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

**Envolvimento do núcleo leito da estria terminal nos
efeitos ansiolíticos do canabidiol**

FELIPE VILLELA GOMES

Ribeirão Preto
2011

FELIPE VILLELA GOMES

**Envolvimento do núcleo leito da estria terminal nos
efeitos ansiolíticos do canabidiol**

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

2011

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Gomes, Felipe Villela

Envolvimento do núcleo leito da estria terminal nos efeitos ansiolíticos do canabidiol / Felipe Villela Gomes; orientador: Prof. Dr. Francisco Silveira Guimarães.

95 p.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciências – Área de Concentração: Farmacologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2011.

1. Canabidiol. 2. Ansiedade. 3. Núcleo leito da estria terminal. 4. Receptor 5-HT_{1A}. 5. Modelos animais. I. Guimarães, Francisco Silveira, orientador.
II. Título

FOLHA DE APROVAÇÃO

Felipe Villela Gomes

ENVOLVIMENTO DO NÚCLEO LEITO DA ESTRIA TERMINAL NOS EFEITOS ANSIOLÍTICOS DO CANABIDIOL

**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 ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. Francisco Silveira Guimarães

Instituição: FMRP – USP

Assinatura: _____

Prof. Dr. Antonio Waldo Zuardi

Instituição: FMRP – USP

Assinatura: _____

Prof. Dr. Reinaldo Naoto Takahashi

Instituição: CCB – UFSC

Assinatura: _____

*“Seja qual for o teu sonho, comece...
Ousadia tem genialidade, poder e magia.”*

Julian Wolfgang Goethe

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Paulo César e Maria Célia, que sempre me incentivaram na busca e conquista dos meus ideais.

A Danielle, pelo incentivo, compreensão, por sempre ter estado ao meu lado e pelo carinho e amor que sempre dedicou a mim.

AGRADECIMENTOS

A Deus que me deu chance de viver e que me acompanha na luta diária não deixando esmorecer minha fé.

A todos os meus familiares que sempre me deu amor e incentivo que necessitava e necessito para seguir em frente.

Ao Prof. Dr. Francisco Silveira Guimarães pela firmeza, determinação, incentivo e confiança transmitida e por compartilhar comigo seus conhecimentos. Um verdadeiro mestre e exemplo de dedicação profissional a ser seguido.

Ao Prof. Dr. Leonardo Resstel, meu “segundo orientador”, por ter sempre estado disposto a esclarecer minhas dúvidas, pelas oportunidades dadas e pelo grande apoio durante a realização deste trabalho.

Aos Prof. Dr. Antônio Zuardi e Reinaldo Takahashi por aceitarem participar da banca examinadora e pela magnífica contribuição com pesquisas sobre canabinóides.

Ao Prof. Dr. Fernando Morgan de Aguiar Corrêa pelo fundamental apoio para a realização deste trabalho.

A Lorena, pela amizade, compreensão e companhia agradável durante esses dois anos de convivência.

A todos os amigos do laboratório, em especial à Alline, Sabrina, Dani Aguiar, Carol, Fred e Manoela, que sempre me ajudaram e contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional.

Aos amigos Fernando e Daniel que muito contribuíram para a realização deste trabalho e também pela agradável convivência.

Aos amigos do Laboratório de Controle Central da Pressão Arterial, em especial à América, Eduardo, Carlos, Cris, Milena, Silvana, Laura, Téo, Nílson, Sara e Denise, por proporcionarem momentos agradáveis e me ajudarem sempre que necessitei.

Aos Professores do Departamento de Farmacologia, por contribuírem para o meu desenvolvimento profissional.

A todos os meus amigos pós-graduandos, pela amizade e colaboração.

Ao José Carlos de Aguiar, Idália I. B. Aguiar, Ivanilda A. C. Fortunato e Simone S. Guilhaume, por me ensinarem e auxiliarem com suas habilidades técnicas. Vocês foram de extrema importância para a realização deste trabalho.

Aos funcionários Sônia Stefanelli, Fátima Petean e José Waldik Ramon, por toda competência, disponibilidade e atenção com que atendem as nossas necessidades burocráticas.

As funcionárias Eliana e Maria Inês, pelo cuidado e respeito que dedicam aos animais do biotério.

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

LISTA DE ABREVIATURAS

2-AG – 2-araquidonoilglicerol

5-CT – 5-carboxiamidotriptamina

5-HT – serotonina

5-HT_{1A} – receptor de serotonina do tipo 1A

5-HT₃ – receptor de serotonina do tipo 3

ANOVA – análise de variância

CB1 – receptor canabinóide do tipo 1

CB2 – receptor canabinóide do tipo 2

CBD – canabidiol

DSM – Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais

EPM – erro padrão da média

FC – frequência cardíaca

LCE – labirinto em cruz elevado

NLET – núcleo leito da estria terminal

PAM – pressão arterial média

REC – resposta emocional condicionada

SBNeC – Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento

TRPV1 – receptor vanilóide do tipo 1

Δ^9 -THC – Δ^9 -tetraidrocanabinol

RESUMO

GOMES, F. V. **Envolvimento do núcleo leito da estria terminal nos efeitos ansiolíticos do canabidiol**. 2011. 95 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

O canabidiol (CBD), um componente não-psicotomomético presente na planta *Cannabis sativa*, induz efeitos ansiolíticos em roedores e humanos após administração sistêmica. Entretanto, poucos estudos foram feitos para identificar as estruturas cerebrais envolvidas nesses efeitos do CBD. Dados prévios do nosso laboratório apontam para um possível envolvimento do núcleo leito da estria terminal (NLET) nos efeitos ansiolíticos do CBD, como evidenciado pelos níveis alterados (reduzidos) de imunorreatividade para proteína c-Fos (marcador de ativação neuronal) em animais tratados com administração sistêmica de CBD no modelo da resposta emocional condicionada (REC) contextual. Os mecanismos de ação pelos quais o CBD produz seus efeitos também são ainda pouco compreendidos, mas pode envolver a ativação de receptores 5-HT_{1A}. Assim, o presente trabalho investigou se a administração de CBD diretamente no NLET atenuaria a expressão da REC contextual. Além disso, nós também avaliamos o envolvimento do NLET nos efeitos ansiolíticos do CBD em outros dois modelos animais de ansiedade amplamente utilizados, o labirinto em cruz elevado e o teste do lambar punido de Vogel e, se os efeitos ansiolíticos do CBD envolveriam a ativação local de receptores 5-HT_{1A}. Os resultados mostraram que o CBD reduziu significativamente o tempo de congelamento e atenuou as respostas cardiovasculares induzidas pela re-exposição ao contexto aversivo no modelo da REC contextual. Além disso, o CBD também

aumentou a exploração dos braços abertos do LCE, bem como o número de lambidas punidas no teste de Vogel, sugerindo um efeito ansiolítico. Adicionalmente, o CBD não alterou o número de entradas nos braços fechados do LCE e não interferiu no consumo de água ou no limiar nociceptivo, descartando potenciais interferentes nesses dois modelos. Nós também observamos que o pré-tratamento local com WAY100635, um antagonista de receptores 5-HT_{1A}, foi capaz de bloquear os efeitos do CBD injetado no NLET nos três modelos animais utilizados. Logo, estes resultados dão suporte à proposta que NLET está envolvido nos efeitos ansiolíticos do CBD observado após a administração sistêmica, e que este efeito parece envolver a neurotransmissão mediada por receptores 5-HT_{1A}.

Palavras-chave: Canabidiol, ansiedade, núcleo leito da estria terminal, receptor 5-HT_{1A}, modelos animais.

ABSTRACT

GOMES, F. V. **Involvement of the bed nucleus of the stria terminalis in the anxiolytic effects of cannabidiol.** 2011. 95 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

Cannabidiol (CBD), a major non-psychotomimetic compound from *Cannabis sativa*, induces anxiolytic effects in rodents and humans following systemic administration. Despite the brain structures of CBD acts remain poorly understood, previous results from our laboratory suggest that the bed nucleus of the stria terminalis (BNST) may be involved in the anxiolytic effects of CBD, as evidenced by changed levels (decreased) in c-Fos protein expression (a marker of neuronal activation) in animals treated with systemic administration of CBD in the contextual fear conditioning. The mechanisms of CBD effects are still poorly understood but may involve activation of 5-HT_{1A} receptors. Thus, in the present study, we have investigated the anxiolytic-like effects of intra-BNST administration of CBD in rats submitted to contextual fear conditioning. Moreover, we also evaluated the involvement of the BNST in the anxiolytic effects of CBD in other two widely used animal models of anxiety, the elevated plus-maze and the Vogel conflict test, and if these effects are mediated by local activation of 5-HT_{1A} receptors. The results showed that CBD significantly decreased the freezing time and attenuated the cardiovascular responses induced by contextual fear conditioning. Moreover, CBD has also increased the exploration of open arms in EPM, and the number of punished licks in the Vogel test, suggesting an anxiolytic effect. Additionally, the CBD did not alter the number of entries in closed arms of the EPM and did not affect water consumption or pain threshold, eliminating

potential interferences of these two models. We also found that local pretreatment with WAY100635, a 5-HT_{1A} receptor antagonist, was able to block the effects of CBD injected into the BNST in the three animal models of anxiety used. Hence, these results support the proposal that BNST is involved in anxiolytic effects of CBD observed after systemic administration, and this effect seems to involve the neurotransmission mediated by 5-HT_{1A} receptors.

Keywords: Cannabidiol, anxiety, bed nucleus of the stria terminalis, 5-HT_{1A} receptor, animal models.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 A ansiedade e seus substratos neurais	16
1.2 O núcleo leito da estria terminal (NLET) e sua relação com a ansiedade.....	17
1.3 O canabidiol e seus efeitos ansiolíticos	19
2 OBJETIVOS.....	25
2.1 Objetivo geral	25
2.2 Objetivos específicos	25
3 MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 Animais	27
3.2 Cirurgia estereotáxica	27
3.3 Drogas	28
3.4 Injeção de drogas no NLET	28
3.5 Procedimento experimental	29
3.6 Modelos experimentais	29
3.6.1 Resposta emocional condicionada (REC) contextual	29
3.6.2 Labirinto em Cruz Elevado (LCE)	31
3.6.3 Lamber punido de Vogel.....	32
3.6.4 Avaliação do consumo de água.....	33
3.6.5 Teste de retirada da cauda	33
3.7 Determinação anatômica dos sítios de injeção de droga.....	34
3.8 Análise dos dados e estatística.....	34
4 RESULTADOS.....	37
4.1 Localização dos sítios de injeção.....	37
4.2 Efeitos da injeção de CBD no NLET sobre a REC contextual	39
4.3 Efeitos da injeção de CBD no NLET de ratos submetidos ao LCE	45
4.4 Efeitos da injeção de CBD no NLET de ratos submetidos ao teste de Vogel ..	46
4.5 Efeitos da injeção de CBD no NLET no consumo de água e no teste de retirada da cauda	47
4.6 Efeitos do pré-tratamento com o WAY100635, um antagonista de receptores 5-HT _{1A} , sobre os efeitos do CBD na REC contextual.....	49

4.7 Efeitos do pré-tratamento com o WAY100635 sobre os efeitos do CBD no LCE	51
4.8 Efeitos do pré-tratamento com WAY100635 sobre os efeitos do CBD no teste de Vogel	52
5 DISCUSSÃO	54
6 CONCLUSÃO	61
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 A ansiedade e seus substratos neurais

A ansiedade é um estado emocional subjetivo de apreensão acompanhado por alterações fisiológicas, comportamentais e cognitivas, tais como taquicardia, sudorese, tensão muscular, irritabilidade e inquietação, dificuldade de concentração e perturbações do sono (Brandão, 2004).

Embora exista uma íntima relação entre ansiedade e medo, e o estudo do medo em animais tem sido extremamente usado para o entendimento das bases neurais da ansiedade, modificações da teoria clássica do sistema de inibição comportamental proposta por Gray e McNaughton (Gray e Mcnaughton, 2000) sugerem que há distinção entre essas duas emoções (Mcnaughton e Corr, 2004). O medo ocorre como resposta a um estímulo definido que ameaça a integridade física do indivíduo enquanto a ansiedade é fruto de perigo incerto ou desconhecido.

Evolutivamente, a ansiedade é importante para a sobrevivência, uma vez que nos adverte do perigo. E, apesar do seu desconforto, é claramente um estímulo necessário para um ótimo desempenho em muitas situações. A ansiedade pode ser considerada como uma emoção “normal” e um componente adaptativo de respostas de estresse agudo sob circunstâncias que ameaçam a integridade do indivíduo. Entretanto, se a ansiedade é desproporcional em intensidade ou cronicidade, ou não é associada com algum risco real ela pode constituir uma resposta mal-adaptativa ou mesmo um transtorno psiquiátrico (Brandão, 2004; Graeff, 2005).

No início do século XX os transtornos de ansiedade foram reunidos em um conceito vago de neurose estabelecido por Sigmund Freud, conceito este usado até meados de 1980, quando foi publicado o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM), elaborado pela *American Psychiatric Association*. Em

sua última edição, o DSM-IV classifica os transtornos de ansiedade em classes nosológicas distintas de acordo com a sintomatologia, decurso temporal e resposta terapêutica, como: transtorno de ansiedade generalizada, transtorno de ansiedade social, fobias específicas, transtorno do pânico, transtorno do estresse pós-traumático, transtorno obsessivo-compulsivo, entre outros (Graeff, 2005).

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 (Graeff, 2005). A ansiedade é um tipo de emoção e, portanto, as estruturas cerebrais implicadas fazem parte do sistema límbico (Dalglish, 2004). O sistema límbico é composto por estruturas corticais, bem como subcorticais, que estão intimamente interligadas. As principais estruturas do sistema límbico inclui o córtex pré-frontal, córtex cingulado, córtex entorrinal, hipocampo, substância cinzenta periaquedutal, amígdala, hipotálamo e núcleo leito da estria terminal (NLET) (Swanson e Petrovich, 1998; Heimer, 2003; Dalglish, 2004). Essas estruturas tem seus respectivos papéis em vários componentes no processamento da ansiedade, como por exemplo, na percepção da ameaça, na modulação e extinção de respostas aversivas. Desta forma, essas estruturas podem estar envolvidas diferentemente nos vários transtornos de ansiedade (Shin e Liberzon, 2010).

1.2 O núcleo leito da estria terminal (NLET) e sua relação com a ansiedade

O NLET é uma estrutura límbica, que forma um contínuo rostralmente à amígdala (Weller e Smith, 1982) e, por meio de extensas conexões com outras estruturas límbicas e com regiões bulbares, tem um importante papel no controle de funções comportamentais, neuroendócrinas e autonômicas (Holstege *et al.*, 1985;

Dunn, 1987; Ciriello e Janssen, 1993; Walker *et al.*, 2003; Dong e Swanson, 2004; Spencer *et al.*, 2005; Resstel *et al.*, 2008).

O NLET tem sido tradicionalmente dividido em duas subdivisões: medial e lateral (Alheid *et al.*, 1995; Alheid, 2003). Dessas, a subdivisão lateral apresenta grande relação embriológica, anatômica, citoarquitetônica e neuroquímica com o núcleo central da amígdala, formando uma circuitaria neural comum denominada de “amígdala estendida”. Entretanto, não há um consenso em relação aos critérios utilizados para a divisão do NLET. Swanson e colaboradores, por exemplo, dividem o NLET em anterior e posterior (Ju e Swanson, 1989; Ju *et al.*, 1989).

Evidências substanciais sugerem que o NLET está criticamente envolvido na expressão de respostas relacionadas à ansiedade (Walker *et al.*, 2003; Resstel *et al.*, 2008; Davis *et al.*, 2010; Somerville *et al.*, 2010) e na modulação de respostas ao estresse (Hammack *et al.*, 2004). Entretanto, estudos investigando os efeitos de lesões do NLET em modelos animais de ansiedade têm produzido resultados inconsistentes. Inicialmente, Ledoux e colaboradores não observaram qualquer alteração nas respostas comportamentais e autonômicas em ratos com lesão do NLET submetidos a um protocolo de medo condicionado ao som (Ledoux *et al.*, 1988). Da mesma forma, Treit e colaboradores não encontraram nenhum efeito de lesões do NLET de ratos submetidos ao labirinto em cruz elevado (LCE) e ao teste de enterrar um bastão eletrificado (Treit *et al.*, 1998). Por outro lado, Waddell e colaboradores verificaram um comportamento tipo-ansiolítico de lesões no NLET em animais submetidos ao labirinto em zero elevado (Waddell *et al.*, 2006). Mais recentemente, Resstel e colaboradores mostraram que a inativação reversível da neurotransmissão do NLET com cloreto de cobalto, um bloqueador sináptico não seletivo, atenuou a expressão das respostas comportamentais e cardiovasculares

induzidas pela re-exposição a um contexto aversivo, além de provocar um aumento do número de lambidas punidas no teste do lambes punido de Vogel, mostrando assim um efeito tipo-ansiolítico (Resstel *et al.*, 2008). As razões para estes resultados contraditórios não são claras, mas podem envolver diferentes modelos animais utilizados e/ ou diferenças metodológicas observadas entre o emprego de lesões irreversíveis e inativação reversível.

Corroborando com o envolvimento do NLET na expressão de respostas relacionadas à ansiedade, Beck e Fibiger relataram que a resposta emocional condicionada (REC) contextual aumentou a expressão da proteína c-Fos, um marcador de ativação neuronal, no NLET, um efeito que foi atenuado pela administração sistêmica de diazepam antes da sessão teste (Beck e Fibiger, 1995). Da mesma forma, Lemos e colaboradores também observaram que o tratamento sistêmico com o canabidiol (CBD), um fitocanabinóide com propriedades ansiolíticas, atenuou a REC contextual e o aumento da expressão da proteína c-Fos no NLET induzida pela re-exposição ao contexto aversivo, sugerindo um possível envolvimento dessa estrutura nos efeitos do CBD (Lemos *et al.*, 2010).

1.3 O canabidiol e seus efeitos ansiolíticos

Preparações de *Cannabis sativa* são usadas há muitos séculos antes de Cristo com fins recreativos e medicinais (Zuardi, 2006). Entretanto apenas em meados do século XX que os principais constituintes químicos da *Cannabis* foram isolados e identificados. O componente responsável pela maioria dos efeitos psicotrópicos da *Cannabis* é o Δ^9 -tetraidrocanabinol (Δ^9 -THC), o qual foi isolado, identificado e sintetizado por Raphael Mechoulam e colaboradores na década de 1960 (Pertwee, 2006).

O Δ^9 -THC provoca seus efeitos psicológicos pela ativação do receptor canabinóide 1 (receptor CB1), que foi identificado em 1988 (Devane *et al.*, 1988) e clonado em 1990 (Matsuda *et al.*, 1990). O receptor CB1 é o receptor acoplado à proteína G mais comum no cérebro. Sua expressão é particularmente elevada no hipocampo, cerebelo, gânglios da basais e neocórtex (Herkenham *et al.*, 1990; Herkenham, 1991; Herkenham *et al.*, 1991; Tsou *et al.*, 1998). Um segundo receptor canabinóide, o receptor CB2 (Munro *et al.*, 1993), o qual acreditava-se ser restrito às células imunológicas, também é expresso no sistema nervoso central, embora em níveis inferiores aos receptores CB1 (Onaivi, 2006; Onaivi *et al.*, 2006). A descoberta desses receptores levou a uma busca por seus agonistas endógenos (endocanabinóides). O primeiro destes endocanabinóides a ser descoberto, foi denominado anandamida, sendo o termo “ananda” oriundo do sânscrito, que significa “felicidade serena” (Devane *et al.*, 1992). Posteriormente, um segundo endocanabinóide, o 2-araquidonoilglicerol (2-AG), foi descoberto em 1995 (Mechoulam *et al.*, 1995), e outros logo em seguida (Pacher *et al.*, 2006).

Outro importante constituinte da *Cannabis sativa* é o canabidiol (CBD) que, ao contrário Δ^9 -THC, é desprovido dos efeitos psicoativos típicos da *Cannabis* (Zuardi, 2008). O CBD foi isolado em 1940 por Adams e colaboradores, mas sua estrutura e estereoquímica foram elucidadas por Mechoulam e Svho apenas em 1963 (Pertwee, 2006).

Embora o CBD não tenha sido inicialmente reconhecido como um componente ativo, este composto tem atraído recentemente grande interesse devido ao seu potencial terapêutico em diversos transtornos (Mechoulam *et al.*, 2002), uma vez que diversos estudos mostram que a administração sistêmica de CBD produz diferentes efeitos farmacológicos, tais como anticonvulsivante (Cunha *et al.*, 1980;

Carlini e Cunha, 1981), neuroprotetor (Hampson *et al.*, 1998; Iuvone *et al.*, 2009), antipsicótico (Zuardi *et al.*, 2006), anticomulsivo (Casarotto *et al.*, 2010) e ansiolítico (Crippa *et al.*, 2004). Em relação ao último, dois importantes estudos com voluntários saudáveis, verificaram que o CBD foi capaz de reduzir os efeitos ansiogênicos induzidos por altas doses de Δ^9 -THC, sem alterar os níveis plasmáticos deste composto (Karniol *et al.*, 1974; Zuardi *et al.*, 1982). Estes resultados originaram a hipótese de que o CBD teria propriedades ansiolíticas. Posteriormente, estudos clínicos e pré-clínicos investigando os efeitos ansiolíticos do CBD obtiveram resultados favoráveis a essa hipótese.

Em humanos, Zuardi e colaboradores, observaram efeitos ansiolíticos do CBD em indivíduos saudáveis submetidos a simulação do falar em público, um modelo de ansiedade experimental humana (Zuardi *et al.*, 1993). Adicionalmente, outros estudos tem verificado que a administração oral de CBD em voluntários saudáveis diminuiu os níveis de ansiedade e, usando técnicas de neuroimagem funcional, associam esses efeitos a uma diminuição da atividade em estruturas límbicas e paralímbicas, como o complexo amígdala-hipocampo esquerdo, estendendo-se até o hipotálamo, e no córtex cingulado posterior esquerdo (Crippa *et al.*, 2004; Fusar-Poli *et al.*, 2009), um padrão de atividade cerebral compatível com uma atividade ansiolítica. Mais recentemente, Crippa e colaboradores em um estudo preliminar, também observaram que o CBD foi capaz de diminuir a ansiedade em pacientes com transtorno de ansiedade social, um efeito que também foi relacionado a uma ação da droga sobre a atividade em estruturas límbicas e paralímbicas (Crippa *et al.*, 2010). Entretanto, as estruturas cerebrais envolvidas nos efeitos do CBD não estão completamente elucidadas.

Similar aos resultados obtidos em estudos clínicos, as propriedades ansiolíticas do CBD também têm sido demonstradas por diversos estudos pré-clínicos que empregaram diferentes paradigmas, como o teste de conflito de Vogel (Moreira *et al.*, 2006), o LCE (Guimaraes *et al.*, 1990; Onaivi *et al.*, 1990) e a REC contextual (Resstel *et al.*, 2006; Lemos *et al.*, 2010).

Assim como as estruturas cerebrais envolvidas nos efeitos ansiolíticos do CBD, os mecanismos de ação relacionados a esses efeitos também não são totalmente conhecidos. Sabe-se que esta droga pode produzir vários efeitos farmacológicos por mecanismos diferentes (Izzo *et al.*, 2009). Por exemplo, o CBD tem uma baixa afinidade para os receptores canabinóides (Petitet *et al.*, 1998; Thomas *et al.*, 1998), mas pode aumentar as ações mediadas pelos endocanabinóides através da sua capacidade de inibir a hidrólise e/ou recaptação do endocanabinóide anandamida (Bisogno *et al.*, 2001). Além disso, o CBD pode atuar com agonista de receptores 5-HT_{1A} (Russo *et al.*, 2005) e resultados recentes do nosso laboratório demonstraram que seu efeito anti-aversivo poderia envolver a ativação desses receptores (Campos e Guimaraes, 2008; Resstel *et al.*, 2009).

Recentemente, nosso laboratório começou a investigar as estruturas cerebrais envolvidas nos efeitos do CBD. Nos estudos realizados até o momento, foi observado que a administração de CBD diretamente na porção dorsolateral da substância cinzenta periaquedutal ou na porção pré-límbica do córtex pré-frontal medial produz efeitos ansiolíticos em ratos submetidos a modelos de ansiedade (Campos e Guimaraes, 2008; Lemos *et al.*, 2010). Além disso, como citado anteriormente, Lemos e colaboradores também observaram que o tratamento sistêmico com CBD atenuou a REC contextual e o aumento da expressão da

proteína c-Fos induzida pela re-exposição ao contexto aversivo no NLET (Lemos *et al.*, 2010), sugerindo um possível envolvimento desta estrutura nos efeitos do CBD.

