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

ANNA BÁRBARA BORGES DE ASSIS

**Participação do sistema endocanabinoide no núcleo leito da estria terminal
sobre respostas de ansiedade em ratos**

Ribeirão Preto

2017

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

ANNA BÁRBARA BORGES DE ASSIS

**Participação do sistema endocanabinoide no núcleo leito da estria terminal
sobre respostas de ansiedade em ratos**

Versão Corrigida

A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de
São Paulo para obtenção do grau de Mestre em Ciências,
Área de concentração: Farmacologia
ORIENTADOR: Prof. Dr. Leonardo Resstel Barbosa Moraes

Ribeirão Preto
2017

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

FICHA CATALOGRÁFICA

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

Borges-Assis, Anna Bárbara

Participação do sistema endocanabinoide no núcleo leito da estria terminal sobre respostas de ansiedade em ratos./ Anna Bárbara Borges de Assis; orientador: Leonardo Resstel Barbosa Moraes. – Ribeirão Preto, 2017.

71 f.

Dissertação (Mestrado)--Universidade de São Paulo, 2017.

1. Núcleo Leito da Estria Terminal 2. Endocanabinoides
.3. Resposta emocional condicionada. 4. Ansiedade.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: BORGES-ASSIS, Anna Bárbara

Título: Participação do sistema endocanabinoide no núcleo leito da estria
Terminal sobre respostas de ansiedade em ratos.

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

Aprovado em: ____ / ____ / 2017

Banca examinadora

Prof. Dr.: Fernando Morgan de Aguiar Correa

Instituição: FMRP – USP

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr.: Pedro Henrique Gobira Nunes

Instituição: FCFRP - USP

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr.: Daniele Cristina de Aguiar

Instituição: UFMG

Julgamento: _____

Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Ao querido chefe, Prof. Dr. Leonardo Resstel Barbosa de Moraes, que me inspira desde os tempos da graduação. Sou grata pela orientação, carinho, confiança e por ter contribuído para minha formação científica e pessoal durante esses anos. Obrigada, principalmente, por me ensinar a acreditar em mim.

Ao professor da banca examinadora, Prof. Dr. Fernando Morgan de Aguiar Corrêa, agradeço por sua disponibilidade e participação na banca, e por toda atenção e contribuição científica ao longo do mestrado.

À professora da banca examinadora, Profa. Dra. Daniele Cristina de Aguiar, agradeço por sua disponibilidade e participação na banca.

Ao Dr. Pedro Gobira Nunes, agradeço por sua disponibilidade, participação na banca e pelas sugestões.

Aos amigos do laboratório Ana T., Dani, Davi, Gabi, Jéssica, Luana, Leandrinho, Luciana e May pelo convívio diário, atenção, risadas, ajuda e força nos momentos difíceis. Tenho um carinho enorme por todos vocês.

À Sara pela ajuda com o projeto e por compartilhar comigo seus saberes e descobertas sobre o BNST.

À Dani pela tutoria, paciência e amizade, por iluminar meus pensamentos, pela ajuda nos experimentos e sua incrível capacidade de enxergar sempre os pontos positivos.

À Ana T. que durante todo o mestrado têm feito com que as responsabilidades, decisões e tarefas se tornem mais leves e organizadas. Por confiar na minha capacidade e por dividir comigo seus aprendizados e experiências. Obrigada pela amizade. Você é um grande exemplo pra mim.

À Laura pela amizade, ajuda técnica e por tornar nossos dias mais alegres e azuis.

À Sabrina por ter me auxiliado no início da minha formação científica e pelo conhecimento compartilhado.

Ao Prof. Dr. Francisco Guimarães por abrir as portas de seu laboratório desde a iniciação científica.

À toda minha família pelas orações e velas acesas.

À minha mãe por ser a razão do meu viver e por me dar forças todos os dias para continuar minha caminhada. Ao meu pai por ser responsável por quem eu sou hoje, por me ensinar sobre respeito e responsabilidades. Ao meu irmão que sempre esteve ao meu lado me apoiando em todas as minhas decisões.

Às amigas T.O.s por torcerem e vibrarem comigo a cada conquista e obstáculo vencido, pelo apoio e compreensão nos momentos de dificuldade, ausência e mau humor.

Às amigas de Orlândia que mesmo longe se fazem presentes.

Aos técnicos Orlandinho pela assistência técnica e momentos de descontração e José Carlos por todos os ensinamentos durante a iniciação científica.

Aos amigos do departamento de Farmacologia.

Aos secretários do departamento Ramon, Fátima, Sônia e Gislaine pela competência e disponibilidade para atender nossas necessidades burocráticas.

Aos funcionários do Biotério, Eliane, Marcos e Orlandinho no cuidado com os animais.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Cnpq), Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência (FAEPA) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

*“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas,
mas ao tocar uma alma humana seja apenas outra alma humana”.*

Carl G. Jung

BORGES-ASSIS, A. B. **Participação do sistema endocanabinoide no núcleo leito da estria terminal sobre respostas de ansiedade em ratos**. 2017. 67 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

O sistema endocanabinoide é composto por ligantes endógenos, enzimas responsáveis pela síntese e degradação desses ligantes, além de receptores específicos. As duas principais moléculas endógenas, anandamida (AEA) e 2-araquidionilglicerol (2-AG), após sintetizadas, são difundidos para a fenda sináptica e agem retrogradamente em receptores canabinóides do tipo 1 e/ou 2 (CB1 e CB2, respectivamente). A ação da AEA termina após processo de internalização seguido por hidrólise através da enzima FAAH (*fatty acid amid hydrolase*; amidohidrolase de ácidos graxos), presente no neurônio pós-sináptico. O 2-AG, por sua vez, é degradado pela MAGL (monoacilglicerol lipase), localizada pré-sinápticamente. O receptor CB1 modula negativamente a liberação de diversos neurotransmissores no sistema nervoso central. A participação dos endocanabinóides é amplamente descrita em diversas estruturas cerebrais envolvidas na expressão de respostas relacionadas aos comportamentos de ansiedade e medo, tendo seus efeitos mediados principalmente por CB1 e CB2. Entretanto, o papel dos endocanabinóides em algumas estruturas ainda não está completamente elucidado. Dentre essas, destaca-se o Núcleo Leito da Estria Terminal (NLET), uma estrutura límbica com importante papel na integração de informações associadas com controle autonômico, endócrino e comportamental durante situações aversivas. Há poucas evidências da presença e do envolvimento do sistema endocanabinoide no NLET sobre a modulação de respostas de ansiedade. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar o envolvimento do sistema endocanabinoide presente no NLET na modulação de respostas aversivas inata e aprendida. Para isso ratos Wistar (240g – 270g) foram implantados com cânulas guia bilateralmente no NLET para administração de drogas. Foram utilizados: veículo (DMSO 10%), antagonista de receptores CB1, o AM251 nas doses de 0,1 a 0,3 nmol/100nL e um inibidor da enzima FAAH, URB597 nas doses de 0,01 e 0,1 nmol/100nL. Cinco dias após a cirurgia estereotáxica, os animais foram submetidos ao teste de resposta inata do Labirinto em cruz elevado por 5 minutos. Avaliou-se o número de entradas e o tempo gasto nos braços abertos e fechados. Dois a três dias após, os animais foram submetidos ao protocolo do medo condicionado ao contexto, realizado em 3 dias consecutivos. No dia do teste, respostas comportamentais (tempo

de congelamento) e autonômicas (Pressão arterial média; Frequência cardíaca, e Temperatura cutânea da cauda) foram continuamente avaliadas durante 10 min. Nossos resultados demonstraram que o bloqueio ou ativação de receptores CB1 no NLET não alterou as respostas de medo inato. Entretanto, no medo aprendido, o antagonismo de receptores CB1 no NLET aumentou o componente comportamental e pressórico. Ainda, a inibição da FAAH no NLET, via CB1, diminuiu o componente comportamental e pressórico da resposta emocional condicionada. Desta maneira, podemos sugerir que o sistema endocanabinoide presente no NLET modula respostas de medo aprendido, sem intervir nas respostas de medo inato.

Palavras-chave: Núcleo leito da estria terminal, endocanabinoides, resposta emocional condicionada, ansiedade.

Abstract

BORGES-ASSIS, A. B. Participation of endocannabinoid system in the bed nucleus of the stria terminalis on anxiety responses modulation in rats. 2017.
School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2017

The cannabinoid system is composed by two main endogenous ligands, enzymes responsible for synthesis and degradation of these ligands, and specific receptors. The two main endogenous molecules, anandamide (AEA) and 2-arachidonoylglycerol (2-AG), after synthesized post-synaptically, are released into the synaptic cleft, where they activate cannabinoid receptors type 1 and 2 (CB1 and CB2, respectively). AEA action terminates after internalization followed by enzymatic hydrolysis via FAAH (fatty acid amid hydrolase) located in the postsynaptic neuron. Meanwhile, 2-AG is degraded presynaptically by MAGL (monoacylglycerol lipase). CB1 receptor negatively modulates the release of several neurotransmitters in central nervous system. The endocannabinoid system is widely present in several brain structures involved on fear expression and anxiety-related responses, mostly mediated via CB1 and CB2 receptors. Nevertheless, the role of the endocannabinoids system role in specific brain structures is not yet completely elucidated. One structure in particular, is the Bed Nucleus of Stria Terminales (BNST), which is a limbic structure responsible for integration of autonomic, neuroendocrine and behavioral information during aversive situations. There is little evidence about the presence and involvement of endocannabinoid system in the BNST on anxiety responses modulation. Therefore, the aim of the present study was to evaluate the role of the endocannabinoid system in the BNST on the modulation of innate and learned aversive responses. Male Wistar rats (240 – 270g) were submitted to stereotaxic surgery for bilateral guide cannula implantation directed to the BNST, for drug administration. Animals received local injections of vehicle, AM251 (CB1-antagonist; 0,1 – 0,3 nmol/100nL), URB597 (an inhibitor of FAAH; 0,01 – 0,1 nmol/100nL). Five days after the stereotaxic surgery, animals were submitted to the innate response test, the elevated plus maze, for 5 minutes. The percentage of entries and time spent in open and the number of enclosed arms entries were analyzed. After two to three days, animals were submitted to the contextual fear conditioning protocol, performed in three consecutive days. On test day, behavioral (freezing) and autonomic responses (mean arterial pressure, heart rate and tail cutaneous temperature) were recorded for 10 min. Our data suggest that after CB1 receptors blocking or activation in the BNST do not promote changes in innate fear responses. However, during fear learning, CB1 receptor antagonism in the BNST

increased freezing behavior and mean arterial pressure. In addition, FAAH inhibition in the BNST, via CB1, reduced freezing behavior and mean arterial pressure in the emotional conditioned response. These results suggest that endogenous cannabinoid system in the BNST can modulate defensive responses in fear learning, but not innate fear responses.

