

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

**Participação de receptores CB1 da substância
cinzenta periaquedutal dorsolateral de ratos na modulação
de respostas defensivas**

SABRINA F. DE S. LISBOA

Ribeirão Preto

2008

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

SABRINA FRANCESCA DE SOUZA LISBOA

**Participação de receptores CB1 da substância
cinzenta periaquedutal dorsolateral de ratos na modulação
de respostas defensivas**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências,
Área de Concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Francisco Silveira Guimarães

Ribeirão Preto

2008

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca Central do Campus Administrativo de
Ribeirão Preto/USP

Lisboa, Sabrina Francesca de Souza

Participação de receptores CB1 da substância cinzenta periaquedutal dorsolateral de ratos na modulação de respostas defensivas/ Sabrina F. de S. Lisboa; orientador: Francisco Silveira Guimarães. – Ribeirão Preto, 2008.

68p.

Dissertação (Mestrado em Ciências – Área de Concentração: Farmacologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

1.Sistema endocanabinóide. 2. Respostas defensivas. 3.Substância cinzenta periaquedutal.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Sabrina Francesca de Souza Lisboa

Participação de receptores CB1 da substância cinzenta periaquedutal dorsolateral na modulação de respostas defensivas

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
Para obtenção do título de Mestre em Ciências,
Área de concentração: Farmacologia

Aprovado em: ____ / ____ / 2008

Banca examinadora

Prof. Dr.: Francisco Silveira Guimarães

Instituição: FMRP – USP

Assinatura: _____

Prof. Dr.: Fernando Morgan de Aguiar Côrrea

Instituição: FMRP – USP

Assinatura: _____

Prof. Dr.: Jorge Alberto Quillfeldt

Instituição: UFRGS

Assinatura: _____

*Aos meus pais, Ismael e Irani, e
aos meus irmãos, Fabiano e
Adriano, que sempre acreditaram em
mim e me apoiaram, dedico este
trabalho.*

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Francisco Silveira Guimarães por ter me acolhido em seu laboratório, por ser exemplo de pesquisador, orientador e, acima de tudo, de pessoa. Agradeço por ter contribuído de forma presente e dedicada em minha formação científica e pessoal e por sua amizade.

Ao professor da banca examinadora, Dr. Fernando Morgan de A. Corrêa, pela sua participação na banca e colaboração em uma parte dos experimentos deste trabalho.

Ao professor da banca examinadora, Dr. Jorge A. Quillfeldt, pela sua participação na banca.

À Profa. Dra. Estefânia Gastaldello Moreira, minha ex-orientadora e amiga, por ter me dado a oportunidade de iniciar minha carreira científica e acadêmica, por compartilhar tantos bons momentos comigo, pela amizade, por ser exemplo de mulher e pesquisadora.

Aos meus queridos amigos Dani e Léo pela amizade durante esses anos de convívio e por terem me ajudado “intelecto e experimentalmente” durante meu mestrado para que conseguisse terminá-lo.

Ao Léo, por ter me dado tantas idéias, por ter me ajudado a fazer os experimentos, por ter me ajudado na elaboração do projeto de doutorado, por ser meu amigo e companheiro de experimentos.

À Dani, pela amizade e companheirismo, por me ouvir quando precisei, por ter se tornado minha prima, por me ajudar com aulas, projetos e apresentações.

À Sã, pela amizade, pelos “papos-cabeça” que me ajudaram muito a crescer tanto pessoal quanto profissionalmente, pelas dicas e idéias para o doutorado.

Ao meu namorado Vinícius por fazer parte da minha vida, por sua amizade, amor, compreensão e companheirismo incondicionais durante todo o tempo em que estivemos juntos.

Aos amigos e companheiros de laboratório e também de assuntos extra-laboratoriais, Ana, Carol, Dani, Laura, Sã, Léo, Zé Carlos, Fred e Plínio, muito obrigada pela amizade,

companheirismo e compreensão em momentos “tensos”, pelos momentos de bobearias, muitas risadas e descontração que fizeram com que a vida dentro e fora do laboratório tivesse mais sentido e fosse mais divertida.

Aos amigos do laboratório de Dor pela amizade, conversas fiadas, momentos de diversão, mas também assuntos sérios, obrigada por terem tornado mais fácil (nem sempre) momentos de tensão e por terem compartilhado bons momentos.

Aos amigos do laboratório de Controle central da pressão arterial pela amizade, pelas reuniões de “discussões científicas” às quartas-feiras à noite e pela convivência no departamento no dia-dia.

Aos meus amigos da fisiologia, a “Trupe do Cursão”, por tantos momentos divertidos e tantos “bafões”, obrigada por terem sido uma “grande família.

Às minhas queridas “prencesas”, companheiras de república, amigas, pela ótima convivência em casa, pelas risadas e baladas.

Aos técnicos José Carlos de Aguiar, Ivanilda A.C. Fortunato e Afonso Paulo Padovan pela ajuda técnica e amizade.

Aos secretários de departamento, Ramón, Sônia e Fátima pelo auxílio e colaboração necessária nesses anos de convívio.

Às funcionárias do biotério, Eliane e Inês, pelo cuidado com os animais.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Se fazer fosse tão fácil quanto saber o que seria bom fazer, as capelas seriam igrejas, e as choupanas dos pobres, palácios de príncipes.

William Shakespeare

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Ansiedade e seus substratos neurais	17
1.2 O sistema canabinóide	19
1.3 Os canabinóides e a modulação do comportamento: participação da SCP	23
2 OBJETIVOS	27
3 MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1 Animais	29
3.2 Cirurgia estereotáxica	29
3.3 Drogas	30
3.4 Injeção de drogas	30
3.5 Procedimento experimental	33
Experimento I:	33
3.5.1 Teste do lambert punido ou de Vogel	33
3.5.2 Avaliação do consumo de água	34
3.5.3 Teste de retirada da cauda (Avaliação nociceptiva)	34
Experimento II:	34
3.5.4 Canulação da artéria femoral e registro da pressão arterial	34
3.5.5 Parâmetros do condicionamento e aquisição dos dados	35
3.6 Perfusão, remoção dos encéfalos e análise histológica	36
3.7 Análise dos dados	36
4 RESULTADOS	39
4.1 Localização do sítio de injeção	39
4.2 Experimento I	40
4.3 Experimento II	45
4.3.1 Respostas comportamentais	45

4.3.2 Respostas cardiovasculares	45
5 DISCUSSÃO	51
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
ANEXOS	



A substância cinzenta periaquedutal dorsolateral (SCPdl) é uma estrutura mesencefálica que circunda o aqueduto cerebral e está envolvida na modulação de comportamentos como dor e analgesia, medo e ansiedade, além de participar no controle cardiovascular. A ativação de receptores CB1 nesse local pela administração de anandamida (AEA) produziu efeitos ansiolíticos em ratos submetidos ao labirinto em cruz elevado. O objetivo deste trabalho foi o de verificar se a administração de AEA na SCPdl também poderia produzir efeitos ansiolíticos em dois outros modelos animais, o teste de conflito de Vogel e o medo condicionado ao contexto. Também verificamos se estes efeitos seriam reproduzidos pela facilitação local da neurotransmissão mediada por endocanabinóides e se eles seriam mediados por ativação de receptores CB1. Ratos Wistar machos (n=5-7) com cânulas direcionadas à SCPdl receberam uma primeira microinjeção de veículo ou AM251 (antagonista de receptores CB1, 100 pmol/0,2 µL) seguida, 5 min após, por uma segunda microinjeção de veículo, AEA (5 pmol/ 0,2 µL) ou AM404 (inibidor de metabolismo e recaptação da AEA, 50 pmol/0,2 µL). No modelo de medo condicionado ao contexto foram avaliadas as respostas comportamentais (congelamento) e cardiovascular (pressão arterial média e frequência cardíaca) de animais re-expostos a um contexto no qual haviam recebido 48 h antes choques elétricos nas patas. No teste de Vogel os animais foram privados de água por 24 h e pré-expostos ao aparato onde poderiam beber livremente por 3 min. Após 24 h adicionais de privação, eles receberam os tratamentos farmacológicos e após 10 min foram colocados na caixa de experimentação. Nessa caixa eles recebiam um choque elétrico na língua através do bico do bebedouro a cada 20 lambidas. No teste de Vogel, a AEA e o AM404 aumentaram o número total de lambidas punidas. Este efeito foi bloqueado pelo antagonista de receptores CB1, AM251. No condicionamento aversivo ao contexto, a AEA e o AM404 reduziram o tempo de congelamento e as respostas cardiovasculares causadas pela exposição ao contexto aversivo. Estes efeitos também foram bloqueados por AM251. Essa

droga, por si só, não produziu nenhum efeito nos dois modelos. Estes resultados sugerem que o sistema canabinoide endógeno localizado na SCPdl participa da modulação de reações defensivas.



Abstract

The dorsolateral periaqueductal gray (dlPAG) is a midbrain region that surrounds the cerebral aqueduct and participates in the modulation of behaviors as pain and analgesia, fear and anxiety, besides participation in cardiovascular control. The activation of CB1 receptors by the administration of the endocannabinoid anandamide (AEA) into this structure induces anxiolytic-like effects in the elevated plus-maze. The aim of this work was to verify if AEA microinjection into the dlPAG would also evoke anxiolytic-like effects in two other models of anxiety, contextual fear conditioning and Vogel conflict test. We also verified if AEA effects could be replicated by facilitation of local endocannabinoid neurotransmission and if they depend on activation of CB1 receptors. Male Wistar rats (n=5-7) with cannulas aimed at the dlPAG were used. The animals received a first microinjection of vehicle or AM251 (CB1-antagonist; 100 pmol/0,2 µL) into the dlPAG followed, 5 min later, by a second microinjection of vehicle, AEA (5 pmol/ 0,2 µL) or AM404 (an inhibitor of AEA metabolism and uptake, 50 pmol/0,2 µL). Behavioral activity (freezing) and cardiovascular response (mean arterial pressure and heart rate) of rats re-exposed to a context where they had received 48 h before electrical foot shocks were evaluated 10 min after the last injection. In the Vogel test the animals were water deprived for 24 hours and pre-exposed to the apparatus where they were allowed to drink for 3 min. After another 24 hours of water deprivation, they received the microinjections and after 10 min were placed into experimental box. In the box they received an electrical shock in the spout of a drinking bottle at every twenty licks. In the Vogel test, AEA and AM404 increased the total number of punished licks. In conditioned animals, AEA and AM404 reduced freezing duration and cardiovascular responses caused by aversive context re-exposure. These effects were blocked by pre-administration of AM251. AM251, by itself, had no effects in any test. These results suggest that endogenous cannabinoid system in the dlPAG can modulate defensive responses.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Ansiedade e seus substratos neurais

O comportamento defensivo é uma reação do organismo a perigos reais ou potenciais. Essa reação é específica para diferentes situações de perigo e pode variar, de acordo com a intensidade do estímulo, de respostas sutis, como avaliação de risco frente a perigos potenciais até a uma resposta de pânico frente ao ataque de um predador (Blanchard *et al.*, 1986; Carobrez, 2003).

Segundo a definição clássica do psiquiatra Aubrey Lewis, a ansiedade humana é um “estado emocional vivenciado com a qualidade subjetiva de medo, desagradável, dirigido para o futuro, desproporcional a uma ameaça reconhecida, com desconforto somático subjetivo e de alterações somáticas manifestas” (citado em Gentil, 1994). A ansiedade pode ser considerada como emoção essencial dentro do repertório afetivo do ser humano, na medida em que contribui para a execução de tarefas motoras e cognitivas (Graeff, 1993). Assim, caracteriza-se como fenômeno adaptativo, uma vez que aperfeiçoa os recursos do indivíduo frente ao ambiente.

A ansiedade em animais é uma emoção semelhante ao medo, entretanto modificações da teoria clássica do sistema de inibição comportamental proposta por Gray e McNaughton (Gray e Mcnaughton, 2000) sugerem que há distinção entre os dois comportamentos (Mcnaughton e Corr, 2004). O medo é fruto de uma ameaça definida enquanto a ansiedade é fruto de perigo incerto ou desconhecido. O medo envolve reações de luta ou fuga ou congelamento, é insensível a drogas ansiolíticas da classe dos benzodiazepínicos e tem a função adaptativa de deslocar o animal para longe da fonte do perigo. Por outro lado, a ansiedade aumenta a avaliação do risco pelo animal, desta maneira tem a função de mover o animal em direção ao perigo, e é sensível aos benzodiazepínicos.

Além das manifestações comportamentais, a ansiedade e o medo produzem intensas alterações fisiológicas, com ativação do sistema simpático e parassimpático. Durante o

comportamento de congelamento, ocorrem tremores musculares, exoftalmia, aumento da motilidade gastrointestinal e urgência para micção e defecação. No comportamento de fuga, observam-se alterações nas frequências respiratória e cardíaca, aumento de pressão arterial e hiperventilação (Schenberg *et al.*, 2001). Ainda, de maneira similar ao que se observa em situações de estresse, há níveis plasmáticos aumentados de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e de corticosteróides (Lopez-Figueroa *et al.*, 1998).

O conhecimento atual das estruturas envolvidas na regulação da ansiedade baseia-se tanto em evidências clínicas quanto experimentais obtidas em seres humanos e em animais de laboratório. A ansiedade é um tipo de emoção e, portanto, as estruturas cerebrais implicadas fazem parte do sistema límbico (para revisão, ver Graeff e Guimaraes, 1999). Os circuitos neurais envolvidos na mediação da ansiedade e do medo são diferentes. Quando o animal evita a fonte de ameaça, acredita-se que sejam ativadas preferencialmente regiões como o córtex cingulado anterior, a amígdala, o hipotálamo medial e a substância cinzenta periaquedutal (SCP). Entretanto, quando o animal se aproxima da fonte de ameaça, ativam-se o córtex cingulado posterior e o sistema septo-hipocampal (Gray e Mcnaughton, 2000).

A observação de que o estímulo das porções dorsolateral e dorsal da SCP causa aversão em animais e medo e ansiedade em humanos indica que esta região é uma importante ligação na circuitaria encefálica que processa o medo e a ansiedade. Vários estudos indicam o envolvimento da SCP nestas emoções. Ratos expostos a um gato apresentam comportamento de congelamento, além de importante condicionamento contextual ao local onde a exposição ocorreu e se tornam menos responsivos a estímulos dolorosos (Lester e Fanselow, 1985; Blanchard *et al.*, 1998; Blanchard & Blanchard, 1971; Blanchard *et al.*, 1976). Tanto o congelamento quanto a analgesia causados por essa exposição são reduzidos após lesão da amígdala (Blanchard e Blanchard, 1972) ou por lesões na SCP (Fanselow, 1991).

A SCP, juntamente com a amígdala e o hipotálamo, faz parte do sistema cerebral de defesa (Graeff, 1990), que é o principal substrato neural para a expressão de alterações comportamentais

e neurovegetativas frente a estímulos aversivos. A SCP é uma estrutura mesencefálica que circunda o aqueduto cerebral e é dividida ao longo do eixo rostro-caudal em colunas dorsomedial, dorsolateral (dl), lateral e ventrolateral (Bandler *et al.*, 1991; Carrive e Bandler, 1991; Carrive, 1993). Devido às conexões recíprocas entre a SCP e o sistema límbico prosencefálico, é postulado que a SCP pertença à área límbica mesencefálica (Nauta, 1958).

Foram descritas diversas projeções aferentes para a SCP provenientes do tronco encefálico (*locus coeruleus*, por exemplo), da medula espinhal, de áreas diencefálicas e telencefálicas (hipotálamo, núcleos central e basolateral da amígdala, estria terminal, giro do cíngulo e diferentes áreas corticais) (Mantyh, 1982a; 1982b). Segundo este mesmo autor, a SCP atua como integrador entre áreas prosencefálicas, tronco cerebral e sítios medulares e, dessa forma, essa estrutura tem sido relacionada ao substrato neural responsável pela coordenação de diversas funções, como respostas nociceptivas (dor e analgesia), comportamentos defensivos e relacionados à ansiedade, controle cardiovascular e respiratório, vocalizações e comportamentos sexuais (Bandler *et al.*, 2000).

1.2 O sistema canabinóide

O uso medicinal e recreacional da *marijuana* (maconha) tem sido praticado por vários séculos, embora as intensas pesquisas sobre o mecanismo de ação de preparações de *Cannabis sativa* tenham começado somente em 1964, quando a estrutura do princípio psicoativo da planta, o $\Delta^9(-)$ -tetrahydrocannabinol (Δ^9 – THC ou THC) foi caracterizada (Di Marzo *et al.*, 1998).

Em 1848, um comentário da *British Pharmacopeia* resumiu quase precisamente os efeitos psicotrópicos da *Cannabis* e apontou seu mérito como analgésico e antiespasmódico (Piomelli, 2003): “Numerosos observadores têm descrito que a maconha indiana produz nos nativos do leste que a usam familiarmente em vez de soluções alcoólicas intoxicantes, algumas vezes um estado de devaneio agradável pesado, cansativo, do qual um indivíduo pode facilmente despertar para (...) um estado algumas vezes alegre, inebriante, levando a ele dançar, cantar, rir, provocando um

desejo pelo venéreo e aumento do desejo por comida, ou um estado algumas vezes briguento, de bebedeira, levando a atos de violência. Durante essa condição, a dor é amena e o espasmo cessa (...). Em conjunto, é um remédio que merece uma pesquisa mais extensa do que qualquer uma até agora instituída”. (Christison, 1848).

Alguns pesquisadores admitiam a idéia da existência de receptores responsáveis pela mediação da maioria dos efeitos do THC e da maconha nos tecido central e periférico. A identificação do THC levou à síntese de ligantes canabinóides de alta afinidade que, por sua vez, possibilitaram a clonagem dos receptores CB1 a partir de cérebro de rato (Matsuda *et al.*, 1990) e de receptores CB2 a partir de baço e de uma linhagem de células humanas leucêmicas promielocíticas de ratos (Munro *et al.*, 1993). Os receptores CB1 são expressos primariamente no sistema nervoso central (SNC) e medeiam muitos, se não todos, os efeitos psicotrópicos e analgésicos classicamente associados com agonistas canabinóides (Gonsiorek *et al.*, 2000). Inicialmente acreditava-se que o receptor CB2 era quase exclusivamente expresso em células imunes periféricas (Galiegue *et al.*, 1995; Schatz *et al.*, 1997), mas hoje já se sabe que este receptor e seus transcritos são amplamente distribuídos no encéfalo, embora em níveis inferiores ao CB1 (Onaivi, 2006; Onaivi *et al.*, 2006).

Sabe-se hoje que os receptores canabinóides localizam-se pré-sinápticamente, são acoplados à proteína G e iniciam diferentes vias de sinalização, incluindo a inibição da adenilato ciclase (Howlett e Fleming, 1984) e regulação de canais iônicos, inibindo canais de Ca^{+2} voltagem-dependentes (tipo N, P/Q) e ativando correntes retificadoras de entrada de K^{+} (Mackie, 2006), ou seja, sua ativação leva à inibição da neurotransmissão.

No SNC, os receptores CB1 são amplamente expressos no hipocampo, córtex, cerebelo e gânglios da base (Herkenham *et al.*, 1991; Matsuda *et al.*, 1993; Tsou *et al.*, 1998), presumivelmente relacionando-se aos notáveis efeitos do THC sobre a memória e cognição, sendo o receptor metabotrópico acoplado à proteína G mais abundante no encéfalo de mamíferos (Herkenham *et al.*, 1990). Já os receptores CB2 estão localizados em células (linfócitos T e B,

macrófagos) e tecidos (baço, tonsilas, linfonodos) imunes e, no encéfalo, em células da micróglia perivasculares, células endoteliais vasculares e em certas subpopulações de neurônios. Após a clonagem e caracterização molecular de CB1, bem como do mapeamento de sua distribuição no cérebro (Matsuda *et al.*, 1990; Herkenham *et al.*, 1991), e mais tarde do receptor CB2 (Munro *et al.*, 1993), não só se estabeleceu o mecanismo de ação do THC, assim ampliando o desenvolvimento de agonistas e antagonistas seletivos para os subtipos de receptores, mas também levou alguns pesquisadores a pensarem se não haveria, então, ligantes endógenos seletivos para receptores canabinóides, que mimetizariam as ações do THC. Assim, iniciou-se a busca por ligantes canabinóides derivados do cérebro, os canabinóides endógenos.

Assim, foi demonstrado que tecidos de mamíferos podem produzir agonistas endógenos para estes receptores, todos os quais são derivados do ácido araquidônico (Di Marzo *et al.*, 1998; Mechoulam *et al.*, 1998; Hillard, 2000). Em 1992, o primeiro composto (amida do ácido araquidônico com etanolamina ou N-aracdoniletanolamina) foi isolado a partir do cérebro de porcos (Devane *et al.*, 1992) e denominado de anandamida (AEA) a partir do significado Sânscrito de “ananda”, “felicidade serena”, e caracterizado como um ligante endógeno. Posteriormente, outro ligante endógeno, o 2-aracdonilglicerol (2-AG), também foi isolado (Mechoulam *et al.*, 1995; Sugiura *et al.*, 1995) a partir de estômago canino. A AEA e o 2-AG, e mais tarde outros agonistas endógenos identificados, foram denominados de endocanabinóides (eCBs).

Os eCBs são ligantes lipídicos para os receptores CB1 e CB2, são produzidos sob demanda, de maneira local e temporalmente regulada por processos dependentes de cálcio (Piomelli, 2003), e modulam a liberação de neurotransmissores, assim exercendo várias ações, como funções motoras, processos cognitivos, emoção, percepção sensorial e funções endócrinas e ingestão alimentar (Mackie, 2006). Dada a localização pré-sináptica dos receptores CB1, juntamente com suas ações principalmente inibitórias, os canabinóides têm sido propostos como moduladores locais retrógrados, com importante papel na modulação de funções fisiológicas

essenciais e contribuição em diversos fenômenos de plasticidade sináptica (Ohno-Shosaku *et al.*, 2001; Piomelli, 2003).

A síntese de AEA, ao contrário da síntese da maioria dos neurotransmissores, dá-se a partir da hidrólise do precursor fosfolípido N-araquidonoil-fosfatidietanolamina (NArPE) pela enzima fosfolipase D (Di Marzo *et al.*, 1994). Foi demonstrado que baixas doses de AEA são capazes de reproduzir a maioria dos efeitos comportamentais típicos do THC em roedores, que são, por exemplo, inibição da atividade locomotora, analgesia no teste da placa quente e hipotermia retal (Fride e Mechoulam, 1993), embora o THC seja agonista pleno de receptores CB1 (Devane *et al.*, 1992) e a AEA seja agonista parcial (Mackie *et al.*, 1993), mas mais seletiva do que o THC (Mukhopadhyay *et al.*, 2002). Desta forma, a AEA compartilha com o THC as mesmas ações mediadas por proteína G sobre a adenilato ciclase e canais de Ca^{+2} : pela ativação dos receptores CB1, a AEA reduz a atividade da adenilato ciclase, inibe atividade de correntes de Ca^{+2} e ativa correntes retificadoras de entrada de K^{+} , desta forma reduzindo a excitabilidade neuronal e liberação de transmissores e afetando a expressão gênica (Mackie e Hille, 1992; Felder *et al.*, 1993; Fride e Mechoulam, 1993; Mackie *et al.*, 1993; Felder *et al.*, 1995; Mackie *et al.*, 1995).

Ainda, a AEA possui todos os critérios-chave para uma substância ser considerada um eCB (Devane *et al.*, 1992); é liberada sob demanda por neurônios estimulados, não armazenada em vesículas como os neurotransmissores clássicos (Di Marzo *et al.*, 1994; Giuffrida *et al.*, 1999), ativa receptores canabinóides com alta afinidade (Devane *et al.*, 1992) e é rapidamente eliminada, ao contrário dos canabinóides derivados da planta que possuem ação longa, através de um processo de duas etapas, que consiste de um transporte mediado por um carreador específico na membrana (AMT – anandamide membrane transporter) (Beltramo *et al.*, 1997), seguido por rápida hidrólise intracelular em compostos inativos pela enzima FAAH (fatty acid amide hydrolase), uma hidrolase serina ligada à membrana intracelular (Deutsch e Chin, 1993; Hillard *et al.*, 1995; Ueda *et al.*, 1995).