O NLET parece estar criticamente envolvido na expressão de respostas relacionadas à ansiedade (Walker *et al.*, 2003; Davis *et al.*, 2010). Além disso, resultados recentes de estudos com lesões ou inativação reversível dessa estrutura mostraram uma atenuação das respostas comportamentais, cardiovasculares (aumento de pressão arterial e frequência cardíaca) e hormonais (aumento da liberação de corticosterona) induzidas pela REC contextual (Sullivan *et al.*, 2004; Resstel *et al.*, 2008).

Assim, com base nessas evidências, o objetivo deste estudo foi testar a hipótese de que o CBD injetado no NLET atenua as respostas comportamentais e cardiovasculares induzidas pela REC contextual. Além disso, nós também avaliamos o envolvimento do NLET nos efeitos ansiolíticos do CBD em outros dois modelos animais de ansiedade amplamente utilizados que envolvem situações aversivas, como o LCE e o lambear punido de Vogel. E, considerando que o efeito ansiolítico do CBD tem sido relacionado à ativação de receptores 5-HT_{1A} (Campos e Guimaraes, 2008; Resstel *et al.*, 2009), nós também testamos se os efeitos do CBD seriam bloqueados pelo pré-tratamento local com WAY100635, um antagonista do receptor 5-HT_{1A}.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito de injeções de CBD no NLET em ratos submetidos a situações aversivas.

2.2 Objetivos específicos

O presente estudo teve como objetivos específicos:

- Elaborar uma curva dose-resposta para o CBD, que foi injetado no NLET, para avaliar o envolvimento dessa estrutura cerebral nos efeitos do CBD sobre a REC contextual, LCE e lambar punido de Vogel.
- Avaliar o envolvimento dos receptores 5-HT_{1A} nos efeitos do CBD.

Material e Métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos pesando entre 240-270g provenientes do Biotério Central do Campus da Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto. Os animais permaneceram no biotério do próprio laboratório sob condições laboratoriais padrões, com temperatura controlada ($24 \pm 1^\circ\text{C}$), livre acesso à água e comida e ciclo claro/escuro de 12 h (com as luzes ligadas às 06:30 AM). Todos os experimentos foram realizados de acordo com as orientações da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC) para o cuidado e uso de animais de laboratório. As condições de acondicionamento e os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética da instituição (número do processo: 88/2009).

3.2 Cirurgia estereotáxica

Os animais foram anestesiados com 2,2,2-tribromoetanol (250 mg/kg, i.p., Sigma-Aldrich, EUA). Após tricotomia da cabeça, os animais foram imobilizados em um estereotáxico (Stoelting, EUA) e receberam injeção subcutânea de lidocaína 2% (contendo epinefrina 2% para promover vasoconstrição local), como anestésico local. A calota craniana foi exposta por meio de uma incisão da pele de, aproximadamente, 1,5 cm de diâmetro. O periósteo foi retirado e a calota craniana seca com H_2O_2 a 10% v/v. Cânulas de aço inoxidável de 13 mm e 0,6 mm de diâmetro externo foram implantadas bilateralmente no NLET, conforme as coordenadas estereotáxicas, através de orifícios feitos com uma broca odontológica. Todas as coordenadas tiveram como referência parâmetros do Atlas de Paxinos e Watson (1997). O bregma foi utilizado como referencial anatômico para as coordenadas da estrutura estudada. As coordenadas utilizadas foram: ântero-

posterior = - 0,4 mm do bregma; lateral = + 4,0 mm da sutura medial, vertical = - 5,5 mm da superfície do crânio e com uma inclinação lateral com ângulo de 23°. As cânulas foram fixadas ao crânio com resina acrílica autopolimerizável e mandris de 0,3 mm de diâmetro foram introduzidos nas cânulas para evitar a obstrução das mesmas durante o período de recuperação do animal.

Como medida profilática, ao final da cirurgia, cada animal recebeu injeção de poliantibiótico veterinário (0,27 g/kg, i.m.; Pentabiótico[®], Fort Dodge, Brasil) para prevenir infecções. No pós-cirúrgico imediato cada animal também recebeu injeção de antiinflamatório não-esteroidal (0,025 g/kg, s.c.; Banamine[®], Schering-Plough, Brasil) para analgesia pós-operatória. Após a cirurgia, os animais foram mantidos sob aquecimento fornecido por uma lâmpada de 60 W até se recuperarem da anestesia.

3.3 Drogas

O CBD (THC Pharm, Alemanha) foi dissolvido em óleo de semente de uva. O antagonista seletivo de receptores 5-HT_{1A} WAY100635 (Sigma-Aldrich, EUA), foi dissolvido em salina (NaCl 0,9%). Cloridrato de morfina (5 mg/kg, Merck, EUA) dissolvido em salina foi utilizado como controle positivo no teste de retirada da cauda. As soluções foram preparadas imediatamente antes do uso e mantidas protegidas da luz durante toda a sessão experimental.

3.4 Injeção de drogas no NLET

Uma agulha de 14 mm foi conectada a uma seringa de 10 µL (7001 KH, Hamilton Co., EUA) através de um tubo de polietileno PE-10 (Clay-Adams, EUA). Após a introdução da agulha na cânula-guia, as soluções foram infundidas, em volume de 0,2 µL, com o uso de uma bomba de infusão (KD Scientific Inc., EUA), a

uma velocidade de 0,4 $\mu\text{L}/\text{min}$. A agulha permaneceu no local por mais 45-60 s para evitar refluxo.

3.5 Procedimento experimental

Os protocolos desenvolvidos foram baseados na elaboração de curva dose-resposta para injeção de CBD no NLET nos três modelos animais de ansiedade descritos a seguir e a avaliação do possível envolvimento dos receptores 5-HT_{1A} nos efeitos do CBD.

Uma semana após a cirurgia estereotáxica, grupos independentes de animais receberam injeções de CBD (15, 30 ou 60 nmol) ou veículo no NLET e 10 min depois foram submetidos aos testes comportamentais. No caso de duas injeções, os animais receberam uma primeira injeção de veículo (salina) ou antagonista de receptores 5-HT_{1A} (WAY100635, 0,37 nmol) seguida, 5 min após, de uma segunda injeção de veículo (óleo de semente de uva) ou CBD (em dose definida a partir da curva dose-resposta). As doses utilizadas foram selecionadas baseando-se em estudos da literatura empregando injeções intra-cerebrais destas drogas em modelos animais de ansiedade (Campos e Guimaraes, 2008; Lemos *et al.*, 2010).

3.6 Modelos experimentais

3.6.1 Resposta emocional condicionada (REC) contextual

A habituação, o condicionamento e o teste foram realizados em uma caixa de condicionamento (25 x 22 x 22 cm, Medical Agent, Japão) com assoalho constituído por 18 barras de metal (2 mm de diâmetro), com espaço de 1,5 cm entre

elas, ligada a um gerador de choques elétricos (Automatic Reflex Conditioner, modelo 8572, Ugo Basile, Itália).

A habituação consistiu de duas sessões de 10 min de exposição a caixa de condicionamento (uma pela manhã e outra à tarde) e nenhum choque foi dado durante as sessões. Na sessão de condicionamento, 24 h após a primeira sessão de habituação, os animais foram divididos em dois grupos experimentais: não condicionado e condicionado. O grupo condicionado foi exposto a caixa de condicionamento por 10 min e recebeu 6 choques elétricos inescapáveis (1,5 mA, com 3 s de duração) com intervalo variável entre 20-60 s. O grupo não condicionado, não recebeu nenhum choque. Logo após, os animais foram anestesiados com 2,2,2-tribromoetanol (250 mg/kg, i.p.) e um cateter foi implantado na artéria femoral para registro da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC). O cateter foi constituído de um segmento de polietileno PE-10 (3-4 cm) soldado a outro seguimento PE-50 (12-13 cm; Clay-Adams, EUA), preenchido com anticoagulante (heparina a 0,3% em salina) e obstruído em sua extremidade externa com um pino de metal. Uma vez implantado, o cateter foi exteriorizado na região escapular no dorso do animal, sendo fixados por linha de sutura.

No dia seguinte ao condicionamento, as respostas comportamentais e cardiovasculares induzidas pela re-exposição ao contexto aversivo foram avaliadas. 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, EUA), por sua vez conectado a um sistema de aquisição de dados computadorizado (Biopac, EUA). Os animais foram transferidos do biotério para a sala de registro e o experimento foi iniciado após um período de adaptação de 60 min. Dado que os animais podem associar

sinais do ambiente com o condicionamento (Frank *et al.*, 2004), os testes foram realizados em uma sala diferente daquela utilizada durante a sessão de condicionamento. A PAM e FC foram continuamente registradas por um computador para posterior análise. Cinco minutos após a última injeção, foi realizado 5 min de registro dos valores basais de PAM e FC e, em seguida, os animais foram colocados na caixa de condicionamento para a avaliação das respostas cardiovasculares e comportamentais evocadas pela REC ao contexto durante 10 min, porém, nenhum choque foi aplicado.

As respostas comportamentais foram avaliadas durante o teste de forma cega, por um experimentador a 45 cm da caixa de condicionamento. O congelamento foi definido como a completa ausência de movimentos, com exceção dos movimentos relacionados à respiração, enquanto o animal assume uma postura tensa característica (Fanselow, 1980). Além do congelamento, também foram avaliados o número de cruzamentos e levantamentos do animal durante o teste. Cada cruzamento foi registrado quando o animal cruzou de um lado para o outro da caixa de condicionamento com as quatro patas.

3.6.2 Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

O teste foi realizado em um LCE de madeira, elevado 50 cm do solo e formado por dois braços abertos (50 x 10 cm) que formam uma cruz com dois braços fechados (50 x 10 x 40 cm). O LCE utilizado foi o mesmo descrito em estudos anteriores do laboratório (Guimaraes *et al.*, 1990; Campos e Guimaraes, 2008). Dez minutos após o tratamento, cada animal foi colocado por 5 min no LCE, com a face voltada para um dos braços fechados. Para análise comportamental, a sessão foi registrada e analisada com o auxílio do software Any-Maze (Stoelting, EUA). Foram

analisados os seguintes parâmetros: o número de entradas nos braços fechados e a porcentagem de entradas e de tempo gasto nos braços abertos do LCE.

3.6.3 Lamber punido de Vogel

O teste de Vogel foi realizado em uma caixa de acrílico (42 x 50 x 25 cm) com uma grade de aço inoxidável na base e contendo uma garrafa de água com bico metálico projetado para dentro da caixa, sendo todo o aparato alocado em uma caixa para atenuar o som externo. O contato do animal com o bico metálico e a grade fecha um circuito elétrico controlado por um sensor (Anxio-Meter modelo 102, EUA) que produz 7 pulsos/s sempre que o animal está em contato com ambos componentes. Cada pulso é considerado como uma lambida e a cada 20 lambidas o animal recebe um choque de intensidade de 0,5 mA com duração de 2 s, sendo que o número de lambidas e de choques durante o período do teste é registrado pelo sensor.

Para o experimento, os animais foram privados de água por 48 h antes do teste. Após as primeiras 24 h, os animais foram colocados na caixa-teste e puderam beber água livremente durante 3 min, para período de treino e a fim de encontrarem o bico da garrafa de água e aprenderem a beber. Os animais que não o encontraram foram excluídos do experimento. Vinte e quatro horas após, os animais foram submetidos aos tratamentos e, 10 min depois, colocados na caixa-teste por 3 min. Durante este período um choque de 0,5 mA no bico do bebedouro foi deflagrado a cada 20 lambidas (Moreira *et al.*, 2006). Como controle, o consumo de água foi avaliado em procedimento semelhante ao acima descrito, mas sem a apresentação de choque. Também como experimento controle, foi realizado o teste de retirada da cauda para avaliar um possível efeito antinociceptivo induzido pela injeção de CBD

no NLET. Somente as doses ativas de CBD no teste de Vogel foram usadas nestes dois procedimentos.

3.6.4 Avaliação do consumo de água

O aparelho utilizado foi o mesmo do procedimento descrito no teste do lambar punido de Vogel, no entanto, o sistema de choques elétricos foi inoperante.

3.6.5 Teste de retirada da cauda

Para avaliar possíveis efeitos antinociceptivos do CBD injetado no NLET que poderiam interferir no teste de Vogel, grupos independentes de animais foram submetidos ao teste de retirada da cauda. O aparelho consiste de uma plataforma de acrílico com um filamento de níquel-cromo (Insight Instruments, Brasil). Os ratos foram cuidadosamente manuseados e colocados com a porção distal de sua cauda sob o filamento de níquel-cromo. A temperatura do filamento foi elevada em 9°C/s pela passagem de corrente elétrica. O sistema possui um tempo de corte de 6 s para evitar dano tecidual quando a temperatura do filamento se aproxima de 80°C. O animal responde espontaneamente ao estímulo nocivo com o reflexo de retirada da cauda. O circuito foi calibrado para provocar este reflexo de retirada no intervalo de 2,5-3,5 s nos animais não tratados. Foram realizadas três medidas basais com um intervalo de 5 min entre cada medida. Após a linha de base os animais foram tratados e, 10 min depois, foram realizadas mais quatro medidas a cada 10 min. A morfina, controle positivo, foi administrada sistemicamente (5 mg/kg, i.p.).

3.7 Determinação anatômica dos sítios de injeção de droga

Ao final de cada experimento, os animais foram anestesiados com uretana (1,25 g/kg, i.p., Sigma-Aldrich, EUA), 0,2 µL de corante azul de Evans a 1% foi injetado bilateralmente para evidenciar os sítios de injeção e, posteriormente, os animais foram perfundidos. Ao final da perfusão, o cérebro foi retirado da caixa craniana e pós-fixado em formol 10%, sendo posteriormente seccionado no criostato (CM-1900, Leica, Alemanha) em cortes frontais de 40 µm de espessura para observação ao microscópio e análise dos sítios de injeção utilizando o Atlas de Paxinos e Watson (1997) como referência. Como controle histológico, os animais submetidos aos modelos animais de ansiedade que receberam a dose ativa de CBD fora do NLET foram reunidos em um grupo adicional (“OUT”).

3.8 Análise dos dados e estatística

Na REC contextual, os valores de PAM e FC foram continuamente registrados por um período de 5 min antes e 10 min durante a re-exposição a caixa de condicionamento. Os dados foram expressos com a média $\pm$ EPM das alterações de PAM ou FC (Δ PAM e Δ FC, respectivamente), em intervalos de 1 min. Os valores durante o período de 5 min antes da re-exposição foram usados como valores basais. As alterações de PAM e FC foram analisadas usando análise de variância (ANOVA) de três fatores, com a condição (condicionado ou não condicionado) e tratamento como os fatores independentes, e o tempo como medida repetida. Quando interações entre os fatores foram observadas, os grupos (condicionado ou não condicionado) foram comparados usando o teste de Bonferroni. O tempo de congelamento foi expresso como a porcentagem de tempo que o animal ficou em uma postura típica de imobilidade durante o período do teste. O tempo de

congelamento, os cruzamentos e levantamentos foram expressos como a média $\pm$ EPM e analisados usando ANOVA de dois fatores, com a condição (condicionado ou não condicionado) e tratamento como fatores. Uma análise regressão não-linear foi realizada para investigar a curva dose-resposta com o CBD sobre o tempo de congelamento. Animais que receberam CBD (30 nmol) fora do NLET foram comparados aos grupos condicionado ou não condicionado tratados com veículo através teste *t* de Student.

No EPM, a porcentagem de entradas e de tempo gasto nos braços abertos ($100 \times \text{aberto} / (\text{aberto} + \text{fechado})$) durante os 5 min de teste foram calculadas para cada animal. Estes parâmetros, assim como o número de entradas nos braços fechados e o número de lambidas no teste de Vogel foram analisados por ANOVA de um fator. Os resultados do teste de retirada da cauda foram analisados por ANOVA de medidas repetidas seguido por ANOVA de um fator para cada intervalo de tempo.

Nos experimentos realizados para testar se os efeitos do CBD injetado no NLET envolveriam a ativação dos receptores 5-HT_{1A}, os dados foram analisados por ANOVA de dois fatores usando a primeira (salina ou WAY100635) e a segunda (CBD ou veículo) injeção como fatores. Quando interações entre os fatores foram observadas, foi realizado ANOVA de um fator seguida do teste de Bonferroni.

O nível de significância assumido foi de $P < 0,05$.

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Localização dos sítios de injeção

A Figura 1 mostra uma fotomicrografia e representações diagramáticas do NLET (modificada do Atlas de Paxinos e Watson, 1997), indicando os sítios de injeção de drogas no NLET de todos os animais utilizados nos experimentos.

Figura 1 – A) Fotomicrografia de uma secção coronal do cérebro de um rato mostrando o sitio de injeção no NLET. **B-D)** Diagramas representativos modificados do Atlas de Paxinos e Watson (1997) indicando a dispersão dos sítios de injeção no cérebro dos ratos utilizados na REC contextual, LCE e lamber punido de Vogel, respectivamente. Os círculos representam os sítios de injeção no NLET (círculos pretos) e fora do NLET (círculos brancos) de todos os animais usados nos experimentos. IA- coordenada interaural; ac- comissura anterior; cc- corpo caloso; f- fornix; ic- capsula interna; LV- ventrículo lateral; LSV- área septal lateral ventral; st- estria terminal.

4.2 Efeitos da injeção de CBD no NLET sobre a REC contextual

Respostas comportamentais na REC contextual

Houve um efeito significativo da condição ($F_{1,31} = 216,8$, $P < 0,001$), do tratamento ($F_{1,31} = 19,4$, $P < 0,001$) e interação entre condição e tratamento ($F_{3,31} = 20,7$, $P < 0,001$) no tempo de congelamento. Animais tratados com veículo que haviam recebido choques elétricos nas patas (grupo condicionado) tiveram um maior tempo de congelamento durante a re-exposição ao contexto aversivo comparado aos animais que não receberam choques (grupo não condicionado), como pode ser observado na Figura 2A. A injeção de CBD (30 e 60 nmol) no NLET reduziu significativamente o tempo de congelamento dos animais condicionados ($n = 5-6$ /grupo; $F_{4,26} = 19,0$, $P < 0,0001$) em comparação com os animais condicionados tratados com veículo ($n = 5$, Figura 2A). Uma análise de regressão não-linear mostrou que esse efeito do CBD foi dose-dependente, mostrando uma associação significativa entre as doses de CBD com a redução do tempo de congelamento ($r^2 = 0,75$, $gl = 14$, $P < 0,05$, Figura 2B). No entanto, o CBD, na dose de 30 nmol, quando injetado em estruturas próximas ao NLET (grupo OUT), foi incapaz de atenuar o tempo de congelamento ($n = 4$; $t_7 = 1,7$, $P > 0,05$, quando comparado ao grupo condicionado tratado com veículo; $t_6 = 5,7$, $P < 0,01$, quando comparado ao grupo não condicionado tratado com veículo; Figura 2A). Além disso, a injeção de CBD (15, 30 ou 60 nmol) no NLET de ratos não condicionados não produziu qualquer efeito sobre o tempo de congelamento ($n = 4$ /grupo; $F_{3,15} = 0,8$, $P > 0,051$, $P > 0,05$, Figura 2A).

Figura 2 – A) Efeitos da injeção bilateral de veículo (VEI) ou CBD (15, 30 ou 60 nmol) em animais não condicionados ($n = 4/\text{grupo}$) e condicionados ($n = 5-6/\text{grupo}$) sobre a porcentagem de tempo de congelamento. Animais condicionados que receberam injeções de CBD (30 nmol) fora do NLET foram reunidos em um grupo adicional ($n = 4$, OUT). As colunas representam a média e as barras o EPM. $*P < 0,05$ em relação ao grupo não condicionado tratado com veículo e $^{\#}P < 0,05$ em relação ao grupo condicionado tratado com veículo, seguido do teste de Bonferroni, exceto para o grupo OUT que foi comparado aos grupos não condicionado ou condicionado tratados com veículo através do teste t de Student. **B)** Porcentagem de tempo de congelamento em resposta a injeção bilateral de veículo (V, $n = 5$) ou doses crescentes de CBD ($n = 5-6/\text{grupo}$) em animais condicionados. A curva dose-efeito foi gerada por análise de regressão não-linear. Os símbolos representam a média $\pm$ EPM.

A avaliação da atividade motora mostrou efeitos significativos da condição ($F_{1,31} = 33,2$, $P < 0,001$), do tratamento ($F_{1,31} = 3,3$, $P < 0,05$) e interação entre condição e tratamento ($F_{3,31} = 5,5$, $P < 0,05$) em relação ao número de cruzamentos. Efeitos similares da condição ($F_{1,31} = 9,6$, $P < 0,01$), do tratamento ($F_{1,31} = 3,2$, $P < 0,05$) e interação entre condição e tratamento ($F_{3,31} = 4,5$, $P < 0,05$) também foram observados para o número de levantamentos. Animais condicionados tratados com veículo e CBD (15 nmol) apresentaram menor número de cruzamentos ($n = 4-6$ /grupo; $F_{2,12} = 31,5$, $P < 0,001$) e levantamentos ($n = 4-6$ /grupo; $F_{2,12} = 9,3$, $P < 0,01$) quando comparados ao grupo de animais não condicionados tratados com veículo (Figura 3). Entretanto, o tratamento com CBD (30 e 60 nmol) aumentou significativamente o número de cruzamentos ($F_{2,14} = 9,1$, $P < 0,01$) e levantamentos ($F_{2,14} = 7,7$, $P < 0,01$) de animais condicionados quando comparados aos animais condicionados tratados com veículo (Figura 3).

Figura 3 – Efeitos da injeção bilateral de veículo (VEI) ou CBD (15, 30 ou 60 nmol) no NLET sobre o número de cruzamentos e levantamentos em animais não condicionados ($n = 4$ /grupo) e condicionados ($n = 5-6$ /grupo). As colunas representam a média e as barras o EPM, * $P < 0,05$ em relação ao grupo não condicionado tratado com veículo e # $P < 0,05$ em relação ao grupo condicionado tratado com veículo, seguido do teste de Bonferroni.

Respostas cardiovasculares na REC contextual

Não foram observadas diferenças nos valores basais de PAM e FC imediatamente antes da re-exposição ao contexto aversivo entre os grupos (Tabela 1).

Tabela 1 – Valores basais da PAM e FC em animais não condicionados e condicionados.

Grupo		PAM (mmHg)	FC (bpm)
<i>Não condicionado</i>			
Veículo	n= 4	107 ± 5	369 ± 9
CBD 15 nmol	n= 4	98 ± 3	343 ± 12
CBD 30 nmol	n= 4	99 ± 2	360 ± 21
CBD 60 nmol	n= 4	104 ± 6	359 ± 12
		$F_{3,15} = 0,957$	$F_{3,15} = 0,576$
<i>Condicionado</i>			
Veículo	n= 5	96 ± 4	351 ± 13
CBD 15 nmol	n= 6	99 ± 3	356 ± 19
CBD 30 nmol	n= 6	100 ± 5	368 ± 12
CBD 60 nmol	n= 6	97 ± 3	345 ± 8
OUT	n= 4	102 ± 3	359 ± 4
		$F_{4,26} = 0,337$	$F_{4,26} = 0,465$
Salina + Veículo	n= 5	100 ± 3	365 ± 15
WAY100635 + Veículo	n= 6	100 ± 3	345 ± 5
Salina + CBD	n= 5	101 ± 3	364 ± 13
WAY100635 + CBD	n= 5	102 ± 3	346 ± 21
		$F_{3,20} = 0,210$	$F_{3,20} = 0,618$

Os valores na tabela representam a média ± EPM, ANOVA de um fator. CBD, canabidiol; FC, frequência cardíaca; PAM, pressão arterial média.

As análises da resposta cardiovascular durante a re-exposição a caixa de condicionamento mostraram um efeito significativo da condição (PAM: $F_{1,31} = 5,6$, $P < 0,01$ e FC: $F_{1,31} = 24,0$, $P < 0,01$), do tratamento (PAM: $F_{3,31} = 4,4$, $P < 0,01$ e FC: $F_{3,31} = 3,7$, $P < 0,01$) e do tempo (PAM: $F_{14,434} = 114,2$, $P < 0,01$ e FC: $F_{14,434} = 97,1$, $P < 0,01$). Houve também interação significativa entre o tempo e a condição (PAM: $F_{14,434} = 4,6$, $P < 0,01$ e FC: $F_{14,434} = 25,0$, $P < 0,01$), tratamento e tempo (PAM: $F_{42,434} =$

2,7, $P < 0,01$ e FC: $F_{42,434} = 2,2$, $P < 0,01$) e condição, tratamento e tempo (PAM: $F_{42,434} = 2,3$, $P < 0,01$ e FC: $F_{42,434} = 1,5$, $P < 0,05$).

