

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

**Efeito do Canabidiol injetado na substância cinzenta periaquedutal
dorsolateral de ratos submetidos a dois modelos de ansiedade.**

Alline Cristina de Campos

Ribeirão Preto

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ALLINE CRISTINA DE CAMPOS

**Efeito do Canabidiol injetado na substância cinzenta periaquedutal
dorsolateral de ratos submetidos a dois modelos de ansiedade**

Alline Cristina de Campos

Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade Medicina de Ribeirão Preto-USP,
para a obtenção do título de Mestre em
Ciências.

Área de concentração: Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Silveira Guimarães

Ribeirão Preto

2008

FOLHA DE APROVAÇÃO

Alline Cristina de Campos

Efeitos do Canabidiol injetado na Substancia Cinzenta Periaquedutal dorsolateral de ratos submetidos a dois modelos de ansiedade.

Dissertação apresentada ao Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo campus Ribeirão Preto, para a obtenção do título de mestre em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Aprovado em: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Francisco Silveira Guimarães

Instituição: FMRP-USP

Assinatura: _____

Prof. Dr. Antônio Waldo Zuardi

Instituição: FMRP-USP

Assinatura: _____

Prof. Dr. Reinaldo Takahashi

Instituição: UFSC

Assinatura: _____

Dedico este trabalho ao amor incondicional e verdadeiro das pessoas que me incentivam constantemente nesta busca incessante da realização de um sonho: mamãe, Cíntia e Stéfanni.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e a sua infinita luz que sempre ilumina meus caminhos.

A minha família querida. Mamãe: obrigada por seus esforços incansáveis e persistentes em nossa busca por uma vida melhor e por me ensinar a nunca desistir. Cíntia e Stéfanni: obrigada pela abdicção e compreensão de sempre. O amor, o carinho e a presença de vocês são vitais em tudo o que tenho tentado construir. Amo vocês.

A meu Orientador Francisco Silveira Guimarães, pela oportunidade da realização deste trabalho, pela confiança, pelos ensinamentos e suporte constantes durante estes dois anos de mestrado.

Agradeço ao suporte técnico e a amizade de Eleni Tamburus Gomes, José Carlos de Aguiar e Afonso Paulo Padovan. Este trabalho tem muito da colaboração de vocês.

Aos colegas de laboratório pela cooperação durante a execução dos experimentos desta dissertação. Dani, obrigada por toda a ajuda desde o começo. Inácio, pelas “discussões” científicas ou não, por nossas colaborações. Fred, obrigada por nossas colaborações científicas e por transmitir esta calma e serenidade. A amizade de vocês é muito importante. Fabrício eterno companheiro de laboratório e das Minas Gerais, obrigada pelo incentivo de sempre.

As amigas de perto: Dri e Vany's. Creuzas, vocês tornam minha vida mais doce e tranqüila. Obrigada por estarem sempre perto quando preciso. Fábria Alvim e Cláudia Padovan, o apoio e a amizade de vocês são sempre muito importantes.

Aos amigos e amigas de longe: Hellen, Juliana, Renata, Paola, Thiago, Izabela, Hermano, Lucas, Robson e tantos outros. Obrigada por se manterem sempre perto mesmo longe. Eu posso sentir o carinho e a torcida de vocês todos os dias.

Aos meus amigos de pós-graduação e do departamento de farmacologia que tornam esta vida acadêmica mais suave e porque não mais divertida. Alisson, Evandro, Stefâny, Marcelo. MALUCOS! Vocês são muito especiais. Chicão, Carlos, Daniel, Dani, Leandro, Lucas, Renata (limpeza), Val, Tati, obrigada por tudo!

Prof. Dr. Orlando Vieira de Souza (UFJF) pelo incentivo e ensinamentos valiosos, fundamentais para o início desta caminhada.

A todos os familiares, amigos e colegas não citados que fizeram e fazem parte desta caminhada o meu muito obrigada!

Agradeço ainda ao trabalho dos profissionais da secretaria do departamento de Farmacologia, Sonia Maria Stefanelli, Fátima Helena Ferreira Petean e José Waldik Ramon pela disposição e empenho de sempre. O trabalho de vocês é essencial para nós pós-graduandos.

Maria Inês Nemoto e Eliana Barros, pelo cuidado dispensado aos animais.

Ratos wistar machos 220-240g, a vocês todo o meu respeito e dignidade. Este trabalho não seria executado sem a colaboração de vocês.

Este trabalho foi realizado com o suporte financeiro da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo: 06 /51376-7. Agradecimentos ao assessor que acompanhou a execução deste trabalho.

“Somos filhos da matéria do sonho, e o sono apenas confina a nossa insistência.”

William Shakespeare

RESUMO

O canabidiol (CBD) é um componente não-psicotomimético da *Cannabis sativa*. Estudos em animais de laboratório e humanos sugerem que a administração sistêmica deste composto produz efeitos ansiolíticos. Os mecanismos e locais de ação destes efeitos, no entanto, ainda não foram investigados. Considerando que a substância cinzenta periaquedutal dorsolateral (SCPdl) tem sido relacionada com a ansiedade e possui receptores para endocanabinóides. O presente projeto objetivou investigar o efeito da microinjeção de CBD (30-120 nmol) na SCPdl de ratos submetidos a dois modelos de ansiedade, o labirinto em cruz elevado (LCE) e o teste do lambar punido de Vogel. O CBD na dose de 30nmol injetado na SCPdl produziu efeito ansiolítico no labirinto em cruz elevado com curva dose-resposta em forma de U-invertido. O efeito ansiolítico do CBD foi confirmado no modelo de lambar punido de Vogel. Entre os possíveis mecanismos propostos para o CBD, foi sugerida a inibição da hidrólise e/ou da recaptção da anandamida, um endocanabinóide, ou o efeito agonista em receptores 5-HT_{1A} ou TP_{RPV1}. Ao testarmos estas possibilidades verificamos que os efeitos do CBD na SCPdl parecem não ser mediados por receptores CB₁, já que não foram antagonizados pelo AM251, um antagonista de receptores CB₁. No entanto o WAY100635, um antagonista de receptores 5HT_{1A}, bloqueou o efeito ansiolítico do CBD. Além disso, a Capsazepina, um antagonista de receptores vanilóides, não foi capaz de reverter o efeito ansiolítico do CBD na dose de 30nmol, mas transformou a maior dose não efetiva testada (60nmol) em uma dose ansiolítica. Os resultados sugerem que o CBD produz efeitos ansiolíticos quando injetado na SCPdl por ativar receptores 5HT_{1A}. Além disso,

em altas concentrações poderia também ativar receptores vanilóides, o que produziria efeitos opostos aos observados com concentrações mais baixas da droga

ABSTRACT

Cannabidiol (CBD) is the nonpsychotomimetic component of *Cannabis sativa* plant. Systemic administration of CBD promotes anxiolytic effects in both animals and humans. However the brain structures and the mechanisms of action of CBD remain poorly understood, although it could interact with 5HT1A and TRPV1 receptors or inhibit the metabolism of anandamide. The dorsolateral periaqueductal (dIPAG) grey has been related to the control of anxiety and fear and expresses a significant number of CB1, 5HT1A and TRPV1 receptors. The aim of this study was to investigate the anxiolytic-like effects of CBD injected into dIPAG of rats submitted to a two models of anxiety : The elevated plus maze and Vogel conflict test. In the dose of 30nmol CBD promotes anxiolytic-like effects in elevated plus maze with a bell-shaped dose-response curve. The anxiolytic effect of this dose was confirmed in the Vogel conflict test. These effects do not seem to be mediated by facilitation of anandamide effects since the previous antagonism of CB1 receptors by AM251 did not prevent the anxiolytic effects of CBD in the dIPAG. However, antagonism of 5HT1A receptors by WAY100365 blocked the anxiolytic effects of CBD. The antagonist of TRPV1 receptors, Capsazepine did not change the anxiolytic effects of CBD in the dose of 30nmol, but turn the higher, ineffective dose of CBD (60 nmol), into an effective one. These results suggest that CBD produce anxiolytic-like effects in the dIPAG by activating 5HT1A receptors. They also suggest that, at higher doses, the drug could also activate TRPV1 receptors, producing opposite effects.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Divisão neuroanatômica da SCP em colunas.....	16
FIGURA 2: Ilustração esquemática representativa dos sítios de injeção.....	28
FIGURA 3: Fotografia de lâmina histológica de um corte coronal da SCP.....	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Avaliação do consumo de água.....	43
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

5HT: serotonina

5HT1A: receptor serotoninérgico do tipo 1A.

AM251: N-(piperidina-1yl)-5-(4-iodofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1Hpirazole-3
carboxamida

ANOVA: Análise de Variância

CBD: canabidiol

CB1: receptor canabinóide do tipo 1.

CB2: receptor canabinóide do tipo 2.

CPZ: N-[2-(4-Clorofenil)-1,3,4,5-tetrahydro-7,8-dihidroxi-2H-2-benzazepina-2-
carbotiamida) ou Capsazepina.

LCE: Labirinto em cruz elevado

SCP: Substância Cinzenta Periaquedutal

SCPdl: Substância Cinzenta Periaquedutal dorso-lateral

TRPV1: receptor vanilóide do tipo 1.

WAY100635: N-[2-[4-(2-metóxfenil)-1-piperazinil]etil]-N-2-piridinil-
ciclohexanocarboxamida maleato

SUMÁRIO

1.0-INTRODUÇÃO	10
1.1- Ansiedade	10
1.2- Estudo experimental da ansiedade: Modelos animais	13
1.3-Substrato neural da ansiedade	14
1.4- A substância cinzenta periaquedutal	15
1.5- O canabidiol e o sistema canabinóide	17
2.0-OBJETIVOS	20
3.0- MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1-Animais	23
3.2-Drogas	23
3.3-Implantação da cânula guia	23
3.4- Microinjeção	23
3.5-Desenho experimental	25
3.6- Modelos Experimentais	24
3.7- Procedimento Experimental	25
3.8- Histologia	28
3.9- Análise estatística	26
4.0- RESULTADOS	27
4.1- Localização dos sítios de injeção	28
4.2- Experimento I: Labirinto em cruz elevado	29
4.3- Experimento II: Lamber punido de Vogel	35
4.4- Experimento III: Teste de retirada da cauda	38

5.0- DISCUSSÃO	39
6.0- CONCLUSÕES	45
7.0- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

Introdução

1.0 –Introdução

1.1-Ansiedade

A ansiedade é uma experiência subjetiva, basicamente desagradável, que geralmente vem acompanhada de alterações dos níveis séricos de corticosteróides, tensão muscular, sudorese e sintomas psicológicos como hipervigilância, insônia e sentimentos de apreensão.(Graeff, 1999).

