

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

**Participação dos receptores TRPV1 nas reações defensivas mediadas pela
substância cinzenta periaquedutal dorsolateral.**

ANA LUISA BERNARDES TERZIAN

Ribeirão Preto

2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

ANA LUISA BERNARDES TERZIAN

**Participação dos receptores TRPV1 nas reações defensivas
mediadas pela substância cinzenta periaquedutal dorsolateral.**

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

2009

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

Terzian, Ana Luisa Bernardes

Participação dos receptores TRPV1 nas reações defensivas mediadas pela substância cinzenta periaquedutal dorsolateral / Ana Luisa B. Terzian; Orientador: Francisco Silveira Guimarães – Ribeirão Preto, 2008.

72p.

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

1. Receptores TRPV1. 2. Canabinóides. 3. Respostas defensivas. 4. Substância cinzenta periaquedutal

FOLHA DE APROVAÇÃO

Ana Luisa Bernardes Terzian

Participação dos receptores TRPV1 nas reações defensivas mediadas pela substância cinzenta periaquedutal dorsolateral.

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: ___/___/2009

Banca Examinadora

Prof. Dr. Francisco Silveira Guimarães

Instituição: FMRP – USP

Assinatura: _____

Profa. Dra. Sâmia Regiane Lourenço Joca

Instituição: FCFRP – USP

Assinatura: _____

Profa. Dra. Christie Ramos Andrade Leite Panissi

Instituição: FORP – USP

Assinatura: _____

Aos meus pais, Paulo e Lucy.
Aos meus irmãos Ana Carolina e Paul.
À Hanna, Nina e Os Verdes.
E ao sempre presente Seo Jorge.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Francisco Silveira Guimarães, por todo apoio e orientação desde os primeiros estágios de minha iniciação científica. Pela grande amizade e seus ensinamentos.

Às professoras da banca examinadora Dra. Christie Leite-Panissi e Dra. Sâmia Joca pela participação e dedicação a esse trabalho, e por todo auxílio em diferentes etapas acadêmicas.

Ao professor, colaborador e amigo Fabrício Moreira, pelas longas conversas sobre A Vida, O Universo e Tudo Mais. Pelo incentivo e ajuda para os próximos passos.

À doutora e querida amiga Daniele Aguiar, por toda ajuda e atenção desde os tempos de iniciação científica. Por toda amizade, carinho e discussões apimentadas.

Aos professores e grandes amigos Leonardo Resstel e Sâmia Joca, por todo carinho, conversas, reuniões, e seus filhos Otto e Miguel.

Aos grandes amigos e companheiros Sabrina Lisboa, Caroline Biojone e Plínio Casarotto, Felipe Vilela, pela amizade, conversas, comissões, apoio e bons momentos.

Ao Prof. Dr. Morgan e todos amigos do Laboratório de Controle Central da Pressão Arterial, pela amizade, apoio científico e colaboração.

Aos colegas de laboratório e departamento, pela convivência durante essa fase.

À todos os amigos de S. J. do Rio Preto, pela amizade, apoio, compreensão e saudades.

Aos amigos Letícia Sicchieri, Nathália Novaretti, André Delfini e todas as *trankeras* pela grande amizade, carinho e ótimos momentos.

Aos amigos e colegas acadêmicos da EAE/IINN-ELS, pelos 2 meses de convivência intensa e inesquecível.

Ao José Carlos de Aguiar, pelo apoio técnico, sabedoria e por toda amizade durante esse tempo.

A Eleni Tamburus Gomes, pelo apoio técnico, dedicação e amizade.

Aos profissionais da secretaria do departamento, José Waldik Ramón, Fátima Helena Ferreira Petean e Sonia Maria Stefanelli, pelo auxílio e colaboração.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

"Sentimos saudade de certos momentos da nossa vida e de certos
momentos de pessoas que passaram por ela."
CDA

RESUMO

O Receptor de Potencial Transitório Vanilóide do Tipo 1 (TRPV1) é um canal permeável ao cálcio que pode ser ativado pelo endocanabinóide anandamida, além de seu agonista exógeno, a capsaicina. Na porção dorsolateral da substância cinzenta periaquedutal (SCPdl) do mesencéfalo, uma estrutura envolvida com comportamento defensivo, resultados prévios demonstraram que a ativação de receptores canabinóides do tipo 1 (CB1) promove efeitos do tipo ansiolítico em curva com forma de sino, de modo dose-dependente. Entretanto, o papel dos receptores TRPV1 ainda não é totalmente conhecido. Desta maneira, no presente estudo foi testada a hipótese de que esse receptor contribuiria para a modulação de comportamentos de ansiedade na SCPdl. Ratos Wistar receberam injeção local intra-SCPdl do antagonista de receptores TRPV1 capsazepina (10-60 nmol) e foram submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado (LCE) e ao modelo do lambar punido de Vogel (VCT). Ainda, os animais receberam injeções de capsaicina (0,01 – 1 nmol), agonista TRPV1, e foram submetidos aos mesmos modelos. Corroborando com a hipótese proposta, a capsazepina produziu um efeito do tipo ansiolítico em ambos modelos. Entretanto, a capsaicina mimetizou os resultados obtidos com o antagonista, o que pode ser atribuído a sua capacidade de dessensibilizar o canal iônico de cálcio. Deste modo, considerando o fato de receptores CB1 e TRPV1 possuírem o mesmo ligante endógeno e em conjunto com resultados obtidos em trabalhos prévios sobre o papel do receptor CB1, tais resultados sugerem que quando ativados os receptores CB1 inibem o comportamento aversivo na SCPdl, e os receptores TRPV1 facilitam. Assim, receptores CB1 e TRPV1 possuiriam ação oposta na modulação de comportamentos do tipo ansiedade nessa estrutura.

Palavras-chave: TRPV1; Anandamida; Endovanilóide, Endocanabinóide; Ansiedade, Labirinto em Cruz Elevado; Lamber Punido de Vogel.

ABSTRACT

The endocannabinoid anandamide is a possible agonist at the Transient Receptor Potential Vanilloid Type 1 (TRPV1) channel, in addition to its agonist activity at cannabinoid type 1 (CB1) receptor. In the midbrain dorsolateral periaqueductal gray (dlPAG) our previous data showed that CB1 activation induces anxiolytic-like effects. However, the role of TRPV1 has remained unclear. Thus, in the present study we tested the hypothesis that this channel would contribute to the modulation of anxiety-like behaviour in the dlPAG. Male Wistar rats received local injections of the TRPV1 antagonist capsazepine (10–60 nmol) and were submitted to the elevated plus-maze (EPM) and to the Vogel test. In addition, animals received local injections of capsaicin (0.01– 1 nmol), a TRPV1 agonist, and were tested in the same models. In accordance with our hypothesis, capsazepine produced anxiolytic-like effects both in the EPM and in the Vogel test. Capsaicin mimicked these results, which might be attributed to its ability to quickly desensitize the channel. Altogether, our data suggest that, while activation of CB1 receptors seems to inhibit aversive responses in the dlPAG, TRPV1 activation could facilitate them. Thus, CB1 and TRPV1 may have opposite functions in modulating anxiety-like behaviour in this region.

Keywords: TRPV1; Anandamide; Endocannabinoids; Endovanilloids; Anxiety; Elevated plus-maze; Vogel test.

Lista de Abreviaturas

ANOVA – Análise de Variância

Ca⁺² – íon Cálcio

CB1 – Receptor Canabinóide do tipo 1

CB2 – Receptor Canabinóide do tipo 2

CPS – Capsaicina

CPZ – Capsazepina

DMSO – Dimetilsulfóxido

EPM – Erro Padrão da Média

LCE – Labirinto em Cruz Elevado

Na⁺ – íon Sódio

NMDA – N-metil-D-aspartato

RTX – Resiniferatoxina

SCP – Substância Cinzenta Periaquedutal

SCPdl – SCP dorsolateral

SCPvl – SCP ventrolateral

SNC – Sistema Nervoso Central

TRP – Receptor de Potencial Transitório

TRPA – TRP Ankyrin

TRPC – TRP Canônico

TRPM – TRP Melastatina

TRPML – TRP Mucolipina.

TRPP – TRP Polocistina

TRPV1 – TRP Vanilóide do tipo 1

VCT – Teste do Lamber Punido de Vogel

Índice

1	INTRODUÇÃO	19
	<i>Comportamento Defensivo</i>	<i>19</i>
	<i>Sustância Cinzenta Periaquedutal.....</i>	<i>20</i>
	<i>Receptores TRPV1.....</i>	<i>21</i>
2	OBJETIVO	28
	<i>Objetivo Geral</i>	<i>28</i>
	<i>Objetivos Específicos.....</i>	<i>28</i>
3	MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1	<i>Animais</i>	<i>30</i>
3.2	<i>Drogas</i>	<i>30</i>
3.3	<i>Modelos Experimentais.....</i>	<i>30</i>
	- Labirinto em Cruz Elevado	30
	- Teste do Lamber Punido de Vogel	31
	- Consumo de Água.....	31
	- Latência de Retirada de Cauda	31
3.4	<i>Cirurgia Estereotáxica</i>	<i>32</i>
3.5	<i>Histologia</i>	<i>32</i>
3.6	<i>Análise dos Resultados</i>	<i>32</i>
4	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	35
	<i>Estudos propostos.....</i>	<i>35</i>
	<i>Microinjeção intra-SCPdl</i>	<i>35</i>
	<i>Experimento 1 – Efeito da injeção de capsazepina na SCPdl sobre o comportamento de ratos submetidos ao labirinto em cruz elevado.....</i>	<i>35</i>

<i>Experimento 2 – Efeito da injeção de capsazepina na SCPdl sobre o comportamento de ratos submetidos ao teste do lamber punido de Vogel.....</i>	<i>36</i>
<i>Experimento 3 – Efeito da injeção de capsaicina na SCPdl sobre o comportamento de ratos submetidos ao labirinto em cruz elevado.....</i>	<i>36</i>
<i>Experimento 4 – Efeito da injeção de capsaicina na SCPdl sobre o comportamento de ratos submetidos ao teste do lamber punido de Vogel.....</i>	<i>36</i>
<i>Experimento 5 – Efeito da injeção de capsazepina na SCPdl no consumo de água</i>	<i>36</i>
<i>Experimento 6 – Efeito da injeção de capsaicina na SCPdl no consumo de água.....</i>	<i>37</i>
<i>Experimento 7 – Efeito da injeção de capsazepina na SCPdl na latência de retirada de cauda</i>	<i>37</i>
<i>Experimento 8 – Efeito da injeção de capsaicina na SCPdl na latência de retirada de cauda.....</i>	<i>37</i>
5 RESULTADOS	39
5.1 <i>Localização do sítio de injeção.....</i>	<i>39</i>
5.2 <i>Experimento 1 – Efeito da injeção de capsazepina na SCPdl sobre o comportamento de ratos submetidos ao labirinto em cruz elevado.....</i>	<i>41</i>
5.3 <i>Experimento 2 – Efeito da injeção de capsazepina na SCPdl sobre o comportamento de ratos submetidos ao teste do lamber punido de Vogel.....</i>	<i>43</i>
5.4 <i>Experimento 3 – Efeito da injeção de capsaicina na SCPdl sobre o comportamento de ratos submetidos ao labirinto em cruz elevado.....</i>	<i>45</i>
5.5 <i>Experimento 4 – Efeito da injeção de capsaicina na SCPdl sobre o comportamento de ratos submetidos ao teste do lamber punido de Vogel.....</i>	<i>47</i>
5.6 <i>Experimento 5 – Efeito da injeção de capsazepina na SCPdl no consumo de água.....</i>	<i>49</i>
5.7 <i>Experimento 6 – Efeito da injeção de capsaicina na SCPdl no consumo de água</i>	<i>51</i>
5.8 <i>Experimento 7 – Efeito da injeção de capsazepina na SCPdl na latência de retirada de cauda</i>	<i>53</i>
5.9 <i>Experimento 8 – Efeito da injeção de capsaicina na SCPdl na latência de retirada de cauda</i>	<i>55</i>

6	DISCUSSÃO	58
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
8	ANEXO.....	72

1 INTRODUÇÃO

Comportamento Defensivo

O comportamento defensivo é uma resposta observada em diferentes espécies animais. Em mamíferos, pode ser representada pelo conjunto de reações que esses organismos emitem frente a perigos reais ou potenciais, tanto na presença de predadores ou mesmo relacionados ao ambiente no qual se encontram (Blanchard, Flannelly *et al.*, 1986; Blanchard e Blanchard, 1988).