Keywords: Bed nucleus of the stria terminalis, endocannabinoids, emotional conditioned response, anxiety.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVOS.....	26
2.1. Objetivo geral.....	26
2.2. Objetivos específicos.....	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
3.1. Animais	28
3.2. Cirurgia para implante da cânula-guia no NLET	28
3.3. Labirinto em Cruz Elevado	29
3.4. Medo condicionado ao contexto	29
3.5. Canulação da artéria femoral	30
3.6. Registro da pressão arterial, frequência cardíaca e temperatura cutânea.....	31
3.7. Avaliação do comportamento de congelamento.....	31
3.8. Técnica para microinjeção de drogas no NLET	31
3.9. Determinação anatômica do local de injeção	32
3.10. Drogas utilizadas	32
3.11. Procedimentos experimentais	32
3.11.1. Avaliação da influência da exposição prévia dos animais ao LCE sobre a REC.....	33
3.11.2. Avaliação da participação de receptores CB1 no NLET sobre respostas de ansiedade	33
3.11.3. Avaliação da participação dos receptores CB1 sobre as respostas evocadas por um inibidor da FAAH.	34
3.12. Análise Estatística dos dados.....	34
4. RESULTADOS.....	37
4.1. Avaliação da influência da exposição prévia ao LCE na resposta emocional condicionada.....	39
4.2. Avaliação da participação de receptores CB1 no NLET sobre respostas de ansiedade	41
4.2.1. Labirinto em cruz elevado	41
4.2.2. Medo condicionado ao contexto	43
4.3. Avaliação da participação dos receptores CB1 sobre as respostas evocadas por um inibidor da FAAH.....	45
4.3.1. Labirinto em cruz elevado	45
4.3.2. Medo condicionado ao contexto	47
5. DISCUSSÃO.....	52
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

1. INTRODUÇÃO

Há uma extensa história sobre o uso medicinal da *Cannabis Sativa* devido às suas propriedades tranquilizantes, antieméticas e analgésicas (Zuardi, 2006). Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (2016), a *Cannabis* é a droga psicoativa ilícita mais consumida no mundo. O Δ^9 -Tetrahidrocanabinol (THC), o principal constituinte psicoativo da *Cannabis*, foi identificado em 1964 o que levou posteriormente a descoberta de receptores e outros componentes dando origem ao sistema endocanabinoide (Gaoni and Mechoulam, 1964). Esse sistema, além de ser alvo biológico do THC, é amplamente estudado pela sua capacidade de manter a homeostase, exercendo ação modulatória sobre processos cognitivos, comportamentais, emocionais, de desenvolvimento e fisiológicos (Mechoulam and Parker, 2013).

O sistema endocanabinoide é constituído por diferentes receptores, sendo os principais os receptores canabinóides do tipo 1 e 2, CB1 e CB2, respectivamente; ligantes endógenos, como a anandamida (AEA) e o 2-araquidonilglicerol (2-AG); e enzimas envolvidas na síntese e metabolismo dos endocanabinoides – as enzimas catabólicas amido hidrolase de ácidos graxos (FAAH) para AEA, e a monoacilglicerol lipase (MAGL) para 2-AG (Di Marzo, 2011; Ueda et al., 2011).

Os endocanabinoides, AEA e 2-AG, são considerados neurotransmissores atípicos produzidos sob demanda a partir de fosfolipídios da membrana celular em neurônios pós-sinápticos frente a estímulos neuronais (Di Marzo, Melck et al. 1998). Após sintetizados, se difundem para a fenda sináptica e agem ativando receptores CB1 e/ou CB2 (Howlett, 2002; Ligresti et al., 2005). A ação da AEA termina após o processo de internalização seguido por hidrólise através da enzima FAAH presente no neurônio pós-sináptico (Ahn et al., 2008; Cravatt et al., 1996). O 2-AG, por sua vez, é degradado pela MAGL que está localizada pré-sinápticamente (Dinh et al., 2002). A supressão dessas enzimas prolonga a atividade dos endocanabinoides (Gaetani et al., 2009). Evidências sugerem que a AEA possui alta afinidade pelos receptores CB1, enquanto que o 2-AG apresenta afinidade semelhante para ambos receptores (Atwood and Mackie, 2010; Mechoulam et al., 1995; Sugiura et al., 1995).

Os receptores CB1 são receptores metabotrópicos pré-sinápticos acoplados a proteína Gi, sendo um dos receptores mais expressos no encéfalo de mamíferos (Herkenham et al., 1990; Howlett et al., 2002) . Sua ativação acarreta inibição da

adenilato ciclase e regulação de canais iônicos, inibindo canais de cálcio voltagem-dependentes e ativando correntes retificadoras de entrada de potássio, culminando na inibição da liberação de neurotransmissores como o glutamato e ácido gama-aminobutírico (GABA) (Howlett, 2002). Os receptores CB2 são receptores metabotrópicos com mecanismo similar ao CB1 (Ashton and Moore, 2011). Apesar de serem usualmente descritos como restritos a células do sistema imune e tecidos periféricos, estudos recentes sugerem sua presença também no sistema nervoso central (SNC), tanto sob condições patológicas quanto em condições fisiológicas normais (Atwood and Mackie, 2010; Marco, 2011). No entanto, são caracterizados de forma bem menos estabelecida quando comparados à expressão de receptores CB1 no cérebro (Gong et al., 2006). Nos últimos anos, um crescente número de estudos relatam o envolvimento do sistema endocanabinoide, especialmente atuando via CB1, na modulação de respostas emocionais, como aquelas relacionadas à ansiedade e depressão (para revisão ver Pacher et al., 2006; Pertwee, 2009).

A ansiedade pode ser definida como estado emocional de apreensão ativado por ameaças distantes ou em potencial. É a representação antecipatória de possíveis, mas incertos, eventos futuros (Borkovec, 1985). Esses processos antecipatórios possuem função adaptativa quando proporcional à probabilidade e gravidade da ameaça, podendo se tornar patológico quando excessivo (Rosen and Schulkin, 1998). Distúrbios de ansiedade são condições crônicas debilitantes que geram prejuízos tanto ao indivíduo quanto à sociedade (Korem et al., 2016).

Diversos modelos animais são utilizados para avaliação e caracterização de estados de ansiedade e como modelos preditivos de drogas com efeitos ansiolíticos. Tais paradigmas experimentais podem ser divididos em dois grupos: aqueles de medo inato, que não envolvem aprendizado, como o modelo do labirinto em cruz elevado (LCE), caixa claro-escuro, teste do campo aberto e, os modelos baseados em aprendizado associativo, como é o caso do teste de conflito de Vogel, teste de esQUIVA e medo condicionado (Millan, 2003; Pellow et al., 1985). O LCE é um teste bastante utilizado para pesquisa de comportamento relacionado à ansiedade. Consiste em um aparato com dois braços abertos perpendiculares a dois braços fechados, localizado a certa altura do chão e, baseia-se no conflito inato do animal entre explorar um ambiente novo e se esquivar de um lugar no qual se sinta ameaçado por ser elevado e aberto. São consideradas respostas características de drogas ansiolíticas o aumento no número de entradas e tempo de permanência nos

braços abertos, sendo que a pré-exposição do animal a algum agente estressor, como restrição ou nado forçado, leva à diminuição na exploração dos braços abertos. (Hogg, 1996; Pellow et al., 1985).

Já o modelo do medo condicionado ao contexto (MCC) é um modelo pavloviano clássico, baseado em aprendizado associativo, no qual o animal é exposto a um estímulo inicialmente neutro (neste caso o contexto), que posteriormente será pareado com um estímulo aversivo ou desagradável, como choque nas patas, caracterizando assim o estímulo incondicionado. Desta maneira, a reexposição do animal ao contexto passa a predizer a ocorrência de choque nas patas, passando o contexto a ser o estímulo condicionado (Fanselow, 1980).

A reexposição do animal ao contexto resulta em respostas comportamentais e autonômicas características que em seu conjunto representam a resposta emocional condicionada (REC). A REC é caracterizada por uma postura imóvel e tensa em que todos os movimentos, exceto os ligados à respiração, são cessados, conhecida como congelamento (Fanselow, 2000, 1980), sendo acompanhada por componentes autonômicos, que consistem em aumento da pressão arterial média (PAM) e da frequência cardíaca (FC) (Carrive, 2000; Resstel et al., 2006) e redução da temperatura cutânea da cauda (TC) (Hott et al., 2016, 2012; Spiacchi et al., 2016; Uliana et al., 2016; Vianna and Carrive, 2005).

Patel e Hillard (2006) observaram que a administração sistêmica de um agonista de receptores CB1 desencadeava respostas do tipo ansiolítica em animais submetidos ao teste do LCE. De modo oposto, o antagonismo desses receptores gerou resposta tipo ansiogênica (Patel and Hillard, 2006). Estudos anteriores demonstraram perfil ansiogênico em camundongos com deleção gênica para receptores CB1 (CB1-/-) expostos a diferentes modelos de ansiedade tais como caixa claro-escuro e LCE, quando comparados a animais selvagens (Martin et al., 2002; Urigüen et al., 2004).

Vale ressaltar ainda que a administração de agonistas CB1 induz efeitos bifásicos no comportamento de ansiedade (Sulcova et al., 1998). Em geral, é demonstrado que baixas doses de agonistas produzem efeito ansiolítico, ao passo que altas doses produzem respostas ansiogênicas, sugerindo um efeito dose-dependente (Korem et al., 2016). Scherma e colaboradores (2008) demonstraram que baixas doses de AEA ou de URB597, um inibidor da enzima FAAH, tem efeito ansiolítico quando administrados isoladamente e efeito ansiogênico quando

combinados. A hipótese para esse mecanismo é que devido a expressão de receptores CB1 em várias subpopulações neuronais, dependendo da intensidade no aumento ou diminuição da sinalização endocanabinoide, diferentes populações neuronais podem ser afetadas, levando a esse efeito bifásico (Rey et al., 2012; Scherma et al., 2008). Além disso, a AEA é capaz de ligar-se também a uma outra modalidade de receptores, os receptores vanilóides de potencial transitório tipo 1 (TRPV1-Transient receptor potential vanilloid type) (Di Marzo et al., 2001; van der Stelt et al., 2005; Vriens et al., 2009; Zygmunt et al., 1999) e, enquanto a ativação de CB1 conduz a uma diminuição no cálcio intracelular e à atenuação da transmissão sináptica, a ligação da AEA ao TRPV1 resulta em aumento dos níveis de cálcio e na potencialização da transmissão sináptica (Kawahara et al., 2011; McGaraughty et al., 2003; Starowicz et al., 2007; Xing and Li, 2007). O bloqueio farmacológico de TRPV1 não apenas aboliu os efeitos de doses elevadas de agonistas CB1 como também resultou num fenótipo ansiolítico sem tratamento concomitante de agonista CB1 (Campos and Guimarães, 2009; Moreira et al., 2009, 2007; Terzian et al., 2009).