A ansiedade é essencialmente uma emoção normal, sendo estritamente relacionada com o medo. Em geral considera-se que o medo seja uma resposta provocada por um estímulo ou situação bem definidos, ou seja, um perigo real, enquanto a ansiedade surgiria em circunstâncias nas quais o perigo parece ser apenas potencial.

Fisiologicamente, tanto ansiedade quanto medo são emoções que apresentam grande valor adaptativo, na medida que podem favorecer a execução de tarefas motoras e cognitivas ou ainda levar ao indivíduo a evitar dano físico. Porém, em alguns casos, a ansiedade eleva-se de maneira a prejudicar a execução de tarefas. Nesses casos ela é considerada patológica, necessitando assim de intervenção farmacológica e/ou psicológica.

A ansiedade patológica pode ser considerada primária, quando é a principal manifestação, ou secundária, isto é, consequência de outros quadros clínicos. Os transtornos primários de ansiedade são classificados de acordo com a presença de determinadas manifestações clínicas. O primeiro modelo de classificação desses transtornos foi proposto pelo psiquiatra George Miller em 1880, que introduziu o termo neurastenia, condição que englobava vários distúrbios de ansiedade. No mesmo século, as fobias foram consideradas como condição

patológica. No entanto, foi Sigmund Freud que estabeleceu o conceito de neurose no início do século XX, termo este usado até início da década de 80, quando foi publicado o Manual Estatístico de Diagnóstico de Doenças Mentais (DSM). Em sua última edição, o DSM-IV classifica os transtornos de ansiedade a seguinte forma:

- **Transtorno de pânico sem agorafobia:** ataques de pânico recorrentes e inesperados, gerando preocupação persistente.
- **Transtorno de pânico com agorafobia:** combinação de ataques de pânico e agorafobia.
- **Agorafobia sem ataques de pânico:** presença de agorafobia e sintomas do tipo pânico, porém sem história de ataques de pânico.
- **Fobia simples:** medo intenso provocado pela exposição a objeto ou exposição definida, que pode levar a um comportamento de esquiva.
- **Fobia Social:** ansiedade clinicamente significativa provocada pela exposição a certos tipos de situação social ou de desempenho, que também pode levar a comportamento de esquiva.
- **Transtorno Obsessivo Compulsivo:** caracterizado por obsessões ou compulsões, comportamentos que levariam ao alívio da ansiedade.
- **Transtorno de estresse pós-traumático:** caracterizado pela re-experimentação de acontecimento extremamente traumático (acidentes, agressões) acompanhada de hipervigilância e esquiva de estímulos associados ao trauma.

- **Transtorno de estresse agudo:** com sintomas semelhantes ao transtorno de estresse pós-traumático, ocorrendo, porém imediatamente após o trauma.
- **Transtorno de ansiedade generalizada:** ansiedade ou preocupação excessiva e persistente durante mais de seis meses.
- **Transtorno de ansiedade devido a uma condição clínica inespecífica:** sintomas proeminentes de ansiedade resultante de doenças orgânicas.
- **Transtorno de ansiedade induzida por fármaco:** sintomas proeminentes de ansiedade resultante de abuso de drogas, medicação ou exposição a toxinas.
- **Transtorno de ansiedade não especificado:** ansiedade intensa ou esquiva fóbica que não se enquadra em nenhuma das classificações anteriores. (DSM-I, 2000).

Embora progressos significativos tenham sido obtidos nas últimas décadas em relação à neurobiologia da ansiedade e ao tratamento de seus transtornos, muitas são as questões a serem investigadas. Além disso, os tratamentos farmacológicos existentes nem sempre são eficazes e apresentam efeitos adversos que podem ser inaceitáveis para determinados pacientes. Dentre as abordagens existentes para investigar esses dois problemas, os modelos experimentais de ansiedade, tanto clínicos quanto aqueles que envolvem experimentação animal, são de grande utilidade.

1.2- Estudo experimental da ansiedade: Modelos animais

O estudo experimental da ansiedade é complicado pela ausência de parâmetros que a reflitam concretamente. A ansiedade teria apenas marcadores correlacionais, como aumento da pressão arterial, taquicardia, hipertermia e aumento dos níveis de corticóides circulantes. Essas alterações autonômicas são geralmente inapropriadas para a caracterização dos mecanismos cerebrais envolvidos nesses transtornos. Por esse motivo os modelos experimentais de ansiedade, principalmente os modelos animais, são de grande valia para o entendimento da neurobiologia envolvidas em tais alterações.

A maioria dos modelos animais de ansiedade baseia-se em situações de conflito. Estes modelos, em sua maioria, baseavam-se no modelo clássico de condicionamento pavloviano (Pavlov, 1928). O primeiro modelo animal a ser amplamente empregado foi o teste de conflito desenvolvido pelos pesquisadores Geller e Seifter na década de 60. Nesse modelo os animais eram treinados a responder a um estímulo de recompensa alimentar o qual, após o aprendizado, era pareado com um componente de punição, um choque nas patas (Geller e Seifter, 1960). Diversos foram os modelos desenvolvidos que tinham por base o mesmo princípio desse modelo, como por exemplo, o modelo do lamber punido de Vogel (Vogel et al., 1971). Esses modelos, porém, requerem um período de treino (no caso do Geller e Seifter) e, além disso, apresentam um componente punido, geralmente estímulos dolorosos como choques, o que levaria a questões éticas. Este fato determinou a procura de modelos animais de conflito não condicionados e não-punidos. Surgiram então os modelos etológicos, ou seja, baseados no medo inato dos animais. Dentre esses, destacam-se o modelo desenvolvido pelo grupo

de Sheila Handley na década de 80, o labirinto em cruz elevado (LCE). Este modelo baseia-se no medo inato dos roedores a lugares altos e desprotegidos. O LCE é composto por dois braços fechados e dois braços abertos, e é elevado cerca de 50 cm do chão. Drogas ansiolíticas clássicas como o diazepam, aumentam o tempo de exploração dos braços abertos sem, no entanto, alterar o índice exploratório dos braços fechados (Handley et al., 1984, Pellow e File 1986). Além desse, outros modelos etológicos de ansiedade foram propostos, como a caixa de claro-escuro (Blumstein & Crawlle, 1983) e o labirinto em T elevado (Vianna et al., 1994). A utilização destes modelos tem contribuído de forma substancial para o melhor entendimento da neurobiologia da ansiedade.

1.3- Substrato Neural da Ansiedade

A caracterização experimental da ansiedade levou ao conhecimento de circuitos cerebrais envolvidos na integração de seus componentes cognitivos e emocionais. Nesse sentido, inúmeras são as estruturas corticais e circuitos límbicos implicados nos mecanismos que modulariam os estados de ansiedade.

Foi Brocca, em 1878, que originalmente introduziu o termo “límbico” para um conjunto de estruturas filogeneticamente conservadas e interligadas. No entanto, o primeiro a relacionar essas estruturas com o substrato fisiológico para a expressão de emoções e do medo foi Papez (1937). Seu “Circuito de Papez” engloba projeções do hipocampo para os corpos mamilares que estão ligados ao núcleo anterior do tálamo. A importância deste sistema foi estabelecida nos trabalhos de MacLean (MacLean, 1949, 1952). Este pesquisador adicionou a este sistema a

amígdala, as conexões do córtex pré-frontal e ainda outros núcleos subcorticais, como o núcleo acumbens e o septo, incluído mais tarde no “sistema de inibição comportamental” do septo-hipocampo (Barili et. al, 1998, Gray, 1987, McNaughton & Gray 2000). Além disso, os vários núcleos do hipotálamo possuem papel no substrato neural das emoções, principalmente nas respostas adrenocorticotróficas ligadas ao estresse, com especial relevância para o núcleo paraventricular do hipotálamo (Hanley e Van de Kar, 2003, Yadin et al., 1993).

Os corpos mamilares, interligados ao sistema septo-hipocampal e amígdala, estariam envolvidos no controle das emoções como o medo e a cognição (Pan and McNaughton, 2002, Oddie et al., 1997, Vertes, 1992, Wirtshafter et al., 1998). Além disso, a amígdala, o hipotálamo medial e a substância cinzenta periaquedutal teriam papel fundamental na coordenação dos comportamentos de defesa como ansiedade e medo (Brandão et al., 1994, Castilho et al., 2002, Graeff, 1990).

1.4- A substância Cinzenta Periaquedutal

A substância cinzenta periaqueductal (SCP) é uma estrutura mesencefálica longitudinalmente organizada, que contorna o aqueduto cerebral até e comissura posterior, onde margeia o terceiro ventrículo, no diencéfalo. Anatômica e funcionalmente, a SCP pode ser dividida em quatro colunas longitudinais denominadas dorsolateral, dorsomedial, lateral e ventrolateral, respectivamente, como esquematicamente representado na figura 1 (Bandler e Shipley 1994).

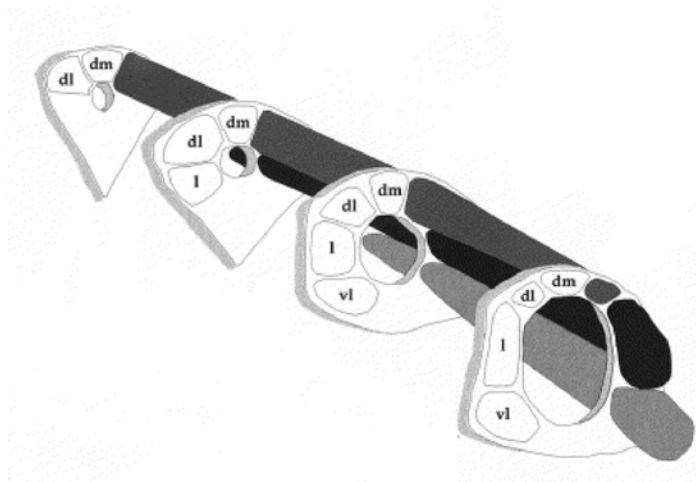


Figura 1- Divisão neuroanatômica da SCP em colunas. Dm: coluna dorsomedial; dl: coluna dorsolateral; l: coluna lateral; vl: coluna ventrolateral. Adaptado de Bandler et al., 2000.