Variações na distância e intensidade do estímulo aversivo apresentado geram respostas que podem oscilar entre comportamentos de congelamento, luta ou fuga (Blanchard e Blanchard, 1988). E essas respostas podem ainda ser associadas a comportamentos distintos de medo e ansiedade. Essa distinção é baseada na teoria de Gray e McNaughton (2000).

Assim, são consideradas respostas relacionadas ao medo aquelas evocadas em situações onde o estímulo é definido e presente – sendo insensíveis à drogas classicamente caracterizadas como ansiolíticas, tais como benzodiazepínicos. Enquanto respostas de ansiedade são provocadas por situações incertas ou desconhecidas, e estão diretamente envolvidas com a avaliação de risco realizadas pelo animal.

Quando o animal tende a se afastar da fonte do perigo, comportamento mais associado ao medo, é observado aumento na atividade de regiões como córtex cingulado anterior, amígdala, hipotálamo e substância cinzenta periaquedutal (SCP). Já em situações em que o animal tenta se aproximar da fonte da ameaça são ativados o córtex cingulado posterior e o sistema septo-hipocampal (Graeff e Guimarães, 1999; Gray e Mcnaughton, 2000). Com a redução da distância em relação ao predador, há uma troca da atividade do córtex pré-frontal ventromedial para a SCP, resultado observado em um estudo de neuroimagem em humanos (Mobbs, Petrovic *et al.*, 2007).

Sustância Cinzenta Periaquedutal

A Substância Cinzenta Periaquedutal (SCP) é formada por neurônios que circundam o aqueduto mesencefálico e pode ser dividida por diferenças anatomo-funcionais em quatro colunas longitudinais que se mantêm ao longo do eixo rostro-caudal – colunas dorsomedial, dorsolateral, lateral e ventrolateral (Carrive, 1993; Bandler, Keay *et al.*, 2000).

Foi verificado que após a estimulação elétrica dessa região animais expressam comportamentos aversivos, enquanto humanos relatam sensações relacionadas ao pânico (Fernandez De Molina e Hunsperger, 1962; Nashold, Wilson *et al.*, 1969).

Em ratos, a estimulação da porção dorsal da SCP (SCPd) é capaz de produzir comportamentos incondicionados, tais como reações de fuga ou congelamento, bem como, alteração em respostas autonômicas, como elevação da pressão arterial e frequência cardíaca, sudorese e piloereção. Essas respostas são diretamente associadas a ataques de pânico experimentais e clínicos em humanos (Krieger e Graeff, 1985; Bandler e Carrive, 1988; Schenberg, Bittencourt *et al.*, 2001). Assim, pode-se surgir que a SCPd seria responsável por respostas de fuga ou luta em situações de medo externo em roedores e outras espécies de mamíferos (Graeff, 1994).

Quando submetidos à situações aversivas, como a presença de predador, é observado em ratos aumento na expressão de proteína Fos na SCP (Canteras e Goto, 1999; Beijamini e Guimaraes, 2006; Aguiar e Guimaraes, 2009). Associado a esses resultados, foram descritas diversas projeções aferentes a SCP provenientes de regiões como tronco encefálico, medula espinhal, áreas diencefálicas e telencefálicas – tais como núcleos amigdalóides e áreas corticais (Mantyh, 1982a; b).

Ainda, a SCP é considerada uma área de integração entre regiões prosencefálicas, tronco encefálico e sítios medulares. Com isso, é relacionada como substrato neuronal

responsável por funções como respostas nociceptivas, controle cardiovascular, comportamento sexual e de defesa (Bandler, Keay *et al.*, 2000).

Receptores TRPV1

A planta *Capsicum sp* é popularmente conhecida como pimenta vermelha e possui como principal e mais irritante constituinte uma substância isolada inicialmente por Thresh em 1846, denominada de capsaicina (Calixto, Kassuya *et al.*, 2005). Há muito tempo existe um amplo interesse no estudo desta substância devido aos seus diversos efeitos biológicos, principalmente na dor e inflamação.

Através de estudos eletrofisiológicos foi demonstrado que a capsaicina é capaz de despolarizar fibras e corpos celulares sensoriais além de produzir aumento na condutância do sódio (Na^+) e cálcio (Ca^{+2}) em membranas neuroniais (Marsh, Stansfeld *et al.*, 1987). A sensação de ardor da pele produzida por essa substância parece ser devido ao influxo de cátions e produção de potenciais de ação que se propagam para o sistema nervoso central (SNC; Bevan e Szolcsanyi, 1990). O influxo de Ca^{+2} causado pela capsaicina também pode produzir a liberação de vários neurotransmissores a partir dos terminais periféricos das fibras sensoriais (Gamse, 1982; Holzer, 1988).

Sabe-se que agonistas e antagonistas dos TRPV1 (receptor de potencial transitório vanilóide tipo 1) são capazes de induzir várias respostas no SNC. Por exemplo, a capsaicina e seu análogo olvanil promoveram liberação do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina a partir dos terminais centrais dos nervos aferentes, resposta que foi bloqueada pelo antagonista dos TRPV1, a capsazepina (Wardle, Ranson *et al.*, 1997). Além disso, a capsaicina estimulou a liberação de glutamato a partir de fatias de hipotálamo e no corno dorsal da medula espinhal. Essa resposta foi dependente de cálcio e também foi inibida pela capsazepina (Sasamura, Sasaki *et al.*, 1998).

Uma vez que a capsaicina parecia atuar em determinados grupos de neurônios sensoriais, iniciou-se a busca dos sítios de ação para esse composto natural. Dessa forma, identificou-se um receptor responsável pelos efeitos biológicos da capsaicina e de seu potente análogo, a resiniferatoxina (RTX), o qual foi primeiramente denominado de receptor vanilóide, já que esses dois compostos possuem em sua estrutura química o grupamento químico homovanilil (Szallasi e Blumberg, 1990a; b). Porém, somente em 1997, Caterina e colaboradores clonaram o cDNA desse receptor, o qual foi denominado de receptor vanilóide do tipo 1 que pertence à família dos receptores de potencial transitório (Caterina, Schumacher *et al.*, 1997).

A grande família dos receptores do tipo TRP constitui um dos maiores grupos de receptores ligados à canais iônicos, composto por mais de 50 membros (Vriens, Watanabe *et al.*, 2004; Nilius e Voets, 2005). Em mamíferos já foram identificados 28 tipos, divididos em 6 subfamílias: TRPC (Canônico), TRPM (Melastatina), TRPV (Vanilóide), TRPA (Ankyrin), TRPP (Polocistina) e TRPML (Mucolipina). E são assim classificados principalmente através de sua sequência primária de aminoácidos (Montell, Birnbaumer e Flockerzi, 2002; Montell, Birnbaumer, Flockerzi *et al.*, 2002; Clapham, 2003; Corey, 2003; Moran, Xu *et al.*, 2004; Delmas, 2005).

O receptor TRPV1 é principalmente encontrado em fibras aferentes primárias de pequeno diâmetro (Baumann, Simone *et al.*, 1991) nos neurônios sensoriais primários. Sendo essencialmente composto por seis alças transmembrânicas e um poro permeável a cátion.

Os TRPV1 expressos em neurônios sensoriais primários são essenciais para o desenvolvimento da hiperalgesia inflamatória (Caterina, Leffler *et al.*, 2000; Davis, Gray *et al.*, 2000). Através de sua ativação por capsaicina, podem apresentar efeito bifásico. Inicialmente observa-se aumento da nocicepção provocado pelo aumento na condutância de canais de Ca^{+2} . Essa resposta é seguida por um efeito antinociceptivo contraditório devido à

dessensibilização desse mesmo canal iônico. (Szallasi e Blumberg, 1999; Szallasi e Di Marzo, 2000). Tanto que Palazzo e colaboradores (2002) observaram hipoalgesia após a microinjeção de capsaicina em uma região do encéfalo de ratos relacionada à nocicepção (Palazzo, De Novellis *et al.*, 2002), a porção dorsolateral da substância cinzenta periaquedutal (SCPdl), e esse efeito foi bloqueado quando os animais foram pré-tratados com a antagonista TRPV1, capsazepina. Esses resultados indicam que os TRPV1 contribuem na antinocicepção mediada por esta estrutura. Nesse estudo, administração de capsaicina intra-SCPdl promoveu uma resposta glutamatérgica localizada, efeito similar ao obtido *in vitro* no hipotálamo, substância nigra e locus coeruleus (Sasamura, Sasaki *et al.*, 1998; Marinelli, Vaughan *et al.*, 2002; Marinelli, Di Marzo *et al.*, 2003).

Juntamente com esses estudos, diversas evidências mostraram que esses receptores também são expressos em outras várias regiões do SNC (Szallasi e Blumberg, 1999), como por exemplo o bulbo olfatório, córtex, hipocampo, hipotálamo e mesencéfalo (Toth, Boczan *et al.*, 2005).

Além da capsaicina, os receptores TRPV1 podem ser ativados por altas temperaturas (> 42°C) e pH ácido (Szallasi e Di Marzo, 2000). E mais ainda, existem compostos endógenos que também promovem suas ações através da ativação dos TRPV1. Esses compostos são denominados endovanilóides.

Para uma substância ser classificada como endovanilóide, o composto deve ser formado pelas células e liberado de maneira atividade-dependente em quantidade suficiente para evocar respostas mediadas por TRPV1 por ligação direta no sítio receptor e subsequente ativação do canal iônico (Van Der Stelt e Di Marzo, 2004).

Dentre as substâncias propostas como endovanilóides destaca-se o endocanabinóide anandamida (Zygmunt, Petersson *et al.*, 1999; Smart, Gunthorpe *et al.*, 2000; Di Marzo, Bisogno *et al.*, 2001). Esta substância é um derivado do ácido araquidônico, a araquidonoil

etanolamida (Di Marzo, Melck *et al.*, 1998; Mechoulam, Fride *et al.*, 1998), e foi primeiramente isolada em 1992, a partir de encefálo de porcos (Devane, Hanus *et al.*, 1992).

Considerando que a anandamida é capaz de ativar os dois tipos de receptores canabinóides CB1 e CB2, além de ser um agonista pleno para os TRPV1, dados da literatura sugerem a existência de uma grande correlação entre os TRPV1 e os receptores canabinóides (Zygmunt, Petersson *et al.*, 1999; Smart, Gunthorpe *et al.*, 2000). Além disso, devido à similaridade da estrutura química entre a anandamida e o ácido oléico, um análogo da capsaicina, sugere-se que alguns vanilóides possam interagir tanto com os dois tipos de receptores canabinóides, como também com o transportador da anandamida, ou ainda, com a enzima responsável pelo seu metabolismo (Szallasi e Di Marzo, 2000).

Há uma ampla evidência de que a interação entre a anandamida com os receptores TRPV1 é específica, pois suas ações sobre o TRPV1 são bloqueadas por antagonistas específicos e não por antagonistas dos receptores CB1 e CB2 (Ross, Gibson *et al.*, 2001; Ross, 2003). Além disso, o tratamento neonatal com capsaicina previne a ativação do TRPV1 pela anandamida, e os efeitos da anandamida são ausentes em células transfectadas que não expressam os receptores TRPV1 (Zygmunt, Petersson *et al.*, 1999; Smart, Gunthorpe *et al.*, 2000; Ross, Gibson *et al.*, 2001).

Juntamente com a capacidade da anandamida atuar tanto em receptores canabinóides como em receptores vanilóides, a co-localização desses receptores em diversas estruturas encefálicas favorece a hipótese que eles modulem os mesmos tipos de respostas relacionadas a atividade neuronal (Cristino, De Petrocellis *et al.*, 2006). E essas respostas podem apresentar características opostas principalmente pelas diferenças na transdução de sinal intracelular e modulação da liberação de neurotransmissores.

Sendo os receptores canabinóides CB1 associados à proteína G, assim, promovem inibição da adenilato ciclase e de canais de cálcio, aumento das correntes de potássio e

reduzem a liberação de neurotransmissores, como GABA e glutamato (Vaughan, Connor *et al.*, 2000). Enquanto os receptores TRPV1, ao contrário, promovem despolarização celular, através da abertura de canais de cálcio, aumentando a taxa de disparo neuronal e a atividade sináptica (Xing e Li, 2007).