A captação de AEA é um processo independente de Na^+ que preenche os quatro critérios que definem transporte através de carreador: alta afinidade, dependência de temperatura, seletividade e saturação de substrato (Beltramo *et al.*, 1997; Hillard *et al.*, 1997). Além do mais, o transporte de AEA pode ser inibido farmacologicamente por vários compostos, como pelo N-(4-hidroxifenil) araquidonoilamida, ou AM404. A habilidade do inibidor do AMT, o AM404, de bloquear a captação de AEA tem sido demonstrada *in vitro* através do uso de neurônios de encéfalo de rato em cultura (Beltramo *et al.*, 1997), astrócitos humanos (Piomelli *et al.*, 1999), 1999) e pedaços de encéfalo de ratos (Beltramo *et al.*, 2000). Além do mais, experimentos *in vivo* têm demonstrado que o AM404 aumenta e prolonga várias respostas farmacológicas promovidas pela AEA exógena (Beltramo *et al.*, 1997; Calignano *et al.*, 1997).

Após a internalização da AEA pelo AMT, esta é hidrolisada a ácido araquidônico e etanolamida pela enzima FAAH. Esta enzima é amplamente distribuída no encéfalo de ratos, sendo expressa em altas concentrações nos corpos celulares e dendritos de vários neurônios. Foi demonstrado em estudo de imunorreatividade de corpos celulares à FAAH que estes estão expostos a terminais axonais positivos para receptores CB1, em estruturas como o hipocampo, neocórtex e cerebelo, indicando que a FAAH não só regula a inativação de AEA como o faz principalmente pós-sinapticamente (Tsou *et al.*, 1998; Egertova *et al.*, 2003).

Frente a essas observações, é possível imaginar que a contribuição do sistema eCB no controle das funções nervosas *in vivo* pode ser verificada utilizando antagonistas de receptores CB1, como o rimonabant (SR141716A), bem como inibidores do metabolismo ou do transporte através da membrana, ou por estabelecer relações causa-efeito entre os eventos fisiológicos e alterações nos níveis de eCBs (Di Marzo *et al.*, 1998).

1.3 Os canabinóides e a modulação do comportamento: participação da SCP

A maioria dos efeitos psicológicos dos canabinóides são bifásicos e bidirecionais dependendo de como é administrada, da dose, personalidade, grau de tolerância e vários outros fatores ambientais e individuais. Como já citado, os efeitos agudos do THC em sujeitos normais

podem ir de euforia, relaxamento, excitação, aumento da percepção e aumento da atividade motora à disforia, ansiedade, sedação, distorção da percepção e descoordenação (Paton e Pertwee, 1972; Paton, 1973; Ashton *et al.*, 1981; Viveros *et al.*, 2005; Pacher *et al.*, 2006). A ampla e heterogênea distribuição dos receptores CB1 através do sistema nervoso central e suas ações diferenciais nessas regiões podem ser responsáveis pela diversidade de reações observadas, que podem tanto ser reações ansiolíticas quanto ansiogênicas e panicogênicas (Zuardi *et al.*, 1982; Hall e Solowij, 1998), mas também tem sido proposto o envolvimento de outros sistemas, como o opióide, o serotoninérgico e o vanilóide, nessas ações contraditórias (Bisogno *et al.*, 2001; Berrendero e Maldonado, 2002; Marin *et al.*, 2003; Marco *et al.*, 2004). Desta maneira, injeções intracerebrais em estruturas específicas podem ser uma ferramenta importante para elucidar o papel dos endocanabinóides na ansiedade e o possível envolvimento de outros sistemas em tais respostas.

Dados recentes sugerem que agentes farmacológicos que aumentam a sinalização eCB podem prover novas perspectivas para o tratamento de desordens relacionadas à ansiedade, sendo que a identificação e caracterização dos substratos moleculares da sinalização eCB têm levado ao desenvolvimento de agentes farmacológicos que aumentam a mesma (Patel e Hillard, 2006). Assim, a modulação da função do AMT e da hidrólise da AEA pela FAAH podem ser alvos farmacológicos para a modulação da ansiedade.

Existem várias evidências que apóiam o papel para os receptores CB1 no controle do comportamento emocional e sugerem a existência de um tônus endocanabinóide ansiolítico (Pacher *et al.*, 2006). A facilitação de tal tônus pela inibição da degradação dos eCBs *in vivo* pode ser terapeuticamente explorada, como indicado pela redução de comportamentos do tipo ansiedade e potentes efeitos antidepressivos em camundongos e ratos tratados com inibidor da enzima FAAH ou do AMT e o bloqueio destes efeitos por antagonistas CB1, como o SR141716 ou o AM281 (Kathuria *et al.*, 2003; Gobbi *et al.*, 2005; Bortolato *et al.*, 2006; Rutkowska *et al.*, 2006).

Os receptores CB1, bem como o AMT e a FAAH são expressos em várias regiões do sistema nervoso central (Herkenham *et al.*, 1991; Giuffrida *et al.*, 2001; Egertova *et al.*, 2003), sendo encontrados em estruturas propostas como coordenadoras de respostas relacionadas à aversão, estresse e ansiedade, tais como o córtex pré-frontal, a amígdala, o hipocampo, a substância cinzenta periaquedutal (SCP) e o hipotálamo (Bandler *et al.*, 2000), sugerindo um papel para os endocanabinóides na modulação destes comportamentos.

Os receptores CB1 são distribuídos ao longo das diversas colunas da SCP (Herkenham *et al.*, 1991), sugerindo que esta estrutura poderia estar envolvida na mediação de alguns dos efeitos dos canabinóides. De acordo com isso, injeções de agonista CB1 na SCPdl de ratos induzem tanto efeitos antinociceptivos quanto antiaversivos (Martin *et al.*, 1995; Finn *et al.*, 2003). Além do mais, a estimulação elétrica da SCPdl induz liberação de AEA e antinocicepção via ativação de receptores CB1 locais (Walker *et al.*, 1999). Finalmente, a liberação de canabinóides na SCPdl que ocorre durante situações estressantes pode ser um mecanismo que contribui para a analgesia induzida pelo estresse (Hohmann *et al.*, 2005).

Considerando a importância da sinalização canabinóide na SCPdl e que a sinalização endocanabinóide modula a ansiedade nesta estrutura de ratos submetidos ao labirinto em cruz elevado, produzindo respostas do tipo ansiolíticas (Moreira *et al.*, 2007), o presente trabalhou testou a hipótese de que os canabinóides também poderiam produzir efeitos tipo ansiolíticos na SCPdl de ratos submetidos a outros modelos de ansiedade e, ainda, que estes efeitos também seriam mediados via receptores CB1. Para testar essa hipótese, portanto, foram avaliados os efeitos da administração local de AEA em ratos submetidos ao teste de Vogel e do medo condicionado ao contexto, e se tais efeitos foram bloqueados pelo antagonista de receptores CB1, o AM251. Para verificar a possível presença de um tônus endógeno na modulação do comportamento nesses modelos ou a potencialização da administração de AEA, foi administrado o inibidor de recaptção de AEA, o AM404.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Considerando o acima exposto, o objetivo geral do presente projeto é verificar a hipótese da injeção de AEA na SCPdl produzir respostas ansiolíticas e verificar o(s) mecanismo(s) pelo(s) qual(s) esta resposta acontece.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a hipótese, utilizando os testes do lambert punido de Vogel e do medo condicionado ao contexto como modelos de ansiedade, do possível efeito ansiolítico produzido pela injeção intra-SCPdl de AEA exógena.
- Investigar se existe um tônus endocanabinóide ansiolítico na SCPdl, através do bloqueio de receptores CB1 ou bloqueio do transporte de AEA.
- Investigar se o efeito ansiolítico é devido à ação em receptores canabinóides.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar entre 230 a 240 g provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em grupos de 5 a 6 animais por gaiola em uma sala com temperatura controlada (24 ± 1 °C) sob condições laboratoriais padrões, com livre acesso à água e à comida e ciclo claro-escuro de 12 h (luzes ligadas às 6:30 a.m.). Todos os experimentos foram realizados de acordo com o Guia da Sociedade Brasileira de Neurociência e Comportamento para o cuidado e uso de animais de laboratório. Os protocolos experimentais foram aprovados previamente pela Comissão de Ética local.

3.2 Cirurgia estereotáxica

Os animais foram anestesiados com 2,2,2-tribromoetanol (2,5%, 10 mL/Kg, i.p.). Após tricotomia na cabeça, os animais foram imobilizados em um estereotáxico (David-Kopfe, USA, 957), receberam injeção subcutânea de lidocaína (contendo epinefrina a 2% para promover vasoconstrição local) como anestésico local e injeção intramuscular de antibiótico (Pentabiótico veterinário, 0,2 mL). A calota craniana foi exposta por meio de uma incisão sagital na pele, de aproximadamente 1,0 cm de diâmetro. Os tecidos epiteliais e o periósteo foram retirados para exposição da calota craniana, que foi seca com H₂O₂ a 10%. Com o auxílio de uma broca dental, foi feito um orifício para implante do parafuso inoxidável necessário para auxiliar na fixação da prótese ao crânio do animal, e outro orifício para inserção da cânula-guia, conforme as coordenadas estereotáxicas. Todas as coordenadas tiveram como referência parâmetros do Atlas de Paxinos & Watson (Paxinos e Watson, 1997). O lâmbda foi utilizado como ponto de referência para a coordenada lateral. As coordenadas utilizadas foram: distância médio-lateral de 1,9 mm (à direita), ângulo de 16° em relação ao plano sagital e 4,3 mm dorso-ventral. Uma cânula de aço inoxidável de 11 mm de comprimento e 0,55mm de diâmetro externo foi introduzida na SCPdl do animal através do orifício feito na calota. A cânula foi fixada ao crânio com resina acrílica

autopolimerizável e, após, um mandril de aço inoxidável de 0,2 mm de diâmetro foi introduzido na cânula para evitar a obstrução da mesma durante o período de recuperação do animal. Após a cirurgia, os animais foram mantidos sob aquecimento fornecido por uma lâmpada de 60 W até se recuperarem da anestesia. Foram transportados ao biotério, onde permaneceram em grupo de 5 ou 6 animais, e, cerca de 7 dias após a cirurgia estereotáxica, foram submetidos aos experimentos.

3.3 Drogas

A Anandamida (AEA – TOCRIS) e o inibidor do transportador de AEA, 4-hydroxyphenylarachidonylamide (AM404; TOCRIS) foram dissolvidos em Tocrisolve™ 100 (formulação composta da proporção 1:4 de óleo de soja/água). O antagonista de receptores CB1 N-(piperidin-1yl)-5-(4-iodophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methyl-1Hpyrazole-3-carboxamide (AM251; TOCRIS) foi dissolvido em DMSO 10% em salina (0,9% NaCl). As soluções foram preparadas imediatamente antes do uso e mantidas no gelo e protegidas durante a sessão experimental. Cloridrato de morfina (5 mg/Kg; Merck) dissolvido em salina foi utilizado como controle positivo no teste de retirada da cauda. As doses foram selecionadas baseando-se em outros estudos da literatura empregando estas doses em modelos animais de ansiedade (Easterling e Holtzman, 2001, 2004; Moreira *et al.*, 2007).

3.4 Injeção de drogas

As drogas foram injetadas na SCPdl com o auxílio de uma bomba de infusão. A injeção foi feita através de uma agulha injetora 1 mm mais longa do que a cânula-guia, sendo esta agulha injetora conectada a uma seringa de 10 µL (Hamilton 701-RN, EUA) através de um fio de polietileno (PE-10, Clay-Adams, EUA). As drogas foram injetadas em um volume de 0,2 µL a uma taxa de infusão de 0,2 µL/30 s. A agulha foi mantida por mais 30 s no interior da cânula para evitar refluxo. Cada animal recebeu apenas uma ou duas injeções (veículo ou droga) de acordo com a Tabela 1, sendo o intervalo entre as injeções de 5 min e o animal submetido ao experimento 10 min após a última injeção.

A dose de AEA utilizada foi de 5 pmol/ 0,2 µL, a de AM251 foi de 100 pmol/ 0,2 µL e a de AM404 foi a de 50 pmol/0,2 µL. Estas doses foram escolhidas baseadas naquelas que produziram efeitos ansiolíticos após injetadas na SCPdl de ratos submetidos ao labirinto em cruz elevado (Moreira *et al.*, 2007).

Para os testes de retirada de cauda e avaliação do consumo de água, em que apenas a AEA ou AM404 foi injetado na SCPdl dos animais, o experimento foi realizado 10 min após a injeção.

Morfina 5 mg/kg foi injetada intraperitonealmente em um volume de 1 mL/kg.

Grupo 1	Veículo AM251 + Veículo AEA
Grupo 2	Veículo AM251 + AEA
Grupo 3	AM251 + Veículo AEA
Grupo 4	AM251 + AEA
Grupo 5	Veículo AM404
Grupo 6	AM404
Grupo 7	Veículo AM251 + veículo AM404
Grupo 8	Veículo AM251 + AM404
Grupo 9	AM251 + veículo AM404
Grupo 10	AM251 + AM404

Tabela 1: Grupos experimentais para os testes de Vogel e medo condicionado ao contexto.

3.5 Procedimento experimental

Experimento I - Efeito da injeção de AEA ou do inibidor do transporte na SCPdl sobre o comportamento de ratos submetidos ao teste do lambar punido ou de Vogel.

3.5.1 Teste do lambar punido ou de Vogel

Este teste foi realizado em uma caixa de plexiglas (42X50X25 cm) com uma grade inoxidável no chão e contendo uma garrafa de água com bico metálico projetada na caixa, sendo todo este aparato alocado em uma caixa para atenuar o som externo (Jardim *et al.*, 2005). O contato do animal com o bico metálico e a grade do chão fecha um circuito elétrico controlado por um sensor (modelo Anxio-Meter 102, Columbus, USA) que produz sete pulsos/s sempre que o animal está em contato com ambos os componentes. Cada pulso é considerado como uma lambida e a cada 20 lambidas o animal recebe por 2 s um choque de intensidade de 0,5 mA, sendo que o número de lambidas e de choques durante o período do teste é registrado pelo sensor.

Os animais foram privados de água por 48 h antes do teste. Após as primeiras 24 h de privação, os animais foram colocados no aparato do teste e puderam beber água livremente por 3 min, a fim de encontrarem a garrafa de água e aprenderem a beber. Alguns animais não encontraram o bico da garrafa e, portanto, foram excluídos do experimento. Vinte e quatro h após, as drogas foram injetadas na SCPdl (de acordo com a tabela 1 e explicado no item 2.4) e, após 10 min, os animais foram colocados no aparato do teste. O período do teste foi de 3 min e os animais receberam choques de 0,5 mA a cada 20 lambidas, sendo registrados o número de lambidas e os choques. Embora o número de choques fornecidos pelo sistema seja proporcional ao número de lambidas dos ratos, pode acontecer algumas vezes de acabar o teste e o animal continuar lambendo, ou seja, aumentará o número de lambidas, mas o animal não levará nenhum choque. Dessa forma, o número de lambidas usualmente é ligeiramente maior do que o esperado, considerando-se o número de choques.

Como controles para o teste de Vogel, foram realizados o teste algesimétrico de retirada da cauda (modificado de D'Amour e Smith, 1941) e um teste para avaliar o consumo de água pelo

animal, a fim de verificar possível antinocicepção e aumento do consumo de água, produzidos pela droga nos animais.

3.5.2 Avaliação do consumo de água

O aparato utilizado foi o mesmo do teste, mas o sistema de choques foi inoperante. Este teste foi realizado em um grupo independente de animais e o procedimento foi o mesmo usado no teste, entretanto o sistema de fornecimento de choques foi desligado. 10 min após a injeção intraperitoneal de veículo ou AEA ou AM404, os animais foram colocados, individualmente, na caixa e foi permitido que bebessem livremente por 3 min para registro do número de lambidas.

3.5.3 Teste de retirada da cauda (Avaliação nociceptiva)

O aparato consiste de uma plataforma de acrílico com um fio de bobina de nicromo (Insight Instruments, Brasil), mantido em uma sala à temperatura ambiente (24–26 °C). Os ratos foram gentilmente manuseados, colocados no aparato para contenção e tiveram a porção distal (3 a 4 cm) de suas caudas pousadas sobre uma resistência e se registrou a latência para retirada da cauda, em segundos, para avaliação da possível antinocicepção. A temperatura da bobina foi elevada em 9 °C/s pela passagem de uma corrente elétrica. O sistema possui um tempo de corte de 6 s para evitar dano tecidual quando a temperatura da bobina aproxima-se de 80 °C. O animal responde espontaneamente ao estímulo nocivo com o reflexo de retirada da cauda. O circuito elétrico foi calibrado para provocar este reflexo de retirada no intervalo de 2,5-3,5 s nos animais não tratados (Molchanov e Guimaraes, 2002). Foram realizadas três medidas basais e calculado o valor médio para obter a linha de base. Após a linha de base, os animais receberam a droga na SCPdl e, após 10 min, foram realizadas mais quatro medidas a cada 10 min.

Experimento II – Efeito da injeção de AEA ou do inibidor do transporte na SCPdl sobre a resposta cardiovascular e comportamental de ratos submetidos ao medo condicionado ao contexto.

3.5.4 Canulação da artéria femoral e registro da pressão arterial:

Vinte e quatro horas antes do teste os animais foram anestesiados com tribromoetanol, na dose de 250 mg/ kg, aplicado i.p. Um cateter foi implantado na artéria femoral para registro da atividade cardiovascular. O cateter era constituído de um segmento de polietileno PE-10 (3-4 cm) soldado a um outro seguimento PE-50 (12-13 cm), que foi preenchido com anticoagulante (heparina a 0,3% em salina) e obstruído em sua terminação externa com um pino de metal. Uma vez implantado, o cateter foi exteriorizado na região escapular no dorso do rato, sendo fixados por linha de sutura.

3.5.5 Parâmetros do condicionamento e aquisição dos dados.

O condicionamento e o teste foram realizados em uma caixa de condicionamento (23 cm x 21 cm x 60 cm, Ugo Basile, Itália) com um assoalho composto de 18 barras de metal (2 mm de diâmetro), com espaço de 1,5 cm entre elas, ligado a um gerador de choques elétricos. A caixa foi limpa antes e após seu uso com uma solução de etanol 70%.

Os ratos foram colocados inicialmente na caixa de condicionamento por 10 min como forma de habituação. Em uma segunda exposição a caixa, os animais receberam 6 choques elétricos inescapáveis (1,5 mA com 3 s de duração) com intervalo variável entre 20 s e 1 min (Resstel et al., 2006). Após 24 h do condicionamento os animais passaram por cirurgia de implante de cateter na artéria femoral, como descrito anteriormente.

Quarenta e oito horas após o condicionamento, a atividade cardiovascular, pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) e o tempo de congelamento foram avaliados durante o teste de re-exposição ao contexto. Em uma sala para registro da atividade cardiovascular, o cateter arterial previamente heparinizado foi conectado a um transdutor de pressão, acoplado a um amplificador de sinais HP7754-A (Hewlett Packard, USA), por sua vez conectado a um sistema de aquisição de dados computadorizado (Biopac, USA). A PAM e FC foram continuamente registradas por um computador para posterior análise. Após 30 min de aclimatização e estabilização dos valores basais da PAM e FC os animais foram colocados novamente na caixa de condicionamento para a avaliação das alterações cardiovasculares e comportamentais decorrentes

da REC (resposta emocional condicionada) durante 10 minutos, porém, nenhum choque foi aplicado.

O comportamento de congelamento foi avaliado de forma cumulativa por todo o período do teste. Os ratos foram testados apenas uma vez. O congelamento foi avaliado durante o teste de forma cega, por um experimentador a uma distância de 30 cm da caixa de condicionamento. O congelamento foi definido como a completa ausência de movimento, com exceção do movimento respiratório, enquanto o animal assume uma postura característica (Fanselow, 1980).

3.6 Perfusão, remoção dos encéfalos e análise histológica

Após a realização dos experimentos, os animais foram anestesiados com uretana (25%, 5 mL/kg, i.p.) e, posteriormente, perfundidos através do ventrículo cardíaco esquerdo, com o auxílio de uma bomba de perfusão, com solução de salina isotônica seguida de solução de formol 10%. Após a perfusão, os animais foram decapitados e se retirou os encéfalos, que foram acondicionados em formol 10% por uma semana, quando então foram cortados no criostato em secções de 50 μ m, para análise histológica do sítio de injeção.

3.7 Análise dos dados

Os dados do Experimento I foram expressos como média \pm EPM. O número de lambidas punidas e o consumo de água foram analisados por análise de variância de uma via (ANOVA), seguidos pelo pós-teste de Bonferroni, em caso de significância estatística. A latência para a retirada da cauda foi analisada pela análise de variância de medidas repetidas (*two-way* ANOVA), sendo tempo o fator dependente e droga o fator independente. O nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$.

Os dados do Experimento II foram expressos como a média \pm EPM. Foram calculadas as médias da variação de PAM e FC (Δ PAM e Δ FC, respectivamente), as quais foram analisadas utilizando a análise de variância (ANOVA) de duas vias, com tratamento (administração de veículo ou droga) como principal fator e o tempo como medida repetida. Quando ocorreu

interação significativa entre os fatores, foi realizada a análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do pós-teste de Bonferroni para comparar as variações em cada tempo.

O congelamento foi medido como percentual do tempo total de exposição à caixa e foi analisado utilizando a análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do pós-teste de Bonferroni. O nível de significância assumido foi de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Localização do sítio de injeção

A fotomicrografia representativa do local de injeção na SCPdl, bem como os sítios de injeção dos animais submetidos ao Vogel e ao medo condicionado ao contexto, que foram projetados sobre secções coronais adjacentes modificadas do Atlas de Paxinos & Watson, 1997, estão representados na Figura 1.

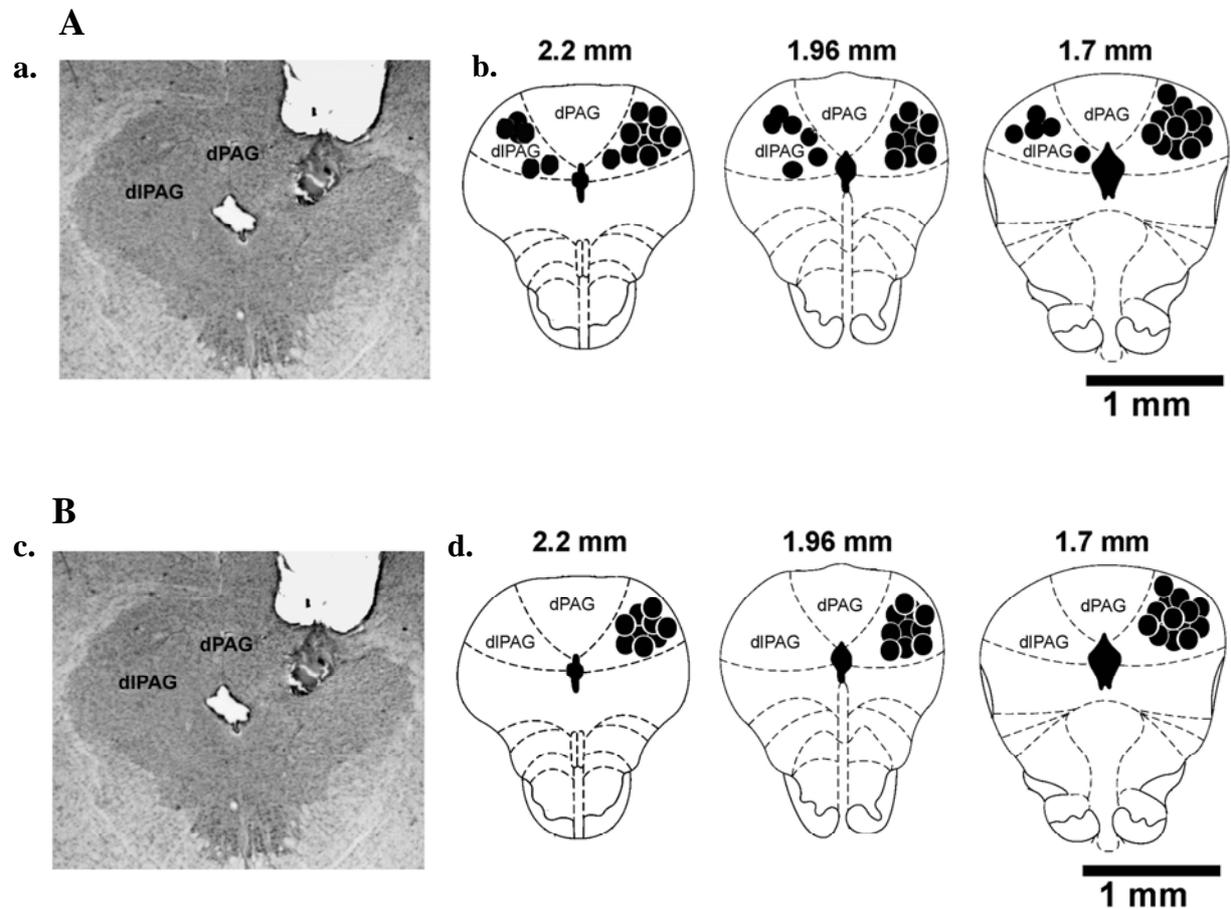


Figura 1: Fotomicrografia (a e c) do sítio de injeção de drogas na SCPdl e diagramas representativos da localização das injeções (b e d) dos animais submetidos aos testes do Experimento I (A) e II (B).