Como mostrado na Figura 4, a re-exposição ao contexto previamente pareado com choques nas patas induziu um aumento acentuado e sustentado da FC e PAM durante os 10 min de teste. Nos grupos não condicionados, a re-exposição ao contexto também aumentou a FC e PAM. No entanto, esses aumentos foram menores do que aqueles observados nos grupos condicionados (PAM: $F_{1,31} = 5,6$, $P < 0,01$ e FC: $F_{1,31} = 24,0$, $P < 0,01$).

Similar às respostas comportamentais, o CBD (30 e 60 nmol) atenuou o aumento da PAM e da FC nos grupos condicionados (PAM: $F_{4,26} = 8,3$, $P < 0,001$ e FC: $F_{4,26} = 5,4$, $P < 0,01$), mas não teve nenhum efeito em animais não condicionados (PAM: $F_{3,15} = 0,3$, $P > 0,05$ e FC: $F_{3,15} = 0,5$, $P > 0,05$, Figura 4). E, não foram observadas alterações cardiovasculares quando o CBD (30 nmol) foi injetado em estruturas próximas ao NLET de animais condicionados antes do teste (grupo OUT, $n = 4$; PAM: $P > 0,05$ e FC: $P > 0,05$, respectivamente).

Figura 4 – Efeitos ao longo do tempo da injeção bilateral de veículo ou CBD (15, 30 ou 60 nmol) no NLET sobre o aumento de pressão arterial média (ΔPAM) e a frequência cardíaca (ΔFC) em animais não condicionados ($n = 4$ /grupo) e condicionados ($n = 5-6$ /grupo). Animais condicionados que receberam injeções de CBD (30 nmol) fora do NLET foram reunidos em um grupo adicional ($n = 4$, OUT). Os símbolos representam a média e as barras o EPM. Os asteriscos indicam diferença significativa do tratamento ($P < 0,05$, teste de Bonferroni) em todo o período de exposição à caixa de condicionamento em relação aos animais tratados com veículo.

4.3 Efeitos da injeção de CBD no NLET de ratos submetidos ao LCE

Como pode ser observado na Figura 5, o CBD (60 nmol) aumentou significativamente a porcentagem de entradas ($F_{4,30} = 4,6$, $P < 0,01$) e de tempo ($F_{4,30} = 3,4$, $P < 0,05$) gasto nos braços abertos do LCE quando comparados aos animais tratados com veículo. Além disso, animais que receberam a dose ativa de CBD (60 nmol) fora do NLET (grupo OUT) não foram diferentes dos controles (teste de Bonferroni, $P > 0,05$). Nenhum efeito sobre o número de entradas nos braços fechados foi observado ($F_{4,30} = 0,5$, $P > 0,05$), sugerindo que o CBD injetado no NLET não altera a atividade motora basal.

Figura 5 – Efeitos da injeção de veículo (VEI) ou CBD (15, 30 ou 60 nmol) no NLET de ratos submetidos ao LCE. As colunas representam a média e as barras o EPM. Animais que receberam injeções de CBD (60 nmol) fora do NLET foram reunidos em um grupo adicional (OUT). * $P < 0,05$ em relação aos animais tratados com veículo (VEI, seguido do teste de Bonferroni; $n = 8, 7, 8, 7, 5$, respectivamente).

4.4 Efeitos da injeção de CBD no NLET de ratos submetidos ao teste de Vogel

Assim como os resultados obtidos nos modelos anteriores, um efeito ansiolítico também foi observado. Neste experimento, injeções de CBD (30 e 60 nmol) no NLET aumentaram o número de lambidas punidas ($F_{4,34} = 7,0$, $P < 0,001$), em comparação aos animais tratados com veículo, como pode ser observado na Figura 6. Além disso, os animais que receberam a dose ativa do CBD (30 nmol) fora

do NLET (OUT) não foram diferentes dos animais que receberam veículo (teste de Bonferroni, $P>0,05$).

Figura 6 – Efeitos do CBD (15, 30 ou 60 nmol) ou veículo (VEI) injetado no NLET de ratos submetidos ao teste de Vogel. As colunas representam a média e as barras o EPM. Animais que receberam injeções de CBD (30 nmol) fora do NLET foram reunidos em um grupo adicional (OUT). * $P<0,05$ em relação aos animais tratados com veículo, seguido do teste de Bonferroni; $n=9, 8, 8, 8, 6$, respectivamente).

4.5 Efeitos da injeção de CBD no NLET no consumo de água e no teste de retirada da cauda

Estes experimentos foram realizados para verificar se a injeção de CBD no NLET aumenta o consumo de água ou induz efeitos antinociceptivos, que são potenciais fatores que podem interferir no teste de Vogel.

Na avaliação do consumo de água, o CBD (30 e 60 nmol) não alterou o número de lambidas não punidas em relação ao grupo veículo ($F_{2,12}=0,7$, $P>0,05$, Tabela 2). E, no teste de retirada da cauda, apenas o tratamento sistêmico com morfina, o controle positivo, aumentou a latência para retirada da cauda (fator

tratamento: $F_{3,15} = 57,2$, $P < 0,001$; fator tempo: $F_{6,10} = 32,7$, $P < 0,001$; interação droga e tempo, $F_{18,26} = 25,6$, $P < 0,001$, teste de Bonferroni, $P < 0,05$; Figura 7).

Tabela 2 – Efeitos da administração de CBD (30 e 60 nmol) intra-NLET sobre o número de lambidas não punidas de ratos privados de água por 48 h.

Tratamento	Número de lambidas não punidas
Veículo	1073 ± 46
CBD 30 nmol	1034 ± 35
CBD 60 nmol	1114 ± 59

Os valores na tabela representam a média $\pm$ EPM ($n = 5/\text{grupo}$). Nenhum efeito significativo foi encontrado.

Figura 7 – Efeito ao longo do tempo da injeção de CBD (30 ou 60 nmol) ou veículo no NLET ou morfina (5 mg/kg, i.p., controle positivo) em 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 aos animais tratados com veículo ($n = 5, 5, 5, 4$, respectivamente).

4.6 Efeitos do pré-tratamento com o WAY100635, um antagonista de receptores 5-HT_{1A}, sobre os efeitos do CBD na REC contextual

Semelhante ao descrito no item 4.2., o CBD (30 nmol) reduziu o tempo de congelamento dos animais condicionados ($n=5$), em comparação aos animais controle ($n=5$; $F_{3,20}=11,7$, $P<0,001$). Nenhum efeito sobre o tempo de congelamento foi verificado em animais tratados apenas com WAY100635 ($n=6$, $P>0,05$), entretanto esta droga foi capaz de bloquear os efeitos do CBD ($n=5$, $P>0,05$, comparado ao grupo controle, Figura 8A). Além disso, houve uma interação significativa entre a primeira e segunda injeção ($F_{1,17}=12,7$, $P<0,01$).

O WAY100635 não afetou os valores basais de PAM ($F_{3,20}=0,2$, $P>0,05$) e FC ($F_{3,20}=0,6$, $P>0,05$) em comparação com os animais tratados com CBD (30 nmol) ou veículo (Tabela 1). E, confirmando os resultados descritos no item 4.2., o CBD (30 nmol) atenuou o aumento das respostas cardiovasculares (PAM: $F_{3,20}=6,9$, $P<0,01$ e FC: $F_{3,20}=3,9$, $P<0,05$) induzido pelo contexto aversivo. O WAY100635 não afetou as respostas cardiovasculares (PAM: $P>0,05$ e FC: $P>0,05$), mas foi capaz de atenuar os efeitos do CBD sobre as respostas cardiovasculares (PAM: $P>0,05$ e FC: $P>0,05$) observadas durante a re-exposição ao contexto aversivo (Figura 8B). Além disso, uma interação significativa entre a primeira e segunda injeção foi encontrada para a PAM ($F_{1,17}=7,0$, $P<0,05$), e, houve uma tendência de interação para a FC ($F_{1,17}=3,6$, $P=0,07$).

Figura 8 – A) Efeito do pré-tratamento com salina (VEI) ou WAY100635 (WAY, 0,37 nmol) seguido por uma segunda injeção de veículo (VEI) ou CBD (30 nmol) sobre a porcentagem de tempo de congelamento induzido pela re-exposição ao contexto aversivo (n= 5-6/grupo). As colunas representam a média e as barras o EPM, *P<0,05 em relação aos outros grupos, seguido do teste de Bonferroni. **B)** Efeito ao longo do tempo do pré-tratamento com salina (VEI) ou WAY100635 (WAY, 0,37 nmol) seguido por uma segunda injeção de óleo de semente de uva (VEI) ou CBD (30 nmol) sobre o aumento de pressão arterial média (Δ PAM) e frequência cardíaca (Δ FC) induzido pela re-exposição ao contexto aversivo. Os símbolos representam a média e as barras o EPM, *P<0,05, em todo o período de exposição a caixa de condicionamento em relação aos demais grupos, seguido do teste de Bonferroni.

4.7 Efeitos do pré-tratamento com o WAY100635 sobre os efeitos do CBD no LCE

Semelhante ao descrito no item 4.3., o CBD (60 nmol) aumentou a porcentagem de entradas ($F_{3,26} = 7,1$, $P < 0,001$) e de tempo ($F_{3,26} = 3,4$, $P < 0,05$) gasto nos braços abertos, sem alterar o número de entradas nos braços fechados ($F_{3,26} = 0,4$, $P > 0,05$, dados não mostrados). Nenhum efeito sobre a porcentagem de entradas e de tempo gasto nos braços abertos foi encontrado nos animais tratados apenas com WAY100635 (teste de Bonferroni, $P > 0,05$), mas esta droga foi capaz de bloquear os efeitos do CBD (interação entre primeira e segunda injeção, $F_{1,26} = 5,2$, $P < 0,05$, Figura 9).

Figura 9 – Efeito do pré-tratamento com salina (VEI) ou WAY100635 (WAY, 0,37 nmol) seguido por uma segunda injeção de veículo ou CBD (30 nmol) no NLEET de ratos submetidos ao LCE. As colunas representam a média e as barras o EPM. As colunas brancas representam a porcentagem de entradas nos braços abertos, enquanto as colunas pretas representam a porcentagem de tempo gasto nos braços abertos. * $P < 0,05$ em relação ao grupo controle, seguido do teste de Bonferroni ($n = 6, 6, 9, 9$, respectivamente).

4.8 Efeitos do pré-tratamento com WAY100635 sobre os efeitos do CBD no teste de Vogel

Confirmando os resultados descritos no item 4.4., o CBD (30 nmol) aumentou o número de lambidas punidas ($F_{3,30} = 11,9$, $P < 0,001$). Nenhum efeito foi observado em animais tratados apenas com WAY100635 (teste de Bonferroni, $P > 0,05$), mas quando administrado antes do CBD, essa droga foi capaz de bloquear os efeitos do CBD (interação entre primeira e segunda injeção, $F_{1,30} = 12,3$, $P < 0,01$), como observado na Figura 10.

Figura 10 – Efeito do pré-tratamento com salina (VEI) ou WAY100635 (WAY, 0,37 nmol) seguido por uma segunda injeção de veículo ou CBD (30 nmol) no NLET de ratos submetidos ao teste de Vogel. As colunas representam a média e as barras o EPM. * $P < 0,05$ em relação ao grupo controle, seguido do teste de Bonferroni ($n = 8, 9, 9, 8$, respectivamente).

Discussão

5 DISCUSSÃO

O presente estudo investigou o possível envolvimento do NLET nos efeitos ansiolíticos do CBD. Além disso, investigou-se o possível envolvimento dos receptores 5-HT_{1A} nos efeitos do CBD injetado no NLET.

Nossos resultados mostraram que a injeção de CBD no NLET induziu efeitos ansiolíticos em três modelos animais de ansiedade conceitualmente distintos: a REC contextual, o LCE e o lambear punido de Vogel. Embora esses modelos animais sejam amplamente utilizados, eles são baseados em diferentes contingências aversivas que podem envolver sistemas neurobiológicos distintos. Na REC contextual, a re-exposição do animal a um ambiente (contexto) que tenha sido anteriormente pareado a um estímulo aversivo ou desagradável, tal como choques nas patas (Fanselow, 1980; Antoniadis e McDonald, 1999; Rudy *et al.*, 2004), faz com que os animais submetidos a este modelo apresentem um comportamento típico de imobilidade (congelamento) e alterações autonômicas, tais como aumento na PAM e FC (Blanchard e Blanchard, 1969; Carrive, 2000; Resstel *et al.*, 2006). Por outro lado, enquanto o LCE está relacionado com a aversão natural que os roedores têm por espaços elevados e abertos (Carobrez e Bertoglio, 2005), o teste de conflito de Vogel envolve a supressão de respostas punidas, ou seja, envolve situação de conflito aprendida ao longo do teste (Millan, 2003; Millan e Brocco, 2003).

Em relação a REC contextual, confirmando estudos anteriores (Zhang *et al.*, 2004; Resstel *et al.*, 2008), nós observamos que os animais condicionados apresentaram significantes alterações cardiovasculares (aumento da FC e PAM) e respostas comportamentais (congelamento, diminuição do número de cruzamentos e levantamentos) após serem re-expostos ao contexto previamente pareado com choques nas patas. Estes efeitos foram atenuados pela injeção de CBD no NLET.

No entanto, o CBD não induziu qualquer alteração significativa nos valores basais de PAM e FC, o que está de acordo com a suposta falta de efeitos cardiovasculares significantes dessa droga (Mcqueen *et al.*, 2004; Resstel *et al.*, 2006; Resstel *et al.*, 2009). É provável, portanto, que a atenuação das respostas cardiovasculares ao contexto aversivo não dependa dos efeitos cardiovasculares diretos, mas sim da atenuação da resposta emocional. E, em concordância com esta proposta, efeitos ansiolíticos também foram observados em animais submetidos ao LCE e ao teste de Vogel após a injeção de CBD no NLET. Além disso, o CBD não alterou a exploração dos braços fechados do LCE, a latência para a retirada da cauda ou o consumo de água, sugerindo um efeito ansiolítico específico. Assim, nossos resultados estão de acordo com trabalhos anteriores que mostraram que a administração sistêmica de CBD produziu efeitos ansiolíticos em ratos submetidos ao medo condicionado ao contexto (Resstel *et al.*, 2006; Lemos *et al.*, 2010), LCE (Guimaraes *et al.*, 1990) e teste de Vogel (Moreira *et al.*, 2006).

Embora a extensão da difusão do CBD a partir do local da injeção não pode ser estabelecida precisamente, a ausência de qualquer efeito quando o CBD foi administrado em estruturas vizinhas sugere que os efeitos foram mediados por uma ação da droga no NLET. Além disso, os efeitos do CBD sobre a atenuação da REC contextual também poderiam ser explicados por uma possível interferência nos processos envolvidos com a formação de memória. No entanto, um baixo potencial de interferência na aprendizagem e memória tem sido relatado para o CBD (Fadda *et al.*, 2004), tornando esta possibilidade improvável.

Nossos resultados também corroboram com os de Lemos e colaboradores, que observaram que a administração sistêmica de CBD foi capaz de reduzir o tempo de congelamento e ativação de neurônios do NLET induzida pela re-

exposição a um contexto aversivo (Lemos *et al.*, 2010). Juntos, estas observações e nossos resultados indicam que o NLET pode estar envolvido nos efeitos ansiolíticos do CBD administrado sistemicamente.

Suportando um possível papel regulatório em respostas defensivas, o NLET é proposto ser um importante relé ligando importantes estruturas prosencefálicas, como a amígdala, o hipocampo e o córtex pré-frontal medial (Davis *et al.*, 1997; Dong *et al.*, 2001a; Dong *et al.*, 2001b; Massi *et al.*, 2008), ao hipotálamo e áreas do tronco cerebral envolvidas na regulação de respostas autonômicas (Herman *et al.*, 1994; Herman e Cullinan, 1997; Alheid, 2003). Em adição, o NLET também pode modular respostas comportamentais a estímulos aversivos. Estudos usando lesões ou inativação farmacológica reversível mostraram que o NLET é importante para a expressão das respostas aversivas (congelamento, aumento das respostas cardiovasculares e da liberação de corticosterona), quando os animais são expostos ao contexto em que eles haviam recebido choques nas patas (Gray *et al.*, 1993; Sullivan *et al.*, 2004; Resstel *et al.*, 2008).

Outro importante resultado do nosso estudo é que os efeitos ansiolíticos do CBD injetado no NLET foram bloqueados pelo pré-tratamento com WAY100635, um antagonista de receptores 5-HT_{1A}, em uma dose que não produziu nenhum efeito. Russo *et al.* (2005) mostraram que o CBD pode deslocar o agonista de receptores 5-HT_{1A}, [³H]8-OH-DPAT, de receptores 5-HT_{1A} humanos clonados expressos em células de ovário de hamster chinês e, usando técnicas que avaliam a transdução de sinal, os autores também observaram que o CBD poderia agir como um agonista desses receptores. De fato, estudos recentes mostram que vários efeitos do CBD podem envolver a neurotransmissão mediada por receptores 5-HT_{1A}. Antagonistas desses receptores foram capazes de bloquear diversos efeitos

induzidos pelo CBD, incluindo os efeitos neuroprotetores (Mishima *et al.*, 2005), antidepressivos (Zanelati *et al.*, 2010), anti-estresse (Resstel *et al.*, 2009), ansiolíticos e panicolíticos após injeção na porção dorsal da substância cinzenta periaquedutal (Campos e Guimaraes, 2008; Soares *et al.*, 2010). Além disso, Magen e colaboradores mostraram que o tratamento crônico com CBD melhora os prejuízos cognitivos e motores em um modelo animal de encefalopatia hepática através de uma ação sobre os receptores 5-HT_{1A} (Magen *et al.*, 2010).

Receptores 5-HT_{1A} cerebrais estão localizados pré-sinápticamente nos corpos celulares dos núcleos da rafe do tronco cerebral e pós-sinápticamente predominantemente em estruturas límbicas, incluindo o NLET (Verge *et al.*, 1985; Chalmers e Watson, 1991; Phelix *et al.*, 1992; Barnes e Sharp, 1999). Várias evidências sugerem que este receptor tem um importante papel na fisiopatologia dos transtornos de ansiedade (Akimova *et al.*, 2009). Camundongos *knockout* para este receptor mostram um aumento dos comportamentos relacionados à ansiedade (Heisler *et al.*, 1998; Parks *et al.*, 1998; Ramboz *et al.*, 1998) e agonistas parciais dos receptores 5-HT_{1A} são usados clinicamente no tratamento de transtornos de ansiedade (Barnes e Sharp, 1999; Rickels e Rynn, 2002).

O NLET recebe uma inervação razoavelmente densa por aferências serotoninérgicas da porção caudal do núcleo dorsal da rafe (Commons *et al.*, 2003; Lowry *et al.*, 2008) e expressa vários subtipos de receptores serotoninérgicos (Mengod *et al.*, 1990; Pompeiano *et al.*, 1994; Waeber *et al.*, 1994; Waeber e Moskowitz, 1995; Wright *et al.*, 1995; Kia *et al.*, 1996; Heidmann *et al.*, 1998; Cornea-Hebert *et al.*, 1999; Xu e Pandey, 2000; Guo *et al.*, 2009). No entanto, Guo e colaboradores observaram que os receptores 5-HT_{1A} e 5-HT₇ são os subtipos de receptores serotoninérgicos mais expressos em neurônios do NLET (Guo *et al.*,

2009). Com base nessas evidências Hammack et al. (2009) sugeriram que o NLET poderia ser uma estrutura crítica para a modulação serotoninérgica de comportamentos relacionados a ansiedade, entretanto poucos estudos tem avaliado como a atividade do NLET é modulada pela serotonina (5-HT).

Estudos eletrofisiológicos demonstraram que a aplicação de 5-HT em neurônios do NLET elicia respostas inibitórias mediadas pela ativação de receptores 5-HT_{1A} pós-sinápticos (Rainnie, 1999; Levita *et al.*, 2004) e a infusão local de um agonista do receptor 5-HT_{1A}, 5-carboxiamidotriptamina (5-CT), no NLET atenuou a resposta de sobressalto em ratos (Levita *et al.*, 2004). Além disso, a buspirona, um agonista parcial dos receptores 5-HT_{1A}, usada clinicamente no tratamento da ansiedade, bloqueia os efeitos do sobressalto aumentado pela luz em ratos e o NLET é descrito ser criticamente envolvido neste modelo animal de ansiedade (Walker e Davis, 1997; Walker *et al.*, 2003; Davis *et al.*, 2010). Juntos, esses resultados sugerem que a inibição de neurônios do NLET mediada pelos receptores 5-HT_{1A} modula comportamentos relacionados a ansiedade e poderiam ser responsáveis pelos efeitos ansiolíticos do CBD injetados nesta estrutura.

Embora os nossos resultados indiquem que os efeitos do CBD no NLET dependem da ativação de receptores 5-HT_{1A}, não é possível descartar o envolvimento de outros mecanismos farmacológicos. Por exemplo, foi mostrado que a administração intracerebroventricular de CBD facilita a extinção do medo condicionado contextual, um efeito mediado pela ativação de receptores canabinóides CB₁, uma vez que o efeito do CBD foi bloqueado pelo tratamento com um antagonista desses receptores (Bitencourt *et al.*, 2008). O mesmo mecanismo foi observado para o efeito do CBD no “*marble-burying behavior*”, um modelo animal proposto para o estudo de drogas anti-compulsivas (Casarotto *et al.*, 2010). Apesar

de ter uma baixa afinidade pelos os receptores CB₁ e CB₂ *in vitro* (Petitet *et al.*, 1998; Thomas *et al.*, 1998), o CBD pode facilitar a neurotransmissão mediada por endocanabinóides por inibir a hidrólise ou recaptação de anandamida (Bisogno *et al.*, 2001). Além disso, também foi observado que o CBD pode ativar os receptores TRPV1 (Bisogno *et al.*, 2001) e modular alostericamente os receptores 5-HT₃ (Yang *et al.*, 2010) e μ - e δ -opióides (Kathmann *et al.*, 2006). Entretanto, o envolvimento desses mecanismos nos efeitos do CBD injetado no NLET permanece sem ser testado.

Conclusão

6 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados no presente trabalho permitem concluir que:

- O CBD injetado no NLET produz efeito ansiolítico em três modelos animais de ansiedade, a REC contextual, o LCE e o lambert punido de Vogel.
- Os efeitos do CBD no NLET parecem depender, pelo menos em parte, da ativação local de receptores 5-HT_{1A}.
- Nossos resultados indicam que o NLET pode estar envolvido nos efeitos ansiolíticos do CBD observados após administração sistêmica.

Referências Bibliográficas

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKIMOVA, E.; LANZENBERGER, R.; KASPER, S. The serotonin-1A receptor in anxiety disorders. Biol Psychiatry, v. 66, n. 7, p. 627-35, Oct 1 2009.

ALHEID, G.; DE OLMOS, J. S.; BELTRAMINO, C. A. Amygdala and extended amygdala In: PAXINOS, G. (Ed.). *The Rat Nervous System*. New York: Academic Press, 1995. p. 495-578.

ALHEID, G. F. Extended amygdala and basal forebrain. Ann N Y Acad Sci, v. 985, p. 185-205, Apr 2003.

ANTONIADIS, E. A.; MCDONALD, R. J. Discriminative fear conditioning to context expressed by multiple measures of fear in the rat. Behav Brain Res, v. 101, n. 1, p. 1-13, May 1999.

BARNES, N. M.; SHARP, T. A review of central 5-HT receptors and their function. Neuropharmacology, v. 38, n. 8, p. 1083-152, Aug 1999.

BECK, C. H.; FIBIGER, H. C. Conditioned fear-induced changes in behavior and in the expression of the immediate early gene c-fos: with and without diazepam pretreatment. J Neurosci, v. 15, n. 1 Pt 2, p. 709-20, Jan 1995.

BISOGNO, T.; HANUS, L.; DE PETROCELLIS, L.; TCHILIBON, S.; PONDE, D. E.; BRANDI, I.; MORIELLO, A. S.; DAVIS, J. B.; MECHOULAM, R.; DI MARZO, V. 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, p. 845-52, Oct 2001.