Entretanto, poucos estudos exploram as consequências funcionais promovidas pela interação desses receptores. Alguns trabalhos observaram respostas similares em relação a antinocicepção induzida após injeções intra-SCPdl de canabinóides ou capsaicina – porém, pelo seu caráter transitório, os efeitos observados na presença de capsaicina são atribuídos à dessensibilização do receptor TRPV1 (Martin, Patrick *et al.*, 1995; Palazzo, De Novellis *et al.*, 2002; Finn, Jhaveri *et al.*, 2003).

Maione e colaboradores (2006), exploraram diretamente essa interação na coluna ventrolateral da SCP, observando alta co-localização desses receptores. E também, o bloqueio da hidrólise da anandamida foi capaz de modificar a resposta à estímulos térmicos de modo bifásico, reduzindo respostas nociceptivas mediadas por TRPV1 e as aumenta via ativação de CB1 (Maione, Bisogno *et al.*, 2006). Esses resultados sugerem que os dois sistemas possam atuar de maneira oposta nessa estrutura.

Apesar de vários trabalhos mostrarem os efeitos dos vanilóides em diversas estruturas do SNC, seus efeitos sobre as respostas comportamentais ainda são pouco explorados. Alguns estudos indicam que a atividade motora pode ser reduzida após ativação dos receptores vanilóides (Di Marzo, Lastres-Becker *et al.*, 2001; Lee, Di Marzo *et al.*, 2006). A administração sistêmica de olvanil promoveu efeito do tipo ansiogênico no modelo do labirinto em cruz elevado (LCE), enquanto que a administração de capsazepina foi capaz de induzir um efeito do tipo ansiolítico no mesmo modelo (Kasckow, Mulchahey *et al.*, 2004). Esses resultados sugerem que agonistas e antagonistas vanilóides podem modular comportamentos relacionados com ansiedade.

Outra observação que sugere envolvimento dos TRPV1 na ansiedade é a presença desses receptores em estruturas envolvidas na elaboração das respostas relacionadas com aversão, estresse e ansiedade, tais como o córtex pré-frontal, amígdala, hipocampo, hipotálamo e SCP (Mezey, Toth *et al.*, 2000; Mcgaraughty, Chu *et al.*, 2003; Toth, Boczan *et al.*, 2005).

Quanto ao papel oposto em relação ao sistema canabinóide, Moreira e colaboradores (2007) demonstraram que a administração de anandamida e seu análogo ACEA intra-SCPdl induziram efeito ansiolítico no LCE, sugerindo a participação dos endocanabinóides na modulação dos comportamentos relacionados à ansiedade mediados pela SCPdl (Moreira, Aguiar *et al.*, 2007). Assim, enquanto os canabinóides seriam capazes de reduzir respostas relacionadas à ansiedade (para revisão, Moreira e Lutz, 2008), o papel do TRPV1 aparenta ser simetricamente oposto. Tanto que animais geneticamente modificados com deleção para o receptor TRPV1 demonstram redução tanto no nível de expressão de comportamentos aversivos, tanto relacionados a ansiedade, como ao medo condicionado (Marsch, Foeller *et al.*, 2007).

Considerando o exposto acima, o presente trabalho testou a hipótese de que os receptores TRPV1 modulam respostas aversivas mediadas pela SCPdl em diferentes modelos animais de ansiedade. Para testar essa hipótese foram avaliados os efeitos da administração do antagonista TRPV1, capsazepina e do agonista capsaicina, na SCPdl em animais submetidos aos modelos do LCE e no teste do lambar punido de Vogel (VTC).

2 OBJETIVO

Objetivo Geral

Considerando o exposto acima, o objetivo geral deste trabalho é investigar a participação dos receptores TRPV1 nas reações defensivas mediadas pela SCPdl eliciadas no modelo do labirinto em cruz elevado e no modelo do lambar punido de Vogel.

Objetivos Específicos

- Verificar a hipótese de que a administração isolada de capsazepina intra-SCPdl irá induzir efeito ansiolítico no LCE, através do bloqueio de receptores TRPV1.
- Verificar a hipótese de que a administração isolada de capsazepina intra-SCPdl irá induzir efeito ansiolítico no modelo do VCT, através do bloqueio de receptores TRPV1.
- Verificar a hipótese de que a administração isolada de capsaicina intra-SCPdl irá induzir efeito ansiogênico no LCE, através da ativação dos receptores TRPV1.
- Verificar a hipótese de que a administração isolada de capsaicina intra-SCPdl irá induzir efeito ansiogênico no modelo do VCT, através da ativação dos receptores TRPV1.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Ratos Wistar, 220-240 gramas, provenientes do Biotério Central da USP-Ribeirão Preto foram mantidos em grupos de 5 animais por caixa (41×33×17 cm). Os animais permaneceram no biotério do próprio laboratório até o momento dos testes, à temperatura de 24±2 °C, com ciclo claro-escuro de 12 x 12 horas, com início às 6:30 h. Todos os experimentos foram realizados na fase clara do ciclo. O protocolo experimental está de acordo com a Sociedade Brasileira de Neurociência e Comportamento. E o estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (Protocolo nº 106/2008).

3.2 Drogas

Capsazepina (Tocris, Ellisville, MO, USA) foi dissolvida em DMSO 100%. As doses utilizadas foram de 10, 30 e 60 nmol no volume de 200 nl. Capsaicina (Tocris, Ellisville, MO, USA) foi dissolvida em DMSO 10%. Nas doses de 0,01, 0,1 e 1,0 nmol no volume de 200nL. Todas as soluções foram preparadas imediatamente antes do uso.

3.3 Modelos Experimentais

- Labirinto em Cruz Elevado

O LCE é um aparelho de madeira constituído por dois braços abertos (50 x 10 cm), sem paredes laterais, perpendiculares a dois braços fechados de mesma dimensão, circundados por paredes laterais de 40 cm de altura. Uma placa de acrílico de 1 cm de altura encontra-se acoplada ao redor dos braços abertos, para evitar a queda dos animais do equipamento, que é elevado 50 cm do solo. O LCE foi desenvolvido por Handley e Mithani (Handley e Mithauni, 1984), que se basearam na observação de que os braços abertos são

naturalmente aversivos aos animais pela ausência de paredes laterais (Montgomery, 1955). Para análise comportamental no LCE foi empregado (Any-maze V. 1.9, Noldus, Holanda).

- Teste do Lamber Punido de Vogel

O teste do lamber punido de Vogel é realizado em uma caixa Plexiglas (42x25x20cm) com chão de grades inoxidáveis. O bebedouro de água metálico é projetado para dentro da caixa, e o contato do animal com o bebedouro e o chão fecha um circuito elétrico controlado por um sensor (Anxio-Meter model 102, Columbus, USA), que produz sete pulsos por segundo sempre que o animal entra em contato com ambos componentes. Cada lambida é considerada um pulso, e a cada 20 lambidas o animal recebe um choque de 0,5 mA por 2s. O sensor registra o número total de lambidas e choques recebidos durante o período do teste. O aparelho encontra-se localizado em uma sala com isolamento acústico (Jardim, Aguiar *et al.*, 2005).

- Consumo de Água

Para avaliação do consumo de água foi utilizado o mesmo aparelho do teste anterior, porém, o sistema de choque foi desligado.

- Latência de Retirada de Cauda

O aparelho utilizado consiste em uma plataforma de acrílico com uma resistência acoplada. Por passagem de corrente elétrica há um aumento na temperatura da resistência numa taxa de 9°C/s. O sistema possui um tempo de corte de 6s para prevenir danos teciduais ao animal quando a temperatura se aproxima dos 80°C. O tempo para retirada da cauda é registrado como latência de retirada. A corrente elétrica foi calibrada para promover o reflexo de retirada entre 2,5-3,5s em animais não tratados.

3.4 Cirurgia Estereotáxica

Os animais foram anestesiados com uma solução à 2,5% de 2,2,2-tribromoetanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO USA; 10 ml/kg, i.p.) e fixados a um aparelho estereotáxico (David-Kopff, USA). Em cada animal foi implantada unilateralmente uma cânula de 11 mm, dirigida para SCPdl (coordenadas: AP-lambda 0 mm, L-1,9 mm, P-4 mm, ângulo-16 graus, Paxinos e Watson, 1997), e fixada ao crânio com cimento acrílico. Um fio de aço inox foi colocado dentro da cânula para evitar obstrução. Após a cirurgia os animais receberam antibiótico (i.m., 0,27 g/kg, Pentabiotico[®], Fort Dodge, Brasil) para prevenir infecção, e um antiinflamatório não-esteroidal (i.m., 0,025 g/kg, Banamine[®], Schering Plough, Brasil) para analgesia pós-operatória. Posterior a recuperação da anestesia, os animais foram alojados no biotério até seu restabelecimento (5-7 dias).

3.5 Histologia

Ao término dos testes, os animais foram anestesiados com Uretana 25% (5ml/kg) e 200 nL de corante Azul de Evans 1% foi injetado intra-SCPdl como marcador do sítio de injeção. Posteriormente foram submetidos a perfusão intracardíaca com salina 0,9% e solução formol 10%. Os encéfalos foram removidos, estocados em formol 10% (3-7 dias) e cortados em secções de 50 micrometros de espessura em um criostato de congelamento (Cryocut 1800). Os cortes foram montados em lâminas de vidro gelatinizadas para verificação do sítio de injeção de acordo com Atlas Paxinos e Watson, 1997. Somente os animais com cânula implantada na SCPdl foram considerados como grupo tratamento na análise estatística.

3.6 Análise dos Resultados

Para cada animal foi calculado, durante os 5 minutos da sessão teste do LCE, as porcentagens de entrada e tempo no braço aberto [$100 \times \text{aberto}/(\text{aberto}+\text{fechado})$]. Os

resultados do LCE e do número de lambidas no VCT foram comparados por Análise de Variância (ANOVA). Os valores obtidos na Latência de retirada de cauda foram analisados por ANOVA de medidas repetidas seguida de um ANOVA de uma via para cada tempo. O teste *post hoc* de Duncan foi empregado para múltipla comparação. Diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$. O software utilizado foi SPSS para Windows (versão 13.0).

4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Estudos propostos.

Dois estudos são propostos. Inicialmente foi verificado o efeito de diferentes doses de capsazepina e capsaicina para verificar se são capazes de produzir alteração na resposta comportamental dos animais *per se* no modelo no labirinto em cruz elevado.

Após esse estudo, um grupo independente de animais foi submetido a outro modelo comportamental, modelo do lambar punido de Vogel, para confirmação dos resultados anteriores.

Microinjeção intra-SCPdl

Após 7 dias de recuperação da cirurgia os animais foram randomicamente designados para os diferentes grupos. A injeção intracerebral (intra-SCPdl) foi feita com uma agulha conectada a uma seringa (Hamilton; USA) de 10 microlitros através de um segmento de Polietileno (P10). Após a introdução da agulha na cânula, o animal é deixado solto na caixa, e procede-se a infusão de 200 nl das soluções em velocidade constante (100 nl/30 s), com ajuda de uma Bomba de Infusão (KD Scientific, USA). Após a injeção a agulha permanece por 30s para evitar possível refluxo da droga.

Experimento 1 – Efeito da injeção de capsazepina na SCPdl sobre o comportamento de ratos submetidos ao labirinto em cruz elevado

Os animais receberam injeções intra-SCPdl de veículo ou capsazepina (10, 30 ou 60 nmol) e após 10 minutos foram submetidos ao LCE. Os animais foram colocados voltados para os braços fechados. Durante 5 minutos foram feitos registros do número de entradas e tempo gasto nos braços aberto e fechado.

Experimento 2 – Efeito da injeção de capsazepina na SCPdl sobre o comportamento de ratos submetidos ao teste do lamber punido de Vogel

Os animais foram privados de água 48h antes do teste. 24h antes do teste foi permitido aos animais beber água livremente por 3 minutos na caixa onde o experimento seria realizado para localizarem o bebedouro. Alguns animais não encontraram o bebedouro e por isso não foram utilizados no experimento. 24 horas após essa primeira sessão, os animais receberam injeções intra-SCPdl de veículo ou capsazepina (60 nmol) e após 10 minutos foram submetidos a sessão teste. O teste possui duração de 3 minutos e os animais receberam choques na intensidade de 0,5 mA a cada 20 lambidas. Foi registrado o número de lambidas punidas.

