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

TAYLLON DOS ANJOS GARCIA

Envolvimento de vias mediadas por endocanabinoides na modulação do comportamento de defesa induzido pelo bloqueio de receptores GABA_A na divisão dorso-medial do hipotálamo ventro-medial: papel do receptor CB₁

**RIBEIRÃO PRETO - SP
2014**

TAYLLON DOS ANJOS GARCIA

Envolvimento de vias mediadas por endocanabinoides na modulação do comportamento de defesa induzido pelo bloqueio de receptores GABA_A na divisão dorso-medial do hipotálamo ventro-medial: papel do receptor CB₁

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

Área de Concentração: Ciências Biológicas – Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Norberto Cysne Coimbra

**RIBEIRÃO PRETO - SP
2014**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Dos ANJOS-GARCIA, Tayllon

Envolvimento de vias mediadas por endocanabinoides na modulação do comportamento de defesa induzido pelo bloqueio de receptores GABA_A na divisão dorso-medial do hipotálamo ventro-medial: papel do receptor CB₁. p. 71. 2014.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Coimbra, Norberto Cysne.

1. Endocanabinoides. 2. Receptor GABA_A. 3. Hipotálamo ventro-medial. 4. Comportamento de defesa.

Nome: Dos ANJOS-GARCIA, Tayllon

Título: Envolvimento de vias mediadas por endocanabinoides na modulação do comportamento de defesa induzido pelo bloqueio de receptores GABA_A na divisão dorso-medial do hipotálamo ventro-medial: papel do receptor CB₁

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

Área de Concentração: Ciências Biológicas – Farmacologia.

Aprovado em: _____

Banca examinadora

Prof. Dr. _____ **Instituição:** _____
Julgamento: _____ **Assinatura:** _____

Prof. Dr. _____ **Instituição:** _____
Julgamento: _____ **Assinatura:** _____

Prof. Dr. _____ **Instituição:** _____
Julgamento: _____ **Assinatura:** _____

AGRADECIMENTOS

É difícil nomear e agradecer a todos individualmente. Entretanto, a cada um de vocês gostaria de agradecer pessoalmente, pois bem sei quão significativo foi cada um de seus gestos de apoio assim como as palavras de incentivo a mim destinados. Assim, meus sinceros agradecimentos são direcionados àqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, assim como para meu crescimento profissional e pessoal.

Um abraço a todos vocês!

RESUMO

Dos ANJOS-GARCIA, T.. **Envolvimento de vias mediadas por endocanabinoides na modulação do comportamento de defesa induzido pelo bloqueio de receptores GABA_A na divisão dorso-medial do hipotálamo ventro-medial: papel do receptor CB₁**. 2014. 71 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Os efeitos dos canabinoides em algumas áreas encefálicas que expressam receptores endocanabinoides, como é o caso dos núcleos hipotalâmicos, não são ainda muito bem definidos. Vários estudos têm demonstrado o papel de alguns núcleos hipotalâmicos na organização das reações induzidas pelo medo inato e pelo pânico. As respostas de defesa induzidas pelo medo instintivo caracterizam-se por serem mais elaboradas e dirigidas para algum abrigo ou rota de fuga. O estado de pânico pode ser provocado experimentalmente em animais de laboratório através da diminuição da atividade do sistema GABAérgico. O objetivo deste trabalho foi estudar os padrões comportamentais de fuga elaborada induzidos pelo bloqueio de receptores GABAérgicos do tipo A, com microinjeções intra-hipotalâmicas de bicuculina (BIC), especificamente na divisão dorso-medial do hipotálamo ventro-medial (VMHDM), assim como estabelecer o envolvimento endocanabinoides e o papel do receptor canabinoide do tipo 1 (CB₁) na modulação das respostas defensivas organizadas pelo hipotálamo medial. Os resultados mostraram que a administração prévia de doses intermediárias (5pmol) de anandamida (AEA) atenuaram as respostas defensivas induzidas pela microinjeção intra-VMHDM de bicuculina (40ng), efeito este prevenido pelo pré-tratamento intra-hipotalâmica com antagonista de receptores CB₁. Os resultados indicam que a AEA pode modular os efeitos pró-aversivos da bicuculina no VMHDM por meio do recrutamento de receptores CB₁.

Palavras-chave: endocanabinoides; receptor GABA_A; hipotálamo ventro-medial; comportamento de defesa.

ABSTRACT

Dos ANJOS-GARCIA, T.. **Involvement of endocannabinoid-mediated pathways in the modulation of defensive behaviour induced by the GABA_A receptor blockade in dorsomedial division of ventromedial hypothalamus: role of CB₁ receptor**. 2014. 71 f. Dissertation (*Magister Scientiae degree*) – School of Medicine of Ribeirão Preto of the University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

The effects of cannabinoids in some brain areas that express endocannabinoid receptors, such as some hypothalamic nuclei, are not yet well known. Several studies have demonstrated a role of hypothalamic nuclei in the organisation of behavioural responses induced by innate fear and panic attacks. The defensive responses induced by instinctive fear are more elaborated and oriented toward a burrow or alternative route of escape. Panic-prone states are able to be experimentally induced in laboratory animals decreasing the GABAergic system activity. The aim of this work was to study panic-like elaborated defensive behaviour evoked by GABA_A receptor blockade with bicuculline (BIC) in the dorsomedial division of the ventromedial hypothalamus (VMHDM), we also aimed to establish the involvement of endocannabinoids and the role of CB₁ cannabinoid receptor in the modulation of elaborated defense behavioural responses organised by medial hypothalamus. The results showed that intra-hypothalamic administration of anandamide (AEA) at the intermediate dose (5pmol) attenuated defensive responses induced by intra-VMHDM microinjection of bicuculline (40ng). This effect, however, was prevented by the pre-treatment of VMHDM with the CB₁ receptor antagonist AM251. These results indicate that AEA can modulate the pro-aversive effects of bicuculline into the VMHDM, recruiting CB₁ receptors.

Keywords: endocannabinoid; GABA_A receptor; ventromedial hypothalamus; defensive behaviour.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 Ansiedade.....	10
1.2 Ansiedade normal e patológica.....	10
1.3 Transtornos do pânico.....	10
1.4 Neurobiologia do comportamento defensivo.....	11
1.5 Substratos neurais de defesa	13
1.5 Hipotálamo e defesa.....	15
1.6 Canabinoides.....	16
1.7 Descoberta dos receptores e ligantes endógenos	17
1.7 Canabinoides no controle das respostas comportamentais	18
1.8 Hipótese	20
2 OBJETIVOS	22
2.1 Objetivo Geral.....	22
2.2 Objetivos Específicos	22
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
3.1 Animais	24
3.2 Drogas	25
3.3 Cirurgia	25
3.4 Procedimento experimental	26
3.5 Análise comportamental	27
3.6 Histologia.....	28
3.7 Análise estatística	28
4 RESULTADOS	30
4.1 Histologia.....	30
4.2 Experimento 1	31
4.2.1 Localização dos sítios de injeção	31
4.2.2 Efeitos do pré-tratamento com anandamida (AEA 0,5, 5 e 50 pmol/0,2µl) sobre os comportamentos induzidos pela administração de bicuculina (40 ng/0,2µl) no núcleo dorso-medial do hipotálamo ventro-medial (VMHDM) de ratos	32
4.3 Experimento 2.....	42
4.3.1 Localização dos sítios de injeção	42

4.3.2 Efeitos da administração de anandamida (AEA 5 pmol/0,1µl) sobre os comportamentos induzidos pela administração de bicuculina (40 ng/0,1µl) na presença do AM251 (100 pmol/0,1µl) no núcleo dorso-medial do hipotálamo ventro-medial (VMHDM) de ratos	42
5 DISCUSSÃO	55
6 CONCLUSÃO.....	61
REFERÊNCIAS	63

1 INTRODUÇÃO

1.1 Ansiedade

Ansiedade é uma palavra derivada do grego *Anshein*, que implica em estrangular, oprimir e sufocar; termos que se referem a algumas das sensações vivenciadas por um indivíduo durante o estado de ansiedade (GRAEFF; NETTO; ZANGROSSI, 1998).

Ansiedade é uma emoção semelhante ao medo; porém, este advém de ameaça definida, enquanto que, na ansiedade, a fonte de perigo é incerta ou desconhecida (GRAEFF; GUIMARÃES, 2012), caracterizando-se por um conjunto de manifestações físicas e psíquicas que incluem sentimentos de apreensão, insegurança, alterações comportamentais, neurovegetativas e hormonais (NUTT, 1990).

Além dessas manifestações associadas às emoções, ocorrem tanto na ansiedade quanto no medo, alterações fisiológicas, como ativação simpática, que leva ao aumento da frequência de batimentos e da força de contração do coração (percebido nos pacientes como palpitação), tremores, sudorese e falta de ar (sufocação), acompanhada por hiperventilação. Alterações parassimpáticas também ocorrem, como aumento da secreção gástrica, da motilidade intestinal, micção e defecação (GRAEFF; GUIMARÃES, 2012).

1.2 Ansiedade normal e patológica

A ansiedade pode ser considerada essencial para a execução de certas tarefas, e para um bom desempenho em atividades motoras e cognitivas, assim como se torna necessária para evitar danos físicos ao organismo em situações de perigo iminente. Entretanto, a partir de certa intensidade, o aumento da ansiedade não melhora o desempenho, passando a ser prejudicial ao indivíduo. Assim, a ansiedade assume um caráter adaptativo e é no sentido prejudicial ao indivíduo que surgem os estados de ansiedade que são considerados transtornos psiquiátricos (GRAEFF; GUIMARÃES, 2012).

1.3 Transtornos do pânico

Segundo o Manual de Diagnóstico e Estatística das Doenças Mentais (DSM-V), a ansiedade patológica pode ser classificada em diferentes transtornos, dentre eles o transtorno

do pânico, que pode vir acompanhado ou não de agorafobia. Neste sentido, ataques de pânico podem ser definidos como episódios recorrentes e inesperados de medo, terror, desconforto ou apreensão intensa, geralmente associada a um sentimento de morte ou de perigo iminente e a uma necessidade premente de fuga daquela dada situação. Agorafobia pode ser definida como medo de lugares ou situações em que o paciente possa sentir-se desprotegido ou das quais não possa evadir-se com facilidade. Durante esses ataques, o indivíduo pode apresentar sintomas, tais como falta de ar, palpitações, dor ou desconforto torácico, asfixia ou sufocação e medo de morte ou de enlouquecer ou, ainda, de perder o autocontrole (GRAEFF; GUIMARÃES, 2012).

Evidências experimentais levaram ao melhor entendimento sobre as bases neurais envolvidas na fisiopatologia do transtorno de pânico. Muitos autores têm considerado estes transtornos como o resultado de patologias associadas ao sistema neural que organiza o comportamento de defesa (BLANCHARD; GRIEBEL; BLANCHARD, 2001; GRAEFF, 1994; McNAUGHTON; CORR, 2004; STEIN; BOUWER, 1997), fazendo analogias com as reações de defesa que os animais exibem frente a estímulos aversivos (GRAEFF; GUIMARÃES, 2012).

Assim, associações entre as respostas defensivas apresentadas por animais têm sido propostas para estudarmos essas desordens psiquiátricas (BLANCHARD et al., 1997; BLANCHARD; GRIEBEL; BLANCHARD, 2001; GUIMARÃES-COSTA et al., 2007). Tais associações fundamentam-se em trabalhos experimentais sobre as reações de roedores frente a um predador natural, como o gato, o homem (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988) e serpentes (GUIMARÃES-COSTA et al., 2007; LOBÃO-SOARES et al., 2008; URIBE-MARIÑO et al., 2012).

1.4 Neurobiologia do comportamento defensivo

Os conceitos dos níveis de defesa provêm da análise etoexperimental do comportamento de roedores (BLANCHARD et al., 1997; BLANCHARD; BLANCHARD, 1988). Entretanto, é de suma importância mencionar que Charles Darwin foi o pioneiro no estudo científico das emoções humanas a partir de observações realizadas em outros animais e que foram descritas em seu livro “A expressão das emoções no homem e nos animais”, publicado em 1872. Darwin observou certa semelhança nas expressões comportamentais, como medo e raiva, entre indivíduos de diferentes espécies e concluiu que esses

comportamentos têm uma conotação inata que pode sofrer evoluções juntamente com as demais características das espécies.

Como mencionado anteriormente, o medo e a ansiedade são emoções que apresentam certo valor adaptativo. Essas emoções surgem nas reações de defesa que os animais exibem diante de ameaças, as quais podem comprometer a integridade física ou a própria sobrevivência da espécie (DEAKIN; GRAEFF, 1991).

Mediante algum tipo de ameaça, os animais geralmente utilizam algumas das estratégias comportamentais básicas de defesa, como alerta, imobilidade, fuga e, por fim, ataque defensivo ou submissão. A escolha da estratégia correta leva em consideração as características do ambiente, a existência de rota de fuga ou não, distância do estímulo ameaçador e a experiência prévia com o estímulo (ADAMS, 1979; BLANCHARD; BLANCHARD, 1988).

Em situações potencialmente perigosas, o animal exibe um comportamento exploratório cauteloso e/ou uma inibição comportamental. Esse comportamento cauteloso foi denominado “*risk assessment behaviour*” ou comportamento de avaliação de risco, no qual o animal mantém o corpo estendido, com o ventre raste ao solo, avançando e recuando a cabeça repetidamente e, ao menor sinal de perigo, reage com uma intensidade bem maior do que reagiria em situações seguras. Nessas situações, ocorrem movimentos exploratórios cautelosos, com posturas e movimentos do corpo que possibilitam a aproximação e a investigação da possível ameaça. Por outro lado, em situações de perigo real, porém, distante do animal, a reação típica apresentada pelos ratos é o “*freezing*” ou imobilidade defensiva, caracterizada por imobilidade do corpo acompanhada por pelo menos duas das seguintes reações autonômicas: urina, defecação, piloereção ou exoftalmia. Quando o perigo está a uma distância considerável do animal, ele pode apresentar comportamento de escape ou esquiva da situação. Em situações onde o perigo é real e próximo do animal, a reação típica apresentada pelos ratos é de posturas e vocalizações ameaçadoras; caso essas posturas e vocalizações não sejam suficientes para impedir o ataque do agressor, ocorre a fuga e, se esta for impossível, resta-lhes a luta defensiva (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988).

Sobre esses ataques, os Blanchard descrevem, ainda, a diferença entre o ataque defensivo e ofensivo. No primeiro, o ataque ocorre através de saltos e mordidas em direção ao focinho do oponente, característico de animais selvagens. Já o ataque ofensivo é lateral e dirigido para as costas do oponente; caracteristicamente, o animal assume uma postura ereta “boxeando” o oponente (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988).

Os comportamentos exibidos em situações que permitem aproximação em direção ao estímulo aversivo (avaliação de risco e inibição comportamental) estariam relacionados à ansiedade; nesse caso, as repostas comportamentais seriam reduzidas por drogas ansiolíticas. Por outro lado, comportamentos relacionados às situações que exigem estratégias defensivas frente a um determinado estímulo (fuga e imobilidade defensiva) estariam relacionados ao medo. Essas repostas comportamentais tendem a ser suscetíveis a drogas panicolíticas e insensíveis a drogas ansiolíticas (BLANCHARD et al., 1997; McNAUGHTON; CORR, 2004).

Assim, modelos experimentais de medo e ansiedade nos permitem estudar as expressões comportamentais defensivas exibidas pelos animais frente às mais diversas situações aversivas (BLANCHARD et al., 1993). E, diante desse conhecimento, é possível explorar o substrato neural envolvido em cada um desses comportamentos (GRAEFF; GUIMARÃES, 2012).

1.5 Substratos neurais de defesa

Algumas estruturas encefálicas têm sido implicadas nos comportamentos defensivos descritos acima. Estudos clássicos (HESS; BRUGER, 1943) demonstraram o envolvimento de redes neurais do sistema límbico envolvidas na organização das emoções, através de um estudo com estimulação elétrica do hipotálamo de gatos, onde o animal apresentava comportamentos defensivos, semelhante à exposição a um predador.

Grandes avanços na compreensão desses transtornos vêm sendo obtidos através de estudos com estimulação elétrica (COIMBRA et al., 1998; EICHENBERGER et al., 2002; OSAKI et al., 2003; RIBEIRO et al., 2005;) e química (BRANDÃO et al., 1988; CARDOSO et al., 1994; EICHENBERGER et al., 2002) de determinadas estruturas encefálicas.