BITENCOURT, R. M.; PAMPLONA, F. A.; TAKAHASHI, R. N. Facilitation of contextual fear memory extinction and anti-anxiogenic effects of AM404 and cannabidiol in conditioned rats. Eur Neuropsychopharmacol, v. 18, n. 12, p. 849-59, Dec 2008.

BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C. Crouching as an index of fear. J Comp Physiol Psychol, v. 67, n. 3, p. 370-5, Mar 1969.

BRANDÃO, M. L. *As Bases Biológicas do Comportamento*. EPU, 2004.

CAMPOS, A. C.; GUIMARAES, F. S. Involvement of 5HT1A receptors in the anxiolytic-like effects of cannabidiol injected into the dorsolateral periaqueductal gray of rats. Psychopharmacology (Berl), v. 199, n. 2, p. 223-30, Aug 2008.

CARLINI, E. A.; CUNHA, J. M. Hypnotic and antiepileptic effects of cannabidiol. J Clin Pharmacol, v. 21, n. 8-9 Suppl, p. 417S-427S, Aug-Sep 1981.

CAROBREZ, A. P.; BERTOGLIO, L. J. 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. Conditioned fear to environmental context: cardiovascular and behavioral components in the rat. Brain Res, v. 858, n. 2, p. 440-5, Mar 10 2000.

CASAROTTO, P. C.; GOMES, F. V.; RESSTEL, L. B.; GUIMARAES, F. S. Cannabidiol inhibitory effect on marble-burying behaviour: involvement of CB1 receptors. Behav Pharmacol, v. 21, n. 4, p. 353-8, Jul 2010.

CHALMERS, D. T.; WATSON, S. J. Comparative anatomical distribution of 5-HT1A receptor mRNA and 5-HT1A binding in rat brain--a combined in situ hybridisation/in vitro receptor autoradiographic study. Brain Res, v. 561, n. 1, p. 51-60, Oct 4 1991.

CIRIELLO, J.; JANSSEN, S. A. Effect of glutamate stimulation of bed nucleus of the stria terminalis on arterial pressure and heart rate. Am J Physiol, v. 265, n. 5 Pt 2, p. H1516-22, Nov 1993.

COMMONS, K. G.; CONNOLLEY, K. R.; VALENTINO, R. J. A neurochemically distinct dorsal raphe-limbic circuit with a potential role in affective disorders. Neuropsychopharmacology, v. 28, n. 2, p. 206-15, Feb 2003.

CORNEA-HEBERT, V.; RIAD, M.; WU, C.; SINGH, S. K.; DESCARRIES, L. Cellular and subcellular distribution of the serotonin 5-HT2A receptor in the central nervous system of adult rat. J Comp Neurol, v. 409, n. 2, p. 187-209, Jun 28 1999.

CRIPPA, J. A.; DERENUSSON, G. N.; FERRARI, T. B.; WICHERT-ANA, L.; DURAN, F.; MARTI, N. S. R. O.; SIMOES, M. V.; BHATTACHARYYA, S.; FUSAR-POLI, P.; ATAKAN, Z.; SANTOS FILHO, A.; FREITAS-FERRARI, M. C.; MCGUIRE, P.; ZUARDI, A. W.; BUSATTO, G.; HALLAK, J. E. Neural basis of anxiolytic effects of cannabidiol (CBD) in generalized social anxiety disorder: a preliminary report. J Psychopharmacol, v., Sep 9 2010.

CRIPPA, J. A.; ZUARDI, A. W.; GARRIDO, G. E.; WICHERT-ANA, L.; GUARNIERI, R.; FERRARI, L.; AZEVEDO-MARQUES, P. M.; HALLAK, J. E.; MCGUIRE, P. K.; FILHO BUSATTO, G. Effects of cannabidiol (CBD) on regional cerebral blood flow. Neuropsychopharmacology, v. 29, n. 2, p. 417-26, Feb 2004.

CUNHA, J. M.; CARLINI, E. A.; PEREIRA, A. E.; RAMOS, O. L.; PIMENTEL, C.; GAGLIARDI, R.; SANVITO, W. L.; LANDER, N.; MECHOULAM, R. Chronic administration of cannabidiol to healthy volunteers and epileptic patients. Pharmacology, v. 21, n. 3, p. 175-85, 1980.

DALGLEISH, T. The emotional brain. Nat Rev Neurosci, v. 5, n. 7, p. 583-9, Jul 2004.

DAVIS, M.; WALKER, D. L.; LEE, Y. Amygdala and bed nucleus of the stria terminalis: differential roles in fear and anxiety measured with the acoustic startle reflex. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, v. 352, n. 1362, p. 1675-87, Nov 29 1997.

DAVIS, M.; WALKER, D. L.; MILES, L.; GRILLON, C. Phasic vs sustained fear in rats and humans: role of the extended amygdala in fear vs anxiety. Neuropsychopharmacology, v. 35, n. 1, p. 105-35, Jan 2010.

DEVANE, W. A.; DYSARZ, F. A., 3RD; JOHNSON, M. R.; MELVIN, L. S.; HOWLETT, A. C. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. Mol Pharmacol, v. 34, n. 5, p. 605-13, Nov 1988.

DEVANE, W. A.; HANUS, L.; BREUER, A.; PERTWEE, R. G.; STEVENSON, L. A.; GRIFFIN, G.; GIBSON, D.; MANDELBAUM, A.; ETINGER, A.; MECHOULAM, R. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. Science, v. 258, n. 5090, p. 1946-9, Dec 18 1992.

DONG, H. W.; PETROVICH, G. D.; SWANSON, L. W. Topography of projections from amygdala to bed nuclei of the stria terminalis. Brain Res Brain Res Rev, v. 38, n. 1-2, p. 192-246, Dec 2001a.

DONG, H. W.; PETROVICH, G. D.; WATTS, A. G.; SWANSON, L. W. Basic organization of projections from the oval and fusiform nuclei of the bed nuclei of the stria terminalis in adult rat brain. J Comp Neurol, v. 436, n. 4, p. 430-55, Aug 6 2001b.

DONG, H. W.; SWANSON, L. W. Projections from bed nuclei of the stria terminalis, posterior division: implications for cerebral hemisphere regulation of defensive and reproductive behaviors. J Comp Neurol, v. 471, n. 4, p. 396-433, Apr 12 2004.

DUNN, J. D. Plasma corticosterone responses to electrical stimulation of the bed nucleus of the stria terminalis. Brain Res, v. 407, n. 2, p. 327-31, Mar 31 1987.

FADDA, P.; ROBINSON, L.; FRATTA, W.; PERTWEE, R. G.; RIEDEL, G. Differential effects of THC- or CBD-rich cannabis extracts on working memory in rats. Neuropharmacology, v. 47, n. 8, p. 1170-9, Dec 2004.

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

FANSELOW, M. S. Contextual fear, gestalt memories, and the hippocampus. Behav Brain Res, v. 110, n. 1-2, p. 73-81, Jun 1 2000.

FRANK, L. M.; STANLEY, G. B.; BROWN, E. N. Hippocampal plasticity across multiple days of exposure to novel environments. J Neurosci, v. 24, n. 35, p. 7681-9, Sep 1 2004.

FUSAR-POLI, P.; CRIPPA, J. A.; BHATTACHARYYA, S.; BORGWARDT, S. J.; ALLEN, P.; MARTIN-SANTOS, R.; SEAL, M.; SURGULADZE, S. A.; O'CARROL, C.; ATAKAN, Z.; ZUARDI, A. W.; MCGUIRE, P. K. Distinct effects of Δ^9 -tetrahydrocannabinol and cannabidiol on neural activation during emotional processing. Arch Gen Psychiatry, v. 66, n. 1, p. 95-105, Jan 2009.

GRAEFF, F. G. Medicamentos Ansiolíticos. In: GRAEFF, F. G.; GUIMARÃES, F. G. (Ed.). *Fundamentos de Psicofarmacologia*. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 123-160.

GRAY, J. A.; MCNAUGHTON, N. *The neuropsychology of anxiety*. Oxford University Press, 2000.

GRAY, T. S.; PIECHOWSKI, R. A.; YRACHETA, J. M.; RITTENHOUSE, P. A.; BETHEA, C. L.; VAN DE KAR, L. D. Ibotenic acid lesions in the bed nucleus of the stria terminalis attenuate conditioned stress-induced increases in prolactin, ACTH and corticosterone. Neuroendocrinology, v. 57, n. 3, p. 517-24, Mar 1993.

GUIMARAES, F. S.; CHIARETTI, T. M.; GRAEFF, F. G.; ZUARDI, A. W. Antianxiety effect of cannabidiol in the elevated plus-maze. Psychopharmacology (Berl), v. 100, n. 4, p. 558-9, 1990.

GUO, J. D.; HAMMACK, S. E.; HAZRA, R.; LEVITA, L.; RAINNIE, D. G. Bi-directional modulation of bed nucleus of stria terminalis neurons by 5-HT: molecular expression and functional properties of excitatory 5-HT receptor subtypes. Neuroscience, v. 164, n. 4, p. 1776-93, Dec 29 2009.

HAMMACK, S. E.; GUO, J. D.; HAZRA, R.; DABROWSKA, J.; MYERS, K. M.; RAINNIE, D. G. The response of neurons in the bed nucleus of the stria terminalis to serotonin: implications for anxiety. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, v. 33, n. 8, p. 1309-20, Nov 13 2009.

HAMMACK, S. E.; RICHEY, K. J.; WATKINS, L. R.; MAIER, S. F. Chemical lesion of the bed nucleus of the stria terminalis blocks the behavioral consequences of uncontrollable stress. Behav Neurosci, v. 118, n. 2, p. 443-8, Apr 2004.

HAMPSON, A. J.; GRIMALDI, M.; AXELROD, J.; WINK, D. Cannabidiol and (-)-Delta9-tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. Proc Natl Acad Sci U S A, v. 95, n. 14, p. 8268-73, Jul 7 1998.

HEIDMANN, D. E.; SZOT, P.; KOHEN, R.; HAMBLIN, M. W. Function and distribution of three rat 5-hydroxytryptamine₇ (5-HT₇) receptor isoforms produced by alternative splicing. Neuropharmacology, v. 37, n. 12, p. 1621-32, Dec 1998.

HEIMER, L. A new anatomical framework for neuropsychiatric disorders and drug abuse. Am J Psychiatry, v. 160, n. 10, p. 1726-39, Oct 2003.

HEISLER, L. K.; CHU, H. M.; BRENNAN, T. J.; DANAIO, J. A.; BAJWA, P.; PARSONS, L. H.; TECOTT, L. H. Elevated anxiety and antidepressant-like responses in serotonin 5-HT_{1A} receptor mutant mice. Proc Natl Acad Sci U S A, v. 95, n. 25, p. 15049-54, Dec 8 1998.

HERKENHAM, M. Characterization and localization of cannabinoid receptors in brain: an in vitro technique using slide-mounted tissue sections. NIDA Res Monogr, v. 112, p. 129-45, 1991.

HERKENHAM, M.; LYNN, A. B.; DE COSTA, B. R.; RICHFIELD, E. K. Neuronal localization of cannabinoid receptors in the basal ganglia of the rat. Brain Res, v. 547, n. 2, p. 267-74, May 3 1991.

HERKENHAM, M.; LYNN, A. B.; LITTLE, M. D.; JOHNSON, M. R.; MELVIN, L. S.; DE COSTA, B. R.; RICE, K. C. Cannabinoid receptor localization in brain. Proc Natl Acad Sci U S A, v. 87, n. 5, p. 1932-6, Mar 1990.

HERMAN, J. P.; CULLINAN, W. E. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. Trends Neurosci, v. 20, n. 2, p. 78-84, Feb 1997.

HERMAN, J. P.; CULLINAN, W. E.; WATSON, S. J. Involvement of the bed nucleus of the stria terminalis in tonic regulation of paraventricular hypothalamic CRH and AVP mRNA expression. J Neuroendocrinol, v. 6, n. 4, p. 433-42, Aug 1994.

HOLSTEGE, G.; MEINERS, L.; TAN, K. Projections of the bed nucleus of the stria terminalis to the mesencephalon, pons, and medulla oblongata in the cat. Exp Brain Res, v. 58, n. 2, p. 379-91, 1985.

IUVONE, T.; ESPOSITO, G.; DE FILIPPIS, D.; SCUDERI, C.; STEARDO, L. Cannabidiol: a promising drug for neurodegenerative disorders? CNS Neurosci Ther, v. 15, n. 1, p. 65-75, Winter 2009.

IZZO, A. A.; BORRELLI, F.; CAPASSO, R.; DI MARZO, V.; MECHOULAM, R. Non-psychoactive plant cannabinoids: new therapeutic opportunities from an ancient herb. Trends Pharmacol Sci, v. 30, n. 10, p. 515-27, Oct 2009.

JU, G.; SWANSON, L. W. Studies on the cellular architecture of the bed nuclei of the stria terminalis in the rat: I. Cytoarchitecture. J Comp Neurol, v. 280, n. 4, p. 587-602, Feb 22 1989.

JU, G.; SWANSON, L. W.; SIMERLY, R. B. Studies on the cellular architecture of the bed nuclei of the stria terminalis in the rat: II. Chemoarchitecture. J Comp Neurol, v. 280, n. 4, p. 603-21, Feb 22 1989.

KARNIOL, I. G.; SHIRAKAWA, I.; KASINSKI, N.; PFEFERMAN, A.; CARLINI, E. A. Cannabidiol interferes with the effects of delta 9 - tetrahydrocannabinol in man. Eur J Pharmacol, v. 28, n. 1, p. 172-7, Sep 1974.

KATHMANN, M.; FLAU, K.; REDMER, A.; TRANKLE, C.; SCHLICKER, E. Cannabidiol is an allosteric modulator at mu- and delta-opioid receptors. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, v. 372, n. 5, p. 354-61, Feb 2006.

KIA, H. K.; MIQUEL, M. C.; BRISORGUEIL, M. J.; DAVAL, G.; RIAD, M.; EL MESTIKAWY, S.; HAMON, M.; VERGE, D. Immunocytochemical localization of serotonin1A receptors in the rat central nervous system. J Comp Neurol, v. 365, n. 2, p. 289-305, Feb 5 1996.

LEDOUX, J. E.; IWATA, J.; CICCHETTI, P.; REIS, D. J. Different projections of the central amygdaloid nucleus mediate autonomic and behavioral correlates of conditioned fear. J Neurosci, v. 8, n. 7, p. 2517-29, Jul 1988.

LEMOIS, J. I.; RESSEL, L. B.; GUIMARAES, F. S. Involvement of the prelimbic prefrontal cortex on cannabidiol-induced attenuation of contextual conditioned fear in rats. Behav Brain Res, v. 207, n. 1, p. 105-11, Feb 11 2010.

LEVITA, L.; HAMMACK, S. E.; MANIA, I.; LI, X. Y.; DAVIS, M.; RAINNIE, D. G. 5-hydroxytryptamine1A-like receptor activation in the bed nucleus of the stria terminalis: electrophysiological and behavioral studies. Neuroscience, v. 128, n. 3, p. 583-96, 2004.

LOWRY, C. A.; HALE, M. W.; EVANS, A. K.; HEERKENS, J.; STAUB, D. R.; GASSER, P. J.; SHEKHAR, A. Serotonergic systems, anxiety, and affective disorder: focus on the dorsomedial part of the dorsal raphe nucleus. Ann N Y Acad Sci, v. 1148, p. 86-94, Dec 2008.

MAGEN, I.; AVRAHAM, Y.; ACKERMAN, Z.; VOROBIEV, L.; MECHOULAM, R.; BERRY, E. Cannabidiol ameliorates cognitive and motor impairments in bile-duct ligated mice via 5-HT(1A) receptor activation. Br J Pharmacol, v., Jan 29 2010.

MASSI, L.; ELEZGARAI, I.; PUENTE, N.; REGUERO, L.; GRANDES, P.; MANZONI, O. J.; GEORGES, F. Cannabinoid receptors in the bed nucleus of the stria terminalis control cortical excitation of midbrain dopamine cells in vivo. J Neurosci, v. 28, n. 42, p. 10496-508, Oct 15 2008.

MATSUDA, L. A.; LOLAIT, S. J.; BROWNSTEIN, M. J.; YOUNG, A. C.; BONNER, T. I. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. Nature, v. 346, n. 6284, p. 561-4, Aug 9 1990.

MCNAUGHTON, N.; CORR, P. J. A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. Neurosci Biobehav Rev, v. 28, n. 3, p. 285-305, May 2004.

MCQUEEN, D. S.; BOND, S. M.; SMITH, P. J.; BALALI-MOOD, K.; SMART, D. Cannabidiol lacks the vanilloid VR1-mediated vasorespiratory effects of capsaicin and anandamide in anaesthetised rats. Eur J Pharmacol, v. 491, n. 2-3, p. 181-9, May 3 2004.

MECHOULAM, R.; BEN-SHABAT, S.; HANUS, L.; LIGUMSKY, M.; KAMINSKI, N. E.; SCHATZ, A. R.; GOPHER, A.; ALMOG, S.; MARTIN, B. R.; COMPTON, D. R.; ET AL. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. Biochem Pharmacol, v. 50, n. 1, p. 83-90, Jun 29 1995.

MECHOULAM, R.; PARKER, L. A.; GALLILY, R. Cannabidiol: an overview of some pharmacological aspects. J Clin Pharmacol, v. 42, n. 11 Suppl, p. 11S-19S, Nov 2002.

MENGOD, G.; NGUYEN, H.; LE, H.; WAEBER, C.; LUBBERT, H.; PALACIOS, J. M. The distribution and cellular localization of the serotonin 1C receptor mRNA in the rodent brain examined by in situ hybridization histochemistry. Comparison with receptor binding distribution. Neuroscience, v. 35, n. 3, p. 577-91, 1990.

MILAD, M. R.; QUIRK, G. J. Neurons in medial prefrontal cortex signal memory for fear extinction. Nature, v. 420, n. 6911, p. 70-4, Nov 7 2002.

MILLAN, M. J. The neurobiology and control of anxious states. Prog Neurobiol, v. 70, n. 2, p. 83-244, Jun 2003.

MILLAN, M. J.; BROCCO, M. The Vogel conflict test: procedural aspects, gamma-aminobutyric acid, glutamate and monoamines. Eur J Pharmacol, v. 463, n. 1-3, p. 67-96, Feb 28 2003.

MISHIMA, K.; HAYAKAWA, K.; ABE, K.; IKEDA, T.; EGASHIRA, N.; IWASAKI, K.; FUJIWARA, M. Cannabidiol prevents cerebral infarction via a serotonergic 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor-dependent mechanism. Stroke, v. 36, n. 5, p. 1077-82, May 2005.

MOREIRA, F. A.; AGUIAR, D. C.; GUIMARAES, F. S. Anxiolytic-like effect of cannabidiol in the rat Vogel conflict test. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, v. 30, n. 8, p. 1466-71, Dec 30 2006.

MUNRO, S.; THOMAS, K. L.; ABU-SHAAR, M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. Nature, v. 365, n. 6441, p. 61-5, Sep 2 1993.

ONAIWI, 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.

ONAIWI, E. S.; GREEN, M. R.; MARTIN, B. R. Pharmacological characterization of cannabinoids in the elevated plus maze. J Pharmacol Exp Ther, v. 253, n. 3, p. 1002-9, Jun 1990.

ONAIWI, E. S.; ISHIGURO, H.; GONG, J. P.; PATEL, S.; PERCHUK, A.; MEOZZI, P. A.; MYERS, L.; MORA, Z.; TAGLIAFERRO, P.; GARDNER, E.; BRUSCO, A.; AKINSHOLA, B. E.; LIU, Q. R.; HOPE, B.; IWASAKI, S.; ARINAMI, T.; TEASENFITZ, L.; UHL, G. R. Discovery of the presence and functional expression of cannabinoid CB₂ receptors in brain. Ann N Y Acad Sci, v. 1074, p. 514-36, Aug 2006.

PACHER, P.; BATKAI, S.; KUNOS, G. The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. Pharmacol Rev, v. 58, n. 3, p. 389-462, Sep 2006.

PARKS, C. L.; ROBINSON, P. S.; SIBILLE, E.; SHENK, T.; TOTH, M. Increased anxiety of mice lacking the serotonin_{1A} receptor. Proc Natl Acad Sci U S A, v. 95, n. 18, p. 10734-9, Sep 1 1998.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 2.ed. Sydney. Academic Press, v., 1997.

PERTWEE, R. G. Cannabinoid pharmacology: the first 66 years. Br J Pharmacol, v. 147 Suppl 1, p. S163-71, Jan 2006.

PETITET, F.; JEANTAUD, B.; REIBAUD, M.; IMPERATO, A.; DUBROEUCQ, M. C. Complex pharmacology of natural cannabinoids: evidence for partial agonist activity of delta9-tetrahydrocannabinol and antagonist activity of cannabidiol on rat brain cannabinoid receptors. Life Sci, v. 63, n. 1, p. PL1-6, 1998.

PHELIX, C. F.; LIPOSITS, Z.; PAULL, W. K. Serotonin-CRF interaction in the bed nucleus of the stria terminalis: a light microscopic double-label immunocytochemical analysis. Brain Res Bull, v. 28, n. 6, p. 943-8, Jun 1992.

POMPEIANO, M.; PALACIOS, J. M.; MENGOD, G. Distribution of the serotonin 5-HT2 receptor family mRNAs: comparison between 5-HT2A and 5-HT2C receptors. Brain Res Mol Brain Res, v. 23, n. 1-2, p. 163-78, Apr 1994.

RAINNIE, D. G. Neurons of the bed nucleus of the stria terminalis (BNST). Electrophysiological properties and their response to serotonin. Ann N Y Acad Sci, v. 877, p. 695-9, Jun 29 1999.

RAMBOZ, S.; OOSTING, R.; AMARA, D. A.; KUNG, H. F.; BLIER, P.; MENDELSON, M.; MANN, J. J.; BRUNNER, D.; HEN, R. Serotonin receptor 1A knockout: an animal model of anxiety-related disorder. Proc Natl Acad Sci U S A, v. 95, n. 24, p. 14476-81, Nov 24 1998.

RESSTEL, L. B.; ALVES, F. H.; REIS, D. G.; CRESTANI, C. C.; CORREA, F. M.; GUIMARAES, F. S. Anxiolytic-like effects induced by acute reversible inactivation of the bed nucleus of stria terminalis. Neuroscience, v. 154, n. 3, p. 869-76, Jun 26 2008.

RESSTEL, L. B.; JOCA, S. R.; MOREIRA, F. A.; CORREA, F. M.; GUIMARAES, F. S. Effects of cannabidiol and diazepam on behavioral and cardiovascular responses induced by contextual conditioned fear in rats. Behav Brain Res, v. 172, n. 2, p. 294-8, Sep 25 2006.

RESSTEL, L. B.; TAVARES, R. F.; LISBOA, S. F.; JOCA, S. R.; CORREA, F. M.; GUIMARAES, F. S. 5-HT1A receptors are involved in the cannabidiol-induced attenuation of behavioural and cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. Br J Pharmacol, v. 156, n. 1, p. 181-8, Jan 2009.

RICKELS, K.; RYNN, M. Pharmacotherapy of generalized anxiety disorder. J Clin Psychiatry, v. 63 Suppl 14, p. 9-16, 2002.

RUDY, J. W.; HUFF, N. C.; MATUS-AMAT, P. Understanding contextual fear conditioning: insights from a two-process model. Neurosci Biobehav Rev, v. 28, n. 7, p. 675-85, Nov 2004.

RUSSO, E. B.; BURNETT, A.; HALL, B.; PARKER, K. K. Agonistic properties of cannabidiol at 5-HT_{1A} receptors. Neurochem Res, v. 30, n. 8, p. 1037-43, Aug 2005.

SHIN, L. M.; LIBERZON, I. The neurocircuitry of fear, stress, and anxiety disorders. Neuropsychopharmacology, v. 35, n. 1, p. 169-91, Jan 2010.

SOARES, V. D.; CAMPOS, A. C.; BORTOLI, V. C.; ZANGROSSI, H., JR.; GUIMARAES, F. S.; ZUARDI, A. W. Intra-dorsal periaqueductal gray administration of cannabidiol blocks panic-like response by activating 5-HT_{1A} receptors. Behav Brain Res, v., May 8 2010.

SOMERVILLE, L. H.; WHALEN, P. J.; KELLEY, W. M. Human bed nucleus of the stria terminalis indexes hypervigilant threat monitoring. Biol Psychiatry, v. 68, n. 5, p. 416-24, Sep 1 2010.

