                             | <b>31</b> |
| ▪ Animais  | <b>32</b> |
| ▪ Drogas   | <b>32</b> |
| ▪ Aparelhos experimentais                              | <b>32</b> |
| ▪ Procedimento experimental                            | <b>34</b> |
| ▪ Delineamento experimental                            | <b>36</b> |
| ▪ Análise estatística                                  | <b>38</b> |
| <b>RESULTADOS</b>                                      | <b>39</b> |
| <b>DISCUSSÃO DOS RESULTADOS</b>                        | <b>56</b> |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>                      | <b>69</b> |

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Labirinto em T Elevado

**Figura 2:** Sinapse Canabinoide

**Figura 3:** Labirinto em T Elevado demonstrando o local de inserção da barreira

**Figura 4:** Campo aberto

**Figura 5:** Representação esquemática do teste no LTE.

**Figura 6:** Efeito da inserção da barreira sobre a tarefa de esquiva inibitória avaliada no LTE

**Figura 7:** Efeito da inserção da barreira sobre a tarefa de escape avaliada no LTE

**Figura 8:** Efeito do Diazepam e do Alprazolam sobre a tarefa de esquiva inibitória avaliada no LTE

**Figura 9:** Efeito do Diazepam e do Alprazolam sobre a tarefa de escape avaliada no LTE

**Figura 10:** Efeito do Win 55-212 (0.1, 0.3, 1.0 mg/Kg) sobre a resposta de esquiva inibitória

**Figura 11:** Efeito do Win 55-212 (0.1, 0.3, 1.0 mg/Kg) sobre a resposta de escape

**Figura 12:** Efeito do AM 251 (0.3, 1.0 e 3.0 mg/Kg) sobre a resposta de esquiva inibitória

**Figura 13:** Efeito do AM 251 (0.3, 1.0 e 3.0 mg/Kg) sobre a resposta de escape

**Figura 14:** Efeito do pré-tratamento com AM 251(1.0 mg/Kg) sobre o ação do Win 55-212 (1.0 mg/mL) na resposta de esquiva inibitória.

**Figura 15:** Efeito do pré-tratamento com AM 251(1.0 mg/Kg) sobre o ação do Win 55-212 (1.0 mg/mL) na resposta de escape

**Figura 16:** Efeito do Rimonabanto (0.3, 1.0 e 3.0 mg/Kg) sobre a resposta de esquiva inibitória

**Figura 17:** Efeito do Rimonabanto (0.3, 1.0 e 3.0 mg/Kg) sobre a resposta de escape

**Figura 18:** Efeito do URB-597 (0.1, 0.3 e 1.0 mg/Kg) sobre a resposta de esquiva inibitória.

**Figura 19:** Efeito do URB-597 (0.1, 0.3 e 1.0 mg/Kg) sobre a resposta de escape

**Figura 20:** Efeito do Win 55-212(1.0 mg/Kg), do URB 597 (1.0 mg/Kg) e do AM 251(3.0 mg/Kg) sobre a atividade locomotora avaliada no campo aberto

## LISTA DE ABREVIATURAS

**2-AG:** Diacilglicerol lípase

**$\Delta$ 9-THC:** Delta nove tetrahydrocannabinol

**5-HT:** Serotonina

**AEA:** Araquidonoil etanolamida (anandamida)

**AMPc:** Monofosfato cíclico de adenosina

**Ca<sup>2+</sup>:** Íons cálcio

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

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

**CCE:** Caixa claro escuro

**CPF:** Córtex pré-frontal

**DLH:** D,L-homocisteico

**DSM:** Diagnostic Statistical Manual

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

**GABA:** Ácido gama-aminobutírico

**IMAO:** Inibidor da monoaminoxidase

**LBase:** Latência de Base

**LCE:** Labirinto em Cruz Elevado

**LTE:** Labirinto em T Elevado

**MGL:** Monoacilglicerol lipase

**RDC:** Research Diagnostic Criteria

**SCP:** Substância cinzenta periaquedutal

**SNC:** Sistema Nervoso Central

**TRPV:** Receptor vaniloide de potencial transitório

### **Resumo:**

A ansiedade é uma emoção adaptativa, associada a comportamentos defensivos. Ela pode, porém, se manifestar de forma excessiva, caracterizando transtornos psiquiátricos, dos quais existem distintos tipos, sendo o transtorno do pânico e o transtorno da ansiedade generalizada os alvos deste trabalho. Estudos com animais experimentais têm sido importantes para melhor caracterizar e elucidar a neurobiologia e a farmacologia desses transtornos, daí a importância de modelos animais que permitam analisar comportamentos correlatos para cada um deles. Nesse contexto foi desenvolvido o labirinto em T elevado (LTE). Esse modelo avalia duas tarefas distintas em um mesmo animal: a esquivia inibitória, correlata ao transtorno da ansiedade generalizada, e a tarefa de escape, relacionada ao transtorno do pânico. Diversos neurotransmissores podem modular tais comportamentos, dentre eles o sistema endocanabinoide. Estudos prévios demonstraram que tanto agonistas quanto antagonistas dos receptores canabinoides podem apresentar respostas complexas nos modelos clássicos de ansiedade. Com base nessas evidências, a proposta desse trabalho foi testar a hipótese de que drogas que facilitam as ações do sistema endocanabinoide promoveriam efeitos ansiolíticos e anti-pânico no LTE. O tratamento com o agonista canabinoide WIN 55-212 (1,0 mg/Kg) diminuiu a latência de saída do braço fechado na tarefa de esquivia inibitória, caracterizando efeito tipo ansiolítico da droga. Esse efeito foi revertido pelo pré-tratamento com antagonista dos receptores CB1 AM 251 (1,0 mg/Kg). Na dose maior (3,0 mg/Kg) esse antagonista promoveu, ainda, efeito ansiogênico, o que não foi observado com o Rimonabanto (3,0 mg/Kg), um outro antagonista. Nenhuma dessas drogas alterou a tarefa de escape. O inibidor da hidrólise da anandamida, URB 597 (0,3/1,0 mg/Kg), diminuiu a latência para a saída do braço fechado e aumentou a latência do braço aberto evidenciado efeito ansiolítico e panicolítico, respectivamente. Juntos, esses resultados sugerem que drogas que atuam sobre o sistema canabinoide apresentam distintos efeitos sobre os comportamentos avaliados no LTE.

## **Abstract**

Anxiety is an adapting emotion related to defensive responses. It may, however, occur excessively, characterizing psychiatric disorders, such as panic and generalized anxiety disorders, which are the focus of this work. Studies with experimental animals have been important to better characterize and elucidate their neurobiology and pharmacology. Hence, the importance of animal models to evaluate each specific disorder. In this context the elevated T maze (LTE) has been developed to evaluate two distinct tasks in the same animal: inhibitory avoidance, related to generalized anxiety disorder, and the escape response, predictive of panic disorder. Several neurotransmitters may modulate such behaviors, including the endocannabinoid system. Previous studies have demonstrated that both agonists and antagonists of cannabinoid receptors can yield complex responses in standard models of anxiety. Based on this evidence, the purpose of this study was to test the hypothesis that drugs that facilitate the endocannabinoid system would induce anxiolytic and anti-panic effects in the LTE. Treatment with the cannabinoid agonist WIN 55-212 (1,0 mg/Kg) decreased the latency to leave the enclosed arm in the inhibitory avoidance task, characterizing an anxiolytic-like effect, which could be prevented by pretreatment with the CB1 receptor antagonist AM 251 (1,0mg/Kg). At the higher dose (3,0 mg/Kg) this antagonist also promoted anxiogenic-like effect, however a similar behavior was not observed with rimonabant (3.0 mg/Kg), another antagonist. None of these drugs changed escape task. The inhibitor of anandamide hydrolysis, URB597 (0,3 and 1,0 mg/kg) reduced the latency to leave the enclosed arm, and increased the latency to get out of open arm, typical of anxiolytic and panicolytic effects, respectively. Together, these results suggest that drugs that act on the cannabinoid system have different effects in the behaviors assessed in LTE.

## **Introdução**

## **Ansiedade:**

A ansiedade pode ser definida como um estado subjetivo de apreensão ou tensão, cuja manifestação plena pode envolver alterações comportamentais e fisiológicas, tais como taquicardia, sudorese, tensão muscular, irritabilidade, inquietação e perturbação do sono (Brandão, 2001; Graeff, 1999). Constitui-se como uma emoção presente no cotidiano, mas que pode se tornar uma condição patológica. No que tange a ansiedade como emoção normal, ela pode favorecer o desempenho do indivíduo em suas atividades diárias. No entanto, assume um caráter patológico quando começa a comprometer e, até mesmo, incapacitar, a execução de atividades psíquicas e ou motoras (Brandão, 2001; Graeff, 1999).

Ainda mais complexo que distinguir a ansiedade como sendo ou não um quadro patológico, é diferenciar, dentro desse último, qual o tipo de transtorno de ansiedade que acomete determinado paciente. Visando classificar e categorizar estados de ansiedade prejudiciais a um indivíduo, alguns critérios operacionais foram adotados pela Associação Psiquiátrica Americana, através da criação dos Manuais de Diagnóstico e Estatística dos Distúrbios Mentais (DSM, em inglês *Diagnostic Statistical Manual of Mental Disorders*), na tentativa de discriminar os distúrbios ou transtornos de ansiedade chamados de primários.

Segundo a classificação mais recente dos transtornos mentais publicada na quarta edição do DSM (DSM-IV, 1994), os transtornos de ansiedade podem ser agrupados nas seguintes categorias: estresse pós-traumático, transtorno do pânico, transtorno obsessivo compulsivo, fobias e ansiedade generalizada.

Tendo em vista que o transtorno da ansiedade generalizada e o transtorno do pânico configuram-se como os principais objetos do presente estudo, será feita uma abordagem um pouco mais detalhada desses quadros.

Freud (1895) já sugeria em seus estudos, que poderia haver uma distinção entre comportamentos relacionados à ansiedade (Viana, 2010). Entretanto, somente no final dos anos 1970, com a publicação dos Critérios Diagnósticos para a Pesquisa (RDC, em inglês *Research Diagnostic Criteria*) por Spitzer e colaboradores (1978), surgiu a primeira distinção entre dois tipos de transtornos de ansiedade, o transtorno do pânico e o transtorno de ansiedade generalizada (Spitzer et al., 1978).

Esta divisão ocorreu principalmente a partir dos estudos do professor Donald Klein. Esses trabalhos demonstraram que pacientes, posteriormente diagnosticados com o transtorno do pânico, se mostravam resistentes ao tratamento com drogas da classe dos benzodiazepínicos, entretanto melhoravam quando tratados com antidepressivos tricíclicos, a exemplo da imipramina (Klein, 1964; Klein and Fink, 1962). Foram observadas também melhorias no quadro clínico com a utilização dos antidepressivos que atuam inibindo a monoaminoxidase (Kelly et al., 1970; Sargent, 1962). De modo distinto, o transtorno da ansiedade generalizada respondia bem ao tratamento com benzodiazepínicos, mas não aos antidepressivos. Após essas constatações, a terceira edição do DSM, publicado pela Associação Psiquiátrica Americana em 1980 (DSM-III, 1980) também adotou a distinção entre transtorno do pânico e transtorno de ansiedade generalizada.

É importante ressaltar que estudos clínicos posteriores não sustentaram a ineficácia farmacológica dos benzodiazepínicos no tratamento do transtorno

do pânico bem como dos antidepressivos na ansiedade generalizada. Esses estudos demonstraram que certos benzodiazepínicos mais potentes como o alprazolam são eficazes no transtorno do pânico, embora em doses mais elevadas do que as utilizadas no tratamento do transtorno de ansiedade generalizada, e que os antidepressivos, depois de semanas de administração contínua, são tão eficazes quanto os benzodiazepínicos no tratamento do transtorno de ansiedade generalizada (Charney and Woods, 1989; Charney et al., 1986; Rickels and Rynn, 2002).

Do ponto de vista da sintomatologia clínica, a DSM IV, classifica o transtorno da ansiedade generalizada como um estado de excessiva ansiedade ou apreensão com duração de mais de seis meses. Já o transtorno do pânico tem como principal característica a presença de ataques de pânico recorrentes e inesperados seguidos por pelo menos um mês de preocupação persistente sobre a possibilidade de desenvolver um novo ataque, ou uma alteração comportamental significativa relacionada a ele (DSM-IV, 1994)

Os transtornos de ansiedade configuram-se como os transtornos psiquiátricos que mais requerem auxílios de profissionais de saúde (Katzman, 2009). Deste modo, a alta prevalência desses transtornos torna esse grupo de patologias um problema de saúde pública, gerando custos sociais bastante elevados, o que torna importante estudos que visem uma melhor elucidação dos mesmos.

### **Ansiedade experimental: neurobiologia e farmacologia**

Muitos esforços têm sido empregados na tentativa de elucidar os componentes neurobiológicos envolvidos nos transtornos da ansiedade. Boa

parte destes estudos emprega o uso da experimentação animal (Graeff and Zangrossi, 2002; Guimarães et al., 2008).

A utilização dos estudos com animais para melhor compreensão desses transtornos está vinculada à correlação das emoções humanas com as respostas emitidas pelos animais, a qual tem sido feita com base na proposta evolutiva de Charles Darwin. Segundo ele, tendo os animais como seus ancestrais, o homem compartilharia com eles as mesmas emoções básicas. Sob esta perspectiva evolutiva, os transtornos de ansiedade teriam suas raízes nas reações de defesa dos animais, expressas frente a situações ou estímulos que representem ameaça ou perigo (Blanchard and Blanchard, 1990; Graeff, 1999).

Estudos conduzidos no laboratório de Robert e Caroline Blanchard demonstraram que, dependendo do tipo de ameaça ou situação de perigo ao qual o animal é exposto, as respostas por ele emitidas também são distintas. Baseado em observações do comportamento defensivo, o casal Blanchard, classificou as respostas de defesa desempenhadas pelos animais de acordo com o nível de ameaça ao qual eles estão submetidos (Blanchard and Blanchard, 1988; Blanchard and Blanchard, 1990).

Nesse contexto, o primeiro nível de defesa ocorre quando a presença do predador é incerta, como por exemplo, quando se explora um ambiente no qual, outrora, a presença do predador já tenha sido detectada, ou quando se está em contato com estímulos associados ao predador como o cheiro do mesmo. Nesse caso o comportamento de defesa apresentado é uma avaliação cautelosa do local, e uma resposta de esquiva (Blanchard and Blanchard, 1988; Blanchard et al., 2001).

No segundo e no terceiro níveis de defesa, o perigo é real. No segundo nível, entretanto, esse perigo está a certa distância. Nesse caso o comportamento emitido pelo animal é o da fuga, caso exista uma rota de saída. Todavia, se essa fuga não for possível, o animal exhibe o comportamento de congelamento. No terceiro e último nível, caracterizado pela presença proximal do predador, os comportamentos observados são a ameaça defensiva (vocalizações), o ataque defensivo (saltos e mordidas), além da tentativa de fuga (Blanchard and Blanchard, 1988; Blanchard et al., 2001).

Além dessas inter-relações presa-predador, respostas comportamentais de defesa também podem ocorrer mediante fatores ambientais aversivos como a iluminação, altura, exposição a lugares ou objetos novos (Carobrez and Bertoglio, 2005).

A avaliação experimental dessas distintas reações de defesa tem sido importante na caracterização dos substratos neurais, bem como da atividade de fármacos que interferem nestas reações e, conseqüentemente, dos transtornos de ansiedade preditivos aos mesmos.

### **Modelos animais de ansiedade:**

A utilização de modelos animais tem sido importante para melhor caracterizar e elucidar a neurobiologia e a farmacologia dos transtornos de ansiedade (Graeff and Zangrossi, 2002)

Os primeiros modelos animais utilizados no estudo da ansiedade foram desenvolvidos com base nos paradigmas oriundos da psicologia experimental formulados nas décadas de 60 e 70. Eles se baseavam no estudo da ansiedade normal ou patológica, uma vez que não havia, ainda, as

classificações modernas que distinguem os tipos de ansiedade (Graeff and Zangrossi, 2002; Guimarães et al., 2008; Pinheiro et al., 2007).

De modo geral, esses modelos de ansiedade clássicos recorrem ao condicionamento Pavloviano bem como ao condicionamento operante (McNaughton and Gray, 2000). Assim, no primeiro caso, avalia-se a inibição de uma resposta gerada por um estímulo condicionado. Este condicionamento é obtido com o pareamento de um estímulo aversivo, como um choque elétrico nas patas, a um estímulo outrora neutro, por exemplo, um tom acústico. Já no segundo tipo de condicionamento, estuda-se a supressão de uma resposta comportamental instrumental, como pressionamento de uma barra, sendo essa supressão desencadeada por uma punição, por exemplo, um choque (Graeff and Zangrossi, 2002; Pinheiro et al., 2007).