A SCP está envolvida na integração de diversas funções, tais como dor, analgesia, comportamentos defensivos, controle cardiovascular e respiratório, vocalizações e comportamentos sexuais. Esta estrutura faz parte do chamado sistema cerebral de defesa (SCD; Graeff, 1990), que inclui estruturas como amígdala e hipotálamo.

A estimulação elétrica ou química da porção dorsal da SCP induz comportamentos de luta e fuga (Bandler e Carrive, 1988, Fernandez e Hunsperger 1962; Krieger e Graeff, 1985) e efeito antinociceptivo não-opiáceo (Morgan, 1998). Por outro lado, microinjeções de ansiolíticos benzodiazepínicos ou bloqueadores da recaptação da serotonina nessa estrutura atenuam tais comportamentos (Graeff et al., 1993, Lovick, 1994). Baseando-se nestes resultados, a substância

cinzenta periaqueductal dorsolateral (SCPdl) tem sido relacionada com respostas defensivas inatas de luta e fuga a estímulos ameaçadores (Graeff et al., 1993).

1.5- O Canabidiol e o Sistema Canabinóide

O Canabidiol (CBD) é um componente não psicotomimético da *Cannabis sativa* que pode constituir até 40% dos extratos da maconha (Grise, 1976). Sua estrutura, assim como a do principal composto psicotomimético, o Δ^9 -THC (Δ^9 tetrahidrocanabinol), foi elucidada em 1963 por Raphael Mechoulam (ver Mechoulam e Hanus, 2002, para revisão). Desde então, suas propriedades farmacológicas vêm sendo investigadas.

Vários estudos têm verificado a ocorrência de interações farmacológicas entre o Δ^9 -THC e CBD quando administrados concomitantemente. Parte dessas interações podem ser farmacocinéticas, já que o CBD é um inibidor do metabolismo de drogas no fígado (Bornheim e Correia, 1989). No entanto, a maior parte dos estudos sugere que o CBD é capaz de inibir alguns dos efeitos do Δ^9 -THC, entre eles os psicotomiméticos e ansiogênicos (Karniol e Carlini, 1973, Zuardi et al., 1982). Isoladamente, a administração do CBD produz diversos efeitos, tanto em animais de laboratório quanto em humanos, dentre eles destacam-se efeitos sedativos/hipnóticos (Carlini et al., 1979, Colasanti et al., 1984, Monti, 1977, Zuardi et al., 1993), anticonvulsivante (Cunha et al., 1980, Zuardi et al., 1984), neuroprotetor (Hampson et al., 1998), antiemético (Shook e Burks, 1989), cardiovasculares (Jarai et al., 1999, Mcqueen et al., 2004) e antiinflamatórios (Watzi et al., 1991). Além destes, vários estudos sugerem a

presença de possível atividade antipsicótica e ansiolítica (ver Zuardi et al., 2006, para revisão, Moreira e Guimarães, 2005). Em relação a essa última, a administração sistêmica do CBD produz efeitos ansiolíticos em roedores submetidos aos modelos do labirinto em cruz elevado (LCE) e lambar punido de Vogel (Guimarães et al., 1991, Onaivi et al., 1991, Moreira et al., 2006). Estes efeitos também foram verificados em humanos submetidos a um modelo experimental de ansiedade (Zuardi et al. 1993a). Os locais e possíveis mecanismos de ação desses efeitos, no entanto, ainda não foram investigados.

A descoberta dos endocanabinóides (Anandamida e 2-aracidoilglicerol), bem como dos receptores CB1 e CB2 (Devane et al., 1992, Matsuda et al., 1990, Machoulam et al., 1995, Munro et al., 1993), produziu um grande impulso nas pesquisas sobre esse assunto. Também os estudos com o CBD foram incentivados. Embora o mecanismo de ação do CBD permaneça não elucidado, alguns estudos têm sugerido que o CBD não interagiria com receptores CB1 ou CB2, já que sua afinidade para estes receptores é baixa *in vitro* (Bisogno et al. 2001, para revisão ver Pertwee, 2004,). Porém, recentemente foi demonstrado, também em preparações *in vitro*, que o CBD poderia agir como um antagonista de receptores CB1 e agonista de receptores CB2 (Thomas et al., 2007). Ainda outros estudos propõem que o CBD poderia inibir a enzima hidrolase de amidas de ácidos graxos (FAAH, *Fatty acid amide hydrolase*), contida em preparações de membranas celulares, impedindo assim a degradação da Anandamida, ou ainda inibir a recaptação da AEA via um transportador de membrana (Watanabe et al., 1996, Rakhshan et al., 2000, Bisogno et al. 2001). Dessa forma, o CBD poderia atuar facilitando a transmissão endocanabinóide de maneira mais seletiva do que

o Δ^9 -THC, um agonista parcial de receptores CB1. Alguns trabalhos sugeriram ainda que o CBD poderia aumentar as correntes de cálcio em neurônios hipocámpais (Drysdale et al., 2005) ou ainda atuaria na liberação de cálcio dos estoques intracelulares (Ryan et al., 2007) ou diretamente como agonista de canais iônicos de cálcio, como por exemplo, o receptor vanilóide do tipo 1-TRPV1 (Bisogno et al., 2001).

Outro mecanismo proposto seria o envolvimento do CBD com o sistema serotoninérgico, quer por inibir a recaptação de serotonina (Hershkowitz, 1978, Pertwee, 2004), quer por atuar diretamente como agonista de receptores 5HT1A (Russo et al. 2005). Nesse sentido, alguns trabalhos demonstram que o CBD poderia atenuar a morte neuronal por isquemia cerebral via receptores 5HT1A (Mishima et al., 2005).

Em relação a possíveis locais nos quais o CBD poderia estar exercendo seu efeito ansiolítico após administração sistêmica, foi verificado que algumas estruturas envolvidas na regulação da ansiedade, como a amígdala basolateral (Pistis et al., 2004) e a substância cinzenta periaquedutal, possuem uma razoável densidade de receptores CB1 (Herkennham et al., 1991, Tsou et al., 1998). Estímulos aversivos parecem aumentar a produção de endocanabinóides na SCP dorsal (Hohmann et al., 2005) e a injeção de canabinóides na SCPdl produz efeito ansiolítico no LCE (Moreira et al., 2007).

Objetivos

2.0-OBJETIVOS

O objetivo geral do presente projeto é o de procurar elucidar os mecanismos dos efeitos ansiolíticos do CBD. Como objetivos específicos, iremos:

1. investigar, utilizando dois modelos animais de ansiedade, o LCE e o teste de lambe punido de Vogel, se a injeção intra-SCPdl poderia produzir efeitos ansiolíticos.

2. Testar a hipótese de que esse efeito envolva inibição de recaptação/metabolização de endocanabinóides e/ou interação com receptores de serotonina (5HT1A) ou Vanilóides (TRPV1).

Materials e Métodos

3.0-MATERIAIS E MÉTODOS

3.1-Animais: Foram utilizados ratos Wistar albinos, machos (200-250 g), provenientes do Biotério Central do Campus da USP- Ribeirão Preto, que foram mantidos aos pares em caixas de acrílico (25 x 18 x 35 cm), com livre acesso a água e comida. Os animais permaneceram no biotério do próprio laboratório, à temperatura de 24 ± 2 °C, com ciclo claro-escuro de 12 x 12 horas, com início às 7:00 h, até o momento dos testes.

3.2- Drogas: Canabidiol (15, 30 e 60 nmol), gentilmente doado pelo Professor Raphael Mechoulam, da Universidade de Jerusalém, que foi dissolvido em óleo de semente de uva, WAY100635 (Sigma, um antagonista seletivo de receptores 5-HT_{1A}, 0.37 nmol, dose retirada de Soares e Zangrossi Jr., 2004), dissolvida em salina; AM251 (Tocris, um antagonista de receptores CB₁, 100 pmol, dose retirada de Moreira et al., 2007) e Capsazepina (Tocris, antagonista de receptores TRPV₁, 10nmol dose retirada de McGaraughty et al., 2003) dissolvidas em DMSO 10%.

3.3- Implantação da cânula-guia. Os animais foram anestesiados com tribromoetanol 2,5 % (10 ml/kg, i.p.) e fixados a um aparelho estereotáxico (David-Kopff). Uma cânula (11 mm) dirigida à SCPdl (coordenadas: AP-lambda 0 mm, L-1,9 mm, P-4 mm, ângulo-16°, Paxinos e Watson, 1997) foi fixada ao crânio com cimento acrílico, conforme descrito em trabalhos prévios (Guimarães et al., 1991).

3.4- Microinjeção. O procedimento foi similar ao usualmente empregado no laboratório (Guimarães et al., 1991, Molchanov e Guimarães, 2002). A microagulha foi conectada a uma microseringa Hamilton de 10 µl através de um

tubo de Polietileno (P10). Após a introdução da microagulha, o animal foi colocado em caixa de observação e as soluções foram infundidas, em volume de 0,2 μ l, com ajuda de uma Bomba de Infusão (KD Scientific, USA) a uma velocidade de 1 μ l/min. A agulha permaneceu no local por mais 1 minuto para evitar refluxo.

3.5- Desenho experimental. Uma semana após a cirurgia, grupos independentes de animais (n=8-10/grupo) receberam as microinjeções de veículo ou droga (CBD doses: 15, 30 e 60 nmoles) e, 10 min após, foram submetidos aos testes comportamentais (Molchanov e Guimarães, 2002). No caso de duas injeções os animais receberam uma primeira microinjeção de veículo ou antagonista (AM251, WAY100635 ou Capsazepina) seguida, 5 min após, de uma segunda microinjeção de veículo ou CBD 30 nmol (dose baseada nos resultados do primeiro experimento). No caso do experimento que utilizou a Capsazepina a dose da CBD de 60 nmoles também foi utilizada.

3.6- Modelos experimentais. O labirinto em cruz elevado foi semelhante ao descrito em experimentos prévios do laboratório (Molchanov e Guimarães, 2002, Matheus et al., 1994, 1997, Guimarães et al., 1991). A caixa empregada no teste de Vogel era feita de Plexiglas (42 X 25 X 20 cm) com uma grade metálica no assoalho. Um bico metálico de bebedouro se projeta na caixa. O contato do animal com o bico e o assoalho fecha um circuito elétrico associado a um sensor (Anxio-Meter model 102, Columbus, USA) que conta o número de lambidas do animal no bico do bebedouro. A cada 20 lambidas o animal recebe um choque elétrico de 0,5 mA (2 s) no bico. Além desses, os animais ainda foram submetidos ao teste de retirada da cauda. Este modelo é utilizado para avaliação de

nocicepção, conforme descrito em experimentos prévios (Guimarães et al., 1991, Matheus et al., 1994, 1997, Molchanov e Guimarães, 2002).