Outra característica desse sistema é que a liberação de endocanabinóides é realizada sob demanda, sendo esses sintetizados e liberados somente “quando necessário” como, por exemplo, pelo aumento na atividade neuronal. Em geral, os endocanabinóides são sintetizados pós-sinápticamente em resposta ao influxo de Ca^{2+} e, após liberados na fenda sináptica, ativam receptores CB1 pré sinápticos levando a supressão da atividade neuronal, agindo como um mecanismo de proteção e neutralizando respostas aversivas (Moreira and Lutz, 2008)

A estimulação indireta da sinalização canabinóide através de inibidores das enzimas responsáveis pela degradação dos endocanabinóides é mais seletiva que a administração direta de um agonista de receptores canabinóides isso porque esses inibidores intensificam a sinalização apenas quando e onde ela já está ocorrendo sem induzi-la de forma direta, como foi sugerido por Piomelli e colaboradores (2006). Nesse trabalho foi demonstrado que o URB597 intensificou a ação da AEA em um subconjunto de receptores CB1 que já são normalmente envolvidos no controle de emoções (Piomelli et al., 2006).

Lisboa e colaboradores (2015) demonstraram que a administração local de drogas que interferem no processo de recaptação ou metabolismo de endocanabinóides diretamente no hipocampo ou na porção pré-límbica do córtex pré-frontal medial (CPFM) foram capazes de gerar respostas tipo ansiolíticas no LCE e

no teste de conflito de Vogel através da ativação de receptores CB1 (Lisboa et al., 2015). No modelo do MCC, Resstel e colaboradores (2008) observaram diminuição significativa nas respostas autonômicas e no tempo de congelamento após a administração exógena de AEA ou inibição de sua recaptação na substância cinzenta periaquedutal (SCP), via receptores CB1 (Resstel et al., 2008b). A administração sistêmica de agonista CB1 diminuiu a expressão do medo condicionado, efeito prevenido pelo pré-tratamento com antagonista CB1 (Pamplona et al., 2006).

O sistema endocanabinoide, como descrito anteriormente, modula respostas de ansiedade em diversas estruturas do SNC, como o córtex pré-frontal medial (Lisboa et al., 2010), hipocampo (Lisboa et al., 2015; Spiacci et al., 2016) e a substância cinzenta periaquedutal (Resstel et al., 2008b). Entretanto, existem outras estruturas importantes para a modulação de respostas de ansiedade nas quais o papel do sistema endocanabinoide ainda não foi totalmente elucidado, como é o caso do núcleo leito da estria terminal (NLET).

O NLET foi descrito pela primeira vez em 1923 e é uma estrutura límbica com importante papel na integração de informações, sendo associada com controle autonômico, endócrino e comportamental observados na expressão do comportamento de medo e ansiedade (Crestani et al., 2009). Lebow e Chen (2016) sugerem que o NLET atue na integração entre as regiões responsáveis pela percepção de situações estressantes com as regiões que geram respostas correspondentes ao estresse sofrido, o que é demonstrado em trabalhos que envolvem o papel dessa estrutura em modelos animais que avaliam aspectos comportamentais e autonômicos (Fendt et al., 2005; Walker and Davis, 1997).

Estudos em roedores mostraram que o NLET possui conexões estruturais com outras regiões límbicas, incluindo a amígdala, hipotálamo, hipocampo, SCP e o córtex, bem como com núcleos hipotalâmicos e do tronco encefálico (Dong et al., 2001; Dong and Swanson, 2006a, 2006b, 2006c, 2004a, 2004b), que são estruturas envolvidas no controle emocional e autonômico (Avery et al., 2014).

É descrito que o NLET possui papel no restabelecimento da homeostase, intervindo em respostas frente a sinais que predizem uma ameaça temporalmente distante (Lebow and Chen, 2016). Foi demonstrado que a estimulação elétrica do NLET produz respostas endócrinas, cardiovasculares e respiratórias similar as provocadas por estímulos aversivos e, por outro lado, sua lesão atenua respostas comportamentais de ansiedade (para revisão ver Hammack et al., 2015). Resstel e

colaboradores (2008) avaliaram a participação do NLET na expressão da REC no modelo do MCC. Foi demonstrado que a inativação reversível da neurotransmissão local do NLET com CoCl_2 , um inibidor inespecífico de sinapses, reduziu o tempo de congelamento e atenuou o aumento na FC e PAM (Resstel et al., 2008a), demonstrando assim a importância dessa estrutura na modulação da resposta emocional em ratos.

Apesar de não haver muitos trabalhos envolvendo o sistema endocanabinoide no NLET, resultados moleculares demonstram a presença de receptores CB1 nessa região (Puente et al., 2010), sendo desta maneira um indício do possível envolvimento desse sistema na modulação de respostas emocionais, tais como de ansiedade.

Recentemente Gomes-de-Souza e colaboradores (2016) avaliaram a participação do sistema endocanabinoide no NLET frente às respostas autonômicas provocadas por um tipo de estresse agudo, o estresse por restrição, que geralmente resulta em aumento da FC e PAM e queda da TC. Foi visto que a administração intra-NLET de um antagonista CB1 resultou em aumento da taquicardia, sem alterar as variações de PAM e de TC. Já a injeção local de fármacos inibidores das enzimas responsáveis pela degradação dos endocanabinoides levou à diminuição da FC; efeito que foi abolido pela administração prévia do antagonista CB1 (Gomes-de-Souza et al., 2016). Resultados esses que mostram que o sistema endocanabinoide no NLET é importante para modulação da resposta autonômica frente a uma situação aversiva. Já foi descrito também que a administração sistêmica de antagonista CB1 produziu aumento nos níveis da ativação neuronal do NLET em animais submetidos a estresse sonoro, indicando que o papel do sistema endocanabinoide nessa estrutura é ativado por estímulos aversivos (Newsom et al., 2012).

Grueter e colaboradores, em 2006, demonstraram que a ativação de receptores glutamatérgicos nessa estrutura induz depressão transitória da transmissão sináptica excitatória dependente de receptores CB1 (Grueter et al., 2006). Estudo objetivando uma melhor compreensão do papel do sistema endocanabinoide no NLET demonstrou a presença de receptores CB1 na porção anterior do NLET, bem como a co-localização destes receptores com transportadores vesiculares de glutamato (vGluT) do tipo 1. Neste mesmo trabalho, preparações de fatias de cérebros contendo o NLET revelaram que a ativação de receptores CB1 inibe transmissões sinápticas tanto excitatórias como inibitórias; sugerindo o possível mecanismo pelo qual os receptores canabinóides podem regular respostas aversivas

nessa estrutura (Puentes et al., 2010). Por fim, resultados recentes de nosso grupo envolvendo o NLET demonstraram a participação do glutamato sobre a modulação da REC (Hott et al., 2016).

Considerando a importante participação do sistema endocanabinoide na modulação de respostas de ansiedade, principalmente através dos endocanabinoides que controlam negativamente a liberação de glutamato ao atuarem retrogradamente em receptores CB1 e, a falta de evidências sobre seu papel no NLET, a primeira hipótese do trabalho foi que o antagonismo de receptores CB1 produza efeito tipo ansiogênico em modelos animais de ansiedade. A segunda hipótese do trabalho foi que o aumento dos níveis da AEA, induzido pela inibição da FAAH, produza respostas ansiolíticas por agir em receptores CB1.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar o envolvimento do sistema endocanabinoide no núcleo leito da estria terminal (NLET) sobre respostas de medo inato e medo aprendido.

2.2. Objetivos específicos

- a) Avaliar a participação de receptores CB1 no NLET sobre respostas de medo inato, utilizando o LCE.
- b) Avaliar a participação de receptores CB1 no NLET sobre respostas de medo aprendido, utilizando o MCC.
- c) Avaliar o efeito do aumento dos níveis de AEA sobre respostas de medo inato, utilizando o LCE.
- d) Avaliar o efeito do aumento dos níveis de AEA sobre respostas de medo aprendido, utilizando o MCC.
- e) Avaliar a participação dos receptores CB1 sobre as respostas evocadas pelo aumento dos níveis de AEA no MCC.

Materiais e Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Durante os experimentos foram utilizados ratos Wistar com peso variando entre 240-270 g fornecidos pelo Biotério Central do Campus da USP de Ribeirão Preto. Os animais foram alojados no biotério do próprio laboratório em caixa de polipropileno (39x32x17cm), em ambiente monitorado, submetidos ao ciclo de claro-escuro de 12 horas, com livre acesso à ração e água.

Os procedimentos atenderam o guia de uso e cuidados de animais de laboratório da Sociedade Brasileira de Neurociência e Comportamento, estando de acordo com as leis internacionais. O Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) aprovou as condições de habitação e procedimentos experimentais (número do protocolo: 158/2015).

3.2. Cirurgia para implante da cânula-guia no NLET

Os animais foram induzidos à anestesia com 2,2,2-tribromoetanol (Aldrich, EUA 250 mg/Kg, i.p), seguido por adaptação ao aparelho estereotáxico (Stoelting, USA). Foi administrado anestésico local cloridrato de lidocaína 2% contendo o vasoconstritor norepinefrina (Novocol 100, S.S. White-Brasil, 0,3 mL, s.c.). Em seguida, uma pequena incisão longitudinal de aproximadamente 1,5 cm foi feita para exposição da calota craniana. A limpeza da região foi feita utilizando-se solução salina e água oxigenada 10%.

A trepanação do crânio foi realizada com o auxílio de broca odontológica para obtenção de três orifícios, sendo um orifício utilizado para fixação de parafuso de aço inoxidável que fixa a resina acrílica autopolimerizável a ser disposta no crânio. Os outros orifícios foram utilizados para introdução de cânulas-guia bilateralmente no NLET, sendo as cânulas constituídas por segmentos de agulha hipodérmica (26 x 0,6 mm, 33G), com 13 mm de comprimento. As cânulas foram fixadas ao crânio com resina acrílica. As coordenadas utilizadas foram baseadas no atlas de Paxinos & Watson (1997) (Anteroposterior: -8.4 mm em relação a interaural; Lateral: 4.0 mm em relação a sutura medial; Vertical: -5.5 mm; Ângulo: 23°; Incisivo: -3.2 mm).

Foram inseridos mandris de 0,2 mm de diâmetro externo no interior de cada cânula guia para evitar sua obstrução durante o período de recuperação do rato. A

fim de prevenir infecção decorrente do procedimento cirúrgico, os animais receberam Pentabiótico veterinário (Fontoura-Wyeth, BR) (0,3 mL/animal, via i.m.). Foi também administrado um analgésico profilático (Banamine; Schering-Plough S/A-Brasil) (2,5 mg/Kg/ml, via s.c.) para reduzir a dor pós-cirúrgica.

3.3. Labirinto em Cruz Elevado

Cinco dias após o implante das cânulas-guia no NLET, os animais foram separados em caixas individuais e submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado (LCE). Este consiste em um aparato de madeira, localizado a 50 cm do chão, tendo dois braços abertos (50x10cm) dispostos perpendicularmente a dois braços fechados, de mesma dimensão, com paredes de 40cm de altura.