Experimento 3 – Efeito da injeção de capsaicina na SCPdl sobre o comportamento de ratos submetidos ao labirinto em cruz elevado

Foi realizado o mesmo protocolo do Experimento 1, porém os animais receberam injeções intra-SCPdl de veículo ou capsaicina (0,01, 0,1 ou 1,0 nmol), 10 minutos antes de serem submetidos ao LCE.

Experimento 4 – Efeito da injeção de capsaicina na SCPdl sobre o comportamento de ratos submetidos ao teste do lamber punido de Vogel

Foi realizado o mesmo protocolo do Experimento 2, porém os animais receberam injeções intra-SCPdl de veículo ou capsaicina (1,0 nmol) 10 minutos antes de serem submetidos ao VCT

Experimento 5 – Efeito da injeção de capsazepina na SCPdl no consumo de água

Esse experimento foi realizado com grupo independente para controle do consumo de água relativo ao teste de Vogel dos animais que receberam a droga (capsazepina 60 nmol). O

procedimento foi similar ao realizado no Experimento 2, porém os animais não recebiam choques. Foi registrado o número total de lambidas durante os 3 minutos de teste.

Experimento 6 – Efeito da injeção de capsaicina na SCPdl no consumo de água

O mesmo protocolo do Experimento 5 foi realizado, mas nesse caso foram feitas injeções intra-SCPdl de capsaicina (1,0 nmol) ou veículo.

Experimento 7 – Efeito da injeção de capsazepina na SCPdl na latência de retirada de cauda

No teste de retirada de cauda grupos independentes foram designados para controle nociceptivo relativo ao teste de Vogel. O procedimento consiste em segurar o animal gentilmente de forma que a ponta (4-5 cm acima da extremidade) de sua cauda permaneça sobre a resistência elétrica e inicia-se o aumento de temperatura. O tempo para retirada da cauda é registrado como latência de retirada, e foi medido entre intervalos de 5 minutos. Antes da realização das injeções é feita uma avaliação uma linha de base da latência para retirada de cada animal. Animais receberam injeções de morfina (5 mg/kg i.p.) 30 minutos antes do início do teste; ou intra-SCPdl de capsazepina (60 nmol) ou veículo 10 minutos antes do início do teste.

Experimento 8 – Efeito da injeção de capsaicina na SCPdl na latência de retirada de cauda

Foi realizado o mesmo protocolo do Experimento 7, mas nesse caso foram feitas injeções intra-SCPdl de capsaicina (1,0 nmol) ou veículo.

5 RESULTADOS

5.1 Localização do sítio de injeção

Sítios de injeção representativos dos locais de injeção na SCPdl dos animais submetidos a todos os experimentos (Figura 1), baseados em secções coronais adjacentes modificadas do Atlas de Paxinos & Watson, 1997.

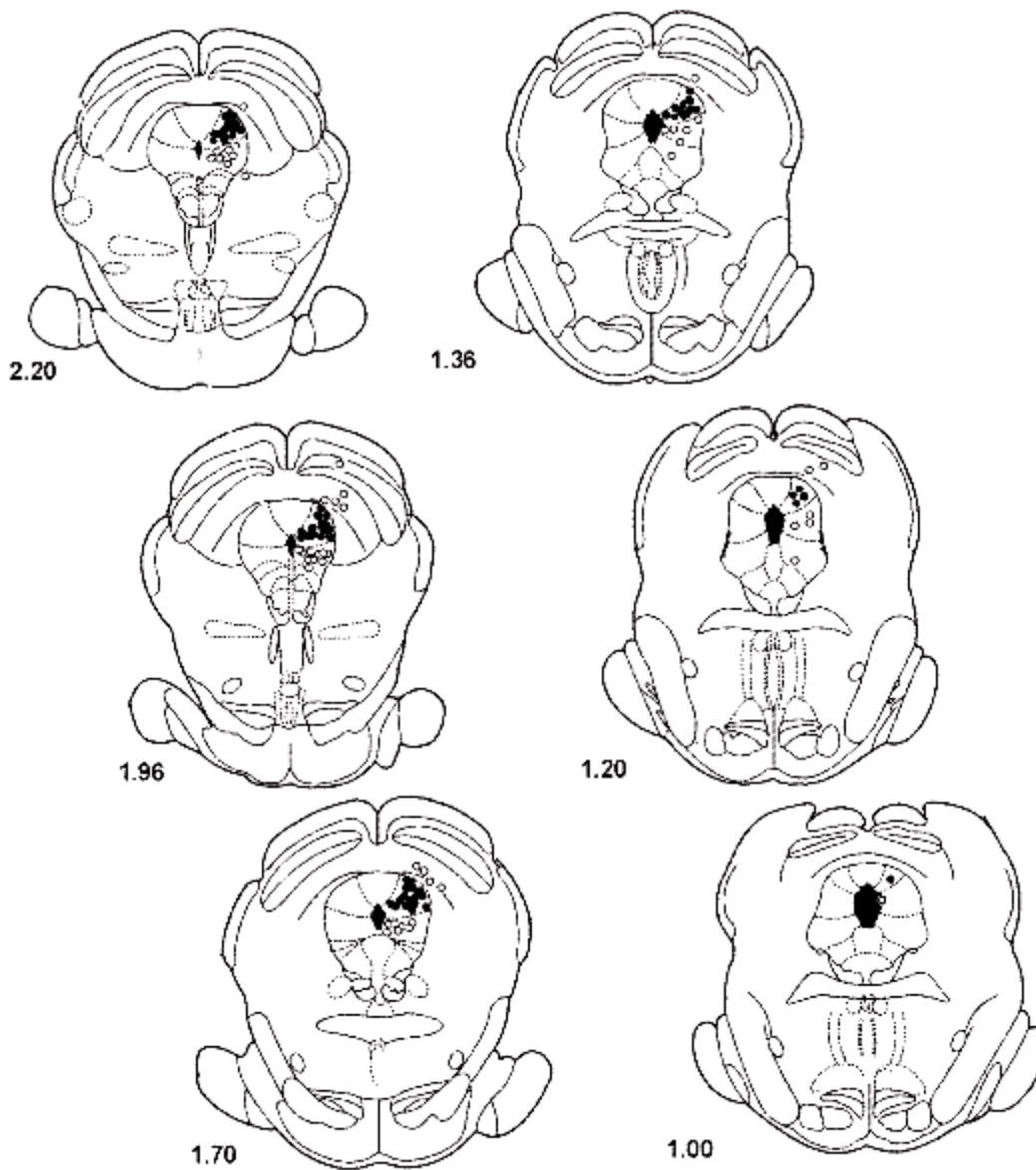


Figura 1: Diagrama representativo baseado no Atlas de Paxinos e Watson (1997) da localização das injeções dos animais submetidos a todos os experimentos. Os círculo escuros representam as injeções localizadas na SCPdl, e os círculos claros injeções fora da SCPdl. Os números representam a distância a partir da interaural (mm).

5.2 Experimento 1 – Efeito da injeção de capsazepina na SCPdl sobre o comportamento de ratos submetidos ao labirinto em cruz elevado

No primeiro experimento realizado, pode-se observar que a capsazepina na maior dose (CPZ; 60 nmol/200nL) administrada na SCPdl, aumentou a porcentagem de tempo ($F_{4,26}=2,1230$; $p=0,1066$, teste Duncan $p<0,05$; Figura 2) de permanência no braço aberto quando comparado ao controle (veículo). Nenhuma das outras doses utilizadas e nem os animais que receberam injeção de capsazepina na dose de 60 nmol fora da SCPdl apresentaram diferença em relação ao veículo. Não houve diferença no número de entrada nos braços fechados ($F_{4,26}=1,0290$, $p=0,41$), sugerindo que a droga não promove alteração na atividade locomotora.

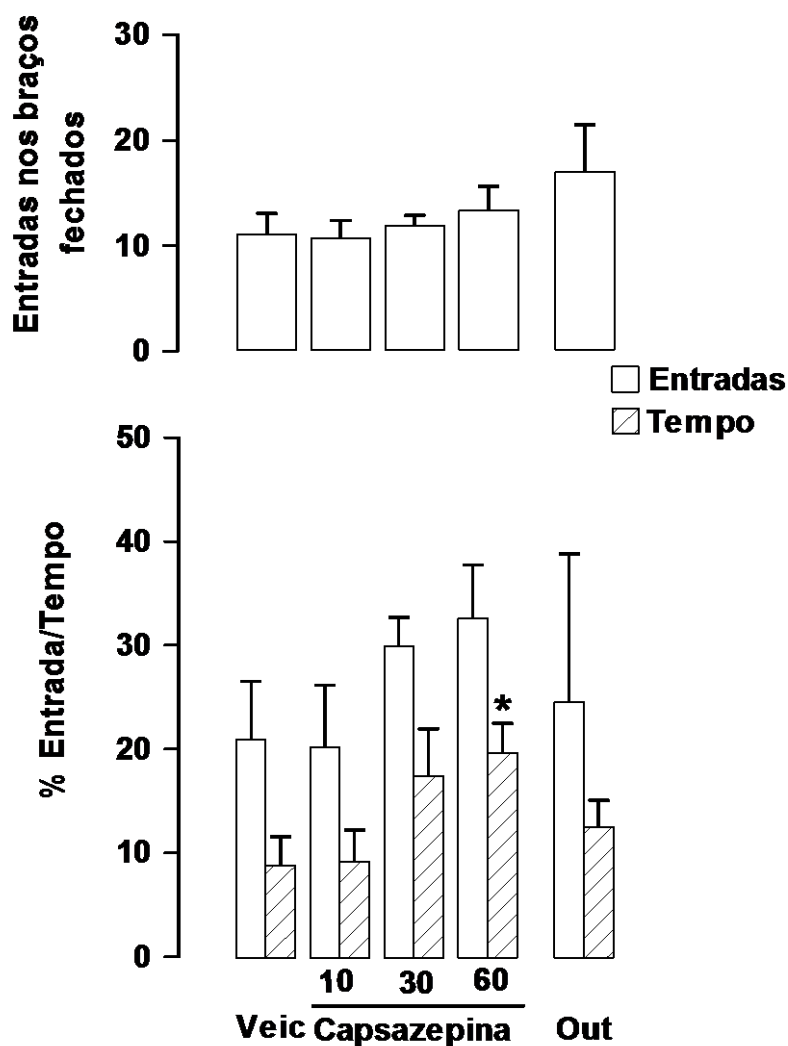


Figura 2: Efeito da administração de capsazepina (10, 30 e 60 nmol/200nL) na SCPdl em ratos submetidos ao labirinto em cruz elevado. A parte superior mostra o número de entradas no braço fechado. A parte inferior apresenta a porcentagem de entradas (barras brancas) e de tempo (barras hachuradas) nos braços abertos. As barras representam a média \pm EPM. Animais que receberam capsazepina (60 nmol) em sítio diferente da SCPdl foram analisados juntos e considerados o grupo Out. Asterísco indica diferença do grupo veículo (Veic; $p < 0,05$, ANOVA seguido de pos-teste Duncan; veículo $n=8$, capsazepina 10 nmol $n=7$, capsazepina 30 nmol $n=7$, capsazepina 60 nmol $n=6$, grupo Out $n=3$).

5.3 Experimento 2 – Efeito da injeção de capsazepina na SCPdl sobre o comportamento de ratos submetidos ao teste do lamber punido de Vogel

No teste do lamber punido de Vogel, após a administração de capsazepina na dose de 60nmol/200nL, foi observado um aumento no número de lambidas punidas e choques ($H_2=8,6525$, $p=0,0132$) quando comparado ao grupo controle como pode ser observado na Figura 3. Não foi verificada nenhuma diferença do número de lambidas punidas dos animais que receberam capsazepina em uma região diferente da SCPdl (Out) quando comparados ao controle.