Embora sejam extensamente utilizados nos ensaios de validação de novos agentes ansiolíticos, bem como nos estudos desempenhados no sentido de melhor compreender os mecanismos de ação dos mesmos, os modelos de punição passaram a ser bastante criticados. O foco dessas críticas se concentra no caráter artificial dos modelos, uma vez que se trata de condições que não são encontradas no ambiente em que o animal vive, bem como no fato de a metodologia empregada ser passível de sofrer a ação de interferentes, os quais não caracterizam diretamente fenômenos comportamentais relacionados à ansiedade. Um exemplo é o caso de a droga estudada apresentar efeito analgésico, o que pode fazer com que o animal execute mais vezes a tarefa punida, já que ele pode apresentar uma resposta diferenciada à punição (Carobrez and Bertoglio, 2005; Graeff and Zangrossi, 2002).

A fim de contornar esses problemas, modelos animais mais etológicos vêm sendo desenvolvidos para o estudo da ansiedade. Tais modelos se baseiam em comportamentos naturais das espécies. Neste contexto, e tendo como base a constatação de que alguns roedores, como ratos e camundongos, evitam locais abertos e elevados e uma vez nele confinados demonstram sinais de medo como congelamento e aumento da defecação e micção, foi desenvolvido um modelo animal de estudos de ansiedade denominado Labirinto em Cruz Elevado (LCE) (Carobrez and Bertoglio, 2005; Handley and Mithani, 1984; Pellow et al., 1985).

O LCE é um dos mais difundidos modelos animais para o estudo da ansiedade. O aparelho é constituído de quatro braços de iguais dimensões, sendo dois deles abertos e dois fechados situados a 50 cm de altura do solo. O modelo está baseado no conflito entre o desejo de exploração do novo, caracterizado pela saída do braço fechado, mais seguro, em contrapartida a um ambiente aversivo caracterizado pelos braços abertos, no qual o animal está mais exposto a possíveis ações de predadores (Pellow et al., 1985). Seu caráter etológico se baseia no fato de que, durante o teste, o animal desenvolve uma exploração espontânea, sem a necessidade de uma recompensa motivadora ou necessidade de consumo. Como já citado, o medo inato destes animais por espaços abertos e alturas elevadas faz com que eles circulem muito pouco nos braços abertos em relação ao tempo que eles se concentram nos fechados (Carobrez and Bertoglio, 2005; Graeff and Zangrossi, 2002).

Contudo, os efeitos de melhora do quadro clínico apresentada por pacientes diagnosticados com transtornos de ansiedade e que foram tratados

com fármacos que modulam a neurotransmissão serotoninérgica, colocou em cheque a eficácia do LCE. Isso porque, apesar de apresentar acentuada preditabilidade farmacológica no que diz respeito ao efeito ansiolítico dos benzodiazepínicos, o modelo não foi hábil em detectar o efeito ansiolítico de drogas não benzodiazepínicas, mais especificamente drogas que atuam modulando a neurotransmissão mediada pela serotonina (5-HT) (Borsini et al., 2002; Handley and McBlane, 1993; Kahn et al., 1986).

A pesquisadora Shirley Handley, sugeriu que a incapacidade de detecção desses efeitos se deve ao fato do labirinto em cruz ser caracterizadamente um modelo no qual o animal se utiliza de diferentes estratégias de defesa. Simplificadamente, segundo ela, o animal se esquivaria do braço aberto quando está no braço fechado e buscaria escapar do braço aberto para um lugar seguro enquanto o explora. Estas estratégias distintas podem ser associadamente responsáveis pela não detecção de efeitos de drogas que atuam na neurotransmissão serotoninérgica. (Handley and McBlane, 1993)

Tais proposições corroboram com a hipótese de Deakin e Graeff que ressalta a participação diferencial da 5-HT na modulação de respostas defensivas que têm sido relacionadas ao transtorno de ansiedade generalizada e ao transtorno do pânico. Assim as diferentes estratégias de defesa exigidas durante o teste do LCE possivelmente seriam moduladas de modo distinto pela serotonina (Deakin and Graeff, 1991; Graeff, 2002).

A fim de tentar responder a estes entraves experimentais, Graeff e colaboradores buscaram desenvolver um modelo experimental que fosse hábil em avaliar duas tarefas, que poderiam estar relacionadas a respostas

defensivas distintas. Essas tarefas são a esquiva inibitória e o escape (Graeff et al., 1993).

O modelo desenvolvido foi denominado labirinto em T elevado (LTE), e constitui uma adaptação do LCE. Esse aparelho é dotado de três braços de iguais dimensões, sendo dois abertos e um fechado, suspenso 40 cm do chão. O teste apresenta duas sessões distintas. Na primeira, na qual se avalia a esquiva inibitória, o animal é colocado na extremidade do braço fechado e contabiliza-se o tempo que ele leva para colocar as quatro patas no centro do labirinto. Para avaliar a tarefa de escape o procedimento é semelhante, com a diferença de que o animal é colocado na extremidade do braço aberto (Graeff et al., 1993; Zangrossi and Graeff, 1997).

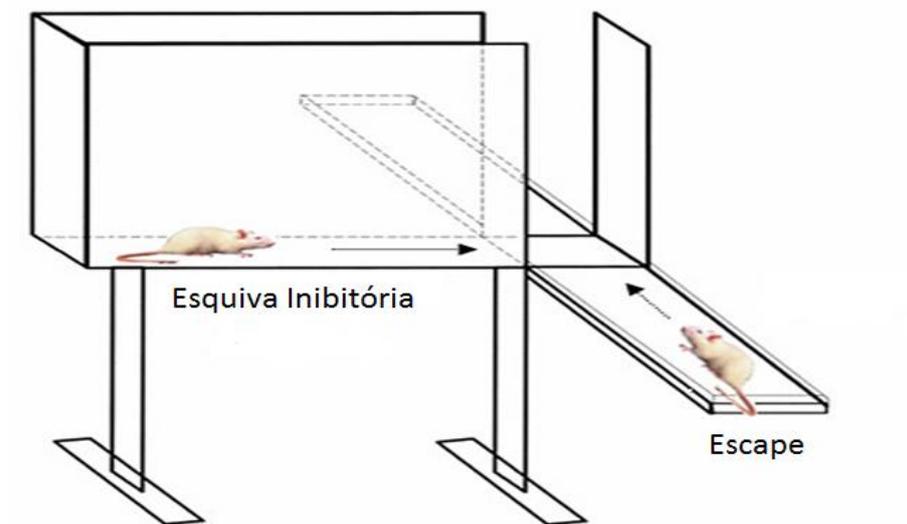


Figura 1: Labirinto em T Elevado (LTE)

Validações farmacológicas e comportamentais deste modelo têm demonstrado que a tarefa de esquiva inibitória está correlacionada com o transtorno da ansiedade generalizada, o que pode ser confirmado com a inibição da latência de esquiva promovida tanto por benzodiazepínicos quanto

pelo tratamento crônico com imipramina (Teixeira et al., 2000; Zangrossi and Graeff, 1997). Em contrapartida, os resultados encontrados na tarefa de escape, como o efeito inibitório da imipramina sobre o comportamento de fuga, são preditivos para o transtorno do pânico, uma vez que se assemelham aos efeitos panicolíticos da droga em pacientes com o transtorno do pânico (Teixeira et al., 2000). Corroboram com isso os resultados de Poltronieri e colaboradores (2003), os quais demonstram que a administração crônica (21 dias), mas não aguda, de fluoxetina inibe a resposta de fuga dos animais no LTE (Poltronieri et al., 2003).

Estudos mais recentes utilizando o LTE têm proporcionado importantes resultados acerca do papel da serotonina na ansiedade. Além dos efeitos já citados com drogas mais clássicas como inibidores da enzima monoaminoxidase (IMAO), esse modelo tem fornecido importantes informações sobre os papéis de receptores, bem como subunidades de alguns dos diversos tipos de receptores para serotonina (da Silva et al., 2011; de Paula et al., 2012; de Paula Soares and Zangrossi, 2009; Pobbe and Zangrossi, 2005). Deste modo, o modelo se mostra um tanto quanto eficaz para avaliar o efeito de drogas com papel complexo nas respostas defensivas correlacionadas com a ansiedade.

As evoluções na compreensão da participação da serotonina nos distintos comportamentos defensivos, preditivos dos transtornos da ansiedade generalizada e do transtorno do pânico propiciadas pelo uso do modelo LTE, caracterizam o mesmo como um importante método para a elucidação do papel de drogas que apresentam efeitos complexos sobre a ansiedade.

### **Cannabis, canabinoides e sistema endocanabinoide:**

Os registros do uso da planta *Cannabis sativa* pelas civilizações antigas remonta há milhares de anos. Achados históricos e arqueológicos já indicavam que o cultivo dessa erva era realizado na China desde o ano 4000 antes de Cristo. Propriedades medicinais da planta foram descritas pelos chineses, em sua farmacopéia (2700 a.C). Já no ocidente os primeiros relatos do uso terapêutico da *Cannabis*, no início do século XIX, foram realizados pelo médico irlandês William B O'Shaughnessy (Pamplona and Takahashi, 2012; Zuardi, 2006).

Embora tenha sido descrita na medicina ocidental há dois séculos, somente nos últimos cinquenta anos, através dos estudos conduzidos por Mechoulam e colaboradores, é que os principais constituintes químicos da *C. sativa*, bem como os reais efeitos por eles mediados começaram a ser melhor compreendidos. Os estudos conduzidos por Mechoulam promoveram o isolamento, a caracterização molecular e a síntese do principal constituinte químico da *Cannabis*: o  $\Delta$ 9-tetrahydrocannabinol ( $\Delta$ 9-THC), o qual se configura como maior responsável pelos marcantes efeitos da planta, como hipotermia, catalepsia, analgesia e redução do controle motor. Além desse, outros sessenta constituintes químicos foram posteriormente isolados (Mechoulam, 1970; Pamplona and Takahashi, 2012).

O acentuado caráter lipofílico inerente dos constituintes da *Cannabis*, além de ter dificultado o isolamento dos mesmos, tornou complexo o estudo das propriedades farmacológicas da planta. Essa acentuada lipofilicidade levou a comunidade científica a acreditar, por alguns anos, que a ação dos

canabinoides era decorrente de sua dispersão na membrana lipídica das células (Paton, 1975).

Entretanto alguns achados científicos, como o fato de os principais efeitos do  $\Delta$ 9-THC, hipotermia, catalepsia, analgesia e redução do controle motor, se mostrarem sensíveis a variações da dose ministrada bem como a pequenas alterações na estrutura da molécula começaram a por em cheque a teoria da dispersão lipídica. Passou-se então a cogitar a existência de sítios específicos de ligação, ou seja, de receptores específicos para os canabinoides (Howlett and Fleming, 1984).

A existência desses receptores canabinoides foi de fato sugerida por Howlett e Fleming, que demonstraram, em 1984, que os canabinoides eram capazes de inibir a enzima adenilato ciclase em concentrações que se correlacionavam significativamente com as doses utilizadas em modelos animais. Posteriormente, através da técnica que utiliza ligantes marcados radiotivamente (“binding”), e com o auxílio do ligante radioativo CP-55940, observou-se que este composto radioativo era deslocado do sítio de ligação pelos canabinoides com diferentes afinidades e de forma: estereosseletiva, saturável e sensível a pequenas variações estruturais (Devane et al., 1988; Howlett and Fleming, 1984). Além disso, esses pesquisadores identificaram uma correlação entre a ordem de afinidade pelo sítio de ligação e a ordem de potência para a indução de efeitos farmacológicos em humanos e em animais experimentais. Essas características preenchem os critérios para a proposta de um novo receptor, ao qual se ligariam os canabinoides.

Finalmente, em 1990, um receptor acoplado à proteína G foi clonado, caracterizado e identificado como o receptor canabinoide. A presença de concentrações variadas desse receptor em distintas regiões do Sistema Nervoso Central fora demonstrada, e possíveis funções foram sugeridas. Assim, receptores presentes no cerebelo e no núcleo da base podem mediar as alterações motoras induzidas pelos canabinoides. Nos diversos núcleos do hipotálamo esses receptores podem mediar a hipotermia e o aumento de apetite enquanto a sua presença no hipocampo e em diversas regiões do córtex cerebral pode ser responsável pelos déficits cognitivos e pela amnésia anterógrada (Herkenham et al., 1990).

Um novo receptor fora caracterizado posteriormente e a ele confere-se a propriedade de mediar apenas os efeitos periféricos dos canabinoides, embora estudos mais recentes tenham colocado em cheque esta hipótese (Ortega-Alvaro et al., 2011; Xi et al., 2011). O Comitê para Nomenclatura de Receptores e Classificação de Drogas da União Internacional de Farmacologia (IUPHAR) denominou os receptores canabinoides pela ordem de descoberta, em subtipo 1 (CB1) e subtipo 2 (CB2) (Howlett et al., 2002).

Posteriormente foram identificados os principais ligantes endógenos desses receptores. O primeiro a ser caracterizado foi a araquidonil-etanolamida (AEA), uma etanolamida do ácido araquidônico, a qual foi denominada anandamida. Foi demonstrado que os efeitos mediados por esse ligante eram semelhantes aos exibidos pelo  $\Delta^9$ -THC (hipotermia, catalepsia, hipolocomoção e analgesia), o que consolidou a hipótese de que a anandamida era um ligante endógeno (Fride e Mechoulam, 1993). Observou-se também uma maior

afinidade da anandamida por receptores do tipo CB1 do que pelos do tipo CB2 (Devane et al., 1992; Felder et al., 1993).

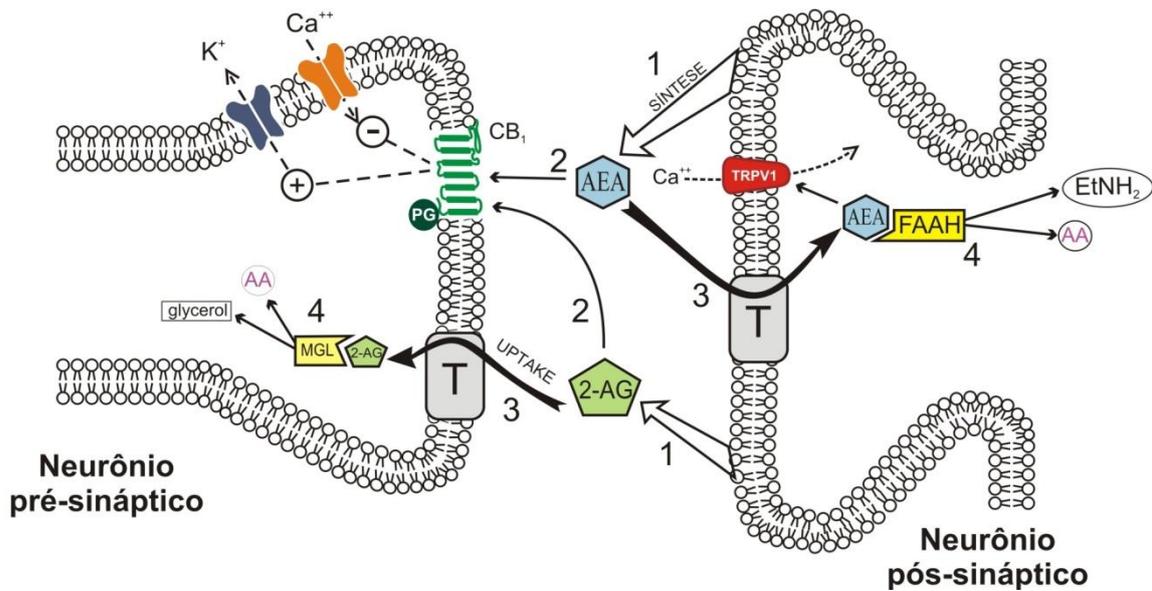
Por outro lado, o 2-araquidonilglicerol (2-AG), um segundo ligante endógeno caracterizado, possui semelhantes valores de afinidade para os dois tipos de receptores. Outros possíveis canabinoides endógenos são a N-araquidonildopamina, o 2-araquidonil-gliceril éter (noladina) e a O-araquidonil-etanolamina (virodamina), todos eles éteres, ésteres ou amidas do ácido araquidônico (Mechoulam et al., 1995; Pamplona and Takahashi, 2012).

Os precursores da síntese destes endocannabinoides são os fosfolípides de membrana. A rota sintética é ativada mediante um influxo de cálcio secundário à despolarização neuronal. Depois de sintetizados eles não são armazenados em vesículas sinápticas, possivelmente difundindo-se logo que produzidos, para o meio extracelular (Di Marzo et al., 1994). Desta forma, o passo limitante para o início da ação dos endocannabinoides é a própria síntese, e não a liberação vesicular (a síntese se dá conforme a demanda). Além disso, os endocannabinoides podem se originar em neurônios pós-sinápticos e agir em terminações pré-sinápticas, exercendo uma ação do tipo retrógrada (Di Marzo, 1999; Di Marzo et al., 1994).