3.7- Procedimento experimental.

Experimento I:

Labirinto em cruz elevado: O animal foi colocado no centro do labirinto com o focinho voltado para um dos braços fechados. Seu comportamento foi registrado através de uma vídeo-câmera e posteriormente analisado pelo programa Ethovision (versão 1.9). Esse programa detecta a posição do animal no LCE e calcula automaticamente o número de entradas e tempo despendido em cada braço. Ao término de cada experimento o LCE foi limpo com solução alcoólica 70%.

Experimento II:

Vogel: Para o teste de Vogel os animais foram privados de água por 48 h antes do teste. Após as primeiras 24 h foi permitido ao animal beber livremente na caixa-teste por 3 min para período de habituação. Vinte e quatro horas após a habituação os animais foram submetidos aos tratamentos e colocados na caixa-teste por 3 min. Durante este período receberam um choque de 0,5 mA no bico do bebedouro a cada 20 lambidas (Molchanov e Guimarães, 2002). Como controle o consumo de água foi avaliado em procedimento semelhante ao acima descrito, mas sem a apresentação de choque.

Experimento III:

Teste de retirada da cauda: Para o teste de retirada da cauda os animais tinham sua cauda apoiada em um filamento de níquel-cromo que sofreu um aquecimento progressivo. Para evitar dano à cauda do animal, foi estabelecido um

ponto de corte de 6 segundos, quando o filamento alcançava uma temperatura de aproximadamente 80°C.

3.8- Histologia. Ao término dos testes, os animais foram anestesiados com uretana 25% (5 ml/kg) e sofreram perfusão intracardíaca com salina 0,9% e formol 10%. Após essa foi inserida uma microagulha pela cânula-guia e injetados 0,2 µl de corante fast green 0,1%. Os cérebros foram retirados, estocados em formol 10% (2-3 dias) e cortados em seções de 40 µm de espessura em um criostato (Leica 1800) para verificação microscópica do local de injeção, segundo os diagramas do atlas de Paxinos e Watson (1997).

3.9- Análise estatística. Os dados foram analisados por ANOVA seguida do teste de Duncan para comparações múltiplas. O nível de significância foi de 5%.

Resultados

4.0-RESULTADOS

4.1- Localização dos sítios de injeção

Os sítios de injeção de cada grupo foram registrados nas planilhas das representações dos cortes coronais modificadas de Paxinos e Watson, 1997. As áreas atingidas nas cirurgias estão representadas na figura 2 (maiores especificações vide legenda). Animais que receberam o CBD na dose efetiva fora da SCPdl foram agrupados em grupo adicional. A figura 3 ilustra uma fotomicrografia de uma secção coronal representativa de um sítio de injeção.

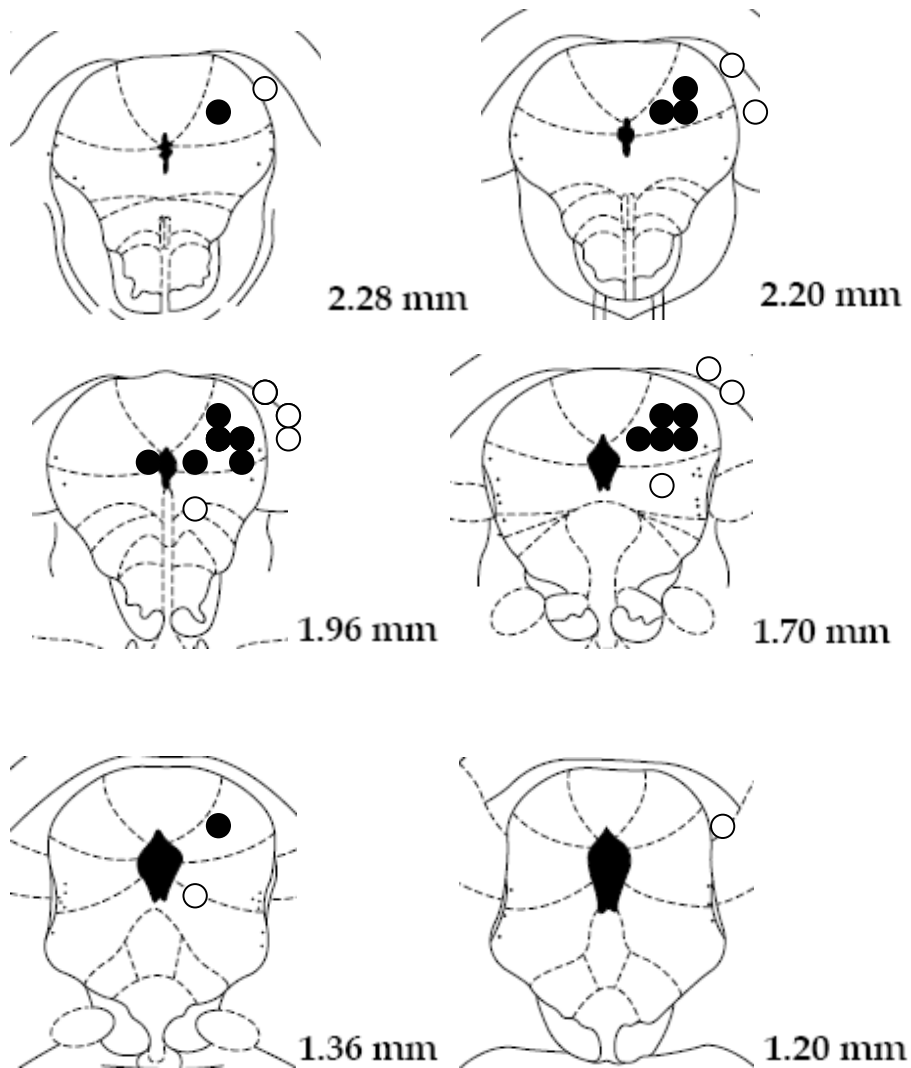


Fig.2- Diagramas modificados de Paxinos e Watson (1997). Ilustração esquemática representativa dos sítios de injeção. Círculos fechados (●) cirurgias consideradas dentro da SCPdl; círculos abertos (○) animais cujos sítios de injeção encontram-se fora da SCPdl. Os números nos diagramas representam a distância da interaural.

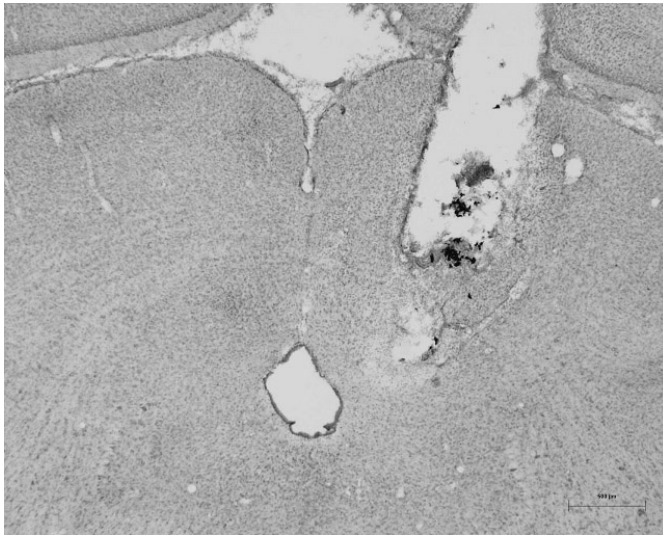


Fig.3- Fotografia de lâmina histológica de um corte coronal em nível de SCP, corado pela coloração de Nissl.

4.2- Experimento I: labirinto em cruz elevado

4.2.1- LCE: construção da curva dose resposta para o CBD injetado na SCPdl

O CBD injetado na SCPdl produziu uma curva dose resposta em formato de U invertido. Na dose de 30 nmoles, o CBD aumentou significativamente tanto a percentagem de entradas ($F_{(4,33)} = 3,5$, $p = 0,001$) como a de tempo gasto ($F_{(4,33)} = 2,6$, $p < 0,05$) nos braços abertos do labirinto em cruz elevado em relação ao grupo controle, sem, no entanto, alterar o número de entradas nos braços fechados

($F_{(4,33)}=0,65$). Nas doses de 15 nmol e 60 nmol, o CBD não apresentou nenhum efeito significativo (Figura 4).

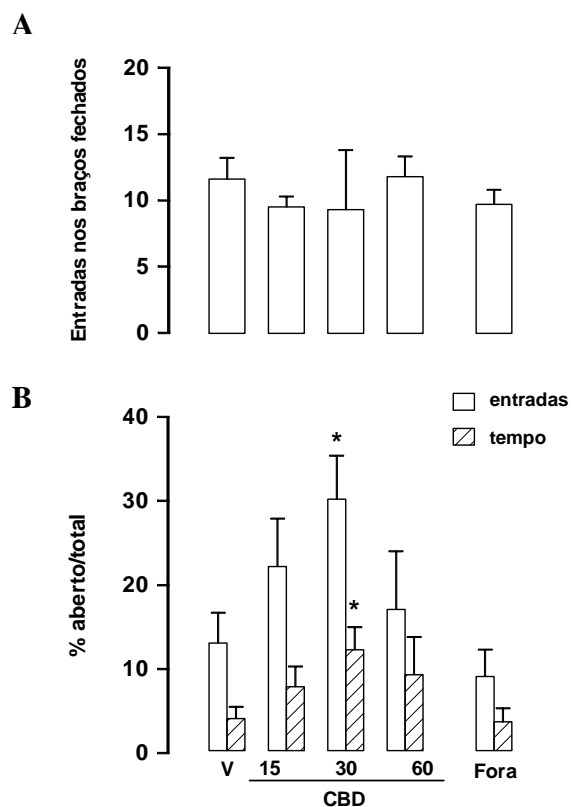


Fig. 4- Efeito do CBD em diferentes doses ou salina microinjetado na SCPdl de ratos submetidos ao LCE. A: Número de entradas nos braços fechados. B: Porcentagem de entradas nos braços abertos (colunas abertas) e porcentagem de tempo gasto nos braços abertos (colunas hachuradas). Os animais que receberam CBD fora da SCPdl foram agrupados no grupo denominado Fora. As barras representam média ± EPM. de 5 a 11 animais. * representa diferença estatística em relação ao grupo veículo (V) (ANOVA seguido de teste Duncan $p < 0,05$).

4.2.2- Efeitos da injeção prévia de AM251, antagonista de receptores CB1, sobre as alterações comportamentais induzidas pela injeção de CBD na SCPdl no LCE.