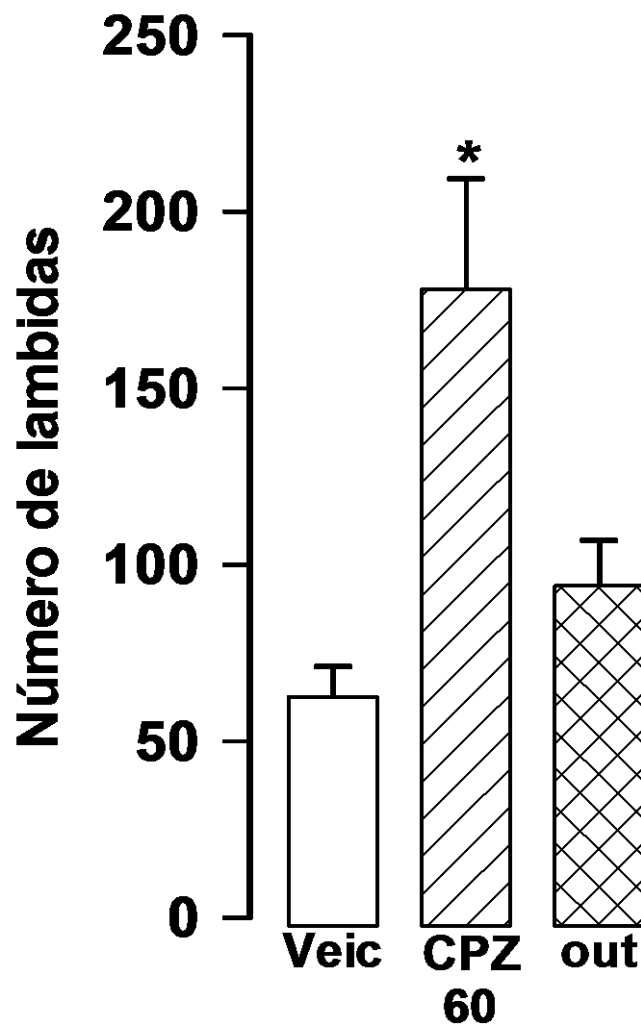


Figura 3: Efeito da injeção de capsazepina (CPZ, 60 nmol) na SCPdl em ratos submetidos ao teste do lambar punido de Vogel. As barras representam média \pm EPM do número total de lambidas punidas durante os 3 minutos do teste. Animais que receberam capsazepina fora da SCPdl foram analisados juntos e são denominados grupo out. A capsazepina aumentou o número de lambidas em relação ao veículo (Veic). Asterísco indica diferença em relação ao veículo ($p < 0,05$, Kruskal-Wallis seguido por pós-teste Mann-Whitney; veículo $n=5$, capsazepina 60 nmol $n=6$, grupo out $n=3$).

5.4 Experimento 3 – Efeito da injeção de capsaicina na SCPdl sobre o comportamento de ratos submetidos ao labirinto em cruz elevado

Nesse experimento, pode-se observar que a capsaicina na maior dose (1,0 nmol/200nL) administrada na SCPdl, aumentou a porcentagem de entrada no braço aberto ($F_{4,25}=1,96$, $p=0,13$, teste Duncan $p<0,05$; Figura 4) quando comparado ao controle (Veic). Nenhuma das outras doses utilizadas e nem os animais que receberam injeção de capsaicina na dose de 1,0 nmol fora da SCPdl (Out) apresentaram diferença em relação ao veículo. Não houve diferença no número de entrada nos braços fechados ($F_{4,25}=1,1108$, $p=0,37$), sugerindo que a droga não promove alteração na atividade locomotora.

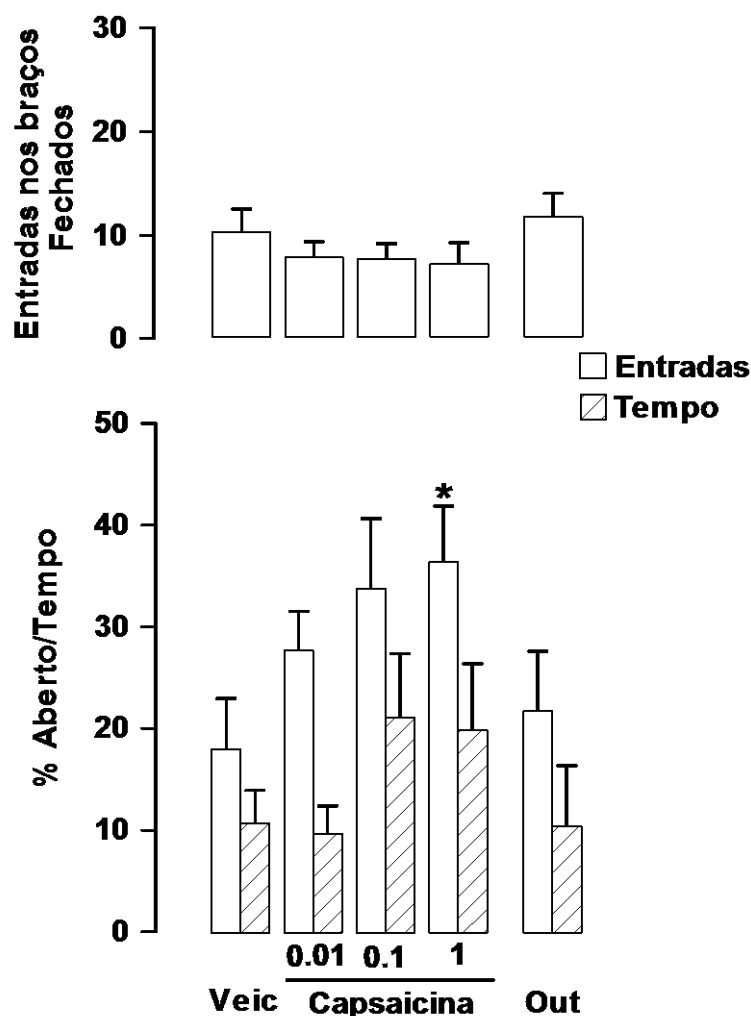


Figura 4: Efeito da administração de capsaicina (0,01, 0,1 e 1,0 nmol/200nL) na SCPdl em ratos submetidos ao labirinto em cruz elevado. A parte superior mostra o número de entradas no braço fechado. A parte inferior apresenta a porcentagem de entradas (barras brancas) e de tempo (barras hachuradas) nos braços abertos. As barras representam a média \pm EPM. Animais que receberam capsaicina (1,0 nmol) em sítio diferente da SCPdl foram analisados juntos e considerados o grupo Out. Asterísco indica diferença do grupo veículo (Veic, $p < 0,05$, ANOVA seguido de pos-teste Duncan; veículo $n=6$, capsacina 0,01 nmol $n=5$, capsacina 0,1 nmol $n=6$, capsacina 1,0 nmol $n=7$, grupo Out $n=6$).

5.5 Experimento 4 – Efeito da injeção de capsaicina na SCPdl sobre o comportamento de ratos submetidos ao teste do lambar punido de Vogel

No teste do lambar punido de Vogel, após a administração de capsaicina na dose de 1,0nmol/200nL, foi observado um aumento no número de lambidas punidas e choques ($H_2=7,6011$, $p=0,0224$) quando comparado ao grupo controle (Veic) como pode ser observado na Figura 5. Não foi verificada nenhuma diferença do número de lambidas punidas dos animais que receberam capsaicina em uma região diferente da SCPdl (out) quando comparados ao controle.

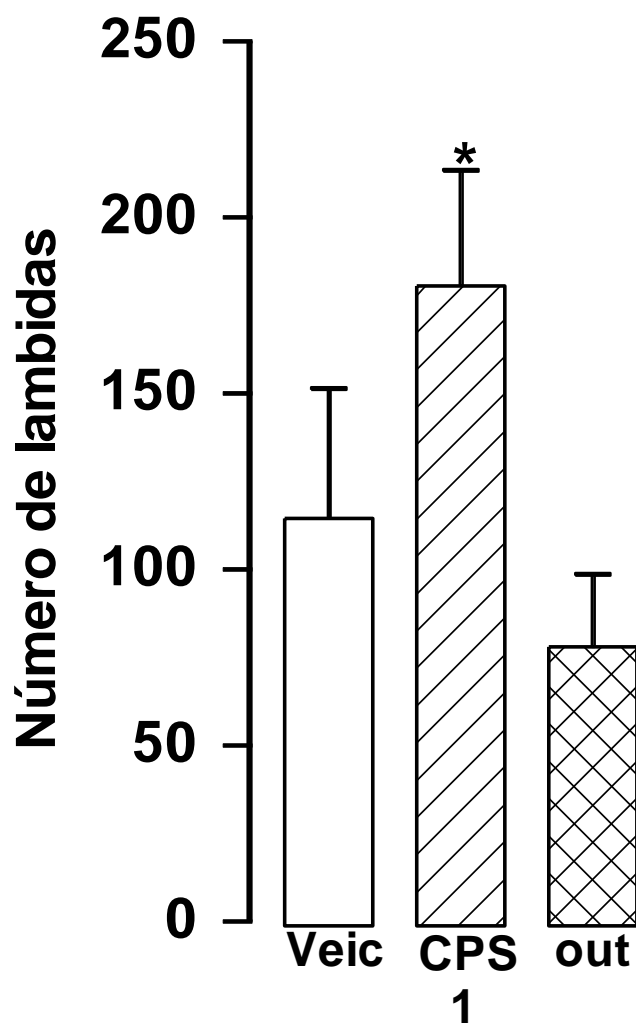


Figura 5 : Efeito da injeção de capsaicina (CPS, 1,0 nmol) na SCPdl em ratos submetidos ao teste do lambido punido de Vogel. As barras representam média \pm EPM do número total de lambidas punidas durante os 3 minutos do teste. Animais que receberam capsaicina fora da SCPdl foram analisados juntos e são denominados grupo out. A capsaicina aumentou o número de lambidas em relação ao veículo. Asterísco indica diferença em relação ao veículo ($p < 0,05$, Kruskal-Wallis seguido por pós-teste Mann-Whitney; veículo $n=10$, capsaicina 1,0 nmol $n=11$, grupo out $n=6$).

5.6 Experimento 5 – Efeito da injeção de capsazepina na SCPdl no consumo de água

Experimentos adicionais foram realizados para descartar possíveis alterações promovidas pela capsazepina em relação ao consumo de água referentes ao teste do lambido de Vogel. No experimento 5, a administração de capsazepina não alterou o número de lambidas não punidas (CPZ 60 nmol/200 nL, n=3, média do número de lambidas: $1164 \pm 150,0$; veículo n=3, média do número de lambidas: $1069,67 \pm 32,0$; Figura 6).

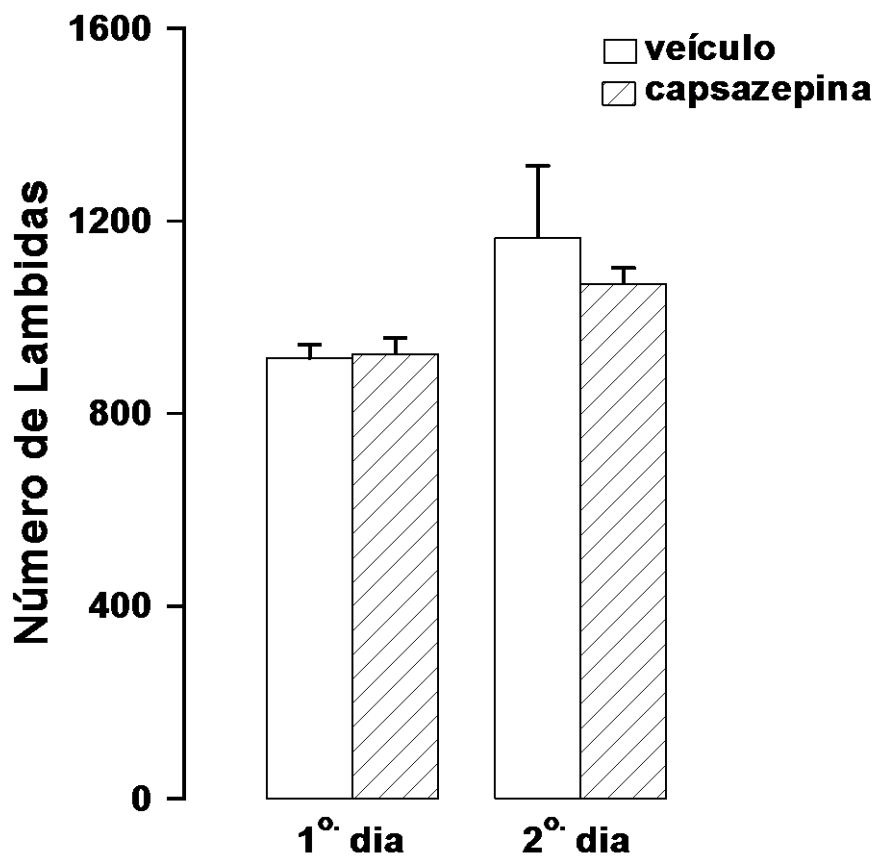


Figura 6: Ausência de efeito da capsazepina (barras hachuradas; 60 nmol; n=3) em relação ao veículo (barras brancas; n=3) injetada localmente na SCPdl em ratos submetidos a avaliação do consumo de água. As colunas representam a média \pm EPM do número de lambidas para cada grupo no período de 3 minutos, após o início das lambidas.