A partir da caracterização dos receptores e da descoberta dos ligantes endógenos foi possível sintetizar agonistas canabinoides, como o WIN 55-212 e HU210 além de antagonistas como o SR141716A (rimonabanto) e o AM 251, os quais se configuram como importantes instrumentos farmacológicos, fundamentais nos estudos que avaliam os papéis desse sistema (Howlett et al., 2002).

Ao se ligarem aos receptores canabinoides, os agonistas, endógenos e exógenos, ativam uma proteína G 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. Os receptores canabinoides podem também aumentar a condutância de canais de potássio e inibir canais de cálcio, hiperpolarizando o neurônio pré-sináptico (Howlett et al., 2002).

A hidrólise dos endocannabinoides ocorre no interior dos neurônios. Entretanto, não está completamente elucidado se a recaptação desses neurotransmissores ocorre por difusão ou se é mediada por um transportador. As enzimas envolvidas neste processo são a hidrolase de amidas de ácidos graxos (*fatty acid amide hydrolase*, FAAH), responsável pela metabolização da anandamida e que possivelmente se localiza nos neurônios pós-sinápticos, e a monoacilglicerol lipase (MGL), responsável pela metabolização do 2-AG e que está localizado nos neurônios pré-sinápticos. Os compostos URB597 e o URB602 constituem, respectivamente, inibidores seletivos de cada uma destas enzimas e, portanto, ao serem ministrados elevam os níveis de endocannabinoides (Howlett et al., 2002; Kathuria et al., 2003).



Saito et. al., 2010

Figura 2: Sinapse Canabinoide

A caracterização do sistema endocanabinoide, aliada ao desenvolvimento de drogas sintéticas, promoveu um aumento nas pesquisas que visam compreender melhor o papel destas drogas em diversos distúrbios sejam eles periféricos, ou em nível de sistema nervoso central.

**Canabinoides e ansiedade:**

O uso da *Cannabis sativa* pode promover significativas alterações nas emoções de medo e de ansiedade (Calabria et al., 2010; Hall and Solowij, 1998). Isso corrobora com a presença de receptores  $CB_1$  em regiões cerebrais que estão implicadas na modulação das respostas relacionadas à ansiedade, como córtex pré-frontal, amígdala e substância cinzenta periaquedutal(SCP) (Ameri, 1999; Moreira and Wotjak, 2010; Rubino et al., 2008). Além disso, estudos de neuroimagem realizados em indivíduos que fazem uso da droga

também têm demonstrado alterações de algumas dessas estruturas nestes pacientes (Gruber et al., 2009; Yucel et al., 2008).

No entanto, comumente ocorrem divergências na forma como o uso recreacional da *Cannabis* pode modular as emoções. Os relatos de sensação de prazer e euforia associada a um alívio da ansiedade e aumentos das inter-relações sociais contrastam com sensações de exacerbação da ansiedade aliada à disforia e mais raramente ataques de pânico. A manifestação desses efeitos opostos pode variar de acordo com o estado emocional que precedeu o uso, bem como da dose utilizada (Moreira and Wotjak, 2010; Parolaro et al., 2010).

O papel bidirecional da *Cannabis* observado em humanos é também mimetizado em estudos com animais. Agonistas de receptores CB1, tanto sintéticos quanto naturais, usualmente conferem respostas complexas em modelos experimentais de ansiedade. Este fato se comprova com os diversos estudos que têm obtido curvas dose resposta em formato de “U” invertido (Lafenetre et al., 2007; Moreira et al., 2009).

De forma geral, animais tratados com baixas doses de  $\Delta$ 9-THC permanecem mais tempo nos braços abertos do LCE, evidenciando efeito tipo ansiolítico. Em contrapartida, os animais que recebem doses altas apresentam efeito oposto, se mantendo mais tempo nos braços fechados, caracterizando um efeito ansiogênico, (Patel and Hillard, 2006; Rubino et al., 2007). Respostas similares foram encontradas após tratamento com o agonista exógeno HU 210 (Hill and Gorzalka, 2004). Patel e Hillard demonstraram, ainda, que o análogo do  $\Delta$ 9-THC, Win 55-212 promoveu efeito dual no LCE. Já Haller e

colaboradores demonstraram efeitos opostos desse agonista em diferentes espécies, sendo efeito tipo ansiogênico promovido em ratos e tipo ansiolítico em camundongos (Haller et al., 2007; Patel and Hillard, 2006).

Cabe ressaltar que um perfil distinto é observado quando se utilizam drogas que modulam o sistema endocanabinoide, não atuando diretamente como agonistas CB1. Tem-se demonstrado, por exemplo, que a inibição farmacológica ou genética da enzima que hidrolisa a anandamida, FAAH, induz somente comportamento tipo ansiolítico (Kathuria et al., 2003; Moreira et al., 2008; Patel and Hillard, 2006).

Ainda dentro do contexto do papel dos canabinoides na ansiedade, muitos estudos têm evidenciado a importância dos receptores CB1 na modulação desses transtornos. Drogas que antagonizam esses receptores, além de serem hábeis em bloquear o efeito promovido pelos agonistas (Moreira et al., 2007; Rubino et al., 2007), podem modular por si só comportamentos relacionados à ansiedade. Efeitos ansiogênicos foram observados nos animais tratados com Rimonabanto e com o AM 251, que foram submetidos ao LCE e ao modelo da caixa claro escuro (Patel and Hillard, 2006; Rodgers et al., 2005). Animais que não expressam esses receptores, também, exibiram um perfil comportamental semelhante (Martin et al., 2002).

Em conjunto, tais dados sugerem que o sistema canabinoide exerce um importante papel no que tange os transtornos da ansiedade. Entretanto, a ação dos canabinoides não foi ainda avaliada em um modelo animal hábil em avaliar separadamente comportamentos que são preditivos de dois tipos distintos de ansiedade.



## **Objetivos:**

### **1. Objetivo geral**

O objetivo geral do presente trabalho foi testar a hipótese de que fármacos que intensificam as ações do sistema endocanabinoide poderiam induzir efeitos tipo-ansiolítico e tipo-panicolítico no modelo do labirinto em T elevado.

### **2. Objetivos específicos**

- A) Testar a hipótese de que o tratamento com agonistas canabinoides atenua os comportamentos de esquiva inibitória e escape avaliados no LTE.
- B) Avaliar se o bloqueio dos receptores CB1 facilita os comportamentos defensivos avaliados no LTE, e verificar se o pré-tratamento com essas drogas altera os resultados obtidos com o agonista.
- C) Testar a hipótese de que a inibição da hidrólise de endocanabinoides atenua os comportamentos de esquiva inibitória e escape avaliados no LTE.

## **Materials e Métodos**

### **Animais:**

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar, pesando entre 220-260 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 cinco 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 ( $24 \pm 2^\circ\text{C}$ ).

### **Drogas:**

Foram usadas as seguintes drogas:

- WIN 55212-2 (agonista de receptores Canabinoides, *Cayman Chemical*<sup>®</sup>)
- Rimonabanto (Antagonista de receptores cannabinoides, Sigma<sup>®</sup>)
- AM 251 (antagonista seletivo de receptores CB1, Sigma<sup>®</sup>)
- URB 597 (inibidor da FAAH, enzima que hidrolisa a anandamida, *Cayman Chemical*<sup>®</sup>)
- Diazepam (Benzodiazepínico eficaz no tratamento do transtorno de ansiedade generalizada)
- Alprazolam (Benzodiazepínico eficaz no tratamento do transtorno de ansiedade generalizada e do transtorno do pânico)

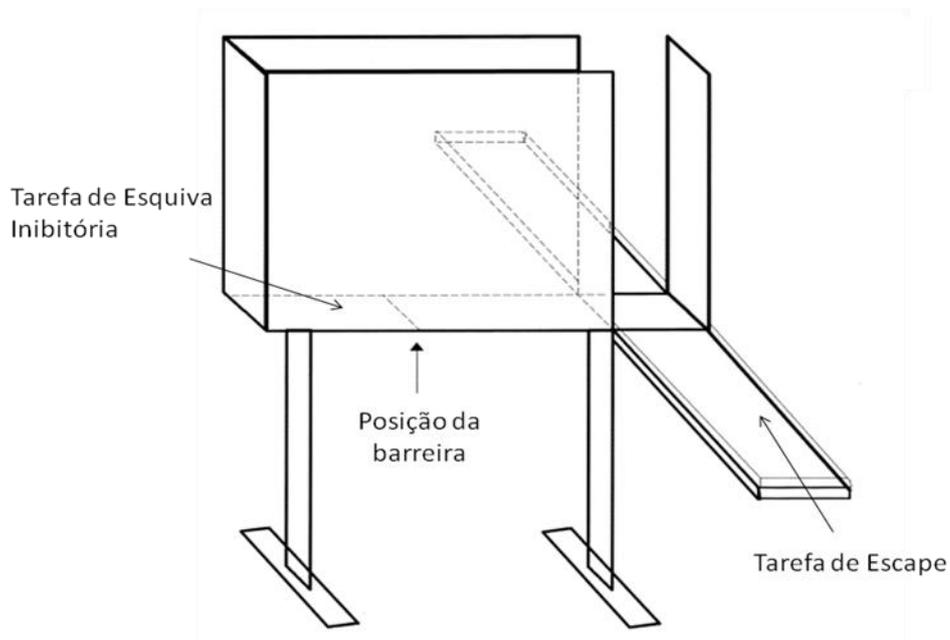
As drogas que atuam sobre o sistema canabinoide, foram diluídas em uma solução veículo constituída por 5% de Cremophor; 5% de Etanol Absoluto e 90% de salina. Os dois benzodiazepínicos foram diluídos diretamente em salina

### **Aparelhos experimentais:**

- Labirinto em T Elevado (LTE)

O LTE é um aparelho de madeira, composto 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 uma parede, também, de madeira de 40 cm de altura que o circunda e está perpendicular aos braços abertos que não possuem borda lateral. Esse modelo avalia dois comportamentos preditivos de distúrbios de ansiedade, sendo que a esquivas ao braço aberto quando o animal está no braço fechado, se relaciona ao transtorno ansiedade generalizada e o escape do braço aberto, que está relacionado ao transtorno do pânico. Uma barreira foi adicionada a 20 centímetros de distancia da porção final do braço aberto, conforme ilustrado na figura.



**Figura 3:** Labirinto em T Elevado com indicação do local de inserção da barreira

➤ Campo Aberto (CA):

O campo aberto consiste em uma caixa de madeira (60cm x 60cm) com paredes de altura de 40cm.



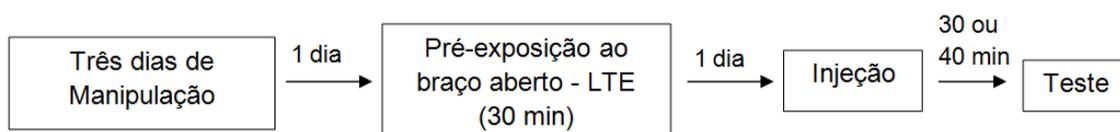
**Figura 4:** Campo aberto

**Procedimento Experimental:**

**Teste no LTE:** Antes de serem submetidos ao labirinto, os animais foram habituados ao experimentador por três dias, durante 3 minutos. No quarto dia cada animal foi pré-exposto por 30 minutos a um dos braços abertos. Para tal, cada animal foi colocado individualmente em um dos braços abertos do LTE o qual foi isolado dos demais braços por uma parede de madeira, disposta na linha de separação entre a área central do labirinto e porção proximal do braço aberto. A pré-exposição teve por objetivo potencializar a expressão do comportamento de fuga por reduzir respostas comportamentais à novidade,

tais como a exploração e a inibição do comportamento, durante a realização da tarefa (Teixeira et al., 2000; Zanoveli et al., 2005).

No quinto dia os animais foram tratados (injeções intraperitoneais) com as drogas a serem testadas bem como com seus respectivos veículos, 30 ou 40 (pré-tratamento) minutos antes do teste. Após este tempo avaliou-se a resposta de esquiva inibitória. Para tal, cada animal foi colocado entre extremidade distal do braço fechado e a barreira. Após trinta segundos a barreira foi retirada e mensurou-se o tempo gasto para a saída, com as quatro patas deste braço, sendo esta medida a latência de base (LBase). A mesma medida foi tomada por mais duas vezes com intervalos de 30 segundos entre elas, esquivas 1 e 2 (E1 e E2). O tempo máximo de permanência do animal neste braço, em cada uma das tomadas de esquivas, foi de 4 minutos. Trinta segundos após o término da tomada da E2, foi avaliado o comportamento de escape. Para tal, cada animal foi colocado na extremidade de um dos braços abertos, mesmo braço em que foi pré-exposto no dia anterior, e mediu-se o tempo gasto para a saída, com as quatro patas, deste braço (FUGA1). A latência de saída do braço aberto foi medida por mais duas vezes (FUGA2 e FUGA3) com intervalos de 30 segundos entre elas.



**Figura 5:** Representação esquemática do teste no LTE

**Teste no CA:** Trinta minutos após receber a droga, os animais 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 por cada animal durante o teste. No intervalo entre eles o campo aberto foi limpo com uma solução de álcool (70 %). Grupos experimentais independentes foram usados nos testes do LTE e do CA.

**Delineamento Experimental:**

**Experimento 1:** Inserção da barreira no braço fechado

Grupos experimentais:

- Animais, submetidos ao LTE sem a barreira
- Animais, submetidos ao LTE com a barreira

**Experimento 2:** Validação farmacológica do LTE com a inserção da barreira.

(n= 11-13 por grupo).

Grupos experimentais:

- Veículo
- Diazepam (2mg/kg)
- Alprazolam (4mg/Kg)

**Experimento 3:** Efeito do agonista canabinoide Win 55-212 no LTE (n= 9-10 por grupo).

Grupos experimentais:

- Veículo
- Win 55-212 (0,1mg/Kg)

- Win 55-212 (0,3mg/Kg)
- Win 55-212 (1,0mg/Kg)

Experimento 4: Efeito do AM 251, antagonista dos receptores canabinoides CB1, no LTE (n= 7-9 por grupo).

Grupos experimentais:

- Veículo
- AM 251 (0,3mg/Kg)
- AM 251 (1,0mg/Kg)
- AM 251 (3,0mg/Kg)

Experimento 5: Bloqueio dos efeitos do Win 55-212 no LTE pelo pré tratamento com um dose inefetiva de AM 251 (n= 7-9 por grupo).

Grupos experimentais:

- Veículo + Veículo
- AM 251 (1,0mg/Kg) + Veículo
- Win 55-212 (1,0mg/Kg) + Veículo
- AM 251 (1,0mg/Kg) + Win 55-212 (1,0mg/Kg)

Experimento 6: Efeito do Rimonabanto um outro antagonista canabinoide no LTE (n= 7-9 por grupo).

Grupos experimentais:

- Veículo
- Rimonabanto (0,3mg/Kg)
- Rimonabanto (1,0mg/Kg)
- Rimonabanto (3,0mg/Kg)

Experimento 7: Efeito do inibidor da hidrólise da anandamida no LTE (n= 9-10 por grupo)

Grupos experimentais:

- Veículo
- URB 597 (0,1mg/Kg)
- URB 597 (0,3mg/Kg)
- URB 597 (1,0mg/Kg)

Experimento 8: Avaliação da locomoção no CA, das drogas que atuam sobre o sistema canabinoide e que promoveram alterações comportamentais no LTE

Grupos experimentais:

- Veículo
- Win 55-212 (1,0mg/Kg)
- URB 597 (1,0mg/Kg)
- AM 251 (3,0mg/Kg)

**Analise estatística:**

O tamanho da amostra para cada grupo experimental variou de oito a doze animais. Os tempos de latência para saída dos braços do labirinto foram analisados por análise de variância, levando-se em conta os fatores “tratamento” (veículo ou drogas) e “sessão” (já que três exposições consecutivas foram realizadas). O teste post-hoc utilizado foi o de Bonferroni. O nível de significância estabelecido foi de  $p < 0.05$ .

## **Resultados**

### **Efeito da inserção da barreira no braço fechado sobre as respostas de esquiva inibitória e de fuga avaliadas no LTE.**

Experimentos prévios descritos pelo grupo do professor Graeff demonstraram que a inserção de uma barreira, a vinte centímetros da extremidade distal do braço fechado, configurou-se como um auxílio facilitador da aquisição da esquiva inibitória ao braço aberto do LTE.