Cada animal foi posicionado em seu centro, que possui 10x10cm, e pôde explorar o labirinto por 5 minutos. Os experimentos foram filmados e o registro do número de entradas e tempo gasto nos braços abertos e fechados foi determinado através do programa Anymaze (Stoelting). Todos os procedimentos foram realizados em sala silenciosa, com temperatura controlada ($24^{\circ} \pm 1$) e iluminação diminuída.

As porcentagens de entrada e tempo nos braços abertos foram quantificadas como $[100 \times \text{aberto}/(\text{aberto} + \text{fechado})]$. O número de entradas nos braços fechados foi utilizado como um marcador de atividade motora geral.

3.4. Medo condicionado ao contexto

Dois dias após serem submetidos ao teste do LCE, os animais foram separados e acomodados em caixas individuais. Os mesmos foram habituados por 10 minutos à caixa de condicionamento (23x20x21cm, Insight®, Ribeirão Preto, Brasil) com assoalho capaz de deflagrar choques. Após a sessão de habituação os animais foram novamente expostos à caixa. Desta vez, puderam explorá-la por 5 minutos (protocolo de baixa intensidade) ou 2 minutos (protocolo de alta intensidade). Em seguida foram submetidos à sessão de choques elétricos e, dependendo do objetivo do protocolo, receberam 3 choques inescapáveis nas patas de 0,85 mA/ 2s (condicionamento de menor intensidade) (Lisboa et al., 2010) ou 6 choques inescapáveis de 1,5 mA/ 3s (condicionamento de maior intensidade) (Resstel et al., 2008b) em intervalos randomizados (variando de 20 a 60s).

A variação na intensidade do condicionamento baseia-se em resultados prévios do nosso grupo que demonstraram que a intensidade da REC está diretamente relacionada à aversividade do protocolo de condicionamento. Foi descrito que a utilização de um protocolo com menor número de choques de menor intensidade (3 choques de 0,85 mA) causava um menor tempo de congelamento, possibilitando a observação do aumento da REC após a administração de um composto ansiogênico, o FG-7142, um agonista inverso de receptores benzodiazepínicos. Entretanto, no protocolo com número e intensidade maiores de choque não foi possível observar efeito de aumento da REC por esta droga, possivelmente por gerar um efeito teto sobre a resposta comportamental e cardiovascular (Lisboa et al., 2010). Dessa forma dependendo do objetivo do protocolo foram utilizados diferentes intensidades de choque, sendo que utilizamos choques de baixa intensidade visando encontrar um aumento da resposta evocada pelo antagonismo dos receptores CB1 e nos demais protocolos, que tinham por objetivo a diminuição da REC, foram utilizados choques de alta intensidade.

Decorridas 24h, no dia 2, um cateter de polietileno foi introduzido na artéria femoral para avaliação dos parâmetros cardiovasculares. Após 48h do condicionamento, no dia do teste, os animais receberam as drogas intra-NLET, sendo a pressão arterial média (PAM), a frequência cardíaca (FC) e a temperatura cutânea da cauda (TC) registradas durante os 10 minutos após a administração da última droga, com o animal ainda em sua caixa, para obtenção dos valores basais desses parâmetros autonômicos. Após este período, os animais foram reexpostos à caixa de condicionamento, sem deflagração de choque, e as respostas comportamentais (tempo de congelamento) e autonômicas (PAM; FC e TC) foram continuamente avaliadas durante 10 minutos.

3.5. Canulação da artéria femoral

Um dia antes do teste do condicionamento, os animais passaram por novo procedimento cirúrgico para canulação da artéria femoral. Os animais foram anestesiados com 2,2,2-tribromoetanol (Aldrich, EUA, 250 mg/Kg, i.p.) para o implante de uma cânula na artéria femoral que foi introduzida até a artéria aorta abdominal inferior. A cânula é constituída por segmento de polietileno PE-10 (4-5 cm) soldado a segmento de polietileno PE-50 (2-13 cm), sendo preenchida com uma

solução de salina e anticoagulante (heparina) e obstruída com pino de metal. A mesma foi exteriorizada no dorso do animal por meio de um trocater e fixada à pele por sutura cirúrgica. A fim de reduzir a dor pós-cirúrgica foi administrado por via subcutânea analgésico (Banamine; Schering-Plough S/A-Brasil) (2,5 mg/Kg/ml). Após este procedimento, os animais permaneceram em caixas individuais até a realização do experimento.

3.6. Registro da pressão arterial, frequência cardíaca e temperatura cutânea

No dia do teste, 48 horas após o condicionamento, em uma sala para registro de atividade cardiovascular, o cateter arterial foi conectado a um transdutor de pressão acoplado a um amplificador de sinais (AECAD 04P), o qual foi conectado a um sistema de aquisição de dados computadorizados (Power Lab, EUA). Na própria caixa de cada animal, foram coletados os registros da atividade autonômica (PAM, FC, TC) basal durante 5 minutos. Ainda nas suas caixas, os animais receberam injeção de veículo ou drogas intra-NLET e, 5 minutos após a última injeção, o animal foi colocado na caixa de condicionamento para avaliação dos parâmetros autonômicos por 10 minutos.

A variação da TC foi registrada manualmente por meio de uma câmera térmica Multi-Purpose Thermal Imager IRI 4010 (InfraRed Integrated Systems Ltd Park Circle, Tithe Barn Way Swan Valley Northampton, EUA) mantendo-se uma distância de 50 cm. Os registros foram realizados a cada minuto, durante os 5 minutos da medida basal e durante o período de 10 minutos de reexposição ao contexto.

3.7. Avaliação do comportamento de congelamento.

O registro do tempo de congelamento foi manual. O congelamento, medida comportamental associada à REC, é considerado como a ausência total de movimentos, exceto aqueles relacionados à respiração (Fanselow, 1980).

3.8. Técnica para microinjeção de drogas no NLET

As microinjeções foram realizadas mediante o auxílio de seringas de 10 µL, modelo KH7001 (Hamilton, EUA) conectadas a agulhas microinjetoras de metal (33

G), através de tubos de polietileno PE-10. As agulhas microinjetoras são 1 mm mais longas do que as cânulas-guia. As microinjeções foram dadas em um volume de 100 nL, bilateralmente. Após cada microinjeção a agulha foi mantida por 30 segundos na cânula para evitar refluxo.

3.9. Determinação anatômica do local de injeção

Os animais foram anestesiados com uretana 25% (10mL/Kg) e nas cânulas guia foram administrados 100 nL de corante Azul de Evans 1%. A seguir os animais foram submetidos à perfusão transcardíaca, primeiramente com 20 mL de solução salina (NaCl 0,9%) e em seguida com 20 mL de formol a 10%. O procedimento consiste na abertura da caixa torácica para exposição do coração. Para facilitar a perfusão cerebral, a aorta descendente é bloqueada com o auxílio de uma pinça hemostática. Foi introduzida no ventrículo esquerdo uma agulha para perfusão e feita uma incisão no átrio direito para o escoamento do sangue e do perfusato. Após a perfusão, o cérebro foi retirado da caixa craniana e mantido em solução de formol a 10% para fixação. Os cérebros foram seccionados (cortes frontais) após 48 horas em um criostato. As secções foram analisadas utilizando o Atlas de Paxinos e Watson (1997) como referência. Após a análise do sítio de microinjeção, os animais que receberam a microinjeção das drogas em áreas adjacentes ao NLET foram agrupados e denominados grupo Fora.

3.10. Drogas utilizadas

N-(piperidin-1yl)-5-(4-iodophenyl)-1(2,4-dichlorophenyl)-4-methyl-H-pyrazole-3-carboxamide (AM251, antagonista de receptores CB1; Tocris; Bristol, UK) nas doses de 0,1 a 0,6 nmol/0,1 µl (Resstel et al., 2008b); Cyclohexylcarbamic acid 3'-(Aminocarbonyl)-[1,1'-biphenyl]-3-yl ester (URB597, inibidor FAAH, Tocris; Bristol, UK) nas doses de 0,01 e 0,1 nmol/0,1 µl (Lisboa et al., 2008). As drogas foram preparadas imediatamente antes do teste, e diluídas em DMSO 10% (veículo).

3.11. Procedimentos experimentais

Os animais canulados intra-NLET, foram ambientados à sala de experimentação 30 minutos antes do início do experimento. Cada animal recebeu uma ou duas injeções (veículo ou droga) de acordo com a Tabela 1, sendo o intervalo

entre as injeções de 5 min, o animal foi submetido ao experimento 10 minutos após a última injeção. Os animais receberam tratamento randômico nos dois modelos, evitando assim que o mesmo animal recebesse a mesma dosagem de droga ou veículo nos dois modelos. Os protocolos foram realizados conforme esquema temporal descrito na Figura 1.

Figura 1: Esquema representativo dos procedimentos que serão empregados.

Tabela 1: Grupos experimentais para os testes de LCE e MCC.

Protocolo 1	Protocolo 2	Protocolo 3
Veículo	Veículo	Veículo+Veículo
AM251 0,1 nmol	URB597 0,01 nmol	Veículo+URB597 0,1 nmol
AM251 0,3 nmol	URB 0,1 nmol	AM251 0,1 nmol+ Veículo
AM251 0,6 nmol		AM251 0,1 nmol + URB597 0,1 nmol

3.11.1. Avaliação da influência da exposição prévia dos animais ao LCE sobre a REC

Foi realizado experimento controle para avaliar se a exposição prévia dos animais ao LCE teria influência sobre a resposta emocional condicionada. Os animais foram separados em 2 grupos: grupo em que os animais foram previamente expostos ao LCE e após 2 a 3 dias foram submetidos ao protocolo do medo condicionado e outro grupo no qual os animais foram submetidos somente ao protocolo do medo condicionado.

3.11.2. Avaliação da participação de receptores CB1 no NLET sobre respostas de ansiedade

Para avaliar a participação dos receptores CB1 sobre a resposta de ansiedade, grupos independentes foram utilizados. Doses crescentes de antagonista CB1, AM251, foram administradas localmente no NLET, 10 min antes do teste do LCE e MCC. Após obtenção da dose efetiva, esta foi utilizada nos protocolos seguintes.

Neste experimento foi utilizado o protocolo de condicionamento de menor intensidade (Lisboa et al., 2010).

3.11.3. Avaliação da participação dos receptores CB1 sobre as respostas evocadas por um inibidor da FAAH.

Primeiramente foi realizada curva de inibição, a fim de avaliar o efeito de um inibidor da FAAH, o URB597, sobre as respostas. As doses testadas foram de 0,01nmol ou 0,1nmol.

Após a determinação da dose efetiva foi avaliado a interação das respostas evocadas pelo aumento da disponibilidade da AEA, via receptores CB1; para isso foi administrado intra-NLET veículo ou AM251 em sua dose inefetiva (0,1nmol), determinada nos protocolos anteriores, 5 minutos antes da microinjeção de URB597 0,1nmol.

Foi utilizado protocolo de condicionamento de maior intensidade (Resstel et al., 2008b).