5.7 Experimento 6 – Efeito da injeção de capsaicina na SCPdl no consumo de água

Experimentos adicionais foram realizados para descartar possíveis alterações promovidas pela capsaicina em relação ao consumo de água referente ao teste do lambr punido de Vogel. No experimento 6, a administração de capsaicina não alterou o número de lambidas não punidas (CPS 1,0 nmol/200 nL, n=4, média do número de lambidas: $1056,5 \pm 93,83$; veículo n=5, média do número de lambidas: $1090,2 \pm 20,17$; Figura 7).

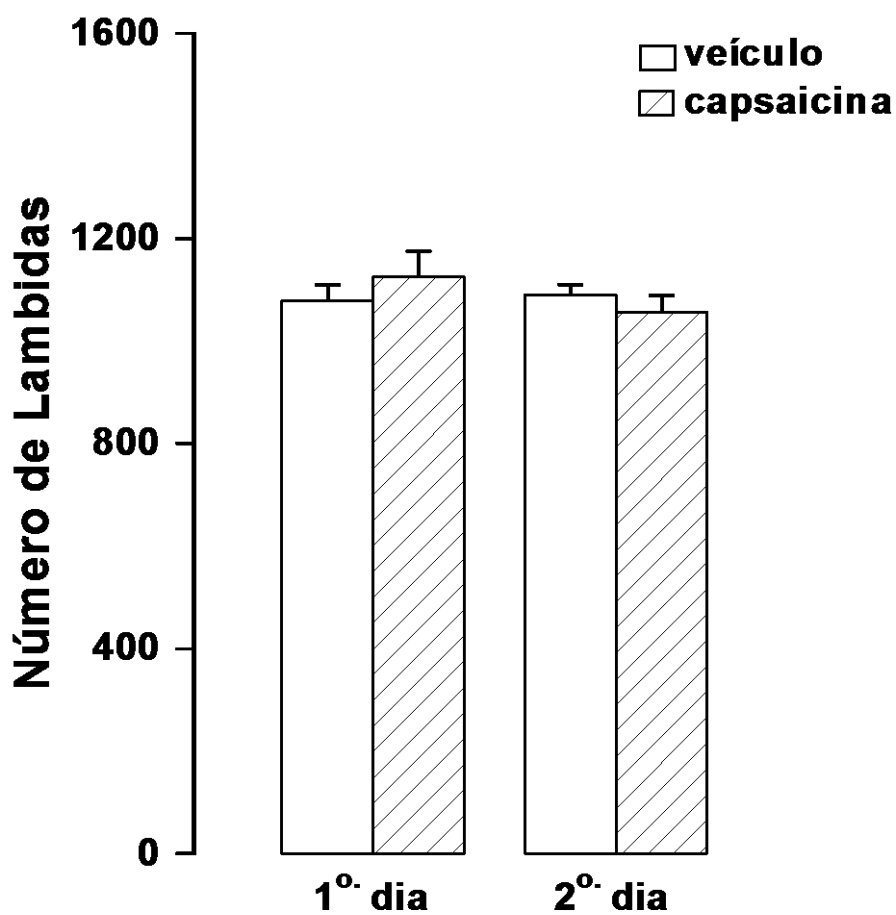


Figura 7: Ausência de efeito da capsaicina (barras hachuradas; 1,0 nmol; n=4) em relação ao veículo (barras brancas; n=5) injetada localmente na SCPdl em ratos submetidos a avaliação do consumo de água. As colunas representam a média \pm EPM do número de lambidas para cada grupo no período de 3 minutos, após o início das lambidas.

5.8 Experimento 7 – Efeito da injeção de capsazepina na SCPdl na latência de retirada de cauda

Protocolo experimental adicional realizado como controle para avaliar possível alteração nociceptiva promovida pelo tratamento com capsazepina na SCPdl. É observado que somente os animais do grupo morfina apresentaram aumento na latência da retirada de cauda quando comparada com os outros grupos (fator droga, $F_{2,7}=27,46$, $p<0,001$; fator tempo $F_{4,8}=3,76$, $p<0,01$, interação droga×tempo, $F_{6,8}=12,31$; Duncan, $p<0,05$; Figura 8).

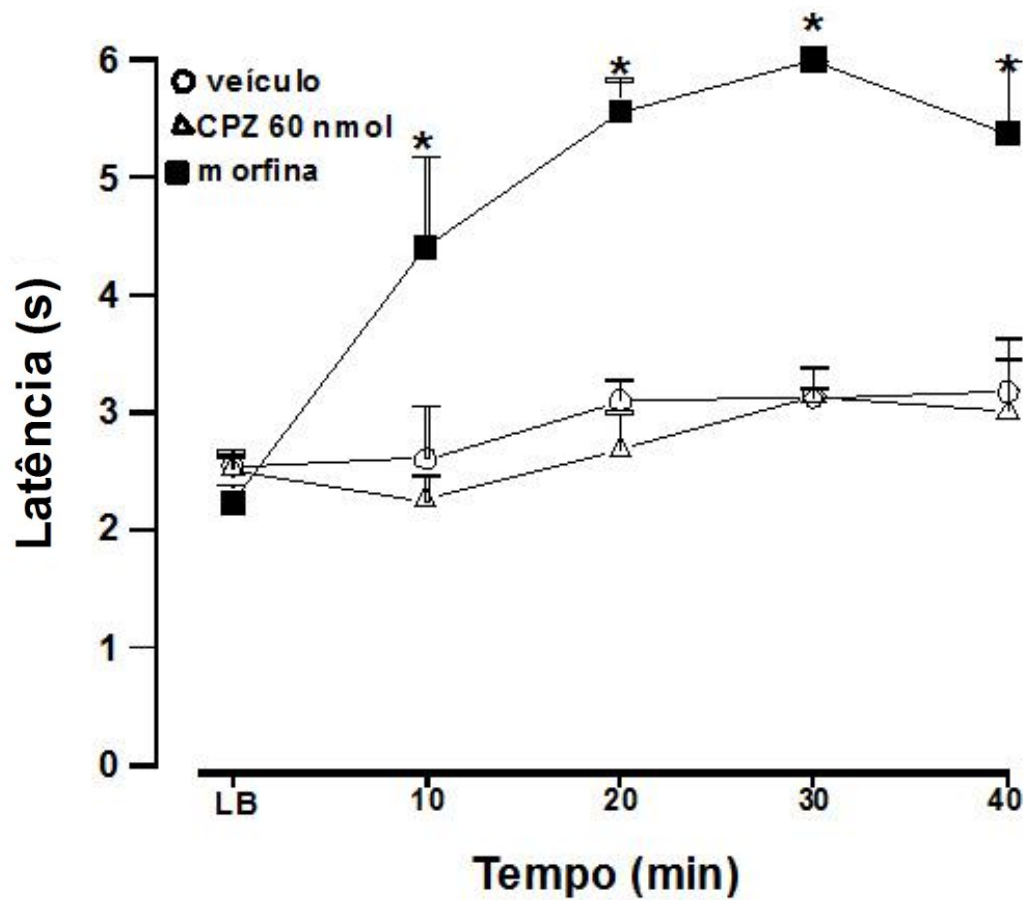


Figura 8: Efeito temporal da administração de capsazepina (CPZ 60nmol, $n=4$) e morfina (5mg/Kg, $n=3$) em relação ao grupo veículo ($n=3$). Cada ponto representa a média \pm EPM do tempo de latência para retirada da cauda. Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao veículo ($p < 0,05$, ANOVA seguido de pós-teste Duncan).

5.9 Experimento 8 – Efeito da injeção de capsaicina na SCPdl na latência de retirada de cauda

Protocolo experimental adicional realizado como controle para avaliar possível alteração nociceptiva promovida pelo tratamento com capsaicina na SCPdl. É observado que somente os animais do grupo morfina apresentaram aumento na latência da retirada de cauda quando comparada com os outros grupos (fator droga, $F_{2,11}=38,9$, $p<0,001$; fator tempo $F_{4,8}=13,21$; $p<0,05$, interação droga \times tempo, $F_{8,14}=16,9$; Duncan, $p<0,05$; Figura 9).

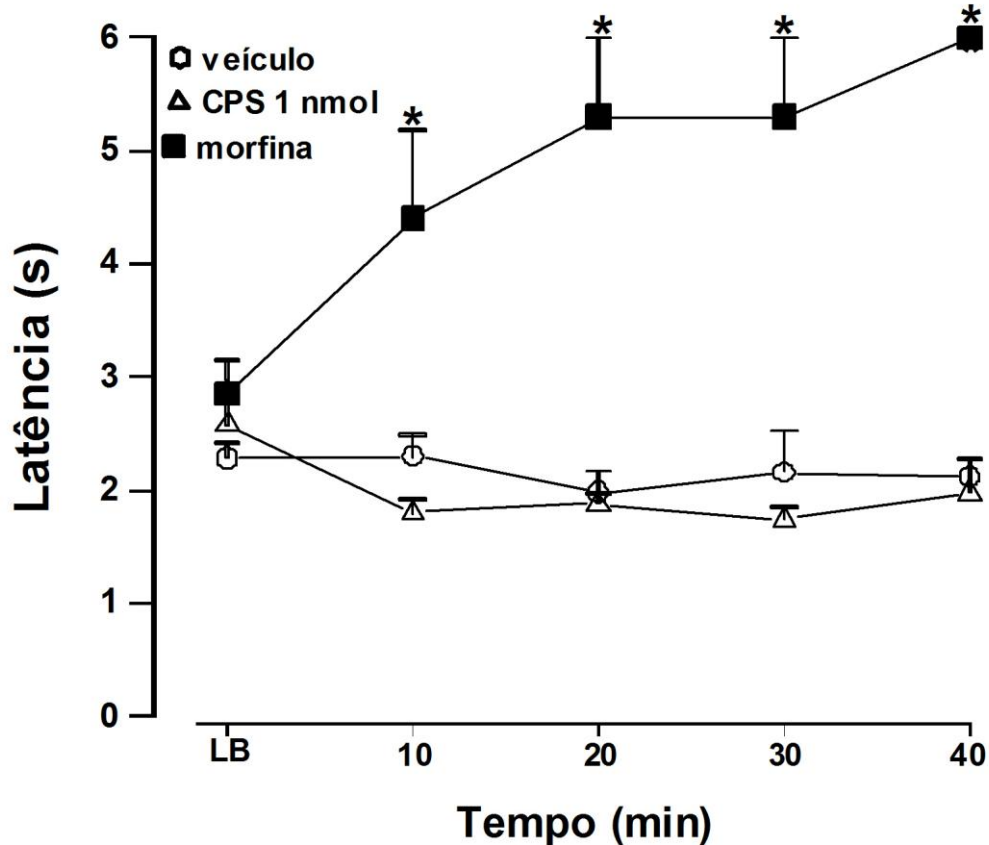


Figura 9 : Efeito temporal da administração de capsaicina (CPS 1,0 nmol, n=5) e morfina (5mg/Kg, n=4) em relação ao grupo veículo (n=3). Cada ponto representa a média \pm EPM do tempo de latência para retirada da cauda. Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao veículo ($p < 0,05$, ANOVA seguido de pós-teste Duncan).

6 DISCUSSÃO

O presente trabalho demonstrou que injeções intra-SCPdl do agonista e do antagonista de receptores TRPV1 foram capazes de induzir efeitos do tipo ansiolítico em dois modelos animais conceitualmente distintos, LCE e o VCT. Enquanto o LCE baseia-se em uma aversão natural que os roedores apresentam por lugares abertos, claros e elevados (Carobrez e Bertoglio, 2005), o VCT envolve a supressão de uma resposta punida, resultante de uma situação de conflito aprendida (Millan e Brocco, 2003).