De forma similar ao experimento anterior, o CBD aumentou significativamente a percentagem de tempo gasto ($F_{(4,29)}=3,02$, $p=0,033$, Duncan, $p<0,05$) nos braços abertos do labirinto em cruz elevado em relação ao grupo controle e ao que recebeu as injeções fora da SCPdl. Não houve diferenças na percentagem de entradas nos braços abertos ($F_{(4,29)}=1,28$) ou no número de entradas nos braços fechados ($F_{(4,29)}=0,51$). O pré-tratamento com AM251, um antagonista de receptores CB1, na dose de 100 pmol, não foi capaz de prevenir o aparecimento do efeito do CBD (figura 5).

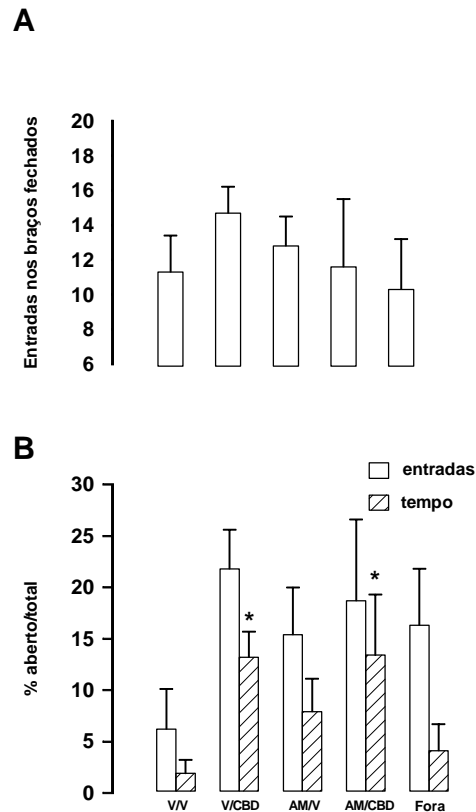


Fig. 5- Efeito do CBD 30 nmoles após pré-tratamento com AM251 na dose de 100 pmol. A: Número de entradas nos braços fechados. B: Porcentagem de entradas nos braços abertos (colunas abertas) e porcentagem de tempo gasto nos braços abertos (colunas hachuradas). Os animais que receberam CBD fora da SCPdl foram agrupados no grupo Fora. As barras representam média ± EPM. de 5 a 9 animais. * representa diferença estatística em relação ao grupo veiculo (V/V) (ANOVA, seguida de teste Duncan $p < 0,05$).

4.2.3- Efeitos da injeção prévia de WAY100635, antagonista de receptores 5HT1A, sobre as alterações comportamentais induzidas pela injeção de CBD na SCPdl no LCE.

O CBD aumentou a percentagem de entradas nos braços abertos do LCE em relação ao grupo controle ($F_{(4,24)} = 3,37, p = 0,043$), o que não ocorreu em relação à percentagem de tempo despendido nesses braços ($F_{(4,24)} = 0,98$). Nenhum efeito ocorreu em relação ao número de entradas nos braços fechados ($F_{(4,24)} = 0,5$). O pré-tratamento com WAY100635, um antagonista de receptores 5HT1A, na dose de 0,37nmol, preveniu o aparecimento do efeito do CBD (figura 6).

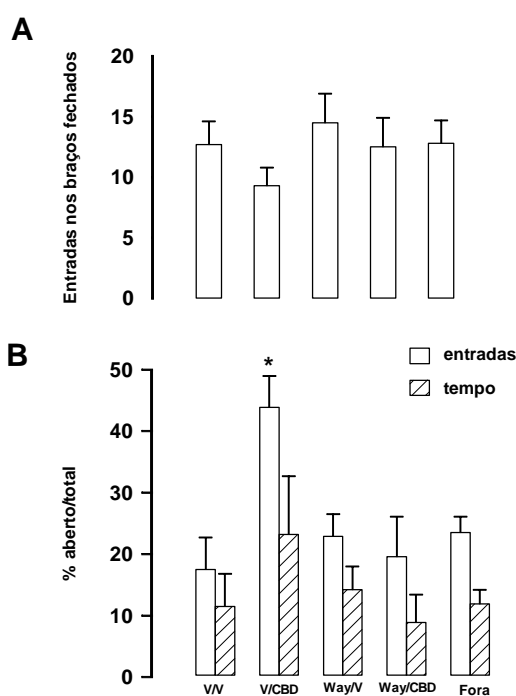


Fig.6- Efeito do CBD 30 nmoles após pré-tratamento com WAY 100635 na dose de 0,37 nmol. A: Número de entradas nos braços fechados. B: Porcentagem de entradas nos braços abertos (colunas abertas) e porcentagem de tempo gasto nos

braços abertos (colunas hachuradas). Os animais que receberam CBD fora da SCPdl foram agrupados no grupo Fora. As barras representam média± EPM. de 3 a 6 animais * representa diferença estatística em relação ao grupo veiculo (V/V) (ANOVA, seguido de teste Duncan $p < 0,05$).

4.2.4- Efeitos da injeção prévia de Capsazepina, antagonista de receptores TRPV1, sobre as alterações comportamentais induzidas pela injeção de CBD na SCPdl no LCE.

O pré-tratamento com capsazepina (10 nmol) não bloqueou o efeito ansiolítico do CBD na dose de 30 nmoles ($F_{(5,35)} = 3,8$, $p = 0,007$, Teste de Duncan, $p < 0,01$) injetado na SCPdl. No entanto, na presença de CPZ, a maior dose ineficaz de CBD (60 nmol) aumentou o numero de entradas nos braços abertos do LCE ($F_{(5,35)} = 3,8$, $p = 0,007$, Teste de Duncan, $p < 0,01$). Não houve diferença nas entradas nos braços fechados ($F_{(5,35)} = 1.9$, $p = 0,10$).

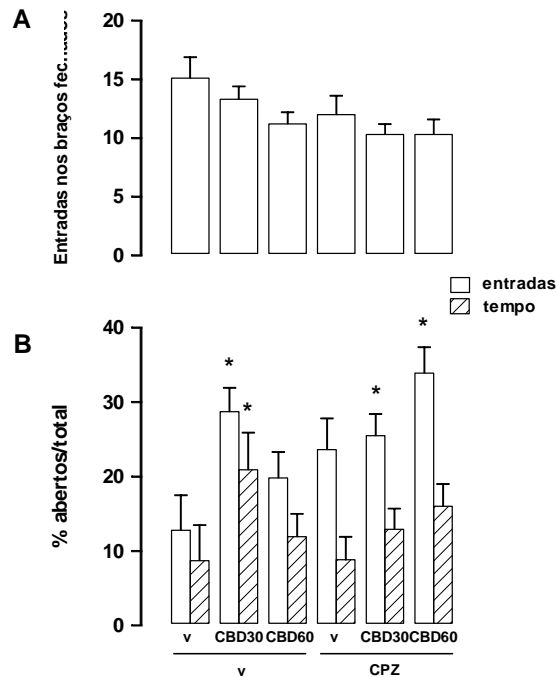


Fig. 7- Efeito do CBD nas doses de 30 e 60 nmoles após o pré-tratamento com veículo ou Capsazepina. A: Número de entradas nos braços fechados. B: Porcentagem de entradas nos braços abertos (colunas abertas) e porcentagem de tempo gasto nos braços abertos (colunas hachuradas). As barras representam média± EPM (n= 7-8). * representa diferença estatística em relação ao grupo v/v.

4.3- Experimento II: lamber punido de Vogel e Avaliação consumatória

O CBD na dose de 30 nmoles promoveu aumento significativo do número de lambidas punidas ($F_{(2,20)} = 7,35$, $p=0,004$) bem como do número de choques recebidos ($F_{(2,20)}=7,4$, $p= 0,004$) pelos animais quando comparado aos animais que receberam veículo, como pode ser observado na figura 5. Além disso, o CBD não foi capaz de alterar por si a capacidade de consumo de água (tabela 1).

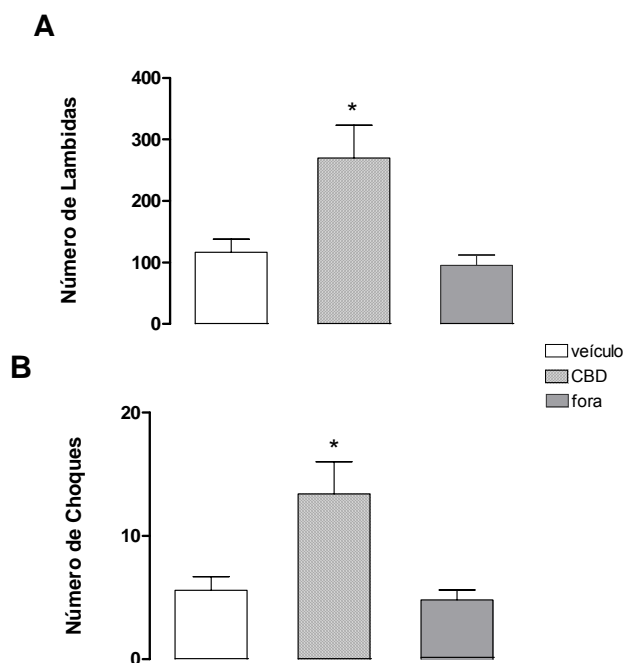


Fig.8- Efeito ansiolítico do CBD no modelo do lamber punido de Vogel. A: Número de lambidas punidas. B: número de choques recebidos. As barras representam Média \pm EPM de 7-8 animais. Barras abertas representam o grupo veiculo, as barras hachuradas o CBD 30nmoles, enquanto as barras cinza representam o grupo Fora, ou seja, animais que receberam CBD fora da SCPdl. * representa estatística em relação ao veiculo (ANOVA, $p < 0,05$).