SPENCER, S. J.; BULLER, K. M.; DAY, T. A. Medial prefrontal cortex control of the paraventricular hypothalamic nucleus response to psychological stress: possible role of the bed nucleus of the stria terminalis. J Comp Neurol, v. 481, n. 4, p. 363-76, Jan 24 2005.

SULLIVAN, G. M.; APERGIS, J.; BUSH, D. E.; JOHNSON, L. R.; HOU, M.; LEDOUX, J. E. Lesions in the bed nucleus of the stria terminalis disrupt corticosterone and freezing responses elicited by a contextual but not by a specific cue-conditioned fear stimulus. Neuroscience, v. 128, n. 1, p. 7-14, 2004.

SWANSON, L. W.; PETROVICH, G. D. What is the amygdala? Trends Neurosci, v. 21, n. 8, p. 323-31, Aug 1998.

THOMAS, B. F.; GILLIAM, A. F.; BURCH, D. F.; ROCHE, M. J.; SELTZMAN, H. H. Comparative receptor binding analyses of cannabinoid agonists and antagonists. J Pharmacol Exp Ther, v. 285, n. 1, p. 285-92, Apr 1998.

TREIT, D.; AUJLA, H.; MENARD, J. Does the bed nucleus of the stria terminalis mediate fear behaviors? Behav Neurosci, v. 112, n. 2, p. 379-86, Apr 1998.

TSOU, K.; BROWN, S.; SANUDO-PENA, M. C.; MACKIE, K.; WALKER, J. M. Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB₁ receptors in the rat central nervous system. Neuroscience, v. 83, n. 2, p. 393-411, Mar 1998.

VERGE, D.; DAVAL, G.; PATEY, A.; GOZLAN, H.; EL MESTIKAWY, S.; HAMON, M. Presynaptic 5-HT autoreceptors on serotonergic cell bodies and/or dendrites but not terminals are of the 5-HT_{1A} subtype. Eur J Pharmacol, v. 113, n. 3, p. 463-4, Jul 31 1985.

WADDELL, J.; MORRIS, R. W.; BOUTON, M. E. Effects of bed nucleus of the stria terminalis lesions on conditioned anxiety: aversive conditioning with long-duration conditional stimuli and reinstatement of extinguished fear. Behav Neurosci, v. 120, n. 2, p. 324-36, Apr 2006.

WAEBER, C.; MOSKOWITZ, M. A. [³H]sumatriptan labels both 5-HT_{1D} and 5-HT_{1F} receptor binding sites in the guinea pig brain: an autoradiographic study. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, v. 352, n. 3, p. 263-75, Sep 1995.

WAEBER, C.; SEBBEN, M.; NIEOULLON, A.; BOCKAERT, J.; DUMUIS, A. Regional distribution and ontogeny of 5-HT₄ binding sites in rodent brain. Neuropharmacology, v. 33, n. 3-4, p. 527-41, Mar-Apr 1994.

WALKER, D. L.; DAVIS, M. Double dissociation between the involvement of the bed nucleus of the stria terminalis and the central nucleus of the amygdala in startle increases produced by conditioned versus unconditioned fear. J Neurosci, v. 17, n. 23, p. 9375-83, Dec 1 1997.

WALKER, D. L.; TOUFEXIS, D. J.; DAVIS, M. Role of the bed nucleus of the stria terminalis versus the amygdala in fear, stress, and anxiety. Eur J Pharmacol, v. 463, n. 1-3, p. 199-216, Feb 28 2003.

WELLER, K. L.; SMITH, D. A. Afferent connections to the bed nucleus of the stria terminalis. Brain Res, v. 232, n. 2, p. 255-70, Jan 28 1982.

WRIGHT, D. E.; SEROOGY, K. B.; LUNDGREN, K. H.; DAVIS, B. M.; JENNES, L. Comparative localization of serotonin_{1A}, _{1C}, and ₂ receptor subtype mRNAs in rat brain. J Comp Neurol, v. 351, n. 3, p. 357-73, Jan 16 1995.

XU, T.; PANDEY, S. C. Cellular localization of serotonin(2A) (5HT(2A)) receptors in the rat brain. Brain Res Bull, v. 51, n. 6, p. 499-505, Apr 2000.

YANG, K. H.; GALADARI, S.; ISAEV, D.; PETROIANU, G.; SHIPPENBERG, T. S.; OZ, M. The nonpsychoactive cannabinoid cannabidiol inhibits 5-hydroxytryptamine_{3A} receptor-mediated currents in *Xenopus laevis* oocytes. J Pharmacol Exp Ther, v. 333, n. 2, p. 547-54, May 2010.

ZANELATI, T. V.; BIOJONE, C.; MOREIRA, F. A.; GUIMARAES, F. S.; JOCA, S. R. Antidepressant-like effects of cannabidiol in mice: possible involvement of 5-HT_{1A} receptors. Br J Pharmacol, v. 159, n. 1, p. 122-8, Jan 2010.

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

ZUARDI, A. W. Cannabidiol: from an inactive cannabinoid to a drug with wide spectrum of action. Rev Bras Psiquiatr, v. 30, n. 3, p. 271-80, Sep 2008.

ZUARDI, A. W. History of cannabis as a medicine: a review. Rev Bras Psiquiatr, v. 28, n. 2, p. 153-7, Jun 2006.

ZUARDI, A. W.; COSME, R. A.; GRAEFF, F. G.; GUIMARAES, F. S. Effects of ipsapirone and cannabidiol on human experimental anxiety. J Psychopharmacol, v. 7, p. 82-8, 1993.

ZUARDI, A. W.; CRIPPA, J. A.; HALLAK, J. E.; MOREIRA, F. A.; GUIMARAES, F. S. Cannabidiol, a Cannabis sativa constituent, as an antipsychotic drug. Braz J Med Biol Res, v. 39, n. 4, p. 421-9, Apr 2006.

ZUARDI, A. W.; SHIRAKAWA, I.; FINKELFARB, E.; KARNIOL, I. G. Action of cannabidiol on the anxiety and other effects produced by delta 9-THC in normal subjects. Psychopharmacology (Berl), v. 76, n. 3, p. 245-50, 1982.

Anexos

Cannabidiol injected into the bed nucleus of the stria terminalis reduces the expression of contextual fear conditioning via 5-HT_{1A} receptors

Felipe V Gomes, Daniel G Reis, Fernando H F Alves, Fernando M A Corrêa, Francisco S Guimares and Leonardo B M Resstel

J Psychopharmacol published online 8 December 2010

DOI: 10.1177/0269881110389095

The online version of this article can be found at:

<http://jop.sagepub.com/content/early/2010/12/02/0269881110389095>

Published by:

<http://www.sagepublications.com>

On behalf of:

[British Association for Psychopharmacology](#)

Additional services and information for *Journal of Psychopharmacology* can be found at:

Email Alerts: <http://jop.sagepub.com/cgi/alerts>

Subscriptions: <http://jop.sagepub.com/subscriptions>

Reprints: <http://www.sagepub.com/journalsReprints.nav>

Permissions: <http://www.sagepub.com/journalsPermissions.nav>

Cannabidiol injected into the bed nucleus of the stria terminalis reduces the expression of contextual fear conditioning via 5-HT_{1A} receptors

Felipe V Gomes, Daniel G Reis, Fernando HF Alves, Fernando MA Corrêa, Francisco S Guimarães and Leonardo BM Resstel

Journal of Psychopharmacology

0(0) 1–10

© The Author(s) 2010

Reprints and permissions:

sagepub.co.uk/journalsPermissions.nav

DOI: 10.1177/0269881110389095

jop.sagepub.com

Abstract

Systemic administration of cannabidiol (CBD) attenuates cardiovascular and behavioral changes induced by re-exposure to a context that had been previously paired with footshocks. Previous results from our group using cFos immunohistochemistry suggested that the bed nucleus of the stria terminalis (BNST) is involved in this effect. The mechanisms of CBD effects are still poorly understood, but could involve 5-HT_{1A} receptor activation. Thus, the present work investigated if CBD administration into the BNST would attenuate the expression of contextual fear conditioning and if this effect would involve the activation of 5-HT_{1A} receptors. Male Wistar rats with cannulae bilaterally implanted into the BNST were submitted to a 10 min conditioning session (six footshocks, 1.5 mA/3 s). Twenty-four hours later freezing and cardiovascular responses (mean arterial pressure and heart rate) to the conditioning box were measured for 10 min. CBD (15, 30 or 60 nmol) or vehicle was administered 10 min before the re-exposure to the aversive context. The second experiment was similar to the first one except that animals received microinjections of the 5-HT_{1A} receptor antagonist WAY100635 (0.37 nmol) 5 min before CBD (30 nmol) treatment. The results showed that CBD (30 and 60 nmol) treatment significantly reduced the freezing and attenuated the cardiovascular responses induced by re-exposure to the aversive context. Moreover, WAY100635 by itself did not change the cardiovascular and behavioral response to context, but blocked the CBD effects. These results suggest that CBD can act in the BNST to attenuate aversive conditioning responses and this effect seems to involve 5-HT_{1A} receptor-mediated neurotransmission.

Keywords

Anxiolytics, autonomic responses, cannabinoids, conditioned emotional response, freezing

Introduction

Cannabidiol (CBD) is a major component of *Cannabis sativa* which, unlike Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC), is devoid of the typical psychotomimetic effects of cannabis (Zuardi, 2008). CBD systemic administration produces several pharmacological effects such as anticonvulsant (Carlini and Cunha, 1981; Cunha et al., 1980), neuroprotective (Hampson et al., 1998; Iuvone et al., 2009), antipsychotic (Zuardi et al., 2006) and anxiolytic (Crippa et al., 2004) effects. Regarding the latter, the anxiolytic properties of CBD have been demonstrated by several preclinical studies which employed different paradigms such as the Vogel conflict test (Moreira et al., 2006), the elevated plus maze (Guimarães et al., 1990; Onaivi et al., 1990) and the conditioned emotional response (Lemos et al., 2010; Resstel et al., 2006b). Similar to the data obtained in animal models, results from studies in healthy volunteers strongly suggested that CBD has an anxiolytic action (Crippa et al., 2004; Fusar-Poli et al., 2009; Zuardi et al., 1993) and also attenuated the anxiogenic effects induced by high doses of Δ^9 -THC in humans (Karniol et al., 1974; Zuardi et al., 1982).

Concerning the conditioned emotional response, systemic administration of CBD attenuated the expression of

contextual fear conditioning (Lemos et al., 2010; Resstel et al., 2006b). Conditioned fear to a context is produced by re-exposing the animal to an environment (context) that has been previously paired with an aversive or unpleasant stimulus such as an electrical footshock (Antoniadis and McDonald, 1999; Fanselow, 1980; Rudy et al., 2004). Animals submitted to this model show freezing behavior and autonomic changes such as an increase in mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) (Blanchard and Blanchard, 1969; Carrive, 2000; Resstel et al., 2006b).

The mechanisms and brain structures involved in the anxiolytic effects of CBD are not entirely known, since this drug can produce multiple pharmacological effects by different mechanisms (Izzo et al., 2009). For example, CBD has a

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

Corresponding author:

Leonardo BM Resstel, Department of Pharmacology, School of Medicine, University of São Paulo, Bandeirantes Avenue 3900, Ribeirão Preto, SP, 14049-900, Brazil
Email: leoresstel@fmrp.usp.br

low affinity for cannabinoid receptors (Petitet et al., 1998; Thomas et al., 1998), but may enhance endocannabinoid-mediated actions through its ability to inhibit the hydrolysis and/or reuptake of endocannabinoid anandamide (Bisogno et al., 2001). Furthermore, CBD possesses agonistic properties at 5-HT_{1A} receptors (Russo et al., 2005) and recent results from our laboratory demonstrated its anxiolytic effects involve the activation of 5-HT_{1A} receptors (Campos and Guimarães, 2008; Resstel et al., 2009). It is unknown, however, if this mechanism is related to CBD effects on contextual fear conditioning.

Recently, our laboratory started to investigate the brain structures involved in the effects of CBD. This drug attenuated the increase in Fos protein expression, a marker of neuronal activation, induced by re-exposure to the aversively conditioned context in the bed nucleus of the stria terminalis (BNST) (Lemos et al., 2010), suggesting a possible involvement of this structure in CBD effects. Similarly, Beck and Fibiger (1995) reported that contextual fear conditioning activates the BNST, an effect attenuated by diazepam administered before the test session.

The BNST is a limbic structure associated with autonomic, neuroendocrine and behavioral functions (Casada and Dafny, 1991; Dunn, 1987; Dunn and Williams, 1995) that seems to be critically involved in the expression of anxiety-like responses (Davis et al., 2010; Walker et al., 2003). Reinforcing a possible role of this structure in contextual fear conditioning, recent findings from studies using lesions or reversible inactivation of the BNST showed attenuation of expression of conditioned emotional response to context (Resstel et al., 2008; Sullivan et al., 2004). Moreover, the BNST has also been proposed to participate in the cardiovascular changes observed in aversive situations such as restraint stress and contextual fear conditioning (Crestani et al., 2009; Resstel et al., 2008).

In light of these findings, the aim of this study was to test the hypothesis that CBD injected into the BNST would attenuate behavioral and cardiovascular (MAP and HR) responses induced by contextual fear conditioning by, at least in part, activating 5-HT_{1A} receptors.

Materials and methods

Animals

The experiments were performed using male Wistar rats weighing 230–270 g. 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 individually 3 days before experimental manipulations (preconditioning, conditioning and testing) in plastic cages with free access to food and water under a 12 h light/dark cycle (lights on at 06:30 h). The institution's Animal Ethics Committee approved the housing conditions and experimental procedures (process number: 88/2009). Procedures were conducted in conformity with the Brazilian Society of Neuroscience and Behavior guidelines for the care and use of laboratory animals, which are in compliance with international laws and policy.

Stereotaxic surgery

Seven days before the experiment the rats were anesthetized with 2,2,2 tribromoethanol (250 mg kg⁻¹ intraperitoneally; Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA) and fixed in a stereotaxic frame (Stoelting, Wood Dale, Illinois, USA). After scalp anesthesia with 2% lidocaine, the skull was surgically exposed and stainless steel guide cannulae (26 G) were implanted bilaterally into the BNST [anteroposterior = -0.4 mm from bregma; lateral = 4.0 mm from the medial suture; vertical = -5.5 mm from the skull with a lateral inclination of 23° (Paxinos and Watson, 1997)]. Cannulae were fixed to the skull with dental cement and a metal screw. An obturator inside the guide cannulae prevented obstruction.

Fear conditioning and testing

Preconditioning, conditioning and testing were carried out in 25 x 22 x 22 cm footshock chambers. The chambers had a grid floor composed of 18 stainless steel rods (2 mm in diameter), spaced 1.5 cm apart and wired to a shock generator (Automatic Reflex Conditioner, model 8572; Ugo Basile, Comerio, Varese, Italy). They were cleaned with 70% ethanol before and after use. Preconditioning started 7 days after the stereotaxic surgery and consisted of two 10-min-long pre-exposures (habituation) to the footshock chamber (one in the morning and one in the afternoon). No shock was given during the pre-exposures. In the conditioning shock session, performed 24 h after the first habituation session, animals were divided into two experimental groups: non-conditioned and conditioned. The non-conditioned group was exposed to the footshock chamber for 10 min but no shock was delivered. The conditioned group was submitted to a shock session consisting of six electrical 1.5 mA/3 s footshocks (Resstel et al., 2008) delivered at pseudorandom intervals (ranging from 20 s to 60 s). The animals were allowed to explore the chamber prior to shock delivery for 2 min, a procedure proposed as essential for context conditioning (Fanselow, 2000). After the conditioning session, the rats were anesthetized with 2,2,2 tribromoethanol (250 mg kg⁻¹ intraperitoneally) and a catheter [a 4 cm segment of polyethylene (PE)-10 heat-bound to a 13 cm segment of PE-50; Clay Adams, Parsippany, New Jersey, USA] was implanted into the femoral artery for blood pressure and HR recording. The catheters were tunneled under the skin and exteriorized on the animal's dorsum.

Cardiovascular and behavioral responses evoked by re-exposure to aversively conditioned context were evaluated 24 h after conditioning. The test session consisted of a 10-min-long re-exposure to the footshock chamber without shock delivery. Animals were transferred from the animal room to the procedure room in their home cage. Cardiovascular recordings were initiated after a 60 min adaptation period. Since animals can associate cues of the environment with conditioning (Frank et al., 2004), the tests were performed in a different room than that used during the conditioning procedure to allow for baseline autonomic measures. MAP and HR were recorded using an HP-7754A amplifier (Hewlett Packard, Palo Alto, California, USA).

connected to a signal acquisition board (Biopac M-100, Goleta, California, USA) and computer processed. Rats were tested one at a time. Five minutes after the last microinjection, a 5 min of baseline recording was performed and then the animals were placed at the center of the footshock chamber to record cardiovascular and behavioral responses evoked by the conditioned emotional response to context.

Behavioral responses were evaluated during the test by an experimenter blind to the experimental groups sat 45 cm away from the footshock chamber. Freezing was defined as the complete absence of movement, except that of the flanks related to respiration, while the animal assumed a characteristic tense posture (Fanselow, 1980). In addition to the duration of freezing, we also evaluated the animal's activity during the test by counting the number of crossings and rearings. A crossing was recorded when the animal crossed with the four paws from one to the other side of the cage.

Experimental design

Experiment 1: Effects of CBD microinjected into the BNST on contextual fear conditioning. The habituated and conditioned animals received bilateral injections of vehicle or CBD (15, 30 or 60 nmol; 200 nL per site; dose range used by Campos and Guimarães, 2008; Lemos et al., 2010) into the BNST 10 min before re-exposure to the conditioning box. For microinjections, we used a 33 G needle (Small Parts, Miami Lakes, Florida, USA) 1 mm longer than the guide cannulae, connected to a 10 μ L syringe (7001 KH, Hamilton Co., Reno, Nevada, USA) through a PE-10 tube. The needles were carefully inserted into the guide cannulae, and the solutions were infused over a 30 s period at a rate of 400 nL min⁻¹ with the help of an infusion pump (KD Scientific Inc., Holliston, Massachusetts, USA). The needles remained in place for an additional 45–60 s period to prevent reflux.

Experiment 2: Involvement of 5-HT_{1A} receptors in the effects of CBD injected into the BNST on contextual fear conditioning. Based on the results obtained in experiment 1, we chose the 30 nmol dose of CBD as the dose to be used in experiment 2. The protocol was similar to that of experiment 1, except that animals received intra-BNST injections of saline or the 5-HT_{1A} receptors antagonist, WAY100635 (0.37 nmol; 200 nL per site) followed 5 min later by a second injection of vehicle or CBD (30 nmol). Ten minutes after the last injection, the animals were placed at the center of the footshock chamber. The dose of WAY100635 was chosen based on previous studies using intracerebral injections (Campos and Guimarães, 2008; De Paula Soares and Zangrossi, 2004).

Drugs

CBD (kindly supplied by THC Pharm, Frankfurt am Main, Germany) was dissolved in grape seed oil (Campos and Guimarães, 2008; Lemos et al., 2010). The 5-HT_{1A} receptors antagonist N-[2-[4-(2-methoxyphenyl)-1-piperazinyl]ethyl]-N-(2-pyridinyl) cyclohexane carboxamide maleate (WAY100635, Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA)

was dissolved in saline. The solutions were prepared immediately before the tests and protected from the light during the experimental sessions.

Histological procedure

At the end of the experiments the rats were anesthetized with urethane (1.25 g kg⁻¹ intraperitoneally, Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA) and 200 nL of 1% Evans blue dye was bilaterally injected into the BNST as an injection site marker. The chest was surgically opened, the descending aorta occluded, the right atrium severed and the brain perfused with 10% formalin through the left ventricle. Brains were postfixed for 24 h at 4°C, and 40 mm sections were cut using a cryostat (CM-1900, Leica, Wetzlar, Germany). Serial brain sections were stained with 1% neutral red and injection sites determined using the rat brain atlas (Paxinos and Watson, 1997) as reference. As a histological control, the animals submitted to contextual fear conditioning that received CBD (30 nmol) outside the BNST were joined together in an additional group (OUT).

Statistical analysis

MAP and HR values were continuously recorded during the 5 min period before and the 10 min period after exposure to the footshock chamber. Data were expressed as means $\pm$ SEM of MAP or HR changes (respectively Δ MAP and Δ HR) sampled at 1 min intervals. Points sampled during the 5 min before exposure were used as the control baseline value. MAP and HR changes were analysed using a three-way ANOVA with condition (conditioned or non-conditioned) and treatment as the main independent factors, and time as a repeated measurement. When interactions between the factors were observed, groups (conditioned or non-conditioned) were compared using the Bonferroni's post hoc test. Freezing was expressed as a percentage of the test period. Freezing, crossings and rearings were expressed as means $\pm$ SEM and analysed using a two-way ANOVA with condition (conditioned or non-conditioned) and treatment as the two factors. A non-linear regression analysis was performed to investigate the dose-response curve obtained with CBD on freezing behavior. Animals receiving CBD (30 nmol) outside the BNST were compared to vehicle non-conditioned or conditioned groups by the Student's *t*-test. Experiment 2 was also analysed by two-way ANOVA using the first (WAY100635 or saline) and the second (CBD or vehicle) injections as main factors. When interaction between the factors was observed, specific one-way ANOVA followed by the Bonferroni's post hoc test was performed. Results of statistical tests with $P < 0.05$ were considered significant.

Results

Diagrammatic representations showing the bilateral injection sites in the BNST and a representative photomicrograph are shown in Figure 1.

Figure 1. Photomicrograph of a coronal brain section from a representative rat showing bilateral microinjection sites in the BNST, and diagrammatic representation based on the rat brain atlas of Paxinos and Watson (1997), indicating the injection sites into (black circles) and outside (white circles) the BNST of all the animals used in the experiments. AC: anterior commissure, BNST: bed nucleus of the stria terminalis, CC: corpus callosum, F: fornix, IA: interaural (coordinate), IC: internal capsule, LSV: lateral septal, ventral, LV: lateral ventricle, ST: stria terminalis.

Experiment 1: Effects of CBD microinjected into the BNST on contextual fear conditioning

Behavioral responses to fear conditioning. There were significant effects of condition ($F_{1,31} = 216.8$, $P < 0.001$), treatment ($F_{1,31} = 19.4$, $P < 0.001$) and interaction ($F_{3,31} = 20.7$, $P < 0.001$) on the percentage of freezing. Vehicle-treated rats which had received electrical footshocks (conditioned group) spent more time freezing during the re-exposure to context than the animals that did not receive shocks (non-conditioned group) (Figure 2A). CBD (30 and 60 nmol) injections significantly reduced ($F_{4,26} = 18.99$, $P < 0.0001$) freezing of conditioned animals ($n = 6$ per group) when compared with vehicle-treated conditioned animals ($n = 5$, Figure 2A). The drug (30 nmol) was unable to prevent the freezing response when injected into the structures surrounding the BNST ($t_6 = 5.73$, $P < 0.01$, Figure 2A). A non-linear regression analysis confirmed that CBD effects were dose-dependent, showing a significant association between drug doses and freezing attenuation ($r^2 = 0.75$, d.f. = 14, $P < 0.05$, Figure 2B). CBD (15, 30 or 60 nmol) injection into the BNST of non-conditioned rats did not produce any effect on freezing behavior ($n = 4$, $P > 0.05$, Figure 2A).

The evaluation of motor activity showed significant effects of condition ($F_{1,31} = 33.2$, $P < 0.001$), treatment ($F_{1,31} = 3.26$, $P < 0.05$) and interaction ($F_{3,31} = 5.54$, $P < 0.05$) on the number of crossings. Similar effects of condition ($F_{1,31} = 9.6$, $P < 0.01$), treatment ($F_{1,31} = 3.2$, $P < 0.05$) and interaction ($F_{3,31} = 4.46$, $P < 0.05$) were observed on the number of rearings. Rats treated with vehicle and 15 nmol CBD and pre-exposed to shocks showed a smaller number of crossings ($n = 4-6$ per group; $F_{2,12} = 31.5$, $P < 0.001$) and rearings ($n = 4-6$; $F_{2,12} = 9.34$, $P < 0.01$) than the non-conditioned vehicle group (Figure 3). Moreover, CBD (30 and 60 nmol) injections significantly increased the number of crossings ($F_{2,14} = 9.06$, $P < 0.01$) and rearings ($F_{2,14} = 7.71$, $P < 0.01$) of conditioned animals when compared to vehicle-treated conditioned animals (Figure 3).