A estimulação elétrica de áreas encefálicas de ratos que eliciam respostas associadas ao pânico, induz comportamentos nos animais caracterizados por alerta seguido de congelamento ou imobilidade defensiva e fuga (COIMBRA et al., 1996, 1998).

Diferentemente da estimulação elétrica que pode tanto excitar corpos celulares quanto fibras de passagem, a microinjeção de drogas excitatórias e inibitórias permite a ativação somente nos corpos celulares dos neurônios, por isso esse método de estimulação química tem sido empregado com sucesso e contribuído bastante para o estudo de neurônios

que regulam determinados comportamentos (GOODCHILD; DAMPNEY; BANDLER, 1982).

A ativação neuronal aumenta a transcrição gênica para a proteína Fos que é passível de identificação através de técnicas de imuno-histoquímica. Assim, é possível localizar estruturas encefálicas ativadas mediante um determinado estímulo e mapear os substratos neurais envolvidos nos comportamentos defensivos (GRAEFF; GUIMARÃES, 2012).

Essas e outras técnicas, como o neurotraçamento, permitiram descobrir uma vasta conexão entre estruturas com funções límbicas e associá-las de modo a compreender melhor os circuitos neurônicos que controlam o comportamento, como a conhecida ligação funcional e neuroanatômica entre a substância cinzenta periaquedutal dorsal, o hipotálamo medial, o complexo amigdalóide e a área septal lateral. Tais estruturas contemplariam o sistema encefálico envolvido nas respostas defensivas ou o chamado sistema encefálico de defesa (GRAEFF, 1990).

Através de trabalhos com abordagens farmacológicas e comportamentais envolvendo estruturas do sistema encefálico de defesa, foi demonstrado que a administração de aminoácidos excitatórios ou a inibição da neurotransmissão GABAérgica tanto no *tectum* como no dienféalo são capazes de induzir reações defensivas em roedores (BRANDÃO et al., 1982; BRANDÃO et al., 1999; de FREITAS et al., 2013a,b)

Di Scala, Scmitt e Karll (1984) já haviam descrito que microinjeções de bicuculina, um antagonista de receptores GABA_A, na substância cinzenta mesencefálica e no hipotálamo medial induziam reações defensivas. Entretanto, os comportamentos advindos da estimulação do mesencéfalo caracterizavam-se, na maioria das vezes, por saltos explosivos semelhantes a um comportamento motor vigoroso acompanhado de alguns levantamentos. Por outro lado, os comportamentos advindos da estimulação hipotalâmica caracterizavam-se por saltos repetitivos e bem orientados, acompanhados de um alto número de levantamentos, os quais se mostraram correlacionados ao número aumentado de cruzamentos apresentado. Foi proposto, então, que estruturas mesencefálicas dorsais, como a substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPd), desempenham uma importante papel nas respostas rápidas e eficientes de defesa, primeiro engajando o animal em um comportamento de fuga explosiva e, em seguida, após a ativação de regiões hipotalâmicas, um comportamento de defesa mais bem organizado (BRANDÃO et al., 1999; COIMBRA et al., 1996). Dessa forma, o hipotálamo seria a estrutura responsável por integrar essas respostas mais elaboradas em relação às aquelas organizadas pelas estruturas mesencefálicas, tais respostas caracterizam-se pelo aumento,

embora menos intenso, da atividade locomotora intercalada por comportamentos de alerta e tentativas de fuga coordenada e direcionada para um local seguro (BIAGIONI et al., 2013; BIAGIONI; SILVA; COIMBRA, 2012; BRANDÃO et al., 1986; DI SCALA; SCHMITT; KARLI, 1984; de FREITAS et al., 2013a,b; FREITAS et al., 2009).

1.5 Hipotálamo e defesa

As funções do hipotálamo são numerosas e quase todas elas estão relacionadas com a homeostase, de modo que o hipotálamo tem um importante papel regulador sobre o sistema nervoso autônomo e sistema endócrino. Não menos importante dentre suas diversas funções, o hipotálamo, juntamente com o sistema límbico e o córtex pré-frontal, exercem um importante papel na regulação das emoções como raiva, medo e prazer (MACHADO, 2006).

Do ponto de vista anatômico, o hipotálamo faz parte do diencéfalo e se dispõe nas paredes laterais do III ventrículo, abaixo do sulco hipotalâmico, que o separa do tálamo. O hipotálamo apresenta também algumas formações anatômicas visíveis na face inferior do cérebro que incluem o quiasma óptico, o *tuber* cinéreo, o infundíbulo e os corpos mamilares. O hipotálamo pode ser, ainda, dividido em três áreas, periventricular, lateral e medial (MACHADO, 2006).

Em estudos de exposição de ratos a um de seus predadores naturais (gato), técnicas imuno-histoquímicas revelaram certa ativação de redes neuronais em alguns núcleos hipotalâmicos, como o núcleo anterior (AHN), a parte dorsomedial do núcleo ventromedial (VMHDM) e o núcleo pré-mamilar dorsal (dPM) (CANTERAS; RIBEIRO-BARBOSA; COMOLI; 2001). Investigando projeções axoniais e conexões recíprocas entre núcleos hipotalâmicos, observou-se que esses núcleos estão profusamente interconectados, de modo que o AHN e o VMHDM enviam densas projeções para o dPM, o AHN recebe projeções provenientes do VMHDM e do dPM e o VMHDM recebe projeções do AHN (CANTERAS et al., 1997; CANTERAS; RIBEIRO-BARBOSA; COMOLI; 2001).

Nesse sentido, Canteras (2002) propôs a existência de um sistema envolvido na elaboração de respostas defensivas inatas, o qual denominou sistema hipotalâmico medial de defesa.

Baseando-se em pesquisas comportamentais, Shekhar (1993, 1994) em tratamentos farmacológicos direcionados ao hipotálamo dorso-medial, sugeriu a existência de

neurônios relacionados à elaboração de respostas defensivas que se encontrariam sob a inibição tônica do GABA.

O bloqueio dos receptores GABA_A no hipotálamo dorso-medial (DMH), no hipotálamo ventro-medial (VMH) e no hipotálamo posterior (PH) de ratos induz comportamentos defensivos similares aos provocados pela estimulação elétrica dessas estruturas (BIAGIONI et. al., 2013; BIAGIONI; SILVA; COIMBRA, 2012; de FREITAS et al., 2013a,b; FREITAS et al., 2009), sugerindo uma inibição tônica do GABA também nessas áreas. Tais comportamentos são caracterizados por fuga orientada (corridas moderadas, com ou sem saltos) e fuga retrógrada (rápidos movimentos defensivos de cabeça e de patas para trás) além de aumento do número de levantamentos e da atividade locomotora. Além disso, foram observadas alterações nos limiares nociceptivos após essas respostas comportamentais, caracterizando a antinocicepção induzida pelo medo inato (BIAGIONI et al., 2013; BIAGIONI; SILVA; COIMBRA, 2012; de FREITAS et al., 2013a,b; FREITAS et al., 2009).

1.6 Canabinoides

A “marijuana” (*Cannabis sativa*), popularmente chamada de maconha, é uma das mais antigas drogas de abuso utilizada pelo homem. A *Cannabis sativa* tem sido usada em todo o mundo há centenas de anos com fins medicinais e também ilícitos. Esta planta apresenta determinados efeitos considerados positivos, como efeito calmante e antiestresse, bem como efeitos negativos associados ao baixo desempenho acadêmico, problemas legais, desemprego e o risco de desenvolver desordens psiquiátricas (MALDONADO, 2011). Como a maioria das drogas de abuso, o uso da *Cannabis sativa* pode induzir euforia, letargia, confusão, sensação de tempo alterado, prejuízo no desempenho motor, déficit de memória, paranoia, alucinações, tonturas e cefaléias (CURRAN et al., 2002; PERTWEE, 2005). “Canabinoide” foi o nome empregado para designar compostos de hidrocarbonetos aromáticos que ocorrem naturalmente na planta *Cannabis sativa* (ELSOHLY, 2002). Os principais compostos psicoativos desta planta são o Δ^9 -tetra-hidrocanabinol (Δ^9 -THC) e o canabidiol (CBD), e o uso destes possui uma grande controvérsia tanto na sociedade quanto na medicina com respeito à sua utilidade na terapêutica (GAONI; MECHOULAM, 1964; MECHOULAM; HANUS, 2002).

1.7 Descoberta dos receptores e ligantes endógenos

Um grande avanço nas pesquisas utilizando os canabinoides se deu no final da década de 80, após a descoberta de receptores específicos para canabinoides em tecidos de mamíferos. Os canabinoides podem produzir seus efeitos bioquímicos e farmacológicos interagindo principalmente com os receptores CB1 e CB2 (DEVANE et al., 1988; MUNRO; THOMAS; ABU-SHAAR, 1993) que pertencem à superfamília dos receptores acoplados à proteína G, ambos coplados negativamente ($G_{i/o}$). A ativação do receptor CB1 resulta em inibição da enzima adenilato ciclase e consequente redução dos níveis de AMPc bem como inibição dos canais de cálcio e aumento das correntes de potássio (DEMUTH; MOLLEMAN, 2006).

O receptor CB1 é comumente encontrado no sistema nervoso central (HOWLETT et al., 2002), em alta densidade no cerebelo, hipocampo, corpo estriado, córtex cerebral e substância negra (GATLEY et al., 1998; HERKENHAM et al., 1990, 1991; MARSICANO; LUTZ, 1999; MATSUDA; BONNER; LOLAIT, 1993; IVERSEN, 2003), bem como em áreas encefálicas e da medula espinal que participam do processamento de informações motoras e nociceptivas, além da cognição e memória (PERTWEE, 2001; IVERSEN, 2003).

No hipotálamo, o receptor CB1 foi encontrado em quantidades moderadas (PETTIT et al., 1998) quando comparado com as demais estruturas supracitadas; entretanto, o receptor CB1 mostrou-se imunorreativo na região paraventricular e lateral do hipotálamo (TSOU et al., 1998), bem como nos núcleos supraquiasmático, supraóptico, ventro-medial e no hipotálamo posterior (HERKENHAM et al., 1990, 1991). No entanto, o receptor CB1 pode, também, ser encontrado em uma variedade de outros órgãos, como gônadas, coração, útero e intestino delgado (BREIVOGEL; CHILDERS, 1998; PARIA et al., 1998; SCHUEL et al., 1999).

Os receptores CB2 são encontrados principalmente em células e tecidos do sistema imunológico (PERTWEE, 1997; HOWLETT et al., 2002), como o baço, podendo exercer um importante papel imunomodulador (MUNRO; THOMAS; ABU-SHAAR, 1993); porém, foram detectados também no núcleo ventro-medial do hipotálamo (GONG et al., 2006).

Após a descoberta dos receptores para canabinoides, foi demonstrado que os mamíferos produzem agonistas endógenos para estes receptores, os chamados endocanabinoides (DI MARZO et al., 1998; MECHOULAM; FRIDE; DI MARZO, 1998). O primeiro endocanabinoide identificado foi a N-araquidoniletanolamida (anandamida; AEA);

porém, outros compostos estão sendo incluídos nesse grupo, como o 2-araquidonilglicerol (2-AG), o O-araquidonoiletanolamina (virodamine) e o N-araquidonoildopamina (DEVANE et al., 1992; SUGIURA et al., 1995; PORTER et al., 2002; WALKER et al., 2002). Dessa maneira, os receptores específicos para canabinoides, juntamente com os endocanabinoides, constituem o que hoje é conhecido como sistema endocanabinoide.

1.7 Canabinoides no controle das respostas comportamentais

O sistema endocanabinoide tem sido implicado no controle de diversas respostas neurofisiológicas e comportamentais. Chaperon e Thiebot (1999) mostraram uma redução na atividade locomotora e uma profunda catalepsia dose-dependente após a injeção de canabinoides em ratos. Corroborando este dado, Compton et al., (1996) e Ledent et al., (1999) sugeriram que a injeção de antagonistas CB1, como o SR141716A, e a deficiência de receptores CB1 em camundongos, respectivamente, causavam um aumento da atividade locomotora, além de potencializar o efeito estimulante da anfetamina e da apomorfina (MASSERANO; KAROUM; WYATT, 1999).

Sabe-se que os receptores CB1 apresentam-se amplamente distribuídos em áreas límbicas e corticais, o que sugere que estes receptores estejam envolvidos no controle das emoções. Alguns estudos têm mostrado que animais *knockout* CB1 exibem uma resposta ansiogênica em diferentes modelos comportamentais, incluindo o do campo aberto, o da caixa claro-escuro e o labirinto em cruz elevado (HALLER et al., 2002; URIGUEN et al., 2004). Além disso, os endocanabinoides podem ainda modular a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), alterando a liberação de diversos neurotransmissores envolvidos no comportamento emocional. Neste sentido, Uriguen et al., (2004) mostraram que as respostas ansiogênicas observadas em camundongos *knockout* CB1 foram acompanhadas por alterações no eixo HPA, apresentando uma hiperssensibilidade ao estresse e uma redução na ação de drogas ansiolíticas, como a buspirona, no teste de claro-escuro.

Outros estudos, utilizando abordagem sistêmica, mostraram que a ativação do receptor CB1, a inibição do FAAH (enzima hidrolase que degrada AEA) e/ou a inibição da recaptação de endocanabinoides produzem efeitos ansiolíticos em modelos animais de ansiedade, tais como no labirinto em cruz elevado (BORTOLATO et al., 2006; MICALE et al., 2009; MOREIRA et al., 2008; NADERI et al., 2008; NAIDU et al., 2007; PATEL; HILLARD, 2006), no labirinto em “zero elevado”, uma modificação do labirinto em cruz

elevado (KATHURIA et al., 2003), e na caixa claro-escuro (RUTKOWSKA; JAMONTT; GLINIĄK, 2006; SCHERMA et al., 2008). Porém, os efeitos da estimulação dos receptores CB1 sobre a ansiedade ainda necessitam de mais atenção, uma vez que esta estimulação pode produzir efeitos bifásicos; baixa doses de canabinoides produzem respostas ansiolíticas enquanto que altas doses evocam respostas ansiogênicas (MOREIRA; WOTJAK, 2010). A ativação farmacológica dos receptores CB1 por via sistêmica pode produzir, ainda, respostas comportamentais antidepressivas no teste de nado forçado, tanto no tratamento agudo (HILL; GORZALKA, 2005; REALINI et al., 2011), quanto crônico (JIANG et al., 2005). Respostas antidepressivas também têm sido mostradas após a inibição da recaptação da AEA no teste de suspensão da cauda (GOBBI et al., 2005; NAIDU et al., 2007). Outros trabalhos mostraram que camundongos *knockout* CB1 apresentam uma hiperativação do eixo HPA (BARNA et al., 2004; COTA et al., 2003). Desta forma, podemos sugerir que o aumento da sinalização endocanabinoide pode produzir efeitos ansiolíticos e antidepressivos, e que alterações neste sistema podem acarretar distúrbios emocionais e neuro-hormoniais.

Segundo Schlicker e Kathmann (2001) e Alger (2002), muitos terminais axônicos do SNC expressam os receptores CB1, tendo como função inibir a liberação de neurotransmissores inibitórios e excitatórios. Freund, Katona e Piomelli (2003) mostraram que os receptores CB1 estão presentes tanto em projeções glutamatérgicas quanto GABAérgicas nas estruturas acima citadas, modulando as aferências para essas estruturas. Um estudo conduzido por Marsicano e Lutz (1999) mostrou imunorreatividade para os receptores CB1 nos núcleos paraventricular e ventral-medial, na haste infundibular e na área hipotalâmica lateral, sendo que estes receptores no hipotálamo encontram-se em neurônios glutamatérgicos. Outros autores mostraram uma predominância dos receptores CB1 sobre terminais axônicos dos neurônios GABAérgicos no SNC (KATONA et al., 1999; SZABO; SCHLICKER, 2005).

A estimulação dos receptores CB1 no córtex pré-frontal medial (CPFm) e no hipocampo produz um acentuado efeito ansiolítico (RUBINO et al., 2008a,b), além de uma resposta antidepressiva mediada pela 5-HT (McLAUGHLIN et al., 2007), e a extinção da resposta de medo condicionado (LIN et al., 2009), possivelmente pela conexão do CPFm com a amígdala basolateral. Microinjeções de agonistas CB1 no núcleo central da amígdala produz respostas ansiolíticas no teste do labirinto em cruz elevado, e esta resposta é potencializada pela injeção sistêmica de morfina (ZARRINDAST et al., 2008). Os receptores endocanabinoides estão presentes em outros substratos neurais encefálicos mais caudais. A

microinjeção de antagonistas CB1 na SCPdl reduz resposta de fuga explosiva mediada pela administração de aminoácidos excitatórios nesta mesma estrutura (FINN et al., 2003).