4.2 Experimento I - Efeito da injeção de AEA ou do inibidor do transporte de AEA (AM404) na SCPdl sobre o comportamento de ratos submetidos ao teste de Vogel

A injeção de AEA (n=6) na SCPdl de ratos submetidos ao teste de Vogel aumentou o número de lambidas punidas e choques em relação ao grupo controle (n=11, $F_{5,39}=5,86$, Bonferroni, $p<0,0005$ e $F_{5,39}=5,76$, Bonferroni, $p<0,0006$, respectivamente), como pode ser observado na Figura 2. A administração de AM251 (n=9) por si não produziu qualquer efeito sobre o comportamento, mas quando foi administrado antes da AEA reverteu o efeito desta sobre o número de lambidas punidas e sobre o número de choques ($p<0,05$, n=5), como observado também na Figura 2. Ainda na Figura 2, a injeção de AM404 (n=4) na SCPdl de outro grupo de animais submetidos ao Vogel também aumentou o número de lambidas punidas e choques (Bonferroni, $p<0,001$) em relação ao grupo controle e, além disso, este efeito também foi revertido pelo pré-tratamento com o antagonista de receptores CB1, o AM251 ($p<0,05$, n=5).

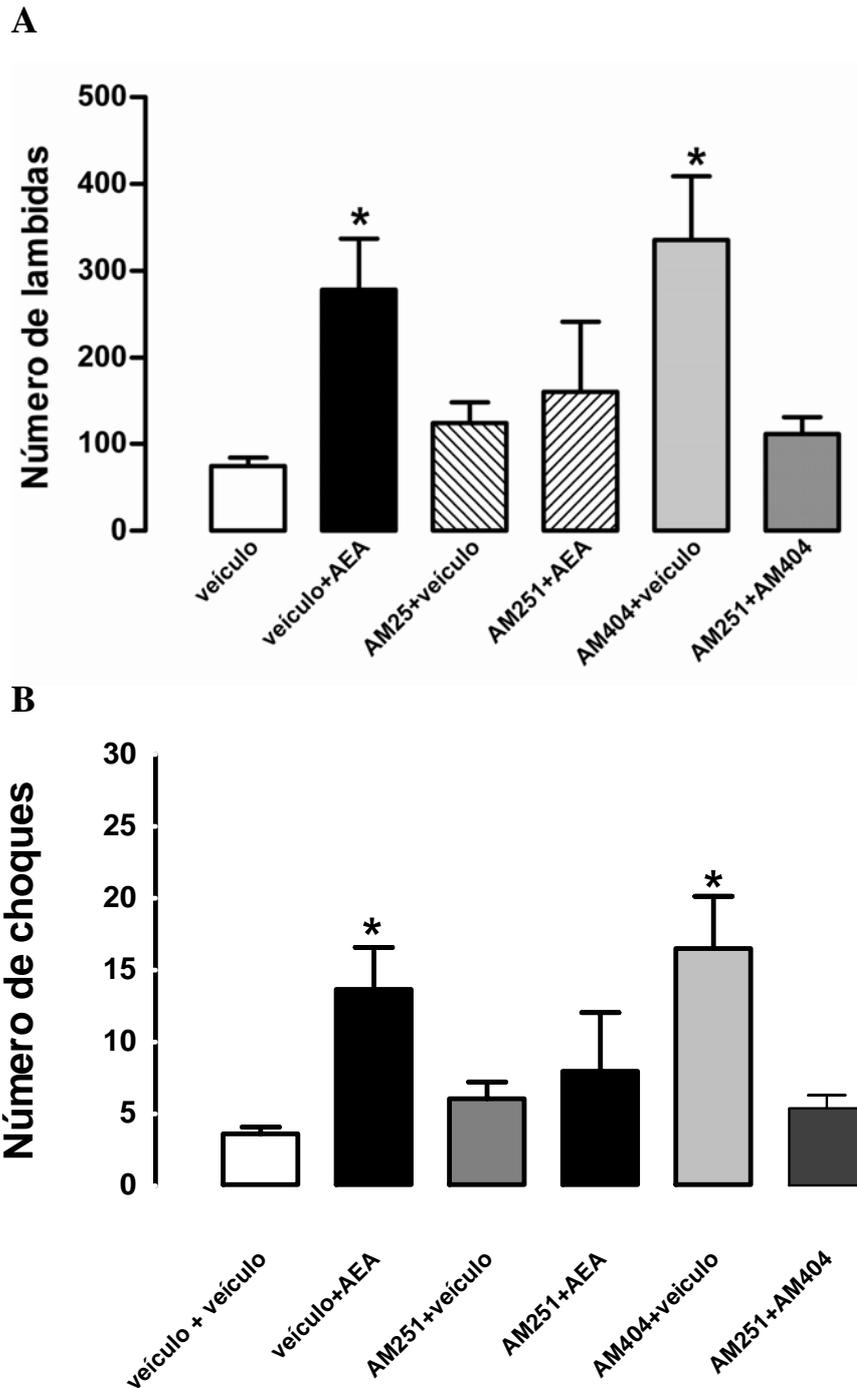


Figura 2: Efeito da administração unilateral de veículo + veículo (0,2 μ L, n=11), veículo + AEA (5pmol/0,2 μ L, n=6), AM251 (100 pmol/0,2 μ L) + veículo (n=9), AM251 + AEA (n=5), AM404 (50pmol/0,2 μ L) + veículo (n=4) ou AM251 + AM404 na SCPdl de ratos submetidos ao teste de Vogel. A AEA e o AM404 aumentaram significativamente o número de lambdas (A) e o número de choques (B), sendo estes efeitos bloqueados pelo pré-tratamento com AM251. Colunas representam a média e as barras o EPM. * $p < 0,001$ (em relação ao grupo veículo+veículo), pós-teste de Bonferroni.

Embora a AEA a tenha produzido efeito, este não foi decorrente de efeito antinociceptivo, como pudemos observar no teste de retirada da cauda (Figura 3). O AM404, entretanto, induziu um pequeno, mas significativo aumento na latência para retirada da cauda 20 min após a injeção em relação ao veículo. Esta latência, entretanto, não diferiu dos valores basais ($p > 0.05$). Nesse teste, a morfina aumentou a latência para retirada de cauda ($F_{3,20}=16,55$, Bonferroni, $p < 0,0001$) e houve efeito desta droga ao longo do tempo ($F_{3,20}=8,03$, $p < 0,0005$). A AEA e o AM404 não modificaram o consumo de água ($F_{2,13}=0,83$, teste t, $p > 0,05$), como pudemos observar na avaliação de consumo de água (Figura 4).

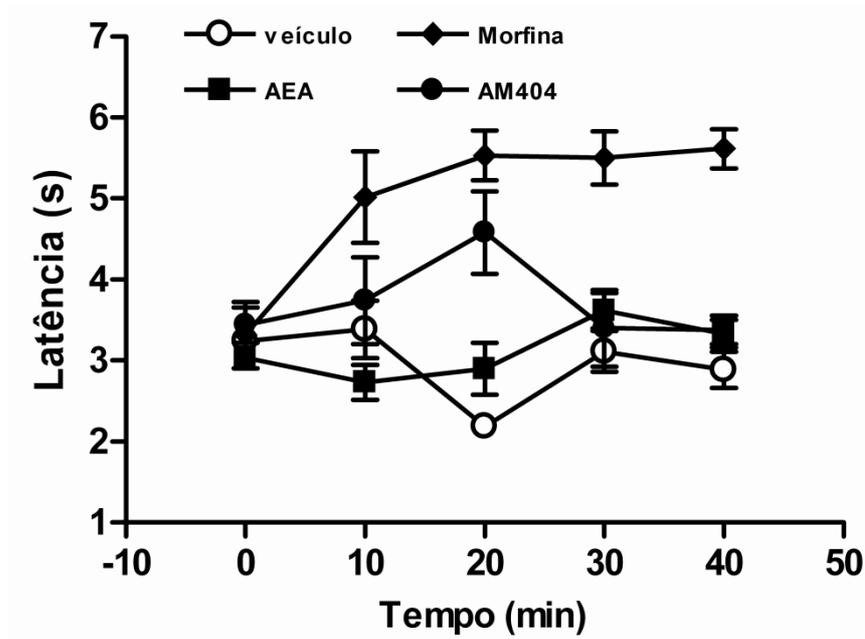


Figura 3: Efeitos ao longo do tempo da AEA (5pmol/0,2 μ L, n=3), AM404 (50pmol/0,2 μ L, n=5), morfina (5 mg/Kg, n=4) ou veículo (0,2 μ L, n=5) injetados unilateralmente na SCPdl de ratos submetidos ao teste de retirada da cauda. Os pontos representam a média e as barras o EPM para a latência de retirada da cauda. * $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo e # $p < 0,05$ em relação ao grupo AEA, pós-teste de Bonferroni.

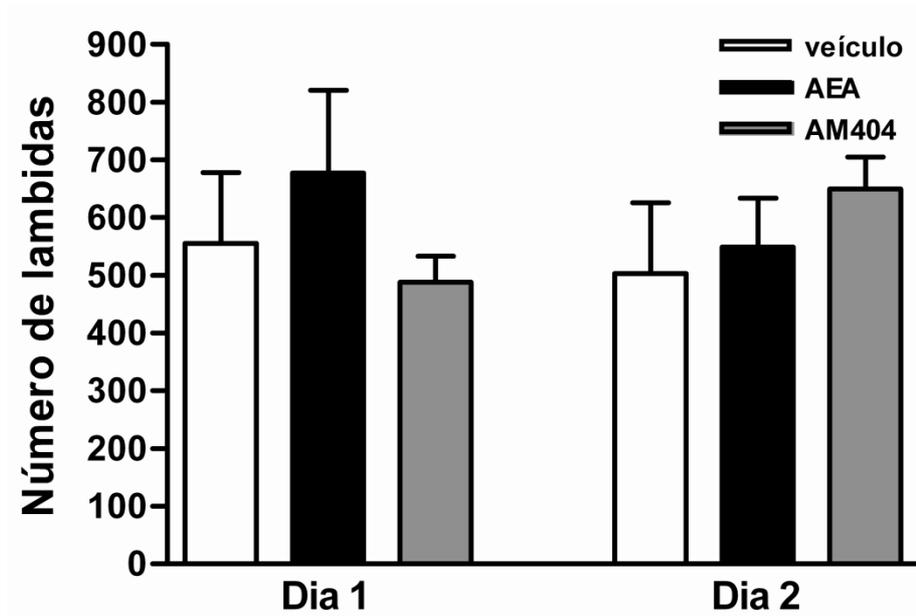


Figura 4: Ausência de efeito da AEA (5pmol/0,2 μ L, n=5), AM404 (50 pmol/0,2 μ L, n=6) ou veículo (0,2 μ L, n=5) injetados unilateralmente na SCPdl de ratos submetidos ao teste de avaliação do consumo de água. As colunas representam a média e as barras o EPM do número de lambidas aferido para cada grupo no período de 3 minutos após o início das lambidas.

4.3 Experimento II – Efeito da injeção de AEA ou do inibidor do transporte de AEA (AM404) na SCPdl sobre a resposta comportamental e cardiovascular de ratos submetidos ao condicionamento ao contexto

4.3.1 Resposta comportamental

A injeção de AEA (n=6) ou de AM404 (n=6) na SCPdl de ratos 10 min antes da re-exposição dos animais à caixa de condicionamento ao contexto reduziu o tempo de congelamento produzido pela REC em relação ao veículo (n=7; $F_{5, 36}=38,9$, Bonferroni, $p<0,001$). A administração de AM251 por si não produziu qualquer efeito (n=6), entretanto o pré-tratamento com este antagonista bloqueou os efeitos tanto da AEA (n=6, $p>0,05$) quanto do AM404 (n=6, $p>0,05$), como observado na Figura 5.

4.3.2 Resposta cardiovascular

Não foram observadas diferenças nos valores basais de PAM (veículo= 95 ± 3 ; AEA= 96 ± 2 ; AM251= 94 ± 4 , AM251+AEA= 96 ± 3 , AM404= 99 ± 3 , AM251+AM404= 100 ± 3 $F_{5, 31}= 0,9$, $p>0,05$) ou FC ($F_{5, 31}= 0,4$, veículo= 335 ± 19 ; AEA= 350 ± 17 ; AM251= 354 ± 20 ; AM251+AEA= 260 ± 21 ; AM404= 248 ± 17 ; AM251+AM404= 259 ± 19 ; $p>0,05$) entre os grupos. Houve efeito significativo do tratamento (PAM: $F_{5, 465}=134,6$, $p<0,001$ e FC: $F_{28, 336}=167,1$, $p<0,001$) e tempo (PAM: $F_{14, 465}=145,5$, $p<0,001$ e FC: $F_{14, 465}=168,5$, $p<0,001$) e interação entre tratamento e tempo (PAM: $F_{70, 465}=5,3$, $p<0,001$ e FC: $F_{70, 465}=6,5$, $p<0,001$). A administração de AEA na SCPdl atenuou o aumento da resposta cardiovascular durante o teste (PAM: $F_{1,165}=229$, $p<0,001$ e FC: $F_{1,165}=379,8$, $p<0,001$) em relação ao grupo controle (Figure 6). De forma similar à AEA, a administração de AM404 na SCPdl atenuou o aumento na FC e na PAM durante o teste (PAM: $F_{1, 165}=165,2$, $p<0,001$ e FC: $F_{1, 165}=226$, $p<0,001$, Fig 6). A administração de AM251 por si não produziu efeito em relação ao grupo controle (PAM: $F_{1, 165}=2,3$, $p>0,05$ e FC: $F_{1, 165}=2,56$, $p>0,05$, Figure 6), entretanto foi capaz de inibir tanto o efeito da AEA (PAM: $F_{1,150}=254,6$, $p<0,001$ e FC: $F_{1,150}=433,3$, $p<0,01$) quanto do AM404 (PAM: $F_{1,150}=449,1$, $p<0,001$ e FC: $F_{1,150}=486,4$, $p<0,001$) sobre as respostas cardiovasculares observadas durante a re-exposição à caixa de condicionamento (Figure 6).

A figura 7 representa um registro das pressões arteriais pulsátil e média e da frequência cardíaca dos animais antes, imediatamente no momento da re-exposição à caixa e durante todo o período de re-exposição. Os traçados demonstram que assim que o animal é re-exposto à caixa, apresenta um aumento nas três medidas, sendo que o tratamento com AEA e AM404 impediu este efeito sobre os parâmetros observados e o pré-tratamento com AM251 restabeleceu a resposta à REC.

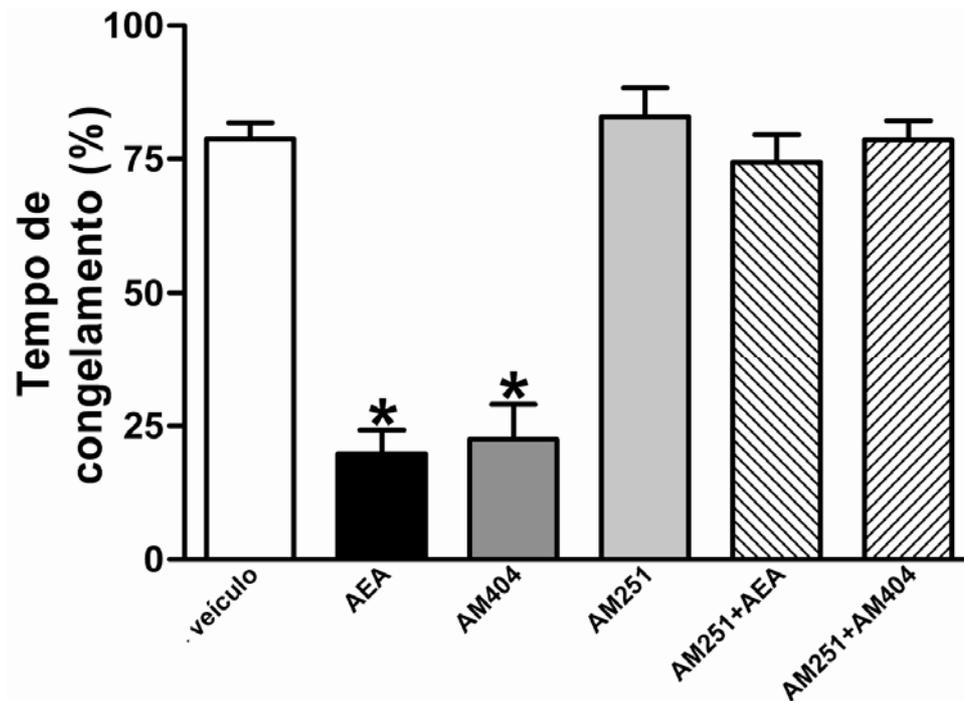


Figura 5: Efeito da administração unilateral de veículo (0,2 μ L, n=7), AEA (5 pmol/0,2 μ L, n=6), AM404 (50pmol/0,2 μ L, n=6), AM251 (100 pmol/0,2 μ L, n=6), AM251+AEA (n=6) ou AM251+AM404 (n=6) na SCPdl de ratos durante a REC sobre a porcentagem de tempo de comportamento de congelamento. A AEA e o AM404 reduziram significativamente a % de tempo de congelamento em relação ao grupo veículo, sendo estes efeitos bloqueados pelo pré-tratamento com AM251. Colunas representam a média e as barras o EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo, pós-teste de Bonferroni.

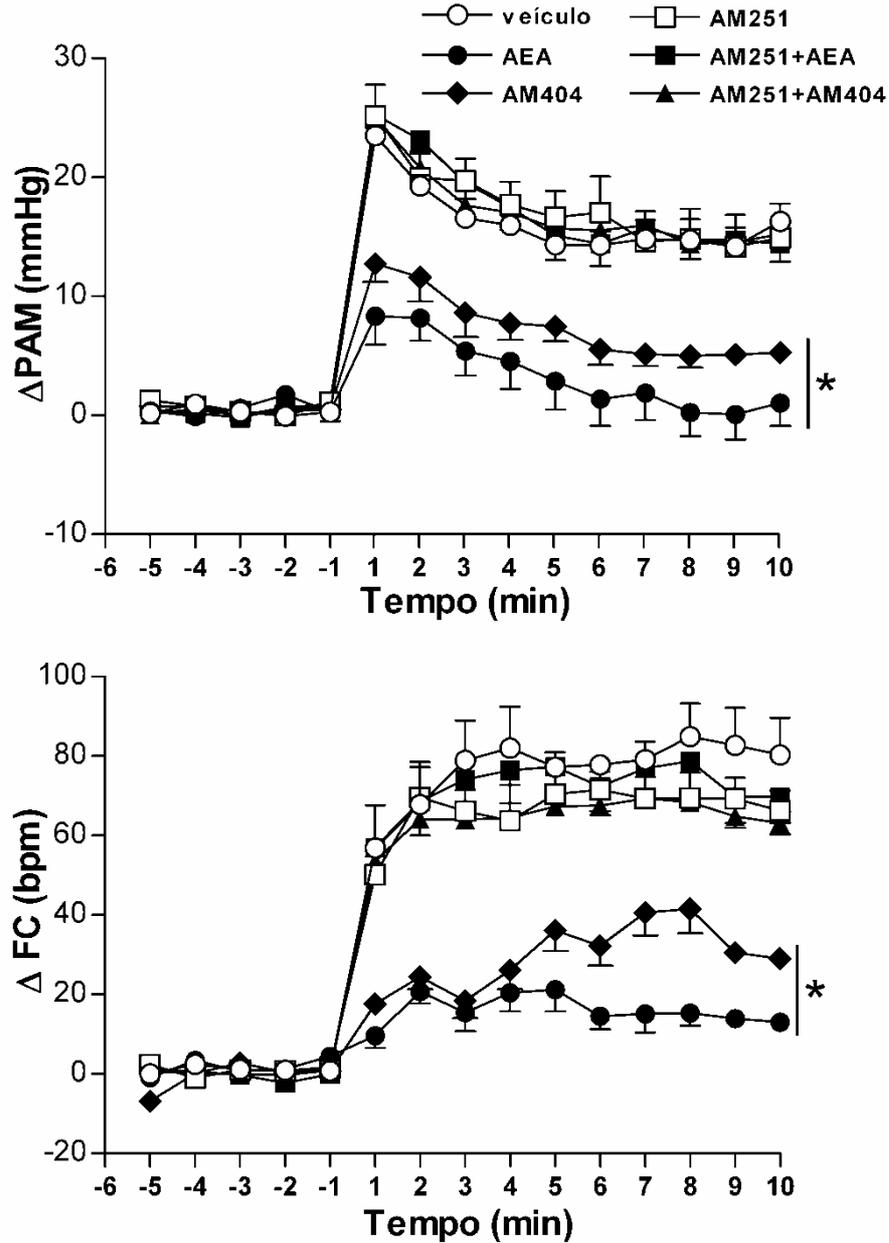


Figura 6: Efeito ao longo do tempo da administração de veículo (0,2 μ L, n=7), AEA (5 pmol/ 0,2 μ L, n=6), AM404 (50 pmol/0,2 μ L, n=6), AM251 (100pmol/0,2 μ L, n=6), AM251+AEA (n=6) ou AM251+AM404 (n=6) injetados unilateralmente na SCPdl sobre as alterações na pressão arterial média (ΔPAM , gráfico superior) e frequência cardíaca (ΔFC , gráfico inferior) observadas em ratos durante a REC. Os símbolos representam a média e as barras o EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo, pós-teste de Bonferroni.

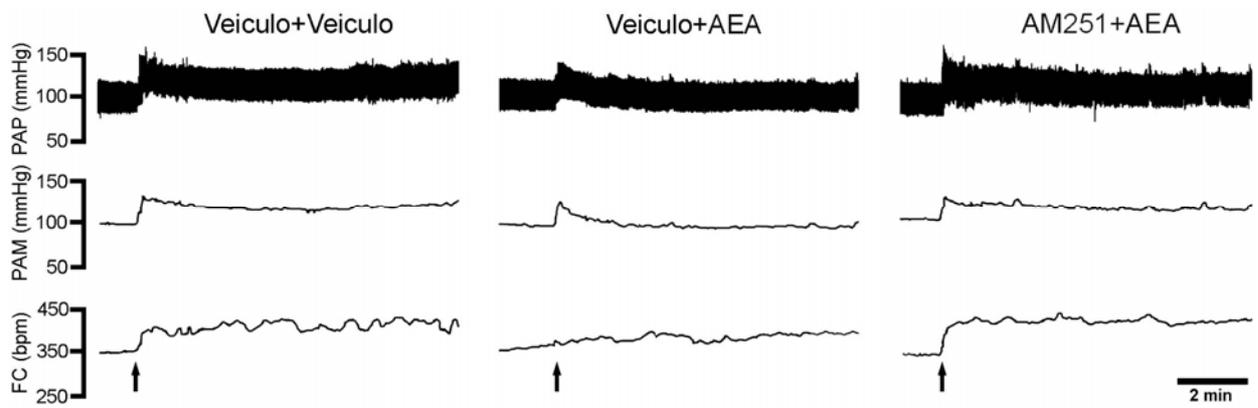


Figura 7: Traçados de pressão arterial média (PAM), pressão arterial pulsátil (PAP) e frequência cardíaca (FC) de um rato representativo de cada grupo, mostrando o efeito da administração de veículo, AEA ou AEA + AM251 na SCPdl sobre as respostas cardiovasculares durante a REC. As setas indicam o início da re-exposição do animal à caixa de condicionamento.