Cardiovascular responses to fear conditioning. No differences were observed on basal levels of both MAP and HR among the groups recorded immediately before chamber re-exposure (Table 1).

The analyses of cardiovascular response during chamber re-exposition showed significant effects of condition (MAP: $F_{1,31} = 5.6$, $P < 0.01$; HR: $F_{1,31} = 24.01$, $P < 0.01$), treatment (MAP: $F_{3,31} = 4.41$, $P < 0.01$; HR: $F_{3,31} = 3.7$, $P < 0.01$) and time (MAP: $F_{14,434} = 114.2$, $P < 0.01$; HR: $F_{14,434} = 97.1$, $P < 0.01$). Conditioning versus time (MAP: $F_{14,434} = 4.6$, $P < 0.01$; HR: $F_{14,434} = 25$, $P < 0.01$), treatment versus time (MAP: $F_{42,434} = 2.7$, $P < 0.01$; HR: $F_{42,434} = 2.2$, $P < 0.01$) and conditioning versus treatment versus time interactions (MAP: $F_{42,434} = 2.3$, $P < 0.01$; HR: $F_{42,434} = 1.5$, $P < 0.05$) were also significant.

As shown in Figure 4, re-exposure to a context previously paired with footshocks induced a marked and sustained increase in HR and MAP during the 10 min test. In the non-conditioned groups, re-exposure to the context also increased HR and MAP. However, these increases were smaller than those observed in the conditioned groups (MAP: $F_{1,31} = 5.6$, $P < 0.01$; HR: $F_{1,31} = 24.01$, $P < 0.01$).

Similar to the behavioral responses, CBD (30 and 60 nmol) attenuated the increase in MAP and HR on conditioned groups (MAP: $F_{4,26} = 8.296$, $P < 0.001$; HR: $F_{4,26} = 5.387$, $P < 0.01$), but had no effect on non-conditioned animals (MAP: $F_{3,15} = 0.314$, $P > 0.05$; HR: $F_{3,15} = 0.517$, $P > 0.05$, Figure 4). No cardiovascular changes were observed when 30 nmol of CBD (Figure 4) was microinjected into the structures surrounding the BNST of conditioned animals before the test ($n = 4$, MAP: $P > 0.05$ and HR: $P > 0.05$ respectively).

Experiment 2: Involvement of 5-HT_{1A} receptors on CBD effects

Behavioral responses to fear conditioning. Similar to experiment 1, 30 nmol of CBD reduced freezing of

Figure 2. (A) Effects of bilateral microinjection of 200 nL of vehicle or CBD (15, 30 or 60 nmol) in non-conditioned ($n = 4$ per group) and conditioned ($n = 5-6$) animals on the percentage of time spent in freezing behavior. Conditioned animals receiving CBD (30 nmol) injections outside the BNST were joined in an additional group (OUT, $n = 4$). Columns represent the mean and bars the SEM, $*P < 0.05$ compared to vehicle non-conditioned group and $\#P < 0.05$ compared to vehicle conditioned group, Bonferroni's post hoc test. (B) Percentage of time spent in freezing behavior in response to the bilateral microinjection of vehicle (V, $n = 5$) or increasing doses of CBD ($n = 5-6$) in conditioned rats. Dose-effect curves were generated by non-linear regression analysis. Symbols represent the means $\pm$ SEM. BNST: bed nucleus of the stria terminalis, CBD: cannabidiol, Veh: vehicle.

Figure 3. Effects of bilateral microinjection of 200 nL of vehicle or CBD (15, 30 or 60 nmol) on the number of crossings and rearings of non-conditioned ($n = 4$ per group) and conditioned ($n = 5-6$) rats. Columns represent the mean and bars the SEM, $*P < 0.05$ compared to vehicle non-conditioned group and $\#P < 0.05$ compared to vehicle conditioned group, Bonferroni's post hoc test. CBD: cannabidiol, Veh: vehicle.

conditioned animals ($n = 5$) as compared to control animals ($n = 5$) ($F_{3,20} = 11.73$, $P < 0.001$). No effect on freezing was found in animals treated only with WAY100635 ($n = 6$, $P > 0.05$), but the drug was able to reduce the effects of CBD ($n = 5$, $P > 0.05$, compared to control vehicle group, Figure 5A). Moreover, there was significant interaction between the first and second injections ($F_{1,17} = 12.73$, $P < 0.01$).

Cardiovascular responses to fear conditioning. WAY100635 did not affect the basal values of MAP ($F_{3,20} = 0.21$, $P > 0.05$) or HR ($F_{3,20} = 0.61$, $P > 0.05$)

compared to 30 nmol of CBD and vehicle (Table 1). Confirming the results from experiment 1, 30 nmol of CBD attenuated the increase of the cardiovascular responses (MAP: $F_{3,20} = 6.948$, $P < 0.01$; HR: $F_{3,20} = 3.855$, $P < 0.05$) induced by the aversive context. WAY100635 did not affect cardiovascular responses by itself (MAP: $P > 0.05$; HR: $P > 0.05$) but was able to inhibit CBD effects on the cardiovascular responses (MAP: $P > 0.05$; HR: $P > 0.05$) observed during aversive context re-exposition (Figure 5B). Furthermore, significant interaction between the first and second injections was found only relative to MAP ($F_{1,17} = 7.01$, $P < 0.05$), however, there was tendency to HR ($F_{1,17} = 3.61$, $P = 0.07$).

Table 1. Basal values of MAP and HR in non-conditioned and conditioned animals

Group		MAP (mmHg)	HR (bpm)
<i>Non-conditioned</i>			
Vehicle	<i>n</i> = 4	107 ± 5	369 ± 9
CBD 15 nmol	<i>n</i> = 4	98 ± 3	343 ± 12
CBD 30 nmol	<i>n</i> = 4	99 ± 2	360 ± 21
CBD 60 nmol	<i>n</i> = 4	104 ± 6	359 ± 12
		$F_{3,15} = 0.957$	$F_{3,15} = 0.576$
<i>Conditioned</i>			
Vehicle	<i>n</i> = 5	96 ± 4	351 ± 13
CBD 15 nmol	<i>n</i> = 6	99 ± 3	356 ± 19
CBD 30 nmol	<i>n</i> = 6	100 ± 5	368 ± 12
CBD 60 nmol	<i>n</i> = 6	97 ± 3	345 ± 8
OUT	<i>n</i> = 4	102 ± 3	359 ± 4
		$F_{4,26} = 0.337$	$F_{4,26} = 0.465$
Saline + Vehicle	<i>n</i> = 5	100 ± 3	365 ± 15
WAY100635 + Vehicle	<i>n</i> = 6	100 ± 3	345 ± 5
Saline + CBD	<i>n</i> = 5	101 ± 3	364 ± 13
WAY100635 + CBD	<i>n</i> = 5	102 ± 3	346 ± 21
		$F_{3,20} = 0.210$	$F_{3,20} = 0.618$

The values in the table represent the means ± SEM, one-way analysis of variance. CBD: cannabidiol, HR: heart rate, MAP: mean arterial pressure.

Discussion

Confirming previous studies (Resstel et al., 2008; Zhang et al., 2004), conditioned animals exhibited significant cardiovascular changes (increases in HR and MAP) and behavioral responses (freezing, decreases in the number of crossings and rearings) after being re-exposed to a context previously paired with aversive footshocks. These effects were attenuated by intra-BNST injection of CBD. This compound did not induce any significant change in the basal levels of MAP and HR, which agrees with the reported lack of significant cardiovascular effects of this drug (McQueen et al., 2004; Resstel et al., 2006b; Resstel et al., 2009). It is unlikely, therefore, that the attenuation of the cardiovascular responses to aversive context depends on direct cardiovascular effects, but rather on an attenuation of the emotional response. In agreement with this proposal, acute administration of CBD has been shown to induce anxiolytic-like effects in several animal models (Guimarães et al., 1990; Moreira et al., 2006; Resstel et al., 2006b).

Although the extent of CBD diffusion from the injection site could not be precisely established, the lack of any effect when the drug was administered into nearby structures suggests that the effects were indeed mediated by drug action in the BNST. CBD effects could also be explained by

Figure 4. Time course of the effects of bilateral microinjection of 200 nL of vehicle (*n* = 5) or CBD (15, 30 or 60 nmol) on mean arterial pressure (Δ MAP) and heart rate (Δ HR) increases recorded in non-conditioned (*n* = 4 per group) and conditioned (*n* = 5–6) rats. Conditioned animals receiving CBD (30 nmol) injections outside the BNST were joined in an additional group (OUT, *n* = 4). Symbols represent the means and bars represent the SEM. The asterisk indicates significant treatment difference ($P < 0.05$, Bonferroni's post hoc test) over the whole footshock chamber exposure period compared to vehicle treated animals.

BNST: bed nucleus of the stria terminalis, CBD: cannabidiol, HR: heart rate, MAP: mean arterial pressure.

Figure 5. (A) Effect of bilateral pretreatment with saline (Veh, 200 nL) or WAY100635 (WAY, 0.37 nmol) followed by a second injection of grape seed oil (Veh) or CBD (30 nmol) on the percentage of freezing induced by re-exposure to the aversive context ($n = 5-6$). Data represent the mean $\pm$ SEM, $*P < 0.05$ compared to other groups, Bonferroni's post hoc test. (B) Time course of the effects of bilateral pretreatment with saline (Veh, 200 nL) or WAY100635 (WAY, 0.37 nmol) followed by a second injection of grape seed oil (Veh) or CBD (30 nmol) on mean arterial pressure (Δ MAP) and heart rate (Δ HR) increase induced by re-exposure to the aversive context ($n = 5-6$). Symbols represent the mean and bars the SEM, $*P < 0.05$, Bonferroni's post hoc test, over the whole footshock chamber exposure period compared to other groups. CBD: cannabidiol, HR: heart rate, MAP: mean arterial pressure, Veh: vehicle, WAY: WAY100635.

interference on memory recall. However, a low potential for interference with learning and memory has been reported for this drug (Fadda et al., 2004), making this possibility improbable.

Corroborating the present results, Lemos et al. (2010) found that systemic administration of CBD was able to reduce freezing behavior and activation of medial prefrontal cortex and BNST neurons induced by re-exposure to the aversively conditioned context. In that study, CBD injected into the prelimbic prefrontal cortex was also able to attenuate the conditioned aversive responses. Together, these observations and our results suggest that the BNST and the prelimbic cortex are involved in the effects of CBD on contextual fear conditioning when CBD is administered systemically.

Supporting a possible regulatory role in defensive responses, the BNST is proposed to be an important relay station linking important forebrain structures involved in conditioned emotional response to context such as the amygdala, hippocampus and medial prefrontal cortex (Dong et al., 2001a, 2001b; Davis et al., 1997a; Fanselow, 2000; Fendt and Fanselow, 1999; Massi et al., 2008; Milad and Quirk, 2002; Resstel et al., 2006a; Rudy et al., 2004; Vertes, 2006), to the hypothalamus and autonomic regulatory brainstem areas (Alheid, 2003; Davis et al., 1997b; Herman and Cullinan, 1997; Herman et al., 1994). In addition to autonomic responses, the BNST could also modulate behavior responses to aversive stimuli. Recent studies using lesions or pharmacological reversible inactivation showed that the BNST is important for the expression of aversive responses such as freezing, MAP and HR increases, as well as for increases in the release of corticosterone when the animals are exposed to the context in which they had previously received a footshock (Gray et al., 1993; Resstel et al., 2008; Sullivan et al., 2004). Another finding of the present study is that the effects of CBD microinjected into the BNST on the expression of contextual fear conditioning were blocked by pretreatment with WAY100635, a 5-HT_{1A} receptor antagonist, at a dose that did not produce any effect by itself. This finding agrees with recent studies showing that several CBD effects involve 5-HT_{1A} receptor-mediated neurotransmission. Antagonists to the 5-HT_{1A} receptor were able to prevent several effects induced by CBD, including antidepressive (Zanelati et al., 2010), anti-stress (Resstel et al., 2009) and anxiolytic effects after drug microinjection into the dorsolateral periaqueductal gray (Campos and Guimarães, 2008). In addition, Magen et al. (2010) showed that chronic treatment with CBD improves cognitive and motor impairments in an animal model of hepatic encephalopathy via 5-HT_{1A} receptor.

Brain 5-HT_{1A} receptors are located presynaptically in cell bodies in the raphe nuclei of the brainstem and postsynaptically predominantly in limbic structures including the BNST (Barnes and Sharp, 1999; Chalmers and Watson, 1991; Phelix et al., 1992; Verge et al., 1985). This receptor is thought to play an important role in the etiology of anxiety disorders (Akimova et al., 2009). 5-HT_{1A} receptor knockout mice display increased anxiety-related behavior (Heisler et al., 1998; Parks et al., 1998; Ramboz et al., 1998) and partial 5-HT_{1A} receptor agonists are anxiolytics (Barnes and Sharp, 1999; Rickels and Rynn, 2002).

The BNST receives a reasonably dense innervation by serotonergic afferents from the caudal regions of the dorsal raphe nucleus (Commons et al., 2003; Lowry et al., 2008) and expresses several subtypes of serotonin receptors (Cornea-Hébert et al., 1999; Guo et al., 2009; Heidmann et al., 1998; Kia et al., 1996; Mengod et al., 1990; Pompeiano et al., 1994; To et al., 1995; Waeber and Moskowitz, 1995; Waeber et al., 1994; Wright et al., 1995; Xu and Pandey, 2000). However, single cell reverse transcriptase PCR (RT-PCR) data revealed that 5-HT_{1A} and 5-HT₇ receptors are the most prevalent receptor subtypes expressed in BNST neurons (Guo et al., 2009). Based on these pieces of evidence, Hammack et al. (2009) suggested that the BNST could be a critical structure for serotonergic modulation of anxiety-like behaviors.

Electrophysiological studies have demonstrated that the application of serotonin to BNST neurons elicits inhibitory responses mediated by the activation of postsynaptic 5-HT_{1A} receptors (Levita et al., 2004; Rainnie, 1999) and local infusion of a 5-HT_{1A} receptor agonist, 5-carboxamidotryptamine (5-CT), into the BNST attenuated the acoustic startle response in rats (Levita et al., 2004). Buspirone, a partial 5-HT_{1A} receptor agonist clinically used in the treatment of anxiety, blocks the effects of light-enhanced startle in rats and the BNST is described to be critically involved in this animal model of anxiety (Davis et al., 1997a; Davis et al., 2010; Walker and Davis, 1997; Walker et al., 2003). Together these results suggest that 5-HT_{1A} receptor-mediated inhibition of BNST neurons modulates anxiety-like behaviors. Although the present results indicate that CBD effects in the BNST depend on the activation of 5-HT_{1A} receptors, it is not possible to rule out the involvement of other pharmacological mechanisms. For example, intracerebroventricular administration of CBD has been shown to facilitate contextual fear conditioning extinction, an effect prevented by treatment with a cannabinoid-1 (CB1) receptor antagonist (Bitencourt et al., 2008). Despite having a low affinity for CB1 and cannabinoid-2 (CB2) receptors *in vitro* (Petitet et al., 1998; Thomas et al., 1998), CBD can facilitate endocannabinoid-mediated neurotransmission by decreasing anandamide hydrolysis or reuptake (Bisogno et al., 2001). CBD has also been found to activate transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 1 (TRPV1) receptors (Bisogno et al., 2001), enhance adenosine signaling through inhibition of uptake (Carrier et al., 2006) and allosterically modulate 5-HT₃ (Yang et al., 2010) and μ - and δ -opioid receptors (Kathmann et al., 2006). The involvement of these mechanisms in the effects of CBD in the BNST remains to be tested. In conclusion, the results of the present study suggest that CBD can decrease the expression of contextual fear conditioning in part, at least, by activating 5-HT_{1A} receptors in the BNST.

Acknowledgements

The authors thank THC Pharm GmbH (Frankfurt am Main, Germany) for kindly donating CBD and Idalia IB Aguiar, Ivanilda AC Fortunato and JC de Aguiar for technical support.

Funding

FV Gomes has a Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) MSc fellowship (130171/2009-3), DG Reis has a

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) PhD fellowship (2008/0469-7) and FHF Alves has a CNPq PhD fellowship (870307/1997-5). This research was also supported by grants from FAPESP (2009/03187-9 and 2007/03685-3), CNPq (480550/2007-7 and 305996/2008-8) and Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FAEPA).

Conflicts of interest statement

The authors have no conflicts of interest to declare.

References

- Akimova E, Lanzenberger R and Kasper S (2009) The serotonin-1A receptor in anxiety disorders. *Biol Psychiatry* 66: 627–635.
- Alheid GF (2003) Extended amygdala and basal forebrain. *Ann N Y Acad Sci* 985: 185–205.
- Antoniadis EA and McDonald RJ (1999) Discriminative fear conditioning to context expressed by multiple measures of fear in the rat. *Behav Brain Res* 101: 1–13.
- Barnes NM and Sharp T (1999) A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* 38: 1083–1152.
- Beck CH and Fibiger HC (1995) Conditioned fear-induced changes in behavior and in the expression of the immediate early gene c-fos: with and without diazepam pretreatment. *J Neurosci* 15: 709–720.
- Bisogno T, Hanus L, De Petrocellis L, Tchilibon S, Ponde DE, Brandi I, et al. (2001) Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. *Br J Pharmacol* 134: 845–852.
- Bitencourt RM, Pamplona FA and Takahashi RN (2008) Facilitation of contextual fear memory extinction and anti-anxiogenic effects of AM404 and cannabidiol in conditioned rats. *Eur Neuropsychopharmacol* 18: 849–859.
- Blanchard RJ and Blanchard DC (1969) Crouching as an index of fear. *J Comp Physiol Psychol* 67: 370–375.
- Campos AC and Guimarães FS (2008) Involvement of 5HT1A receptors in the anxiolytic-like effects of cannabidiol injected into the dorsolateral periaqueductal gray of rats. *Psychopharmacology (Berl)* 199: 223–230.
- Carlini EA and Cunha JM (1981) Hypnotic and antiepileptic effects of cannabidiol. *J Clin Pharmacol* 21: 417S–427S.
- Carrier EJ, Auchampach JA and Hillard CJ (2006) Inhibition of an equilibrative nucleoside transporter by cannabidiol: a mechanism of cannabinoid immunosuppression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 7895–7900.
- Carrive P (2000) Conditioned fear to environmental context: cardiovascular and behavioral components in the rat. *Brain Res* 858: 440–445.
- Casada JH and Dafny N (1991) Restraint and stimulation of bed nucleus of the stria terminalis produce similar stress-like behaviors. *Brain Res Bull* 27: 207–212.
- Chalmers DT and Watson SJ (1991) Comparative anatomical distribution of 5-HT1A receptor mRNA and 5-HT1A binding in rat brain—a combined *in situ* hybridisation/*in vitro* receptor autoradiographic study. *Brain Res* 561: 51–60.
- Commons KG, Connolly KR and Valentino RJ (2003) A neurochemically distinct dorsal raphe-limbic circuit with a potential role in affective disorders. *Neuropsychopharmacology* 28: 206–215.
- Cornea-Hébert V, Riad M, Wu C, Singh SK and Descarries L (1999) Cellular and subcellular distribution of the serotonin 5-HT_{2A} receptor in the central nervous system of adult rat. *J Comp Neurol* 409: 187–209.

- Crestani CC, Alves FH, Tavares RF and Corrêa FM (2009) Role of the bed nucleus of the stria terminalis in the cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. *Stress* 12: 268–278.
- Crippa JA, Zuardi AW, Garrido GE, Wichert-Ana L, Guarnieri R, Ferrari L, et al. (2004) Effects of cannabidiol (CBD) on regional cerebral blood flow. *Neuropsychopharmacology* 29: 417–426.
- Cunha JM, Carlini EA, Pereira AE, Ramos OL, Pimentel C, Gagliardi R, et al. (1980) Chronic administration of cannabidiol to healthy volunteers and epileptic patients. *Pharmacology* 21: 175–185.
- Davis M, Walker DL and Lee Y (1997a) Amygdala and bed nucleus of the stria terminalis: differential roles in fear and anxiety measured with the acoustic startle reflex. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 352: 1675–1687.
- Davis M, Walker DL and Lee Y (1997b) Roles of the amygdala and bed nucleus of the stria terminalis in fear and anxiety measured with the acoustic startle reflex. Possible relevance to PTSD. *Ann N Y Acad Sci* 821: 305–331.
- Davis M, Walker DL, Miles L and Grillon C (2010) Phasic vs sustained fear in rats and humans: role of the extended amygdala in fear vs anxiety. *Neuropsychopharmacology* 35: 105–135.
- De Paula Soares V and Zangrossi H Jr (2004) Involvement of 5-HT_{1A} and 5-HT₂ receptors of the dorsal periaqueductal gray in the regulation of the defensive behaviors generated by the elevated T-maze. *Brain Res Bull* 64: 181–188.
- Dong HW, Petrovich GD and Swanson LW (2001a) Topography of projections from amygdala to bed nuclei of the stria terminalis. *Brain Res Brain Res Rev* 38: 192–246.
- Dong HW, Petrovich GD, Watts AG and Swanson LW (2001b) Basic organization of projections from the oval and fusiform nuclei of the bed nuclei of the stria terminalis in adult rat brain. *J Comp Neurol* 436: 430–455.
- Dunn JD (1987) Plasma corticosterone responses to electrical stimulation of the bed nucleus of the stria terminalis. *Brain Res* 407: 327–331.
- Dunn JD and Williams TJ (1995) Cardiovascular responses to electrical stimulation of the bed nucleus of the stria terminalis. *J Comp Neurol* 352: 227–234.
- Fadda P, Robinson L, Fratta W, Pertwee RG and Riedel G (2004) Differential effects of THC- or CBD-rich cannabis extracts on working memory in rats. *Neuropharmacology* 47: 1170–1179.
- Fanselow MS (1980) Conditioned and unconditional components of post-shock freezing. *Pavlov J Biol Sci* 15: 177–182.
- Fanselow MS (2000) Contextual fear, gestalt memories, and the hippocampus. *Behav Brain Res* 110: 73–81.
- Fendt M and Fanselow MS (1999) The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. *Neurosci Biobehav Rev* 23: 743–760.
- Frank LM, Stanley GB and Brown EN (2004) Hippocampal plasticity across multiple days of exposure to novel environments. *J Neurosci* 24: 7681–7689.
- Fusar-Poli P, Crippa JA, Bhattacharyya S, Borgwardt SJ, Allen P, Martin-Santos R, et al. (2009) Distinct effects of {delta}9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol on neural activation during emotional processing. *Arch Gen Psychiatry* 66: 95–105.
- Gray TS, Piechowski RA, Yracheta JM, Rittenhouse PA, Bethea CL and Van de Kar LD (1993) Ibotenic acid lesions in the bed nucleus of the stria terminalis attenuate conditioned stress-induced increases in prolactin, ACTH and corticosterone. *Neuroendocrinology* 57: 517–524.
- Guimarães FS, Chiaretti TM, Graeff FG and Zuardi AW (1990) Antianxiety effect of cannabidiol in the elevated plus-maze. *Psychopharmacology (Berl)* 100: 558–559.
- Guo JD, Hammack SE, Hazra R, Levita L and Rainnie DG (2009) Bi-directional modulation of bed nucleus of stria terminalis neurons by 5-HT: molecular expression and functional properties of excitatory 5-HT receptor subtypes. *Neuroscience* 164: 1776–1793.
- Hammack SE, Guo JD, Hazra R, Dabrowska J, Myers KM and Rainnie DG (2009) The response of neurons in the bed nucleus of the stria terminalis to serotonin: implications for anxiety. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 33: 1309–1320.
- Hampson AJ, Grimaldi M, Axelrod J and Wink D (1998) Cannabidiol and (-)Delta9-tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 8268–8273.
- Heidmann DE, Szot P, Kohen R and Hamblin MW (1998) Function and distribution of three rat 5-hydroxytryptamine₇ (5-HT₇) receptor isoforms produced by alternative splicing. *Neuropharmacology* 37: 1621–1632.
- Heisler LK, Chu HM, Brennan TJ, Danao JA, Bajwa P, Parsons LH, et al. (1998) Elevated anxiety and antidepressant-like responses in serotonin 5-HT_{1A} receptor mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 15049–15054.
- Herman JP and Cullinan WE (1997) Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Trends Neurosci* 20: 78–84.
- Herman JP, Cullinan WE and Watson SJ (1994) Involvement of the bed nucleus of the stria terminalis in tonic regulation of paraventricular hypothalamic CRH and AVP mRNA expression. *J Neuroendocrinol* 6: 433–442.
- Iuvone T, Esposito G, De Filippis D, Scuderi C and Steardo L (2009) Cannabidiol: a promising drug for neurodegenerative disorders? *CNS Neurosci Ther* 15: 65–75.
- Izzo AA, Borrelli F, Capasso R, Di Marzo V and Mechoulam R (2009) Non-psychoactive plant cannabinoids: new therapeutic opportunities from an ancient herb. *Trends Pharmacol Sci* 30: 515–527.
- Karniol IG, Shirakawa I, Kasinski N, Pfeifferman A and Carlini EA (1974) Cannabidiol interferes with the effects of delta 9-tetrahydrocannabinol in man. *Eur J Pharmacol* 28: 172–177.
- Kathmann M, Flau K, Redmer A, Tränkle C and Schlicker E (2006) Cannabidiol is an allosteric modulator at mu- and delta-opioid receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 372: 354–361.
- Kia HK, Miquel MC, Brisorgueil MJ, Daval G, Riad M, El Mestikawy S, et al. (1996) Immunocytochemical localization of serotonin_{1A} receptors in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 365: 289–305.
- Lemos JI, Resstel LB and Guimarães FS (2010) Involvement of the prelimbic prefrontal cortex on cannabidiol-induced attenuation of contextual conditioned fear in rats. *Behav Brain Res* 207: 105–111.
- Levita L, Hammack SE, Mania I, Li XY, Davis M and Rainnie DG (2004) 5-hydroxytryptamine_{1A}-like receptor activation in the bed nucleus of the stria terminalis: electrophysiological and behavioral studies. *Neuroscience* 128: 583–596.
- Lowry CA, Hale MW, Evans AK, Heerkens J, Staub DR, Gasser PJ, et al. (2008) Serotonergic systems, anxiety, and affective disorder: focus on the dorsomedial part of the dorsal raphe nucleus. *Ann N Y Acad Sci* 1148: 86–94.
- Magen I, Avraham Y, Ackerman Z, Vorobiev L, Mechoulam R and Berry E (2010) Cannabidiol ameliorates cognitive and motor impairments in bile-duct ligated mice via 5-HT_{1A} receptor activation. *Br J Pharmacol* 159: 950–957.
- Massi L, Elezgarai I, Puente N, Reguero L, Grandes P, Manzoni OJ, et al. (2008) Cannabinoid receptors in the bed nucleus of the stria terminalis control cortical excitation of midbrain dopamine cells in vivo. *J Neurosci* 28: 10496–10508.
- McQueen DS, Bond SM, Smith PJ, Balali-Mood K and Smart D (2004) Cannabidiol lacks the vanilloid VR₁-mediated vasospasmodic effects of capsaicin and anandamide in anaesthetised rats. *Eur J Pharmacol* 491: 181–189.
- Mengod G, Nguyen H, Le H, Waeber C, Lübbert H and Palacios JM (1990) The distribution and cellular localization of the serotonin