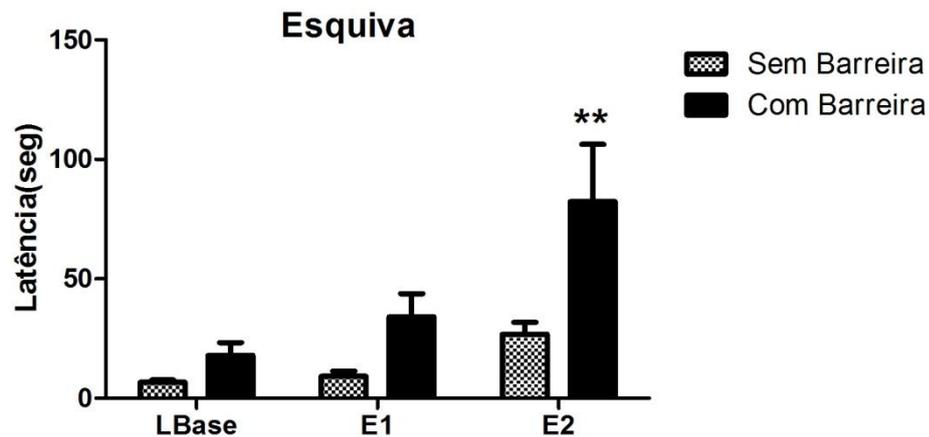
A fim de reafirmar este achado, dois grupos de animais, os quais não receberam nenhum tipo de tratamento farmacológico, foram submetidos ao teste do LTE. O primeiro grupo foi submetido ao aparelho sem a presença da barreira e o segundo grupo com a presença barreira. O gráfico da figura 6 expõe os resultados obtidos a partir da avaliação do efeito da inserção da barreira sobre a resposta de esquiva inibitória

A ANOVA de medidas repetidas mostrou a aquisição da resposta de esquiva inibitória dos braços abertos do LTE para todos os grupos experimentais [efeito sessão:  $F(2,26) = 18,69$ ,  $P < 0,001$ ]. A análise estatística também mostrou efeito do fator barreira [ $F(1,26) = 7,19$ ;  $P < 0,05$ ]. Não foi demonstrada interação entre os fatores [ $F(2,26) = 2,27$ ; ns].

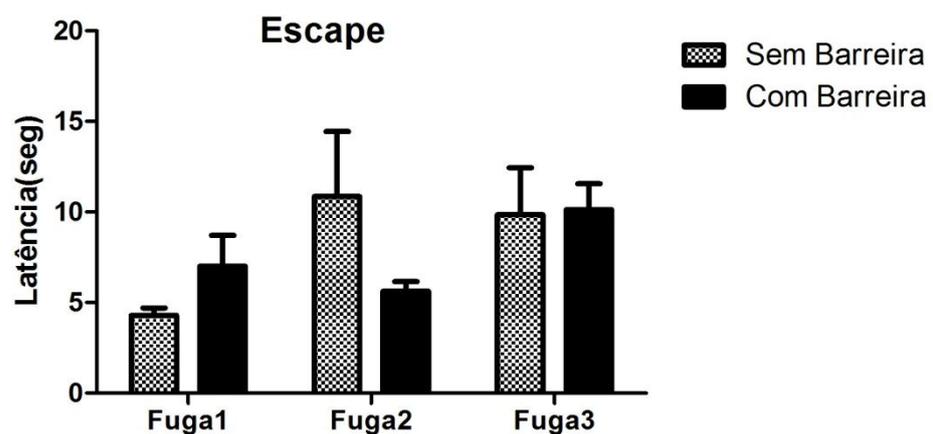
A presença da barreira facilitou a aquisição da resposta de esquiva inibitória, marcadamente caracterizado pela elevação na latência para saída do braço fechado. Este efeito foi evidenciado pela diferença estatística significativa demonstrada no teste de *Bonferroni* ( $p < 0,01$ ) na E2 comparando os grupos experimentais submetidos ao teste na presença e na ausência da barreira.

Podemos observar na figura 7 as latências para a tarefa de escape realizada 30 segundos após a E2. A análise de variância de duas vias não revelou alteração do fator barreira [ $F(1,26) = 0,18$ , ns]. Os fatores sessão

[ $F(2,26) = 2,78$ , ns] e interação: tratamento vs. fator sessão [ $F(2,26) = 2,41$ , ns] também não foram alterados de forma significativa. O teste de Bonferroni não demonstrou haver diferenças significativas entre os grupos. Mediante o resultado na tarefa de esquiva, adotamos o uso da barreira nos experimentos subsequentes.



**Figura 6:** Efeito da inserção da barreira no braço fechado do labirinto sobre a resposta de esquiva inibitória. LBase refere-se à linha de base, enquanto E1 e E2, ao 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 (\*\* $p < 0,01$ , em relação ao grupo sem barreira, ANOVA seguida de teste de Bonferroni) ( $n=8$ ).



**Figura 7:** Efeito da inserção da barreira no braço fechado do labirinto sobre a resposta de escape. As tarefas de fuga 1, 2, e 3 forma intercaladas 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 sem barreira, ANOVA seguida de teste de Bonferroni) ( $n=8$ ).

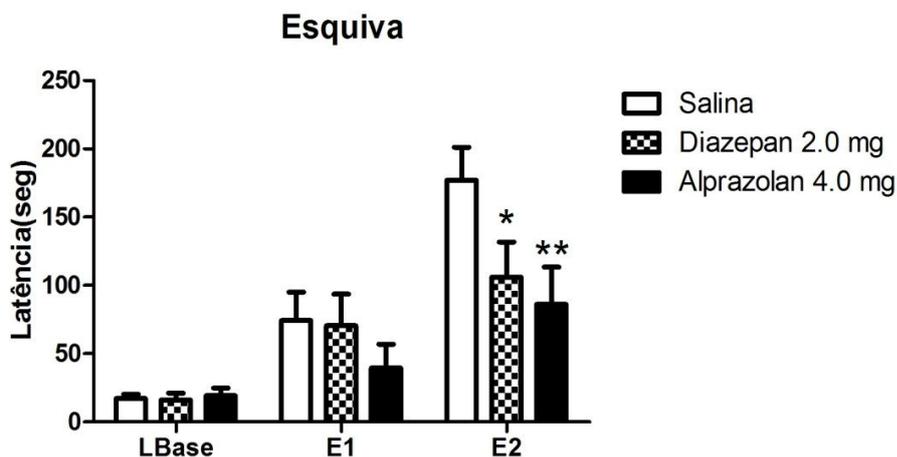
## **Efeito do Tratamento com Diazepam ou Alprazolam sobre as respostas de esquiva inibitória e de fuga avaliadas no LTE.**

A fim de validar farmacologicamente o modelo em nosso laboratório, os animais foram submetidos ao tratamento com diazepam (2 mg/Kg) ou alprazolam (4 mg/Kg). O gráfico da figura 8 expõe os resultados obtidos a partir desta validação farmacológica do modelo sobre a resposta de esquiva inibitória.

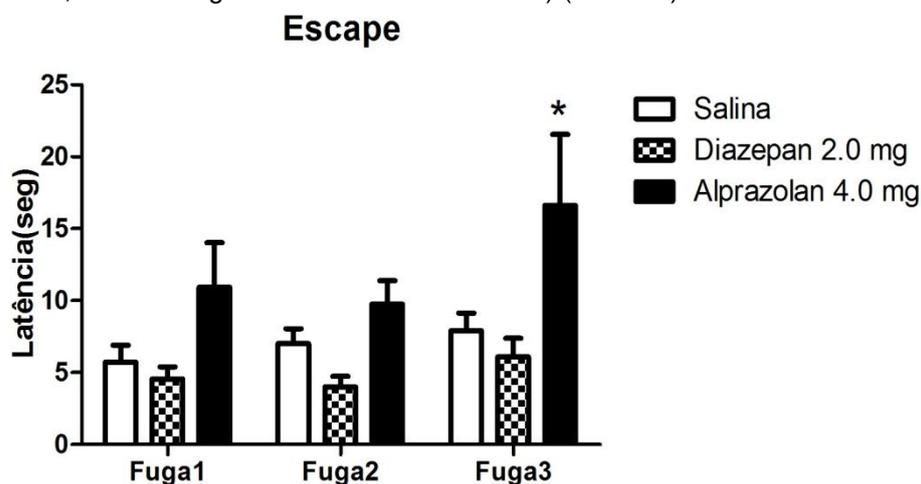
A análise de variância de duas vias mostrou a aquisição da resposta de esquiva inibitória dos braços abertos do LTE, por todos os grupos experimentais [efeito sessão:  $F(2,64) = 39,61$ ,  $P < 0,0001$ ]. Não houve efeito do fator tratamento [ $F(2,64) = 1,90$ ; ns], mas houve interação: fator tratamento vs. fator sessão [ $F(4,64) = 3,16$ ;  $P < 0,05$ ]. O pós-teste de Bonferroni detectou diferenças estatisticamente significativas entre o grupo tratado com salina e os grupos que receberam diazepam ( $*p < 0,05$ ) ou alprazolam ( $**p < 0,01$ ). Esses dados sugerem que as duas drogas exercem um efeito correlacionado com ação ansiolítica. Tal fato é demonstrado por um prejuízo na aquisição da resposta de esquiva inibitória, evidenciado por uma diminuição na latência para saída do braço fechado na segunda sessão de esquiva (E2).

Podemos observar na figura 9 as latências para a tarefa de fuga realizada 30 segundos após a E2. A análise de variância de duas vias revelou alterações dos fatores tratamento [ $F(2,64) = 4,58$ ;  $P < 0,05$ ], e sessão [ $F(2,64) = 3,17$ ;  $P < 0,05$ ]. O fator interação não demonstrou alteração significativa [ $F(4,64) = 0,83$ ; ns]. O teste de *Bonferroni* demonstrou haver diferença significativa ( $*P < 0,05$ ) entre o grupo controle e o grupo que recebeu tratamento com Alprazolam (4,0mg/Kg) na terceira sessão de escape (Fuga3).

Desse modo, pode-se inferir que o Alprazolam, na dose utilizada, 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 ao qual havia sido pré-exposto no dia anterior.



**Figura 8:** Efeito do Diazepam e do Alprazolam (2.0 e 4.0 mg/Kg, respectivamente) sobre a resposta de esquiva inibitória. LBase 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. As drogas e a salina foram administrados pela via intraperitoneal 30 minutos antes do teste (\* $p < 0,05$  / \*\*  $p < 0,01$ , em relação à salina, ANOVA seguida de teste de Bonferroni) ( $n=11-13$ ).



**Figura 9:** Efeito do Diazepam(2.0mg/Kg) e do Alprazolam (4.0 mg/Kg) sobre a resposta de escape. As tarefas de fuga 1, 2, e 3 forma intercaladas por um intervalo de 30 segundos. As colunas representam a média das latências e a barra vertical, o erro padrão da média. As drogas e a salina foram administrados pela via intraperitoneal 30 minutos antes do teste (\* $p < 0,05$ , em relação à salina, ANOVA seguida de teste de Bonferroni) ( $n=11-13$ ).

### **Efeito do tratamento com Win 55-212 sobre as respostas de esquiva inibitória e de fuga, avaliadas no LTE.**

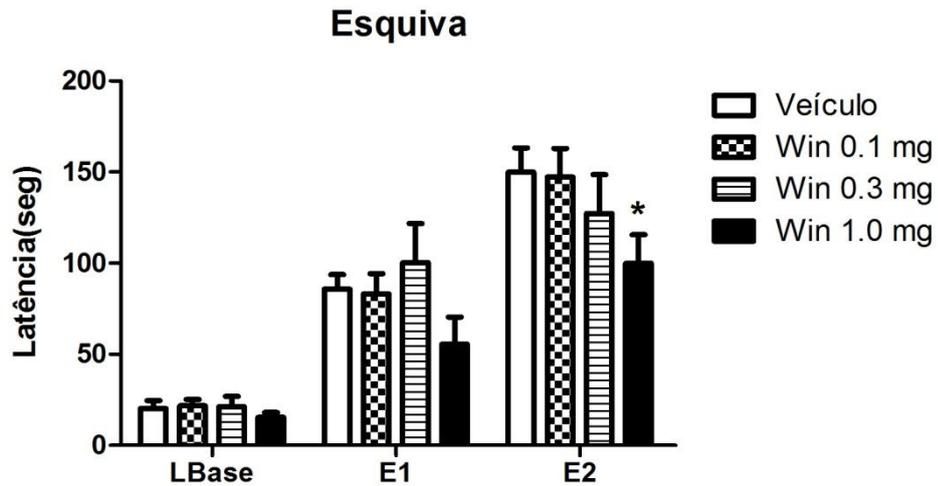
O gráfico da figura 10 expõe os resultados obtidos a partir da avaliação do efeito de diferentes doses do agonista canabinoide WIN 55-212 sobre a resposta de esquiva inibitória.

A ANOVA de medidas repetidas mostrou a aquisição dessa resposta de esquiva inibitória aos braços abertos do LTE [efeito sessão:  $F(2,68) = 111,69$ ,  $P < 0,0001$ ]. Não houve efeito do fator tratamento [ $F(2,68) = 1,78$ ; ns] nem do fator interação: fator tratamento vs. fator sessão [ $F(6,70) = 1,51$ ; ns].

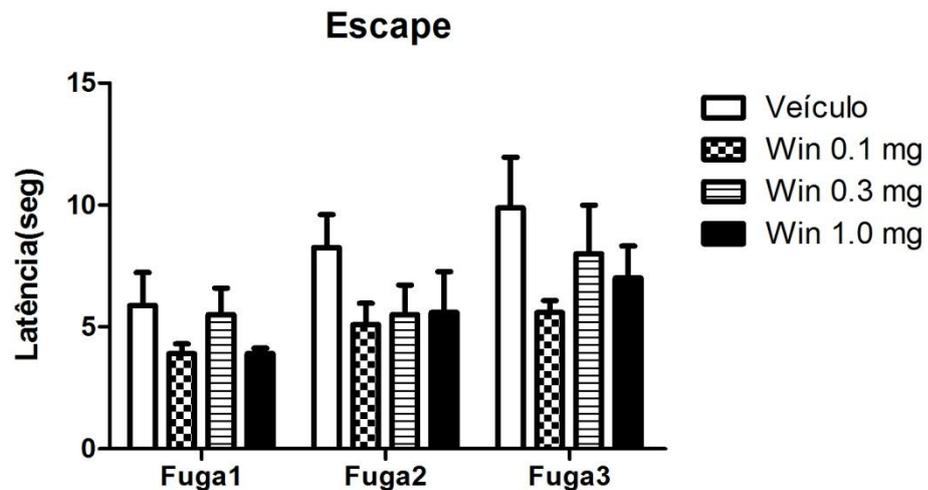
A maior dose de Win 55-212 diminuiu a latência de esquiva inibitória. Esse dado foi caracterizado, pela diminuição na tempo decorrido para saída do braço fechado. Este efeito, indicativo de ação ansiolítica, foi evidenciado pela diferença estatística significativa demonstrada no teste de *Bonferroni* ( $p < 0,05$ ) na E2, na comparação entre o grupo que recebeu veículo e o que recebeu a maior dose do Win 55-212.

Com relação à tarefa de escape, pode-se observar na figura 11 as latências para a saída do braço aberto nas três sessões de fuga. A análise de variância de duas vias não revelou alterações dos fatores: sessão [ $F(2,68) = 2,76$ ; ns], tratamento [ $F(3,68) = 2,43$ ; ns] nem interação entre o fator tratamento vs. fator sessão [ $F(6,70) = 1,58$ ; ns].

O pós-teste de *Bonferroni* não demonstrou relações estatisticamente significativas entre os grupos tratados com a droga e o grupo controle.



**Figura 10:** Efeito do Win 55-212 (0.1, 0.3, 1.0 mg/Kg) sobre a resposta de esquiva inibitória. LBase 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. A droga e o veículo foram administrados pela via intraperitoneal 30 minutos antes do teste (\* $p < 0,05$ , em relação ao veículo, ANOVA seguida de teste de Bonferroni) ( $n=9-10$ ).



**Figura 11:** Efeito do Win 55-212 (0.1, 0.3, 1.0 mg/Kg) sobre a resposta de escape. As tarefas de fuga 1, 2, e 3 forma intercaladas por um intervalo de 30 segundos. As colunas representam a média das latências e a barra vertical, o erro padrão da média. A droga e o veículo foram administrados pela via intraperitoneal 30 minutos antes do teste ( $p < 0,05$ , em relação ao veículo, ANOVA seguida de teste de Bonferroni) ( $n=9-10$ ).