5 DISCUSSÃO

No presente trabalho investigamos o efeito do endocanabinóide (eCB) Anandamida (AEA) e do inibidor do sistema de recaptação de AEA (AM404) injetados na SCPdl de ratos submetidos aos modelos do lambert punido de Vogel e do condicionamento ao contexto e investigamos a resposta cardiovascular evocada durante a resposta emocional condicionada (REC) dos animais re-expostos à caixa de condicionamento. Além disso, investigamos o possível envolvimento do receptor canabinóide do tipo CB1 nas respostas produzidas pela AEA e pelo AM404, através do uso do antagonista deste subtipo de receptor, o AM251.

Como pudemos observar, a administração de AEA e de AM404 na SCPdl aumentou o número de lambidas punidas e, conseqüentemente, de choques recebidos pelos animais (Figura 2), indicativo de efeito ansiolítico. O possível efeito ansiolítico da AEA na SCPdl já havia sido sugerido (Moreira *et al.*, 2007), mas utilizando outro modelo de ansiedade, o labirinto em cruz elevado (LCE). Esse modelo se baseia na aversão de roedores a ambientes abertos, claros e altos, sendo esta aversão inata reduzida por drogas ansiolíticas (Handley e Mithani, 1984; Pellow e File, 1986). Entretanto, naquele trabalho anterior não foi observado efeito do AM404.

Um dos paradigmas utilizados no presente trabalho, o teste de Vogel, também é um modelo de ansiedade, entretanto não se baseia em um componente inato do animal, mas sim na supressão de respostas punidas, ou seja, envolve situação de conflito aprendida ao longo do teste. Neste modelo, ratos privados de água são expostos ao conflito entre beber a água e receber um choque brando na língua (Vogel *et al.*, 1971). Drogas ansiolíticas exercem uma ação anticonflito e aumentam o número de lambidas punidas, um efeito visto consistentemente com drogas que potenciam a ação do ácido gama-aminobutírico (GABA) (Griebel *et al.*, 1999; Flores e Pellon, 2000; Carlson *et al.*, 2001; Griebel *et al.*, 2005). Desta maneira, a possível ação ansiolítica da AEA quando injetada na SCPdl em ratos submetidos ao referido modelo é sugerida. Em relação ao AM404, o fato de se ter obtido efeito ansiolítico neste trabalho, mas não no de Moreira e colaboradores (2007) provavelmente é devido às diferenças entre os modelos utilizados, já que

quando foi utilizado um modelo de medo inato, o AM404 não produziu efeito, mas quando utilizamos um modelo de conflito aprendido, com liberação de choque (mais estressante para o animal), pudemos observar o efeito do AM404.

Após observar a ação ansiolítica da AEA e do AM404 injetados na SCPdl, fomos investigar a possível participação de receptores CB1 em tais respostas. Os receptores CB1 estão distribuídos ao longo das diversas colunas da SCP (Herkenham *et al.*, 1991), sugerindo que esta estrutura poderia estar envolvida na mediação de alguns dos efeitos dos canabinóides. É proposto que a SCP faz parte do substrato neural responsável pela coordenação tanto de respostas nociceptivas quanto relacionadas à ansiedade (Bandler *et al.*, 2000), sendo que injeções de agonistas CB1 na parte dorsolateral desta estrutura (SCPdl) de ratos induz tanto efeitos anti-nociceptivos quanto antiaversivos (Martin *et al.*, 1995; Finn *et al.*, 2003) e a AEA liberada após um estímulo elétrico nesta estrutura causa antinocicepção via ativação de receptores CB1 locais (Walker *et al.*, 1999).

Embora o AM251 tenha sido ineficaz por si (Figura 2) no teste de Vogel, sugerindo a ausência de um tônus endógeno controlando tal resposta, quando os animais que receberam AEA ou AM404 foram pré-tratados com aquela droga, as respostas comportamentais induzidas por estas no referido teste foram bloqueadas. Esses resultados, portanto, sugerem a participação dos receptores CB1 na resposta ansiolítica produzida pela AEA e pelo AM404 no teste de Vogel e corrobora, mais uma vez, os resultados da AEA obtidos por Moreira e colaboradores no LCE (Moreira *et al.*, 2007). Eles estão de acordo também com a proposta de que o sistema eCB atuaria como um “tampão” contra o estresse, atenuando suas conseqüências (Viveros *et al.*, 2007).

Baseando-se no fato de que a estimulação elétrica ou química da porção dorsal da SCP induz comportamentos de luta e fuga (Fernandez De Molina e Hunsperger, 1962; Krieger e Graeff, 1985; Bandler e Carrive, 1988) e efeito antinociceptivo não opióide (Morgan *et al.*, 1998), além de produzir analgesia sensível ao SR141716 (antagonista não-seletivo para CB1) e liberação de AEA (Walker *et al.*, 1999), e considerando que o teste de Vogel baseia-se no conflito entre

receber um estímulo aversivo (choque) ou beber água, drogas que influenciam o limiar nociceptivo ou o consumo de água poderiam produzir resultados falso-positivos neste teste (Millan e Brocco, 2003). O aumento no número de choques recebidos pelos animais sob efeito da droga poderia indicar um efeito antinociceptivo desta e, assim, isto seria o fator responsável pelo efeito anticonflito. De forma similar, o aumento no consumo de água entre os animais sob efeito da droga poderia indicar uma sede exacerbada produzida por esta e, conseqüentemente, isto contribuiria para o efeito anticonflito, motivando o animal a vencer a aversão ao choque e consumir mais água em relação aos animais do grupo controle. Para descartar a hipótese do efeito ansiolítico obtido com a AEA e o AM404 na SCPdl ser devido a uma dessas ações, foram realizados experimentos para controlar estas possibilidades.

Os resultados mostraram (Figura 3) que a AEA não aumentou a latência para a retirada da cauda, tornando inconsistente a idéia de uma possível antinocicepção provocada pela droga nos animais submetidos ao choque. Ainda, um possível efeito da AEA sobre a sede também foi descartado, uma vez que o consumo de água foi similar entre os animais que receberam veículo ou AEA na SCPdl e foram submetidos ao aparato do Vogel, porém sem liberação de choques (Figura 4). Estes resultados sugerem, pelo menos nesse caso, que a ação da AEA injetada na SCPdl de animais submetidos ao teste do Vogel, como no LCE (Moreira *et al.*, 2007), é restrita à ansiedade. O AM404, por outro lado, induziu um efeito antinociceptivo significativo em relação ao grupo veículo quando os animais foram avaliados 20 minutos após a microinjeção. Este efeito, porém, foi pequeno, uma vez que os valores não diferiram dos valores basais do mesmo grupo. Um efeito antinociceptivo do AM404 na SCPdl, entretanto, é compatível com um estudo em que a estimulação elétrica desta estrutura promoveu liberação de AEA com subsequente antinocicepção via ativação de receptores CB1 locais (Walker *et al.*, 1999). No presente trabalho os animais foram avaliados no teste de Vogel 10 min após a microinjeção da droga, quando nenhum efeito antinociceptivo do AM404 foi detectado. Além do mais, o AM404 também não alterou o

consumo de água. Portanto, parece improvável que o efeito anticonflito do AM404 no teste de Vogel seja devido a uma interferência não-específica com mecanismos de apetite ou nociceptivos.

Um outro modelo animal comumente utilizado para estudar comportamentos relacionados à ansiedade e que também foi empregado neste estudo para avaliar os efeitos da AEA é o medo condicionado ao contexto. Neste modelo, o medo é induzido quando um ambiente específico (contexto), não-aversivo por si, é repetidamente pareado com algum tipo de estímulo aversivo, incondicionado (no presente trabalho, choques elétricos nas patas) (Fanselow, 1980), de maneira que o ambiente anteriormente neutro passa a ser aversivo para o animal. Em ratos, a resposta gerada pela re-exposição à caixa, denominada de resposta emocional condicionada (REC), é caracterizada por comportamento de congelamento associado a um aumento na PAM e FC (Antoniadis e McDonald, 1999; Carrive, 2000; Resstel, Joca, Guimaraes *et al.*, 2006; Resstel, Joca, Moreira *et al.*, 2006). Qualitativamente, o congelamento e aumento na PA e FC gerados por resposta emocional condicionada a um estímulo discreto (luz e/ ou som) e aqueles produzidos por medo condicionado ao contexto são os mesmos. Todavia, existe uma grande diferença na duração da REC ao contexto, que chega a ser cinco vezes maior em relação ao estímulo luminoso e/ ou sonoro (Ledoux *et al.*, 1984; Iwata e Ledoux, 1988; Nijssen *et al.*, 1998).

Diversas estruturas cerebrais estão envolvidas na REC. As informações do estímulo aversivo incondicionado que atingem a porção ventrolateral da SCP resultam em respostas de congelamento (Fendt e Fanselow, 1999). Além disso, a SCP está envolvida na integração de diversas funções, como por exemplo, controle cardiovascular (Graeff, 1990), podendo também modular estruturas do tronco encefálico envolvidas na taquicardia e aumento da PA (Fendt e Fanselow, 1999). Assim, a injeção de AEA ou de AM404 na SCPdl poderia modular tanto a resposta comportamental quanto a cardiovascular nos animais submetidos ao condicionamento ao contexto.

Durante a re-exposição ao contexto, onde o animal anteriormente levou choques, os animais do grupo controle permaneceram a maior parte do tempo imóveis (em torno de 80%,

Figura 5) e tiveram aumento da resposta cardiovascular, como observado pelo aumento da PAM e FC na Figura 6, corroborando estudos prévios (Carrive, 2000; Zhang *et al.*, 2004) que mostraram que a resposta cardiovascular condicionada ao contexto é positivamente associada à resposta condicionada de congelamento. Já os animais que receberam AEA ou AM404 tiveram uma redução nesta REC, uma vez que o tempo em que permaneceram imóveis foi apenas em torno de 20%, e também tiveram redução significativa na resposta cardiovascular (Figura 6). Da mesma forma como aconteceu no teste de Vogel, o pré-tratamento com o antagonista CB1, o AM251, também foi capaz de reduzir a REC nesse modelo, sugerindo mais uma vez que a ação ansiolítica da AEA e do AM404 envolve a participação destes receptores, e também foi capaz de bloquear a resposta de redução da PAM e FC produzida por ambas as drogas (Figura 6).

A observação de que a estimulação das porções dorsal e dorsolateral da SCP produz aversão em animais e medo e ansiedade em humanos, indica que esta região encefálica é um importante componente da circuitaria encefálica que processa o medo e a ansiedade. Evidências para o envolvimento da SCP nestas emoções têm sido sugeridas por vários tipos de estudos (Behbehani, 1995). Além disso, como os receptores CB1 estão distribuídos ao longo das diversas colunas da SCP (Herkenham *et al.*, 1991), é sugerida também a participação desta estrutura na mediação de alguns dos efeitos dos canabinóides.

O efeito ansiolítico obtido com a administração de AEA intra-SCPdl em ratos submetidos aos dois modelos de ansiedade utilizados no presente trabalho está de acordo com o trabalho de Moreira e colaboradores, que utilizou o labirinto em cruz elevado (LCE) como modelo de ansiedade (Moreira *et al.*, 2007). Por outro lado, no presente trabalho o AM404 foi capaz de produzir efeito, o que não tinha sido observado por Moreira e colaboradores. É importante ressaltar que embora todos os três modelos citados sejam modelos de ansiedade, o substrato neural envolvido na modulação dos comportamentos dos animais submetidos a tais modelos provavelmente é diferente. O LCE baseia-se em um medo inato dos roedores a ambientes claros, altos e desprotegidos, o Vogel em uma resposta punida a uma condição fisiológica (necessidade

de beber água) e o medo condicionado ao contexto a uma resposta emocional condicionada (congelamento) a um estímulo aversivo apresentado previamente (choques nas patas). Dessa maneira, sugerimos que estas diferenças nos modelos animais empregados podem ser responsáveis pelo efeito do AM404 no Vogel e no condicionamento, mas não no LCE. A importância, portanto, do presente trabalho é a confirmação do efeito ansiolítico da AEA em outros modelos de ansiedade que não envolvem a aversão inata de roedores e a verificação de respostas divergentes frente aos tipos de estímulos aversivos aos animais.

Os efeitos obtidos com a AEA e com o AM404 na SCPdl neste trabalho também estão de acordo com dados da literatura obtidos após injeções sistêmicas de THC ou de canabinóides sintéticos em roedores (Berrendero e Maldonado, 2002; Patel e Hillard, 2006), mas resultados contraditórios também são encontrados (Onaivi *et al.*, 1990; Onaivi *et al.*, 1995; Chakrabarti *et al.*, 1998; Patel e Hillard, 2006). Estas contradições, provavelmente, são relacionadas a efeitos particulares dos canabinóides sobre outras estruturas atingidas após administração sistêmica, bem como a diferentes doses administradas. Como exemplo, tem sido sugerido que injeção local de THC na amígdala central induz efeito tipo ansiogênico (Onaivi *et al.*, 1995), a injeção de AEA ou canabidiol na amígdala basolateral não produz efeito sobre a ansiedade (Lisboa *et al.*, 2007; Lisboa e Guimaraes, 2008), enquanto nós e Moreira e colaboradores (Moreira *et al.*, 2007) pudemos observar um efeito contrário após a injeção de AEA na SCPdl, sugerindo que esta estrutura é um possível local para os efeitos ansiolíticos dos canabinóides. Isto também está de acordo com efeitos antiaversivos induzidos pela administração na SCP de um agonista CB1, o HU210, observados em um modelo de resposta aversiva induzida por substâncias químicas (Finn *et al.*, 2003).

A administração sistêmica de AM404 produz efeitos ansiolíticos em paralelo a um aumento nas concentrações de AEA no sistema nervoso central (SNC) (Kathuria *et al.*, 2003; Bortolato *et al.*, 2006). Assim, a AEA agindo no SNC poderia estar envolvida no efeito ansiolítico após a administração sistêmica de AM404. De acordo com isso, foi descrito que o aumento da

extinção do medo condicionado e a atenuação da ansiedade induzidos pelo AM404 foram prevenidos pelo antagonismo de receptores CB1, indicando que o aumento nos níveis de eCBs é o principal mecanismo para estas ações (Chhatwal *et al.*, 2005; Bortolato *et al.*, 2006). Assim, a administração de AM404 na SCPdl deve ter os mesmos efeitos da AEA sobre o medo condicionado por promover aumento da AEA endógena nesta estrutura.

De forma similar ao que se tem observado com agonistas canabinóides, administração sistêmica do antagonista CB1, AM251, também gera resultados contraditórios, apresentando tanto efeitos ansiogênicos (Rodgers *et al.*, 2005; Patel e Hillard, 2006) quanto ansiolíticos (Griebel *et al.*, 2005). Assim, a injeção desta droga em estruturas cerebrais específicas pode ajudar a elucidar estes resultados controversos. Assim, embora o AM251 por si não tenha modificado qualquer medida no teste de Vogel e no medo condicionado ao contexto, sua administração na SCPdl foi capaz de bloquear os efeitos da AEA e do AM404, sugerindo o envolvimento dos receptores CB1 desta estrutura na resposta ansiolítica promovida por estas drogas nesses dois modelos animais de ansiedade, e está de acordo com o papel proposto para este receptor na modulação de comportamentos relacionados à ansiedade (Kathuria *et al.*, 2003; Bortolato *et al.*, 2006; Patel e Hillard, 2006; Moreira *et al.*, 2007).

Receptores canabinóides inibem a liberação de transmissores (Gill *et al.*, 1970). Foi demonstrado que agonistas canabinóides agem via receptores CB1 para inibir a transmissão sináptica na SCP de ratos (Vaughan *et al.*, 2000). Além do mais, o antagonista específico para CB1, SR141716, foi capaz de reverter a inibição da transmissão sináptica do tipo glutamatérgica na SCP promovida pelo agonista canabinóide WIN55,212-2, sugerindo a participação desses receptores em tal resposta (Rinaldi-Carmona *et al.*, 1994). Foi demonstrado em um estudo anterior de nosso laboratório (Guimaraes *et al.*, 1991) que o AP7, um antagonista de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, é capaz de produzir efeito tipo ansiolítico quando microinjetado na SCPdl. De acordo com isso, foi descrito que o AP7 na SCPdl não só apresenta um perfil ansiolítico com aumento da exploração dos braços abertos no LCE, mas também promove

aumento do número de lambidas punidas no teste de Vogel (Molchanov e Guimaraes, 2002). Finalmente, estudos prévios com administração de aminoácidos excitatórios na SCPdl demonstraram aumento do comportamento de congelamento e da atividade cardiovascular, caracterizado por respostas hipertensoras e de taquicardia (Krieger e Graeff, 1985; Bandler e Carrive, 1988). Estes resultados provêm indícios de que a liberação de glutamato na SCPdl é importante durante situações de ansiedade. Assim, nossos resultados sugerem que tanto a AEA quanto o AM404, pela ativação de receptores CB1, poderiam modular a resposta comportamental no teste de Vogel e as respostas comportamentais e cardiovasculares durante o medo condicionado, por promoverem redução da liberação de glutamato na SCPdl.

Como conclusões, nossos resultados confirmam que a administração de agonistas CB1 na SCPdl produz efeitos ansiolíticos. Além disso, os resultados obtidos com o bloqueio do transportador de recaptação da AEA sugerem que o sistema endocanabinóide é capaz de modular respostas de ansiedade via ativação de receptores CB1 nesta estrutura. Finalmente, os dados indicam que a SCPdl também pode estar envolvida no controle de respostas cardiovasculares decorrentes de uma resposta emocional condicionada a um estímulo aversivo.

Referências bibliográficas

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Antoniadis, E. A. e R. J. McDonald. Discriminative fear conditioning to context expressed by multiple measures of fear in the rat. Behav Brain Res, v.101, n.1, May, p.1-13. 1999.
- Ashton, H., J. Golding, V. R. Marsh, J. E. Millman e J. W. Thompson. The seed and the soil: effect of dosage, personality and starting state on the response to delta 9 tetrahydrocannabinol in man. Br J Clin Pharmacol, v.12, n.5, Nov, p.705-20. 1981.
- Bandler, R. e P. Carrive. Integrated defence reaction elicited by excitatory amino acid microinjection in the midbrain periaqueductal grey region of the unrestrained cat. Brain Res, v.439, n.1-2, Jan 26, p.95-106. 1988.
- Bandler, R., P. Carrive e S. P. Zhang. Integration of somatic and autonomic reactions within the midbrain periaqueductal grey: viscerotopic, somatotopic and functional organization. Prog Brain Res, v.87, p.269-305. 1991.
- Bandler, R., K. A. Keay, N. Floyd e J. Price. Central circuits mediating patterned autonomic activity during active vs. passive emotional coping. Brain Res Bull, v.53, n.1, Sep 1, p.95-104. 2000.
- Behbehani, M. M. Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. Prog Neurobiol, v.46, n.6, Aug, p.575-605. 1995.
- Beltramo, M., F. R. De Fonseca, M. Navarro, A. Calignano, M. A. Gorriti, *et al.* Reversal of dopamine D(2) receptor responses by an anandamide transport inhibitor. J Neurosci, v.20, n.9, May 1, p.3401-7. 2000.
- Beltramo, M., N. Stella, A. Calignano, S. Y. Lin, A. Makriyannis, *et al.* Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. Science, v.277, n.5329, Aug 22, p.1094-7. 1997.
- Berrendero, F. e R. Maldonado. Involvement of the opioid system in the anxiolytic-like effects induced by Delta(9)-tetrahydrocannabinol. Psychopharmacology (Berl), v.163, n.1, Aug, p.111-7. 2002.
- Bisogno, T., L. Hanus, L. De Petrocellis, S. Tchilibon, D. E. Ponde, *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, v.134, n.4, Oct, p.845-52. 2001.
- Blanchard, D. C. e R. J. Blanchard. Innate and conditioned reactions to threat in rats with amygdaloid lesions. J Comp Physiol Psychol, v.81, n.2, Nov, p.281-90. 1972.
- Blanchard, R. J., K. J. Flannelly e D. C. Blanchard. Defensive behavior of laboratory and wild *Rattus norvegicus*. J Comp Psychol, v.100, n.2, Jun, p.101-7. 1986.

- Blanchard, R. J., J. N. Nikulina, R. R. Sakai, C. Mckittrick, B. Mcewen, *et al.* Behavioral and endocrine change following chronic predatory stress. Physiol Behav, v.63, n.4, Feb 15, p.561-9. 1998.
- Bortolato, M., P. Campolongo, R. A. Mangieri, M. L. Scattoni, R. Frau, *et al.* Anxiolytic-like properties of the anandamide transport inhibitor AM404. Neuropsychopharmacology, v.31, n.12, Dec, p.2652-9. 2006.
- Calignano, A., G. La Rana, M. Beltramo, A. Makriyannis e D. Piomelli. Potentiation of anandamide hypotension by the transport inhibitor, AM404. Eur J Pharmacol, v.337, n.1, Oct 15, p.R1-2. 1997.
- Carlson, J. N., R. Haskew, J. Wacker, I. M. Maisonneuve, S. D. Glick, *et al.* Sedative and anxiolytic effects of zopiclone's enantiomers and metabolite. Eur J Pharmacol, v.415, n.2-3, Mar, p.181-9. 2001.
- Carobrez, A. P. [Glutamatergic neurotransmission as molecular target in anxiety]. Rev Bras Psiquiatr, v.25 Suppl 2, Dec, p.52-8. 2003.
- Carrive, P. The periaqueductal gray and defensive behavior: functional representation and neuronal organization. Behav Brain Res, v.58, n.1-2, Dec 20, p.27-47. 1993.
- Carrive, P. Conditioned fear to environmental context: cardiovascular and behavioral components in the rat. Brain Res, v.858, n.2, Mar 10, p.440-5. 2000.
- Carrive, P. e R. Bandler. Control of extracranial and hindlimb blood flow by the midbrain periaqueductal grey of the cat. Exp Brain Res, v.84, n.3, p.599-606. 1991.
- Chakrabarti, A., J. E. Ekuta e E. S. Onaivi. Neurobehavioral effects of anandamide and cannabinoid receptor gene expression in mice. Brain Res Bull, v.45, n.1, p.67-74. 1998.
- Chhatwal, J. P., M. Davis, K. A. Maguschak e K. J. Ressler. Enhancing cannabinoid neurotransmission augments the extinction of conditioned fear. Neuropsychopharmacology, v.30, n.3, Mar, p.516-24. 2005.
- Christison, R. A Dispensatory Commentary on the Pharmacopoeias of Great Britain (and the United States). Philadelphia. 1848. 971-974 p.
- Deutsch, D. G. e S. A. Chin. Enzymatic synthesis and degradation of anandamide, a cannabinoid receptor agonist. Biochem Pharmacol, v.46, n.5, Sep 1, p.791-6. 1993.
- Devane, W. A., L. Hanus, A. Breuer, R. G. Pertwee, L. A. Stevenson, *et al.* Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. Science, v.258, n.5090, Dec 18, p.1946-9. 1992.
- Di Marzo, V., A. Fontana, H. Cadas, S. Schinelli, G. Cimino, *et al.* Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. Nature, v.372, n.6507, Dec 15, p.686-91. 1994.

Di Marzo, V., D. Melck, T. Bisogno e L. De Petrocellis. Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. Trends Neurosci, v.21, n.12, Dec, p.521-8. 1998.

Easterling, K. W. e S. G. Holtzman. Central discriminative effects of morphine in rats: training via intracerebroventricular administration. Brain Res Bull, v.56, n.6, Dec, p.545-51. 2001.

Easterling, K. W. e S. G. Holtzman. In rats, acute morphine dependence results in antagonist-induced response suppression of intracranial self-stimulation. Psychopharmacology (Berl), v.175, n.3, Sep, p.287-95. 2004.

Egertova, M., B. F. Cravatt e M. R. Elphick. Comparative analysis of fatty acid amide hydrolase and cb(1) cannabinoid receptor expression in the mouse brain: evidence of a widespread role for fatty acid amide hydrolase in regulation of endocannabinoid signaling. Neuroscience, v.119, n.2, p.481-96. 2003.