Tendo em vista evidências que propõem que a diminuição da atividade GABAérgica no hipotálamo medial evoca comportamentos defensivos, estudos mais aprofundados são necessários para investigar a participação do sistema endocanabinoide na elaboração das reações defensivas coordenadas pelos núcleos hipotalâmicos. Tais dados revelam a importância do estudo com estes compostos e justificam melhores investigações a respeito do papel exercido por esse sistema, tendo em vista a evidente capacidade de modular vários processos fisiológicos, e somando-se isso às investigações dos comportamentos defensivos, fica evidente a importância desses estudos para melhor compreensão dos mecanismos neurobiológicos que regem estes comportamentos observados, os quais são subjacentes ao estado de pânico.

1.8 Hipótese

Mediante vários relatos na literatura, inclusive de nosso próprio grupo, sugerindo que drogas derivadas da *Cannabis sativa* possuem atividade antiaversiva e tendo em mente a existência de endocanabinoides com atividade similar em nosso sistema nervoso central, e o envolvimento de neurônios do hipotálamo medial na organização do comportamento de defesa, a hipótese do presente trabalho é que a administração de anandamida na divisão dorso-medial do núcleo hipotalâmico ventro-medial promoveria, via receptores CB₁, a redução dos comportamentos de defesa induzidos pelo bloqueio GABAérgico nessa mesma estrutura do hipotálamo medial.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar o envolvimento de vias mediadas por endocanabinoides na modulação das respostas defensivas organizadas pelo hipotálamo medial.

2.2 Objetivos Específicos

Estudar o padrão do comportamento de defesa de ratos *Wistar*, organizado pela divisão dorso-medial do núcleo hipotalâmico ventro-medial, e induzido pelo bloqueio local de receptores GABA_A (com microinjeção intraencefálica de bicuculina, na dose de 40 ng/0,2μL).

Estudar o efeito do pré-tratamento do núcleo dorso-medial do hipotálamo ventro-medial com anandamida (nas doses de 0,5, 5 e 50 pmol/0,2μL) sobre as respostas comportamentais induzidas pela microinjeção de bicuculina no mesmo núcleo hipotalâmico.

Estudar o envolvimento de receptores endocanabinoides do tipo CB₁ do hipotálamo ventro-medial no efeito da anandamida sobre a ativação comportamental induzida pela bicuculina administrada na divisão dorso-medial do hipotálamo ventro-medial, por meio da administração intra-hipotalâmica prévia de AM251 (100 pmol/0,1μL).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados, no presente trabalho, ratos albinos (*Rattus norvegicus*, *Rodentia*, *Muridae*), de linhagem Wistar, pesando entre 230-270g, provenientes do Biotério Central da USP, *Campus* de Ribeirão Preto. Os animais foram habituados em grupo de dez animais em uma arena poligonal (com 154cm X 72cm X 64cm, de acrílico cristal, revestido de *insulfilm*) disposta sobre uma superfície de granito e munida com uma toca artificial (medindo 36 cm X 26 cm X 12,5 cm), com duas saídas diametralmente opostas (figura 1). Os animais ficaram acondicionados sob ciclo claro/escuro de 12/12h (luzes acesas das 6:00 às 18:00 horas), com temperatura da sala experimental entre $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e sem privação de água e comida, exceto durante a realização dos experimentos. Os experimentos foram realizados segundo os princípios éticos elaborados segundo as normas que regulamentam aspectos éticos da utilização de animais de laboratório, estabelecidas pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da FMRP-USP (CETEA).

Figura 1: Aparato experimental mostrando a arena munida com toca, utilizada durante a habituação dos animais (A) e durante os experimentos (B).

3.2 Drogas

Foram utilizadas as seguintes drogas e seus respectivos diluentes como controle:

(a) Antagonista de receptores GABA_A, *[R-(R*,S*)]-5-(6,8-Dihydro-8-oxofuro[3,4-*e*]-1,3-benzodioxol-6-yl)-5,6,7,8-tetrahydro-6,6-dimethyl-1,3-dioxolo[4,5-*g*]isoquinolinium iodide* (BICUCULINA; TOCRIS), na dose de 40ng/0,2μL solubilizado em NaCl 0,9% (BIAGIONI et al., 2013; BIAGIONI; SILVA; COIMBRA, 2012; de FREITAS et al., 2013a,b; FREITAS et al., 2009);

(b) Agonista de receptores canabinoides e vaniloide, *N-(2-Hydroxyethyl)-5Z,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenamide* (ANANDAMIDA; TOCRIS), nas doses de 0,5, 5 e 50pmol/0,2μL solubilizados em *Tocrisolve TM* 100, um solvente que contém 1:4 óleo de soja/água emulsificado com bloqueador copolímero Pluronic F68 (RESSTEL et al., 2008; MOREIRA; AGUIAR; GRUIMARÃES, 2007).

(c) Antagonista de receptores canabinoides CB₁, *N-(Piperidin-1-yl)-5-(4-iodophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methyl-1H-pyrazole-3-carboxamide* (AM251; TOCRIS), na dose de 100pmol/0,1μL solubilizado em DMSO a 10% (ALMEIDA-SANTOS et al., 2013; LISBOA; GUIMARÃES, 2012)

3.3 Cirurgia

Os animais foram anestesiados com 92 mg/kg de cetamina e 9,2 mg/kg de xilasina administradas por via intramuscular, e foram fixados pelos rochedos temporais e incisivos superiores a um aparelho estereotático (David Kopf, EUA). Após anestesia local com lidocaína a 2%, uma cânula-guia (diâmetro externo 0,6mm) foi implantada unilateralmente no diencéfalo e direcionada para a divisão dorso-medial do hipotálamo ventro-medial (VMHDM), segundo coordenadas AP= -2,4 mm, ML= 0,3mm, DV= -8,1mm, de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (2007). O bregma foi utilizado como referência e as suturas lambdoide e bregmática foram mantidas em um mesmo plano horizontal. Depois de implantada, a cânula-guia foi fixada utilizando-se uma resina de acrílico autopolimerizável que foi ancorada por um parafuso de fornitureira de aço inoxidável. Encerrada a cirurgia, um mandril foi colocado na cânula-guia para evitar obstruções.

3.4 Procedimento experimental

O experimento foi realizado em grupos independentes de animais (n=7-9/grupo) que foram submetidos à cirurgia estereotáxica para a introdução de uma cânula-guia no VMHDM como descrito acima. Durante o período pós-operatório de cinco dias, os animais permaneceram em uma arena poligonal com toca para habituação até o dia do experimento.

Após o procedimento cirúrgico, os animais foram tratados com uma injeção intramuscular profunda de penicilina benzatina (60.000 UI) e com uma dose do analgésico e anti-inflamatório não esteroide flunixin meglumine (Banamine; 2,5 mg/kg).

No dia do experimento, os animais foram separados e designados aleatoriamente para um dos grupos de tratamento. As injeções intracerebrais foram realizadas com uma agulha dental (diâmetro externo 0,3mm) introduzida através da cânula guia até 1mm abaixo da extremidade final da cânula. O volume de 0,1 a 0,2 μ L foi microinjetado em 15 segundos, usando-se uma microseringa Hamilton conectada a uma bomba de infusão através de um tubo de polietileno (PE10).

No primeiro experimento, os animais receberam a primeira microinjeção de anandamida ou veículo (AEA0,5, AEA5, AEA50 ou veh), seguido-se, 5 minutos depois, uma segunda microinjeção de bicuculina ou veículo (BIC ou veh) e foram colocados imediatamente na arena de experimento através da saída oposta a toca, onde os comportamentos foram gravados por uma câmera filmadora durante 10 minutos. Neste experimento, as microinjeções foram realizadas em um volume de 0,2 μ L.

No segundo experimento, os animais receberam a primeira microinjeção de AM251 ou veículo (AM251 100 ou veh), seguido-se, 5 minutos depois, de uma segunda microinjeção de anandamida ou veículo (AEA5 ou veh). Cinco minutos depois da segunda microinjeção, os animais receberam a última administração intra-hipotalâmica de bicuculina ou veículo (BIC ou veh) e foram colocados imediatamente na arena de experimento através da saída oposta a toca, onde os comportamentos foram gravados por uma câmera filmadora durante 10 minutos. Este segundo experimento foi conduzido em grupos independentes do primeiro experimento, e as microinjeções foram realizadas em um volume de 0,1 μ L.

3.5 Análise comportamental

As respostas comportamentais foram analisadas através de um *software* de uso livre, desenvolvido no Laboratório de Comportamento Exploratório da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo – *Campus* Ribeirão Preto. As análises comportamentais subjetivas de reações defensivas, incluíram frequência e tempo de alerta, congelamento, fuga, levantamentos, cruzamentos, bem como frequência de entradas na toca e tempo de permanência na mesma.

A resposta de alerta foi considerada como interrupção abrupta do comportamento em curso em tempo menor que 5 segundos, enquanto que o “congelamento” foi considerado interrupção do comportamento em curso por pelo menos 5 segundos acompanhado de, no mínimo, duas reações autonômicas visíveis (micção, defecação, piloereção ou exoftalmia); a duração dos comportamentos supracitados foi mensurada com o auxílio de um cronômetro. Os comportamentos de fuga foram divididos em fuga não orientada e orientada para a toca. Juntos, esses dois últimos registros constituíram o comportamento designado de “fuga total”. Comportamentos de escalada, subidas na toca e saltos na vertical também foram considerados comportamentos organizados.

A fuga não orientada caracteriza-se por corridas não orientadas (sem direção definida, e em sentido oposto ao da posição da toca), enquanto que a fuga orientada é mais elaborada, ou seja, uma fuga orientada diretamente para a toca, caracterizada por um deslocamento em um sentido ou direção que aproxime o animal da posição da toca. Os comportamentos de escaladas (realizadas nas bordas da arena), subidas na toca e saltos essencialmente na vertical também caracterizaram uma fuga orientada. Os comportamentos de levantamentos (apoio das patas anteriores nas amuradas da arena, ou elevadas sem apoio), cruzamentos (cruzamento das linhas divisórias do assoalho da arena com as quatro patas), frequência de entradas na toca e tempo de permanência dentro dela também foram analisados.

Para um controle adicional, os animais que receberam injeções fora da área desejada foram reunidos em um grupo denominado “*OUT*” e comparados com o grupo que recebeu apenas veículo.

3.6 Histologia

Os animais foram anestesiados com uma solução de hidrato de cloral a 5% na dose de 1 mL/100g e perfundidos (bomba de perfusão Master Flex® L/S TM) através do ventrículo esquerdo com solução de NaCl a 0,9%, em volume suficiente para retirar todo o sangue do animal (± 200 mL), seguida de solução tamponada de paraformaldeído a 4%, em volume suficiente para fixar os tecidos (± 200 mL). Os encéfalos foram retirados e mantidos no paraformaldeído a 4% por no mínimo 4 horas, seguido de 48 horas na sacarose a 30%. Posteriormente, foram congelados e cortados com o auxílio de um criostato (Leica CM 1950) em fatias de 30 μ m de espessura. Os cortes foram montados em lâminas de vidro gelatinizadas, secos ao ar e corados com hematoxilina e eosina em um sistema robotizado de histologia (Leica Autostainer XL, modelo CV5030). Posteriormente, os cortes nas lâminas foram analisados com o auxílio de microscopia de luz (*Axiolmager Z1*, Zeiss), e a posição das pontas das agulhas de microinjeção localizadas no neuroeixo foram assinaladas em anagramas do atlas de Paxinos e Watson (2007). Somente animais com sinais de presença da extremidade final da microagulha dentro do VMHDM foram incluídos na análise estatística, exceto as do grupo “OUT”.

3.7 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Os dados referentes ao primeiro experimento foram analisados por meio da análise de variância de uma via (*one-way-ANOVA*), enquanto que os dados referentes ao segundo experimento foram analisados por meio da análise de variância de três vias (*three-way-ANOVA*). Em ambos os experimentos foram empregados, quando apropriado, o teste de Newman-Keuls para comparações múltiplas. Resultados com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4 RESULTADOS

4.1 Histologia

Figura 2: Fotomicrografias de cortes coronais do diencéfalo de rato Wistar, passando pelo hipotálamo. A seta representa um sítio de microinjeção de droga, mostrando a extremidade final da microagulha dentro do VMHDM nas coordenadas estereotáticas bregma -2,52mm (A) e bregma -2,64mm (B). DMH: hipotálamo dorsomedial. VMH: hipotálamo ventromedial. Coloração: hematoxilina-eosina.

4.2 Experimento 1

4.2.1 Localização dos sítios de injeção

A figura 3 apresenta os diagramas representativos dos sítios de injeção de drogas no VMHDM de todos os animais submetidos ao experimento 1 e utilizados nas análises estatísticas. Os sítios de injeção foram definidos de acordo com o atlas estereotático de Paxinos e Watson (2007).

Figura 3: Localização dos sítios de injeção de drogas de todos os animais submetidos ao experimento 1. Os círculos escuros representam as injeções localizadas no VMHDM. Os 'X' representam as injeções fora do VMHDM.

4.2.2 Efeitos do pré-tratamento com anandamida (AEA 0,5, 5 e 50 pmol/0,2µl) sobre os comportamentos induzidos pela administração de bicuculina (40 ng/0,2µl) no núcleo dorso-medial do hipotálamo ventro-medial (VMHDM) de ratos

Os comportamentos induzidos pelo bloqueio GABAérgico no VMHDM através de microinjeção de bicuculina incluíram respostas de alerta e de fuga. Respostas de imobilidade defensiva não foram observadas nos tratamentos realizados.

A figura 4A apresenta o gráfico (média±EPM) referente à frequência de alerta. A ANOVA de uma via seguida do teste *post hoc* Newman-Keuls indicou que o grupo tratado com veh-BIC aumentou significativamente a frequência de alerta quando comparado com o grupo tratado com veh-veh. O pré-tratamento com AEA, nas três doses (0,5, 5 e 50pmol/0,2µl), foi capaz de reduzir a frequência de alerta quando comparados com o grupo veh-BIC (veh-veh:0,500±0,189; veh-BIC:11,630±2,442; AEA0,5-BIC:3,125±0,398; AEA5-BIC:3,000±0,577; AEA50-BIC:4,571±0,812; $F_{(7,53)}=14,15$; $p<0,0001$). A droga na dose de 5pmol/0,2µl *per se* não apresentou efeito quando comparado com o grupo veh-veh (veh-AEA5:1,143±0,404; $p>0,05$). As administrações realizadas fora do VMHDM foram reunidas em um grupo *OUT* e também foram comparadas com o grupo veh-veh, não havendo diferença entre elas (veh-BIC(*OUT*):0,571±0,369; AEA5-BIC(*OUT*):0,429±0,297; $p>0,05$).

A figura 4B apresenta o gráfico (média±EPM) referente ao tempo de alerta. A ANOVA de uma via seguida do teste *post hoc* Newman-Keuls indicou que o grupo tratado com veh-BIC aumentou significativamente a duração do comportamento de alerta quando comparado com o grupo tratado com veh-veh. O pré-tratamento com AEA, nas três doses (0,5, 5 e 50pmol/0,2µl), foi capaz de reduzir o tempo de alerta quando comparados com o grupo veh-BIC (veh-veh:0,049±0,021; veh-BIC:2,706±0,649; AEA0,5-BIC:0,558±0,153; AEA5-BIC:0,570±0,139; AEA50-BIC:0,970±0,220; $F_{(7,53)}=14,15$; $p<0,0001$). A droga na dose de 5pmol/0,2µl *per se* não apresentou efeito quando comparado com o grupo veh-veh (veh-AEA5:0,237±0,077; $p>0,05$). As administrações realizadas fora do VMHDM foram reunidas em um grupo *OUT* e também foram comparadas com o grupo veh-veh, não havendo diferença entre elas (veh-BIC(*OUT*):0,083±0,055; AEA5-BIC(*OUT*):0,067±0,048; $p>0,05$).

Figura 4: Efeito da administração de anandamida (AEA 0,5, 5 e 50pmol/0,2µl) sobre o comportamento de alerta induzido pela administração de bicuculina (BIC 40ng/0,2µL). Todas as administrações foram realizadas no VMHDM. Os animais que receberam as injeções fora do VMHDM foram analisados e reunidos em um grupo *OUT*. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n=8, 8, 8, 9, 7, 7, 7 e 7 da esquerda para a direita. *** representa $p < 0,001$ em relação ao grupo veh-veh, e ### representa $p < 0,001$ em relação ao grupo veh-BIC (*One-way ANOVA* seguida do teste *post-hoc* de Newman-Keuls).