- 1C receptor mRNA in the rodent brain examined by in situ hybridization histochemistry. Comparison with receptor binding distribution. *Neuroscience* 35: 577–591.
- Milad MR and Quirk GJ (2002) Neurons in medial prefrontal cortex signal memory for fear extinction. *Nature* 420: 70–74.
- Moreira FA, Aguiar DC and Guimarães FS (2006) Anxiolytic-like effect of cannabidiol in the rat Vogel conflict test. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 30: 1466–1471.
- Onaivi ES, Green MR and Martin BR (1990) Pharmacological characterization of cannabinoids in the elevated plus maze. *J Pharmacol Exp Ther* 253: 1002–1009.
- Parks CL, Robinson PS, Sibille E, Shenk T and Toth M (1998) Increased anxiety of mice lacking the serotonin_{1A} receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 10734–10739.
- Paxinos G and Watson C (1997) *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 2nd ed. Sydney: Academic Press.
- Petitot F, Jeantaud B, Reibaud M, Imperato A and Dubroeuq MC (1998) Complex pharmacology of natural cannabinoids: evidence for partial agonist activity of delta9-tetrahydrocannabinol and antagonist activity of cannabidiol on rat brain cannabinoid receptors. *Life Sci* 63: PL1–6.
- Phelix CF, Liposits Z and Paull WK (1992) Serotonin-CRF interaction in the bed nucleus of the stria terminalis: a light microscopic double-label immunocytochemical analysis. *Brain Res Bull* 28: 943–948.
- Pompeiano M, Palacios JM and Mengod G (1994) Distribution of the serotonin 5-HT₂ receptor family mRNAs: comparison between 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors. *Brain Res Mol Brain Res* 23: 163–178.
- Rainnie DG (1999) Neurons of the bed nucleus of the stria terminalis (BNST). Electrophysiological properties and their response to serotonin. *Ann N Y Acad Sci* 877: 695–699.
- Ramboz S, Oosting R, Amara DA, Kung HF, Blier P, Mendelsohn M, et al. (1998) Serotonin receptor 1A knockout: an animal model of anxiety-related disorder. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 14476–14481.
- Resstel LB, Alves FH, Reis DG, Crestani CC, Corrêa FM and Guimarães FS (2008) Anxiolytic-like effects induced by acute reversible inactivation of the bed nucleus of stria terminalis. *Neuroscience* 154: 869–876.
- Resstel LB, Joca SR, Guimarães FG and Corrêa FM (2006a) Involvement of medial prefrontal cortex neurons in behavioral and cardiovascular responses to contextual fear conditioning. *Neuroscience* 143: 377–385.
- Resstel LB, Joca SR, Moreira FA, Corrêa FM and Guimarães FS (2006b) Effects of cannabidiol and diazepam on behavioral and cardiovascular responses induced by contextual conditioned fear in rats. *Behav Brain Res* 172: 294–298.
- Resstel LB, Tavares RF, Lisboa SF, Joca SR, Corrêa FM and Guimarães FS (2009) 5-HT_{1A} receptors are involved in the cannabidiol-induced attenuation of behavioural and cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. *Br J Pharmacol* 156: 181–188.
- Rickels K and Rynn M (2002) Pharmacotherapy of generalized anxiety disorder. *J Clin Psychiatry* 63(Suppl 14): 9–16.
- Rudy JW, Huff NC and Matus-Amat P (2004) Understanding contextual fear conditioning: insights from a two-process model. *Neurosci Biobehav Rev* 28: 675–685.
- Russo EB, Burnett A, Hall B and Parker KK (2005) Agonistic properties of cannabidiol at 5-HT_{1A} receptors. *Neurochem Res* 30: 1037–1043.
- Sullivan GM, Apergis J, Bush DE, Johnson LR, Hou M and Ledoux JE (2004) Lesions in the bed nucleus of the stria terminalis disrupt corticosterone and freezing responses elicited by a contextual but not by a specific cue-conditioned fear stimulus. *Neuroscience* 128: 7–14.
- Thomas BF, Gilliam AF, Burch DF, Roche MJ and Seltzman HH (1998) Comparative receptor binding analyses of cannabinoid agonists and antagonists. *J Pharmacol Exp Ther* 285: 285–292.
- To ZP, Bonhaus DW, Eglén RM and Jakeman LB (1995) Characterization and distribution of putative 5-HT₇ receptors in guinea-pig brain. *Br J Pharmacol* 115: 107–116.
- Verge D, Daval G, Patey A, Gozlan H, el Mestikawy S and Hamon M (1985) Presynaptic 5-HT autoreceptors on serotonergic cell bodies and/or dendrites but not terminals are of the 5-HT_{1A} subtype. *Eur J Pharmacol* 113: 463–464.
- Vertes RP (2006) Interactions among the medial prefrontal cortex, hippocampus and midline thalamus in emotional and cognitive processing in the rat. *Neuroscience* 142: 1–20.
- Waeber C and Moskowitz MA (1995) [³H]sumatriptan labels both 5-HT_{1D} and 5-HT_{1F} receptor binding sites in the guinea pig brain: an autoradiographic study. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 352: 263–275.
- Waeber C, Sebben M, Nieoullon A, Bockaert J and Dumuis A (1994) Regional distribution and ontogeny of 5-HT₄ binding sites in rodent brain. *Neuropharmacology* 33: 527–541.
- Walker DL and Davis M (1997) Double dissociation between the involvement of the bed nucleus of the stria terminalis and the central nucleus of the amygdala in startle increases produced by conditioned versus unconditioned fear. *J Neurosci* 17: 9375–9383.
- Walker DL, Toufexis DJ and Davis M (2003) Role of the bed nucleus of the stria terminalis versus the amygdala in fear, stress, and anxiety. *Eur J Pharmacol* 463: 199–216.
- Wright DE, Seroogy KB, Lundgren KH, Davis BM and Jennes L (1995) Comparative localization of serotonin_{1A}, 1C, and 2 receptor subtype mRNAs in rat brain. *J Comp Neurol* 351: 357–373.
- Xu T and Pandey SC (2000) Cellular localization of serotonin(2A) (5HT(2A)) receptors in the rat brain. *Brain Res Bull* 51: 499–505.
- Yang KH, Galadari S, Isaev D, Petroianu G, Shippenberg TS and Oz M (2010) The nonpsychoactive cannabinoid cannabidiol inhibits 5-hydroxytryptamine_{3A} receptor-mediated currents in *Xenopus laevis* oocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 333: 547–554.
- Zanelati TV, Biojone C, Moreira FA, Guimarães FS and Joca SR (2010) Antidepressant-like effects of cannabidiol in mice: possible involvement of 5-HT_{1A} receptors. *Br J Pharmacol* 159: 122–128.
- Zhang WN, Murphy CA and Feldon J (2004) Behavioural and cardiovascular responses during latent inhibition of conditioned fear: measurement by telemetry and conditioned freezing. *Behav Brain Res* 154: 199–209.
- Zuardi AW (2008) Cannabidiol: from an inactive cannabinoid to a drug with wide spectrum of action. *Rev Bras Psiquiatr* 30: 271–280.
- Zuardi AW, Cosme RA, Graeff FG and Guimarães FS (1993) Effects of ipsapirone and cannabidiol on human experimental anxiety. *J Psychopharmacol* 7(Suppl 1): 82–88.
- Zuardi AW, Crippa JA, Hallak JE, Moreira FA and Guimarães FS (2006) Cannabidiol, a Cannabis sativa constituent, as an antipsychotic drug. *Braz J Med Biol Res* 39: 421–429.
- Zuardi AW, Shirakawa I, Finkelfarb E and Karniol IG (1982) Action of cannabidiol on the anxiety and other effects produced by delta 9-THC in normal subjects. *Psychopharmacology (Berl)* 76: 245–250.

The anxiolytic-like effects of cannabidiol injected into the bed nucleus of the stria terminalis are mediated by 5-HT_{1A} receptors

Felipe V. Gomes · Leonardo B. M. Resstel ·
Francisco S. Guimarães

Received: 16 June 2010 / Accepted: 22 September 2010
© Springer-Verlag 2010

Abstract

Rationale Cannabidiol (CBD) is a non-psychotomimetic compound from *Cannabis sativa* that induces anxiolytic-like effects in rodents and humans after systemic administration. Previous results from our group showed that CBD injection into the bed nucleus of the stria terminalis (BNST) attenuates conditioned aversive responses. The aim of this study was to further investigate the role of this region on the anxiolytic effects of the CBD. Moreover, considering that CBD can activate 5-HT_{1A} receptors, we also verified a possible involvement of these receptors in those effects.

Methods Male Wistar rats received injections of CBD (15, 30, or 60 nmol) into the BNST and were exposed to the elevated plus-maze (EPM) or to the Vogel conflict test (VCT), two widely used animal models of anxiety.

Results CBD increased open arms exploration in the EPM as well as the number of punished licks in the VCT, suggesting an anxiolytic-like effect. The drug did not change the number of entries into the enclosed arms of the EPM nor interfered with water consumption or nociceptive threshold, discarding potential confounding factors in the two tests. Moreover, pre-treatment with the 5-HT_{1A} receptor antagonist WAY100635 (0.37 nmol) blocked the effects of CBD in both models.

Conclusions These results give further support to the proposal that BNST is involved in the anxiolytic-like effects of CBD observed after systemic administration, probably by facilitating local 5-HT_{1A} receptor-mediated neurotransmission.

Keywords Cannabinoids · Anxiety · Serotonin receptor · Rat · Maze · Limbic system · Behavior · Anxiolytic · Animal model

Introduction

Cannabidiol (CBD) is a major component of *Cannabis sativa* that may constitute up to 40% of cannabis extracts (Grle 1976). Although it is devoid of the typical psychotomimetic effects of this plant (Zuardi 2008), CBD can attenuate the psychotomimetic and anxiogenic effects induced by high doses of Δ^9 -tetrahydrocannabinol in humans (Karniol et al. 1974; Zuardi et al. 1982). This finding leads to the hypothesis that CBD could have antipsychotic and anxiolytic properties.

Accordingly, several pre-clinical and clinical studies have demonstrated that systemic administration of CBD induces anxiolytic-like effects (Crippa et al. 2004; Fusar-Poli et al. 2009; Guimaraes et al. 1990; Resstel et al. 2006; Zuardi et al. 1993). The brain sites and mechanism related to these anxiolytic effects, however, are still poorly understood.

Systemic treatment with CBD was able to attenuate the expression of contextual fear conditioning and the associated increase in neuronal activation (measured by cFos expression) in the bed nucleus of the stria terminalis (BNST) (Lemos et al. 2010). Similar effects were observed after intra-BNST injection of CBD (Gomes, Guimaraes and Resstel, unpublished data). Together these results suggest that the BNST could be involved in the anxiolytic-like effects induced by CBD.

The BNST is a limbic structure proposed to be critically involved in the expression of anxiety-related autonomic, neuroendocrine, and behavioral responses (Casada and Dafny 1991; Dunn 1987; Dunn and Williams 1995; Davis

F. V. Gomes · L. B. M. Resstel · F. S. Guimarães (✉)
Department of Pharmacology, School of Medicine,
University of São Paulo,
Bandeirantes Avenue 3900,
Ribeirão Preto, São Paulo 14049-900, Brazil
e-mail: fsguimar@fmrp.usp.br

et al. 2010; Walker et al. 2003). Reversible inactivation of the BNST, for example, induces anxiolytic-like effects in rats submitted to contextual fear conditioning and Vogel conflict test (VCT) (Resstel et al. 2008). There are, however, inconsistent results in the literature regarding the role of this region in anxiety, which may reflect the different experimental paradigms used (Treit et al. 1998; Waddell et al. 2006).

The elevated plus-maze (EPM) and the VCT are widely used animal models of anxiety based on distinct theoretical constructs, exploratory behavior (Carobrez and Bertoglio 2005), and suppression of punished responses (Millan 2003; Millan and Brocco 2003), respectively. Since systemic administration of CBD reduces anxiety in rats submitted to these two models (Guimaraes et al. 1990; Moreira et al. 2006), the present study investigated if these effects could involve the BNST. Also, considering that the anxiolytic effects of CBD have been related to the activation of 5-HT_{1A} receptors (Campos and Guimaraes 2008; Resstel et al. 2009), we also tested if these effects would be inhibited by local pretreatment with WAY100635, a 5-HT_{1A} receptor antagonist.

Materials and methods

Animals

The experiments were performed with male Wistar rats weighing 230–270 g at the beginning of the experiments. The animals were housed in groups of four per cage (41×33×17 cm) in a temperature-controlled room (24±1°C) under standard laboratory conditions with free access to food and water and a 12 h light/dark cycle (lights on at 06:30 A.M.). Procedures were conducted in conformity with the Brazilian Society of Neuroscience and Behavior guidelines for the care and use of laboratory animals, which are in compliance with international laws and politics. The Institution's Animal Ethics Committee approved the housing conditions and experimental procedures (process number: 88/2009).

Stereotaxic surgery

Seven days before the experiment, the rats were anesthetized with 2,2,2-tribromoethanol (250 mg/kg, i.p., Sigma-Aldrich, USA) and fixed in a stereotaxic frame (Stoelting, USA). After scalp anesthesia with 2% lidocaine, the skull was surgically exposed and stainless steel guide cannulae (26G) were implanted bilaterally into the BNST (anteroposterior = −0.4 mm from bregma; lateral = 4.0 mm from the medial suture, vertical = −5.5 mm from the skull with a lateral inclination of 23°; Paxinos and Watson 1997). Cannulae were fixed to the skull with dental cement and a

metal screw. An obturator inside the guide cannulae prevented obstruction. After surgery, the animals received a polyantibiotic (0.27 g/kg, i.m.; Pentabiotico®, Fort Dodge, Brazil) to prevent infection and a nonsteroidal anti-inflammatory (0.025 g/kg, s.c.; Banamine®, Schering Plough, Brazil) for post-operative analgesia.

Apparatus

Elevated plus maze

The EPM consisted of two opposite wooden open arms (50×10 cm), crossed at right angle by two arms of the same dimensions enclosed by 40-cm-high walls with no roof. The maze was located 50 cm above the floor and a 1-cm-high edge made of Plexiglas surrounded the open arms to prevent falls. It was located in a sound-attenuated, temperature-controlled (24±1°C) room and the environment was illuminated by one 40-W fluorescent light placed 3 m away from the EPM. The Any-Maze software (Stoelting, USA) was employed for behavioral analysis in the EPM. It detects the position of the animal in the maze and calculates the number of entries and time spent in open and enclosed arms. Each session lasted for 5 min, and after each trial, the maze was cleaned with an alcohol solution (Campos and Guimaraes 2008).

Vogel conflict test

The VCT was performed in a Plexiglas box (42×25×20 cm) with a stainless grid floor. A metallic spout of a drinking bottle containing water was 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 seven pulses per second 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 shock 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 (Moreira et al. 2006).

Water consummatory evaluation

The apparatus was the same used in the test described above; however, the electric shock delivering system was rendered inoperative.

Tail flick test

To control for possible antinociceptive drug effects that could interfere in the VCT, the animals were also

submitted to the tail flick test. The apparatus consisted of an acrylic platform with a nichrome wire coil maintained at room temperature ($24 \pm 1^\circ\text{C}$). 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 cutoff 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.

Drugs

CBD (kindly supplied by THC Pharm, Germany) was dissolved in grape seed oil (Campos and Guimaraes 2008). The 5-HT_{1A} receptor antagonist WAY100635 (Sigma-Aldrich, USA) and morphine hydrochloride (Merck, USA) was dissolved in saline. The solutions were prepared immediately before the tests and protected from the light during the experimental sessions.

Procedure

Intra-BNST injection

Seven days after surgery, the animals were randomly assigned to one of the treatment groups. Intracerebral injections were performed with a thin dental needle (30G 0.3 mm OD; Terumo Dental Needle®, Brazil) introduced through the guide cannula until its tip was 1 mm below the cannula end, connected to a 10 μL syringe (7,001 KH, Hamilton Co., USA) through a PE10 tubing. The needles were carefully inserted into the guide cannulae, and a volume of 0.2 μL was injected over a 30-s period with a rate of 0.4 $\mu\text{L}/\text{min}$ with the help of an infusion pump (Kd Scientific Inc., USA). A polyethylene catheter (PE10) was interposed between the upper end of the dental needle and the syringe and the successful infusions were confirmed through the movement of air bubble in the PE catheter. In order to prevent reflux, the needles were left in place for a 45–60-s period after the end of each injection.

Experiment 1: intra-BNST CBD effects in rats submitted to the EPM

The rats received intra-BNST bilateral injections of vehicle or CBD (15, 30, or 60 nmol; the doses were based on those employed by Campos and Guimaraes 2008) and 10 min later were placed in the center of the EPM facing an enclosed arm. The number of entries and time spent in the open and enclosed arms were recorded for 5 min.

Experiment 2: intra-BNST CBD effects in rats submitted to the VCT

An independent group of animals was water-deprived for 48 h before the test. After the first 24 h of deprivation, they were allowed to freely drink 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, they received intra-BNST bilateral injections of vehicle or CBD (15, 30, or 60 nmol) and 10 min later were placed inside the apparatus. The test period lasted for 3 min, and the animals received a 0.5-mA shock through the bottle spout every 20 licks. The number of punished licks was registered. The procedure was similar to the one already used and validated in the laboratory (Moreira et al. 2006).

Experiment 3: intra-BNST CBD effects on the water consumption test

This test was performed in an independent group of animals and the procedure was the same as that used in the punished licking test; however, the electric shock delivering system was rendered inoperative. Ten minutes after vehicle or CBD (30 or 60 nmol) injection, the rats were allowed to freely drink for 3 min. The number of licks during this period was registered.

Experiment 4: intra-BNST CBD effects on the tail flick test

The tail flick test was conducted in independent groups of animals receiving vehicle, CBD, or morphine. The procedure was similar to the one already used and validated in the laboratory (Moreira et al. 2006). Briefly, the animals were gently handled and their tails were laid across a heating coil. The time to withdraw the tail was recorded as tail flick latency, which was measured at 5-min intervals until a stable baseline was obtained over three consecutive trials. After drug administration, the tail withdrawal latency was measured again at 10-min intervals for up to 40 min. Vehicle and CBD (30 or 60 nmol) were bilaterally injected into the BNST whereas the positive control, morphine, was administered systemically (5 mg/kg, i.p.).

Experiment 5: effects of pretreatment with the 5-HT_{1A} receptor antagonist WAY100635 on CBD effects in the EPM

The animals received intra-BNST injections of vehicle or WAY100635 (0.37 nmol) followed, 5 min later, by vehicle or CBD (60 nmol). Ten minutes after the second injection, the animals were submitted to the EPM test. The dose of

WAY100635 was chosen based on previous studies using intra-BNST injections (Alves et al. 2010).

Experiment 6: effects of pretreatment with WAY100635 on the CBD effects in the VCT

The protocol was similar to that of experiment 2 except that the animals received intra-BNST injections of saline or the 5-HT_{1A} receptor antagonist WAY100635 (0.37 nmol) followed, 5 min later, by a second injection of vehicle or CBD (30 nmol). Ten minutes after the last injection, the animals were submitted to the VCT.

Histological procedure

At the end of the experiments, the rats were anesthetized with urethane (1.25 g/kg i.p., Sigma-Aldrich, USA) and 0.2 µL of 1% Evans Blue dye was bilaterally injected into the BNST as an injection site marker. The chest was surgically opened, the descending aorta occluded, the right atrium severed, and the brain perfused with 10% formalin through the left ventricle. Brains were post-fixed for 24 h at 4°C, and 40-µm sections were cut using a cryostat (CM-1900, Leica, Germany). Serial brain sections were stained with 1% Neutral Red. The injection sites were located using the rat brain atlas of Paxinos and Watson

(1997). Rats receiving injections of the active dose of CBD outside the BNST were included in an additional group (OUT).

Statistical analysis

The percentages of entries and time spent in the open arms ($100 \times \text{open}/(\text{open} + \text{enclosed})$) during the 5-min sessions in the EPM were calculated for each animal. These results, the number of enclosed arm entries, and the number of licks in the VCT were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA). Data from the tail flick experiment were analyzed by a repeated-measures ANOVA followed by one-way ANOVAs at each time interval in case of significant interactions. Experiments 5 and 6 were also analyzed by two-way ANOVA using the first (WAY100635 or saline) and the second (CBD or vehicle) injections as main factors. Post-hoc analysis was performed using the Bonferroni test. Differences were considered significant at $P < 0.05$ level.

Results

Diagrammatic representations showing the bilateral injection sites in the BNST and a representative photomicrograph are presented in Fig. 1.

Fig. 1 Photomicrograph of a coronal brain section from a representative rat showing bilateral injection sites into the BNST and diagrammatic representation based on the rat brain atlas of Paxinos and Watson (1997), indicating the injection sites into (black circles) and outside (white circles) the BNST of all the animals used in the experiments. *IA* interaural coordinate; *ac* anterior commissure; *cc* corpus callosum; *f* fornix; *ic* internal capsule; *LV* lateral ventricle; *LSV* lateral septal ventral; *st* stria terminalis

Experiment 1: intra-BNST CBD effects in rats submitted to the EPM

As seen in Fig. 2, CBD (60 nmol) significantly increased the percentage of entries ($F_{4,30}=4.63$, $P<0.01$; Bonferroni test, $P<0.01$) and time spent ($F_{4,30}=3.41$, $P<0.05$; Bonferroni test, $P<0.05$) in the open arms of the EPM as compared to control animals. Animals receiving the active dose of CBD (60 nmol) outside the BNST (OUT) were not different from controls (Bonferroni test, $P>0.05$). No effects on the number of enclosed arms entries were found, suggesting that CBD are not affecting basal motor activity ($F_{4,30}=0.53$, $P>0.05$).