Fanselow, M. The midbrain periaqueductal gray as a coordinator of action in response to fear and anxiety. In: Depaulis A e B. R. (Ed.). The midbrain periaqueductal gray matter: functional, anatomical and immunohistochemical organization. New York: Plenum Publishing Corp, 1991. The midbrain periaqueductal gray as a coordinator of action in response to fear and anxiety., p.151-173

Fanselow, M. S. Conditioned and unconditional components of post-shock freezing. Pavlov J Biol Sci, v.15, n.4, Oct-Dec, p.177-82. 1980.

Felder, C. C., E. M. Briley, J. Axelrod, J. T. Simpson, K. Mackie, *et al.* 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, v.90, n.16, Aug 15, p.7656-60. 1993.

Felder, C. C., K. E. Joyce, E. M. Briley, J. Mansouri, K. Mackie, *et al.* Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors. Mol Pharmacol, v.48, n.3, Sep, p.443-50. 1995.

Fendt, M. e M. S. Fanselow. The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. Neurosci Biobehav Rev, v.23, n.5, May, p.743-60. 1999.

Fernandez De Molina, A. e R. W. Hunsperger. Organization of the subcortical system governing defence and flight reactions in the cat. J Physiol, v.160, Feb, p.200-13. 1962.

Finn, D. P., M. D. Jhaveri, S. R. Beckett, C. H. Roe, D. A. Kendall, *et al.* Effects of direct periaqueductal grey administration of a cannabinoid receptor agonist on nociceptive and aversive responses in rats. Neuropharmacology, v.45, n.5, Oct, p.594-604. 2003.

Flores, P. e R. Pellon. Antipunishment effects of diazepam on two levels of suppression of schedule-induced drinking in rats. Pharmacol Biochem Behav, v.67, n.2, Oct, p.207-14. 2000.

Fride, E. e R. Mechoulam. Pharmacological activity of the cannabinoid receptor agonist, anandamide, a brain constituent. Eur J Pharmacol, v.231, n.2, Feb 9, p.313-4. 1993.

Galiegue, S., S. Mary, J. Marchand, D. Dussossoy, D. Carriere, *et al.* Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. Eur J Biochem, v.232, n.1, Aug 15, p.54-61. 1995.

Gentil, V. Ansiedade e transtornos ansiosos. In: V. Gentil e F. Lotufo-Neto (Ed.). Pânico, Fobias e Obsessões. São Paulo: Edusp, 1994. Ansiedade e transtornos ansiosos., p.23-30

Gill, E. W., W. D. Paton e R. G. Pertwee. Preliminary experiments on the chemistry and pharmacology of cannabis. Nature, v.228, n.5267, Oct 10, p.134-6. 1970.

Giuffrida, A., M. Beltramo e D. Piomelli. Mechanisms of endocannabinoid inactivation: biochemistry and pharmacology. J Pharmacol Exp Ther, v.298, n.1, Jul, p.7-14. 2001.

Giuffrida, A., L. H. Parsons, T. M. Kerr, F. Rodriguez De Fonseca, M. Navarro, *et al.* Dopamine activation of endogenous cannabinoid signaling in dorsal striatum. Nat Neurosci, v.2, n.4, Apr, p.358-63. 1999.

Gobbi, G., F. R. Bambico, R. Mangieri, M. Bortolato, P. Campolongo, *et al.* Antidepressant-like activity and modulation of brain monoaminergic transmission by blockade of anandamide hydrolysis. Proc Natl Acad Sci U S A, v.102, n.51, Dec 20, p.18620-5. 2005.

Gonsiorek, W., C. Lunn, X. Fan, S. Narula, D. Lundell, *et al.* Endocannabinoid 2-arachidonyl glycerol is a full agonist through human type 2 cannabinoid receptor: antagonism by anandamide. Mol Pharmacol, v.57, n.5, May, p.1045-50. 2000.

Graeff, F. Brain defense systems and anxiety. In: M. Roth, G. Burrows, *et al* (Ed.). Handbook of Anxiety: Amsterdam: Elsevier Science, v.3, 1990. Brain defense systems and anxiety, p.307-357

Graeff, F. G. Role of 5-HT in defensive behavior and anxiety. Rev Neurosci, v.4, n.2, Apr-Jun, p.181-211. 1993.

Graeff, F. G. e F. S. Guimaraes. Fundamentos de Psicofarmacologia. São Paulo: Atheneu, v.1. 1999. 238 p.

Gray, J. A. e N. Mcnaughton. The neuropsychology of anxiety: Oxford University Press. 2000

Griebel, G., G. Perrault, S. Tan, H. Schoemaker e D. J. Sanger. Comparison of the pharmacological properties of classical and novel BZ-omega receptor ligands. Behav Pharmacol, v.10, n.5, Sep, p.483-95. 1999.

Griebel, G., J. Stemmelin e B. Scatton. Effects of the cannabinoid CB1 receptor antagonist rimonabant in models of emotional reactivity in rodents. Biol Psychiatry, v.57, n.3, Feb 1, p.261-7. 2005.

Guimaraes, F. S., A. P. Carobrez, J. C. De Aguiar e F. G. Graeff. Anxiolytic effect in the elevated plus-maze of the NMDA receptor antagonist AP7 microinjected into the dorsal periaqueductal grey. Psychopharmacology (Berl), v.103, n.1, p.91-4. 1991.

Hall, W. e N. Solowij. Adverse effects of cannabis. Lancet, v.352, n.9140, Nov 14, p.1611-6. 1998.

Handley, S. L. e S. Mithani. 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.

Herkenham, M., A. B. Lynn, M. R. Johnson, L. S. Melvin, B. R. De Costa, *et al.* Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. J Neurosci, v.11, n.2, Feb, p.563-83. 1991.

Herkenham, M., A. B. Lynn, M. D. Little, M. R. Johnson, L. S. Melvin, *et al.* Cannabinoid receptor localization in brain. Proc Natl Acad Sci U S A, v.87, n.5, Mar, p.1932-6. 1990.

Hillard, C. J. Biochemistry and pharmacology of the endocannabinoids arachidonylethanolamide and 2-arachidonylglycerol. Prostaglandins Other Lipid Mediat, v.61, n.1-2, Apr, p.3-18. 2000.

Hillard, C. J., W. S. Edgemond e W. B. Campbell. Characterization of ligand binding to the cannabinoid receptor of rat brain membranes using a novel method: application to anandamide. J Neurochem, v.64, n.2, Feb, p.677-83. 1995.

Hillard, C. J., W. S. Edgemond, A. Jarrahian e W. B. Campbell. Accumulation of N-arachidonylethanolamine (anandamide) into cerebellar granule cells occurs via facilitated diffusion. J Neurochem, v.69, n.2, Aug, p.631-8. 1997.

Hohmann, A. G., R. L. Suplita, N. M. Bolton, M. H. Neely, D. Fegley, *et al.* An endocannabinoid mechanism for stress-induced analgesia. Nature, v.435, n.7045, Jun 23, p.1108-12. 2005.

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

Iwata, J. e J. E. Ledoux. Dissociation of associative and nonassociative concomitants of classical fear conditioning in the freely behaving rat. Behav Neurosci, v.102, n.1, Feb, p.66-76. 1988.

Jardim, M. C., D. C. Aguiar, F. A. Moreira e F. S. Guimaraes. Role of glutamate ionotropic and benzodiazepine receptors in the ventromedial hypothalamic nucleus on anxiety. Pharmacol Biochem Behav, v.82, n.1, Sep, p.182-9. 2005.

Kathuria, S., S. Gaetani, D. Fegley, F. Valino, A. Duranti, *et al.* Modulation of anxiety through blockade of anandamide hydrolysis. Nat Med, v.9, n.1, Jan, p.76-81. 2003.

Krieger, J. E. e F. G. Graeff. Defensive behavior and hypertension induced by glutamate in the midbrain central gray of the rat. Braz J Med Biol Res, v.18, n.1, p.61-7. 1985.

- Ledoux, J. E., A. Sakaguchi e D. J. Reis. Subcortical efferent projections of the medial geniculate nucleus mediate emotional responses conditioned to acoustic stimuli. J Neurosci, v.4, n.3, Mar, p.683-98. 1984.
- Lester, L. S. e M. S. Fanselow. Exposure to a cat produces opioid analgesia in rats. Behav Neurosci, v.99, n.4, Aug, p.756-9. 1985.
- Lisboa S. F. e F. S. Guimaraes. Cannabidiol microinjected into basolateral amygdaloid complex does not modify anxiety-like behavior in the elevated plus maze. 2008.
- Lisboa, S. F., L. B. M. Resstel, D. C. Aguiar e F. S. Guimaraes. Dorsolateral periaqueductal gray CB1 receptor activation reduces anxiety-like response in rats submitted to the Vogel test 2007.
- Lopez-Figueroa, M. O., H. E. Day, H. Akil e S. J. Watson. Nitric oxide in the stress axis. Histol Histopathol, v.13, n.4, Oct, p.1243-52. 1998.
- Mackie, K. Cannabinoid receptors as therapeutic targets. Annu Rev Pharmacol Toxicol, v.46, p.101-22. 2006.
- Mackie, K., W. A. Devane e B. Hille. Anandamide, an endogenous cannabinoid, inhibits calcium currents as a partial agonist in N18 neuroblastoma cells. Mol Pharmacol, v.44, n.3, Sep, p.498-503. 1993.
- Mackie, K. e B. Hille. Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma-glioma cells. Proc Natl Acad Sci U S A, v.89, n.9, May 1, p.3825-9. 1992.
- Mackie, K., Y. Lai, R. Westenbroek e R. Mitchell. Cannabinoids activate an inwardly rectifying potassium conductance and inhibit Q-type calcium currents in AtT20 cells transfected with rat brain cannabinoid receptor. J Neurosci, v.15, n.10, Oct, p.6552-61. 1995.
- Mantyh, P. W. Forebrain projections to the periaqueductal gray in the monkey, with observations in the cat and rat. J Comp Neurol, v.206, n.2, Apr 1, p.146-58. 1982a.
- Mantyh, P. W. The midbrain periaqueductal gray in the rat, cat, and monkey: a Nissl, Weil, and Golgi analysis. J Comp Neurol, v.204, n.4, Feb 1, p.349-63. 1982b.
- Marco, E. M., L. Perez-Alvarez, E. Borcel, M. Rubio, C. Guaza, *et al.* Involvement of 5-HT1A receptors in behavioural effects of the cannabinoid receptor agonist CP 55,940 in male rats. Behav Pharmacol, v.15, n.1, Feb, p.21-7. 2004.
- Marin, S., E. Marco, M. Biscaia, B. Fernandez, M. Rubio, *et al.* Involvement of the kappa-opioid receptor in the anxiogenic-like effect of CP 55,940 in male rats. Pharmacol Biochem Behav, v.74, n.3, Feb, p.649-56. 2003.
- Martin, W. J., S. L. Patrick, P. O. Coffin, K. Tsou e J. M. Walker. An examination of the central sites of action of cannabinoid-induced antinociception in the rat. Life Sci, v.56, n.23-24, p.2103-9. 1995.

- Matsuda, L. A., T. I. Bonner e S. J. Lolait. Localization of cannabinoid receptor mRNA in rat brain. J Comp Neurol, v.327, n.4, Jan 22, p.535-50. 1993.
- Matsuda, L. A., S. J. Lolait, M. J. Brownstein, A. C. Young e T. I. Bonner. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. Nature, v.346, n.6284, Aug 9, p.561-4. 1990.
- Mcnaughton, N. e P. J. Corr. A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. Neurosci Biobehav Rev, v.28, n.3, May, p.285-305. 2004.
- Mechoulam, R., S. Ben-Shabat, L. Hanus, M. Ligumsky, N. E. Kaminski, *et al.* Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. Biochem Pharmacol, v.50, n.1, Jun 29, p.83-90. 1995.
- Mechoulam, R., E. Fride e V. Di Marzo. Endocannabinoids. Eur J Pharmacol, v.359, n.1, Oct 16, p.1-18. 1998.
- Millan, M. J. e M. Brocco. The Vogel conflict test: procedural aspects, gamma-aminobutyric acid, glutamate and monoamines. Eur J Pharmacol, v.463, n.1-3, Feb 28, p.67-96. 2003.
- Molchanov, M. L. e F. S. Guimaraes. Anxiolytic-like effects of AP7 injected into the dorsolateral or ventrolateral columns of the periaqueductal gray of rats. Psychopharmacology (Berl), v.160, n.1, Feb, p.30-8. 2002.
- Moreira, F. A., D. C. Aguiar e F. S. Guimaraes. Anxiolytic-like effect of cannabinoids injected into the rat dorsolateral periaqueductal gray. Neuropharmacology, v.52, n.3, Mar, p.958-65. 2007.
- Morgan, M.M., P. K. Whitney, *et al.* Immobility and flight associated with antinociception produced by activation of the ventral and lateral/ dorsal regions of the rat periaqueductal gray. Brain Res, v.804, n.1, Aug 31, p. 159-66. 1988.
- Mukhopadhyay, S., B. M. Chapnick e A. C. Howlett. Anandamide-induced vasorelaxation in rabbit aortic rings has two components: G protein dependent and independent. Am J Physiol Heart Circ Physiol, v.282, n.6, Jun, p.H2046-54. 2002.
- Munro, S., K. L. Thomas e M. Abu-Shaar. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. Nature, v.365, n.6441, Sep 2, p.61-5. 1993.
- Nauta, W. J. Hippocampal projections and related neural pathways to the midbrain in the cat. Brain, v.81, n.3, Sep, p.319-40. 1958.
- Nijssen, M. J., G. Croiset, M. Diamant, M. H. Broekhoven, D. De Wied, *et al.* Vagal activation in novelty-induced tachycardia during the light phase in the rat. Physiol Behav, v.63, n.2, Jan, p.233-9. 1998.
- Ohno-Shosaku, T., T. Maejima e M. Kano. Endogenous cannabinoids mediate retrograde signals from depolarized postsynaptic neurons to presynaptic terminals. Neuron, v.29, n.3, Mar, p.729-38. 2001.

- Onaivi, E. S. Neuropsychobiological evidence for the functional presence and expression of cannabinoid CB2 receptors in the brain. Neuropsychobiology, v.54, n.4, p.231-46. 2006.
- Onaivi, E. S., A. Chakrabarti, E. T. Gwebu e G. Chaudhuri. Neurobehavioral effects of delta 9-THC and cannabinoid (CB1) receptor gene expression in mice. Behav Brain Res, v.72, n.1-2, Dec 14, p.115-25. 1995.
- Onaivi, E. S., M. R. Green e B. R. Martin. Pharmacological characterization of cannabinoids in the elevated plus maze. J Pharmacol Exp Ther, v.253, n.3, Jun, p.1002-9. 1990.
- Onaivi, E. S., H. Ishiguro, J. P. Gong, S. Patel, A. Perchuk, *et al.* Discovery of the presence and functional expression of cannabinoid CB2 receptors in brain. Ann N Y Acad Sci, v.1074, Aug, p.514-36. 2006.
- Pacher, P., S. Batkai e G. Kunos. The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. Pharmacol Rev, v.58, n.3, Sep, p.389-462. 2006.
- Patel, S. e C. J. Hillard. 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, v.318, n.1, Jul, p.304-11. 2006.
- Paton, W. D. Cannabis and its problems. Proc R Soc Med, v.66, n.7, Jul, p.718-21. 1973.
- Paton, W. D. e R. G. Pertwee. Effect of cannabis and certain of its constituents on pentobarbitone sleeping time and phenazone metabolism. Br J Pharmacol, v.44, n.2, Feb, p.250-61. 1972.
- Paxinos, G. e C. Watson. The rat brain in stereotaxic coordinates. New York: Academic Press. 1997
- Pellow, S. e S. E. File. 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.
- Piomelli, D. The molecular logic of endocannabinoid signalling. Nat Rev Neurosci, v.4, n.11, Nov, p.873-84. 2003.
- Piomelli, D., M. Beltramo, S. Glasnapp, S. Y. Lin, A. Goutopoulos, *et al.* Structural determinants for recognition and translocation by the anandamide transporter. Proc Natl Acad Sci U S A, v.96, n.10, May 11, p.5802-7. 1999.
- Resstel, L. B., S. R. Joca, F. G. Guimaraes e F. M. Correa. Involvement of medial prefrontal cortex neurons in behavioral and cardiovascular responses to contextual fear conditioning. Neuroscience, v.143, n.2, Dec 1, p.377-85. 2006.
- Resstel, L. B., S. R. Joca, F. A. Moreira, F. M. Correa e F. S. Guimaraes. Effects of cannabidiol and diazepam on behavioral and cardiovascular responses induced by contextual conditioned fear in rats. Behav Brain Res, v.172, n.2, Sep 25, p.294-8. 2006.

Rinaldi-Carmona, M., F. Barth, M. Heaulme, D. Shire, B. Calandra, *et al.* SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. FEBS Lett, v.350, n.2-3, Aug 22, p.240-4. 1994.

Rodgers, R. J., P. M. Evans e A. Murphy. Anxiogenic profile of AM-251, a selective cannabinoid CB1 receptor antagonist, in plus-maze-naïve and plus-maze-experienced mice. Behav Pharmacol, v.16, n.5-6, Sep, p.405-13. 2005.

Rutkowska, M., J. Jamontt e H. Gliniak. Effects of cannabinoids on the anxiety-like response in mice. Pharmacol Rep, v.58, n.2, Mar-Apr, p.200-6. 2006.

Schatz, A. R., M. Lee, R. B. Condie, J. T. Pulaski e N. E. Kaminski. Cannabinoid receptors CB1 and CB2: a characterization of expression and adenylate cyclase modulation within the immune system. Toxicol Appl Pharmacol, v.142, n.2, Feb, p.278-87. 1997.

Schenberg, L. C., A. S. Bittencourt, E. C. Sudre e L. C. Vargas. Modeling panic attacks. Neurosci Biobehav Rev, v.25, n.7-8, Dec, p.647-59. 2001.

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

Tsou, K., S. Brown, M. C. Sanudo-Pena, K. Mackie e J. M. Walker. Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. Neuroscience, v.83, n.2, Mar, p.393-411. 1998.

Ueda, N., Y. Kurahashi, S. Yamamoto e T. Tokunaga. Partial purification and characterization of the porcine brain enzyme hydrolyzing and synthesizing anandamide. J Biol Chem, v.270, n.40, Oct 6, p.23823-7. 1995.

Vaughan, C. W., M. Connor, E. E. Bagley e M. J. Christie. Actions of cannabinoids on membrane properties and synaptic transmission in rat periaqueductal gray neurons in vitro. Mol Pharmacol, v.57, n.2, Feb, p.288-95. 2000.

Viveros, M. P., E. M. Marco e S. E. File. Endocannabinoid system and stress and anxiety responses. Pharmacol Biochem Behav, v.81, n.2, Jun, p.331-42. 2005.

Viveros, M. P., E. M. Marco, R. Llorente e L. Lamota. The role of the hippocampus in mediating emotional responses to nicotine and cannabinoids: a possible neural substrate for functional interactions. Behav Pharmacol, v.18, n.5-6, Sep, p.375-89. 2007.

Vogel, J. R., B. Beer e D. E. Clody. A simple and reliable conflict procedure for testing anti-anxiety agents. Psychopharmacologia, v.21, n.1, p.1-7. 1971.

Walker, J. M., S. M. Huang, N. M. Strangman, K. Tsou e M. C. Sanudo-Pena. Pain modulation by release of the endogenous cannabinoid anandamide. Proc Natl Acad Sci U S A, v.96, n.21, Oct 12, p.12198-203. 1999.

Zhang, W. N., C. A. Murphy e J. Feldon. Behavioural and cardiovascular responses during latent inhibition of conditioned fear: measurement by telemetry and conditioned freezing. Behav Brain Res, v.154, n.1, Sep 23, p.199-209. 2004.

Zuardi, A. W., I. Shirakawa, E. Finkelfarb e I. G. Karniol. Action of cannabidiol on the anxiety and other effects produced by delta 9-THC in normal subjects. Psychopharmacology (Berl), v.76, n.3, p.245-50. 1982.





Activation of CB1 cannabinoid receptors in the dorsolateral periaqueductal gray reduces the expression of contextual fear conditioning in rats.

Journal:	<i>Psychopharmacology</i>
Manuscript ID:	Psych-2007-00620
Manuscript Type:	original investigation
Date Submitted by the Author:	13-Nov-2007
Complete List of Authors:	Resstel, Leonardo; School of Medicine of Ribeirão Preto, Pharmacology Lisboa, Sabrina; School of Medicine of Ribeirão Preto, Pharmacology Aguiar, Daniele; School of Medicine of Ribeirão Preto, Pharmacology Corrêa, Fernando; School of Medicine of Ribeirão Preto, Pharmacology Guimarães, Francisco; School of Medicine of Ribeirão Preto, Pharmacology
Keywords:	CB1 receptors, anandamide, anxiolytic-like effect

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13 **Activation of CB1 cannabinoid receptors in the dorsolateral periaqueductal gray**
14 **reduces the expression of contextual fear conditioning in rats.**
15
16
17

18
19
20 Resstel, LBM^{1*}; Lisboa, SF¹; Aguiar, DC; Corrêa, FMA; Guimarães, FS.
21
22

23
24 Department of Pharmacology, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São
25 Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil.
26
27
28

29
30
31 *Correspondence to: Dr. Leonardo Resstel, Department of Pharmacology, School of
32 Medicine of Ribeirão Preto, USP, Av. Bandeirantes 3900, 14049-900, Ribeirão Preto, São
33 Paulo, Brazil.
34
35
36

37
38 Fax: + 55-16-633-2301.
39

40
41 E-mail: leoresstel@yahoo.com.br
42

43
44 ¹ The authors contributed equally to this work.
45
46

47 **Running title:** dlPAG CB1 cannabinoid receptors and conditioned fear response.
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

ABSTRACT

In rats, conditioned fear to context causes freezing immobility and cardiovascular changes. It also increases neuronal activation of the dorsolateral region of the periaqueductal gray (dlPAG). Since microinjection of CB1 cannabinoid receptor agonist into the dlPAG evokes anxiolytic-like effects and the conditioned fear to context test has been widely used to measure anxiety, the aim of the present study was to verify if direct administration into the dlPAG of the CB1 cannabinoid receptor agonist anandamide (AEA) or the anandamide transport inhibitor AM404 would attenuate the behavioral (freezing) and cardiovascular (increase of arterial pressure and heart rate) responses of rats submitted to a contextual fear conditioning paradigm. The results showed that both the freezing and cardiovascular responses were reduced by local administration of either AEA (5 nmol/ 200 nL) or AM404 (50 pmol/ 200nL) into the dlPAG before re-exposition to the aversively conditioned context. Moreover, these drug effects were abolished when the animals were locally pretreated with AM251 (100 pmol/200nL), a CB1 receptor antagonist. These results indicate that endocannabinoids in the dlPAG could attenuate the expression of the contextual fear responses.

Key words: CB1 receptors, anandamide, anxiolytic-like effect.

INTRODUCTION

Re-exposure of rats to an environment where they had previously being submitted to an aversive stimulation such as electrical footshocks causes cardiovascular and behavioral changes characterized by complete immobility (freezing) and mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) increases (Blanchard and Blanchard, 1969; Fanselow, 1980; Resstel et al., 2006a).

The periaqueductal gray matter (PAG) is a midbrain structure that has been widely related to defense responses. Although electrical or chemical stimulation of the dorsal portion of PAG is usually related the flight reactions, it can also produces freezing responses and increased cardiovascular activity (Krieger and Graeff 1985; Bandler and Carrive 1988). Reinforcing a possible role of this region in conditioned fear, re-exposure to aversively conditioned context increases neuronal activity in the PAG (Carive et al., 1997 and 2000) and PAG lesions block freezing to aversively conditioned stimulus (LeDoux et al. 1988; Amorapanth et al. 1999).

Cannabinoid CB1 receptors and endogenous cannabinoid agonists such as anandamide (AEA) and 2-arachidonoylglycerol are widely located in the brain (Devane et al., 1988 and 1992; Matsuda et al., 1990; Mechoulam et al., 1995; Sugiura et al., 1995) and have been proposed to play an important role in several functions of the central nervous system (CNS, Smith et al., 1994; Adams et al., 1998). CB1 receptors are expressed in the PAG (Herkenham et al., 1991; Bandler et al., 2000; Egertova et al., 2003) and a recent study from our laboratory showed that intra- dorsolateral PAG (dIPAG) administration of AEA increases both the time spent and the number of entries into the open arms of an elevated plus-maze (EPM), indicating an anxiolytic-like effect (Moreira et al., 2007). These results suggest that the local endocannabinoid system into dIPAG modulates defensive responses.