3.12. Análise Estatística dos dados

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

As variações da PAM (ΔPAM , mmHg), FC (ΔFC , bpm) e temperatura cutânea (ΔTC , °C) foram medidas simultaneamente minuto a minuto por animal durante os 10 minutos de exposição ao contexto. A análise dos dados foi realizada utilizando-se ANOVA de medidas repetidas, sendo o tempo o fator repetido, o tratamento a variável independente (veículo ou drogas) e as medidas autonômicas as variáveis dependentes. Em caso de significância, a média dos valores dos parâmetros autonômicos durante a reexposição foi calculada e os valores

comparados utilizando ANOVA de uma via. Os dados coletados foram expressos como média $\pm$ EPM.

O comportamento de congelamento dos animais foi expresso como percentual do tempo total de exposição à caixa e foi analisado por ANOVA de uma via, sendo o tratamento a variável independente e a porcentagem de tempo de congelamento a variável dependente. O pós-teste de Dunnett foi aplicado em caso de interação significativa entre os fatores. O nível de significância assumido foi $p < 0,05$. O software utilizado foi GraphPad Prism versão 5.01.

4. RESULTADOS

A Figura 2 mostra uma fotomicrografia e uma representações diagramáticas do NLET (modificada do Atlas de Paxinos e Watson, 1997), indicando os sítios de injeção de drogas no NLET de animais utilizados nos experimentos.

Figura 2. A) Fotomicrografia representativa de uma secção coronal do cérebro de um rato mostrando o sítio de injeção no NLET. B) Diagramas representativos modificados do Atlas de Paxinos e Watson (1997) indicando os sítios de injeção no NLET (círculos pretos). Devido à sobreposição o número de pontos não necessariamente corresponde ao número de animais utilizados no estudo. ac- comissura anterior; cc- corpo caloso; f- fornix; LV- ventrículo lateral

A)

DMSO

B)

AM251 0,3 nmol

Figura 2.1. Registros representativos de PAM, PAP e FC de ratos condicionados antes e após (0 a 10 min) a re-exposição ao contexto aversivo. A) Animais tratados com veículo (DMSO). B) Animais tratados com AM251 na dose de 0,3 nmol.

4.1. Avaliação da influência da exposição prévia ao LCE na resposta emocional condicionada

Os dados apresentados na Figura 2.1 mostram que a exposição prévia dos animais ao teste do LCE não altera de forma significativa a expressão da resposta emocional condicionada ($n=5/\text{grupo}$).

Teste t de Student não demonstrou diferença significativa no tempo de congelamento entre os grupos ($t=1,5$; $p>0,05$).

A resposta autonômica durante a reexposição ao contexto é representada graficamente na Figura 2.1 (B, C, D). A análise de medidas repetidas dos parâmetros autonômicos demonstrou que houve efeito do tempo (PAM, $F_{14,112}=12,09$, $p<0,001$; FC, $F_{14,112}=15,39$, $p<0,001$; TC, $F_{14,112}=6,875$, $p<0,001$), mas não do tratamento (PAM, $F_{1,112}=0,3780$, $p=0,5$; FC, $F_{1,112}=1,331$, $p=0,2$; TC, $F_{1,112}=0,3610$, $p=0,5$); não houve efeito significativo também na interação entre tempo e tratamento (PAM, $F_{14,112}=0,5166$, $p=0,9$; FC, $F_{14,112}=1,286$, $p=0,2$; TC, $F_{14,112}=0,3509$, $p=0,9$) durante a reexposição ao contexto aversivo.

Figura 3: Exposição prévia ao LCE não altera de maneira significativa a REC. Comparação dos parâmetros comportamentais e autonômicos de animais previamente expostos (n=5) ou não ao LCE (n=5). (A) As colunas representam à média e as barras o EPM. Teste t de Student $t=1,5$; $p>0,05$. (B) Efeitos ao longo do tempo sobre a pressão arterial média (Δ PAM), frequência cardíaca (Δ FC) (C) e (D) temperatura cutânea (Δ TC). Os símbolos representam a média e as barras o EPM.

4.2. Avaliação da participação de receptores CB1 no NLET sobre respostas de ansiedade

4.2.1. Labirinto em cruz elevado

Os dados apresentados na Figura 3 mostram o efeito da administração bilateral no NLET do antagonista de receptores CB1, o AM251, nas doses de 0,1 nmol (n=11), 0,3 nmol (n=8) e 0,6 nmol (n=12) em animais submetidos ao LCE. A análise de variância de uma via não demonstrou diferença significativa na porcentagem de entrada ($F_{3,43}=1,933$; pós teste de Dunnett $p=0,1$) e de tempo gasto ($F_{3,43}=0,4509$, pós teste de Dunnett $p=0,7$) nos braços abertos em nenhuma das doses utilizadas em relação ao controle (n=13). Não houve também diferença no número de entradas nos braços fechados ($F_{3,43}=1,370$, pós teste de Dunnett $p=0,5$) em relação ao controle, sugerindo que a droga não promove alteração na atividade locomotora.

Figura 4: Antagonismo de receptores CB1 no NLET não altera o comportamento de ratos submetidos ao LCE Efeitos da microinjeção bilateral, no NLET, de veículo (n=13) ou AM251 nas doses de 0,1 (n=11); 0,3 (n=8) e 0,6 nmol (n=12) durante a exposição ao LCE. A) Porcentagem de entrada (barras brancas) e tempo (barras pretas) gastos nos braços abertos. As barras representam a média $\pm$ EPM. ANOVA seguido de pós teste de Dunnett $p>0,05$. B) Número de entradas nos braços fechados. As barras representam a média $\pm$ EPM. ANOVA seguido de pós teste de Dunnett $p>0,05$.

4.2.2. Medo condicionado ao contexto

Os dados apresentados na Figura 4A mostram o efeito da administração do antagonista de receptores CB1, AM251, no NLET de animais submetidos ao medo condicionado. A análise de variância de uma via demonstrou diferença significativa no tempo de congelamento entre os grupos ($F_{2,24}=8,874$; $p<0,05$), sendo que apenas a dose de 0,3 nmol ($n=9$), mas não a dose de 0,1 nmol ($n=7$), aumentou a porcentagem do tempo de congelamento em relação ao grupo veículo ($n=9$) (pós teste de Dunnett $p<0,05$).

A resposta autonômica do tratamento com AM251 durante a reexposição ao contexto é representada graficamente na Figura 4 (B, C, D). A análise de medidas repetidas dos parâmetros autonômicos demonstrou que houve efeito do tempo (PAM, $F_{14,285}=36,19$, $p<0,001$; FC, $F_{14,285}=16,03$, $p<0,001$; TC, $F_{14,285}=15,99$, $p<0,001$), do tratamento na PAM ($F_{2,285}=20,93$, $p<0,001$) mas não na FC ($F_{2,285}=1,459$, $p=0,2$) nem na TC ($F_{2,285}=2,122$, $p=0,1$); não houve efeito significativo também na interação entre tempo e tratamento (PAM, $F_{28,285}=0,9829$, $p=0,4$; FC, $F_{28,285}=0,2585$, $p=1,0$; TC, $F_{28,285}=0,1813$, $p=1,0$) durante a reexposição ao contexto aversivo. A ANOVA de uma via da média dos valores da PAM durante a reexposição mostrou efeito significativo da dose de AM251 0,3 nmol em relação ao grupo controle ($F_{2,20}=3,471$, $p<0,05$ pós teste de Dunnett).

Nenhuma das drogas utilizadas nesse protocolo alterou os valores basais autonômicos ($p>0,05$).

Figura 5: Administração bilateral de AM251 no NLET afeta distintamente as respostas emocionais e autonômicas do medo condicionado ao contexto. Efeitos da microinjeção bilateral de veículo (n=9) ou AM251 nas doses de 0,1 (n=7) e 0,3 nmol (n=9) durante a reexposição ao contexto aversivo sobre a porcentagem de tempo de congelamento (A). As colunas representam à média e as barras o EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo, seguido de pós teste de Dunnett. (B) Efeitos ao longo do tempo sobre a pressão arterial média (Δ PAM), frequência cardíaca (Δ FC) (C) e (D) temperatura cutânea (Δ TC). Os símbolos representam à média e as barras o EPM. O asterisco indica diferença significativa do tratamento em relação aos animais tratados com veículo ($p < 0,05$, pós teste de Dunnett).

4.3. Avaliação da participação dos receptores CB1 sobre as respostas evocadas por um inibidor da FAAH.

4.3.1. Labirinto em cruz elevado

Os dados apresentados na figura 5 mostram que a análise de variância de uma via demonstrou que as doses de URB597 de 0,01 (n=8) e 0,1 nmol (n=12) não apresentaram diferença em relação ao veículo (n=11) quanto a porcentagem de tempo ($F_{2,30}=0,7622$, $p=0,5$ pós teste de Dunnett) nem de entradas ($F_{2,30}=0,9253$, $p=0,4$ pós teste de Dunnett) nos braços abertos. Não houve também diferença no número de entradas nos braços fechados ($F_{2,30}=2,984$, $p=0,06$ pós teste de Dunnett) em relação ao controle, sugerindo que a droga não promove alteração na atividade locomotora. Deste modo, não foi dada continuidade deste protocolo no teste do LCE.

Figura 6: O aumento dos níveis de anandamida no NLET não afeta o comportamento de animais submetidos ao LCE. Efeitos da microinjeção bilateral de veículo (n=11) ou URB597 nas doses de 0,01 (n=8) e 0,1 nmol (n=12) durante a exposição ao LCE. A) Porcentagem de entrada (barras brancas) e tempo (barras pretas) gastos nos braços abertos. As barras representam a média $\pm$ EPM. ANOVA seguido de pós teste de Dunnett $p>0,05$. B) Número de entradas nos braços fechados. As barras representam a média $\pm$ EPM. ANOVA seguido de pós teste de Dunnett $p>0,05$.

4.3.2. Medo condicionado ao contexto

Os dados apresentados na Figura 6A mostram o efeito da administração de um inibidor da FAAH, URB597, no NLET. A análise de variância de uma via indicou diferença significativa no tempo de congelamento entre os grupos ($F_{2,21}=10,53$; $p<0,05$), sendo que apenas a dose de 0,1 nmol ($n=6$), mas não a dose de 0,01 nmol ($n=6$), diminuiu a porcentagem do tempo de congelamento em relação ao grupo veículo ($n=10$) (pós teste de Dunnett $p<0,05$).

A resposta autonômica ao tratamento com URB597 durante a reexposição ao contexto é representada graficamente na Figura 4 (B, C, D). A análise de medidas repetidas dos parâmetros autonômicos demonstrou que houve efeito do tempo (PAM, $F_{14,266}=76,19$, $p<0,001$; FC, $F_{14,266}=4$, $p<0,001$; TC, $F_{14,266}=27,24$, $p<0,001$), do tratamento na PAM ($F_{2,266}=4,194$, $p<0,05$) mas não na FC ($F_{2,266}=0,8406$, $p=0,4$) nem na TC ($F_{2,266}=0,7065$, $p=0,5$); houve efeito significativo também na interação entre tempo e tratamento apenas na PAM ($F_{28,266}=3,126$, $p<0,001$) mas não na FC ($F_{28,266}=0,6564$, $p=0,9$) nem na TC ($F_{28,266}=0,6018$, $p=0,9$) durante a reexposição ao contexto aversivo. A ANOVA de uma via da média dos valores da PAM durante a reexposição mostrou efeito significativo da dose de URB597 0,1 nmol em relação ao grupo controle ($F_{2,21}=4,194$, $p<0,05$ pós teste de Dunnett).