Os comportamentos de fuga foram divididos em fuga não orientada e orientada para a toca. A figura 5 apresenta os gráficos (média $\pm$ EPM) referentes à fuga total (A e B) caracterizada pela soma do comportamento de fuga não orientada (C e D) e fuga orientada diretamente para a toca (E e F).

A figura 5A apresenta o gráfico de frequência de fuga total. A ANOVA de uma via seguida do teste *post hoc* Newman-Keuls indicou que o grupo tratado com veh-BIC aumentou significativamente a frequência de fuga quando comparado com o grupo tratado com veh-veh. O pré-tratamento com AEA nas doses de 0,5 e 5pmol/0,2µl, mas não na dose de 50pmol/0,2µl, reduziu a frequência de fuga quando comparados com o grupo tratado com veh-BIC (veh-veh:0,250 $\pm$ 0,164; veh-BIC:22,000 $\pm$ 3,635; AEA0,5-BIC:7,125 $\pm$ 1,302; AEA5-BIC:5,889 $\pm$ 1,230; AEA50-BIC:19,29 $\pm$ 5,485; $F_{(7,53)}=14,13$; $p < 0,0001$). A droga na dose de 5pmol/0,2µl *per se* não apresentou efeito (veh-AEA5:0 $p > 0,05$). As administrações realizadas fora do VMHDM foram reunidas em um grupo *OUT* e também foram comparadas com o grupo veh-veh, não havendo diferença entre elas (veh-BIC(*OUT*):1,000 $\pm$ 0,436; AEA5-BIC(*OUT*):0,286 $\pm$ 0,286; $p > 0,05$).

A figura 5B apresenta o gráfico de tempo de fuga total. A ANOVA de uma via seguida do teste *post hoc* Newman-Keuls indicou que o grupo tratado com veh-BIC aumentou

significativamente o tempo de fuga quando comparado com o grupo tratado com veh-veh. O pré-tratamento do hipotálamo medial com AEA nas doses de 0,5 e 5pmol/0,2µl, mas não na dose de 50pmol/0,2µl, reduziu o tempo de fuga quando comparados com o grupo tratado com veh-BIC (veh-veh:0,034±0,026; veh-BIC:11,01±2,201; AEA0,5-BIC:2,777±0,635; AEA5-BIC:2,004±0,710; AEA50-BIC:8,631±3,055; $F_{(7,53)}=10,27$; $p<0,0001$). A droga na dose de 5pmol/0,2µl *per se* não apresentou efeito (veh-AEA5:0 $p>0,05$). As administrações realizadas fora do VMHDM foram reunidas em um grupo *OUT* e também foram comparadas com o grupo veh-veh, não havendo diferença entre elas (veh-BIC(*OUT*):0,381±0,182; AEA5-BIC(*OUT*):0,134±0,134; $p>0,05$).

Separadamente, os comportamentos de fuga não orientada e orientada para a toca apresentaram um mesmo padrão em relação aos resultados de fuga total.

A figura 5C apresenta o gráfico de frequência de fuga não orientada. A ANOVA de uma via seguida do teste *post hoc* Newman-Keuls indicou que o grupo tratado com veh-BIC aumentou significativamente a frequência de fuga não orientada quando comparado com o grupo tratado com veh-veh. O pré-tratamento com AEA nas doses de 0,5 e 5pmol/0,2µl, mas não na dose de 50pmol/0,2µl, reduziu a frequência de fuga não orientada quando comparado com o grupo tratado com veh-BIC (veh-veh:0; veh-BIC:11,380±2,121; AEA0,5-BIC:2,500±0,906; AEA5-BIC:2,222±0,863; AEA50-BIC:9,286±3,293; $F_{(7,53)}=10,21$; $p<0,0001$). A droga na dose de 5pmol/0,2µl *per se* não apresentou efeito (veh-AEA5:0 $p>0,05$). As administrações realizadas fora do VMHDM foram reunidas em um grupo *OUT* e também foram comparadas com o grupo veh-veh, não havendo diferença entre elas (veh-BIC(*OUT*):0,143±0,143; AEA5-BIC(*OUT*):0,143±0,143; $p>0,05$).

A figura 5D apresenta o gráfico de tempo de fuga não orientada. A ANOVA de uma via seguida do teste *post hoc* Newman-Keuls indicou que o grupo tratado com veh-BIC aumentou significativamente o tempo de fuga não orientada quando comparado com o grupo tratado com veh-veh. O pré-tratamento com AEA nas doses de 0,5 e 5pmol/0,2µl, mas não na dose de 50pmol/0,2µl, reduziu o tempo de fuga não orientada quando comparados com o grupo tratado com veh-BIC (veh-veh:0; veh-BIC:8,443±2,163; AEA0,5-BIC:0,899±0,324; AEA5-BIC:1,448±0,684; AEA50-BIC:7,048±2,798; $F_{(7,53)}=7,591$; $p<0,0001$). A droga na dose de 5pmol/0,2µl *per se* não apresentou efeito (veh-AEA5:0 $p>0,05$). As administrações realizadas fora do VMHDM foram reunidas em um grupo *OUT* e também foram comparadas com o grupo veh-veh, não havendo diferença entre elas (veh-BIC(*OUT*):0,054±0,054; AEA5-BIC(*OUT*):0,147±0,147; $p>0,05$).

A figura 5E apresenta o gráfico de frequência de fuga orientada diretamente para a toca. A ANOVA de uma via seguida do teste *post hoc* Newman-Keuls indicou que o grupo tratado com veh-BIC aumentou significativamente a frequência de fuga orientada para a toca quando comparado com o grupo tratado com veh-veh. O pré-tratamento com AEA nas doses de 0,5 e 5pmol/0,2μl, mas não na dose de 50pmol/0,2μl, reduziu a frequência de fuga orientada para a toca quando comparados com o grupo tratado com veh-BIC (veh-veh:0,250±0,164; veh-BIC:10,630±2,329; AEA0,5-BIC:4,625±0,596; AEA5-BIC:3,667±0,500; AEA50-BIC:10,000±2,628; $F_{(7,53)}=11,85$; $p<0,0001$). A droga na dose de 5pmol/0,2μl *per se* não apresentou efeito (veh-AEA5:0 $p>0,05$). As administrações realizadas fora do VMHDM foram reunidas em um grupo *OUT* e também foram comparadas com o grupo veh-veh, não havendo diferença entre elas (veh-BIC(*OUT*):0,857±0,404; AEA5-BIC(*OUT*):0,143±0,143; $p>0,05$).

A figura 5F apresenta o gráfico da duração de fuga orientada diretamente para a toca. A ANOVA de uma via seguida do teste *post hoc* Newman-Keuls indicou que o grupo tratado com veh-BIC aumentou significativamente o tempo de fuga orientada para a toca quando comparado com o grupo tratado com veh-veh. Apenas o pré-tratamento com AEA na dose de 5pmol/0,2μl reduziu o tempo de fuga orientada para a toca quando comparado com o grupo tratado com veh-BIC (veh-veh:0,034±0,026; veh-BIC:2,571±0,670; AEA0,5-BIC:1,977±0,374; AEA5-BIC:0,555±0,135; AEA50-BIC:1,583±0,321; $F_{(7,53)}=9,790$; $p<0,0001$). A droga na dose de 5pmol/0,2μl *per se* não apresentou efeito (veh-AEA5:0 $p>0,05$). As administrações realizadas fora do VMHDM foram reunidas em um grupo *OUT* e também foram comparadas com o grupo veh-veh, não havendo diferença entre elas (veh-BIC(*OUT*):0,327±0,183; AEA5-BIC(*OUT*):0,087±0,087; $p>0,05$).

Figura 5: Efeito da administração de anandamida (AEA 0,5, 5 e 50pmol/0,2 μ l) sobre os comportamentos de fuga induzidos pela administração de bicuculina (BIC 40ng/0,2 μ L). Todas as administrações foram realizadas no VMHDM. Os animais que receberam as injeções fora do VMHDM foram analisados e reunidos em um grupo *OUT*. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n=8, 8, 8, 9, 7, 7, 7 e 7 da esquerda para a direita. * representa $p<0,05$, ** representa $p<0,01$ e *** representa $p<0,001$ em relação ao grupo veh-veh. ## representa $p<0,01$ e ### representa $p<0,001$ em relação ao grupo veh-BIC (*One-way ANOVA* seguida do teste *post-hoc* de Newman-Keuls).

A figura 6 apresenta os gráficos (média±EPM) referentes aos demais comportamentos caracterizados como orientados, que compreendem a frequência de escaladas (A), a subidas na toca (B) e saltos na vertical (C).

A figura 6A apresenta o gráfico de frequência de escalada. A ANOVA de uma via seguida do teste *post hoc* Newman-Keuls indicou que o grupo tratado com veh-BIC aumentou significativamente a frequência de escalada quando comparado com o grupo tratado com veh-veh. Apenas o pré-tratamento com AEA na dose de 5pmol/0,2µl reduziu a frequência de escalada quando comparado com o grupo tratado com veh-BIC (veh-veh:0; veh-BIC:11,630±2,146; AEA0,5-BIC:9,125±1,630; AEA5-BIC:0,333±0,235; AEA50-BIC:8,143±0,911; $F_{(7,53)}=22,35$; $p<0,0001$). A droga na dose de 5pmol/0,2µl *per se* não apresentou efeito quando comparado com o grupo veh-veh (veh-AEA5:0,286±0,184 $p>0,05$). As administrações realizadas fora do VMHDM foram reunidas em um grupo *OUT* e também foram comparadas com o grupo veh-veh, não havendo diferença entre elas (veh-BIC(*OUT*):0; AEA5-BIC(*OUT*):0,143±0,143; $p>0,05$).

A figura 6B apresenta o gráfico de frequência de subidas na toca. A ANOVA de uma via seguida do teste *post hoc* Newman-Keuls indicou que o grupo tratado com veh-BIC aumentou significativamente a frequência de subidas na toca quando comparado com o grupo tratado com veh-veh. Apenas o pré-tratamento com AEA na dose de 5pmol/0,2µl reduziu a frequência de subidas na toca quando comparado com o grupo tratado com veh-BIC (veh-veh:0; veh-BIC:7,125±1,288; AEA0,5-BIC:6,500±1,909; AEA5-BIC:1,444±0,556; AEA50-BIC:8,000±2,936; $F_{(7,53)}=7,474$; $p<0,0001$). A droga na dose de 5pmol/0,2µl *per se* não apresentou efeito (veh-AEA5:0 $p>0,05$). As administrações realizadas fora do VMHDM foram reunidas em um grupo *OUT* e também foram comparadas com o grupo veh-veh, não havendo diferença entre elas (veh-BIC(*OUT*):0,286±0,184; AEA5-BIC(*OUT*):0,143±0,143; $p>0,05$).

A figura 6C apresenta o gráfico de frequência de saltos na vertical. A ANOVA de uma via seguida do teste *post hoc* Newman-Keuls indicou que o grupo tratado com veh-BIC aumentou significativamente a frequência de saltos na vertical quando comparado com o grupo tratado com veh-veh. O pré-tratamento com AEA nas doses de 0,5 e 5pmol/0,2µl, mas não na dose de 50pmol/0,2µl, reduziu a frequência de saltos quando comparados com o grupo tratado com veh-BIC (veh-veh:0; veh-BIC:8,625±2,514; AEA0,5-BIC:2,625±1,051; AEA5-BIC:0,222±0,147; AEA50-BIC:8,429±4,087; $F_{(7,53)}=5,238$; $p=0,0001$). A droga na dose de 5pmol/0,2µl *per se* não apresentou efeito (veh-AEA5:0 $p>0,05$). As administrações realizadas fora do VMHDM foram reunidas em um grupo *OUT* e também foram comparadas com o

grupo veh-veh, não havendo efeito estatisticamente significativo (veh-BIC(*OUT*):0; AEA5-BIC(*OUT*):0; $p>0,05$).

Figura 6: Efeito da administração de anandamida (AEA 0,5, 5 e 50pmol/0,2µl) sobre os comportamentos orientados induzidos pela administração de bicuculina (BIC 40ng/0,2µL). Todas as administrações foram realizadas no VMHDM. Os animais que receberam as injeções fora do VMHDM foram analisados e reunidos em um grupo *OUT*. Os dados representam a média $\pm$ EPM, $n=8, 8, 8, 9, 7, 7, 7$ e 7 da esquerda para a direita. * representa $p<0,05$, ** representa $p<0,01$ e *** representa $p<0,001$ em relação ao grupo veh-veh. # representa $p<0,05$, ## representa $p<0,01$ e ### representa $p<0,001$ em relação ao grupo veh-BIC (*One-way* ANOVA seguida do teste *post-hoc* de Newman-Keuls).

A figura 7 apresenta os gráficos referentes aos comportamentos de frequência e tempo de levantamento, número de entradas na toca e tempo de permanência na mesma, assim como frequência de cruzamentos.

A figura 7A apresenta o gráfico de frequência de levantamentos. A ANOVA de uma via seguida do teste *post hoc* Newman-Keuls indicou que o grupo tratado com veh-BIC aumentou significativamente a frequência de levantamentos quando comparado com o grupo tratado com veh-veh. Apenas o pré-tratamento com AEA na dose de 5pmol/0,2µl reduziu a frequência de levantamento quando comparado com o grupo tratado com veh-BIC (veh-veh: 9,875±3,608; veh-BIC: 94,50±7,474; AEA0,5-BIC: 63,63±9,192; AEA5-BIC: 34,33±6,754; AEA50-BIC: 76,29±16,22; $F_{(7,53)}=17,43$; $p<0,0001$). A droga na dose de 5pmol/0,2µl *per se* não apresentou efeito quando comparado com o grupo veh-veh (veh-AEA5: 11,0±4,451 $p>0,05$). As administrações realizadas fora do VMHDM foram reunidas em um grupo *OUT* e também foram comparadas com o grupo veh-veh, não havendo diferença entre elas (veh-BIC(*OUT*): 21,0±2,526; AEA5-BIC(*OUT*): 19,0±3,288; $p>0,05$).

A figura 7B apresenta o gráfico de tempo de levantamento. A ANOVA de uma via seguida do teste *post hoc* Newman-Keuls indicou que o grupo tratado com veh-BIC aumentou significativamente o tempo de levantamento quando comparado com o grupo tratado com veh-veh. O pré-tratamento com AEA em todas as doses (0,5, 5 e 50pmol/0,2µl) reduziu o tempo de levantamento quando comparado com o grupo tratado com veh-BIC (veh-veh: 12,67±4,995; veh-BIC: 73,65±7,063; AEA0,5-BIC: 30,88±3,817; AEA5-BIC: 32,87±5,388; AEA50-BIC: 50,35±7,791 $F_{(7,53)}=12,29$; $p<0,0001$). A droga na dose de 5pmol/0,2µl *per se* não apresentou efeito quando comparado com o grupo veh-veh (veh-AEA5: 11,81±6,378 $p>0,05$). As administrações realizadas fora do VMHDM foram reunidas em um grupo *OUT* e também foram comparadas com o grupo veh-veh, não havendo diferença entre elas (veh-BIC(*OUT*): 27,67±6,498; AEA5-BIC(*OUT*): 21,70±4,847; $p>0,05$).

A figura 7C apresenta o gráfico de frequência de entradas na toca. A ANOVA de uma via seguida do teste *post hoc* Newman-Keuls indicou que o grupo tratado com veh-BIC aumentou significativamente a frequência de entradas na toca quando comparado com o grupo tratado com veh-veh. Nenhum pré-tratamento com AEA alterou a frequência de entradas na toca quando comparado com o grupo tratado com veh-BIC (veh-veh: 14,63±3,273; veh-BIC: 31,0±3,224; AEA0,5-BIC: 25,75±9,192; AEA5-BIC: 26,89±4,756; AEA50-BIC: 35,14±6,364; $F_{(7,53)}=5,924$; $p>0,05$). A droga na dose de 5pmol/0,2µl *per se* não apresentou efeito quando comparado com o grupo veh-veh (veh-AEA5: 9,857±2,577 $p>0,05$). As administrações realizadas fora do VMHDM foram reunidas em um grupo *OUT* e também

foram comparadas com o grupo veh-veh, não havendo diferença entre elas (veh-BIC(*OUT*):13,0±2,127; AEA5-BIC(*OUT*):16,71±2,843; $p>0,05$).