No modelo do LCE, os animais tendem a permanecer mais tempo nos braços fechados, mas na presença de drogas ansiolíticas há um aumento no tempo de permanência e número de entradas desses animais nos braços abertos (Handley e Mithani, 1984; Pellow e File, 1986). Em relação as drogas ansiolíticas, é observado um aumento no número de respostas punidas no VCT. Neste modelo, os animais são privados de água por 48h antes do teste e são expostos ao conflito entre beber água e receber um choque na língua (Vogel, Beer *et al.*, 1971), após a administração de drogas que reduzem o nível de ansiedade é observado um aumento no número de lambidas punidas, indicando redução no conflito característico do modelo (Griebel, Perrault *et al.*, 1999; Flores e Pellon, 2000).

Apesar de apresentar aumento na porcentagem de entradas nos braços aberto, os animais tratados com capsazepina não demonstraram alteração no número de entradas nos braços fechados, em relação ao grupo controle. Isso indica que a droga utilizada não afeta a atividade locomotora dos animais. E a capsaicina aumentou o número de entradas nos braços aberto, e bem como a capsazepina, não alterou o número de entradas no braço fechado. Sendo assim, tanto o agonista quanto o antagonista não afetaram o comportamento locomotor dos animais, corroborando com o efeito tipo ansiolítico observado para ambas as drogas.

Em conjunto com esses resultados, no VCT, tanto o agonista quanto o antagonista, nas doses que demonstraram efeito no primeiro modelo, apresentaram aumento no número de lambidas punidas. Confirmando os resultados obtidos no modelo do LCE.

O resultado obtido em relação a capsaicina é contrário à nossa hipótese inicial. Uma possibilidade para a ausência do efeito ansiogênico esperado seria o fato de que a capsaicina é capaz de induzir uma dessensibilização rápida nos canais iônicos dos receptores TRPV1 após única administração. Isso foi observado na periferia e é responsável pelo atraso no efeito nociceptivo observado após injeções de capsaicina (Lamotte, Shain *et al.*, 1991; Lamotte, Lundberg *et al.*, 1992; Szallasi e Blumberg, 1999; Szallasi e Di Marzo, 2000). Um resultado similar foi obtido após administração local na SCP por McGaraughty e colaboradores (2003). Entretanto, nem todos os estudos apresentam os mesmos resultados. Ao contrário de dessensibilização, alguns verificaram ativação dos receptores TRPV1 tanto para respostas nociceptivas como para respostas associadas à ansiedade (Palazzo, De Novellis *et al.*, 2002; Starowicz, Maione *et al.*, 2007; Starowicz, Nigam *et al.*, 2007; Rubino, Realini *et al.*, 2008). E essa diferença pode estar relacionada ou com a dose utilizada ou com o intervalo entre a administração da droga e análise comportamental.

Do mesmo modo, a partir dos experimentos que serviram como controle do VCT, já que o aumento no número de lambidas poderia estar relacionado com alterações no limiar nociceptivo, não foram observadas alterações na latência de retirada da cauda para nenhuma das drogas utilizadas. Sugerindo efeito antipunição específico do VCT, e não sendo consequência da redução da nocicepção pelo tratamento. Ainda, a droga poderia promover aumento excessivo da sede do animal, mas a avaliação do número de lambidas não punidas demonstrou não haver diferença entre o número de lambidas não punidas entre os animais do grupo controle e aqueles que receberam capsazepina, reforçando a idéia da diminuição do conflito gerado pelo modelo, e assim, confirmando o caráter ansiolítico da capsazepina. A

mesma resposta foi obtida em relação a capsaicina, tanto para as respostas nociceptivas quanto para o consumo de água.

Adicionalmente, além do bloqueio dos receptores TRPV1, é sugerido que a capsazepina possa atuar por meio de bloqueio direto de canais de cálcio voltagem-dependente e receptores colinérgicos do tipo nicotínico (Szallasi e Blumberg, 1999). Ainda, a administração do agonista TRPV1, capsaicina, produz uma resposta no mesmo sentido da produzida na presença de capsazepina. Esse fato é atribuído ao efeito bifásico que a ativação de receptores TRPV1 pode apresentar (Szallasi e Blumberg, 1999; Szallasi e Di Marzo, 2000) através da dessensibilização de canal iônico de cálcio.

Em um trabalho prévio de 2007, foi demonstrado que ativação de receptores canabinóides do tipo 1 (CB1) situados na SCPdl induz efeitos do tipo ansiolíticos (Moreira, Aguiar *et al.*, 2007). E a injeção local de anandamida é capaz de atenuar comportamentos relacionados à ansiedade, um efeito bloqueado pelo antagonista seletivo de receptores CB1, AM251. Juntamente, o efeito promovido pela anandamida foi mimetizado pelo agonista seletivo CB1 araquidonoil cloretoilamina (Moreira, Aguiar *et al.*, 2007). Em outro estudo do mesmo grupo (Lisboa, Resstel *et al.*, 2008), após administração de anandamida na SCPdl em animais submetidos ao VCT, foi observado aumento no número de lambidas punidas. A mesma resposta foi obtida após injeção intra-SCPdl de AM404, o inibidor da enzima FAAH que degrada a anandamida, nesse modelo. Porém, quando os animais foram pré-tratados com o antagonista de receptor CB1 (AM251), ambos os efeitos foram bloqueados.

Os efeitos antiaversivos mediados por CB1 também foram observados em modelos animais que mimetizam situações de pânico (Finn, Jhaveri *et al.*, 2003), e através da analgesia induzida por estresse (Hohmann, Suplita *et al.*, 2005).

Esses dados prévios, em conjunto com os dados do presente trabalho indicam que receptores CB1 e TRPV1 estão envolvidos em funções opostas na SCPdl. Ainda, a

possibilidade da anandamida agir como agonista endógeno para ambos receptores, talvez explique a curva dose-resposta em forma de sino obtida após sua administração local na SCPdl (Moreira, Aguiar *et al.*, 2007). Tal questão está de acordo com observações de que o aumento do nível de endocanabinóides na SCPvl, através da inibição da hidrólise da anandamida, poderia induzir tanto efeitos anti como efeitos pro-nociceptivo via TRPV1 e CB1, respectivamente (Maione, Bisogno *et al.*, 2006).

Também, estudos demonstraram que injeções no córtex pré-frontal de metanandamida, um análogo estável da anandamida, são capazes de alterar respostas comportamentais no LCE de maneira bifásica, com baixas doses induzindo efeito ansiolítico mediado por CB1, enquanto altas doses induzem respostas ansiogênicas via TRPV1 (Rubino, Realini *et al.*, 2008). Nesse mesmo estudo, diferentes doses de capsaicina foram administradas e um efeito do tipo ansiogênico foi obtido, ao contrário do observado no presente trabalho, e isso provavelmente está relacionado com a diferença na dose utilizada e do tempo entre a administração da droga e o início do teste, não sendo suficiente para dessensibilizar os canais de cálcio nesse caso.

Finalmente, a modulação bidirecional de respostas aversivas por TRPV1 e CB1 é sustentada por estudos que empregam administração sistêmica de drogas ou animais geneticamente modificados. Tanto deleções genéticas quanto antagonismo dos receptores CB1 aumentam respostas aversivas (Martin, Ledent *et al.*, 2002; Moreira, Aguiar *et al.*, 2007; Moreira, Kaiser *et al.*, 2008). O oposto acontece quando há o bloqueio dos receptores TRPV1 ou com animais que possuem deleção para o receptor TRPV1 (Kasckow, Mulchahey *et al.*, 2004; Marsch, Foeller *et al.*, 2007). A anandamida ainda pode interagir com receptores CB1 e TRPV1 para inibir ou promover estados aversivos, respectivamente. Outros receptores nos quais a anandamida pode atuar devem ser considerados, tal como o receptor CB2 e o receptor

recém identificado GPR55, apesar de que suas ações na modulação da ansiedade ainda não serem muito conhecidas (Moreira e Lutz, 2008).

O possível mecanismo e possíveis interações do TRPV1 com outros neurotransmissores ainda precisam ser investigados. Entretanto, existem evidências farmacológicas, morfológicas, neuroquímicas e eletrofisiológicas que sugerem o possível envolvimento do glutamato, em respostas mediadas pelo TRPV1 na SCP.

Primeiramente, o efeito antinociceptivo induzido por injeções locais de capsaicina pode ser evitado por antagonistas de receptores ionotrópicos (tipo NMDA) ou metabotrópicos (tipos 1 e 5) de glutamato (Palazzo, De Novellis *et al.*, 2002). Também, receptores TRPV1 são expressos em neurônios glutamatérgicos e podem facilitar a liberação desse neurotransmissor (Starowicz, Maione *et al.*, 2007). Por último, ainda causam aumento do disparo neuronal por aumentar a ativação de receptores ionotrópicos, tanto NMDA quanto não-NMDA, em fatias de SCPdl (Xing e Li, 2007).

Outra questão controversa é sobre qual ligante endógeno seria capaz de ativar o receptor TRPV1. A primeira substância proposta como ‘endovanilóide’ foi a anandamida, entretanto essa apresenta uma afinidade de 5 a 20 vezes menor quando comparado com os receptores CB1 (Zygmunt, Petersson *et al.*, 1999; Smart, Gunthorpe *et al.*, 2000; Starowicz, Nigam *et al.*, 2007). Outros agonistas endógenos propostos seriam o N-araquidonoil dopamina (NADA) e derivados de lipoxigenase (Starowicz, Nigam *et al.*, 2007).

Ainda, Palazzo e colaboradores (2002), e Mcgaraughty e colaboradores (2003) detectaram efeitos antinociceptivos mediados por TRPV1 na SCP. No presente trabalho, nenhuma das drogas – capsazepina e capsaicina – modificaram a latência no teste de retirada de cauda. Uma possível razão para o resultado obtido no presente estudo é que as doses utilizadas são muito baixas para produzir alteração na resposta nociceptiva, apesar de serem capazes de produzir efeitos ansiolíticos. Os trabalhos que apresentaram efeito antinociceptivo

utilizaram doses entre 6-10 nmol (Palazzo, De Novellis *et al.*, 2002; Mcgaraughty, Chu *et al.*, 2003), enquanto a dose testada no presente trabalho foi de 1 nmol, e que apresentou efeito no LCE e VCT.

Em conclusão, os resultados obtidos demonstram que injeções locais do antagonista de receptores TRPV1, capsazepina, na SCPdl promoveram efeitos ansiolíticos em dois modelos animais preditivos de ansiedade. O mesmo efeito é obtido após administração de capsaicina, possivelmente por promover dessensibilização do canal iônico. Sendo assim, sugere-se que tanto o bloqueio do TRPV1 ou ativação do CB1 na SCPdl possam inibir comportamentos relacionados à ansiedade. E a ativação de CB1 e TRPV1 é um possível mecanismo pelo qual a anandamida endógena modula bidirecionalmente as respostas aversivas nessa estrutura.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguiar, D. C. e F. S. Guimaraes. Blockade of NMDA receptors and nitric oxide synthesis in the dorsolateral periaqueductal gray attenuates behavioral and cellular responses of rats exposed to a live predator. J Neurosci Res, Apr 9. 2009.

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., K. A. Keay, *et al.* 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.

Baumann, T. K., D. A. Simone, *et al.* Neurogenic hyperalgesia: the search for the primary cutaneous afferent fibers that contribute to capsaicin-induced pain and hyperalgesia. J Neurophysiol, v.66, n.1, Jul, p.212-27. 1991.

Beijamini, V. e F. S. Guimaraes. c-Fos expression increase in NADPH-diaphorase positive neurons after exposure to a live cat. Behav Brain Res, v.170, n.1, Jun 3, p.52-61. 2006.

Bevan, S. e J. Szolcsanyi. Sensory neuron-specific actions of capsaicin: mechanisms and applications. Trends Pharmacol Sci, v.11, n.8, Aug, p.330-3. 1990.

Blanchard, D. C. e R. J. Blanchard. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. Annu Rev Psychol, v.39, p.43-68. 1988.

Blanchard, R. J., K. J. Flannelly, *et al.* Defensive behavior of laboratory and wild *Rattus norvegicus*. J Comp Psychol, v.100, n.2, Jun, p.101-7. 1986.