Nenhuma das drogas utilizadas nesse protocolo alterou os valores basais autonômicos ($p>0,05$).

Os dados apresentados na Figura 7A mostram que o efeito da anandamida (AEA) na reexposição ao contexto aversivo acontece via receptores CB1. A análise de variância de uma via demonstrou diferença significativa no tempo de congelamento do grupo Veículo+URB597 ($n=5$) em relação ao grupo controle ($n=6$) e diferença entre os grupos Veículo+URB597 e AM251+URB597 ($n=5$) ($F_{3,22}=4,634$), (pós teste de Tukey $p<0,05$).

As respostas autonômicas durante a reexposição contextual são representadas nas Figuras 7B, 7C e 7D. Nos parâmetros autonômicos, ocorreu um efeito significativo no tempo (PAM, $F_{14,285}=13,79$, $p<0,0001$; FC, $F_{14,285}=22,74$, $p<0,0001$; TC, $F_{14,285}=23,42$, $p<0,0001$), e no tratamento na PAM ($F_{3,285}=8,836$, $p<0,0001$) mas não na FC ($F_{3,285}=1,396$, $p=0,2$) e TC ($F_{3,285}=1,159$, $p=0,3$), não sendo significativa na interação entre tempo e tratamento (PAM, $F_{42,285}=0,3956$,

$p=0,9$; FC, $F_{42,285}=0,4269$, $p=0,9$; TC, $F_{42,285}=0,2081$, $p=1,0$) durante a reexposição ao contexto aversivo. A ANOVA de uma via da média dos valores da PAM durante a reexposição mostrou efeito significativo do grupo veículo+URB597 em relação ao grupo controle e entre os grupos Veículo+URB597 e AM251+URB597 ($F_{3,19}=2,93$, $p<0,05$ pós teste de Duncan).

Nenhuma das drogas utilizadas nesse protocolo alterou os valores basais autonômicos ($p>0,05$).

Figura 7: A administração bilateral de URB597 no NLET altera de modo distinto as respostas emocionais e autonômicas em animais submetidos ao medo condicionado ao contexto, sem afetar respostas basais. Efeitos da microinjeção bilateral de veículo (n=10) ou URB597 nas doses de 0,01 (n=6) e 0,1 nmol (n=6) durante a reexposição ao contexto aversivo sobre a porcentagem de tempo de congelamento (A). As colunas representam à média e as barras o EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo, seguido de pós teste de Dunnett. (B) Efeitos ao longo do tempo sobre a pressão arterial média (Δ PAM), frequência cardíaca (Δ FC) (C) e (D) temperatura cutânea (Δ TC). Os símbolos representam à média e as barras o EPM. O asterisco indica diferença significativa do tratamento em relação aos animais tratados com veículo ($p < 0,05$, pós teste de Dunnett). A ANOVA de uma via da média dos valores da PAM durante a reexposição mostrou efeito significativo da dose de URB597 0,1 nmol em relação ao grupo controle ($F_{2,21}=4,194$, $p < 0,05$ pós teste de Dunnett).

Figura 8: O efeito da anandamida (AEA) na reexposição ao contexto aversivo depende de receptores CB1. Efeitos da injeção bilateral intra-NLET de veículo+veículo (Veic+Veic; n=6) ou veículo+URB597 0,1nmol (Veic+URB597; n=5), AM251 0.1nmol+veículo (AM251+Veic; n=5), AM251 0.1nmol+URB597 0.1 nmol (AM251+URB597; n=7) sobre a porcentagem do tempo de congelamento (A). As colunas representam à média e as barras o EPM. (B) Efeitos ao longo do tempo sobre a pressão arterial média (Δ PAM), frequência cardíaca (Δ HR) (C) e (D) temperatura cutânea (Δ TC). Os símbolos representam à média e as barras o EPM. *p<0,05 em relação ao grupo veículo e #p<0,05 em relação ao grupo veículo+URB597 0,1nmol (Veic+URB597), pós teste de Duncan.

5. DISCUSSÃO

O presente estudo investigou o possível papel do sistema endocanabinoide presente no núcleo leito da estria terminal (NLET) sobre as respostas de ansiedade em ratos, através do envolvimento dos receptores CB1 e um de seus principais ligantes endógenos, a anandamida (AEA). Para isso, foram utilizados dois modelos animais de ansiedade conceitualmente distintos: o labirinto em cruz elevado (LCE), um modelo baseado em medo inato, e o medo condicionado ao contexto (MCC), baseado em aprendizado associativo (Pellow, Chopin et al. 1985; Millan, 2003). Nossos achados mostraram que o antagonismo ou a ativação de receptores CB1 no NLET não promoveu alterações em respostas de medo inato, mas modulou a resposta comportamental e de aumento da PAM no modelo MCC.

O LCE é amplamente utilizado nos estudos das bases neurobiológicas da ansiedade experimental e na pesquisa de novos alvos para compostos ansiolíticos (Ennaceur and Chazot, 2016). O teste é baseado na tendência natural dos roedores em explorar novos ambientes e se esquivarem de lugares elevados e iluminados nos quais se sintam ameaçados, que é representado pelos braços abertos do LCE (Pellow et al., 1985; Pellow and File, 1986). Em relação às variáveis registradas são considerados parâmetros relacionados à ansiedade o aumento na porcentagem de entradas e do tempo gasto nos braços abertos (File et al., 1990; Pellow and File, 1986). As entradas nos braços fechados são utilizadas como medida de atividade locomotora (File SE, 1992). A premissa básica dos modelos de medo inato, como é o caso do LCE, é o conflito gerado pela exposição a um novo ambiente que, em roedores, é responsável por evocar medo e curiosidade ao mesmo tempo (Montgomery, 1955).

Em nossos resultados observamos que não houve diferença na porcentagem de tempo e entrada nos braços abertos entre animais tratados em relação ao grupo controle; não houve também alteração da atividade locomotora entre os grupos tratados e o veículo. Em nosso estudo nós observamos que o antagonismo farmacológico de receptores CB1 intra-NLET, bem como a ativação desses receptores, através do aumento na disponibilidade de AEA por um inibidor da enzima FAAH, não induziram alterações comportamentais e nem alterações locomotoras nesses animais quando comparados aos animais tratados com veículo. Tal resultado é similar aos resultados previamente descritos na literatura, os quais demonstram que

tanto a administração sistêmica de antagonista CB1 quanto injeções centrais em diferentes regiões do encéfalo como o córtex pré-frontal medial (CPFM), hipocampo, substância cinzenta periaquedutal (SCP) e amígdala não levaram a alterações comportamentais e locomotoras no LCE (Campos et al., 2010; Fogaça et al., 2012; Moreira et al., 2007; Roohbakhsh et al., 2009; Rubino et al., 2008, 2007; Zarrindast et al., 2008).

Entretanto, resultados controversos têm sido relatados em diferentes condições experimentais no mesmo modelo (Komaki et al., 2015; Patel and Hillard, 2006; Berloquio 2013). Quanto à ativação dos receptores CB1, estudos prévios do nosso grupo demonstraram efeito do tipo ansiolítico através do aumento na disponibilidade de AEA pela administração de um inibidor da FAAH no hipocampo dorsal e CPFM em animais submetidos ao teste do LCE (Lisboa et al., 2015). Por outro lado, resultados opostos foram obtidos por conta de diferentes condições do contexto experimental (Haller et al., 2009; Morena et al., 2016).

A liberação de endocanabinoides apresenta característica peculiar em relação à grande maioria dos neurotransmissores: sua produção ocorre sob demanda. Assim, os endocanabinoides são sintetizados e liberados quando necessário como, por exemplo, situações de aumento da atividade neuronal (Mackie, 2006). Usualmente, os endocanabinoides funcionam como um *freio*, para ajustar a atividade de circuitos cerebrais específicos e liberação de diferentes neurotransmissores que foram estimulados além de um determinado limiar (Lutz et al., 2015). Nessas situações, os endocanabinoides são sintetizados no terminal pós-sináptico, em resposta ao influxo de Ca^{2+} . Após sua difusão para a fenda sináptica, ocorre ativação de receptores canabinóides, como os receptores CB1, localizados pré sinapticamente, e assim, reduzem a atividade neuronal (Moreira and Lutz, 2008).

Além disso, a sinalização endocanabinoide é capaz de regular o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA). A ativação do eixo HPA é uma resposta bem caracterizada ao estresse e responsável pela resposta neuroendócrina a estímulos aversivos (Hill and McEwen, 2010). Estudos demonstraram que tanto a interrupção genética como o bloqueio farmacológico da sinalização do receptor CB1 resultam em aumento da atividade do eixo HPA sob condições basais e após exposição a estresse agudo (Cota et al., 2007; Patel et al., 2004; Steiner and Wotjak, 2008).

A deleção genética total de receptores CB1 em camundongos promove aumento no comportamento de ansiedade sob condições de alta aversividade, mas

não sob condições menos aversivas, sugerindo que a sinalização endocanabinoide é mobilizada apenas por estímulos de maior aversividade (Jacob et al., 2009). Ainda, existe uma especificidade de resposta em relação à localização dos receptores CB1. Foi demonstrado que receptores CB1 em neurônios corticais glutamatérgicos e GABAérgicos exercem controle opostos sobre comportamentos de ansiedade, porém somente em situações de alto conteúdo aversivo (Häring et al., 2011; Jacob et al., 2009; Lafenêtre et al., 2009; Legler et al., 2015; Llorente-Berzal et al., 2015; Rey et al., 2012; Ruehle et al., 2013). Tal fato corrobora idéia de que o sistema endocanabinoide reduz a atividade neuronal em circuitos específicos, quando necessário. A ideia de que o sistema endocanabinoide atue modulando apenas situações que envolvam maior aversividade é uma possível explicação para nossos achados quanto às respostas emocionais dos animais submetidos ao condicionamento ao contexto.

O modelo do medo condicionado ao contexto (MCC) é um modelo pavloviano de condicionamento aversivo que envolve o medo evocado pela reexposição a ambiente previamente neutro (estímulo condicionado) que foi pareado a um estímulo aversivo ou desagradável como choque nas patas (estímulo não condicionado) (Carrive, 2000).