A figura 7D apresenta o gráfico de tempo de permanência na toca. A ANOVA de uma via seguida do teste *post hoc* Newman-Keuls indicou que o grupo tratado com veh-BIC reduziu significativamente o tempo de permanência na toca quando comparado com o grupo tratado com veh-veh. Nenhum pré-tratamento com AEA alterou o tempo de permanência na toca quando comparado com o grupo tratado com veh-BIC (veh-veh:494,3±27,98; veh-BIC:137,6±21,97; AEA0,5-BIC:205,5±49,61; AEA5-BIC:274,5±46,23; AEA50-BIC:180,0±42,30 $F_{(7,53)}=15,71$; $p<0,0001$). A droga na dose de 5pmol/0,2µl *per se* não apresentou efeito quando comparado com o grupo veh-veh (veh-AEA5:500,0±32,42 $p>0,05$). As administrações realizadas fora do VMHDM foram reunidas em um grupo *OUT* e também foram comparadas com o grupo veh-veh, não havendo diferença entre elas (veh-BIC(*OUT*):448,2±25,66; AEA5-BIC(*OUT*):426,7±38,52; $p>0,05$).

A figura 7E apresenta o gráfico de frequência de cruzamentos. A ANOVA de uma via seguida do teste *post hoc* Newman-Keuls indicou que o grupo tratado com veh-BIC aumentou significativamente a frequência de cruzamentos quando comparado com o grupo tratado com veh-veh. Nenhum pré-tratamento com AEA alterou a frequência de cruzamentos quando comparado com o grupo tratado com veh-BIC (veh-veh:55,0±8,43; veh-BIC:360,0±34,55; AEA0,5-BIC:325,5±69,13; AEA5-BIC:276,0±45,19; AEA50-BIC:422,6±68,72; $F_{(7,53)}=11,10$; $p>0,05$). A droga na dose de 5pmol/0,2µl *per se* não apresentou efeito quando comparado com o grupo veh-veh (veh-AEA5:61,86±16,82 $p>0,05$). As administrações realizadas fora do VMHDM foram reunidas em um grupo *OUT* e também foram comparadas com o grupo veh-veh, não havendo diferença estatisticamente significantes entre elas (veh-BIC(*OUT*):125,7±12,3; AEA5-BIC(*OUT*):144,0±20,71; $p>0,05$).

Figura 7: Efeito da administração de anandamida (AEA 0,5, 5 e 50pmol/0,2µl) sobre os comportamentos de levantamento (A e B), número de entradas na toca (C), tempo de permanência dentro dela (D) e cruzamentos (E) induzidos pela administração de bicuculina (BIC 40ng/0,2µL). Todas as administrações foram realizadas no VMHDM. Os animais que receberam as injeções fora do VMHDM foram analisados e reunidos em um grupo *OUT*. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n=8, 8, 8, 9, 7, 7, 7 e 7 da esquerda para a direita. * representa $p<0,05$, ** representa $p<0,01$ e *** representa $p<0,001$ em relação ao grupo veh-veh. # representa $p<0,05$ e ### representa $p<0,001$ em relação ao grupo veh-BIC (*One-way ANOVA* seguida do teste *post-hoc* de Newman-Keuls).

4.3 Experimento 2

4.3.1 Localização dos sítios de injeção

A figura 8 apresenta os diagramas representativos dos sítios de injeção no VMHDM de todos os animais submetidos ao experimento 2 e utilizados nas análises estatísticas. Os sítios de injeção foram definidos de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (2007).

Figura 8: Localização dos sítios de injeção de todos os animais submetidos ao experimento 2. Os círculos escuros representam as injeções localizadas no VMHDM.

4.3.2 Efeitos da administração de anandamida (AEA 5 pmol/0,1µl) sobre os comportamentos induzidos pela administração de bicuculina (40 ng/0,1µl) na presença do AM251 (100 pmol/0,1µl) no núcleo dorso-medial do hipotálamo ventro-medial (VMHDM) de ratos

Os comportamentos induzidos pelo bloqueio GABAérgico no VMHDM através de microinjeção de bicuculina incluíram respostas de alerta e fuga. Respostas de imobilidade defensiva não foram observadas nos tratamentos realizados.

A figura 9 apresenta os gráficos de alerta, onde houve significativa interação entre as três injeções na frequência de alerta ($F_{(7,53)}=5,184$; $p<0,05$) mas não na duração de alerta defensivo ($F_{(7,53)}=2,990$; $p>0,05$).

A figura 9A apresenta o gráfico (média±EPM) de frequência de alerta. Similarmente ao experimento 1, a ANOVA seguida do teste *post hoc* Newman-Keuls indicou que, no experimento 2, o grupo tratado com veh-veh-BIC aumentou significativamente a frequência de alerta quando comparado com o grupo tratado com veh-veh-veh ao passo que a anandamida na dose de 5pmol atenuou este comportamento (veh-veh-veh: $0,875\pm0,227$; veh-veh-BIC: $8,111\pm0,564$; veh-AEA5-BIC: $3,250\pm0,839$ ($F_{(7,53)}=8,852$; $p<0,0001$). Este efeito, entretanto, foi prevenido pelo pré-tratamento com AM251 na dose de 100pmol/0,1µL ($p>0,05$). Os controles das drogas não apresentaram efeito estatisticamente significante quando comparados com o grupo veh-veh-veh (veh-AEA5-veh: $0,333\pm0,211$; AM251-veh-veh: $1,143\pm0,404$; AM251-AEA5-veh: $1,286\pm0,359$; $p>0,05$).

A figura 9B apresenta o gráfico (média±EPM) de tempo de alerta. Similarmente ao experimento 1, a ANOVA seguida do teste *post hoc* Newman-Keuls indicou que, no experimento 2, o grupo tratado com veh-veh-BIC aumentou significativamente o tempo de alerta quando comparado com o grupo tratado com veh-veh-veh ao passo que a anandamida na dose de 5pmol atenuou este comportamento (veh-veh-veh: $0,213\pm0,050$; veh-veh-BIC: $2,959\pm0,338$; veh-AEA5-BIC: $1,030\pm0,298$ ($F_{(7,53)}=6,522$; $p<0,0001$). Este efeito, porém, não foi prevenido pelo pré-tratamento com AM251 na dose de 100pmol/0,1µL diferentemente do observado na frequência de alerta. Os controles das drogas não apresentaram efeito quando comparados com o grupo veh-veh-veh (veh-AEA5-veh: $0,066\pm0,042$; AM251-veh-veh: $0,195\pm0,063$; AM251-AEA5-veh: $0,373\pm0,116$; $p>0,05$).

Figura 9: Efeito da administração de anandamida (AEA 5pmol/0,1µl) sobre o comportamento de alerta induzido pela administração de bicuculina (BIC 40ng/0,1µL) na presença do AM251 (100pmol/0,1µL). Todas as administrações foram realizadas no VMHDM. Os dados representam a média ± EPM, n=8, 6, 9, 8, 7, 7, 8 e 8 da esquerda para a direita. * representa $p<0,05$, *** representa $p<0,001$ em relação ao grupo veh-veh-veh e ## representa $p<0,01$, ### representa $p<0,001$ em relação ao grupo veh-veh-BIC (*Three-way ANOVA* seguida do teste *post-hoc* de Newman-Keuls).

Os comportamentos de fuga foram divididos em fuga não orientada e orientada para a toca. A figura 10 apresenta os gráficos (média±EPM) referentes à fuga total (A e B), caracterizada pela soma do comportamento de fuga não orientada (C e D) e fuga orientada diretamente para a toca (E e F).

Houve significativa interação entre a primeira e a terceira injeção e entre a segunda e a terceira injeção na frequência de fuga total ($F_{(7,53)}=23,619$; $p<0,05$ e $F_{(7,53)}=20,130$; $p<0,05$ respectivamente). No tempo de fuga total houve significativa interação também entre a primeira e a terceira injeção e entre a segunda e a terceira injeção ($F_{(7,53)}=23,326$; $p<0,05$ e $F_{(7,53)}=16,524$; $p<0,05$ respectivamente).

A figura 10A apresenta o gráfico (média±EPM) de frequência de fuga total. Similarmente ao experimento 1, a ANOVA seguida do teste *post hoc* Newman-Keuls indicou que, no experimento 2, o grupo tratado com veh-veh-BIC aumentou significativamente a frequência de fuga quando comparado com o grupo tratado com veh-veh-veh, ao passo que a anandamida na dose de 5pmol atenuou este comportamento (veh-veh-veh: $0,500 \pm 0,0189$; veh-veh-BIC: $21,56 \pm 4,503$; veh-AEA5-BIC: $3,750 \pm 1,386$ ($F_{(7,53)}=29,32$; $p<0,0001$). Este efeito, entretanto, foi prevenido pelo pré-tratamento do hipotálamo medial com AM251 na dose de 100pmol/0,1µL ($p>0,05$). O pré-tratamento com apenas o AM251 aumentou a frequência de fuga quando comparado com o grupo veh-veh-BIC (AM251-veh-BIC: $45,13 \pm 5,416$; $p<0,001$). Os controles das drogas não apresentaram efeito quando comparados com o grupo veh-veh-

veh (veh-AEA5-veh:0; AM251-veh-veh:0,286±0,184; AM251-AEA5-veh:0,429±0,297; $p>0,05$).

A figura 10B apresenta o gráfico (média±EPM) de tempo de fuga total. Similarmente ao experimento 1, a ANOVA seguida do teste *post hoc* Newman-Keuls indicou que, no experimento 2, o grupo tratado com veh-veh-BIC aumentou significativamente o tempo de fuga quando comparado com o grupo tratado com veh-veh-veh ao passo que a anandamida na dose de 5pmol atenuou este comportamento (veh-veh-veh:0,273±0,117; veh-veh-BIC:21,56±4,503; veh-AEA5-BIC:2,175±0,0805 ($F_{(7,53)}=30,58$; $p<0,0001$). Este efeito, entretanto, foi prevenido pelo pré-tratamento com AM251 na dose de 100pmol/0,1μL ($p>0,05$). O pré-tratamento com apenas o AM251 aumentou o tempo de fuga quando comparado com o grupo veh-veh-BIC (AM251-veh-BIC:45,13±5,416; $p<0,001$). Os controles das drogas não apresentaram efeito estatisticamente significantes quando comparados com o grupo veh-veh-veh (veh-AEA5-veh:0; AM251-veh-veh:0,155±0,105; AM251-AEA5-veh:0,272±0,188; $p>0,05$).

Assim como no experimento 1, os comportamentos de fuga não orientada e orientada para a toca apresentaram um mesmo padrão em relação aos resultados de fuga total.

Houve significativa interação entre a primeira e a terceira injeção e entre a segunda e a terceira injeção na frequência de fuga não orientada ($F_{(7,53)}=12,277$; $p<0,05$ e $F_{(7,53)}=13,260$; $p<0,05$ respectivamente). No tempo de fuga não orientada houve significativa interação também entre a primeira e a terceira injeção e entre a segunda e a terceira injeção ($F_{(7,53)}=12,752$; $p<0,05$ e $F_{(7,53)}=13,510$; $p<0,05$ respectivamente).

A figura 10C apresenta o gráfico (média±EPM) de frequência de fuga não orientada. Similarmente ao experimento 1, a ANOVA seguida do teste *post hoc* Newman-Keuls indicou que, no experimento 2, o grupo tratado com veh-veh-BIC aumentou significativamente a frequência de fuga não orientada quando comparado com o grupo tratado com veh-veh-veh ao passo que a anandamida na dose de 5pmol atenuou este comportamento (veh-veh-veh:0; veh-veh-BIC:11,67±3,109; veh-AEA5-BIC:1,250±0,453 ($F_{(7,53)}=16,46$; $p<0,0001$). Este efeito, entretanto, foi prevenido pelo pré-tratamento com AM251 na dose de 100pmol/0,1μL ($p>0,05$). O pré-tratamento com apenas o AM251 aumentou a frequência de fuga não orientada quando comparado com o grupo veh-veh-BIC (AM251-veh-BIC:22,88±4,172; $p<0,001$). Os controles das drogas não apresentaram efeito estatisticamente significativo quando comparados com o grupo veh-veh-veh (veh-AEA5-veh:0; AM251-veh-veh:0; AM251-AEA5-veh:0; $p>0,05$).

A figura 10D apresenta o gráfico (média±EPM) de tempo de fuga não orientada. Similarmente ao experimento 1, a ANOVA seguida do teste *post hoc* Newman-Keuls indicou que, no experimento 2, o grupo tratado com veh-veh-BIC aumentou significativamente o tempo de fuga não orientada quando comparado com o grupo tratado com veh-veh-veh, ao passo que a anandamida na dose de 5pmol atenuou este comportamento (veh-veh-veh:0; veh-veh-BIC:6,624±2,109; veh-AEA5-BIC:0,616±0,245 ($F_{(7,53)}=16,36$; $p<0,0001$). Este efeito, entretanto, foi prevenido pelo pré-tratamento com AM251 na dose de 100pmol/0,1µL ($p>0,05$). O pré-tratamento do hipotálamo medial com apenas o AM251 aumentou o tempo de fuga não orientada quando comparado com o grupo veh-veh-BIC (AM251-veh-BIC:13,56±2,176; $p<0,001$). Os controles das drogas não apresentaram efeito estatisticamente significativo quando comparados com o grupo veh-veh-veh (veh-AEA5-veh:0; AM251-veh-veh:0; AM251-AEA5-veh:0; $p>0,05$).

Houve significativa interação entre a primeira e a terceira injeção e entre a segunda e a terceira injeção na frequência de fuga orientada diretamente para a toca ($F_{(7,53)}=18,640$; $p<0,05$ e $F_{(7,53)}=12,193$; $p<0,05$ respectivamente). No tempo de fuga orientada diretamente para a toca houve significativa interação também entre a primeira e a terceira injeção e entre a segunda e a terceira injeção ($F_{(7,53)}=18,581$; $p<0,05$ e $F_{(7,53)}=9,509$; $p<0,05$ respectivamente).

A figura 10E apresenta o gráfico (média±EPM) de frequência de fuga orientada diretamente para a toca. Similarmente ao experimento 1, a ANOVA seguida do teste *post hoc* Newman-Keuls indicou que, no experimento 2, o grupo tratado com veh-veh-BIC aumentou significativamente a frequência de fuga orientada para a toca quando comparado com o grupo tratado com veh-veh-veh, ao passo que a anandamida na dose de 5pmol atenuou este comportamento (veh-veh-veh:0,500±0,189; veh-veh-BIC:9,889±1,874; veh-AEA5-BIC:2,500±1,086 ($F_{(7,53)}=21,50$; $p<0,0001$). Este efeito, entretanto, foi prevenido pelo pré-tratamento com AM251 na dose de 100pmol/0,1µL ($p>0,05$). O pré-tratamento do hipotálamo medial com apenas o AM251 aumentou a frequência de fuga orientada para a toca quando comparado com o grupo veh-veh-BIC (AM251-veh-BIC:22,25±3,046; $p<0,001$). Os controles das drogas não apresentaram efeito estatisticamente significativo quando comparados com o grupo veh-veh-veh (veh-AEA5-veh:0; AM251-veh-veh:0,286±0,184; AM251-AEA5-veh:0,429±0,297; $p>0,05$).

A figura 10F apresenta o gráfico (média±EPM) de tempo de fuga orientada diretamente para a toca. Similarmente ao experimento 1, a ANOVA seguida do teste *post hoc* Newman-Keuls indicou que, no experimento 2, o grupo tratado com veh-veh-BIC aumentou

significativamente o tempo de fuga orientada para a toca quando comparado com o grupo tratado com veh-veh-veh, ao passo que a anandamida na dose de 5pmol atenuou este comportamento (veh-veh-veh:0,273±0,117; veh-veh-BIC:8,090±1,551; veh-AEA5-BIC:1,558±0,651 ($F_{(7,53)}=19,17$; $p<0,0001$). Este efeito, entretanto, foi prevenido pelo pré-tratamento com AM251 na dose de 100pmol/0,1µL ($p>0,05$). O pré-tratamento com apenas o AM251 aumentou o tempo de fuga orientada para a toca quando comparado com o grupo veh-veh-BIC (AM251-veh-BIC:17,97±2,838; $p<0,001$). Os controles das drogas não apresentaram efeito estatisticamente significativo quando comparados com o grupo veh-veh-veh (veh-AEA5-veh:0; AM251-veh-veh:0,155±0,105; AM251-AEA5-veh:0,272±0,188; $p>0,05$).