Tabela 1- Avaliação do consumo de água. Resultados expressos em média \pm EPM do número de lambidas não punidas. Nenhuma diferença estatística foi encontrada entre os grupos veiculo e CBD 30nmoles (n= 5-7)

Avaliação do consumo de água (média \pm EPM do número de lambidas não punidas)	
Droga	
Veiculo	685,1 \pm 154,6
CBD (30nmoles)	612,9 \pm 92,9

4.4-Experimento III: teste da retirada da cauda

Para descartar a possibilidade de efeito falso positivo por efeito antinociceptivo no modelo de Vogel, a dose efetiva do CBD utilizada no Vogel foi testada em modelo de nocicepção, o modelo de retirada da cauda. Os resultados da avaliação nociceptiva foram transformados em índices de analgesia segundo a fórmula indicada na legenda do gráfico da figura 9. A ANOVA de medidas repetidas mostrou efeito significativo dos fatores tratamento ($F_{(2,14)}=108,4$, $p<0,001$), tempo ($F_{(6,84)}=19,21$, $p<0,001$), e interação tratamento X tempo ($F_{(12,84)}=25,07$, $p<0,001$). ANOVAs com medidas repetidas, realizadas em cada tempo mostraram que a morfina aumentou o IA em relação ao veículo e CBD nos tempos 10, 15, 20 e 25 minutos após a injeção ($F_{2,14}=34,0$ a $147,9$, $p<0,001$). Aos 15 min o CBD também produziu um pequeno, porém significativo, aumento no IA em relação ao veículo ($p<0,05$). No entanto, ao contrário do grupo que recebeu morfina ($F_{(6,30)}=119,7$, $p<0,001$), o CBD não aumentou o IA em relação à linha de base ($F_{(6,30)}=1,23$).

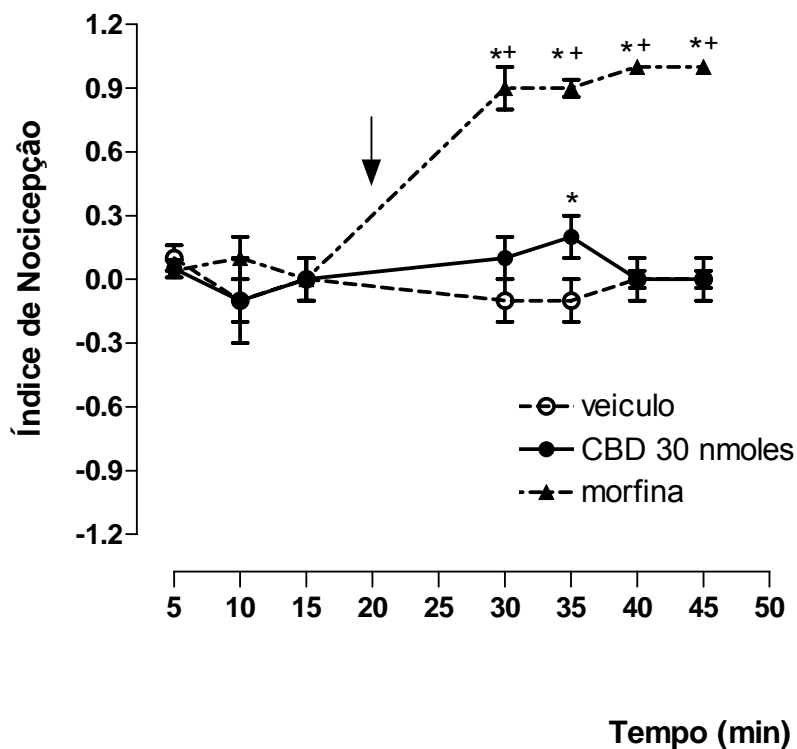


Fig.9- Efeito do CBD (30 nmol) microinjetado na SCPdl e morfina (5mg/Kg) i.p. em ratos submetidos ao teste de retirada da cauda. Os pontos representam as médias (+/- o E.P.M. de 5-6 animais) dos índices de analgesia (IA), calculado pela fórmula: $IA = (LT - LB) / (6 - LB)$, onde LB representa a linha basal e LT a latência para a retirada da cauda. * significa diferença em relação ao veiculo, + representa diferença em relação ao CBD. ($p < 0,05$). A seta indica o momento da injeção.

Discussão

5.0- DISCUSSÃO

Como visto na introdução, o CBD é um constituinte da *Cannabis sativa* que, ao contrário do Δ -9-THC, não possui atividade psicotomimética. (Mechoulam e Hanus, 2002). Quando injetado sistemicamente em roedores, exibe efeito do tipo ansiolítico em diversos modelos como o LCE, lambar punido de Vogel e no medo condicionado (Guimarães et al., 1991, Moreira et al., 2006, Musty et al., 1984, Resstel et al., 2006). Além disso, é capaz de atenuar a ansiedade em humanos no modelo de simulação de falar em público (Zuardi et al., 1993). No entanto, o substrato neural envolvido nestas respostas, bem como o mecanismo de ação envolvido neste efeito, permanece desconhecido.

Nossos resultados demonstraram que o CBD, na dose de 30 nmoles, aumentou a exploração dos braços abertos do LCE sem alterar o número de entradas nos braços fechados, indicando um efeito ansiolítico (Pellow and File, 1986). Confirmando este efeito, a mesma dose de CBD aumentou o número de lambidas punidas no teste de Vogel sem alterar o número de lambidas não punidas. Nesse teste, efeitos analgésicos poderiam interferir na interpretação dos resultados. No teste de retirada da cauda o CBD produziu um pequeno, porém significativo, aumento na latência de resposta, sugerindo efeito antinociceptivo. Contudo, esse efeito somente ocorreu 15 min após a administração da droga, sendo que no tempo semelhante ao empregado no teste de Vogel (10 min), não houve diferença em relação ao veículo. Além disso, a análise do grupo que recebeu CBD ou veículo mostrou que em nenhum dos dois grupos ocorreu variação significativa do índice de analgesia em relação à linha de base. No

conjunto, os resultados indicam que o CBD, injetado na SCPdl, produz efeito ansiolítico.

O CBD injetado na SCPdl produziu uma curva dose resposta em formato de U invertido, reproduzindo o aspecto da curva encontrada em experimentos com injeções sistêmicas desse mesmo composto no LCE (Guimarães et al., 1991). Este fenômeno é comumente observado em experimentos com canabinóides, nos quais a maior dose utilizada perde sua efetividade (Onaivi et al., 1990; Guimarães et al., 1991; Moreira et al., 2006). As razões para estas curvas dose-resposta em forma de U invertido não são conhecidas, mas podem estar relacionadas a múltiplos efeitos produzidos por estes compostos.

A anandamida, um endocanabinóide, quando injetada na SCPdl de ratos também exibiu perfil ansiolítico no LCE (Moreira et al., 2007). Bisogno et al. (2001) sugeriram que o CBD poderia facilitar a sinalização endocanabinóide por inibir a degradação dos endocanabinóides ao impedir sua captação ou inibir a FAAH, enzima responsável pela inativação da anandamida. Com o aumento da concentração dos endocanabinóides na fenda sináptica haveria uma facilitação de sua interação com os receptores CB1. No entanto, o AM251, um antagonista de receptores CB1, não foi capaz, na dose que bloqueou o efeito ansiolítico da anandamida (Moreira et al., 2007), de reverter o efeito ansiolítico do CBD. Isto sugere que esse último efeito não decorre, pelo menos na dose eficaz, de ativação de receptores CB1 ou da facilitação da neurotransmissão canabinóide.

Vários estudos têm demonstrado que os receptores 5HT1A localizados na SCP dorsal participam na regulação de comportamentos de esquiva e fuga (Beckett et al., 1992; Beckett et al., 1997, Nogueira et al., 1995). Como já citado na

introdução, o CBD poderia estar atuando via receptores 5HT1A (Mishima et al., 2005, Russo et al., 2005). Alguns trabalhos têm ainda sugerido uma possível participação do sistema serotoninérgico na modulação dos efeitos comportamentais de drogas que sabidamente atuam sobre o sistema canabinóide (Marco et al., 2004). Baseando-se nestes dados testamos a hipótese de que o WAY100635, um antagonista dos receptores 5HT1A, poderia inibir o aparecimento do efeito ansiolítico do CBD injetado na SCPdl de ratos.

Nossos dados demonstraram que a injeção prévia do antagonista de receptores 5HT1A na dose de 0,37 nmol (retirada de De Paula Soares e Zangrossi Jr., 2003) foi capaz de reverter o efeito ansiolítico do CBD na dose de 30 nmoles. Este resultado sugere que o CBD exerce seu efeito ansiolítico na SCPdl via receptores 5HT1A. Este efeito pode ser mediado tanto por uma atividade agonista do CBD em receptores serotoninérgicos do subtipo 1A (Russo et al., 2005) como por facilitação da liberação de serotonina (Bambico et al., 2007).

Diversos estudos sugerem que CBD e THC possuem efeitos antagônicos em vários sistemas. O THC, em doses elevadas, poderia estar aumentando a taxa de renovação de serotonina (Holtzman et al., 1969; Sofia et al. 1971; Krantz et al., 1971). Além disso, um estudo de 1978 sugeriu que 10mg/Kg de THC é capaz de diminuir a produção de 5HT em cérebros de camundongos (Johnson e Dewey, 1978). Desta forma o CBD poderia estar atuando de forma a elevar, por exemplo, a produção de serotonina na SCPdl.

Além disso, o CBD poderia atuar elevando as correntes de Cálcio intracelulares (Drysdale et al., 2005; Ryan et al., 2007), o que favoreceria a liberação de neurotransmissores, como por exemplo, a serotonina. Embora a

injeção direta de serotonina na SCP dorsal produza efeitos ansiogênicos (Zanoveli et al., 2003), a injeção de agonistas dos receptores 5HT1A nesta mesma estrutura produz efeitos ansiolíticos (Beckett et al., 1998, De Paula Soares e Zangrossi, 2004, Zanoveli et al., 2003) o que nos levaria a concluir que o efeito do CBD na SCPdl parece realmente ser mediada pela ativação dos receptores 5HT1A presentes na SCPdl.

Uma outra possibilidade seria a ação agonista do CBD sobre os receptores TRPV1 (Bisogno et al., 2001), que são canais de cálcio regulados por ligantes. São expressos de maneira significativa em neurônios pré-sinápticos na SCPdl (Mezey et al., 2000; Xing e Li, 2006), de onde parecem regular a liberação de glutamato (Palazzo et al., 2002, Xing e Li, 2006). O glutamato é o mais importante neurotransmissor excitatório presente no sistema nervoso central. Desta forma, a facilitação da neurotransmissão glutamatérgica poderia facilitar efeitos ansiogênicos. Corroborando com essa possibilidade, foi verificado que antagonistas de receptores glutamatérgicos produzem efeitos ansiolíticos quando injetados na SCPdl (Guimarães et al., 1991).

Tendo por base tais evidências, a ativação de receptores vanilóides na SCPdl por altas doses de CBD poderia estar aumentando a liberação de glutamato nesta estrutura. Isso poderia explicar o desaparecimento do efeito ansiolítico do CBD e explicaria ainda o porquê de curvas dose-respostas em U invertido encontradas após administração sistêmica ou central desta droga.