A resposta comportamental do medo condicionado é bem descrita e caracterizada por uma postura imóvel e tensa que, geralmente, é acompanhada pelos componentes cardiovasculares e autonômicos como aumento da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC), e queda da temperatura cutânea caudal (TC) devido ativação do sistema nervoso simpático (Carrive, 2000; Fanselow, 1980; Hott et al., 2016; Resstel et al., 2008a; Spiacci et al., 2016; Uliana et al., 2016; Vianna and Carrive, 2005). Esse conjunto de alterações comportamentais e autonômicas auxilia o organismo a responder a potenciais ameaças. O aumento da FC e a vasoconstrição visceral e periférica aumentam a pressão de perfusão levando ao redirecionamento do fluxo sanguíneo para leitos como a musculatura esquelética, importante para reações de defesa como luta ou fuga (Blanchard et al., 1986; Vianna and Carrive, 2005; Walker and Carrive, 2003). Sendo que a administração de drogas ansiolíticas antes da reexposição ao estímulo condicionado leva ao prejuízo na expressão do medo e ansiedade (Resstel et al., 2006).

Em nossos resultados a ativação ou bloqueio de receptores CB1 no NLET em animais submetidos ao MCC levaram a efeitos tipo ansiolítico e ansiogênico,

respectivamente, na resposta comportamental e de pressão arterial média (PAM). Tal resultado é em parte similar àqueles de estudos prévios do nosso grupo envolvendo a neurotransmissão endocanabinoide em outras estruturas cerebrais como a SCP e hipocampo dorsal (Spiacci et al., 2016; Uliana et al., 2016). Nesses estudos o antagonismo de receptores CB1 aumentou o componente comportamental e autonômico da resposta emocional frente à reexposição ao contexto aversivo, sendo os resultados semelhantes aos observados no antagonismo de receptores CB1 no NLET. Além disso, outro estudo do grupo também demonstrou que o aumento da disponibilidade de AEA na SCP, através da inibição da recaptação de AEA, reduziu o tempo de congelamento e a resposta cardiovascular no MCC (Resstel et al., 2008b). Esses resultados são similares ao nosso resultado utilizando o inibidor da FAAH no NLET, no qual observamos diminuição do tempo de congelamento e na PAM. Desta forma, nossos resultados no MCC demonstram que o sistema endocanabinoide é importante na modulação de resposta de medo aprendido.

Poucos trabalhos na literatura descrevem o papel do sistema endocanabinoide presente no NLET sobre as resposta de medo condicionado (Gomes et al., 2012; Gomes-de-Souza et al., 2016; Lange et al., 2016; Massi et al., 2008; Puente et al., 2010; Resstel et al., 2008a). Entretanto, já foi demonstrada a influência dessa estrutura sobre a resposta emocional condicionada (REC). A inativação reversível do NLET através do CoCl_2 , um inibidor inespecífico de sinapses, produziu efeito ansiolítico determinado pela diminuição do tempo de congelamento e queda da PAM e FC durante a reexposição de animais ao contexto condicionado (Resstel et al., 2008a). Resultado este que demonstra que o NLET é importante para expressão da REC. Interessantemente, nossos resultados no MCC demonstraram que o sistema endocanabinoide modula o componente comportamental e pressórico da REC na reexposição ao contexto aversivo. É possível que esse efeito seja devido à ampla rede de conexões que o NLET possui com outras estruturas envolvidas com a modulação de respostas associadas a situações aversivas (Crestani et al., 2013).

O NLET é uma estrutura límbica, bastante heterogênea que funciona como um importante *relé* na integração das respostas fisiológicas e comportamentais relacionadas ao estresse, desempenhando papel no controle das respostas autonômicas, neuroendócrinas e comportamentais sob condições aversivas (Crestani et al., 2013). É uma estrutura bem caracterizada em roedores e nos últimos anos tornou-se alvo de interesse para investigação de distúrbios psiquiátricos relacionados

ao estresse em humanos (Lebow and Chen, 2016). Evidências anatômicas, comportamentais e estudos de neuroimagem demonstraram o envolvimento do NLET em respostas de ansiedade (Dabrowska et al., 2011; Duvarci et al., 2009; Singewald et al., 2003; Walker et al., 2009; Yassa et al., 2012).

É relatada a participação do NLET em respostas de ansiedade tanto em modelos de aprendizado associativo como modelos de medo não condicionado. Lesões na região dorsal do NLET resultaram em comportamento ansiolítico aumentando a exploração no teste do campo aberto e nos braços abertos do LCE em roedores. De maneira oposta, a estimulação do NLET promoveu efeito ansiogênico nesses testes (Kim et al., 2013).

Estudos de nosso grupo demonstram mesmo padrão de respostas em modelos animais de medo aprendido em que a inativação reversível do NLET produziu efeito ansiolítico como o aumento no número de lambidas punidas no teste de conflito de Vogel e diminuição do tempo de congelamento em animais submetidos ao modelo do MCC (Resstel et al., 2008a). Vale ressaltar que o NLET apresenta conexões recíprocas com os núcleos medial e central da amígdala, além de receber projeções de estruturas como o hipocampo, complexo basolateral da amígdala e CPFM (Dong et al., 2001; Dong and Swanson, 2004c; Herman et al., 2003; Radley et al., 2009; Shammah-Lagnado et al., 2000; Spencer et al., 2005; Vertes, 2004). Essas estruturas são conhecidas por serem ativadas sob condições aversivas e possuem extrema importância na mediação de respostas comportamentais (Campeau and Davis, 1995; McDougall et al., 2004; Spencer and Day, 2004), portanto podemos sugerir que é através dessas conexões que o NLET desempenha seu papel sobre o componente comportamental da REC.

O NLET envia projeções para diversas áreas envolvidas na regulação autonômica em resposta a situações aversivas (Crestani et al., 2013; Resstel et al., 2008a), dentre elas o núcleo dorso medial do hipotálamo (DMH), um dos principais componentes responsáveis por mediar respostas cardiovasculares relacionadas ao estresse (Thompson and Swanson, 1998). Já foi mostrado que a estimulação elétrica da porção medial do NLET levou a aumento da PAM (Dunn and Williams, 1995). Resultado que mostra que além de estar relacionado ao controle da resposta comportamental ao estresse, o NLET é uma estrutura importante na modulação da resposta cardiovascular.

Além disso, uma característica importante da resposta cardiovascular ao estresse é o aumento simultâneo na pressão arterial e atividade vasomotora simpática (Kanbar et al., 2007) que parece ser mediado pela via descendente do DMH para os neurônios pré-motores simpáticos na medula ventrolateral rostral (RVLM) (DiMicco et al., 2006; Fontes et al., 2001; Horiuchi et al., 2004). No RVLM a microinjeção, em ratos não anestesiados, de aminoácidos excitatórios produz aumento da PAM (Bachelard et al., 1990), demonstrando a importância desta estrutura na regulação da atividade cardiovascular. É bem estabelecido que esses neurônios sejam fundamentais para a geração do tono vasomotor simpático (Feldberg and Guertzenstein, 1976; Guertzenstein and Silver, 1974). Nesse sentido, a microinjeção de antagonista de receptores CB1 e de inibidor da FAAH produz resposta de aumento e diminuição da PAM, respectivamente, possivelmente por modularem a atividade do NLET e consequentemente a atividade do DMH e RVLM. Por outro lado, estudo recente demonstrou que a modulação do sistema endocanabinoide no NLET frente às respostas fisiológicas ao estresse por restrição, um tipo de estresse agudo, levou a alteração da FC sem afetar a PAM (Gomes-de-Souza et al., 2016). Esse resultado difere do resultado encontrado no medo condicionado sugerindo que o NLET, por meio da sinalização endocanabinoide, atue de maneira distinta dependendo do tipo de estresse sofrido. Neste sentido, podemos sugerir que o estresse por restrição envolva substratos neurais diferentes e ative vias de retransmissão em estruturas distintas das sugeridas em nossos resultados. Assim, demonstramos a importância do sistema endocanabinoide no NLET na mediação de respostas a situações aversivas.

É amplamente descrito que o mecanismo de ação das respostas mediadas pelos endocanabinoides em diversas estruturas envolve a modulação da liberação de neurotransmissores, como GABA e glutamato (Shen et al., 1996; Stella and Piomelli, 2001; Tomasini et al., 2002). Vaughan e colaboradores (2000) demonstraram que a ativação de receptores CB1 da SCP inibe a transmissão sináptica glutamatérgica (Vaughan et al., 2000). Estudos eletrofisiológicos demonstraram que a ativação de receptores CB1 no NLET inibe transmissões sinápticas tanto excitatórias quanto inibitórias. No mesmo trabalho foi observada a co-localização destes receptores com transportadores vesiculares de glutamato (vGluT) do tipo 1 (Puente et al., 2010). Nesse sentido, estudo utilizando camundongos com deleção genética de receptores CB1 (CB1^{-/-}) em neurônios glutamatérgicos, mostrou que a administração de baixas

doses de um agonista CB1 gerou efeito tipo ansiolítico no LCE em animais selvagens, sendo que esta resposta era ausente nos animais CB1-/- em neurônios glutamatérgicos, sugerindo que este efeito seja mediado por inibição da neurotransmissão glutamatérgica (Rey et al., 2012). Utilizando a mesma técnica de deleção genética condicional, foi demonstrado que animais CB1-/- em neurônios glutamatérgicos apresentam aumento do comportamento de congelamento quando expostos ao teste do medo condicionado em relação aos animais selvagens (Metna-Laurent et al., 2012; Terzian et al., 2011). Complementarmente, resultados do grupo demonstraram que o antagonismo farmacológico de receptores de glutamato do tipo NMDA intra-NLET reduz o tempo de congelamento e a resposta autonômica durante a reexposição ao contexto condicionado (Hott et al., 2016).

Desta forma, considerando que a neurotransmissão glutamatérgica é importante na modulação da REC no MCC e que o receptor CB1 modula a liberação de glutamato no NLET e em outras estruturas, possivelmente as respostas observadas no MCC envolvam a modulação da liberação de glutamato. O aumento do tempo de congelamento e PAM observados com a administração de antagonista CB1 no NLET podem ser explicados pela desinibição da liberação de glutamato pelo CB1, culminando assim em um aumento de glutamato na fenda sináptica que promove a ativação de receptores NMDA e assim aumenta a resposta observada no MCC. Resultados do grupo já demonstraram esse evento no hipocampo dorsal e SCP, no qual a administração prévia de um antagonista de receptores NMDA foi capaz de prevenir o aumento da REC promovido por antagonista de receptores CB1 (Spiacci et al., 2016; Uliana et al., 2016), resultado que reforça a ideia que o efeito observado no NLET seja mediado por glutamato.

No protocolo utilizando um inibidor da FAAH no NLET, por sua vez, observou-se diminuição do tempo de congelamento e da PAM, efeito oposto ao observado no antagonismo de receptores CB1. A inibição da FAAH aumenta a disponibilidade de AEA o que proporciona ligação e ativação de receptores CB1, uma vez que a administração prévia de antagonista CB1 previne a diminuição do tempo de congelamento e PAM induzido pela administração no NLET de um inibidor da FAAH. Desta maneira, possivelmente este efeito observado é devido à ativação do receptor CB1 promovido pela AEA, reduzindo assim a liberação de glutamato no NLET.