Experiment 2: intra-BNST CBD effects in rats submitted to the VCT

In accordance with the previous experiment, an anxiolytic-like effect was also observed. In this experiment, CBD (30 and 60 nmol) injection into the BNST increased the number of punished licks ($F_{4,34}=6.99$, $P<0.001$; Bonferroni test, $P<0.05$) in the VCT as compared to the vehicle-treated group (Fig. 3). Moreover, animals receiving the active dose

Fig. 2 Anxiolytic-like effect of CBD (15, 30, or 60 nmol) injected into the BNST of rats submitted to the EPM. Columns represent the means±SEM. The upper panel shows the number of entries into the enclosed arms whereas the lower panel shows the percentage of entries (white columns) and the time spent (black columns) in the open arms. Animals receiving CBD (60 nmol) injections outside the BNST were joined in an additional group (OUT). Asterisks indicate significant difference from vehicle (VEH, $P<0.05$, ANOVA followed by the Bonferroni's *post hoc* test; $n=8, 7, 8, 7, 5$, respectively)

Fig. 3 Effects of CBD (15, 30, or 60 nmol) or vehicle injected into the BNST of rats submitted to the VCT. Columns represent the means±SEM total number of punished licks in the 3-min session. Animals receiving CBD (30 nmol) injections outside the BNST were joined together in an additional group (OUT). Asterisks indicate significant difference from vehicle (VEH, $P<0.05$, ANOVA followed by the Bonferroni's *post hoc* test; $n=9, 8, 8, 8, 6$, respectively)

of CBD (30 nmol) outside the BNST (OUT) were not different from controls (Bonferroni test, $P>0.05$).

Experiments 3 and 4: intra-BNST CBD effects on water consumption and tail flick test

These experiments were performed to test whether CBD injected into the BNST would increase water consumption or nociceptive responses, which are potential confounding factors in the VCT. In experiment 3, CBD (30 and 60 nmol) did not change the number of unpunished licks compared to vehicle ($F_{2,12}=0.69$, $P>0.05$; Table 1). In experiment 4, only morphine, the positive control, increased the withdrawal latency in the tail flick test (drug factor, $F_{3,15}=57.23$, $P<0.001$; time factor, $F_{6,10}=32.73$, $P<0.001$; drug × time interaction, $F_{18,26}=25.60$, $P<0.001$; Bonferroni test, $P<0.05$; Fig. 4).

Experiment 5: effects of pretreatment with the 5-HT1A receptor antagonist WAY100635 on CBD effects in the EPM

Similar to experiment 1, CBD (60 nmol) increased the percentage of entries ($F_{3,26}=7.08$, $P<0.001$; Bonferroni

Table 1 Effects of intra-BNST administration of CBD (30 and 60 nmol) on the number of unpunished licks of rats that had been water-deprived for 48 h

Treatment	Unpunished licks
Vehicle	1,073±46
CBD, 30 nmol	1,034±35
CBD, 60 nmol	1,114±59

The values in the table represent the means±SEM ($n=5$ /group). No significant effect was found

Fig. 4 Time course for the effects of vehicle, CBD (30 or 60 nmol), or morphine (5 mg/kg, i.p.) in the tail flick test. Each point represents the mean±SEM for the latency of tail withdrawal. The asterisk indicates significant difference from vehicle (VEH, $P<0.05$, ANOVA followed by the Bonferroni's *post hoc* test; $n=5, 5, 5, 4$, respectively)

test, $P<0.05$ compared to all groups) and time spent in the open arms ($F_{3,26}=3.37$, $P<0.05$; Bonferroni test, $P<0.05$ compared to control group) without changing the number of enclosed arms entries ($F_{3,26}=0.40$, $P>0.05$, data not shown). No effect on the percentage of entries and time spent in the open arms was found in animals treated only with WAY100635 (Bonferroni test, $P>0.05$). This drug, however, was able to prevent the effects of CBD (first versus second injection interaction, $F_{1,26}=5.16$, $P<0.05$; Bonferroni test, $P>0.05$ compared to control group; Fig. 5).

Fig. 5 Effect of bilateral pretreatment with saline (VEH) or WAY100635 (WAY, 0.37 nmol) followed by a second injection of vehicle or CBD (60 nmol) into the BNST of rats submitted to EPM. Columns represent the means±SEM. The white columns represent the percent of entries onto the open arms, while the black columns represent the percent of the time spent in the open arms. The asterisk represents statistical differences from control group ($P<0.05$, ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test; $n=6, 6, 9, 9$, respectively)

Experiment 6: effects of pretreatment with WAY100635 on CBD effects in the VCT

Confirming results from experiment 2, CBD (30 nmol) increased the number of punished licks ($F_{3,30}=11.86$, $P<0.001$; Bonferroni test, $P<0.01$ compared to all groups). No effect was found in animals treated only with WAY100635 (Bonferroni test, $P>0.05$) but this drug was able to prevent the effects of CBD (first versus second injection interaction, $F_{1,30}=12.33$, $P<0.01$; Bonferroni test, $P>0.05$ compared to control group; Fig. 6).

Discussion

The present study showed that local injection of CBD into the BNST induces anxiolytic-like effects in two conceptually distinct animal models of anxiety, the EPM and the VCT. Although both tests are widely employed as behavioral models of anxiety, they are based on different aversive contingencies that could engage distinct neurobiological systems. Whereas the EPM is related to the natural aversion that rodents have for elevated and open spaces (Carobrez and Bertoglio 2005), the VCT involves the suppression of punished responses (Millan 2003; Millan and Brocco 2003). CBD did not change enclosed arms exploration in the EPM nor tail flick latency or the number of unpunished licks in the VCT, suggesting a specific anxiolytic-like effect. Hence, our results are in agreement with previous works showing that systemic administration of CBD produces anxiolytic-like effects in rats submitted to the EPM (Guimaraes et al. 1990) and VCT (Moreira et al. 2006). They also agree with the observation that CBD injected into the BNST attenuates conditioned fear responses (Gomes, Guimaraes and

Fig. 6 Effect of bilateral pretreatment with saline (VEH) or WAY100635 (WAY, 0.37 nmol) followed by a second injection of vehicle or CBD (30 nmol) into the BNST of rats submitted to the Vogel conflict test. Columns represent the means±SEM total number of punished licks in the 3-min session. The asterisk indicates significant difference from control group ($P<0.05$, ANOVA followed by the Bonferroni's *post hoc* test; $n=8, 9, 9, 8$, respectively)

Resstel, unpublished data) and modulates the parasympathetic component of baroreflex (Alves et al. 2010). Moreover, similar to the BNST, intra-dorsolateral periaqueductal gray (dlPAG) administration of CBD induced anxiolytic-like effects in the EPM and VCT models. Together these findings indicate that the BNST and the dlPAG could be structures related to the anxiolytic effects of systemically administered CBD.

The BNST has been proposed to play a special role in anxiety as opposed to fear (Walker et al. 2003). There are, however, conflicting results regarding its involvement in these behaviors. Treit et al. (1998), for example, failed to find any effect of BNST lesion in the EPM and the shock-probe burying tests whereas Resstel et al. (2008) showed that its reversible inactivation attenuates conditioned emotional responses and causes anxiolytic effects in the VCT. The reasons for these contradictory results are not clear but could involve the different animal models used or methodological differences in the lesions employed. Nevertheless, the present results reinforce the proposal that the BNST could play a crucial role on anxiety modulation.

CBD can produce its effects through multiple pharmacological mechanisms (Izzo et al. 2009). It has a low affinity for cannabinoid receptors (Petitet et al. 1998; Thomas et al. 1998) but can facilitate endocannabinoid signaling through their ability to inhibit the cellular reuptake and hydrolysis of endocannabinoid anandamide (Bisogno et al. 2001). In addition, Russo et al. (2005) reported that CBD can displace the 5-HT_{1A} receptor agonist [3H]8-OH-DPAT from cloned human 5-HT_{1A} receptors expressed in Chinese hamster ovary cultured cells and acts as an agonist at these receptors.

Brain 5-HT_{1A} receptors are located presynaptically in cell bodies in the raphe nuclei of the brain stem and postsynaptically in several limbic structures, including the BNST (Barnes and Sharp 1999; Chalmers and Watson 1991; Phelix et al. 1992; Verge et al. 1985). This receptor is thought to play an important role in the pathophysiology of anxiety disorders. Systemic administration of 5-HT_{1A} receptor agonist 8-OH-DPAT produces anxiolytic effects in rats submitted to the VCT (Engel et al. 1984) and the partial 5-HT_{1A} receptor agonist buspirone is used clinically to treat generalized anxiety disorder (Rickels and Rynn 2002). Moreover, 5-HT_{1A} receptor knockout mice display increased anxiety-related behavior (Heisler et al. 1998; Parks et al. 1998; Ramboz et al. 1998), a phenotype that has been attributed to the receptor absence during development (Gross et al. 2002).

The BNST receives dense innervations from serotonergic afferents from caudal regions of the dorsal raphe nucleus (Commons et al. 2003; Lowry et al. 2008) and expresses several subtypes of serotonin (5-HT) receptors (Heidmann et al. 1998; Mengod et al. 1990; Pompeiano et al. 1994; Xu and Pandey 2000), with the 5-HT_{1A} subtype being one of

the most prevalent (Guo et al. 2009). In addition, 5-HT elicits inhibitory responses in BNST neurons that are mediated by activation of postsynaptic 5-HT_{1A} receptors (Levita et al. 2004; Rainnie 1999) and local infusion of the 5-HT_{1A} receptor agonist 5-carboxyamidotryptamine (5-CT) attenuates acoustic startle responses in rats (Levita et al. 2004).

In agreement with these results, BNST injections of the 5-HT_{1A} receptor antagonist WAY100635 prevented the anxiolytic-like effects of CBD in rats submitted to the EPM and VCT. Similar antagonism has been observed in anxiety and depression models after systemic or intra-dlPAG CBD administration (Campos and Guimaraes 2008; Resstel et al. 2009; Soares et al. 2010; Zanelati et al. 2010). These results, therefore, suggest that 5-HT_{1A} receptor activation could be responsible for the anxiolytic effects of CBD injected into the BNST. Systemic administration of WAY100635, however, has been shown to induce anxiolytic-like effects after systemic administration (Griebel et al. 1999, 2000). The interpretation of these results, however, is complicated by the pre- and postsynaptic localization of 5-HT_{1A} receptors, with a predominant action on the former leading to an actual increase in 5-HT-mediated neurotransmission (Barnes and Sharp 1999). Also, postsynaptic 5-HT_{1A} receptors in the central nucleus of the amygdala (CeA) have been shown to regulate the release of 5-HT in both the CeA and the caudal linear raphe nucleus (Bosker et al. 1997). Since the BNST can regulate amygdala activity (Alheid 2003), the present results could also involve a feedback regulation of 5-HT release.

Taken together, these pieces of evidence indicate that the present results could be related to local circuitry effects rather than reflecting a general 5-HT_{1A} receptor role on anxiety modulation. In this way, activation of postsynaptic 5-HT_{1A} receptors have also been shown to cause anxiolytic effects in other brain regions related to defensive behaviors, including the amygdala, dorsal PAG, and the BNST (Zangrossi et al. 1999; Zanoveli et al. 2003; Levita et al. 2004).

In conclusion, the present results indicate that the BNST could be involved in the anxiolytic-like effects observed after the systemic administration of CBD and that the local effects of this drug depend on the facilitation of 5-HT_{1A} receptor-mediated neurotransmission.

Acknowledgements The authors thank THC Pharm for having kindly donated CBD; Ivanilda A.C. Fortunato and J.C. de Aguiar for technical support. FV Gomes has a CNPq MsC fellowship (130171/2009-3). This research was also supported by grants from FAPESP (2009/03187-9 and 2007/03685-3), CNPq (480550/2007-7 and 305996/2008-8), and FAEPA.

Conflicts of interest The authors declare no conflicts of interest.

References

- Alheid GF (2003) Extended amygdala and basal forebrain. *Ann NY Acad Sci* 985:185–205
- Alves FHF, Crestani CC, Gomes FV, Guimaraes FS, Correa FMA, Resstel LBM (2010) Cannabidiol injected into the bed nucleus of the stria terminalis modulates the baroreflex activity through 5-HT_{1A} receptors. *Pharmacol Res* 62:228–236
- Barnes NM, Sharp T (1999) A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* 38:1083–1152
- Bisogno T, Hanus L, De Petrocellis L, Tchilibon S, Ponde DE, Brandi I, Moriello AS, Davis JB, Mechoulam R, Di Marzo V (2001) Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR₁ receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. *Br J Pharmacol* 134:845–852
- Bosker FJ, Klompmakers A, Westenberg HGM (1997) Postsynaptic 5-HT_{1A} receptors mediate 5-hydroxytryptamine release in the amygdala through a feedback to the caudal linear raphe. *Eur J Pharmacol* 333:147–157
- Campos AC, Guimaraes FS (2008) Involvement of 5HT_{1A} receptors in the anxiolytic-like effects of cannabidiol injected into the dorsolateral periaqueductal gray of rats. *Psychopharmacol (Berl)* 199:223–230
- Carobrez AP, Bertoglio LJ (2005) Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neurosci Biobehav Rev* 29:1193–1205
- Casada JH, Dafny N (1991) Restraint and stimulation of bed nucleus of the stria terminalis produce similar stress-like behaviors. *Brain Res Bull* 27:207–212
- Chalmers DT, Watson SJ (1991) Comparative anatomical distribution of 5-HT_{1A} receptor mRNA and 5-HT_{1A} binding in rat brain—a combined in situ hybridisation/in vitro receptor autoradiographic study. *Brain Res* 561:51–60
- Commons KG, Connolly KR, Valentino RJ (2003) A neurochemically distinct dorsal raphe-limbic circuit with a potential role in affective disorders. *Neuropsychopharmacology* 28:206–215
- Crippa JA, Zuardi AW, Garrido GE, Wichert-Ana L, Guarnieri R, Ferrari L, Azevedo-Marques PM, Hallak JE, McGuire PK, Filho Busatto G (2004) Effects of cannabidiol (CBD) on regional cerebral blood flow. *Neuropsychopharmacology* 29:417–426
- Davis M, Walker DL, Miles L, Grillon C (2010) Phasic vs sustained fear in rats and humans: role of the extended amygdala in fear vs anxiety. *Neuropsychopharmacology* 35:105–135
- Dunn JD (1987) Plasma corticosterone responses to electrical stimulation of the bed nucleus of the stria terminalis. *Brain Res* 407:327–331
- Dunn JD, Williams TJ (1995) Cardiovascular responses to electrical stimulation of the bed nucleus of the stria terminalis. *J Comp Neurol* 352:227–234
- Engel JA, Hjorth S, Svensson K, Carlsson A, Liljequist S (1984) Anticonflict effect of the putative serotonin receptor agonist 8-hydroxy-2-(di-*n*-propylamino)tetralin (8-OH-DPAT). *Eur J Pharmacol* 105:365–368
- Fusar-Poli P, Crippa JA, Bhattacharyya S, Borgwardt SJ, Allen P, Martin-Santos R, Seal M, Surguladze SA, O'Carroll C, Atakan Z, Zuardi AW, McGuire PK (2009) Distinct effects of {delta}9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol on neural activation during emotional processing. *Arch Gen Psychiatry* 66:95–105
- Griebel G, Rodgers RJ, Perrault G, Sanger DJ (1999) Behavioural profiles in the mouse defence test battery suggest anxiolytic potential of 5-HT_{1A} receptor antagonists. *Psychopharmacol (Berl)* 144:121–130
- Griebel G, Rodgers RJ, Perrault G, Sanger DJ (2000) The effects of compounds varying in selectivity as 5-HT_{1A} receptor antagonists in three rat models of anxiety. *Neuropharmacology* 39:1848–1857
- Grle L (1976) A comparative study on some chemical and biological characteristics of various samples of cannabis resin. *Bull Narc* 14:37–46
- Gross C, Zhuang X, Stark K, Ramboz S, Oosting R, Kirby L, Santarelli L, Beck S, Hen R (2002) Serotonin_{1A} receptor acts during development to establish normal anxiety-like behaviour in the adult. *Nature* 416:396–400
- Guimaraes FS, Chiaretti TM, Graeff FG, Zuardi AW (1990) Antianxiety effect of cannabidiol in the elevated plus-maze. *Psychopharmacol (Berl)* 100:558–559
- Guo JD, Hammack SE, Hazra R, Levita L, Rainnie DG (2009) Bi-directional modulation of bed nucleus of stria terminalis neurons by 5-HT: molecular expression and functional properties of excitatory 5-HT receptor subtypes. *Neuroscience* 164:1776–1793
- Heidmann DE, Szot P, Kohen R, Hamblin MW (1998) Function and distribution of three rat 5-hydroxytryptamine₇ (5-HT₇) receptor isoforms produced by alternative splicing. *Neuropharmacology* 37:1621–1632
- Heisler LK, Chu HM, Brennan TJ, Danao JA, Bajwa P, Parsons LH, Tecott LH (1998) Elevated anxiety and antidepressant-like responses in serotonin 5-HT_{1A} receptor mutant mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:15049–15054
- Izzo AA, Borrelli F, Capasso R, Di Marzo V, Mechoulam R (2009) Non-psychotropic plant cannabinoids: new therapeutic opportunities from an ancient herb. *Trends Pharmacol Sci* 30:515–527
- Karniol IG, Shirakawa I, Kasinski N, Pfeifferman A, Carlini EA (1974) Cannabidiol interferes with the effects of delta 9—tetrahydrocannabinol in man. *Eur J Pharmacol* 28:172–177
- Lemos JI, Resstel LB, Guimaraes FS (2010) Involvement of the prelimbic prefrontal cortex on cannabidiol-induced attenuation of contextual conditioned fear in rats. *Behav Brain Res* 207:105–111
- Levita L, Hammack SE, Mania I, Li XY, Davis M, Rainnie DG (2004) 5-Hydroxytryptamine_{1A}-like receptor activation in the bed nucleus of the stria terminalis: electrophysiological and behavioral studies. *Neuroscience* 128:583–596
- Lowry CA, Hale MW, Evans AK, Heerkens J, Staub DR, Gasser PJ, Shekhar A (2008) Serotonergic systems, anxiety, and affective disorder: focus on the dorsomedial part of the dorsal raphe nucleus. *Ann NY Acad Sci* 1148:86–94
- Mengod G, Nguyen H, Le H, Waeber C, Lubbert H, Palacios JM (1990) The distribution and cellular localization of the serotonin 1C receptor mRNA in the rodent brain examined by in situ hybridization histochemistry. Comparison with receptor binding distribution. *Neuroscience* 35:577–591
- Millan MJ (2003) The neurobiology and control of anxious states. *Prog Neurobiol* 70:83–244
- Millan MJ, Brocco M (2003) The Vogel conflict test: procedural aspects, gamma-aminobutyric acid, glutamate and monoamines. *Eur J Pharmacol* 463:67–96
- Moreira FA, Aguiar DC, Guimaraes FS (2006) Anxiolytic-like effect of cannabidiol in the rat Vogel conflict test. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 30:1466–1471
- Parks CL, Robinson PS, Sibille E, Shenk T, Toth M (1998) Increased anxiety of mice lacking the serotonin_{1A} receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:10734–10739
- Paxinos G, Watson C (1997) The rat brain in stereotaxic coordinates, 2nd edn. Academic, Sydney
- Petitot F, Jeantaud B, Reibaud M, Imperato A, Dubroeuq MC (1998) Complex pharmacology of natural cannabinoids: evidence for partial agonist activity of delta9-tetrahydrocannabinol and antagonist activity of cannabidiol on rat brain cannabinoid receptors. *Life Sci* 63:PL1–PL6
- Phelix CF, Liposits Z, Paull WK (1992) Serotonin–CRF interaction in the bed nucleus of the stria terminalis: a light microscopic

- double-label immunocytochemical analysis. *Brain Res Bull* 28:943–948
- Pompeiano M, Palacios JM, Mengod G (1994) Distribution of the serotonin 5-HT₂ receptor family mRNAs: comparison between 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors. *Brain Res Mol Brain Res* 23:163–178
- Rainnie DG (1999) Neurons of the bed nucleus of the stria terminalis (BNST). Electrophysiological properties and their response to serotonin. *Ann NY Acad Sci* 877:695–699
- Ramboz S, Oosting R, Amara DA, Kung HF, Blier P, Mendelsohn M, Mann JJ, Brunner D, Hen R (1998) Serotonin receptor 1A knockout: an animal model of anxiety-related disorder. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:14476–14481
- Resstel LB, Joca SR, Moreira FA, Correa FM, Guimaraes FS (2006) Effects of cannabidiol and diazepam on behavioral and cardiovascular responses induced by contextual conditioned fear in rats. *Behav Brain Res* 172:294–298
- Resstel LB, Alves FH, Reis DG, Crestani CC, Correa FM, Guimaraes FS (2008) Anxiolytic-like effects induced by acute reversible inactivation of the bed nucleus of stria terminalis. *Neuroscience* 154:869–876
- Resstel LB, Tavares RF, Lisboa SF, Joca SR, Correa FM, Guimaraes FS (2009) 5-HT_{1A} receptors are involved in the cannabidiol-induced attenuation of behavioural and cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. *Br J Pharmacol* 156:181–188
- Rickels K, Rynn M (2002) Pharmacotherapy of generalized anxiety disorder. *J Clin Psychiatry* 63 (Suppl 14):9–16
- Russo EB, Burnett A, Hall B, Parker KK (2005) Agonistic properties of cannabidiol at 5-HT_{1a} receptors. *Neurochem Res* 30:1037–1043
- Soares VP, Campos AC, Bortoli VC, Zangrossi H Jr, Guimaraes FS, Zuardi AW (2010) Intra-dorsal periaqueductal gray administration of cannabidiol blocks panic-like response by activating 5-HT_{1A} receptors. *Behav Brain Res* 213:225–229
- Thomas BF, Gilliam AF, Burch DF, Roche MJ, Seltzman HH (1998) Comparative receptor binding analyses of cannabinoid agonists and antagonists. *J Pharmacol Exp Ther* 285:285–292
- Treit D, Aujla H, Menard J (1998) Does the bed nucleus of the stria terminalis mediate fear behaviors? *Behav Neurosci* 112:379–386
- Verge D, Daval G, Patey A, Gozlan H, el Mestikawy S, Hamon M (1985) Presynaptic 5-HT autoreceptors on serotonergic cell bodies and/or dendrites but not terminals are of the 5-HT_{1A} subtype. *Eur J Pharmacol* 113:463–464
- Waddell J, Morris RW, Bouton ME (2006) Effects of bed nucleus of the stria terminalis lesions on conditioned anxiety: aversive conditioning with long-duration conditional stimuli and reinstatement of extinguished fear. *Behav Neurosci* 120:324–336
- Walker DL, Toufexis DJ, Davis M (2003) Role of the bed nucleus of the stria terminalis versus the amygdala in fear, stress, and anxiety. *Eur J Pharmacol* 463:199–216
- Xu T, Pandey SC (2000) Cellular localization of serotonin(2A) (5HT_{2A}) receptors in the rat brain. *Brain Res Bull* 51:499–505
- Zanelati TV, Biojone C, Moreira FA, Guimaraes FS, Joca SR (2010) Antidepressant-like effects of cannabidiol in mice: possible involvement of 5-HT_{1A} receptors. *Br J Pharmacol* 159:122–128
- Zangrossi H Jr, Viana MB, Graeff FG (1999) Anxiolytic effect of intra-amygdala injection of midazolam and 8-hydroxy-2-(di-*n*-propylamino)tetralin in the elevated T-maze. *Eur J Pharmacol* 369:267–270
- Zanoveli JM, Nogueira RL, Zangrossi H Jr (2003) Serotonin in the dorsal periaqueductal gray modulates inhibitory avoidance and one-way escape behaviors in the elevated T-maze. *Eur J Pharmacol* 473:153–161
- Zuardi AW (2008) Cannabidiol: from an inactive cannabinoid to a drug with wide spectrum of action. *Rev Bras Psiquiatr* 30:271–280
- Zuardi AW, Shirakawa I, Finkelfarb E, Karniol IG (1982) Action of cannabidiol on the anxiety and other effects produced by delta 9-THC in normal subjects. *Psychopharmacol (Berl)* 76:245–250
- Zuardi AW, Cosme RA, Graeff FG, Guimaraes FS (1993) Effects of ipsapirone and cannabidiol on human experimental anxiety. *J Psychopharmacol* 7:82–88