Desta forma, nós testamos se o CBD na dose de 60 nmoles, que fora ineficaz em atenuar os comportamentos correlacionados a ansiedade no LCE, poderia estar atuando de maneira dual em receptores 5HT1A e TRPV1. Como descrito

anteriormente, a CPZ não atenuou o efeito ansiolítico do CBD na dose de 30nmol e também não produziu efeito ansiolítico na dose testada, embora uma tendência estatística seja observada. Todavia, a injeção prévia de CPZ tornou ansiolítica a dose de 60nmol que por si só não promovia tal efeito. Isso sugere que, nessa dose, o CBD poderia estar ativando tanto receptores 5HT1A quanto TRPV1, com a ativação dos segundos impedindo o aparecimento dos efeitos ansiolíticos produzidos pelos primeiros.

Os dados apresentados neste trabalho contribuem para o entendimento dos possíveis sítios cerebrais envolvidos nos efeitos sistêmicos do CBD, sugerindo a participação da SCPdl. No entanto, nossos achados não afastam que outras áreas cerebrais relacionadas ao controle e à expressão de comportamentos defensivos, como a amígdala, córtex pré-frontal medial e o hipotálamo, também estejam envolvidos nestes efeitos. Novos experimentos precisam ser realizados para testar esta possibilidade.

No que se refere ao mecanismo de ação do efeito ansiolítico deste fitocanabinoide, experimentos complementares são ainda necessários para afastar a participação de outros receptores serotoninérgicos (5HT2A) ou ainda de outros sistemas que têm sido relacionados com os efeitos ansiolíticos do CBD, como por exemplo, o adenosinérgico (Carrier et al., 2006; Sagredo et al., 2007).

Conclusões

6.0- CONCLUSÕES

Os resultados apresentados no presente trabalho nos permitem concluir que:

- O CBD injetado na SCPdl produz efeito ansiolítico em dois modelos de ansiedade, o LCE e o Lamber punido de Vogel;
- Os efeitos ansiolíticos do CBD na SCPdl parecem ser promovidos pela facilitação da neurotransmissão mediados por receptores 5HT1A;
- A ativação dual de receptores TRPV1 na SCPdl por altas doses de CBD parece explicar as curvas doses respostas em U invertido observadas com esta droga.

Referências Bibliográficas

7.0- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAMBICO, F.C. et al. Cannabinoids elicit antidepressant-like effects behavior and activate serotonergic neurons through the medial prefrontal cortex. *J. of Neurosci*, 27 (43): 11700-11711, 2007.

BANDLER, R. & SHIPLEY, M.T.: Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray: modules for emotional expression? *Trends Neurosci.*,17:379-389, 1994.

BANDLER, R. et al. Central circuits mediating patterned autonomic activity during active vs. passive emotional coping, *Brain Res Bull*, 53 95-104, 2000.

BARILI, P., DE CAROLIS, G., ZACCHEO, D. E AMENTA, F. Sensitivity to ageing of the limbic dopaminergic system: a review. *Mech Ageing Dev*, 106(1-2)57-92, 1998.

BANDLER, R., CARRIVE, P.: Integrated defence reaction elicited by excitatory amino acid microinjection in the midbrain periaqueductal gray region of the unrestrained cat. *Brain Res.*, 439:95-106, 1988.

BECKETT, S. e MARSDEN, C. A. The effect of central and systemic injection of the 5-HT_{1A} receptor agonist 8-OHDPAT and the 5-HT_{1A} receptor antagonist WAY100635 on periaqueductal grey-induced defence behaviour. *J Psychopharmacol.*,11(1),35-40, 1997.

BECKETT, S. R., LAWRENCE, A. J., MARSDEN, C. A. E MARSHALL, P. W. Attenuation of chemically induced defence response by 5-HT₁ receptor agonists administered into the periaqueductal gray. *Psychopharmacology (Berl)*,108(1-2),110-4, 1992.

BISOGNO, T et al. Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide, *Br J Pharmacol*, 134 845-52, 2001.

BLUMSTEIN, L. K. E CRAWLEY, J. N. Further characterization of a simple, automated exploratory model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behav*, v.18, n.1, Jan, p.37-40. 1983.

BORNHEIM, L. M. and CORREIA, M.A.: Effect of cannabidiol on cytochrome P-450 isozymes. *Biochem. Pharmacol.* 38,02789-94, 1989.

BRANDAO, M.L, et al. Neural substrates of defensive behavior in the midbrain tectum. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 18, 339-346, 1994.

CARRIER, E.J., AUCHAMPACH, J.A. AND HILLARD, C.J., Inhibition of an equilibrative nucleoside transporter by cannabidiol: a mechanism of cannabinoid immunosuppression, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103 7895-900, 2006.

CASTILHO, V. M., MACEDO, C. E. E BRANDAO, M. L. Role of benzodiazepine and serotonergic mechanisms in conditioned freezing and antinociception using electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray as unconditioned stimulus in rats. *Psychopharmacology (Berl)*,165(1),77-85, 2002.

COLASANTI, B.K., BROWN, R.E. AND CRAIG, C.R., Ocular hypotension, ocular toxicity, and neurotoxicity in response to marijuana extract and cannabidiol, *Gen Pharmacol*, 15 (1984) 479-84.

CUNHA, J.M. et al. Chronic administration of cannabidiol to health volunteers and epileptic patients. *Pharmacology*, 21(3): 175-85, 1980.

DE PAULA SOARES, V. E ZANGROSSI, H., JR. Involvement of 5-HT_{1A} and 5-HT₂ receptors of the dorsal periaqueductal gray in the regulation of the defensive behaviors generated by the elevated T-maze. *Brain Res Bull*,64(2),181-8, 2004.

DEVANE, W.A., et al. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoids receptor. *Science* 258:1946-9, 1992.

Diagnostic and statistical Manual- Text Revision (DSM-IV-TR). American Psychiatric Association, Washington, DC, 2000

DRYSDALE, A. J. Et al. Cannabidiol-induced intracellular Ca²⁺ elevations in hippocampal cells. *Neuropharmacology*,50(5),621-31, 2006.

FERNADEZ de MOLINA, A. e HUNSPERGER, R.W.: Central representation of affective reaction in forebrain and brain stem: electrical stimulation of amígdala, stria terminalis and adjacent structures. *J. Physiol.*, 145:251-265, 1956.

GELLER, I., KULAK, J. T., JR. e SEIFTER, J. The effects of chlordiazepoxide and chlorpromazine on a punishment discrimination. *Psychopharmacologia*, 3: 374-85, 1962.

GRAEFF, F.G. Ansiedade. In: GRAEFF, F.G., BRANDÃO, M.L. Neurobiologia das doenças mentais. 5^a Ed. São Paulo: Lemos, p135-178, 1999.

GRAEFF, F.G.: Brain defenses and anxiety. In :M. Roth, G.D. burrows & R. Noyes. (eds). Handbook of anxiety, Amsterdam, *Elsevier Science Publisher*, 1990;3:307-354, 1990.

GRAEFF, F.G.: role of 5HT in the defensive behavior end anxiety. *Rev. Neurosci.*, 4:181-211, 1993.

GRAY, J. A. The neuropsychology of the emotions and personality structure].
Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova, 37(6)1011-24, 1987.

GRLIE, L: A comparative study on some chemical and biological characteristics
of various samples of cannabis resin. *Bull. Narcot.* 14:37-46, 1976.

GUIMARAES F.S et al. Anxiolytic effect in the elevated plus-maze of the
NMDA receptor antagonist AP7 microinjected into the dorsal periaqueductal
grey. *Psychopharmacology*. 103: 91-94, 1991.

GUIMARÃES, F.S., et al. Antianxiety effects of cannabidiol in the elevated plus
maze. *Psychopharmacology* 100:558-9,1990.

HAMPSON, A.J. et al.: Cannabidiol and delta-9- tetrahydrocannabinol are
neuroprotective antioxidants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95(14): 8268-73, 1998.

HANDLEY, S. L. e MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and
antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. *Naunyn
Schmiedebergs Arch Pharmacol*, v.327, n.1, Aug, p.1-5. 1984.

HANLEY, N.R. e VAN DE KAR, L.D., Serotonin and the neuroendocrine
regulation of the hypothalamic--pituitary-adrenal axis in health and disease,
Vitam Horm, 66 189-255, 2003.

HERKENHAM, M. et al. Characterization and localization of cannabinoids
receptor in the brain; a quantitative in vitro autoradiograph study. *J. of
Neuroscience* 11:563-83, 1991.

HERSHKOWITZ, M.: The effect of *in vivo* treatment with (-)delta 1-
tetrahydrocannabinol, and the psychoactive drugs on the in vivo uptake of
biogenic amines. *Adv. Biosci.* 22-23:351-8, 1978.

HOHMANN, A.G. et al. An endocannabinoid mechanism for stress-induced analgesia. *Nature*, 435, 1108-1112, 2005.

HOLTZMAN, D. et al. 1-delta9-tetrahydrocannabinol: neurochemical and behavioral effects in the mouse. *Science*, 163(874), 1464-7, 1969.

JARAI, Z. et al.: Cannabinoid-induced mesenteric vasodilatation through an endothelial site distinct from CB1 or CB2 receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 96(24): 14136-41, 1999.

JOHNSON, K. M. E DEWEY, W. L. The effect of delta9-tetrahydrocannabinol on the conversion of [3H]tryptophan to 5-[3H] hydroxytryptamine in the mouse brain. *J Pharmacol Exp Ther*, 207(1), 140-50, 1978.

KARNIOL, I. G.; CARLINI, E.A.: Pharmacological interaction between cannabidiol and delta-9 tetrahydrocannabinol in man. *Eur. J. Pharmacol.* 28:172-7, 1974.

KRANTZ, J. C., JR., BERGER, H. J. E WELCH, B. L. Blockade of (-)-trans- 9 - tetrahydrocannabinol depressant effect by cannabidiol in mice. *Am J Pharm Sci Support Public Health*, 143(5), 149-52, 1971.

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

LOVICK, T.A.: Serotonergic influence from nucleus raphe obscurus on neurones in the periaqueductal gray matter in the rat. *Brain Res.*, 606:92-98, 1993.

MACLEAN, P. D. Psychosomatic disease and the visceral brain; recent developments bearing on the Papez theory of emotion. *Psychosom Med*, 11(6):338-53, 1949.