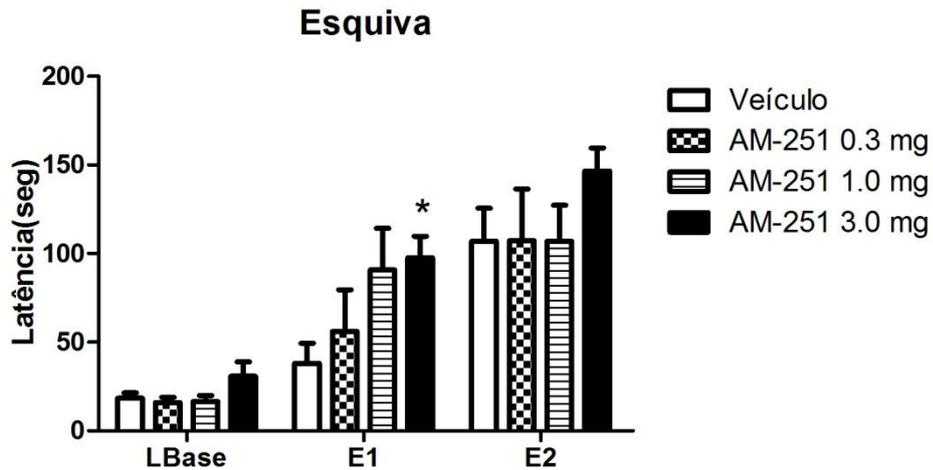
### **Efeito do tratamento com AM 251 sobre as respostas de esquiva inibitória e de fuga avaliadas no LTE.**

De modo a verificar, posteriormente, se o efeito obtido com Win 55-212 seria revertido pela administração de um antagonista seletivo de receptores CB1, inicialmente foram avaliados os efeitos de três doses de AM 251 no LTE. O gráfico da figura 12 expõe os resultados obtidos a partir da avaliação do efeito de diferentes doses desse antagonista sobre a resposta de esquiva inibitória.

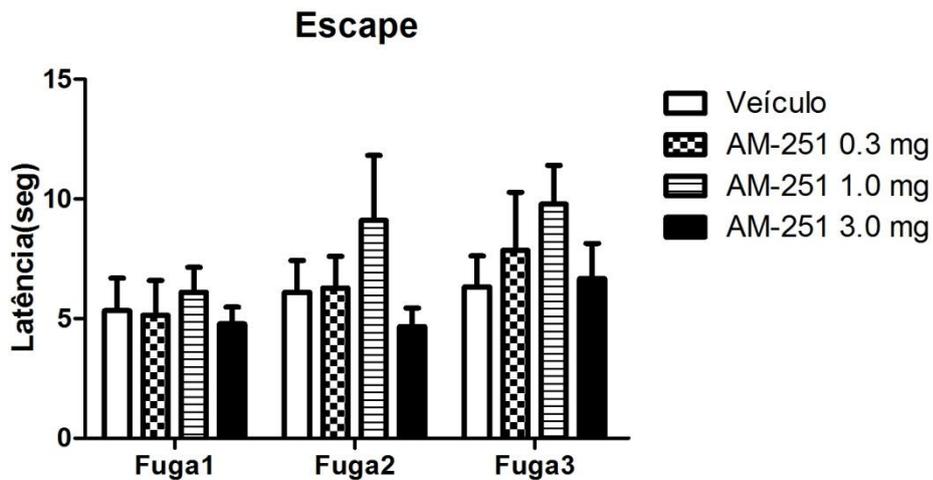
A análise de variância de duas vias mostrou que todos os grupos experimentais adquiriram a resposta de esquiva inibitória aos braços abertos do LTE [efeito sessão:  $F(2,60) = 69,86$ ,  $P < 0,0001$ ]. Não houve efeito do fator tratamento [ $F(3,60) = 1,71$ ; ns] e nem da interação: fator tratamento vs. fator sessão [ $F(6,60) = 1,69$ ; ns].

O pós-teste de *Bonferroni* detectou diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre o grupo tratado com a maior dose do AM 251 (3mg/Kg) e o grupo controle na E2. Estes dados sugerem haver um efeito indicativo de ação ansiogênica dessa dose da droga, o que foi evidenciado pela alteração na aquisição da resposta de esquiva inibitória, caracterizada por um aumento na latência para saída do braço fechado na terceira sessão (E2).

Podemos observar na figura 13 as latências para a tarefa de fuga realizada 30 segundos após a E2. A análise de variância de duas vias não revelou alterações dos fatores: sessão [ $F(2,60) = 2,52$ ; ns], tratamento [ $F(3,60) = 1,80$ ; ns], nem interação: fator tratamento vs. fator sessão [ $F(6,60) = 0,31$ ; ns]. O teste de *Bonferroni* também não demonstrou relações estatisticamente significativas entre os tratamentos e o grupo controle.



**Figura 12:** Efeito do AM 251 (0.3, 1.0 e 3.0 mg/Kg) sobre a resposta de esquiva inibitória. LBase 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. A droga e o veículo foram administrados pela via intraperitoneal 30 minutos antes do teste (\* $p < 0,05$ , em relação ao veículo, ANOVA seguida de teste de Bonferroni) ( $n = 7-9$ ).



**Figura 13:** Efeito do AM 251 (0.3, 1.0 e 3.0 mg/Kg) sobre a resposta de escape. As tarefas de fuga 1, 2, e 3 foram intercaladas por um intervalo de 30 segundos. As colunas representam a média das latências e a barra vertical, o erro padrão da média. A droga e o veículo foram administrados pela via intraperitoneal 30 minutos antes do teste ( $p < 0,05$ , em relação ao veículo, ANOVA seguida de teste de Bonferroni) ( $n = 7-9$ ).

### **Efeito do pré-tratamento com uma dose de AM 251, inefetiva por si só, sobre as respostas de esquiva inibitória e de fuga no LTE promovidas pelo tratamento com Win 55-212**

A fim de estudar se o efeito indicativo de ação ansiolítica do Win 55-212 na dose de 1.0 mg/Kg seria mediado por receptores do tipo CB1, os animais foram previamente tratados com o AM 251. A dose do antagonista escolhida (1.0 mg/Kg) não demonstrou efeito por si só no modelo, como demonstrado nos resultados anteriores (Figuras 12 e 13).

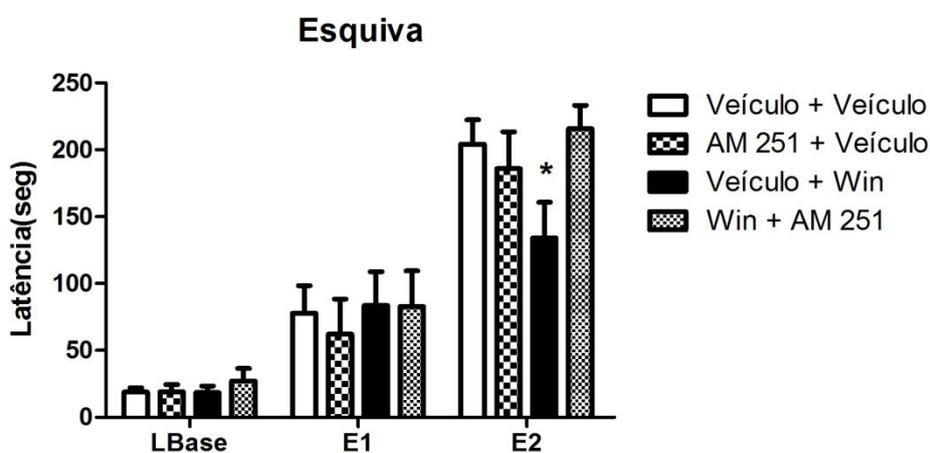
O gráfico da figura 14 demonstra o efeito dos diversos tratamentos, conforme explicado no delineamento experimental, (veículo+veículo; AM251+veículo; veículo + Win 55-212 e AM 251+Win 55-212) sobre a tarefa de esquiva inibitória.

A análise de variância de duas vias mostrou a aquisição da resposta de esquiva inibitória dos braços abertos do LTE, para todos os grupos experimentais [efeito sessão:  $F(2,56) = 96,50$ ,  $P < 0,0001$ ]. Não houve efeito do fator tratamento [ $F(3,56) = 0,85$ ;  $P < 0,05$ ] e não houve interação: fator tratamento vs. fator sessão [ $F(6,56) = 1,71$ ; ns]. O pós-teste de Bonferroni detectou diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre o grupo tratado com Veículo + Win 55-212 e o grupo que recebeu Veículo + Veículo. Estes resultados confirmam o dado obtido anteriormente no qual foi observado que Win 55-212 apresentava efeito tipo ansiolítico.

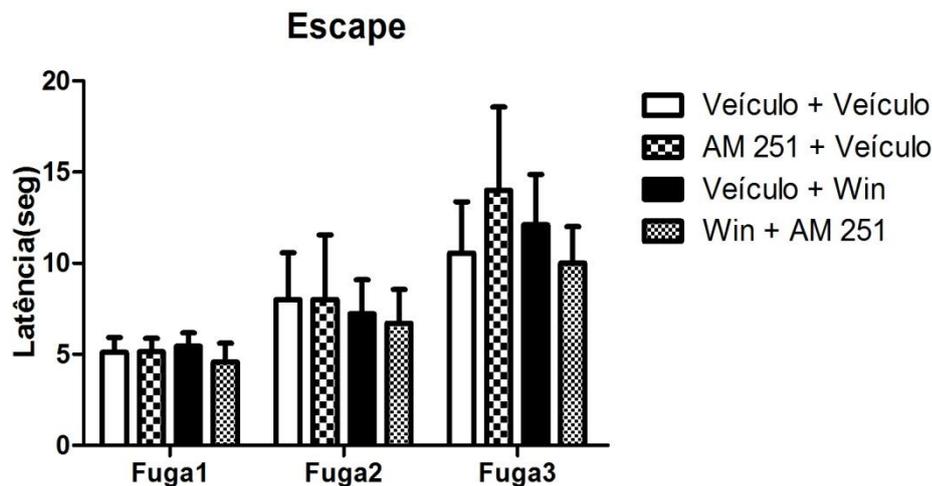
O pós teste de *Bonferroni* demonstrou, ainda, diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) comparando os grupos Veículo+Win 55-212 e AM 251+ Win 55-212 e que essa diferença não era observada na comparação entre os grupos Veículo + Veículo e AM 251+ Win 55-212. Esses dados sugerem que

houve uma reversão do efeito tipo ansiolítico do agonista canabinoide mediante pré-tratamento com um antagonista CB1. Desse modo, esses receptores poderiam ser os responsáveis, por mediar o efeito tipo ansiolítico do Win 55-212 no LTE.

Com relação à tarefa de escape, pode-se observar na figura 15 as latências para a saída do braço aberto nas três sessões de fuga. A análise de variância de duas vias não revelou alterações dos fatores sessão [ $F(2,56) = 3,15$ ; ns] tratamento [ $F(3,56) = 0,18$ ; ns] nem interação entre o fator tratamento vs. fator sessão [ $F(6,56) = 0,23$ ; ns]. O teste de *Bonferroni* também não demonstrou relações estatisticamente significativas entre os grupos tratados e o grupo controle.



**Figura 14:** Efeito do pré-tratamento com AM 251(1.0 mg/Kg) sobre o ação do Win 55-212 (1.0 mg/mL) na resposta de esquiva inibitória. LBase 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. O pré-tratamento (AM 251 ou Veículo) foi feito dez minutos antes da injeção do Win 55-212 ou do veículo os quais foram administrados 30 minutos antes do teste. Todos os tratamentos foram feitos pela via intraperitoneal (\* $p < 0,05$ , em relação ao veículo, ANOVA seguida de teste de Bonferroni) ( $n=7-9$ ).



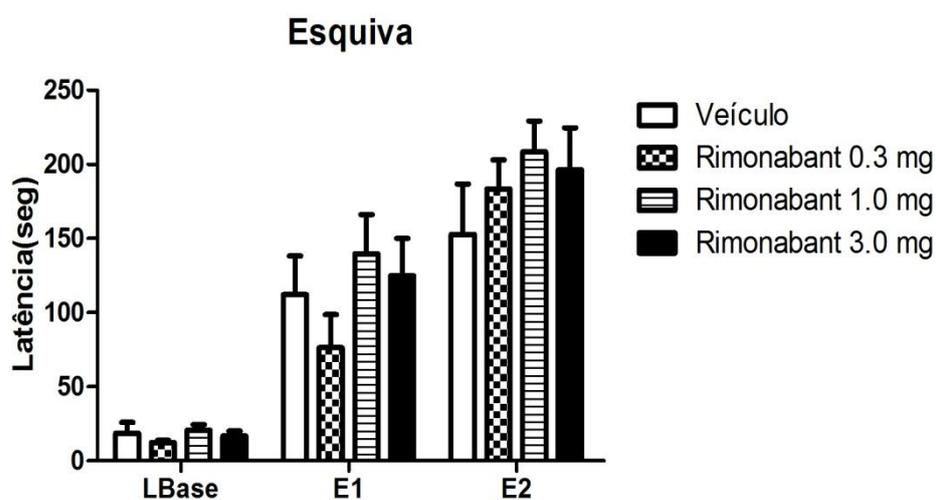
**Figura 15:** Efeito do pré-tratamento com AM 251 (1.0 mg/Kg) sobre a ação do Win 55-212 (1.0 mg/mL) na resposta de escape. As tarefas de fuga 1, 2, e 3 forma intercaladas por um intervalo de 30 segundos. As colunas representam a média das latências e a barra vertical, o erro padrão da média. A droga e o veículo foram administrados pela via intraperitoneal 30 minutos antes do teste ( $p < 0,05$ , em relação ao veículo, ANOVA seguida de teste de Bonferroni) ( $n=7-9$ ).

### **Efeito do Tratamento com Rimonabanto sobre as respostas de esquiva inibitória e de fuga avaliadas no LTE.**

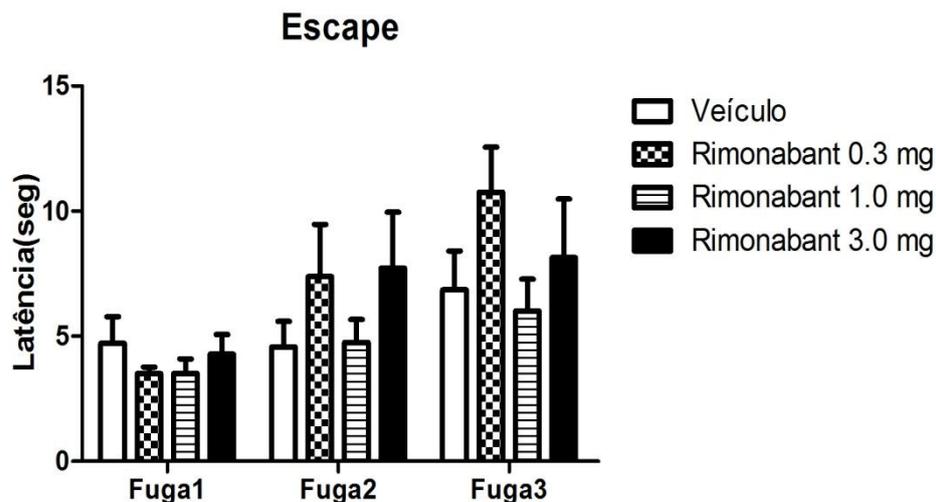
A fim de avaliar se o efeito indicativo de ansiogênese observado com o AM 251 também seria promovido por outro antagonista dos receptores canabinoides, avaliou-se o efeito de três doses crescentes do Rimonabanto (Figura 16).

A análise de variância de duas vias mostrou a aquisição da resposta de esquiva inibitória dos braços abertos do LTE, por todos os grupos experimentais efeito sessão: [ $F(2,54) = 89,78, P < 0,0001$ ]. Não houve efeito do fator tratamento [ $F(3,54) = 0,366; ns$ ], nem do fator interação: fator tratamento vs. fator sessão [ $F(6,54) = 1,02; ns$ ]. O pós-teste de Bonferroni não detectou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos tratados. Esses dados sugerem que o Rimonabanto, nas doses testadas, não mimetizou o efeito tipo ansiogênico encontrado com o AM 251.

Podemos observar na figura 17 as latências para a tarefa de fuga realizada 30 segundos após a E2. A análise de variância de duas vias não revelou alteração do fator tratamento [ $F(3,54) = 1,62$ , ns]. Os fatores tarefa [ $F(2,54) = 1,89$ , ns] e interação [ $F(6,54) = 1,63$ , ns] também não foram alterados de forma significativa. O teste de *Bonferroni* não demonstrou haver diferenças significativas entre o grupo controle e os grupos tratados com Rimonabanto.



**Figura 16:** Efeito do Rimonabanto (0.3,1.0 e 3.0 mg/Kg) sobre a resposta de esquiva inibitória. LBase 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. A droga e o veículo foram administrados pela via intraperitoneal 30 minutos antes do teste ( $p < 0,05$ , em relação ao veículo, ANOVA seguida de teste de Bonferroni) ( $n=7-9$ ).



**Figura 17:** Efeito do Rimonabanto (0.3,1.0 e 3.0 mg/Kg) sobre a resposta de escape. As tarefas de fuga 1, 2, e 3 foram intercaladas por um intervalo de 30 segundos. As colunas representam a média das latências e a barra vertical, o erro padrão da média. A droga e o veículo foram administrados pela via intraperitoneal 30 minutos antes do teste ( $p < 0,05$ , em relação ao veículo, ANOVA seguida de teste de Bonferroni) ( $n=7-9$ ).