Calixto, J. B., C. A. Kassuya, *et al.* Contribution of natural products to the discovery of the transient receptor potential (TRP) channels family and their functions. Pharmacol Ther, v.106, n.2, May, p.179-208. 2005.

Canteras, N. S. e M. Goto. Fos-like immunoreactivity in the periaqueductal gray of rats exposed to a natural predator. Neuroreport, v.10, n.2, Feb 5, p.413-8. 1999.

Carobrez, A. P. e L. J. Bertoglio. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. Neurosci Biobehav Rev, v.29, n.8, p.1193-205. 2005.

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.

Caterina, M. J., A. Leffler, *et al.* Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. Science, v.288, n.5464, Apr 14, p.306-13. 2000.

Caterina, M. J., M. A. Schumacher, *et al.* The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. Nature, v.389, n.6653, Oct 23, p.816-24. 1997.

- Clapham, D. E. TRP channels as cellular sensors. Nature, v.426, n.6966, Dec 4, p.517-24. 2003.
- Corey, D. P. New TRP channels in hearing and mechanosensation. Neuron, v.39, n.4, Aug 14, p.585-8. 2003.
- Cristino, L., L. De Petrocellis, *et al.* Immunohistochemical localization of cannabinoid type 1 and vanilloid transient receptor potential vanilloid type 1 receptors in the mouse brain. Neuroscience, v.139, n.4, p.1405-15. 2006.
- Davis, J. B., J. Gray, *et al.* Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. Nature, v.405, n.6783, May 11, p.183-7. 2000.
- Delmas, P. Polycystins: polymodal receptor/ion-channel cellular sensors. Pflugers Arch, v.451, n.1, Oct, p.264-76. 2005.
- Devane, W. A., L. Hanus, *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., T. Bisogno, *et al.* Anandamide: some like it hot. Trends Pharmacol Sci, v.22, n.7, Jul, p.346-9. 2001.
- Di Marzo, V., I. Lastres-Becker, *et al.* Hypolocomotor effects in rats of capsaicin and two long chain capsaicin homologues. Eur J Pharmacol, v.420, n.2-3, May 25, p.123-31. 2001.
- Di Marzo, V., D. Melck, *et al.* Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. Trends Neurosci, v.21, n.12, Dec, p.521-8. 1998.
- 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, *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.
- Gamse, R. Capsaicin and nociception in the rat and mouse. Possible role of substance P. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, v.320, n.3, Sep, p.205-16. 1982.
- Graeff, F. G. Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviors and related emotions in mammals. Braz J Med Biol Res, v.27, n.4, Apr, p.811-29. 1994.
- Griebel, G., G. Perrault, *et al.* Comparison of the pharmacological properties of classical and novel BZ-omega receptor ligands. Behav Pharmacol, v.10, n.5, Sep, p.483-95. 1999.

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.

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

Holzer, P. Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. Neuroscience, v.24, n.3, Mar, p.739-68. 1988.

Jardim, M. C., D. C. Aguiar, *et al.* 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.

Kasckow, J. W., J. J. Mulchahey, *et al.* Effects of the vanilloid agonist olvanil and antagonist capsazepine on rat behaviors. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, v.28, n.2, Mar, p.291-5. 2004.

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.

Lamotte, R. H., L. E. Lundberg, *et al.* Pain, hyperalgesia and activity in nociceptive C units in humans after intradermal injection of capsaicin. J Physiol, v.448, Mar, p.749-64. 1992.

Lamotte, R. H., C. N. Shain, *et al.* Neurogenic hyperalgesia: psychophysical studies of underlying mechanisms. J Neurophysiol, v.66, n.1, Jul, p.190-211. 1991.

Lee, J., V. Di Marzo, *et al.* A role for vanilloid receptor 1 (TRPV1) and endocannabinoid signalling in the regulation of spontaneous and L-DOPA induced locomotion in normal and reserpine-treated rats. Neuropharmacology, v.51, n.3, Sep, p.557-65. 2006.

Lisboa, S. F., L. B. Resstel, *et al.* Activation of cannabinoid CB1 receptors in the dorsolateral periaqueductal gray induces anxiolytic effects in rats submitted to the Vogel conflict test. Eur J Pharmacol, v.593, n.1-3, Sep 28, p.73-8. 2008.

Maione, S., T. Bisogno, *et al.* Elevation of endocannabinoid levels in the ventrolateral periaqueductal grey through inhibition of fatty acid amide hydrolase affects descending nociceptive pathways via both cannabinoid receptor type 1 and transient receptor potential vanilloid type-1 receptors. J Pharmacol Exp Ther, v.316, n.3, Mar, p.969-82. 2006.

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.

_____. 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.

Marinelli, S., V. Di Marzo, *et al.* Presynaptic facilitation of glutamatergic synapses to dopaminergic neurons of the rat substantia nigra by endogenous stimulation of vanilloid receptors. J Neurosci, v.23, n.8, Apr 15, p.3136-44. 2003.

Marinelli, S., C. W. Vaughan, *et al.* Capsaicin activation of glutamatergic synaptic transmission in the rat locus coeruleus in vitro. J Physiol, v.543, n.Pt 2, Sep 1, p.531-40. 2002.

Marsch, R., E. Foeller, *et al.* Reduced anxiety, conditioned fear, and hippocampal long-term potentiation in transient receptor potential vanilloid type 1 receptor-deficient mice. J Neurosci, v.27, n.4, Jan 24, p.832-9. 2007.

Marsh, S. J., C. E. Stansfeld, *et al.* The mechanism of action of capsaicin on sensory C-type neurons and their axons in vitro. Neuroscience, v.23, n.1, Oct, p.275-89. 1987.

Martin, M., C. Ledent, *et al.* Involvement of CB1 cannabinoid receptors in emotional behaviour. Psychopharmacology (Berl), v.159, n.4, Feb, p.379-87. 2002.

Martin, W. J., S. L. Patrick, *et al.* 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.

Mcgaraughty, S., K. L. Chu, *et al.* Capsaicin infused into the PAG affects rat tail flick responses to noxious heat and alters neuronal firing in the RVM. J Neurophysiol, v.90, n.4, Oct, p.2702-10. 2003.

Mechoulam, R., E. Fride, *et al.* Endocannabinoids. Eur J Pharmacol, v.359, n.1, Oct 16, p.1-18. 1998.

Mezey, E., Z. E. Toth, *et al.* Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human. Proc Natl Acad Sci U S A, v.97, n.7, Mar 28, p.3655-60. 2000.

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.

Mobbs, D., P. Petrovic, *et al.* When fear is near: threat imminence elicits prefrontal-periaqueductal gray shifts in humans. Science, v.317, n.5841, Aug 24, p.1079-83. 2007.

Montell, C., L. Birnbaumer, *et al.* The TRP channels, a remarkably functional family. Cell, v.108, n.5, Mar 8, p.595-8. 2002.

_____. A unified nomenclature for the superfamily of TRP cation channels. Mol Cell, v.9, n.2, Feb, p.229-31. 2002.

Montgomery, K. C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. J Comp Physiol Psychol, v.48, n.4, Aug, p.254-60. 1955.

Moran, M. M., H. Xu, *et al.* TRP ion channels in the nervous system. Curr Opin Neurobiol, v.14, n.3, Jun, p.362-9. 2004.

Moreira, F. A., D. C. Aguiar, *et al.* Anxiolytic-like effect of cannabinoids injected into the rat dorsolateral periaqueductal gray. Neuropharmacology, v.52, n.3, Mar, p.958-65. 2007.

- Moreira, F. A., N. Kaiser, *et al.* Reduced anxiety-like behaviour induced by genetic and pharmacological inhibition of the endocannabinoid-degrading enzyme fatty acid amide hydrolase (FAAH) is mediated by CB1 receptors. Neuropharmacology, v.54, n.1, Jan, p.141-50. 2008.
- Moreira, F. A. e B. Lutz. The endocannabinoid system: emotion, learning and addiction. Addict Biol, v.13, n.2, Jun, p.196-212. 2008.
- Nashold, B. S., Jr., W. P. Wilson, *et al.* Sensations evoked by stimulation in the midbrain of man. J Neurosurg, v.30, n.1, Jan, p.14-24. 1969.
- Nilius, B. e T. Voets. TRP channels: a TR(I)P through a world of multifunctional cation channels. Pflugers Arch, v.451, n.1, Oct, p.1-10. 2005.
- Palazzo, E., V. De Novellis, *et al.* Interaction between vanilloid and glutamate receptors in the central modulation of nociception. Eur J Pharmacol, v.439, n.1-3, Mar 29, p.69-75. 2002.
- 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.
- Ross, R. A. Anandamide and vanilloid TRPV1 receptors. Br J Pharmacol, v.140, n.5, Nov, p.790-801. 2003.
- Ross, R. A., T. M. Gibson, *et al.* Structure-activity relationship for the endogenous cannabinoid, anandamide, and certain of its analogues at vanilloid receptors in transfected cells and vas deferens. Br J Pharmacol, v.132, n.3, Feb, p.631-40. 2001.
- Rubino, T., N. Realini, *et al.* Role in anxiety behavior of the endocannabinoid system in the prefrontal cortex. Cereb Cortex, v.18, n.6, Jun, p.1292-301. 2008.
- Sasamura, T., M. Sasaki, *et al.* Existence of capsaicin-sensitive glutamatergic terminals in rat hypothalamus. Neuroreport, v.9, n.9, Jun 22, p.2045-8. 1998.
- Schenberg, L. C., A. S. Bittencourt, *et al.* Modeling panic attacks. Neurosci Biobehav Rev, v.25, n.7-8, Dec, p.647-59. 2001.
- Smart, D., M. J. Gunthorpe, *et al.* The endogenous lipid anandamide is a full agonist at the human vanilloid receptor (hVR1). Br J Pharmacol, v.129, n.2, Jan, p.227-30. 2000.
- Starowicz, K., S. Maione, *et al.* Tonic endovanilloid facilitation of glutamate release in brainstem descending antinociceptive pathways. J Neurosci, v.27, n.50, Dec 12, p.13739-49. 2007.
- Starowicz, K., S. Nigam, *et al.* Biochemistry and pharmacology of endovanilloids. Pharmacol Ther, v.114, n.1, Apr, p.13-33. 2007.
- Szallasi, A. e P. M. Blumberg. Resiniferatoxin and its analogs provide novel insights into the pharmacology of the vanilloid (capsaicin) receptor. Life Sci, v.47, n.16, p.1399-408. 1990a.

_____. Specific binding of resiniferatoxin, an ultrapotent capsaicin analog, by dorsal root ganglion membranes. Brain Res, v.524, n.1, Jul 30, p.106-11. 1990b.

_____. Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. Pharmacol Rev, v.51, n.2, Jun, p.159-212. 1999.

Szallasi, A. e V. Di Marzo. New perspectives on enigmatic vanilloid receptors. Trends Neurosci, v.23, n.10, Oct, p.491-7. 2000.

Toth, A., J. Boczan, *et al.* Expression and distribution of vanilloid receptor 1 (TRPV1) in the adult rat brain. Brain Res Mol Brain Res, v.135, n.1-2, Apr 27, p.162-8. 2005.

Van Der Stelt, M. e V. Di Marzo. Endovanilloids. Putative endogenous ligands of transient receptor potential vanilloid 1 channels. Eur J Biochem, v.271, n.10, May, p.1827-34. 2004.

Vaughan, C. W., M. Connor, *et al.* 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.

Vogel, J. R., B. Beer, *et al.* A simple and reliable conflict procedure for testing anti-anxiety agents. Psychopharmacologia, v.21, n.1, p.1-7. 1971.

Vriens, J., H. Watanabe, *et al.* Cell swelling, heat, and chemical agonists use distinct pathways for the activation of the cation channel TRPV4. Proc Natl Acad Sci U S A, v.101, n.1, Jan 6, p.396-401. 2004.

Wardle, K. A., J. Ranson, *et al.* Pharmacological characterization of the vanilloid receptor in the rat dorsal spinal cord. Br J Pharmacol, v.121, n.5, Jul, p.1012-6. 1997.

Xing, J. e J. Li. TRPV1 receptor mediates glutamatergic synaptic input to dorsolateral periaqueductal gray (dl-PAG) neurons. J Neurophysiol, v.97, n.1, Jan, p.503-11. 2007.

Zygmunt, P. M., J. Petersson, *et al.* Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. Nature, v.400, n.6743, Jul 29, p.452-7. 1999.

8 ANEXO

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](#)