1
2
3 This hypothesis, however, has not yet been tested in other animal models such as contextual
4 fear conditioning. The aim of the present study, therefore, was to test this hypothesis by
5 verifying the effects of intra-dIPAG administration of AEA or AM404, an AEA re-uptake
6 inhibitor on the behavior and cardiovascular responses of rats re-exposed to an aversively
7 conditioned context. We also tested if effects of AEA or AM404 are being mediated by
8 CB1 receptors by locally pretreating the animals with AM251, a CB1 receptor antagonist.
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19

20 **METHODS**

21 **Animals.**

22
23
24 Thirty seven male Wistar rats weighing 210-230 g were used. Animals were kept in the
25 Animal Care Unit of the Department of Pharmacology, School of Medicine of Ribeirão
26 Preto, University of São Paulo. Rats were housed individually in plastic cages with free
27 access to food and water and under a 12 h light/dark cycle (lights on at 06:30 h). The
28 Institution's Animal Ethics Committee approved the housing conditions and experimental
29 protocols.
30
31
32
33
34
35
36
37

38 **Surgical procedures.**

39
40 Seven days before the experiment rats were anesthetized with tribromoethanol (250 mg/ kg
41 i.p.). After scalp anaesthesia with 2% lidocaine, a stainless steel guide cannula (0.6 mm
42 OD) was implanted unilaterally on the right side aimed at the dIPAG (coordinates: AP = 0
43 from lambda, L = 1.9 mm at an angle of 16°, D = 4.0 mm) according to the atlas published
44 by Paxinos and Watson (1997). The cannula was fixed to the skull with dental cement and a
45 metal screw. One day before the test rats were anesthetized with tribromoethanol and a
46 catheter (a 4 cm PE-10segment heat-bound to a 13 cm PE-50segment, Clay Adams, USA)
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 was inserted into the abdominal aorta through the femoral artery for blood pressure
4 recording. Catheters were tunnelled under the skin and exteriorized on the animal's dorsum.
5
6

7 8 **Drugs**

9
10 The endogenous cannabinoid anandamide (TOCRIS) and the anandamide transporter (AT)
11 inhibitor 4-hydroxyphenylarachidonylamide (AM404; TOCRIS) were dissolved in
12 Tocrisolve™ 100 (the formulation is composed of a 1:4 ratio of soya oil/water, and is
13 emulsified with the block co-polymer Pluronic F68). The CB1 cannabinoid receptor
14 antagonist N-(piperidin-1-yl)-5-(4-iodophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methyl-1H-pyrazole-
15 3-carboxamide (AM251; TOCRIS, USA) was dissolved in DMSO 10% in saline (0.9%
16 NaCl). The solutions were prepared immediately before use and were kept on ice and
17 protected from the light during the experimental sessions.
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28

29 **Fear conditioning and testing.**

30
31 Preconditioning, conditioning and testing were carried out in 25x22x22 cm foot shock box.
32
33 The box had a grid floor composed of 18 stainless steel rods (2 mm in diameter), spaced 1.5
34 cm apart and wired to a shock generator (Automatic Reflex Conditioner, model 8572 - Ugo
35 Basile, Italy). The experimental box was cleaned with 70% ethanol before and after use.
36
37 Preconditioning started 1 week after guide cannula implantation and consisted of one 10-
38 min-long pre-exposure (habituation) to the foot shock box. The conditioning shock session
39 was performed 24 hours after habituation. After 3 min of habituation animals were
40 submitted to a shock session consisting of six 1.5 mA/3 s electric foot shocks (Resstel et al.,
41 2006b) delivered at 20 s to 1 min intervals. Twenty-four h after the conditioning session a
42 catheter was implanted into the femoral artery for blood pressure and heart rate recording.
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603
604
605
606
607
608
609
610
611
612
613
614
615
616
617
618
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816
817
818
819
820
821
822
823
824
825
826
827
828
829
830
831
832
833
834
835
836
837
838
839
840
841
842
843
844
845
846
847
848
849
850
851
852
853
854
855
856
857
858
859
860
861
862
863
864
865
866
867
868
869
870
871
872
873
874
875
876
877
878
879
880
881
882
883
884
885
886
887
888
889
890
891
892
893
894
895
896
897
898
899
900
901
902
903
904
905
906
907
908
909
910
911
912
913
914
915
916
917
918
919
920
921
922
923
924
925
926
927
928
929
930
931
932
933
934
935
936
937
938
939
940
941
942
943
944
945
946
947
948
949
950
951
952
953
954
955
956
957
958
959
960
961
962
963
964
965
966
967
968
969
970
971
972
973
974
975
976
977
978
979
980
981
982
983
984
985
986
987
988
989
990
991
992
993
994
995
996
997
998
999
1000

1
2
3 The test session consisted of a 10 min-long re-exposure to the foot shock chamber without
4 shock delivery. Animals were transferred from the animal room to the experimental room
5
6 (a different room was used for conditioning) in their home box. MAP and HR were
7
8 recorded using an HP-7754A amplifier (Hewlett Packard, USA) connected to a signal
9
10 acquisition board (Biopac M-100, USA) and a computer. The cardiovascular recordings
11
12 began after an adaptation period of 1 h to the acoustically isolated experimental room in the
13
14 laboratory. Rats were tested only once. Freezing was evaluated during the test by an
15
16 experimenter blind to the treatment groups sat 30 cm away from the foot shock chamber. It
17
18 was defined as the complete absence of movement other than respiration while the animal
19
20 assumed a characteristic tense posture (Fanselow, 1980).
21
22
23
24
25

26 27 **Experimental design.**

28
29 Six groups of animals received unilateral injection into the dIPAG of 200 nL of vehicle
30
31 (vehicle AEA or AM404 + vehicle AM251, n=7), AM251 vehicle + AEA (5 nmol, n=6),
32
33 AM251 vehicle + AM404 (50 nmol, n=6), AM251 (100 pmol) + AEA (n=6), AM251 +
34
35 AM404 (n=6) or AM251 + 200 nL of vehicle (n=6). The dose of AEA was based on that
36
37 that produced anxiolytic effects in the EPM. The doses of AM404 and AM251 were based
38
39 on those that potentiated or blocked, respectively, these effects in the same study (Moreira
40
41 et al., 2006). A 33G needle (Small Parts, Miami Lakes, FL, USA) 1 mm longer than the
42
43 guide cannula, connected to a 10 μ L syringe (7001 KH, Hamilton Co., USA) through a PE-
44
45 10 tubing, was used. The needles were carefully inserted into the guide cannulas and the
46
47 solutions were infused over a 15 s period. They remained in place for an additional 20 s
48
49 period to prevent reflux.
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 The interval between the first and second microinjection was 5 min and the animals were
4 tested 10 min after the last microinjection. In all animals the cardiovascular as well
5
6 behavioural responses were recorded during the test chamber re-exposition.
7
8
9

10 **Histological Procedure**

11
12 At the end of the experiments the rats were anesthetized with urethane (1.25 g/ kg, i.p.) and
13 200 nL of 1% Evan's blue dye was unilaterally injected in the dIPAG as a site marker. The
14
15 chest was surgically opened; the descending aorta occluded; the right atrium severed and
16
17 the brain perfused with 10% formalin through the left ventricle. Brains were post fixed for
18
19 24 h at 4°C and 40 µm sections were cut using a cryostat (CM-1900, Leica, Germany).
20
21 Serial brain sections were stained with 1% neutral red and injection sites determined using
22
23 the rat brain atlas of Paxinos and Watson (1997) as reference (Figure 1).
24
25
26
27
28

29 **Data Analysis**

30
31 The MAP and HR values were continuously recorded in the 5 min period before and during
32
33 the 10 min test period. Data were expressed as means \pm SEM of MAP or HR changes
34
35 (respectively Δ MAP and Δ HR) sampled at 60 s intervals. Points sampled during the 300 s
36
37 before exposure were used as control baseline value. MAP and HR changes were analyzed
38
39 using a two-way repeated measure ANOVA with group treatment as main independent
40
41 factor and time as a repeated measurement. When interactions between the factors were
42
43 observed, groups were compared at specific times using Bonferroni's post-hoc test.
44
45
46
47

48 Freezing was expressed as percentage of the total test period (10 min). Freezing was
49
50 analyzed using one-way ANOVA followed by Bonferroni's post-hoc test. $P < 0.05$ was
51
52 considered significant.
53
54
55
56
57
58
59
60

RESULTS

A representative photomicrograph and a diagrammatic representation indicating the injection sites in the dlPAG can be seen in Figure 1. Compared to the vehicle group, no changes were observed in either the behavior or cardiovascular responses when both AEA and AM404 were microinjected into dlPAG surrounding structures.

Behavioral responses to fear conditioning

There were significant effects of treatment ($F_{5, 31}=39.1$, $p<0.001$) on the percentage of freezing. Intra-dlPAG injection of either AEA ($p<0.001$) or AM404 ($p<0.001$) significantly reduced the percentage of freezing when compared to vehicle-treated animals (Figure 2). No effect was observed when AM251 was injected into the dlPAG ($p>0.05$). However, AM251 was able to reduce the effects of both AEA ($p>0.05$) and AM404 ($p>0.05$, Figure 2).

Cardiovascular responses to fear conditioning

No differences were observed at basal values of MAP ($F_{5, 31}=0.9$, $p>0.05$) or HR ($F_{5, 31}=0.4$, $p>0.05$) among all group of animals. There were significant effects of treatment (MAP: $F_{5, 465}=134.6$, $p<0.001$ and HR: $F_{28, 336}=167.1$, $p<0.001$) and time (MAP: $F_{14, 465}=145.5$, $p<0.001$ and HR: $F_{14, 465}=168.5$, $p<0.001$). Also, there was a significant interaction between treatment and time (MAP: $F_{70, 465}=5.3$, $p<0.001$ and HR: $F_{70, 465}=6.5$, $p<0.001$). Injections of AEA into the dlPAG attenuated the increase in cardiovascular response during the test (MAP: $F_{1, 165}=229$, $p<0.001$ and HR: $F_{1, 165}=379.8$, $p<0.001$, Figure 3). Similar to AEA, AM404 administration into the dlPAG also attenuated the increase in HR and MAP during the test (MAP: $F_{1, 165}=165.2$, $p<0.001$ and HR: $F_{1, 165}=226$, $p<0.001$, Figure 3). No changes were observed when AM251 was administered alone (MAP: $F_{1, 165}=2.3$, $p>0.05$ and HR: $F_{1, 165}=2.56$, $p>0.05$, Figure 3). However, this treatment was able to inhibit both

1
2
3 AEA (MAP: $F_{1, 150}=254.6$, $p<0.001$ and HR: $F_{1, 150}=433.3$, $p<0.01$) and AM404 (MAP: $F_{1, 150}=449.1$, $p<0.001$ and HR: $F_{1, 150}=486.4$, $p<0.001$) effects on cardiovascular responses
4
5
6
7
8 observed during the chamber re-exposition (Figure 3). A representative recording of the
9
10 cardiovascular effects of AEA microinjection in the dlPAG and AM251 influence on these
11
12 effects are presented in Figure 4.
13
14
15
16
17

18 Discussion

19
20 The present study showed that conditioned rats presented freezing and MAP and HR
21
22 increases immediately after being placed in the test chamber, confirming that re-exposure
23
24 to a context previously paired with aversive (footshock) stimulus induces behavioral and
25
26 autonomic responses typically observed in studies employing contextual fear conditioning
27
28 paradigms (Zhang et al. 2004, Resstel et al. 2006a, 2006b). These responses were
29
30 significantly reduced by intra-dlPAG injection of AEA, a cannabinoid receptors agonist, or
31
32 AM404, an AEA transport inhibitor. Previous studies, using animal models such as the
33
34 EPM, Vogel conflict test, local aversive stimulation, have demonstrated that the dlPAG
35
36 plays an important role in anxiety modulation in rats (Molchanov and Guimarães, 2002;
37
38 Moreira et al., 2007; Matheus et al., 1994). Our results, in addition to reinforcing the idea of
39
40 an important role of dlPAG on conditioned fear responses (Amorapanth et al., 1999), also
41
42 indicate that local endocannabinoids can modulate these responses.
43
44
45
46
47

48 Systemic administration of AM404 induces anxiolytic-like effects and a parallel increase in
49
50 AEA concentrations in the CNS (Bortolato et al., 2006; Kathuria et al., 2003), suggesting
51
52 that this endocannabinoid could be involved in the reported anxiolytic-like activity of
53
54 systemic administration of AM404. Accordingly, the enhancement of conditioned fear
55
56 extinction and the attenuation of anxiety induced by AM404 are prevented by a CB1
57
58
59
60

1
2
3 receptor antagonist, indicating that an increase in the level of endocannabinoids is the main
4 mechanism for these effects (Bortolato et al., 2006; Chhatwal et al., 2005). Corroborating
5 this proposal, the conditioned fear attenuation induced by AM404 administration into the
6 dIPAG was also blocked by local treatment with a CB1 receptor antagonist.
7
8
9

10
11
12 The attenuation of fear responses by administration of AEA and AM404 in the dIPAG
13 agrees with the anxiolytic effects observed after systemic administration of low doses of
14 Δ 9-THC (Δ 9-Tetrahydrocannabinol, the major psychoactive component of the Cannabis
15 sativa), synthetic cannabinoids or AM404 in rodents (Berrendero and Maldonado, 2002;
16 Patel and Hillard, 2006; Bortolato et al., 2006). This is in line with the anti-aversive effects
17 induced by intra-dorsal PAG injection of the CB1 receptor agonist HU210, as observed in a
18 model of chemically-induced aversive response (Finn et al., 2003). Thus, our study
19 reinforces the potential role of dIPAG as an important site for the anxiolytic action of
20 cannabinoids.
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32

33
34 AEA exert most of its actions in the CNS via the CB1cannabinoid receptor (Matsouda et
35 al., 1990; Rinaldi-Carmona et al., 1994). Thus, to verify if local CB1 receptors in the
36 dIPAG were involved in AEA and AM404 effects on fear conditioned responses, a
37 selective antagonist for CB1 receptors, AM251 was used. The observation that the
38 reduction of both freezing and cardiovascular responses evoked by dIPAG microinjection
39 of AEA or AM404 was inhibited by pretreatment with AM251 reinforces the idea of the
40 involvement of CB1 receptors on this effect. These results also agree with the proposed
41 involvement of these receptors on anxiety modulation (Bortolato et al., 2006; Kathuria et
42 al., 2003; Patel and Hillard, 2006).
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54

55
56 Previous results from our laboratory (Moreira et al., 2007) showed that administration of
57 AEA into the dIPAG induces anxiolytic-like effects in the EPM, which were prevented by
58
59
60

1
2
3 AM251. In this work, however, AM404 was ineffective by itself whereas in the present
4
5 study this drug was able to attenuate fear conditioned responses. Although at the moment it
6
7 is only possible to speculate about the reasons for this difference, it suggests that local PAG
8
9 endocannabinoid system plays a more significant role when animals are confronted with
10
11 putative more intense aversive stimulus such as re-exposure to a fear conditioned context,
12
13 as compared to the EPM. This is in line with a study showing increased concentrations of
14
15 AEA in the PAG after exposure to more intense aversive stimuli such as electrical
16
17 footshock (Chhatwal et al., 2005; Bortolato et al., 2006).
18
19

20
21 Cannabinoid receptors are able to inhibit neurotransmitter release (Gill et al., 1970). In the
22
23 PAG cannabinoid agonists inhibit glutamatergic synaptic transmission (Vaughan et al.,
24
25 2000). Moreover, this inhibition of glutamatergic synaptic transmission in the PAG by the
26
27 cannabinoid agonist WIN55,212-2 is reversed by the CB1-specific antagonist SR141716,
28
29 indicating that it is mediated by activation of these receptors (Rinaldi-Carmona et al.,
30
31 1994). Several studies have shown that antagonism of glutamate-mediated
32
33 neurotransmission in the dlPAG produces anxiolytic responses in distinct animal models
34
35 (Guimarães et al, 1991, Matheus et al., 1994, de Oliveira et al., 2001, Molchanov and
36
37 Guimarães, 2002). Electrical or chemical stimulation of this region, on the other hand,
38
39 evokes intense defensive reactions (Krieger and Graeff 1985; Bandler and Carrive 1988).
40
41 Together, these pieces of evidence suggest that in the present study AEA and AM404 are
42
43 attenuating the expression of fear conditioned responses by reducing glutamate release in
44
45 the PAG due to CB1 receptor activation.
46
47
48
49
50
51

52
53 In conclusion, the present results indicate that CB1 receptors in the dlPAG could play an
54
55 important modulatory role on the expression of the behavioral and cardiovascular responses
56
57 observed during fear evoked by aversive contextual conditioning.
58
59
60

Acknowledgments

The authors wish to thank Ivanilda A.C. Fortunato and José Carlos Aguiar for technical support. Research supported by grants from CNPq and FAPESP.

REFERENCES

- Adams IB, Compton DR, Martin BR (1998) Assessment of anandamide interaction with the cannabinoid brain receptor: SR 141716A antagonism studies in mice and autoradiographic analysis of receptor binding in rat brain. *J Pharmacol Exp Ther* 284: 1209-17
- Amorapanth P, Nader K, LeDoux JE (1999) Lesions of periaqueductal gray dissociate-conditioned freezing from conditioned suppression behavior in rats. *Learn Mem* 6: 491-9
- Bandler R, Carrive P (1988) Integrated defence reaction elicited by excitatory amino acid microinjection in the midbrain periaqueductal grey region of the unrestrained cat. *Brain Res* 439: 95-106
- Bandler R, Keay KA, Floyd N, Price J (2000) Central circuits mediating patterned autonomic activity during active vs. passive emotional coping. *Brain Res Bull* 53: 95-104
- Berrendero F, Maldonado R (2002) Involvement of the opioid system in the anxiolytic-like effects induced by Delta(9)-tetrahydrocannabinol. *Psychopharmacology (Berl)* 163: 111-7

1
2
3 Blanchard RJ, Blanchard DC (1969) Passive and active reactions to fear-eliciting stimuli. J
4
5 Comp Physiol Psychol 68: 129-35
6

7
8
9 Bortolato M, Campolongo P, Mangieri RA, Scattoni ML, Frau R, Trezza V, La Rana G,
10
11 Russo R, Calignano A, Gessa GL, Cuomo V, Piomelli D (2006) Anxiolytic-like
12
13 properties of the anandamide transport inhibitor AM404.
14
15 Neuropsychopharmacology 31: 2652-9
16

17
18
19 Carrive P, Lee J, Su A (2000) Lidocaine blockade of amygdala output in fear-conditioned
20
21 rats reduces Fos expression in the ventrolateral periaqueductal gray. Neuroscience
22
23 95: 1071-80
24
25

26
27
28 Carrive P, Leung P, Harris J, Paxinos G (1997) Conditioned fear to context is associated
29
30 with increased Fos expression in the caudal ventrolateral region of the midbrain
31
32 periaqueductal gray. Neuroscience 78: 165-77
33
34

35
36 Chhatwal JP, Davis M, Maguschak KA, Ressler KJ (2005) Enhancing cannabinoid
37
38 neurotransmission augments the extinction of conditioned fear.
39
40 Neuropsychopharmacology 30: 516-24
41
42

43
44 de Oliveira RM, Del Bel EA, Guimarães FS (2001) Effects of excitatory amino acids and
45
46 nitric oxide on flight behavior elicited from the dorsal periaqueductal gray.
47
48 Neurosci. Biobeh. Rev., 25:679-685
49

50
51
52 Devane WA, Dysarz FA, 3rd, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC (1988) Determination
53
54 and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. Mol Pharmacol 34: 605-
55

1
2
3 Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D,
4
5 Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R (1992) Isolation and structure of a brain
6
7 constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 258: 1946-9
8
9

10
11 Egertova M, Cravatt BF, Elphick MR (2003) Comparative analysis of fatty acid amide
12
13 hydrolase and cb(1) cannabinoid receptor expression in the mouse brain: evidence
14
15 of a widespread role for fatty acid amide hydrolase in regulation of
16
17 endocannabinoid signaling. *Neuroscience* 119: 481-96
18
19

20
21 Fanselow MS (1980) Conditioned and unconditional components of post-shock freezing.
22
23 Pavlov J Biol Sci 15: 177-82
24
25

26
27 Finn DP, Jhaveri MD, Beckett SR, Roe CH, Kendall DA, Marsden CA, Chapman V (2003)
28
29 Effects of direct periaqueductal grey administration of a cannabinoid receptor
30
31 agonist on nociceptive and aversive responses in rats. *Neuropharmacology* 45: 594-
32
33 604
34
35

36
37 Gill EW, Paton WD, Pertwee RG (1970) Preliminary experiments on the chemistry and
38
39 pharmacology of cannabis. *Nature* 228: 134-6
40
41

42
43 Guimarães FS, Carobrez AP, De Aguiar JC, Graeff FG (1991) Anxiolytic effect in the
44
45 elevated plus-maze of the NMDA receptor antagonist AP7 microinjected into the
46
47 dorsal periaqueductal grey. *Psychopharmacology (Berl)* 103: 91-4
48
49

50
51 Herkenham M, Lynn AB, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, Rice KC (1991)
52
53 Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a
54
55 quantitative in vitro autoradiographic study. *J Neurosci* 11: 563-83
56
57
58
59
60

- 1
2
3 Kathuria S, Gaetani S, Fegley D, Valino F, Duranti A, Tontini A, Mor M, Tarzia G, La
4
5 Rana G, Calignano A, Giustino A, Tattoli M, Palmery M, Cuomo V, Piomelli D
6
7 (2003) Modulation of anxiety through blockade of anandamide hydrolysis. *Nat Med*
8
9 9: 76-81
10
11
12
13
14 Krieger JE, Graeff FG (1985) Defensive behavior and hypertension induced by glutamate
15
16 in the midbrain central gray of the rat. *Braz J Med Biol Res* 18: 61-7
17
18
19
20 LeDoux JE, Iwata J, Cicchetti P, Reis DJ (1988) Different projections of the central
21
22 amygdaloid nucleus mediate autonomic and behavioral correlates of conditioned
23
24 fear. *J Neurosci* 8: 2517-29
25
26
27
28 Matheus MG, Nogueira R, Carobrez AP, Graeff FG, Guimarães FS (1994) Anxiolytic
29
30 effect of glycine antagonists microinjected into the dorsal periaqueductal grey.
31
32 *Psychopharmacology* 13:565-569
33
34
35
36 Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI (1990) Structure of a
37
38 cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 346:
39
40 561-4
41
42
43
44 Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A,
45
46 Almog S, Martin BR, Compton DR, et al. (1995) Identification of an endogenous 2-
47
48 monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem*
49
50 *Pharmacol* 50: 83-90
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 Molchanov ML, Guimarães FS (2002) Anxiolytic-like effects of AP7 injected into the
4 dorsolateral or ventrolateral columns of the periaqueductal gray of rats.
5
6 Psychopharmacology (Berl) 160: 30-8
7
8
9
10
11 Moreira FA, Aguiar DC, Guimarães FS (2007) Anxiolytic-like effect of cannabinoids
12 injected into the rat dorsolateral periaqueductal gray. Neuropharmacology 52: 958-
13
14 65
15
16
17
18
19 Patel S, Hillard CJ (2006) Pharmacological evaluation of cannabinoid receptor ligands in a
20 mouse model of anxiety: further evidence for an anxiolytic role for endogenous
21
22 cannabinoid signaling. J Pharmacol Exp Ther 318: 304-11
23
24
25
26
27
28 Resstel LB, Joca SR, Guimarães FG, Correa FM (2006a) Involvement of medial prefrontal
29
30 cortex neurons in behavioral and cardiovascular responses to contextual fear
31
32 conditioning. Neuroscience 143: 377-85
33
34
35
36 Resstel LB, Joca SR, Moreira FA, Correa FM, Guimarães FS (2006b) Effects of
37
38 cannabidiol and diazepam on behavioral and cardiovascular responses induced by
39
40 contextual conditioned fear in rats. Behav Brain Res 172: 294-8
41
42
43
44 Rinaldi-Carmona M, Barth F, Heaulme M, Shire D, Calandra B, Congy C, Martinez S,
45
46 Maruani J, Neliat G, Caput D, et al. (1994) SR141716A, a potent and selective
47
48 antagonist of the brain cannabinoid receptor. FEBS Lett 350: 240-4
49
50
51
52 Smith PB, Compton DR, Welch SP, Razdan RK, Mechoulam R, Martin BR (1994) The
53
54 pharmacological activity of anandamide, a putative endogenous cannabinoid, in
55
56 mice. J Pharmacol Exp Ther 270: 219-27
57
58
59
60

1
2
3 Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, Yamashita A, Waku K
4
5 (1995) 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand
6
7
8 in brain. *Biochem Biophys Res Commun* 215: 89-97
9

10
11 Vaughan CW, Connor M, Bagley EE, Christie MJ (2000) Actions of cannabinoids on
12
13 membrane properties and synaptic transmission in rat periaqueductal gray neurons
14
15 in vitro. *Mol Pharmacol* 57: 288-95
16
17

18
19 Zhang WN, Murphy CA, Feldon J (2004) Behavioural and cardiovascular responses during
20
21 latent inhibition of conditioned fear: measurement by telemetry and conditioned
22
23 freezing. *Behav Brain Res* 154: 199-209
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

FIGURE LEGENDS

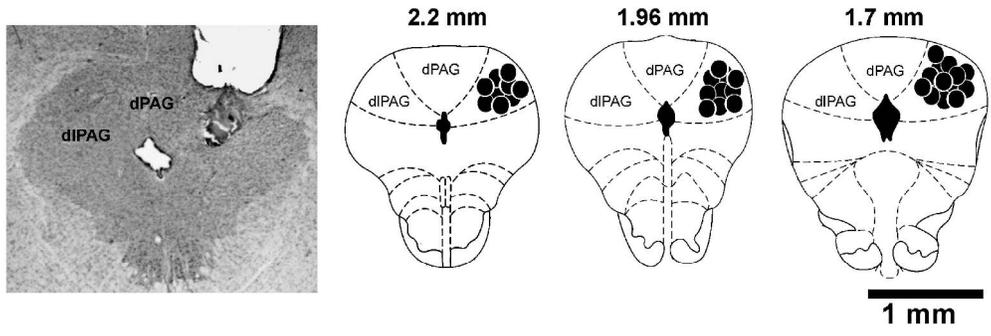
Figure 1. Photomicrograph of a coronal brain section showing unilateral microinjection sites in the dIPAG and a diagrammatic representation based on the rat brain atlas of Paxinos and Watson (1997) indicating injections sites of vehicle, AEA, AM404 and AM251 into the dIPAG of conditioned animals. IA- interaural. dPAG: dorsal periaqueductal gray; dIPAG: dorsolateral periaqueductal gray.