Figura 10: Efeito da administração de anandamida (AEA 5pmol/0,1µl) sobre os comportamentos de fuga induzidos pela administração de bicuculina (BIC 40ng/0,1µL) na presença do AM251 (100pmol/0,1µL). Todas as administrações foram realizadas no VMHDM. Os dados representam a média ± EPM, n=8, 6, 9, 8, 7, 7, 8 e 8 da esquerda para a direita. ** representa $p < 0,01$ e *** representa $p < 0,001$ em relação ao grupo veh-veh-veh. ## representa $p < 0,01$ e ### representa $p < 0,001$ em relação ao grupo veh-veh-BIC (*Three-way ANOVA* seguida do teste *post-hoc* de Newman-Keuls).

A figura 11 apresenta os gráficos (média±EPM) referentes aos demais comportamentos que compreendem a frequência de escaladas (A), subidas na toca (B) e saltos na vertical (C). Houve significativa interação entre as três injeções na frequência de escalada, de subidas na toca e de saltos ($F_{(7,53)}=11,924$; $p<0,05$; $F_{(7,53)}=4,583$; $p<0,05$ e $F_{(7,53)}=4,836$; $p<0,05$ respectivamente).

A figura 11A apresenta o gráfico (média±EPM) de frequência de escalada. Similarmente ao experimento 1, a ANOVA seguida do teste *post hoc* Newman-Keuls indicou que, no experimento 2, o grupo tratado com veh-veh-BIC aumentou significativamente a frequência de escalada quando comparado com o grupo tratado com veh-veh-veh, ao passo que a anandamida na dose de 5pmol atenuou este comportamento (veh-veh-veh:0; veh-veh-BIC:10,11±2,530; veh-AEA5-BIC:0,875±0,295 ($F_{(7,53)}=8,455$; $p<0,0001$). Este efeito, entretanto, foi prevenido pelo pré-tratamento com AM251 na dose de 100pmol/0,1µL ($p>0,05$). Os controles das drogas não apresentaram efeito estatisticamente significativo quando comparados com o grupo veh-veh-veh (veh-AEA5-veh:0; AM251-veh-veh:0; AM251-AEA5-veh:0,286±0,286; $p>0,05$).

A figura 11B apresenta o gráfico (média±EPM) de frequência de subidas na toca. Similarmente ao experimento 1, a ANOVA seguida do teste *post hoc* Newman-Keuls indicou que, no experimento 2, o grupo tratado com veh-veh-BIC aumentou significativamente a frequência de subidas na toca, quando comparado com o grupo tratado com veh-veh-veh, ao passo que a anandamida na dose de 5pmol atenuou este comportamento (veh-veh-veh:0,750±0,412; veh-veh-BIC:9,222±1,479; veh-AEA5-BIC:1,625±0,625 ($F_{(7,53)}=14,93$; $p<0,0001$). Este efeito, entretanto, foi prevenido pelo pré-tratamento com AM251 na dose de 100pmol/0,1µL ($p>0,05$). Os controles das drogas não apresentaram efeito estatisticamente significativo quando comparados com o grupo veh-veh-veh (veh-AEA5-veh:0; AM251-veh-veh:0; AM251-AEA5-veh:0,286±0,286; $p>0,05$).

A figura 11C apresenta o gráfico (média±EPM) de frequência de saltos na vertical. Similarmente ao experimento 1, a ANOVA seguida do teste *post hoc* Newman-Keuls indicou que, no experimento 2, o grupo tratado com veh-veh-BIC aumentou significativamente a frequência de saltos na vertical quando comparado com o grupo tratado com veh-veh-veh, ao passo que a anandamida na dose de 5pmol atenuou este comportamento (veh-veh-veh:0; veh-veh-BIC:6,667±2,432; veh-AEA5-BIC:0,375±0,263 ($F_{(7,53)}=4,545$; $p<0,001$). Este efeito, entretanto, foi prevenido pelo pré-tratamento com AM251 na dose de 100pmol/0,1µL ($p>0,05$). Os controles das drogas não apresentaram efeito estatisticamente

significante quando comparados com o grupo veh-veh-veh (veh-AEA5-veh:0; AM251-veh-veh:0; AM251-AEA5-veh:0; $p>0,05$).

Figura 11: Efeito da administração de anandamida (AEA 5pmol/0,1µl) sobre os comportamentos orientados induzidos pela administração de bicuculina (BIC 40ng/0,1µL) na presença do AM251 (100pmol/0,1µL). Todas as administrações foram realizadas no VMHDM. Os dados representam a média $\pm$ EPM, $n=8, 6, 9, 8, 7, 7, 8$ e 8 da esquerda para a direita. * representa $p<0,05$, ** representa $p<0,01$ e *** representa $p<0,001$ em relação ao grupo veh-veh-veh. # representa $p<0,05$, ## representa $p<0,01$ e ### representa $p<0,001$ em relação ao grupo veh-veh-BIC (*Three-way ANOVA* seguida do teste *post-hoc* de Newman-Keuls)

A figura 12 apresenta os gráficos referentes aos comportamentos não defensivos que compreendem frequência e tempo de levantamento, número de entradas na toca e tempo de permanência na mesma, assim como frequência de cruzamentos.

Houve significativa interação entre a primeira e a segunda e entre as três injeções na frequência de levantamentos ($F_{(7,53)}=12,557$; $p<0,05$; $F_{(7,53)}=5,927$; $p<0,05$ respectivamente). Também houve interação entre a primeira e a segunda injeção no tempo de levantamentos ($F_{(7,53)}=5,927$; $p<0,05$).

A figura 12A apresenta o gráfico (média±EPM) de frequência de levantamentos. Similarmente ao experimento 1, a ANOVA seguida do teste *post hoc* Newman-Keuls indicou que, no experimento 2, o grupo tratado com veh-veh-BIC aumentou significativamente a frequência de levantamentos quando comparado com o grupo tratado com veh-veh-veh, ao passo que a anandamida na dose de 5pmol atenuou este comportamento (veh-veh-veh: $11,63\pm3,093$; veh-veh-BIC: $77,56\pm7,509$; veh-AEA5-BIC: $37,13\pm9,180$ ($F_{(7,53)}=16,92$; $p<0,0001$). Este efeito, entretanto, foi prevenido pelo pré-tratamento com AM251 na dose de 100pmol/0,1µL ($p>0,05$). Os controles das drogas não apresentaram efeito estatisticamente significativo quando comparados com o grupo veh-veh-veh (veh-AEA5-veh: $1,167\pm0,980$; AM251-veh-veh: $6,429\pm2,034$; AM251-AEA5-veh: $7,714\pm4,028$; $p>0,05$).

A figura 12B apresenta o gráfico (média±EPM) de tempo de levantamento. Similarmente ao experimento 1, a ANOVA seguida do teste *post hoc* Newman-Keuls indicou que, no experimento 2, o grupo tratado com veh-veh-BIC aumentou significativamente o tempo de levantamentos quando comparado com o grupo tratado com veh-veh-veh ao passo que a anandamida na dose de 5pmol atenuou este comportamento (veh-veh-veh: $14,95\pm4,015$; veh-veh-BIC: $48,27\pm5,168$; veh-AEA5-BIC: $27,04\pm6,432$ ($F_{(7,53)}=10,97$; $p<0,0001$). Este efeito, entretanto, foi prevenido pelo pré-tratamento com AM251 na dose de 100pmol/0,1µL ($p>0,05$). Os controles das drogas não apresentaram efeito estatisticamente significativo quando comparados com o grupo veh-veh-veh (veh-AEA5-veh: $0,834\pm0,783$; AM251-veh-veh: $8,194\pm2,784$; AM251-AEA5-veh: $8,196\pm4,462$; $p>0,05$).

Considerando a frequência de entradas na toca, houve significativa interação entre a primeira e a terceira injeção ($F_{(7,53)}=8,946$; $p<0,05$). No tempo de permanência na toca houve significativa interação entre a primeira e a segunda injeção ($F_{(7,53)}=4,901$; $p<0,05$).

A figura 12C apresenta o gráfico (média±EPM) de frequência de entradas na toca. Similarmente ao experimento 1, a ANOVA seguida do teste *post hoc* Newman-Keuls indicou que, no experimento 2, o grupo tratado com veh-veh-BIC aumentou significativamente a frequência de entradas na toca quando comparado com o grupo tratado com veh-veh-veh, ao

passo que a anandamida na dose de 5pmol atenuou este comportamento (veh-veh-veh:10,0±1,0; veh-veh-BIC:33,67±3,496; veh-AEA5-BIC:21,0±3,349 ($F_{(7,53)}=25,92$; $p<0,0001$). Este efeito, entretanto, foi prevenido pelo pré-tratamento com AM251 na dose de 100pmol/0,1μL ($p>0,05$). O pré-tratamento com apenas o AM251 aumentou a frequência de entradas na toca quando comparado com o grupo veh-veh-BIC (AM251-veh-BIC:44,38±4,251; $p<0,05$). Os controles das drogas não apresentaram efeito estatisticamente significativo quando comparados com o grupo veh-veh-veh (veh-AEA5-veh:3,833±0,401; AM251-veh-veh:7,0±1,512; AM251-AEA5-veh:5,571±0,841; $p>0,05$).

A figura 12D apresenta o gráfico (média±EPM) de tempo de permanência na toca. Similarmente ao experimento 1, a ANOVA seguida do teste *post hoc* Newman-Keuls indicou que, no experimento 2, o grupo tratado com veh-veh-BIC reduziu significativamente o tempo de permanência na toca quando comparado com o grupo tratado com veh-veh-veh, ao passo que a anandamida na dose de 5pmol aumentou este comportamento (veh-veh-veh:455,6±25,30; veh-veh-BIC:121,1±21,02; veh-AEA5-BIC:276,7±54,92 ($F_{(7,53)}=31,05$; $p<0,0001$). Este efeito, entretanto, foi prevenido pelo pré-tratamento com AM251 na dose de 100pmol/0,1μL ($p>0,05$). Os controles das drogas não apresentaram efeito estatisticamente significativo quando comparados com o grupo veh-veh-veh (veh-AEA5-veh:546,9±13,03; AM251-veh-veh:477,7±36,74; AM251-AEA5-veh:519,9±30,17; $p>0,05$).

Considerando a frequência de cruzamentos, houve significativa interação entre a primeira e a terceira injeção e entre a segunda e a terceira injeção ($F_{(7,53)}=9,184$; $p<0,05$; $F_{(7,53)}=10,328$; $p<0,05$).

A figura 12E apresenta o gráfico (média±EPM) de frequência de cruzamentos. Similarmente ao experimento 1, a ANOVA seguida do teste *post hoc* Newman-Keuls indicou que, no experimento 2, o grupo tratado com veh-veh-BIC aumentou significativamente a frequência de cruzamentos na toca, quando comparado com o grupo tratado com veh-veh-veh, ao passo que a anandamida na dose de 5pmol atenuou este comportamento (veh-veh-veh:96,0±10,61; veh-veh-BIC:522,6±52,60; veh-AEA5-BIC:277,9±42,93 ($F_{(7,53)}=44,64$; $p<0,0001$). Este efeito, entretanto, foi prevenido pelo pré-tratamento com AM251 na dose de 100pmol/0,1μL ($p>0,05$). Os controles das drogas não apresentaram efeito estatisticamente significativo quando comparados com o grupo veh-veh-veh (veh-AEA5-veh:43,67±4,595; AM251-veh-veh:59,71±8,058; AM251-AEA5-veh:58,43±11,61; $p>0,05$).

Figura 12: Efeito da administração de anandamida (AEA 5pmol/0,1 μ l) sobre o comportamentos de levantamento (A e B), o número de entradas na toca (C), o tempo de permanência dentro dela (D) e sobre a incidência de cruzamentos (E) induzidos pela administração de bicuculina (BIC 40ng/0,1 μ L) na presença do AM251 (100pmol/0,1 μ L). Todas as administrações foram realizadas no VMHDM. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n=8, 6, 9, 8, 7, 7, 8 e 8 da esquerda para a direita. * representa $p<0,05$, ** representa $p<0,01$ e *** representa $p<0,001$ em relação ao grupo veh-veh-veh. # representa $p<0,05$, ## representa $p<0,01$ e ### representa $p<0,001$ em relação ao grupo veh-veh-BIC (Three-way ANOVA seguida do teste *post-hoc* de Newman-Keuls).

5 DISCUSSÃO

O modelo experimental adotado neste estudo nos permite avaliar diversos comportamentos, tendo em vista que se trata de uma arena munida com toca, onde os animais foram previamente habituados. A riqueza de informações contidas nesse modelo pode ser observada nas figuras do presente trabalho. Desta forma, é possível avaliar mais detalhadamente os comportamentos uma vez que a toca, nestas condições experimentais, seria um lugar seguro para os animais, permitindo assim certo comportamento elaborado e em direção às possíveis rotas seguras de fuga.

No presente trabalho, a desinibição GABAérgica com microinjeções de antagonista de receptores GABA_A (bicuculina) na divisão dorso-medial do hipotálamo ventro-medial (VMHDM) induziu respostas comportamentais de defesa, caracterizadas principalmente por alerta e comportamentos de fuga nos primeiros seis minutos do etograma, além de intenso comportamento motor caracterizado por maior exploração da arena e levantamentos, quando comparado com o grupo controle. Por outro lado, como foi observado no experimento 1, a administração prévia do agonista de receptores endocanabinoides (anandamida) foi capaz de reduzir grande parte desses comportamentos, principalmente no que se refere à dose de 5 pmol/0,2µl.

O bloqueio dos receptores GABA_A no DMH (hipotálamo dorso-medial), no VMH e no PH (hipotálamo posterior) de ratos induz comportamentos defensivos similares aos provocados pela estimulação elétrica dessas estruturas (BIAGIONI et al., 2013; BIAGIONI; SILVA; COIMBRA, 2012; de FREITAS et al., 2013a,b; FREITAS et al., 2009), sugerindo uma inibição tônica do GABA também nessas áreas.

Esses resultados encontrados no presente trabalho são consistentes com estudos prévios que demonstraram que comportamentos defensivos podem ser eliciados através de estimulação química de núcleos hipotalâmicos como o DMH, VMH e PH (BIAGIONI et al., 2013; BIAGIONI; SILVA; COIMBRA, 2012; de FREITAS et al., 2013a,b; FREITAS et al., 2009; SHEKHAR, 1993) e, tendo como base o fato de que os neurônios presentes nas regiões dorso medial do hipotálamo estariam sob inibição tônica do GABA, o presente trabalho suporta essa hipótese e demonstra, pela primeira vez em um subnúcleo específico do hipotálamo (a divisão dorso-medial no núcleo ventro-medial) que o tratamento com antagonista GABA_A (bicuculina) altera todos os padrões de comportamentos analisados. Tais dados supracitados são condizentes com os descritos em estudos com estimulação elétrica e química de estruturas prosencefálicas e mesencefálicas (COIMBRA et al., 2006; de FREITAS

et al., 2013a,b; FREITAS et al., 2009; GRAEFF et al., 1986a,b), assemelhando-se muito a padrões comportamentais observados em animais expostos a ameaças naturais.

Neste estudo, diversos comportamentos foram caracterizados, tais como fuga orientada, onde é destacado o comportamento de fuga orientada diretamente para a toca, a qual reveste-se das características sugestivas de um lugar seguro para o animal. Outras análises incluem o comportamento de escalada nas bordas do aparato (arena), frequência de subidas na toca e também saltos apresentados exclusivamente na vertical, ou seja, direcionados para cima, em direção à saída da arena. Esses últimos vêm corroborar a ideia da existência de comportamentos mais bem elaborados (URIBE-MARIÑO et al., 2012; TWARDOWSCHY et al., 2013), organizados pelo hipotálamo medial, ou seja, uma fuga orientada para uma possível saída do ambiente de estimulação aversiva.