### **Efeito do Tratamento com URB 597 sobre as respostas de esquivas inibitória e de fuga avaliadas no LTE.**

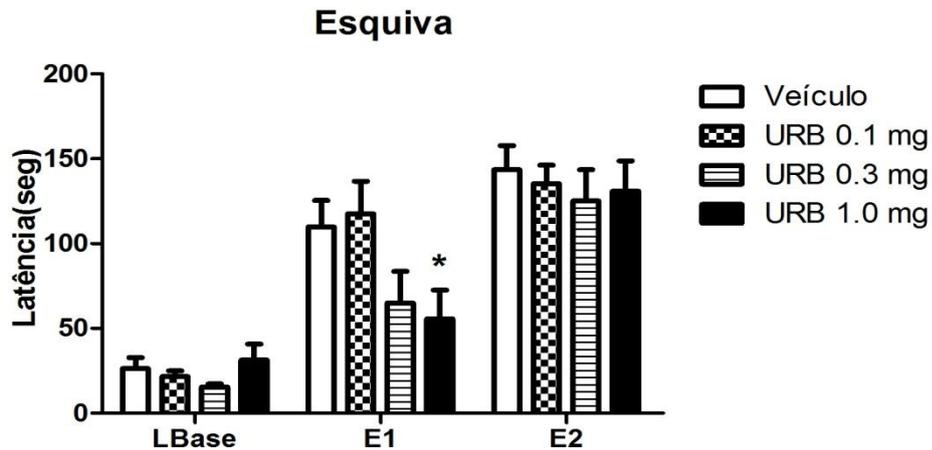
O resultado preditivo de comportamento ansiogênico obtido com a maior dose do AM 251, sugere que o sistema endocanabinoide é importante no que tange os comportamentos defensivos estudados no LTE. A fim de verificar esta hipótese os animais foram submetidos ao tratamento com o URB 597, um inibidor da hidrólise do endocanabinoide anandamida. O gráfico da figura 18 expõe os resultados obtidos a partir da avaliação do efeito de diferentes doses desta droga sobre a resposta de esquivas inibitória.

A análise de variância de duas vias mostrou a aquisição da resposta de esquivas inibitórias dos braços abertos do LTE, por todos os grupos experimentais efeito sessão: [ $F(2,70) = 106,47, P < 0,0001$ ]. Não houve efeito do fator tratamento [ $F(3,70) = 1,32; ns$ ], mas houve interação entre o fator

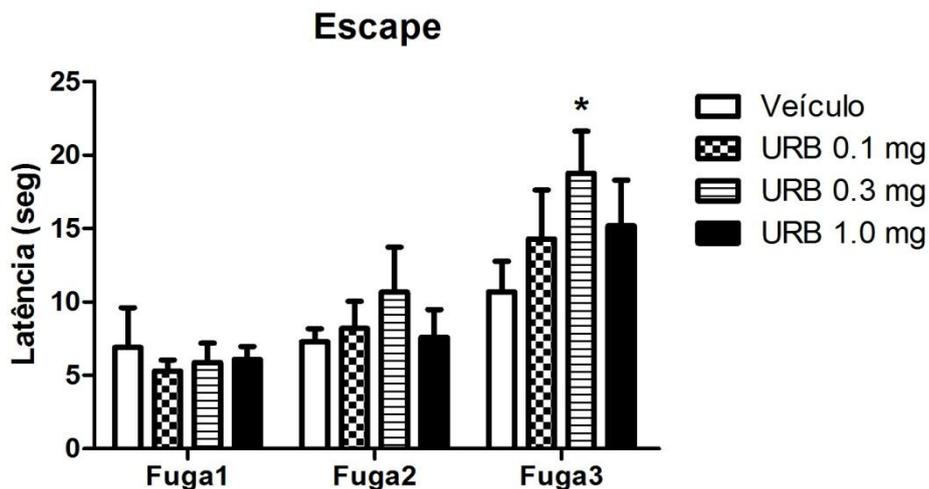
tratamento vs. fator sessão [ $F(6,70) = 2,65; P < 0,05$ ]. O pós-teste de Bonferroni detectou diferenças estatisticamente significativas ( $*p < 0,05$ ) entre o grupo tratado com a maior dose do URB 597 (1mg/Kg) e o grupo controle na E1. Esse resultado sugere um efeito indicativo de ação ansiolítica da maior dose da droga, evidenciado por um prejuízo na aquisição da resposta de esquiva inibitória. Isso foi caracterizado, por uma diminuição na latência para saída do braço fechado na segunda sessão de esquiva (E1).

Podemos observar na figura 19 as latências para a tarefa de fuga realizada 30 segundos após a E2. A análise de variância de duas vias revelou alteração do fator sessão [ $F(2,70) = 19.31, P < 0,001$ ]. Os fatores tratamento [ $F(3,70) = 0,93, ns$ ] e interação [ $F(6,70) = 0,86, ns$ ] não foram alterados de forma significativa. O teste de *Bonferroni* demonstrou haver diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre o grupo controle e o grupo que recebeu tratamento com URB 597 na dose intermediária (0,3 mg/Kg) na terceira sessão de fuga (Fuga3).

Desse modo, pode-se inferir que o URB 597, nessa dose, promoveu um comportamento preditivo de ação panicolítica, evidenciado pelo aumento da latência em atingir o centro do labirinto quando o animal foi colocado na extremidade do braço aberto ao qual havia sido pré-exposto no dia anterior.



**Figura 18:** Efeito do URB-597 (0.1, 0.3 e 1.0 mg/Kg) sobre a resposta de esquiva inibitória. LBase 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. A droga e o veículo foram administrados pela via intraperitoneal 30 minutos antes do teste (\* $p < 0,05$ , em relação ao veículo, ANOVA seguida de teste de Bonferroni) ( $n=9-10$ ).

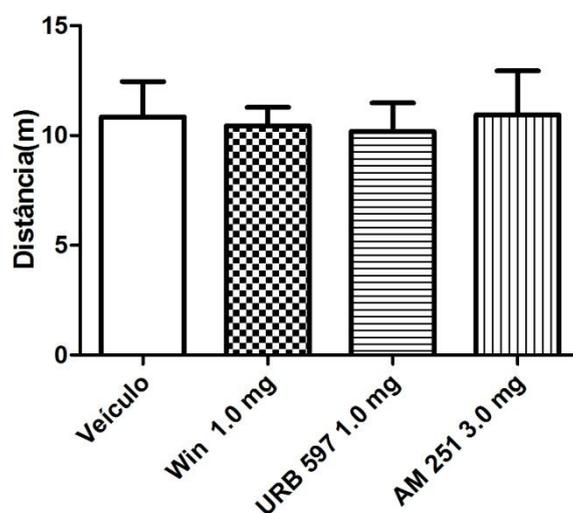


**Figura 19:** Efeito do URB 597 (0.1, 0.3 e 1.0 mg/Kg) sobre a resposta de escape. As tarefas de fuga 1, 2, e 3 forma intercaladas por um intervalo de 30 segundos. As colunas representam a média das latências e a barra vertical, o erro padrão da média. A droga e o veículo foram administrados pela via intraperitoneal 30 minutos antes do teste (\* $p < 0,05$ , em relação ao veículo, ANOVA seguida de teste de Bonferroni) ( $n=9-10$ ).

## Efeito do Tratamento com as drogas que atuam no sistema canabinoide, e que promoveram alguma alteração comportamental no LTE

A fim de descartar a possibilidade de que os efeitos observados no LTE, promovidos pelo tratamento com canabinoides (Win 55-212, AM 251 e URB

597), foram decorrentes de alteração da atividade exploratória, os animais foram submetidos ao teste do campo aberto onde se quantificou a distância por eles percorrida. 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(3,11)=0,056; ns]. ANOVA, seguida do teste de Bonferroni; (Figura 20).



**Figura 20:** Efeito do Win 55-212(1.0 mg/Kg), do URB 597 (1.0 mg/Kg) e do AM 251(3.0 mg/Kg) 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) ( $n=5$ ).

## **Discussão**

No presente trabalho, utilizando o modelo do LTE, demonstramos que drogas, que de algum modo atuam sobre o sistema canabinoide são hábeis em alterar os comportamentos defensivos da esQUIVA inibitória e do escape avaliados no modelo. Nossos resultados demonstraram que o agonista canabinoide exógeno apresentou efeito tipo ansiolítico enquanto o antagonista demonstrou efeito tipo ansiogênico. Ademais, nossos dados mostraram que o inibidor da hidrólise promoveu efeito tanto, nas tarefas de esQUIVA quanto na tarefa de escape, apresentando, portanto, efeito tipo ansiolítico e tipo panicolítico, respectivamente.

Na primeira parte desse trabalho, cuidamos de validar este modelo no Laboratório de Neuropsicofarmacologia da UFMG. Zangrossi e colaboradores haviam demonstrado que a presença de uma barreira situada a vinte centímetros do fim do braço fechado facilitava a aquisição da esQUIVA inibitória (Zangrossi and Graeff, 1997). Este procedimento foi repetido em nosso laboratório, e o resultado corroborou com o que havia sido observado no estudo anterior, uma vez que os animais submetidos ao aparelho do LTE contendo a barreira adquiriram a esQUIVA inibitória ao braço aberto mais rapidamente. Para avaliar o papel de drogas que apresentam atividade preditiva de alterar o comportamento do transtorno da ansiedade generalizada, drogas ansiolíticas e ou ansiogênicas, é importante que se ocorra a aquisição do comportamento de esQUIVA inibitória (Pinheiro et al., 2007; Zangrossi and Graeff, 1997). Diante disso e com base nos nossos resultados que demonstram que a barreira auxilia na aquisição deste comportamento, nós estabelecemos a utilização da mesma nos experimentos subsequentes.

A validação farmacológica do LTE, agora com a barreira, foi realizada a partir de experimentos conduzidos com os benzodiazepínicos Diazepam e Alprazolam. Os resultados encontrados nos animais tratados com Diazepam mostram uma diminuição na latência de saída durante a tarefa de esquiiva inibitória. Esses efeitos, além de reproduzirem dados já obtidos na validação promovida por Zangrossi e colaboradores, corroboram dados bem determinados pela literatura. Esses registros demonstram que o Diazepam aumenta o período de exploração dos braços abertos do LCE bem como a frequência de visitação dos mesmos, além de aumentar o tempo que os animais exploram o lado claro no modelo da caixa claro escuro (CCE) (Bourin and Hascoet, 2003; Guimaraes et al., 1990; Pellow et al., 1985). O fato dessa droga não ter alterado significativamente a tarefa de escape está de acordo com estudos com animais e com dados clínicos que demonstram que o diazepam não apresenta efeito significativo no transtorno do pânico (Borelli et al., 2004; Burrows et al., 1990).

Os resultados evidenciados com o Alprazolam, que consiste num benzodiazepínico mais eficaz (Susman and Klee, 2005), demonstraram que a droga, similarmente ao Diazepam, apresenta um efeito tipo ansiolítico. Esse resultado confirma evidências demonstradas nos modelos do LCE (Kulkarni and Sharma, 1993) e do teste de conflito de Voguel (Kennett et al., 1998). Além disso, nossos resultados demonstraram que a droga também promove um efeito panicolítico caracterizado pela maior latência na saída do braço aberto na tarefa de escape. Esse dado está de acordo com evidências clínicas que mostram a eficácia do Alprazolam (Susman and Klee, 2005). Estudos prévios que utilizaram modelos animais preditivos do transtorno, do pânico também

corroboram com o nosso achado (de Bortoli et al., 2008; Shekhar and Keim, 2000)

Feitas as validações comportamentais e farmacológicas do modelo, deu-se início à avaliação da ação de drogas que de alguma forma atuam sobre o sistema canabinoide. Primariamente testamos os efeitos do agonista CB1 Win 55-212. Os animais tratados com a maior dose dessa droga apresentaram diminuição na latência para saída do braço fechado. Esse comportamento evidencia um efeito correlacionado a um perfil ansiolítico.

O papel ansiolítico do  $\Delta$ 9-THC e seus análogos já é bem descrito na literatura. Maldonado e Berrendero demonstraram que os animais tratados com o principal constituinte psicoativo da *marijuana* permaneceram mais tempo no compartimento claro da caixa claro escuro, um comportamento correlacionado com efeito ansiolítico (Berrendero and Maldonado, 2002). Similarmente os trabalhos de Rubino e colaboradores, demonstraram que o  $\Delta$ 9-THC exercia efeito tipo ansiolítico, evidenciado por aumento na exploração dos braços abertos do LCE (Rubino et al., 2007). Efeitos similares foram encontrados em estudos que usavam outros agonistas de receptores CB1 (Hill and Gorzalka, 2004; Patel and Hillard, 2006). Estudos de outros grupos realizados com o análogo do  $\Delta$ 9-THC, Win 55-212 demonstraram que essa droga promovia efeito ansiolítico no modelo do LCE (Haller et al., 2004). Diante disso, os resultados que indicam efeito ansiolítico do Win 55-212, encontrados em nosso trabalho, corroboram com esses estudos prévios.

O efeito desse agonista, encontrado em nosso trabalho, não teve relação com uma possível alteração na atividade locomotora, uma vez que a

dose eficaz em promover o efeito tipo ansiolítico não alterou a atividade locomotora medida na arena.

Estudos realizados com animais nocaute para o gene que expressa os receptores CB1 mostraram que esses animais apresentaram comportamento ansiogênico no modelo do LCE (Haller et al., 2002). Martin e colaboradores observaram esse perfil comportamental também no modelo da caixa claro escuro, no qual os animais nocautes permaneceram menos tempo no lado claro do aparelho (Martin et al., 2002).

De modo similar, estudos nos quais os animais receberam tratamento com antagonistas dos receptores CB1 demonstraram que esses animais exibiram perfil comportamental correlacionado com ansiogênese, tanto nos modelos da CCE quanto no LCE (Akinshola et al., 1999; Haller et al., 2004; Rodgers et al., 2005). Nosso estudo mostrou que os animais expostos ao LTE, após injeção com AM251, apresentaram um aumento na latência de saída do braço fechado durante a tarefa de esquivas inibitória. Esse efeito corrobora com resultados prévios, os quais demonstraram que essa droga também desencadeia comportamentos tipo ansiogênicos em outros modelos animais (Rodgers et al., 2005; Sink et al., 2010). É importante citar que esse efeito não teve relação com uma possível alteração na atividade locomotora uma vez que a dose eficaz em promover o efeito tipo ansiogênico não alterou a atividade de locomoção medida na arena.

Em nosso trabalho, nós também avaliamos o papel do Rimonabanto. Essa droga é um antagonista dos receptores canabinoides que outrora foi usado na terapia clínica visando o tratamento da obesidade bem como de

desordens metabólicas associadas (Moreira and Crippa, 2009). Entretanto seu uso foi suspenso em virtude de está relacionado, dentre outros com desordens psiquiátricas, como aumento da ansiedade (Murray et al., 2007).

Os estudos realizados em animais demonstram que o Rimonabanto promove alterações complexas e variadas no que diz respeito tanto ao modelo experimental utilizado quanto a dose. Balerio e colaboradores demonstraram que baixas doses de Rimonabanto (0.25-1.0 mg/Kg) não alteram, por si só, o efeito comportamental de animais expostos ao LCE (Balerio et al., 2006). Já os estudos conduzidos por Navarro e colaboradores, demonstraram que em doses elevadas esse antagonista promovia efeito tipo ansiogênico no mesmo modelo (Navarro et al., 1997). Por outro lado trabalhos conduzidos por Rodgers encontraram que a droga foi inefetiva no LCE (Rodgers et al., 2003). Comprovando ainda mais essa variabilidade nos efeitos da droga, um papel ansiolítico foi conferido a ela no teste do LCE e no teste de conflito de Vogel (Griebel et al., 2005).

Trabalhos usando uma variante do LCE, denominado labirinto em zero elevado, demonstraram que a droga também não promoveu alterações do comportamento preditivo de ansiedade (Kathuria et al., 2003). Esses dados corroboram com os efeitos apresentados no nosso trabalho, no qual observamos que nenhuma das três doses do Rimonabanto alterou as latências de saída do braço fechado na tarefa de esquiva.

Distintas alterações comportamentais têm sido relatadas na literatura no que diz respeito ao tratamento com antagonistas dos receptores canabinoides. Haller e colaboradores demonstraram que as alterações comportamentais

mediadas pelo Rimonabanto e pelo AM 251 eram opostas, sendo que o primeiro apresentava efeito ansiolítico e o segundo efeito ansiogênico no modelo do LCE. Nesse mesmo trabalho foi demonstrado que o Rimonabanto promovia alterações comportamentais mesmo em animais que não expressavam o receptor CB1, observação que não foi mimetizada pelo AM 251 (Haller et al., 2004). Um estudo mais recente demonstrou, ainda, que o AM 251 e o Rimonabanto apresentam diferenças no potencial de inibição dos efeitos de agonistas (McMahon and Koek, 2007). Diante dessa diferenças citadas pode se inferir que as duas drogas podem apresentar diferentes seletividades pelo receptor CB1. Como no nosso trabalho as doses desses dois antagonistas foram equivalentes, uma maior seletividade do AM251 poderia explicar o fato de que apenas esse antagonista foi hábil em promover o efeito tipo ansiogênico.