Figure 2. Effects of unilateral microinjection of 200 nL of vehicle (n=7), AEA (5 nmol/200nL, n=6), AM404 (50 pmol/200nL, n=6), AM251 (100pmol/200nL, n=6), AM251+AEA (n=6) or AM251+AM404 (n=6) on the percentage of time spent in freezing behavior. Columns represent the means and bars the SEM, *p<0.05 compared to vehicle group, Bonferroni's pos-hoc test.

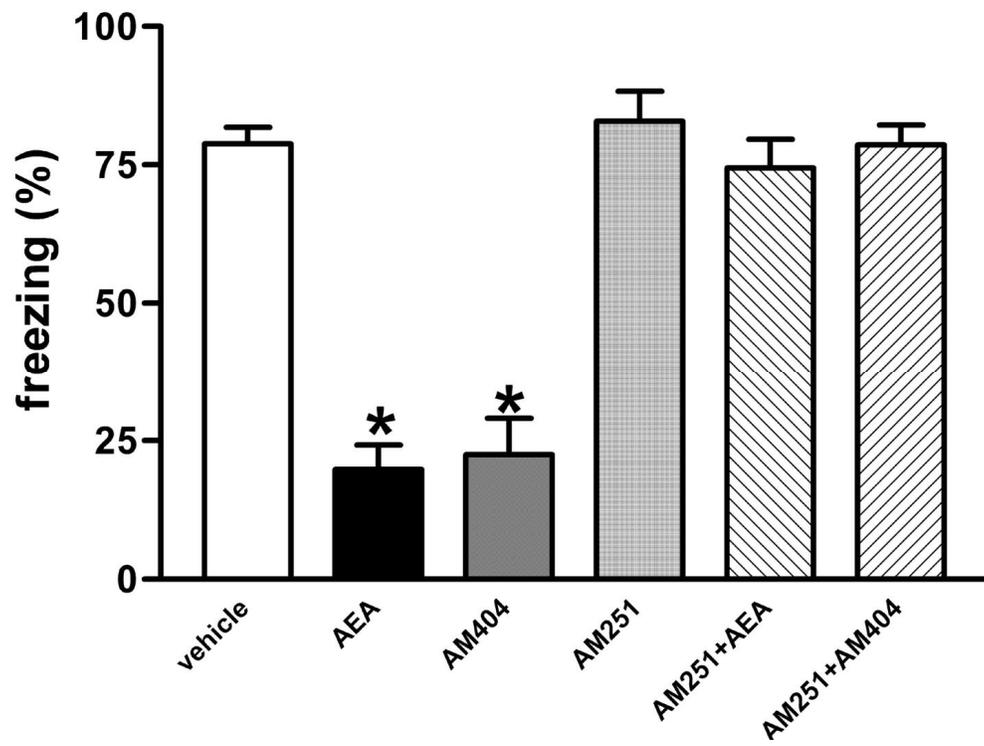
Figure 3. Time-course of the effects of unilateral microinjection of 200 nL of vehicle (n=7), AEA (5 nmol/ 200nL, n=6), AM404 (50 pmol/200nL, n=6), AM251 (100pmol/200nL, n=6), AM251+AEA (n=6) or AM251+AM404 (n=6) on mean arterial pressure (Δ MAP) and heart rate (Δ HR). Symbols represent the means and bars the SEM. *p<0.05, Bonferroni's post-hoc test.

Figure 4. Representative individual recordings of pulsatile arterial pressure (PAP), mean arterial pressure (MAP), and heart rate (HR) showing the cardiovascular alterations evoked by re-exposure to context in conditioned rats treated with vehicle, AEA or AEA+AM251. Arrows indicate the start of the re-exposure.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

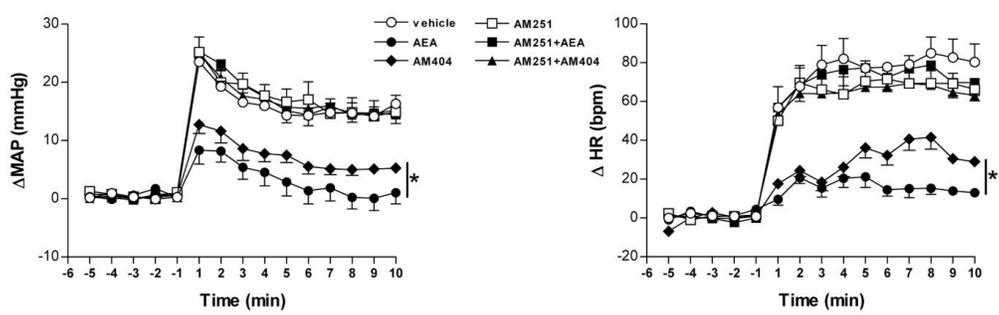


189x63mm (500 x 500 DPI)

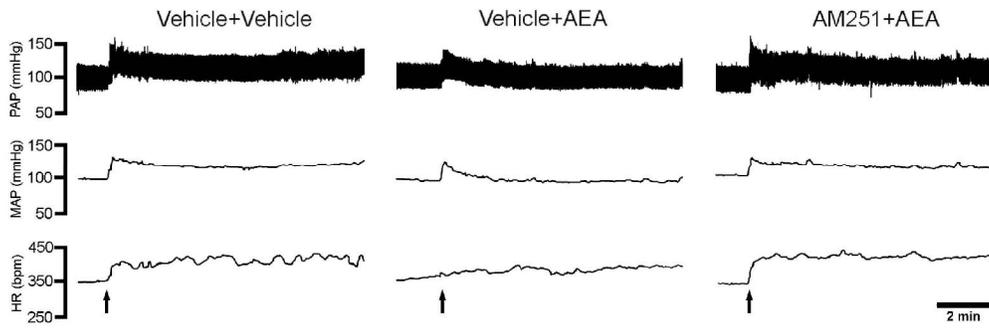


61x45mm (600 x 600 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



57x17mm (600 x 600 DPI)



180x58mm (300 x 300 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Activation of CB1 receptors in the dorsolateral periaqueductal gray induces anxiolytic effects in rats submitted to the Vogel conflict test

Sabrina F Lisboa¹, Leonardo BM Resstel¹, Daniele C Aguiar¹, Francisco S Guimarães*

Department of Pharmacology, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 14090-090, Brazil.

* Correspondence to: Dr Francisco Silveira Guimarães, Department of Pharmacology, School of Medicine of Ribeirão Preto, USP, Av. Bandeirantes 3900, 14049-900, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

Phone: + 55-16-3602-3209.

Fax: + 55-16-3633-2301.

E-mail address: fsguimar@fmrp.usp.br

¹ The authors contributed equally to this work.

Abstract

There are contradictory results concerning the effects of systemic injections of cannabinoid agonists in anxiety-related behaviors. Direct drug administration into brain structures related to aversive responses could help to clarify the role of cannabinoids in these behaviors. One such structure is the midbrain dorsolateral periaqueductal gray (dlPAG). The activation of CB1 receptors by the administration of the endocannabinoid anandamide (AEA) into this structure induces anxiolytic-like effects in the elevated plus-maze. The aim of this work was to verify if AEA microinjection into the dlPAG would also evoke anxiolytic-like effects in another model of anxiety, the Vogel punished licking test. We also verified if AEA effects could be replicated by facilitation of local endocannabinoid neurotransmission and if they depend on activation of CB1 receptors. Male Wistar rats (n=5-7) with cannulas aimed at the dlPAG were used. The animals received a first microinjection of vehicle or AM251 (CB1-antagonist; 100 pmol/200 nL) into the dlPAG, followed, 5 min later, by a second microinjection of vehicle, AEA (5 pmol/ 200 nL) or AM404 (an inhibitor of AEA metabolism and uptake, 50 pmol/200 nL). The animals were water deprived for 24 hours and pre-exposed to the apparatus where they were allowed to drink for 3 min. After another 24 hours of water deprivation, they received the microinjections and, 10 min later, were placed into the experimental box. In this box they received an electrical shock (0.5 mA, 2 s) in the spout of a drinking bottle at every twenty licks. AEA (5 pmol) and AM404 (50 pmol) increased the total number of punished licks. These effects were blocked by pre-administration of AM251. AM251, by itself, had no effects in any test. These results support the proposal that an endogenous cannabinoid system in the dlPAG can modulate defensive responses, suggesting that this structure is a possible neuroanatomical site for the anxiolytic-like effects mediated by cannabinoid agonists.

Keywords: cannabinoid, anxiety, anandamide, anxiety models

1. Introduction

The periaqueductal gray (PAG) is a mesencephalic structure divided into four columns along its rostro-caudal axis: dorsomedial (dmPAG), dorsolateral (dlPAG), lateral and ventrolateral columns. It is proposed to be part of a neural substrate responsible for the coordination of both nociceptive and anxiety-related responses (Bandler et al., 2000). Cannabinoid CB1 receptors are distributed along the diverse columns of this structure (Herkenham et al., 1990), suggesting that the PAG could mediate some effects of cannabinoids. Accordingly, injections of CB1 receptor agonists into the dorsal PAG induce both anti-nociceptive and anti-aversive effects in rats (Finn et al., 2003; Martin et al., 1995) and electrical stimulation of this structure causes anandamide (AEA) release and anti-nociception via local CB1 receptor activation (Walker et al., 1999). In addition, cannabinoids released in the dlPAG by stressful events may contribute to stress-induced analgesia (Hohmann et al., 2005).

In the central nervous system (CNS) the endocannabinoids (AEA and 2-arachidonoylglycerol -2-AG) are synthesized on-demand from post-synaptic neurons after an increase in calcium influx and immediately diffuse to the synaptic cleft, activating CB1 receptors located in pre-synaptic terminals (Wilson et al., 2002). The AEA action is limited by re-uptake through an AEA transporter (AT) with subsequent metabolism by an intracellular enzyme, the Fatty Acid Amide Hydrolase (FAAH), located in post-synaptic neurons (Beltramo et al., 1997; Di Marzo et al., 1994; Piomelli et al., 1999). Both these steps can be pharmacologically modulated. In addition to CB1 receptors, the PAG contains both AT and FAAH (Bandler et al., 2000), suggesting a role for the endocannabinoids in the modulation of behaviors coordinated

by this structure.

A previous work (Moreira et al., 2007) showed that endocannabinoids injected into the dlPAG were able to increase the anxiolytic-like behavior in rats submitted to the elevated plus-maze (EPM), a model that measures the conflict generated by the drive to explore a safe (closed arms) versus unsafe (open arms) place. In this work, the authors suggested that the anxiolytic-like effects of AEA in the dlPAG is via CB1. The results, however, do not support the idea of a tonic modulation of anxiety by endocannabinoids in this structure, since inhibition of the AT or a CB1 antagonist did not produce any significant effect on the anxious-related behavior.

Another paradigm used to study anxiety responses is the Vogel punished licking test (VPLT), which is based on suppression of punished responses. In this model, water-deprived rodents are exposed to the conflict between licking the spout of a bottle and receiving a mild shock on the tongue (Carlson et al., 2001; Flores et al., 2000; Griebel et al., 1999a; Griebel et al., 1999b; Vogel et al., 1971). Anxiolytic drugs typically increase the number of punished licks, an effect consistently seen with drugs that potentiate the action of γ -aminobutyric acid, such as the benzodiazepines (Carlson et al., 2001; Flores et al., 2000; Griebel et al., 1999a; Griebel et al., 1999b).

Although both the VPLT and EPM are widely employed as behavioral models of anxiety, they are based on different aversive contingencies that may engage distinct neurobiological systems. Whereas the latter test relies on innate fear of open spaces the former is based on conflict induced by a learned contingency (electrical shock on a drinking spout) in thirsty animals. The aim of present work is to verify if endocannabinoids injected into the dlPAG would induce anxiolytic-like response in rats submitted to the VPLT similar to those observed in the EPM. We evaluated the effects of local administration of AEA as well as AM404, an

AEA re-uptake inhibitor, and tested if AEA and AM404 effects were mediated via CB1 receptors using AM251, a CB1 receptor antagonist.

2. Material and methods

2.1. Animal preparation

Male Wistar rats weighing 230-250 g were used. Animals were kept in the Animal Care Unit of the Department of Pharmacology, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo. Rats were housed in a number of four/cage in plastic cages under standard laboratory conditions, with free access to food and water and under a 12 h light/dark cycle (lights on at 06:30 h). The Institution's housing conditions and experimental procedures were previously approved by the local Animal Ethics Committee.

Seven days before the experiment rats were anesthetized with tribromoethanol (10 mL/kg i.p.) and fixed on a stereotaxic frame. After local anesthesia of the scalp with 2% lidocaine, the skull was surgically exposed and stainless steel guide cannulas (0.6 mm OD) were implanted unilaterally on the right side aimed at the dlPAG (coordinates: AP=0 from lambda, L=1.9 mm at an angle of 16°, D=4.0 mm) using a stereotaxic apparatus, according to the atlas published by Paxinos and Watson (1997). The cannulas were fixed to the skull with dental cement and one metal screw. An obturator inside the guide cannula prevented obstruction.

2.2. Drugs

The following drugs were used: Anandamide (Tocris), AM251 (Tocris), AM404 (Tocris), morphine (Sigma, USA), tribromoethanol (Aldrich, USA) and urethane (Sigma, USA).

2.3. Vogel conflict test

The Vogel conflict test was performed in a Plexiglas box (42 × 50 × 25 cm) with a stainless steel grid floor. The metallic spout of a drinking bottle containing water projected into the box.

The contact of the animal with the spout and the grid floor closed an electrical circuit controlled by a sensor (Anxio-Meter model 102, Columbus, USA), which produced 7 pulses/s whenever the animal was in contact with both components. Each pulse was considered as a lick and at every 20 licks the animal received a 0.5 mA electrical shock on the metallic drinking spout for 2 s. The sensor recorded the total number of licks and shocks delivered during the test period. The whole apparatus was located inside a sound-attenuated cage (Jardim et al., 2005).

2.4. Water consumption evaluation

The apparatus was the same used in the test above; however, the electrical shock delivering system was inoperative. Water consumption was measure after 24 and 48 h of deprivation.

2.5. Tail-flick test

The apparatus consisted of an acrylic platform with a nichrome wire coil (Insight Instruments, Brazil) maintained at room temperature (24–26°C). The rats were gently handled and their tails were laid across the coil. The coil temperature was then raised at 9 °C/s by the passage of electric current. The system had a cut-off time of 6 s to prevent tissue damage when the coil temperature approached 80°C. The time to withdraw the tail was recorded as tail-flick latency. The electric current was calibrated to provoke this reflex within 2.5–3.5 s in non-treated animals (Bandler et al., 1988; Krieger et al., 1985).

2.6. Experimental design

Six groups of animals submitted to the VPLT received unilateral injection into the dlPAG of 0.2 µL of vehicle (vehicle AEA or AM404 + vehicle AM251, n=11), AM251 vehicle + AEA (5 nmol, n=6), AM251 vehicle + AM404 (50 nmol, n=4), AM251 (100 pmol) + AEA (n=5), AM251 + AM404 (n=5) or AM251 + 0.2 µL of vehicle (n=9). The dose of AEA was based on that that produced anxiolytic effects in the EPM and contextual fear conditioning. The doses of AM404 and AM251 were based on those that potentiated or blocked,

respectively, these effects in the same studies (Moreira et al., 2007).

2.7. Procedures

Each animal was used only once. Intracerebral injections were performed with a thin dental 33G needle (Small Parts, Miami Lakes, FL, USA) introduced through the guide cannula until its tip was 1.0 mm below the cannula end. A volume of 0.2 μ L was injected in 30 s using a microsyringe (Hamilton, USA) connected to an infusion pump (Kd Scientific, USA). In order to prevent reflux the guide cannula was left in place for 30 s after the end of each injection. A polyethylene catheter (PE 10) was interposed between the upper end of the dental needle and the microsyringe. The drugs were microinjected in a final volume of 0.2 μ L in dIPAG. Morphine hydrochloride (5 mg/kg; Merck), dissolved in saline, was used as a positive control in the tail-flick test (see below).

The interval between the first and second microinjection was 5 min and the animals were tested 10 min after the last microinjection.

2.7.1. Vogel conflict test

The animals were water deprived for 48 h before the test. After the first 24 h of deprivation they were allowed to drink freely for 3 min in the test cage in order to find the drinking bottle spout. Some animals did not find the spout and were not included in the experiment. Twenty-four hours later the animals received a first microinjection of vehicle or AM251 (CB1-antagonist; 100 pmol/200 nL) into the dIPAG, followed, 5 min later, by a second microinjection of vehicle, AEA (5 pmol/ 200 nL) or AM404 (an inhibitor of AEA metabolism and uptake, 50 pmol/200 nL). 10 min after the last injection the animals were placed into the test box. The test period lasted for 3 min and the animals received a 0.5 mA shock every 20 licks. During this period the number of punished licks and shocks delivered

were registered.

2.7.2. Tail-flick test

The tail-flick test was conducted in independent groups of animals receiving vehicle, morphine, AEA or AM404. The heating was applied to a portion of the ventral surface of the tail located between 4 and 6 cm from its end. The tail-flick latency was measured at 5-min intervals until a stable baseline (BL) was obtained over three consecutive trials. The latency was measured again within 30 s after drug administration and then at 10-min intervals for up to 40 min (Millan et al., 2003). The morphine were administered systemically i.p. 10 min before the test and vehicle, AEA or AM404 were injected into the dlPAG as described above.

2.8. Histological Procedure

On the day after the experiments the rats were anesthetized with urethane (1.25 g/ kg, i.p.), their chests were surgically opened; the descending aortas occluded; the right atrium severed and the brains perfused with 10% formalin through the left ventricle. The brains were post fixed for 24 h at 4°C, and 40 µm sections were cut with a cryostat (CM 1900, Leica, Germany). Brain sections were stained with 1% neutral red. The placement of the injection needles was identified with the help of the rat brain atlas of Paxinos and Watson (Paxinos and Watson, 1997).

2.9. Data Analysis

The data were expressed as mean \pm SEM. The number of punished licks were analyzed by one-way ANOVA. In case of statistical significance the groups were compared by the Bonferroni's post hoc test. The latency of tail withdrawal and water consumption were analyzed by two way-ANOVA with treatment and time (repeated measure) as the two factors. Results of

statistical tests with $p < 0.05$ were considered significant.

3. Results

3.1. Experiment 1: Effect of vehicle, AEA or AM404 injection into the dlPAG on the behavior of animals submitted to VPLT.

The dlPAG injection sites are represented in Fig. 1. There was a significant effect of treatment on the number of punished licks ($F_{5,39}=5.86$, Bonferroni, AEA: $p < 0.0005$ and AM404: $p < 0.0001$). These effects were blocked by pre-administration of AM251 ($p < 0.05$). AM251, by itself, had no effects in any test ($p > 0.05$) (Fig. 2). Drug administration into adjacent structures did not produce any effect (data not shown).

3.2. Experiment 2: Drug effects in the tail-flick test.

The tail-flick test results can be seen in Fig. 3. There were significant drug ($F_{3,20}=16.55$, $p < 0.0001$), time ($F_{3,20}=4.74$, $p = 0.0017$) and drug \times time interaction ($F_{3,20}=8.03$, $p < 0.0001$) effects. Withdrawal latencies were significant greater than vehicle at 10, 20, 30 and 40 min after morphine injection (5 mg/kg). AEA did not produce any effect. AM404, however, induced a small but significant increase in withdrawal latency 20 min after injection as compared to vehicle. This latency, however, was not different from baseline values ($p > 0.05$).

3.3. Experiment 3: Drug effects on water consumption

Either AEA or AM404 had no effects on number of licks ($F_{2,26}=0.33$, $p > 0.05$) when were microinjected into the dlPAG (Fig. 4).

4. Discussion

In a previous study Moreira et al. (2007) showed that AEA injected into the dlPAG increased the exploration of the open arms of the elevated plus maze (EPM). This model is based on a conflict between exploratory behavior and innate fear of open spaces and anxiolytic drugs increase the number of entries and time spent in the open arms of the EPM (Handley et al., 1984; Pellow et al., 1986). The results, therefore, suggest that AEA produces anxiolytic effects in the dlPAG. To confirm this possibility, in the present work we tested the animals in the VPLT, an animal model of anxiety not based on innate fear but instead on suppression of punished responses learned during the test. In this model, water deprived rodents are exposed to a conflict between licking the spout of a bottle containing water and receiving a mild shock on the tongue (Vogel et al., 1971). Anxiolytics that potentiate the action of γ -aminobutyric acid such as the benzodiazepines typically increase the number of punished licks (Carlson et al., 2001; Flores et al., 2000; Griebel et al., 1999a; Griebel et al., 1999b). Similar effects were observed with AEA, indicating an anxiolytic-like effect. This effect was also observed when AM404, an inhibitor of AEA transporter and degradation, was administered into dlPAG. This effect contrasts with results reported by Moreira et al. (2007), which failed to find any effect of this drug in the EPM after direct administration into the dlPAG. Although the causes of these contradictory results are not clear, they may involve the distinct animal models of anxiety employed. Brain endocannabinoids have been proposed to act as a 'stress buffer system' (Viveros et al., 2007), engaged by high demand situations. Following this proposal, it is possible to reason that the VPLT, by involving pain and water deprivation, engages the endocannabinoid system in the dlPAG to a greater extent than the EPM. Corroborating this proposal, we have recently found anxiolytic-like effects of AEA and AM404 in a contextual fear conditioning paradigm, another animal model that involves pain exposure (Resstel et al.,

unpublished data).