Nesse sentido, outros estudos têm relatado que a estimulação de áreas hipotalâmicas tem evocado comportamentos defensivos mais bem orientados e elaborados (de FREITAS et al., 2013a,b; FREITAS et al., 2009) quando comparados com estimulação de estruturas mesencefálicas (COIMBRA et al., 2006) onde se nota um comportamento explosivo caracterizado por um aumento súbito de corridas e principalmente saltos horizontais, ao passo que os saltos evocados por estimulação do hipotálamo medial são orientados verticalmente (DI SCALA; SCHMITT; KARLI, 1984). Em adição, reações de defesa induzidas pela estimulação do hipotálamo medial têm sido caracterizadas por rápidos movimentos coordenados intercalados com tentativas de fuga direcionada (DI SCALA; SCHMITT; KARLI, 1984; BRANDÃO et al., 1986; MILANI; GRAEFF, 1987; SILVEIRA; GRAEDD, 1992; de FREITAS et al., 2013a,b; FREITAS et al., 2009), o que corrobora os dados encontrados neste trabalho. É interessante notar que tem sido descrito que respostas defensivas mais atenuadas e brandas são vistas mediante uma desinibição GABAérgica no hipotálamo dorso-medial quando comparado com o mesmo tratamento no hipotálamo posterior (BIAGIONI; SILVA; COIMBRA, 2012). Somando-se a esses dados, respostas defensivas eliciadas na presença de um predador natural aumentam a expressão de proteína Fos no núcleo anterior do hipotálamo, na parte dorso-medial no núcleo ventro-medial e no núcleo pré-mamilar dorsal do hipotálamo, regiões propostas como parte do sistema hipotalâmico medial de defesa (CANTERAS et al., 1997). Todos esses dados sugerem que diferentes áreas hipotalâmicas podem estar envolvidas em diferentes situações aversivas e podem ser recrutadas de maneira diferente de acordo com o tipo de comportamento evocado, especialmente naquelas situações experimentais onde existe uma possível rota de fuga.

Apesar de alguns estudos relatarem comportamentos de imobilidade defensiva ou “congelamento” (BIAGIONI; SILVA; COIMBRA, 2012; FREITAS et al., 2009), no presente estudo este comportamento não foi observado; porém, notou-se um grande aumento tanto na frequência quanto no tempo de alerta. Neste sentido, outros estudos têm relatado que comportamentos de imobilidade defensiva têm sido observados mais comumente após a ativação glutamatérgica ou inibição GABAérgica em áreas mesencefálicas (FERREIRA-NETO; BORELLI; BRANDÃO, 2007; BRANDÃO; de AGUIAR; GRAEFF, 1982; COIMBRA; TOMAZ; BRANDÃO, 1992). É possível que mesmo considerando o hipotálamo medial, respostas de imobilidade defensiva sejam organizadas por discretos agrupamentos neurônicos ativados em trabalhos pregressos, mas não o foram no presente estudo.

Como descrito anteriormente, microinjeções de aminoácidos excitatórios ou drogas que diminuem a neurotransmissão GABAérgica em estruturas que compreendem o sistema encefálico de defesa induzem diversas respostas defensivas organizadas ou não (CANTERAS, 2002) que ainda carecem de melhores esclarecimentos e definições a respeito de sua organização precisa. Esses comportamentos são correlatos de ataques de pânico em humanos e têm sido propostos como um modelo de ataque de pânico, considerando sua validação neurofisiológica e previsibilidade farmacológica (DEAKIN; GRAEFF, 1991; JENCK; MOREAU; MARTIN, 1995; SCHENBERG et al., 2001).

Tendo como foco os comportamentos orientados induzidos pela administração de bicuculina no VMHDM, a fuga orientada foi reduzida pela administração prévia de anandamida nas doses de 0,5 e 5pmol/0,2µl, na mesma estrutura. Entretanto, a duração dessa fuga orientada foi diminuída pelo tratamento local com anandamida apenas na dose de 5pmol/0,2µl. Outros comportamentos característicos dessa fuga orientada (escaladas e subidas na toca) também foram atenuados pela anandamida nessa dose, enquanto que a frequência de saltos na vertical foram reduzidos por anandamida na concentração de 0,5 e de 5pmol/0,2µl.

No experimento 2, nota-se que a dose (100pmol) utilizada do antagonista de receptores CB₁ (AM251) foi capaz de reverter o efeito atenuador da anandamida sobre a resposta da bicuculina, sugerindo que a ativação de receptores canabinoides do tipo 1, mais frequentemente descritos no sistema nervoso central, pode modular as respostas de pânico nesta região diencefálica. Similarmente a este trabalho, recentes pesquisas têm demonstrado que administração de anandamida na mesma dose utilizada neste estudo mostrou-se capaz de atenuar respostas de fuga induzida pela administração de um doador de óxido nítrico (SIN-1) na SCPd, e o pré-tratamento do *tectum* com AM251 aumentou, ao invés de diminuir ou reverter, as reações induzidas pelo SIN-1 (LISBOA; GUIMARÃES, 2012). No mesmo

estudo, os autores descrevem, ainda, que doses elevadas de anandamida não foram capazes de atenuar essas respostas; entretanto, o bloqueio prévio de receptores TRPV1 (receptor vaniloide de potencial transitório do tipo 1) comumente encontrado em áreas encefálicas envolvidas com estados aversivos, foi capaz de tornar altas doses de anandamida efetivas em reduzir as reações induzidas pelo doador de óxido nítrico.

Assim como descrito por Lisboa e Guimarães (2012), o pré-tratamento apenas com AM251 aumentou, ao invés de diminuir ou não alterar, as reações tanto de fuga não orientada quanto de fuga orientada para a toca induzidas pela bicuculina. Nosso grupo tem considerando a existência de transmissões no VMHDM mediada por neurônios GABAérgicos e glutamatérgicos, as quais modulam um outro neurônio efetor responsável por desencadear o comportamento defensivo. No pré-tratamento apenas com o antagonista CB₁, hipoteticamente, possibilitar-se-ia que a anandamida endógena se ligasse a receptores TRPV1 pós-sinápticos e ativasse ainda mais esse neurônio efetor, somando-se aos comportamentos induzidos pelo bloqueio GABAérgico no local. Contudo, não podemos afastar uma possível atividade facilitatória intrínseca do AM251 no sistema motor. Com efeito há evidências de que a administração de 20 mg de rimonabant, um antagonista/agonista inverso de receptor CB1 em seres humanos causa um aumento da excitabilidade de neurônios motores corticais e espinais (OLIVIERO et al., 2012).

Não obstante, outros autores têm proposto que ligantes endógenos desses receptores, possivelmente a anandamida, podem exercer efeitos panicolíticos ou panicogênicos via ativação de receptores CB1 e TRPV1, respectivamente (CASAROTTO et al., 2012).

No presente trabalho, doses elevadas (50pmol) de anandamida não foram suficientes para reverter o efeito induzido pela bicuculina. Altas doses desse agonista têm sido relatadas como ansiogênicas, diferentemente de baixas doses relatadas como ansiolíticas (CHHATWAL; RESSLER, 2007). Tal fato se deve, possivelmente, à ativação de receptores TRPV1 e CB1, respectivamente. De acordo com essa visão, alguns estudos têm demonstrado que antagonistas TRPV1 apresentam efeitos antiaversivos, possivelmente por permitirem que a anandamida endógena se ligue diretamente a receptores CB1. O mesmo é verdade se bloquearmos o efeito panicolítico da capsazepina (antagonista TRPV1) através do pré-tratamento com antagonistas CB1 (ALMEIDA-SANTOS et al., 2013).

Levando em consideração o primeiro experimento, e que altas doses de anandamida não foram capazes de reverter os efeitos causados pela administração intra-hipotalâmica de bicuculina, como fora observado na dose de 5pmol, sugere-se que essa alta

dose de anandamida utilizada no experimento 1 possa se tornar efetiva na presença de um antagonista TRPV1, merecendo investigações mais aprofundadas a respeito dessa possibilidade. Dessa forma, nossos dados vão ao encontro desses estudos prévios e contribuem para melhor explicar o papel desses receptores nas estruturas envolvidas com reações defensivas.

Neste modelo experimental, e como observado no experimento 1, a anandamida induziu uma curva dose resposta característica de compostos canabinoides usados em outros modelos experimentais (MOREIRA; AGUIAR; GUIMARÃES, 2007; ALMEIDA-SANTOS et al., 2013). A curva em U apresentada no presente estudo, no que se refere ao tratamento do hipotálamo medial com anandamida, mostrou-se diferente daquela curva em U invertida descrita por outros autores. Isso pode dever-se ao fato de que o estímulo usado para evocar o comportamento de defesa no presente trabalho foi a microinjeção intra-hipotalâmica de bicuculina, o que se mostra diferente da indução do comportamento de defesa por estímulos naturais (URIBE-MARIÑO et al., 2012), como a exposição a estressores. No entanto, os tratamentos farmacológicos utilizados no presente estudo vêm contribuir para reforçar o papel na divisão dorso-medial do núcleo hipotalâmico ventro-medial na organização do comportamento de defesa inato, e que as vias endocanabinoides modulam a expressão de comportamento relacionado ao medo inato e ao pânico.

Conclusão

6 CONCLUSÃO

No presente trabalho, os resultados obtidos nos permitem sugerir a participação efetiva do sistema GABAérgico da divisão dorso-medial do núcleo hipotalâmico ventro-medial na modulação tônica de neurônios envolvidos com a elaboração de comportamentos defensivos. Como as respostas de defesa evocadas pelo bloqueio de receptores GABA_A no VMHDM foram atenuadas pelo pré-tratamento local com anandamida e revertidas na presença do AM251, podemos, ainda, sugerir que os endocanabinoides também atuam modulando esse substrato neural, possivelmente via receptores CB₁.

Referências

REFERÊNCIAS¹

Adams, D. B. (2006). "Brain mechanisms of aggressive behavior: an updated review." *Neurosci Biobehav Rev* 30(3): 304-318.

Alger, B. E. (2002). "Retrograde signaling in the regulation of synaptic transmission: focus on endocannabinoids." *Prog Neurobiol* 68(4): 247-286.

Almeida-Santos, A. F., F. A. Moreira, et al. (2013). "Role of TRPV1 receptors on panic-like behaviors mediated by the dorsolateral periaqueductal gray in rats." *Pharmacol Biochem Behav* 105: 166-172.

Barna, I., D. Zelena, et al. (2004). "The role of endogenous cannabinoids in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis regulation: in vivo and in vitro studies in CB1 receptor knockout mice." *Life Sci* 75(24): 2959-2970.

Biagioni, A. F., R. L. de Freitas, et al. (2013). "Serotonergic neural links from the dorsal raphe nucleus modulate defensive behaviours organised by the dorsomedial hypothalamus and the elaboration of fear-induced antinociception via locus coeruleus pathways." *Neuropharmacology* 67: 379-394.

Biagioni, A. F., J. A. Silva, et al. (2012). "Panic-like defensive behavior but not fear-induced antinociception is differently organized by dorsomedial and posterior hypothalamic nuclei of *Rattus norvegicus* (Rodentia, Muridae)." *Braz J Med Biol Res* 45(4): 328-336.

Blanchard, D. C. and R. J. Blanchard (1988). "Ethoexperimental approaches to the biology of emotion." *Annu Rev Psychol* 39: 43-68.

Blanchard, D. C., G. Griebel, et al. (2001). "Mouse defensive behaviors: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic." *Neurosci Biobehav Rev* 25(3): 205-218.

Blanchard, R. J., G. Griebel, et al. (1997). "Differentiation of anxiolytic and panicolytic drugs by effects on rat and mouse defense test batteries." *Neurosci Biobehav Rev* 21(6): 783-789.

Blanchard, R. J., E. B. Yudko, et al. (1993). "Defense system psychopharmacology: An ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety." *Behavioural Brain Research* 58(1-2): 155-165.

Bortolato, M., P. Campolongo, et al. (2006). "Anxiolytic-like properties of the anandamide transport inhibitor AM404." *Neuropsychopharmacology* 31(12): 2652-2659.

Brandao, M. L., V. Z. Anseloni, et al. (1999). "Neurochemical mechanisms of the defensive behavior in the dorsal midbrain." *Neurosci Biobehav Rev* 23(6): 863-875.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas . NBR 6023.

Brandao, M. L., J. C. de Aguiar, et al. (1982). "GABA mediation of the anti-aversive action of minor tranquilizers." *Pharmacol Biochem Behav* 16(3): 397-402.

Brandao, M. L., G. Di Scala, et al. (1986). "Escape behavior produced by the blockade of glutamic acid decarboxylase (GAD) in mesencephalic central gray or medial hypothalamus." *Pharmacol Biochem Behav* 24(3): 497-501.

Brandao, M. L., C. Tomaz, et al. (1988). "Defense reaction induced by microinjections of bicuculline into the inferior colliculus." *Physiol Behav* 44(3): 361-365.

Breivogel, C. S. and S. R. Childers (1998). "The functional neuroanatomy of brain cannabinoid receptors." *Neurobiol Dis* 5(6 Pt B): 417-431.

Canteras, N. S. (2002). "The medial hypothalamic defensive system: hodological organization and functional implications." *Pharmacol Biochem Behav* 71(3): 481-491.

Canteras, N. S., S. Chiavegatto, et al. (1997). "Severe reduction of rat defensive behavior to a predator by discrete hypothalamic chemical lesions." *Brain Res Bull* 44(3): 297-305.

Canteras, N. S., E. R. Ribeiro-Barbosa, et al. (2001). "Tracing from the dorsal premammillary nucleus prosencephalic systems involved in the organization of innate fear responses." *Neurosci Biobehav Rev* 25(7-8): 661-668.

Cardoso, S. H., N. C. Coimbra, et al. (1994). "Defensive reactions evoked by activation of NMDA receptors in distinct sites of the inferior colliculus." *Behav Brain Res* 63(1): 17-24.

Casarotto, P.C., et al. (2012). "Opposing roles for cannabinoid receptor type-1 (CB(1)) and transient receptor potential vanilloid type-1 channel (TRPV1) on the modulation of panic-like responses in rats." *Neuropsychopharmacology*. 37, 478-486

Chaperon, F. and M. H. Thiebot (1999). "Behavioral effects of cannabinoid agents in animals." *Crit Rev Neurobiol* 13(3): 243-281.

Chhatwal, J. P. and K. J. Ressler (2007). "Modulation of fear and anxiety by the endogenous cannabinoid system." *CNS Spectr* 12(3): 211-220.

Coimbra, N. C., R. De Oliveira, et al. (2006). "Neuroanatomical approaches of the tectum-reticular pathways and immunohistochemical evidence for serotonin-positive perikarya on neuronal substrates of the superior colliculus and periaqueductal gray matter involved in the elaboration of the defensive behavior and fear-induced analgesia." *Exp Neurol* 197(1): 93-112.

Coimbra, N. C., G. C. Eichenberger, et al. (1996). "Effects of the blockade of opioid receptor on defensive reactions elicited by electrical stimulation within the deep layers of the superior colliculus and DPAG." *Brain Res* 736(1-2): 348-352.

Coimbra, N. C., C. Tomaz, et al. (1992). "Evidence for the involvement of serotonin in the antinociception induced by electrical or chemical stimulation of the mesencephalic tectum." *Behavioural Brain Research* 50(1-2): 77-83.

Compton, D. R., M. D. Aceto, et al. (1996). "In vivo characterization of a specific cannabinoid receptor antagonist (SR141716A): inhibition of delta 9-tetrahydrocannabinol-induced responses and apparent agonist activity." *J Pharmacol Exp Ther* 277(2): 586-594.

Cota, D., G. Marsicano, et al. (2003). "The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis." *J Clin Invest* 112(3): 423-431.

Curran, H. V., C. Brignell, et al. (2002). "Cognitive and subjective dose-response effects of acute oral Delta 9-tetrahydrocannabinol (THC) in infrequent cannabis users." *Psychopharmacology (Berl)* 164(1): 61-70.

Darwin, C. "A expressão das emoções no homem e nos animais". Título original: *The expression of emotion in man and animals*, 1872. Companhia das Letras, 4^a ed. Schwarcz, 2004.

de Freitas, R. L., C. J. Salgado-Rohner, et al. (2013a). "Involvement of prelimbic medial prefrontal cortex in panic-like elaborated defensive behaviour and innate fear-induced antinociception elicited by GABAA receptor blockade in the dorsomedial and ventromedial hypothalamic nuclei: role of the endocannabinoid CB1 receptor." *Int J Neuropsychopharmacol* 16(8): 1781-1798.

de Freitas, R. L., C. J. Salgado-Rohner, et al. (2013b). "NMDA and AMPA/Kainate Glutamatergic Receptors in the Prelimbic Medial Prefrontal Cortex Modulate the Elaborated Defensive Behavior and Innate Fear-Induced Antinociception Elicited by GABAA Receptor Blockade in the Medial Hypothalamus." *Cereb Cortex*.

Deakin, J. F. and F. G. Graeff (1991). "5-HT and mechanisms of defence." *J Psychopharmacol* 5(4): 305-315.

Demuth, D. G. and A. Molleman (2006). "Cannabinoid signalling." *Life Sci* 78(6): 549-563.