A partir dos resultados obtidos com o AM 251 pode-se inferir que os receptores CB1 desempenham papel relevante na modulação dos transtornos de ansiedade avaliados no LTE. Essa importância ficou ainda mais bem caracterizada com os resultados expressos na figura 14. Foi observado que o pré-tratamento, com uma dose inefetiva por si só do AM 251, bloqueou o efeito ansiolítico desencadeado pelo tratamento com Win 55-212.

É bem descrito na literatura que os receptores CB1 medeiam as reações promovidas por agonistas canabinoides (Howlett, 1995; Howlett et al., 2002). Em nosso estudo a antagonização destes receptores reverteu o efeito promovido pelo agonista. Isso está de acordo com o papel proposto dos receptores CB1 em mediar comportamentos tipo ansiolíticos promovidos por

agonistas canabinoides (Bortolato et al., 2006; Haller et al., 2004; Moreira et al., 2007; Patel and Hillard, 2006).

O efeito ansiogênico evidenciado após o tratamento com o antagonista AM 251 indicou que o sistema endocanabinoide podia desempenhar algum papel nos transtornos de ansiedade avaliados no LTE. Além do uso de antagonistas de receptores canabinoides, outra importante ferramenta para auxiliar na avaliação do papel do sistema endocanabinoide nas respostas comportamentais relacionadas à ansiedade, consiste na manipulação farmacológica e genética dos processos que culminam com a degradação dos endocanabinoides.

Estudos demonstraram que o AM 404, um inibidor da proteína que recapta a anandamida aumentou o tempo que os animais ficavam no braço aberto do LCE evidenciando um efeito ansiolítico (Bortolato et al., 2006; Moreira et al., 2007). Essa droga também mostrou potencial ansiolítico, caracterizado por uma facilitação na extinção do medo, no modelo do medo condicionado (Chhatwal et al., 2005). Respostas ainda mais significativas passaram a ser obtidas com as manipulações genéticas e farmacológicas sobre a FAAH, enzima responsável pela degradação da anandamida (Kathuria et al., 2003; Moreira et al., 2008). O inibidor seletivo da FAAH, URB 597, promove efeitos ansiolíticos em ratos e camundongos (Kathuria et al., 2003; Moreira et al., 2008). Além disso, animais nocautes para essa proteína passavam mais tempo no compartimento claro, no modelo da caixa claro escuro, bem como nos braços abertos do LCE (Moreira et al., 2008).

Similarmente os nossos resultados demonstraram que o URB 597 promoveu uma diminuição na latência de saída do braço fechado, durante a

tarefa de esquivar, sugerindo um efeito ansiolítico desse inibidor. Nossos dados também estão de acordo com os estudos de Patel e Hillard nos quais foi observado que os animais tratados com URB 597 passavam mais tempo nos braços abertos do LCE além de entrar mais vezes nesse compartimento (Patel and Hillard, 2006). Um resultado mais recente publicado por Busquets-Garcia e colaboradores demonstrou que animais tratados com URB 597 passavam mais tempo na porção aberta do labirinto em zero elevado indicando efeito tipo ansiolítico, corroborando com os resultados descritos em nosso trabalho (Busquets-Garcia et al., 2011).

Em nosso estudo, o tratamento com o inibidor da hidrólise promoveu, ainda, uma maior latência na saída do braço aberto do LTE, sendo essa uma ação tipo panicolítica. Esse efeito do URB 597 corrobora dados da literatura que mostram diminuição de comportamentos aversivos relacionados ao transtorno do pânico, em animais que receberam canabinoides. Finn e colaboradores, observaram no modelo de indução locomotora promovida pelo ácido D,L-homocistéico, que a injeção central do agonista HU 210 ocasionava a redução dessa resposta, sendo este um efeito tipo panicolítico (Finn et al., 2003).

A estimulação elétrica da SCPd constitui um outro modelo preditivo de transtorno do pânico bastante difundido (Graeff and Del-Ben, 2008; Lim et al., 2011; Moers-Hornikx et al., 2011; Schenberg et al., 2001). Em um estudo mais recente Casarotto e colaboradores demonstraram que o tratamento com o ACEA, um agonista seletivo de receptores CB1, aumentou a latência de estimulação elétrica necessária para que fosse desencadeada as alterações comportamentais, sugerindo efeito antipânico (Casarotto et al., 2012). É preciso

mencionar que os trabalhos citados, embora corroborem com nossos resultados com URB 597, utilizaram injeções regioespecíficas dos canabinoides, diferentemente dos nossos testes que se valeram de injeções sistêmicas. Isso pode explicar o fato de não termos observado efeito tipo panicolítico nos animais tratados com o Win 55-212.

A distribuição da enzima FAAH não se dá de modo homogêneo no cérebro. Isso faz com que o tratamento com inibidor da mesma promova a elevação dos níveis da anandamida e a consequente modulação dos receptores CB1 somente em regiões que expressam FAAH pós-sináptica em proximidade de receptores CB1, e que estão ativamente liberando endocanabinoides (Lafenetre et al., 2007).

Além disso, é importante lembrar que a síntese dos endocanabinoides ocorre sob demanda, e para tal é necessário que exista um estímulo que a desencadeie (Di Marzo et al., 1994). Desse modo o inibidor da hidrólise apresentará uma ação seletiva inibindo a degradação somente nos sítios onde a síntese dos endocanabinoides foi desencadeada (Piomelli et al., 2006). No caso do nosso trabalho esse estímulo para a síntese pode ser a exposição aos ambientes aversivos do LTE.

Tanto esse caráter de ação em sítios específicos, nos quais ocorreu a síntese dos endocanabinoides, quanto a necessidade da proximidade entre os sítios que expressam FAAH e receptores CB1, podem ser responsáveis pelo fato de drogas inibidores da hidrólise, como o URB 597, ocasionarem efeitos distintos dos encontrados no simples tratamento direto com agonistas exógenos. Foi observado, por exemplo, que o inibidor da FAAH, não apresenta os efeitos de hipotermia e catalepsia, nem o potencial de adicção observados

com agonistas canabinoides (Gobbi et al., 2005; Kathuria et al., 2003; Piomelli et al., 2006).

No que tange os transtornos de ansiedade essas diferenças entre as drogas que atuam aumentando os níveis de endocanabinoides e agonistas exógenos também ocorrem. Diversos estudos demonstram, por exemplo, que o padrão de U invertido das curvas dose resposta obtidas em modelos preditivos de ansiedade, encontradas com o uso de agonistas exógenos não é mimetizado por drogas que elevam os níveis de canabinoides endógenos (Haller et al., 2007; Kathuria et al., 2003; Moreira et al., 2007; Patel and Hillard, 2006).

Ainda no âmbito das divergências, entre drogas que modulam os níveis de endocanabinoides e os agonistas exógenos e com relação aos comportamentos da ansiedade, Chhatwal e colaboradores demonstraram que o tratamento com o AM 404 facilitava a extinção do medo condicionado, e que esse efeito não era observado com o tratamento com Win 55-212 (Chhatwal et al., 2005). Estes resultados corroboram com os dados publicados neste trabalho no qual apenas o URB 597, e não o agonista exógeno testado promoveu efeito panicolítico.

Estudos demonstram que o canabinoide endógeno anandamida, também é um ligante do receptor vaniloide de potencial transitório subtipo 1 (TRPV1) (Van Der Stelt and Di Marzo, 2004). A elevação dos níveis de anadamida na SCP, promovida pela utilização de um inibidor da enzima que a degrada provoca analgesia mediada por receptores TRPV1, caracterizando interação da anandamida com esse receptor (Starowicz et al., 2007).

Kasckow e colaboradores demonstraram, ainda, que 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 (Kasckow et al., 2004). Utilizando camundongos nocautes para TRPV1, Marsch e colegas observaram o comportamento tipo ansiolítico desses animais no LCE e na caixa claro-escuro, quando comparado aos animais selvagens, corroborando a hipótese que a ativação desses receptores apresenta papel pró-aversivo (Marsch et al., 2007).

Esses resultados podem explicar o fato de termos obtido efeito panicolítico somente com a dose intermediária do URB 597. É possível que na maior dose, a droga elevou de modo mais acentuado os níveis de anandamida, permitindo que esse endocanabinoide também se ligasse aos receptores TRPV1, e mascarasse o efeito panicolítico. Isso corrobora com dados prévios que demonstraram que o bloqueio desses receptores TRPV1, restabelece o efeito antiaversivo de agonistas canabinoides (Campos and Guimaraes, 2009; Casarotto et al., 2012; Terzian et al., 2009).

Os dados apresentados nesse trabalho mostram que drogas que interferem com o sistema endocanabinoide modulam as respostas comportamentais avaliadas no LTE. Foi demonstrado que um antagonista exógeno promove efeito tipo-ansiolítico mediado por receptor CB1, enquanto um efeito tipo ansiogênico foi observado com o uso do antagonista destes receptores. O inibidor da hidrólise da anandamida, além de promover efeito tipo-ansiolítico apresentou efeito tipo antipânico. Este último resultado é particularmente importante uma vez que nosso trabalho é o primeiro a

demonstrar efeito panicolítico com injeção sistêmica de drogas que aumentam o nível de endocanabinoides. Tais resultados, portanto, sustentam a hipótese de que fármacos que intensificam as ações do sistema endocanabinoide induzem efeitos tipo ansiolítico e tipo panicolítico no modelo do labirinto em T elevado e representam possíveis estratégias para novos tratamentos farmacológicos de transtornos de ansiedade.

## Referências Bibliográficas

- Akinshola, B.E., Chakrabarti, A., and Onaivi, E.S. (1999). In-vitro and in-vivo action of cannabinoids. *Neurochem Res* 24, 1233-1240.
- Ameri, A. (1999). The effects of cannabinoids on the brain. *Prog Neurobiol* 58, 315-348.
- Balerio, G.N., Aso, E., and Maldonado, R. (2006). Role of the cannabinoid system in the effects induced by nicotine on anxiety-like behaviour in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 184, 504-513.
- Berrendero, F., and Maldonado, R. (2002). Involvement of the opioid system in the anxiolytic-like effects induced by Delta(9)-tetrahydrocannabinol. *Psychopharmacology (Berl)* 163, 111-117.
- Blanchard, D.C., and Blanchard, R.J. (1988). Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. *Annu Rev Psychol* 39, 43-68.
- Blanchard, D.C., Griebel, G., and Blanchard, R.J. (2001). Mouse defensive behaviors: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. *Neurosci Biobehav Rev* 25, 205-218.
- Blanchard, R.J., and Blanchard, D.C. (1990). An ethoexperimental analysis of defense, fear, and anxiety. In *Anxiety*, N. McNaughton, and G. Andrews, eds. (University of Otago, Dunedin), pp. 124-133.
- Borelli, K.G., Nobre, M.J., Brandao, M.L., and Coimbra, N.C. (2004). Effects of acute and chronic fluoxetine and diazepam on freezing behavior induced by electrical stimulation of dorsolateral and lateral columns of the periaqueductal gray matter. *Pharmacol Biochem Behav* 77, 557-566.
- Borsini, F., Podhorna, J., and Marazziti, D. (2002). Do animal models of anxiety predict anxiolytic-like effects of antidepressants? *Psychopharmacology (Berl)* 163, 121-141.

Bortolato, M., Campolongo, P., Mangieri, R.A., Scattoni, M.L., Frau, R., Trezza, V., La Rana, G., Russo, R., Calignano, A., Gessa, G.L., *et al.* (2006). Anxiolytic-like properties of the anandamide transport inhibitor AM404. *Neuropsychopharmacology* 31, 2652-2659.

Bourin, M., and Hascoet, M. (2003). The mouse light/dark box test. *Eur J Pharmacol* 463, 55-65.

Brandão, M.L. (2001). Comportamento emocional. In *Psicofisiologia: as bases fisiológicas do comportamento*, M.L. Brandão, ed. (São Paulo, Atheneu), pp. 146 - 151.

Burrows, G.D., Norman, T.R., Judd, F.K., and Marriott, P.F. (1990). Short-acting versus long-acting benzodiazepines: discontinuation effects in panic disorders. *J Psychiatr Res* 24 *Suppl* 2, 65-72.

Busquets-Garcia, A., Puighermanal, E., Pastor, A., de la Torre, R., Maldonado, R., and Ozaita, A. (2011). Differential role of anandamide and 2-arachidonoylglycerol in memory and anxiety-like responses. *Biol Psychiatry* 70, 479-486.

Calabria, B., Degenhardt, L., Hall, W., and Lynskey, M. (2010). Does cannabis use increase the risk of death? Systematic review of epidemiological evidence on adverse effects of cannabis use. *Drug Alcohol Rev* 29, 318-330.

Campos, A.C., and Guimaraes, F.S. (2009). Evidence for a potential role for TRPV1 receptors in the dorsolateral periaqueductal gray in the attenuation of the anxiolytic effects of cannabinoids. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 33, 1517-1521.

Carobrez, A.P., and Bertoglio, L.J. (2005). Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neurosci Biobehav Rev* 29, 1193-1205.

Casarotto, P.C., Terzian, A.L., Aguiar, D.C., Zangrossi, H., Guimaraes, F.S., Wotjak, C.T., and Moreira, F.A. (2012). Opposing roles for cannabinoid receptor type-1 (CB) and transient receptor potential vanilloid type-1 channel (TRPV1) on the modulation of panic-like responses in rats. *Neuropsychopharmacology* 37, 478-486.

Charney, D.S., and Woods, S.W. (1989). Benzodiazepine treatment of panic disorder: a comparison of alprazolam and lorazepam. *J Clin Psychiatry* 50, 418-423.

Charney, D.S., Woods, S.W., Goodman, W.K., Rifkin, B., Kinch, M., Aiken, B., Quadrino, L.M., and Heninger, G.R. (1986). Drug treatment of panic disorder: the comparative efficacy of imipramine, alprazolam, and trazodone. *J Clin Psychiatry* 47, 580-586.

Chhatwal, J.P., Davis, M., Maguschak, K.A., and Ressler, K.J. (2005). Enhancing cannabinoid neurotransmission augments the extinction of conditioned fear. *Neuropsychopharmacology* 30, 516-524.

da Silva, E.S., Poltronieri, S.C., Nascimento, J.O., Zangrossi, H., Jr., and Viana, M.B. (2011). Facilitation of 5-HT(2A/2C)-mediated neurotransmission in the ventromedial hypothalamic nucleus decreases anxiety in the elevated T-maze. *Behav Brain Res* 216, 692-698.

de Bortoli, V.C., Nogueira, R.L., and Zangrossi, H., Jr. (2008). Alprazolam potentiates the antiaversive effect induced by the activation of 5-HT(1A) and 5-HT (2A) receptors in the rat dorsal periaqueductal gray. *Psychopharmacology (Berl)* 198, 341-349.

de Paula, D.C., Torricelli, A.S., Lopreato, M.R., Nascimento, J.O., and Viana, M.B. (2012). 5-HT(2A) receptor activation in the dorsolateral septum facilitates inhibitory avoidance in the elevated T-maze. *Behav Brain Res* 226, 50-55.

de Paula Soares, V., and Zangrossi, H., Jr. (2009). Stimulation of 5-HT1A or 5-HT2A receptors in the ventrolateral periaqueductal gray causes anxiolytic-, but not panicolytic-like effect in rats. *Behav Brain Res* 197, 178-185.

Deakin, J.F.W., and Graeff, F.G. (1991). 5-HT and mechanisms of defense. *JPsychopharmacology* 5, 305-315.

Devane, W.A., Breuer, A., Sheskin, T., Jarbe, T.U., Eisen, M.S., and Mechoulam, R. (1992). A novel probe for the cannabinoid receptor. *J Med Chem* 35, 2065-2069.

Devane, W.A., Dysarz, F.A., 3rd, Johnson, M.R., Melvin, L.S., and Howlett, A.C. (1988). Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol* 34, 605-613.

Di Marzo, V. (1999). Biosynthesis and inactivation of endocannabinoids: relevance to their proposed role as neuromodulators. *Life Sci* 65, 645-655.

Di Marzo, V., Fontana, A., Cadas, H., Schinelli, S., Cimino, G., Schwartz, J.C., and Piomelli, D. (1994). Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature* 372, 686-691.

DSM-III (1980). American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders. , Fourth edn (Washington DC, APA Press).