Considering that the Vogel test is a paradigm based on the conflict between water appetite and punishment, drugs that influence water consumption or nociceptive thresholds may yield confounding results (Millan et al., 2003). Therefore, we conducted experiments to control these possibilities. None of the aforementioned parameters were modified by AEA. AM404, however, induced a significant antinociceptive effect in the tail-flick test when the animals were evaluated 20 minutes after microinjection, as compared to vehicle treated rats. This effect, however, was small, since it was not different from the baseline values of this compound. A antinociceptive effect of AM404 in the dlPAG, however, is compatible with a study showing that electrical stimulation in this structure promotes AEA release with subsequent antinociception via activation of local CB1 receptors (Walker et al., 1999). In the present study, in addition, the animals were evaluated in the VLTP 10 minutes after drug microinjection, when no antinociceptive effect of AM404 was detected. Therefore, it seems unlikely that the anticonflict effect found in the VPLT is due to non specific interference with appetitive or nociceptive mechanisms.

CB1 receptors are largely distributed in the PAG (Herkenham et al., 1990). Confirming that the anxiolytic effects produced by AEA and AM404 in the dlPAG involve activation of these receptors, AM251, a CB1 receptor antagonist, was able to block those effects. Although the lack of AM251 effect when administered alone could indicate, contrasting with the results observed with AM404, that the endocannabinoid system in the dlPAG is not engaged by this model, only one dose was tested. Moreover, since the model is based on suppression of punished behavior, it is usually not very sensitive to detect anxiogenic effects.

Cannabinoid receptors inhibit neurotransmitters release (Gill et al., 1970), an effect that

was also demonstrated in the PAG (Vaughan et al., 2000). In this structure a cannabinoid agonist, WIN55,212-2, was shown to decrease glutamate release, an effect blocked by SR141716, a CB1 antagonist (Rinaldi-Carmona et al., 1994). Whereas glutamate agonists injected into the dlPAG cause freezing behavior and increased cardiovascular activity (Bandler et al., 1988; Krieger et al., 1985), glutamate antagonists produce anxiolytic-like effect in several animal models, including the EPM and VLTP , (Molchanov et al., 2002). It is possible, thus, that the anxiolytic effects observed with AEA and AM404 involve a decrease in glutamate release in the dlPAG.

In conclusion, the present results suggest that the dlPAG could be a possible brain site related to the anxiolytic effects of systemically administered cannabinoids. In addition, they also suggest that the endocannabinoid system located in this region could modulate anxiety responses.

Acknowledgements

The authors wish to thank José Carlos Aguiar, Ivanilda A.C. Fortunato and Afonso Paulo Padovan for technical support. Research supported by grants from CNPq, CAPES and FAPESP.

References

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

Bandler, R., Keay, K.A., Floyd, N., Price, J., 2000. Central circuits mediating patterned autonomic activity during active vs. passive emotional coping. *Brain Res Bull* 53, 95-104.

Behbehani, M.M., 1995. Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. *Prog Neurobiol* 46, 575-605.

Beltramo, M., Stella, N., Calignano, A., Lin, S.Y., Makriyannis, A., Piomelli, D., 1997. Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. *Science* 277, 1094-1097.

Berrendero, F., Maldonado, R., 2002. Involvement of the opioid system in the anxiolytic-like effects induced by Delta(9)-tetrahydrocannabinol. *Psychopharmacology (Berl)* 163, 111-117.

Bortolato, M., Campolongo, P., Mangieri, R.A., Scattoni, M.L., Frau, R., Trezza, V., La Rana, G., Russo, R., Calignano, A., Gessa, G.L., Cuomo, V., Piomelli, D., 2006.

Anxiolytic-like properties of the anandamide transport inhibitor AM404. *Neuropsychopharmacology* 31, 2652-2659.

Carlson, J.N., Haskew, R., Wacker, J., Maisonneuve, I.M., Glick, S.D., Jerussi, T.P., 2001. Sedative and anxiolytic effects of zopiclone's enantiomers and metabolite. *Eur J Pharmacol* 415, 181-189.

Chakrabarti, A., Ekuta, J.E., Onaivi, E.S., 1998. Neurobehavioral effects of anandamide and cannabinoid receptor gene expression in mice. *Brain Res Bull* 45, 67-74.

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

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

Finn, D.P., Jhaveri, M.D., Beckett, S.R., Roe, C.H., Kendall, D.A., Marsden, C.A., Chapman, V., 2003. Effects of direct periaqueductal grey administration of a cannabinoid receptor agonist on nociceptive and aversive responses in rats. *Neuropharmacology* 45, 594-604.

Flores, P., Pellon, R., 2000. Antipunishment effects of diazepam on two levels of suppression of schedule-induced drinking in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 67, 207-214.

Gill, E.W., Paton, W.D., Pertwee, R.G., 1970. Preliminary experiments on the chemistry and pharmacology of cannabis. *Nature* 228, 134-136.

Griebel, G., Perrault, G., Letang, V., Granger, P., Avenet, P., Schoemaker, H., Sanger, D.J., 1999a. New evidence that the pharmacological effects of benzodiazepine receptor ligands can be associated with activities at different BZ (omega) receptor subtypes. *Psychopharmacology (Berl)* 146, 205-213.

Griebel, G., Perrault, G., Tan, S., Schoemaker, H., Sanger, D.J., 1999b. Comparison of the pharmacological properties of classical and novel BZ-omega receptor ligands. *Behav Pharmacol* 10, 483-495.

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

Guimaraes, F.S., Carobrez, A.P., De Aguiar, J.C., Graeff, F.G., 1991. Anxiolytic effect in the elevated plus-maze of the NMDA receptor antagonist AP7 microinjected into the dorsal periaqueductal grey. *Psychopharmacology (Berl)* 103, 91-94.

Handley, S.L., Mithani, S., 1984. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 327, 1-5.

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

Hohmann, A.G., Suplita, R.L., Bolton, N.M., Neely, M.H., Fegley, D., Mangieri, R., Krey, J.F., Walker, J.M., Holmes, P.V., Crystal, J.D., Duranti, A., Tontini, A., Mor, M., Tarzia,

G., Piomelli, D., 2005. An endocannabinoid mechanism for stress-induced analgesia. *Nature* 435, 1108-1112.

Jardim, M.C., Aguiar, D.C., Moreira, F.A., Guimaraes, F.S., 2005. Role of glutamate ionotropic and benzodiazepine receptors in the ventromedial hypothalamic nucleus on anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 82, 182-189.

Kathuria, S., Gaetani, S., Fegley, D., Valino, F., Duranti, A., Tontini, A., Mor, M., Tarzia, G., La Rana, G., Calignano, A., Giustino, A., Tattoli, M., Palmery, M., Cuomo, V., Piomelli, D., 2003. Modulation of anxiety through blockade of anandamide hydrolysis. *Nat Med* 9, 76-81.

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

Martin, W.J., Patrick, S.L., Coffin, P.O., Tsou, K., Walker, J.M., 1995. An examination of the central sites of action of cannabinoid-induced antinociception in the rat. *Life Sci* 56, 2103-2109.

Millan, M.J., Brocco, M., 2003. The Vogel conflict test: procedural aspects, gamma-aminobutyric acid, glutamate and monoamines. *Eur J Pharmacol* 463, 67-96.

Molchanov, M.L., Guimaraes, F.S., 2002. Anxiolytic-like effects of AP7 injected into the dorsolateral or ventrolateral columns of the periaqueductal gray of rats. *Psychopharmacology (Berl)* 160, 30-38.

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

Onaivi, E.S., Chakrabarti, A., Gwebu, E.T., Chaudhuri, G., 1995. Neurobehavioral effects of delta 9-THC and cannabinoid (CB1) receptor gene expression in mice. *Behav Brain Res* 72, 115-125.

Onaivi, E.S., Green, M.R., Martin, B.R., 1990. Pharmacological characterization of cannabinoids in the elevated plus maze. *J Pharmacol Exp Ther* 253, 1002-1009.

Patel, S., 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.

Pellow, S., File, S.E., 1986. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 24, 525-529.

Piomelli, D., Beltramo, M., Glasnapp, S., Lin, S.Y., Goutopoulos, A., Xie, X.Q., Makriyannis, A., 1999. Structural determinants for recognition and translocation by the anandamide transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 5802-5807.

Rinaldi-Carmona, M., Barth, F., Heaulme, M., Shire, D., Calandra, B., Congy, C., Martinez, S., Maruani, J., Neliat, G., Caput, D., et al., 1994. SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. *FEBS Lett* 350, 240-244.

Rodgers, R.J., Evans, P.M., 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.

Vaughan, C.W., Connor, M., Bagley, E.E., Christie, M.J., 2000. Actions of cannabinoids on membrane properties and synaptic transmission in rat periaqueductal gray neurons in vitro. *Mol Pharmacol* 57, 288-295.

Viveros, M.P., Marco, E.M., Llorente, R., Lamota, L., 2007. The role of the hippocampus in mediating emotional responses to nicotine and cannabinoids: a possible neural substrate for functional interactions. *Behav Pharmacol* 18, 375-389.

Vogel, J.R., Beer, B., Clody, D.E., 1971. A simple and reliable conflict procedure for testing anti-anxiety agents. *Psychopharmacologia* 21, 1-7.

Walker, J.M., Huang, S.M., Strangman, N.M., Tsou, K., Sanudo-Pena, M.C., 1999. Pain modulation by release of the endogenous cannabinoid anandamide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 12198-12203.

Wilson, R.I., Nicoll, R.A., 2002. Endocannabinoid signaling in the brain. *Science* 296, 678-682.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Photomicrograph of a coronal brain section showing an unilateral microinjection site in the dlPAG and a diagrammatic representation based on the rat brain atlas of Paxinos and Watson (1997) indicating injections sites into this structure. dPAG: dorsal periaqueductal gray; dlPAG: dorsolateral periaqueductal gray.

Fig. 2. Effects of unilateral microinjection of 0.2 μ L of vehicle (n=7), AEA (5 nmol/ 0.2 μ L, n=6), AM404 (50 pmol/0.2 μ L, n=6), AM251 (100pmol/ 0.2 μ L, n=6), AM251+AEA (n=6) or AM251+AM404 (n=6) on the number of punished licks in the VPLT. Columns represent the means and bars the SEM, *p<0.05 compared to vehicle group, Bonferroni's pos-hoc test.

Fig. 3. Time course effects of AEA (5pmol/0,2 μ l) (n=6), AM404 (50 pmol/ 0,2 μ l) (n=5), morphine (5 mg/Kg) (n=6) or vehicle (n=7) in the tail-flick test. With the exception of morphine (i.p. injection) all drugs and vehicle were injected into the dlPAG. Each point represents the mean and bars the SEM for the latency of tail withdrawal, *p<0.05 compared to vehicle (ANOVA followed by Bonferroni's post-test).

Fig. 4. Absence of AEA (5pmol/0,2 μ l) (n=5), AM404 (50 pmol/0,2 μ l) (n=6) or vehicle (n=5) effects microinjected into dlPAG of rats submitted to evaluation of water consumption. Columns represent the means and bars the SEM of number of licks measured for each group in 3 minutes period after 24h (Day 1) and 48h (Day 2) of water deprivation.

Figure 1
[Click here to download high resolution image](#)

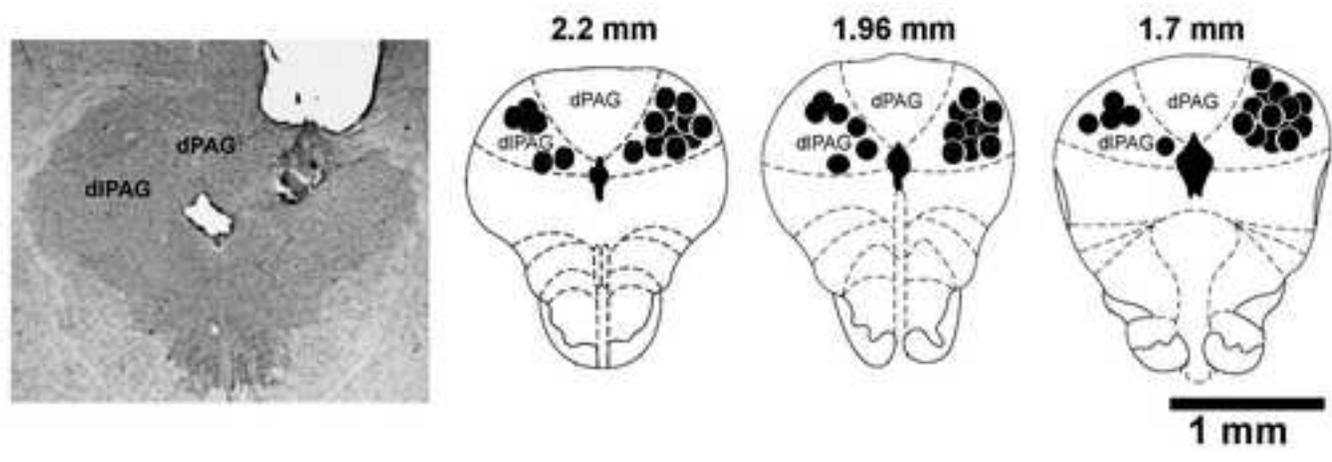


Figure 2
[Click here to download high resolution image](#)

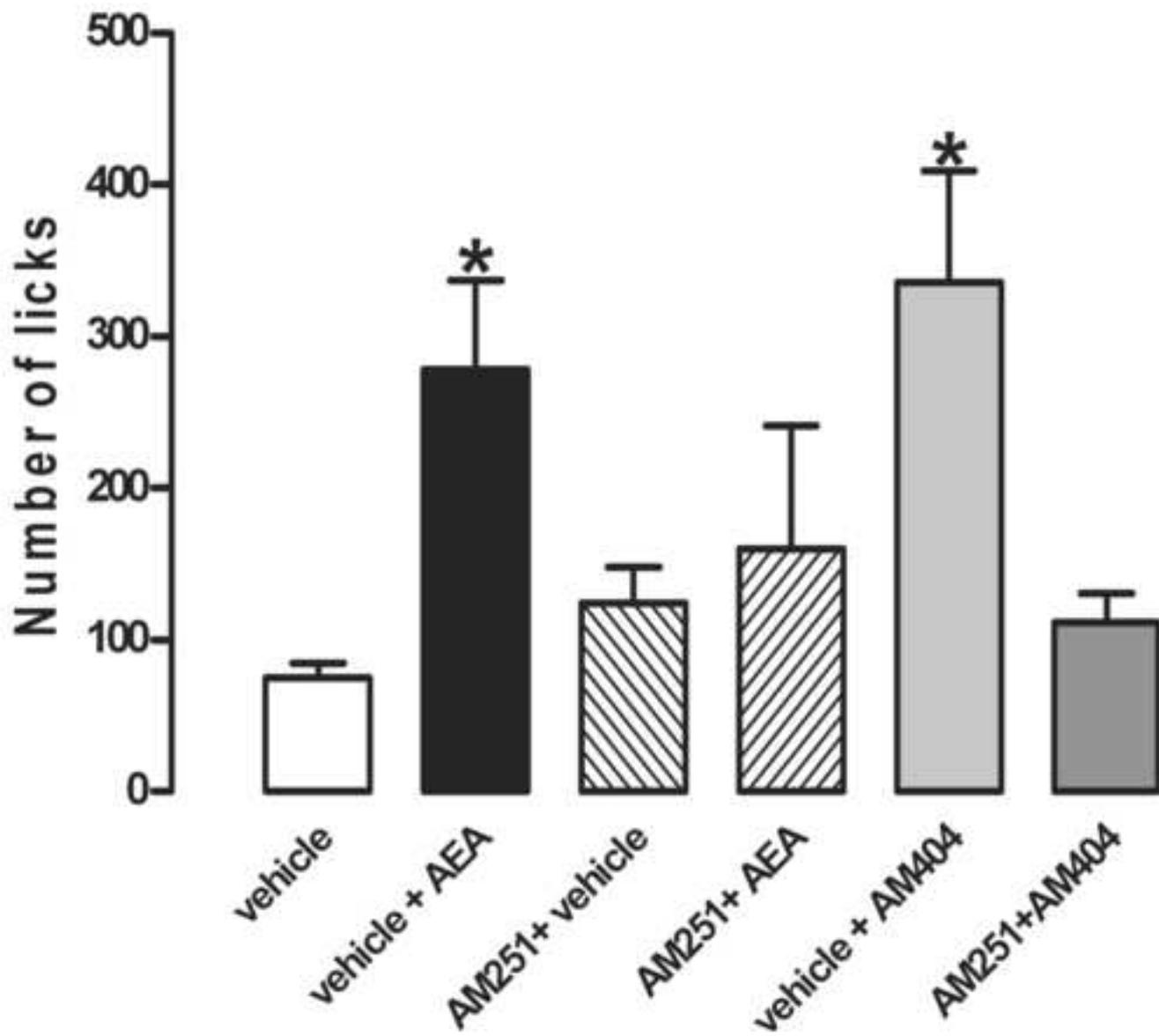


Figure 3
[Click here to download high resolution image](#)

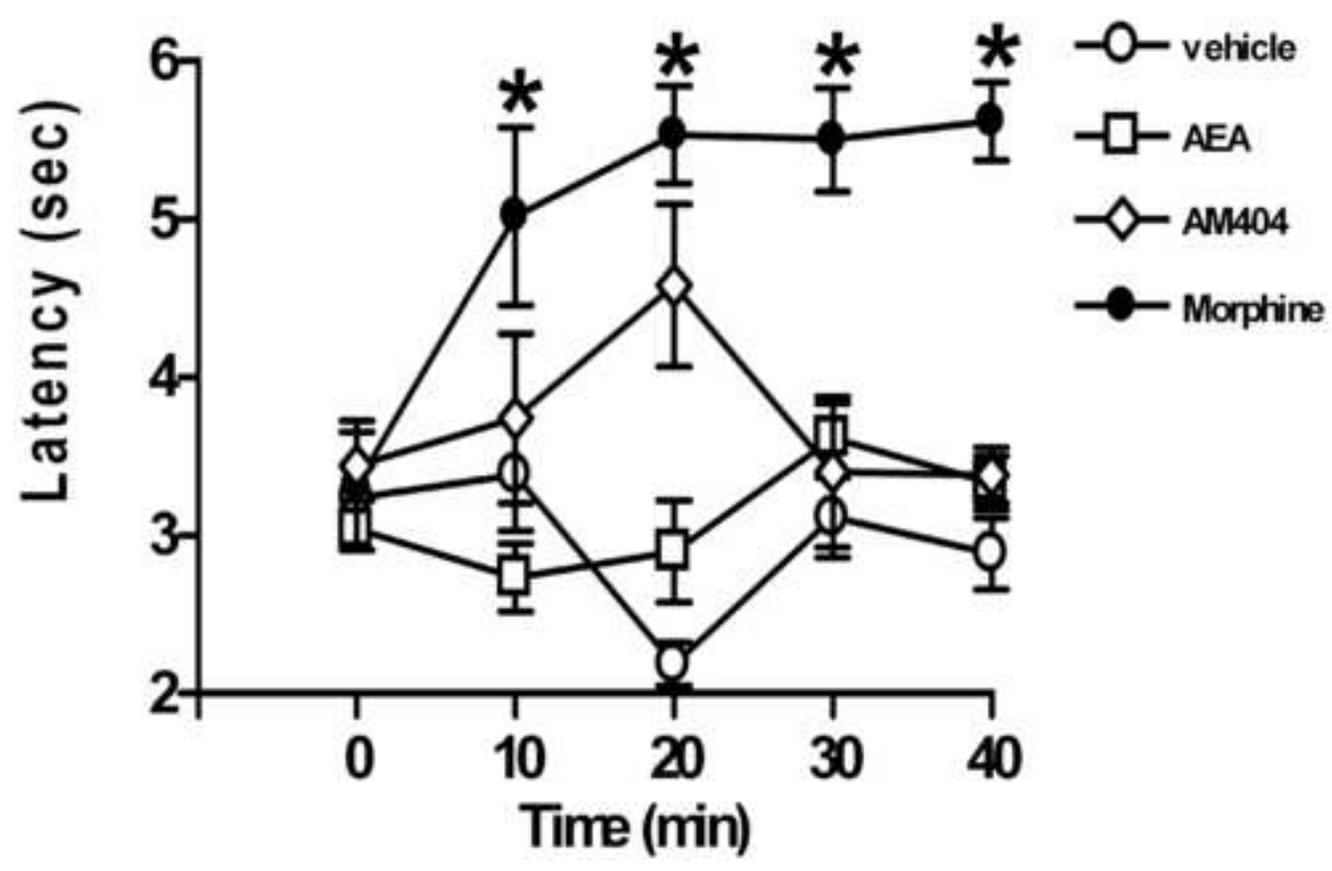
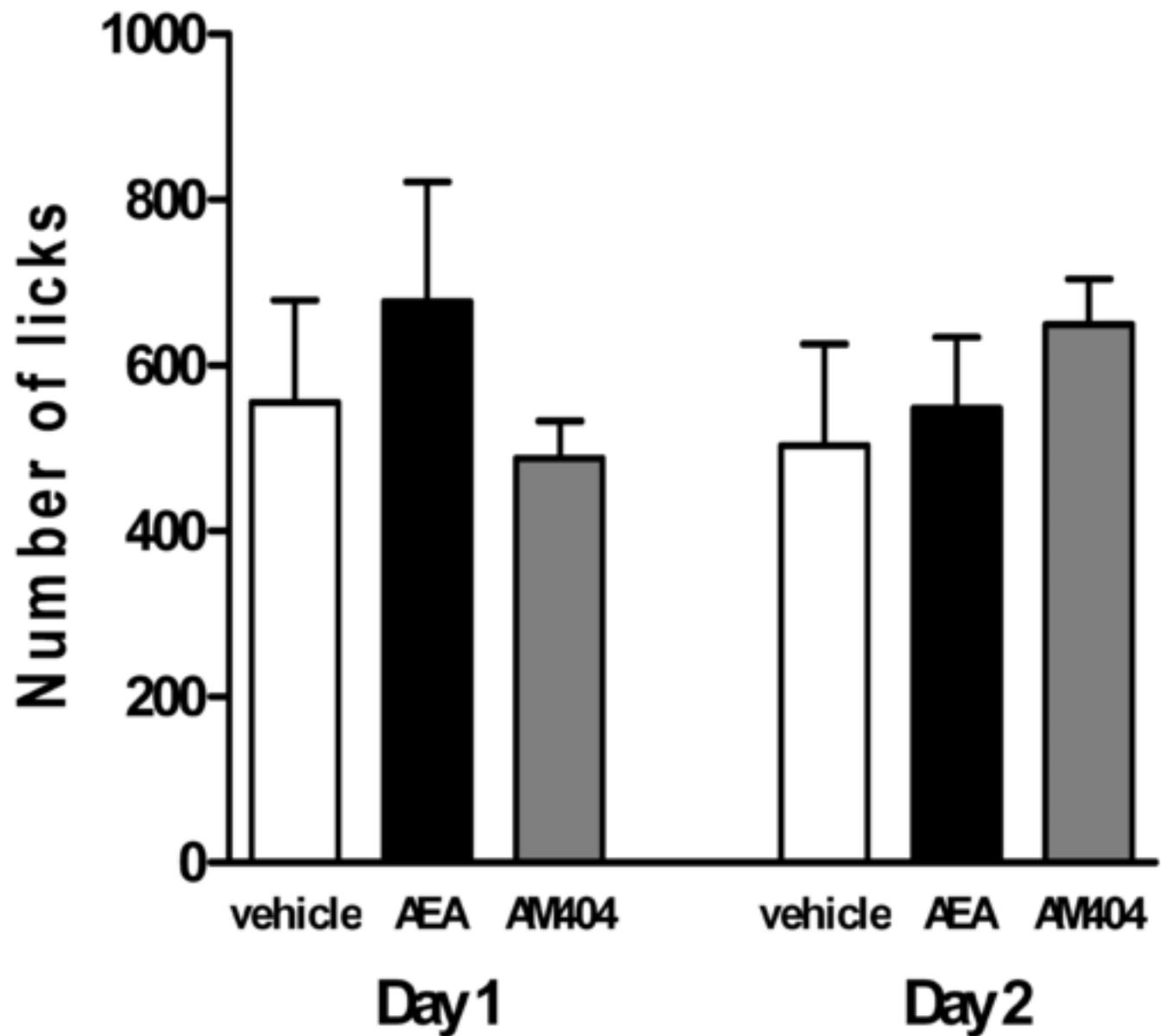


Figure 4
[Click here to download high resolution image](#)



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](#)