Devane, W. A., F. A. Dysarz, 3rd, et al. (1988). "Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain." *Mol Pharmacol* 34(5): 605-613.

Devane, W. A., L. Hanus, et al. (1992). "Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor." *Science* 258(5090): 1946-1949.

Di Marzo, V., D. Melck, et al. (1998). "Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action." *Trends Neurosci* 21(12): 521-528.

Di Scala, G., P. Schmitt, et al. (1984). "Flight induced by infusion of bicuculline methiodide into periventricular structures." *Brain Res* 309(2): 199-208.

Eichenberger, G. C., S. J. Ribeiro, et al. (2002). "Neuroanatomical and psychopharmacological evidence for interaction between opioid and GABAergic neural pathways in the modulation of fear and defense elicited by electrical and chemical stimulation of the deep layers of the superior colliculus and dorsal periaqueductal gray matter." *Neuropharmacology* 42(1): 48-59.

ElSohly, M. A. (2002). "Chemical constituents of cannabis". In: Grotenhermen, F., Russo, E. *Cannabis and Cannabinoids Pharmacology, Toxicology and Therapeutic Potential*. Haworth Press, New York, 27-36.

Ferreira-Netto, C., K. G. Borelli, et al. (2007). "Distinct Fos expression in the brain following freezing behavior elicited by stimulation with NMDA of the ventral or dorsal inferior colliculus." *Exp Neurol* 204(2): 693-704.

Finn, D. P., M. D. Jhaveri, et al. (2003). "Effects of direct periaqueductal grey administration of a cannabinoid receptor agonist on nociceptive and aversive responses in rats." *Neuropharmacology* 45(5): 594-604.

Freitas, R. L., A. Uribe-Marino, et al. (2009). "GABA(A) receptor blockade in dorsomedial and ventromedial nuclei of the hypothalamus evokes panic-like elaborated defensive behaviour followed by innate fear-induced antinociception." *Brain Res* 1305: 118-131.

Freund, T. F., I. Katona, et al. (2003). "Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling." *Physiol Rev* 83(3): 1017-1066.

Gaoni, Y. and R. Mechoulam (1964). "Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish." *Journal of the American Chemical Society* 86(8): 1646-1647.

Gatley, S. J., R. Lan, et al. (1998). "Imaging the brain marijuana receptor: development of a radioligand that binds to cannabinoid CB1 receptors in vivo." *J Neurochem* 70(1): 417-423.

Gobbi, G., F. R. Bambico, et al. (2005). "Antidepressant-like activity and modulation of brain monoaminergic transmission by blockade of anandamide hydrolysis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(51): 18620-18625.

Gong, J. P., E. S. Onaivi, et al. (2006). "Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain." *Brain Res* 1071(1): 10-23.

Goodchild, A. K., R. A. Dampney, et al. (1982). "A method for evoking physiological responses by stimulation of cell bodies, but not axons of passage, within localized regions of the central nervous system." *J Neurosci Methods* 6(4): 351-363.

Graeff, F. G. (1994). "Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviors and related emotions in mammals." *Braz J Med Biol Res* 27(4): 811-829.

Graeff, F. G., M. L. Brandao, et al. (1986a). "Modulation of the brain aversive system by GABAergic and serotonergic mechanisms." *Behav Brain Res* 22(2): 173-180.

Graeff, F. G., M. L. Brandao, et al. (1986b). "Role of GABA in the anti-aversive action of anxiolytics." *Adv Biochem Psychopharmacol* 42: 79-86.

Graeff, F. G., C. F. Netto, et al. (1998). "The elevated T-maze as an experimental model of anxiety." *Neurosci Biobehav Rev* 23(2): 237-246.

Graeff, F. G.; Guimarães, F. S. (2012). "Fundamentos da Psicofarmacologia". Atheneu.

Graeff, F. G. "Brain defense systems and anxiety". In: *Handbook of Anxiety*. M. Roth, M., G. D. Burrows, G. D., Noyes, R. vol. 3, Elsevier Science Publishers, Amsterdam (1990) p. 307-354.

Guimaraes-Costa, R., M. B. Guimaraes-Costa, et al. (2007). "Innate defensive behaviour and panic-like reactions evoked by rodents during aggressive encounters with Brazilian constrictor snakes in a complex labyrinth: behavioural validation of a new model to study affective and agonistic reactions in a prey versus predator paradigm." *J Neurosci Methods* 165(1): 25-37.

Haller, J., N. Bakos, et al. (2002). "The effects of genetic and pharmacological blockade of the CB1 cannabinoid receptor on anxiety." *Eur J Neurosci* 16(7): 1395-1398.

Herkenham, M., A. B. Lynn, et al. (1991). "Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study." *J Neurosci* 11(2): 563-583.

Herkenham, M., A. B. Lynn, et al. (1990). "Cannabinoid receptor localization in brain." *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(5): 1932-1936.

Hess, W. and Brugger, M. (1943). "Das subkortikale zentrum der affektiven abwreaktion". *Helv. Physiol. Pharmacol. Acta.*, 1: 33-52.

Hill, M. N. and B. B. Gorzalka (2005). "Pharmacological enhancement of cannabinoid CB1 receptor activity elicits an antidepressant-like response in the rat forced swim test." *Eur Neuropsychopharmacol* 15(6): 593-599.

Howlett, A. C., F. Barth, et al. (2002). "International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors." *Pharmacol Rev* 54(2): 161-202.

Iversen, L. (2003). "Cannabis and the brain." *Brain* 126(6): 1252-1270.

Jenck, F., J. L. Moreau, et al. (1995). "Dorsal periaqueductal gray-induced aversion as a simulation of panic anxiety: elements of face and predictive validity." *Psychiatry Res* 57(2): 181-191.

Jiang, W., Y. Zhang, et al. (2005). "Cannabinoids promote embryonic and adult hippocampus neurogenesis and produce anxiolytic- and antidepressant-like effects." *J Clin Invest* 115(11): 3104-3116.

Kathuria, S., S. Gaetani, et al. (2003). "Modulation of anxiety through blockade of anandamide hydrolysis." *Nat Med* 9(1): 76-81.

Katona, I., B. Sperlagh, et al. (1999). "Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons." *J Neurosci* 19(11): 4544-4558.

Ledent, C., O. Valverde, et al. (1999). "Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice." *Science* 283(5400): 401-404.

Lin, H. C., S. C. Mao, et al. (2009). "The role of prefrontal cortex CB1 receptors in the modulation of fear memory." *Cereb Cortex* 19(1): 165-175.

Lisboa, S. F. and F. S. Guimaraes (2012). "Differential role of CB1 and TRPV1 receptors on anandamide modulation of defensive responses induced by nitric oxide in the dorsolateral periaqueductal gray." *Neuropharmacology* 62(8): 2455-2462.

Lobao-Soares, B., R. Walz, et al. (2008). "Cellular prion protein modulates defensive attention and innate fear-induced behaviour evoked in transgenic mice submitted to an agonistic encounter with the tropical coral snake *Oxyrhopus guibei*." *Behav Brain Res* 194(2): 129-137.

Machado, A. M. (2006). "Neuroanatomia Funcional". 2.ed. São Paulo: Atheneu.

Maldonado, R., F. Berrendero, et al. (2011). "Neurochemical basis of cannabis addiction." *Neuroscience* 181(0): 1-17.

Marsicano, G. and B. Lutz (1999). "Expression of the cannabinoid receptor CB1 in distinct neuronal subpopulations in the adult mouse forebrain." *Eur J Neurosci* 11(12): 4213-4225.

Masserano, J. M., F. Karoum, et al. (1999). "SR 141716A, a CB1 cannabinoid receptor antagonist, potentiates the locomotor stimulant effects of amphetamine and apomorphine." *Behav Pharmacol* 10(4): 429-432.

Matsuda, L. A., T. I. Bonner, et al. (1993). "Localization of cannabinoid receptor mRNA in rat brain." *J Comp Neurol* 327(4): 535-550.

McLaughlin, R. J., M. N. Hill, et al. (2007). "Local enhancement of cannabinoid CB1 receptor signalling in the dorsal hippocampus elicits an antidepressant-like effect." *Behav Pharmacol* 18(5-6): 431-438.

McNaughton, N. and P. J. Corr (2004). "A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance." *Neurosci Biobehav Rev* 28(3): 285-305.

Mechoulam, R., E. Fride, et al. (1998). "Endocannabinoids." *Eur J Pharmacol* 359(1): 1-18.

Mechoulam, R. and L. Hanus (2002). "Cannabidiol: an overview of some chemical and pharmacological aspects. Part I: chemical aspects." *Chem Phys Lipids* 121(1-2): 35-43.

Micale, V., L. Cristino, et al. (2009). "Anxiolytic effects in mice of a dual blocker of fatty acid amide hydrolase and transient receptor potential vanilloid type-1 channels." *Neuropsychopharmacology* 34(3): 593-606.

Milani, H. and F. G. Graeff (1987). "GABA-benzodiazepine modulation of aversion in the medial hypothalamus of the rat." *Pharmacol Biochem Behav* 28(1): 21-27.

Moreira, F. A., D. C. Aguiar, et al. (2007). "Anxiolytic-like effect of cannabinoids injected into the rat dorsolateral periaqueductal gray." *Neuropharmacology* 52(3): 958-965.

Moreira, F. A., N. Kaiser, et al. (2008). "Reduced anxiety-like behaviour induced by genetic and pharmacological inhibition of the endocannabinoid-degrading enzyme fatty acid amide hydrolase (FAAH) is mediated by CB1 receptors." *Neuropharmacology* 54(1): 141-150.

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

Munro, S., K. L. Thomas, et al. (1993). "Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids." *Nature* 365(6441): 61-65.

Naderi, N., A. Haghparast, et al. (2008). "Interaction between cannabinoid compounds and diazepam on anxiety-like behaviour of mice." *Pharmacol Biochem Behav* 89(1): 64-75.

Naidu, P. S., S. A. Varvel, et al. (2007). "Evaluation of fatty acid amide hydrolase inhibition in murine models of emotionality." *Psychopharmacology (Berl)* 192(1): 61-70.

Nutt, D. J. (1990). "The pharmacology of human anxiety." *Pharmacol Ther* 47(2): 233-266.

Oliviero, A., et al., CB1 receptor antagonism/inverse agonism increases motor system excitability in humans. *European Neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, 2012. 22(1): p. 27-35

Osaki, M. Y., L. Castellan-Baldan, et al. (2003). "Neuroanatomical and neuropharmacological study of opioid pathways in the mesencephalic tectum: effect of mu(1)- and kappa-opioid receptor blockade on escape behavior induced by electrical stimulation of the inferior colliculus." *Brain Res* 992(2): 179-192.

Paria, B. C., W. Ma, et al. (1998). "Effects of cannabinoids on preimplantation mouse embryo development and implantation are mediated by brain-type cannabinoid receptors." *Biol Reprod* 58(6): 1490-1495.

Patel, S. and C. J. Hillard (2006). "Pharmacological evaluation of cannabinoid receptor ligands in a mouse model of anxiety: further evidence for an anxiolytic role for endogenous cannabinoid signaling." *J Pharmacol Exp Ther* 318(1): 304-311.

- Paxinos, G., Watson, C. (2007). "The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates." Academic Press, Sidney.
- Pertwee, R. G. (1997). "Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors." *Pharmacol Ther* 74(2): 129-180.
- Pertwee, R. G. (2001). "Cannabinoid receptors and pain." *Prog Neurobiol* 63(5): 569-611.
- Pertwee, R. G. "Canabinoids." In: *Handbook of Experimental Pharmacology*. Pertwee, R. G. Vol 168. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2005; p-754.
- Pettit, D. A., M. P. Harrison, et al. (1998). "Immunohistochemical localization of the neural cannabinoid receptor in rat brain." *J Neurosci Res* 51(3): 391-402.
- Porter, A. C., J. M. Sauer, et al. (2002). "Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor." *J Pharmacol Exp Ther* 301(3): 1020-1024.
- Realini, N., D. Vigano, et al. (2011). "Chronic URB597 treatment at adulthood reverted most depressive-like symptoms induced by adolescent exposure to THC in female rats." *Neuropharmacology* 60(2-3): 235-243.
- Resstel, L. B., S. F. Lisboa, et al. (2008). "Activation of CB1 cannabinoid receptors in the dorsolateral periaqueductal gray reduces the expression of contextual fear conditioning in rats." *Psychopharmacology (Berl)* 198(3): 405-411.
- Ribeiro, S. J., J. G. Ciscato, Jr., et al. (2005). "Functional and ultrastructural neuroanatomy of interactive intratectal/tectonigral mesencephalic opioid inhibitory links and nigrotectal GABAergic pathways: involvement of GABAA and mu1-opioid receptors in the modulation of panic-like reactions elicited by electrical stimulation of the dorsal midbrain." *J Chem Neuroanat* 30(4): 184-200.
- Rubino, T., C. Guidali, et al. (2008a). "CB1 receptor stimulation in specific brain areas differently modulate anxiety-related behaviour." *Neuropharmacology* 54(1): 151-160.
- Rubino, T., N. Realini, et al. (2008b). "Role in anxiety behavior of the endocannabinoid system in the prefrontal cortex." *Cereb Cortex* 18(6): 1292-1301.
- Rutkowska, M., J. Jamontt, et al. (2006). "Effects of cannabinoids on the anxiety-like response in mice." *Pharmacol Rep* 58(2): 200-206.
- Schenberg, L. C., A. S. Bittencourt, et al. (2001). "Modeling panic attacks." *Neurosci Biobehav Rev* 25(7-8): 647-659.
- Scherma, M., J. Medalie, et al. (2008). "The endogenous cannabinoid anandamide has effects on motivation and anxiety that are revealed by fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibition." *Neuropharmacology* 54(1): 129-140.

Schlicker, E. and M. Kathmann (2001). "Modulation of transmitter release via presynaptic cannabinoid receptors." *Trends Pharmacol Sci* 22(11): 565-572.

Schuel, H., M. Chang, et al. (1999). *Cannabinoid Receptors in Sperm. Marijuana and Medicine*. G. Nahas, K. Sutin, D. Harvey et al, Humana Press: 335-345.

Shekhar, A. (1993). "GABA receptors in the region of the dorsomedial hypothalamus of rats regulate anxiety in the elevated plus-maze test. I. Behavioral measures." *Brain Res* 627(1): 9-16.

Shekhar, A. (1994). "Effects of treatment with imipramine and clonazepam on an animal model of panic disorder." *Biol Psychiatry* 36(11): 748-758.

Silveira, M. C. and F. G. Graeff (1992). "Defense reaction elicited by microinjection of kainic acid into the medial hypothalamus of the rat: antagonism by a GABAA receptor agonist." *Behav Neural Biol* 57(3): 226-232.

Stein, D. J. and C. Bouwer (1997). "A neuro-evolutionary approach to the anxiety disorders." *J Anxiety Disord* 11(4): 409-429.

Sugiura, T., S. Kondo, et al. (1995). "2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain." *Biochem Biophys Res Commun* 215(1): 89-97.

Szabo, B. and E. Schlicker (2005). "Effects of cannabinoids on neurotransmission." *Handb Exp Pharmacol*(168): 327-365.

Tsou, K., S. Brown, et al. (1998). "Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system." *Neuroscience* 83(2): 393-411.

Twardowsky, A., et al.. (2013) "The role of 5-HT1A receptors in the anti-aversive effects of cannabidiol on panic attack-like behaviors evoked in the presence of the wild snake *Epicrates cenchria crassus* (Reptilia, Boidae)". *J Psychopharmacol* 27:1149-1159

Uribe-Marino, A., A. Francisco, et al. (2012). "Anti-aversive effects of cannabidiol on innate fear-induced behaviors evoked by an ethological model of panic attacks based on a prey vs the wild snake *Epicrates cenchria crassus* confrontation paradigm." *Neuropsychopharmacology* 37(2): 412-421.

Uriguen, L., S. Perez-Rial, et al. (2004). "Impaired action of anxiolytic drugs in mice deficient in cannabinoid CB1 receptors." *Neuropharmacology* 46(7): 966-973.

Walker, J. M., J. F. Krey, et al. (2002). "Endocannabinoids and related fatty acid derivatives in pain modulation." *Chem Phys Lipids* 121(1-2): 159-172.

Zarrindast, M. R., S. Sarahroodi, et al. (2008). "Cannabinoid CB1 receptors of the rat central amygdala mediate anxiety-like behavior: interaction with the opioid system." *Behav Pharmacol* 19(7): 716-723.