MACLEAN, P. D. Some psychiatric implications of physiological studies on frontotemporal portion of limbic system (visceral brain). *Electroencephalogram Clin Neurophysiol Suppl*, .4(4)407-18, 1952.

MARCO, E. M., et al. Involvement of 5-HT1A receptors in behavioural effects of the cannabinoid receptor agonist CP 55,940 in male rats. *Behav Pharmacol*,15(1),21-7, 2004.

MATHEUS M.G., et al. Anxiolytic effect of glycine antagonists microinjected into the dorsal periaqueductal grey. *Psychopharmacology*. 113: 565-569, 1994.

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

MCNAUGHTON, N. E GRAY, J. A. Anxiolytic action on the behavioural inhibition system implies multiple types of arousal contribute to anxiety. *J Affect Disord*, 61(3)161-76, 2000.

MCQUEEN, D.S. et al.: Cannabinoids lacks the vanilloid VR1-mediates vaso-respiratory effects of capsaicin and anandamide in anaesthetised rats. *Eur. J. Pharmacol*. 491(2-3):181-9, 2004.

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

MECHOULAM, R., HANUS, L.: Cannabidiol: an overview of some chemical and pharmacological aspects. Part I. chemical aspects. *Chem Phys Lipids* 35-43, 2002.

MEZEY, E. et al. Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human. *Proc Natl Acad Sci U S A*,97(7),3655-60, 2000.

MISHIMA, K., et al. Cannabidiol prevents cerebral infarction via a serotonergic 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor-dependent mechanism. *Stroke*,36(5),1077-82, 2005.

MOLCHANOV M.L, GUIMARÃES .FS. Anxiolytic-like effects of AP7 injected into the dorsolateral or ventrolateral columns of the periaqueductal gray of rats. *Psychopharmacology*, 160: 30-38, 2002.

MONTI, J.M., Hypnotic-like effects of cannabidiol in the rat, *Psychopharmacology (Berl)*, 55 263-5, 1977.

MOREIRA, F. A., AGUIAR, D. C. E GUIMARAES, F. S. Anxiolytic-like effect of cannabinoids injected into the rat dorsolateral periaqueductal gray. *Neuropharmacology*,52(3),958-65, 2007.

MOREIRA, F. A., AGUIAR, D. C. E GUIMARAES, F. S. Anxiolytic-like effect of cannabidiol in the rat Vogel conflict test. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 30(8),1466-71, 2006.

MOREIRA, F.A., GUIMARÃES, F.S.: Cannabidiol inhibits hyperlocomotion induced by psychotomimetic drugs in mice. *Eur. J. Pharmacol* , 512(2-3);199-205, 2005.

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

MUNRO, S., THOMAS, K.L. AND ABU-SHAAR, M., Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, 365 61-5, 1993.

MUSTY, R. E., CONTI, L.H., MECHOULAM, R. Anxiolytic properties of cannabidiol. *Marihuana 84: Proceedings of the Oxford Symposium on Cannabis. Press*, 713-719, 1984.

MUSTY, R: Possible anxiolytic effects of cannabidiol. The cannabinoids: Chemical, pharmacological and Therapeutic Aspects. *Academic press*, 795-813,1984.

NOGUEIRA, R. L. E GRAEFF, F. G. Role of 5-HT receptor subtypes in the modulation of dorsal periaqueductal gray generated aversion. *Pharmacol Biochem Behav*,52(1),1-6, 1995.

ODDIE, S. D., et al. Hippocampal formation is involved in movement selection: evidence from medial septal cholinergic modulation and concurrent slow-wave (theta rhythm) recording. *Behav Brain Res* , 88(2),169-80, 1997.

ONAVI, E.S., GREEN, M.R. e MARTIN, B.R.: Pharmacological characterization of cannabinoids in the elevated plus maze. *J. Pharmacol. Exp Ther.* 253:1002-9, 1990.

Palazzo, E. et al. Interaction between vanilloid and glutamate receptors in the central modulation of nociception, *Eur J Pharmacol*, 439 69-75, 2002.

- PAN, W.X. AND MCNAUGHTON, N., The role of the medial supramammillary nucleus in the control of hippocampal theta activity and behaviour in rats, *Eur J Neurosci*, 16 1797-809, 2002.
- PAVLOV, I.. Lectures on Conditioned Reflexes. International Publishers, 1928.
- PAXINOS G., WATSON C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 3 ed. New York, Academic Press, 1997.
- PELLOW, S. E FILE, S. E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav*, v.24, n.3, Mar, p.525-9. 1986.
- PERTWEE, R.G.: Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptor. *Pharmacol. Ther.*, 74:129-80, 1997.
- PERTWEE, R.G.: The pharmacological and therapeutic potential of cannabidiol. In: DiMarzo V., editor. Cannabinoids. Dordrecht (Nederherlands): *Kluwer Academic Publishers*, 2004.
- PISTIS, M et al. Cannabinoids modulate neuronal firing in the basolateral amígdala: evidence for CB1-and non-CB1-mediated actions. *Neuropharmacol.*, 46:115-25, 2004.
- RAKHSHAN, et al. Carrier-mediated uptakes of the endogenous cannabinoids anandamide in RBL-2H3 cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther*, 292:960-7, 2000.
- RESSTEL, L. B et al. Effects of cannabidiol and diazepam on behavioral and cardiovascular responses induced by contextual conditioned fear in rats. *Behav Brain Res*,172(2),294-8, 2006.
- RUSSO, E.B et al. Agonistic properties of Cannabidiol at 5HT1a receptors. *Neurochemical Research* 30(8):1037-43, 2005.

RYAN, D., et al. Interactions of cannabidiol with endocannabinoid signalling in hippocampal tissue. *Eur J Neurosci*,25(7),2093-102, 2007.

SAGREDO, O. et al. Cannabidiol reduced the striatal atrophy caused by 3-nitropropionic acid in vivo by mechanisms independent of the activation of cannabinoid, vanilloid TRPV1 and adenosine A2A receptors, *Eur J Neurosci*, 26 843-51, 2007.

SHOOK, J.E., BURKS, T.F: Psychoactive cannabinoids reduce gastrointestinal propulsion and motility in rodents. *J. Pharmacol. Exp. Ther*, 249920: 444:9, 1989.

SOFIA, R. D et al.. The effect of 1-tetrahydrocannabinol on the uptake of serotonin by rat brain homogenates. *Eur J Pharmacol*,16(2),257-9, 1971.

SOFIA, R. D., DIXIT, B. N. E BARRY, H., 3RD. The effect of delta-1-tetrahydrocannabinol on serotonin metabolism in the rat brain. *Life Sci* I,10(8),425-36, 1971.

THOMAS, A. et al. Cannabidiol displays unexpectedly high potency as an antagonist of CB1 and CB2 receptor agonists in vitro. *Br J Pharmacol*,150(5),613-23, 2007.

TSOU, K et al. Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the central nervous system. *Neuroscience*, 83:393-411, 1998.

VERTES, R. P. PHA-L analysis of projections from the supramammillary nucleus in the rat. *J Comp Neurol*,326(4),595-622, 1992.

VIANA, M. B., TOMAZ, C. E GRAEFF, F. G. The elevated T-maze: a new animal model of anxiety and memory. *Pharmacol Biochem Behav*, v.49, n.3, Nov, p.549-54. 1994.

VOGEL, J.R., BEER, B., CLODY, D.E. A simple and reliable conflict procedure for testing anti-anxiety agents. *Psychopharmacologia*, 21(1): 1-7, 1971.

WATANABE, K et al., Inhibition of anandamide amidase activity in mouse brain microsomes by cannabinoids. *Biol. Pharm. Bull.*, 19:1109-11, 1996.

WATZI, B., et al.: Marijuana components stimulate human peripheral blood mononuclear cell secretion of interferon-gamma and suppress interleukin-1 alpha in vitro. *Int. J. Immunopharmacol.* 13(8):1091-7, 1991

WIRTSHAFTER, D., STRATFORD, T. R. E SHIM, I. Placement in a novel environment induces fos-like immunoreactivity in supramammillary cells projecting to the hippocampus and midbrain. *Brain Res*,789(2),331-4, 1998.

XING, J. E LI, J. TRPV1 receptor mediates glutamatergic synaptic input to dorsolateral periaqueductal gray (dl-PAG) neurons. *J Neurophysiol*,97(1),503-11, 2007.

YADIN, E et al.. The role of the lateral septum in anxiolysis. *Physiol Behav*,53(6),1077-83, 1993.

ZANOVELI, J.M., NOGUEIRA, R.L. AND ZANGROSSI, H., JR., Serotonin in the dorsal periaqueductal gray modulates inhibitory avoidance and one-way escape behaviors in the elevated T-maze, *Eur J Pharmacol*, 473 153-61, 2003.

ZUARDI , A. W., TEIXEIRA, N.A., KARNIOL, I.G.: Pharmacological effects of the delta-9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol on serum corticosterone levels in rats. *Arch. Int. Pharmacodyn.* 269:12-19,1984.

ZUARDI, A. W et al. Characteristics of the stimulus produced by the mixture of cannabidiol with delta-9-tetrahydrocannabinol. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 249(1):137- 137-46, 1981.

ZUARDI, A. W., ANTUNES-RODRIGUES, J. E CUNHA, J.M.: Effects of isaspirone and canabidiol on human experimental anxiety. *J. psychopharmacol.*7:82-8,1993.

ZUARDI, A. W.; KARNIOL, I.G.: Effects on variable-interval performance in rats of delta-9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol, separately and in combination. *Braz.J. Med. Biol. Res.*: 16(2):141, 1983.

ZUARDI, A.W. et al. Antipsychotic effects of cannabidiol. *Clin. Psychiatry*, 56(10): 485-6, 1995.

ZUARDI, A. W. ; SHIRAKAWA, I. ; FINKELFARB, E. ; KARNIOL, I. G. . Action Of Cannabidiol On The Anxiety And Other Effects Produced By Delta-9-Thc In Normal Subjects. *Psychopharmacology, Berlim*, v. 249, n. 76, p. 245-250,1982.

ZUARDI, A. W. ; GUIMARAES, F. S. ; MOREIRA, A. C. . Effect Of Cannabidiol On Plasma Prolactin, Growth Hormone And Cortisolin Human Volunteers. *Brazilian journal of medicine and biological research, Brasil*, v.26,p.213-217,1993.

ZUARDI, A. W. ; CRIPPA, J A S ; HALLAK, J e C ; MOREIRA, F A ; GUIMARÃES, F S. Cannabidiol, a Cannabis sativa constituent, as an antipsychotic drug. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 39, p. 421-429, 2006.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)