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

Felder, C.C., Briley, E.M., Axelrod, J., Simpson, J.T., Mackie, K., and Devane, W.A. (1993). Anandamide, an endogenous cannabimimetic eicosanoid, binds to the cloned human cannabinoid receptor and stimulates receptor-mediated signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 7656-7660.

Finn, D.P., Jhaveri, M.D., Beckett, S.R., Roe, C.H., Kendall, D.A., Marsden, C.A., and 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.

Gobbi, G., Bambico, F.R., Mangieri, R., Bortolato, M., Campolongo, P., Solinas, M., Cassano, T., Morgese, M.G., Debonnel, G., Duranti, A., *et al.* (2005). Antidepressant-like activity and modulation of brain monoaminergic transmission by blockade of anandamide hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 18620-18625.

Graeff, F.G. (1999). Ansiedade. In *Neurobiologia das doenças mentais*, F.G. Graeff, and M.L. Brandão, eds. ( São Paulo), pp. 135 -178.

Graeff, F.G. (2002). On serotonin and experimental anxiety. *Psychopharmacology (Berl)* 163, 467-476.

Graeff, F.G., and Del-Ben, C.M. (2008). Neurobiology of panic disorder: from animal models to brain neuroimaging. *Neurosci Biobehav Rev* 32, 1326-1335.

Graeff, F.G., Viana, M.B., and 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., and Zangrossi, J.H. (2002). Animal Models of Anxiety Disorders. In *Textbook of biological psychiatry* Wiley and Sons, H.D.B. D'haenen, J.A.; Westenberg, H.; Willner, P, ed. ( London), pp. 879-893.

Griebel, G., Stemmelin, J., and Scatton, B. (2005). Effects of the cannabinoid CB1 receptor antagonist rimonabant in models of emotional reactivity in rodents. *Biol Psychiatry* 57, 261-267.

Gruber, S.A., Rogowska, J., and Yurgelun-Todd, D.A. (2009). Altered affective response in marijuana smokers: an FMRI study. *Drug Alcohol Depend* 105, 139-153.

Guimarães, F.S., Carobrez, A.P., and Graeff, F.g. (2008). Modulation of anxiety behaviors by 5-HT-interacting drugs. In *Handbook of Anxiety and Fear*, R. Blanchard, C. Blanchard, G. Griebel, and D. Nutt, eds., pp. 241- 268.

Guimaraes, F.S., Chiaretti, T.M., Graeff, F.G., and Zuardi, A.W. (1990). Antianxiety effect of cannabidiol in the elevated plus-maze. *Psychopharmacology (Berl)* 100, 558-559.

Hall, W., and Solowij, N. (1998). Adverse effects of cannabis. *Lancet* 352, 1611-1616.

Haller, J., Bakos, N., Szirmay, M., Ledent, C., and Freund, T.F. (2002). The effects of genetic and pharmacological blockade of the CB1 cannabinoid receptor on anxiety. *Eur J Neurosci* 16, 1395-1398.

Haller, J., Matyas, F., Soproni, K., Varga, B., Barsy, B., Nemeth, B., Mikics, E., Freund, T.F., and Hajos, N. (2007). Correlated species differences in the effects of cannabinoid ligands on anxiety and on GABAergic and glutamatergic synaptic transmission. *Eur J Neurosci* 25, 2445-2456.

Haller, J., Varga, B., Ledent, C., and Freund, T.F. (2004). CB1 cannabinoid receptors mediate anxiolytic effects: convergent genetic and pharmacological evidence with CB1-specific agents. *Behav Pharmacol* 15, 299-304.

Handley, S.L., and McBlane, J.W. (1993). 5HT drugs in animal models of anxiety. *Psychopharmacology (Berl)* 112, 13-20.

Handley, S.L., and 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.

Herkenham, M., Lynn, A.B., Little, M.D., Johnson, M.R., Melvin, L.S., de Costa, B.R., and Rice, K.C. (1990). Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 1932-1936.

Hill, M.N., and Gorzalka, B.B. (2004). Enhancement of anxiety-like responsiveness to the cannabinoid CB(1) receptor agonist HU-210 following chronic stress. *Eur J Pharmacol* 499, 291-295.

Howlett, A.C. (1995). Pharmacology of cannabinoid receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 35, 607-634.

Howlett, A.C., Barth, F., Bonner, T.I., Cabral, G., Casellas, P., Devane, W.A., Felder, C.C., Herkenham, M., Mackie, K., Martin, B.R., *et al.* (2002). International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev* 54, 161-202.

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

Kahn, R.J., McNair, D.M., Lipman, R.S., Covi, L., Rickels, K., Downing, R., Fisher, S., and Frankenthaler, L.M. (1986). Imipramine and chlordiazepoxide in depressive and anxiety disorders. II. Efficacy in anxious outpatients. *Arch Gen Psychiatry* 43, 79-85.

Kasckow, J.W., Mulchahey, J.J., and Geraciotti, T.D., Jr. (2004). Effects of the vanilloid agonist olvanil and antagonist capsazepine on rat behaviors. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 28, 291-295.

Kathuria, S., Gaetani, S., Fegley, D., Valino, F., Duranti, A., Tontini, A., Mor, M., Tarzia, G., La Rana, G., Calignano, A., *et al.* (2003). Modulation of anxiety through blockade of anandamide hydrolysis. *Nat Med* 9, 76-81.

Katzman, M.A. (2009). Current considerations in the treatment of generalized anxiety disorder. *CNS Drugs* 23, 103-120.

Kelly, D., Guirguis, W., Frommer, E., Mitchell-Heggs, N., and Sargant, W. (1970). Treatment of phobic states with antidepressants. A retrospective study of 246 patients. *Br J Psychiatry* 116, 387-398.

Kennett, G.A., Trail, B., and Bright, F. (1998). Anxiolytic-like actions of BW 723C86 in the rat Vogel conflict test are 5-HT<sub>2B</sub> receptor mediated. *Neuropharmacology* 37, 1603-1610.

Klein, D.F. (1964). Delineation of Two Drug-Responsive Anxiety Syndromes. *Psychopharmacologia* 5, 397-408.

Klein, D.F., and Fink, M. (1962). Psychiatric reaction patterns to imipramine. *Am J Psychiatry* 119, 432-438.

Kulkarni, S.K., and Sharma, K. (1993). Alprazolam modifies animal behaviour on elevated plus-maze. *Indian J Exp Biol* 31, 908-911.

Lafenetre, P., Chaouloff, F., and Marsicano, G. (2007). The endocannabinoid system in the processing of anxiety and fear and how CB1 receptors may modulate fear extinction. *Pharmacol Res* 56, 367-381.

Lim, L.W., Blokland, A., van Duinen, M., Visser-Vandewalle, V., Tan, S., Vlamings, R., Janssen, M., Jahanshahi, A., Aziz-Mohammadi, M., Steinbusch, H.W., *et al.* (2011). Increased plasma corticosterone levels after periaqueductal gray stimulation-induced escape reaction or panic attacks in rats. *Behav Brain Res* 218, 301-307.

Marsch, R., Foeller, E., Rammes, G., Bunck, M., Kossel, M., Holsboer, F., Ziegler, W., Landgraf, R., Lutz, B., and 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, 832-839.

Martin, M., Ledent, C., Parmentier, M., Maldonado, R., and Valverde, O. (2002). Involvement of CB1 cannabinoid receptors in emotional behaviour. *Psychopharmacology (Berl)* 159, 379-387.

McMahon, L.R., and Koek, W. (2007). Differences in the relative potency of SR 141716A and AM 251 as antagonists of various in vivo effects of cannabinoid agonists in C57BL/6J mice. *Eur J Pharmacol* 569, 70-76.

McNaughton, N., and Gray, J.A. (2000). Anxiolytic action on the behavioural inhibition system implies multiple types of arousal contribute to anxiety. *J Affect Disord* 61, 161-176.

Mechoulam, R. (1970). Marijuana chemistry. *Science* 168, 1159-1166.

Mechoulam, R., Ben-Shabat, S., Hanus, L., Ligumsky, M., Kaminski, N.E., Schatz, A.R., Gopher, A., Almog, S., Martin, B.R., Compton, D.R., *et al.* (1995). Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol* 50, 83-90.

Moers-Hornikx, V.M., Vles, J.S., Lim, L.W., Ayyildiz, M., Kaplan, S., Gavilanes, A.W., Hoogland, G., Steinbusch, H.W., and Temel, Y. (2011). Periaqueductal grey stimulation induced panic-like behaviour is accompanied by deactivation of the deep cerebellar nuclei. *Cerebellum* 10, 61-69.

Moreira, F.A., Aguiar, D.C., Campos, A.C., Lisboa, S.F., Terzian, A.L., Resstel, L.B., and Guimaraes, F.S. (2009). Antiaversive effects of cannabinoids: is the periaqueductal gray involved? *Neural Plast* 2009, 625469.

Moreira, F.A., Aguiar, D.C., and Guimaraes, F.S. (2007). Anxiolytic-like effect of cannabinoids injected into the rat dorsolateral periaqueductal gray. *Neuropharmacology* 52, 958-965.

Moreira, F.A., and Crippa, J.A. (2009). The psychiatric side-effects of rimonabant. *Rev Bras Psiquiatr* 31, 145-153.

Moreira, F.A., Kaiser, N., Monory, K., and Lutz, B. (2008). Reduced anxiety-like behaviour induced by genetic and pharmacological inhibition of the endocannabinoid-degrading enzyme fatty acid amide hydrolase (FAAH) is mediated by CB1 receptors. *Neuropharmacology* 54, 141-150.

Moreira, F.A., and Wotjak, C.T. (2010). Cannabinoids and anxiety. *Curr Top Behav Neurosci* 2, 429-450.

Murray, R.M., Morrison, P.D., Henquet, C., and Di Forti, M. (2007). Cannabis, the mind and society: the hash realities. *Nat Rev Neurosci* 8, 885-895.

Navarro, M., Hernandez, E., Munoz, R.M., del Arco, I., Villanua, M.A., Carrera, M.R., and Rodriguez de Fonseca, F. (1997). Acute administration of the CB1 cannabinoid receptor antagonist SR 141716A induces anxiety-like responses in the rat. *Neuroreport* 8, 491-496.

Ortega-Alvaro, A., Aracil-Fernandez, A., Garcia-Gutierrez, M.S., Navarrete, F., and Manzanares, J. (2011). Deletion of CB2 cannabinoid receptor induces schizophrenia-related behaviors in mice. *Neuropsychopharmacology* 36, 1489-1504.

Pamplona, F., and Takahashi, R. (2012). Psychopharmacology of the endocannabinoids: far beyond anandamide. *J Psychopharmacol* 26, 7-22.

Parolaro, D., Realini, N., Vigano, D., Guidali, C., and Rubino, T. (2010). The endocannabinoid system and psychiatric disorders. *Exp Neurol* 224, 3-14.

Patel, S., and Hillard, C.J. (2006). Pharmacological evaluation of cannabinoid receptor ligands in a mouse model of anxiety: further evidence for an anxiolytic role for endogenous cannabinoid signaling. *J Pharmacol Exp Ther* *318*, 304-311.

Paton, W.D. (1975). Pharmacology of marijuana. *Annu Rev Pharmacol* *15*, 191-220.

Pellow, S., Chopin, P., File, S.E., and Briley, M. (1985). Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods* *14*, 149-167.

Pinheiro, S.H., Zangrossi, H., Jr., Del-Ben, C.M., and Graeff, F.G. (2007). Elevated mazes as animal models of anxiety: effects of serotonergic agents. *An Acad Bras Cienc* *79*, 71-85.

Piomelli, D., Tarzia, G., Duranti, A., Tontini, A., Mor, M., Compton, T.R., Dasse, O., Monaghan, E.P., Parrott, J.A., and Putman, D. (2006). Pharmacological profile of the selective FAAH inhibitor KDS-4103 (URB597). *CNS Drug Rev* *12*, 21-38.

Pobbe, R.L., and Zangrossi, H., Jr. (2005). 5-HT(1A) and 5-HT(2A) receptors in the rat dorsal periaqueductal gray mediate the antipanic-like effect induced by the stimulation of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus. *Psychopharmacology (Berl)* *183*, 314-321.

Poltronieri, S.C., Zangrossi, H., Jr., and de Barros Viana, M. (2003). Antipanic-like effect of serotonin reuptake inhibitors in the elevated T-maze. *Behav Brain Res* *147*, 185-192.

Rickels, K., and Rynn, M. (2002). Pharmacotherapy of generalized anxiety disorder. *J Clin Psychiatry* *63 Suppl 14*, 9-16.

Rodgers, R.J., Evans, P.M., and Murphy, A. (2005). Anxiogenic profile of AM-251, a selective cannabinoid CB1 receptor antagonist, in plus-maze-naive and plus-maze-experienced mice. *Behav Pharmacol* *16*, 405-413.

Rodgers, R.J., Haller, J., Halasz, J., and Mikics, E. (2003). 'One-trial sensitization' to the anxiolytic-like effects of cannabinoid receptor antagonist SR141716A in the mouse elevated plus-maze. *Eur J Neurosci* *17*, 1279-1286.

Rubino, T., Guidali, C., Vigano, D., Realini, N., Valenti, M., Massi, P., and Parolaro, D. (2008). CB1 receptor stimulation in specific brain areas differently modulate anxiety-related behaviour. *Neuropharmacology* 54, 151-160.

Rubino, T., Sala, M., Vigano, D., Braidà, D., Castiglioni, C., Limonta, V., Guidali, C., Realini, N., and Parolaro, D. (2007). Cellular mechanisms underlying the anxiolytic effect of low doses of peripheral Delta9-tetrahydrocannabinol in rats. *Neuropsychopharmacology* 32, 2036-2045.

Sargant, W. (1962). The treatment of anxiety states and atypical depressions by the monoamine oxidase inhibitor drugs. *J Neuropsychiatr* 3(Suppl 1), S 96-103.

Schenberg, L.C., Bittencourt, A.S., Sudre, E.C., and Vargas, L.C. (2001). Modeling panic attacks. *Neurosci Biobehav Rev* 25, 647-659.

Shekhar, A., and Keim, S.R. (2000). LY354740, a potent group II metabotropic glutamate receptor agonist prevents lactate-induced panic-like response in panic-prone rats. *Neuropharmacology* 39, 1139-1146.

Sink, K.S., Segovia, K.N., Sink, J., Randall, P.A., Collins, L.E., Correa, M., Markus, E.J., Vemuri, V.K., Makriyannis, A., and Salamone, J.D. (2010). Potential anxiogenic effects of cannabinoid CB1 receptor antagonists/inverse agonists in rats: comparisons between AM4113, AM251, and the benzodiazepine inverse agonist FG-7142. *Eur Neuropsychopharmacol* 20, 112-122.

Spitzer, R.L., Endicott, J., and Robins, E. (1978). Research diagnostic criteria: rationale and reliability. *Arch Gen Psychiatry* 35, 773-782.

Starowicz, K., Nigam, S., and Di Marzo, V. (2007). Biochemistry and pharmacology of endovanilloids. *Pharmacol Ther* 114, 13-33.

Susman, J., and Klee, B. (2005). The Role of High-Potency Benzodiazepines in the Treatment of Panic Disorder. *Prim Care Companion J Clin Psychiatry* 7, 5-11.

Teixeira, R.C., Zangrossi, H., and 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.

- Terzian, A.L., Aguiar, D.C., Guimaraes, F.S., and 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* 19, 188-195.
- Van Der Stelt, M., and Di Marzo, V. (2004). Endovanilloids. Putative endogenous ligands of transient receptor potential vanilloid 1 channels. *Eur J Biochem* 271, 1827-1834.
- Viana, M.d.B. (2010). Freud e Darwin: ansiedade como sinal, uma resposta adaptativa ao perigo. *Natureza humana* 12, 1-33.
- Xi, Z.X., Peng, X.Q., Li, X., Song, R., Zhang, H.Y., Liu, Q.R., Yang, H.J., Bi, G.H., Li, J., and Gardner, E.L. (2011). Brain cannabinoid CB receptors modulate cocaine's actions in mice. *Nat Neurosci* 14, 1160-1166.
- Yucel, M., Solowij, N., Respondek, C., Whittle, S., Fornito, A., Pantelis, C., and Lubman, D.I. (2008). Regional brain abnormalities associated with long-term heavy cannabis use. *Arch Gen Psychiatry* 65, 694-701.
- Zangrossi, H., Jr., and Graeff, F.G. (1997). Behavioral validation of the elevated T-maze, a new animal model of anxiety. *Brain Res Bull* 44, 1-5.
- Zanoveli, J.M., Nogueira, R.L., and Zangrossi, H., Jr. (2005). Chronic imipramine treatment sensitizes 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2A</sub> receptors in the dorsal periaqueductal gray matter: evidence from the elevated T-maze test of anxiety. *Behav Pharmacol* 16, 543-552.
- Zuardi, A.W. (2006). History of cannabis as a medicine: a review. *Rev Bras Psiquiatr* 28, 153-157.