É também bem estabelecido que a ativação de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA pode induzir síntese de óxido nítrico (NO) no SNC por meio da isoforma

neuronal da NO sintase (nNOS) (Garthwaite et al., 1989). O NO é um importante neuromodulador envolvido em vários processos biológicos e, pode influenciar a função celular modulando a excitabilidade neuronal, bem como a liberação do próprio glutamato e outros neurotransmissores (Garthwaite et al., 1988; Lourenço et al., 2010). Estudos em animais mostraram que antagonistas NMDA são capazes de reverter respostas aversivas induzidas pela administração de um doador de NO na SCP de ratos (Moreira et al., 2004). Além disso, o pré-tratamento com inibidor da nNOS atenua reações defensivas induzidas pela administração de agonistas NMDA, também na SCP (Miguel and Nunes-de-Souza, 2008), demonstrando o envolvimento e integração das neurotransmissões glutamatérgicas e nitrérgicas na modulação de respostas defensivas.

Resultados recentes mostraram que o sistema nitrérgico presente no NLET modula a REC no MCC. Neste trabalho a administração de um inibidor da nNOS e um sequestrador extracelular de NO foram capazes de reduzir a resposta comportamental e autonômica da REC no MCC, sugerindo o envolvimento do sistema nitrérgico presentes nesta estrutura na expressão da REC (Hott et al., 2016). Além disso, este trabalho mostra ainda que a produção de NO durante a reexposição ao contexto aversivo depende da ativação de receptores NMDA, uma vez que a administração de um antagonista de receptores NMDA no NLET diminuiu a quantidade de NO_x no NLET em relação aos animais tratados com salina (Hott et al., 2016). Esse resultado demonstra a íntima relação do sistema glutamatérgico e nitrérgico no NLET na modulação da REC. Portanto, considerando que o receptor CB1 no NLET modula a transmissão glutamatérgica e que a resposta observada nos protocolos com antagonista CB1 e inibidor da FAAH possivelmente sejam mediados por glutamato, o sistema nitrérgico também pode estar envolvido nas respostas com MCC observadas neste trabalho.

Estudos do nosso grupo demonstraram a ligação entre o sistema endocanabinoide e a neurotransmissão nitrérgica na modulação de respostas defensivas. Foi observado que a administração prévia de um inibidor da nNOS ou de um sequestrador de NO foram capazes de prevenir o efeito ansiogênico produzido pelo antagonista CB1 no hipocampo dorsal e na SCP dorsolateral, sugerindo que a resposta induzida pelo bloqueio de receptores CB1 parece envolver ativação da enzima nNOS e difusão do NO para fenda sináptica (Spiacchi et al., 2016; Uliana et al., 2016).

Nesse sentido, estas evidências indicam que a resposta promovida pela microinjeção de antagonista de receptores CB1 no NLET aumenta o tempo de congelamento e PAM provavelmente por induzir a produção de NO e sua difusão para a fenda sináptica. Além disso, sugerem que a inibição da FAAH no NLET reduza o tempo de congelamento e PAM por reduzir a produção e difusão de NO. Portanto, apesar de não existirem evidências concretas da ligação do sistema endocanabinoide ao sistema glutamatérgico e nitrérgico no NLET na modulação da REC no MCC, sugerimos que os efeitos observados com antagonismo CB1 e inibição da FAAH sejam via modulação da liberação de glutamato e produção de NO.

Desta maneira, podemos concluir que o sistema endocanabinoide presente no NLET modula respostas de medo aprendido, sem intervir nas respostas de medo inato. No MCC, observamos que a administração de antagonista de receptores CB1 no NLET aumenta o componente comportamental e pressórico da REC e que a inibição da FAAH no NLET, via CB1, diminuiu o componente comportamental e pressórico da REC no MCC.

Referências bibliográficas

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahn, K., McKinney, M.K., Cravatt, B.F., 2008. Enzymatic pathways that regulate endocannabinoid signaling in the nervous system. *Chem. Rev.* 108, 1687–1707. doi:10.1021/cr0782067
- Ashton, C.H., Moore, P.B., 2011. Endocannabinoid system dysfunction in mood and related disorders. *Acta Psychiatr. Scand.* 124, 250–261. doi:10.1111/j.1600-0447.2011.01687.x
- Atwood, B.K., Mackie, K., 2010. CB2: a cannabinoid receptor with an identity crisis. *Br. J. Pharmacol.* 160, 467–479. doi:10.1111/j.1476-5381.2010.00729.x
- Avery, S.N., Clauss, J.A., Winder, D.G., Woodward, N., Heckers, S., Blackford, J.U., 2014. BNST neurocircuitry in humans. *NeuroImage* 91, 311–323. doi:10.1016/j.neuroimage.2014.01.017
- Bachelard, H., Gardiner, S.M., Bennett, T., 1990. Cardiovascular responses elicited by chemical stimulation of the rostral ventrolateral medulla in conscious, unrestrained rats. *J. Auton. Nerv. Syst.* 31, 185–190. doi:10.1016/0165-1838(90)90184-K
- Blanchard, R.J., Flannelly, K.J., Blanchard, D.C., 1986. Defensive behavior of laboratory and wild *Rattus norvegicus*. *J. Comp. Psychol. Wash. DC* 100, 101–107.
- Borkovec, T.D., 1985. Worry: a potentially valuable concept. *Behav. Res. Ther.* 23, 481–483.
- Campeau, S., Davis, M., 1995. Involvement of the central nucleus and basolateral complex of the amygdala in fear conditioning measured with fear-potentiated startle in rats trained concurrently with auditory and visual conditioned stimuli. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 15, 2301–2311.
- Campos, A.C., Ferreira, F.R., Guimarães, F.S., Lemos, J.I., 2010. Facilitation of endocannabinoid effects in the ventral hippocampus modulates anxiety-like behaviors depending on previous stress experience. *Neuroscience* 167, 238–246. doi:10.1016/j.neuroscience.2010.01.062
- Campos, A.C., Guimarães, F.S., 2009. Evidence for a potential role for TRPV1 receptors in the dorsolateral periaqueductal gray in the attenuation of the anxiolytic effects of cannabinoids. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 33, 1517–1521. doi:10.1016/j.pnpbp.2009.08.017
- Carrive, P., 2000. Conditioned fear to environmental context: cardiovascular and behavioral components in the rat. *Brain Res.* 858, 440–445.
- Cota, D., Steiner, M.-A., Marsicano, G., Cervino, C., Herman, J.P., Grübler, Y., Stalla, J., Pasquali, R., Lutz, B., Stalla, G.K., Pagotto, U., 2007. Requirement of cannabinoid receptor type 1 for the basal modulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis function. *Endocrinology* 148, 1574–1581. doi:10.1210/en.2005-1649
- Cravatt, B.F., Giang, D.K., Mayfield, S.P., Boger, D.L., Lerner, R.A., Gilula, N.B., 1996. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature* 384, 83–87. doi:10.1038/384083a0
- Crestani, C.C., Alves, F.H., Gomes, F.V., Resstel, L.B., Correa, F.M., Herman, J.P., 2013. Mechanisms in the bed nucleus of the stria terminalis involved in control of autonomic and neuroendocrine functions: a review. *Curr. Neuropharmacol.* 11, 141–159. doi:10.2174/1570159X11311020002
- Crestani, C.C., Alves, F.H.F., Tavares, R.F., Corrêa, F.M.A., 2009. Role of the bed nucleus of the stria terminalis in the cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. *Stress Amst. Neth.* 12, 268–278. doi:10.1080/10253890802331477
- Dabrowska, J., Hazra, R., Ahern, T.H., Guo, J.-D., McDonald, A.J., Mascagni, F., Muller, J.F., Young, L.J., Rainnie, D.G., 2011. Neuroanatomical evidence for reciprocal regulation of the corticotrophin-releasing factor and oxytocin systems in the

- hypothalamus and the bed nucleus of the stria terminalis of the rat: Implications for balancing stress and affect. *Psychoneuroendocrinology* 36, 1312–1326.
doi:10.1016/j.psyneuen.2011.03.003
- Di Marzo, V., 2011. Endocannabinoid signaling in the brain: biosynthetic mechanisms in the limelight. *Nat. Neurosci.* 14, 9–15. doi:10.1038/nn.2720
- Di Marzo, V., Bisogno, T., De Petrocellis, L., 2001. Anandamide: some like it hot. *Trends Pharmacol. Sci.* 22, 346–349.
- DiMicco, J.A., Sarkar, S., Zaretskaia, M.V., Zaretsky, D.V., 2006. Stress-induced cardiac stimulation and fever: common hypothalamic origins and brainstem mechanisms. *Auton. Neurosci. Basic Clin.* 126–127, 106–119. doi:10.1016/j.autneu.2006.02.010
- Dinh, T.P., Freund, T.F., Piomelli, D., 2002. A role for monoglyceride lipase in 2-arachidonoylglycerol inactivation. *Chem. Phys. Lipids* 121, 149–158.
- Dong, H.-W., Petrovich, G.D., Watts, A.G., Swanson, L.W., 2001. Basic organization of projections from the oval and fusiform nuclei of the bed nuclei of the stria terminalis in adult rat brain. *J. Comp. Neurol.* 436, 430–455. doi:10.1002/cne.1079
- Dong, H.-W., Swanson, L.W., 2006a. Projections from bed nuclei of the stria terminalis, anteromedial area: Cerebral hemisphere integration of neuroendocrine, autonomic, and behavioral aspects of energy balance. *J. Comp. Neurol.* 494, 142–178.
doi:10.1002/cne.20788
- Dong, H.-W., Swanson, L.W., 2006b. Projections from bed nuclei of the stria terminalis, dorsomedial nucleus: Implications for cerebral hemisphere integration of neuroendocrine, autonomic, and drinking responses. *J. Comp. Neurol.* 494, 75–107.
doi:10.1002/cne.20790
- Dong, H.-W., Swanson, L.W., 2006c. Projections from bed nuclei of the stria terminalis, magnocellular nucleus: Implications for cerebral hemisphere regulation of micturition, defecation, and penile erection. *J. Comp. Neurol.* 494, 108–141.
doi:10.1002/cne.20789
- Dong, H.-W., Swanson, L.W., 2004a. Projections from bed nuclei of the stria terminalis, posterior division: Implications for cerebral hemisphere regulation of defensive and reproductive behaviors. *J. Comp. Neurol.* 471, 396–433. doi:10.1002/cne.20002
- Dong, H.-W., Swanson, L.W., 2004b. Organization of axonal projections from the anterolateral area of the bed nuclei of the stria terminalis. *J. Comp. Neurol.* 468, 277–298. doi:10.1002/cne.10949
- Dong, H.-W., Swanson, L.W., 2004c. Projections from bed nuclei of the stria terminalis, posterior division: implications for cerebral hemisphere regulation of defensive and reproductive behaviors. *J. Comp. Neurol.* 471, 396–433. doi:10.1002/cne.20002
- Dunn, J.D., Williams, T.J., 1995. Cardiovascular responses to electrical stimulation of the bed nucleus of the stria terminalis. *J. Comp. Neurol.* 352, 227–234.
doi:10.1002/cne.903520206
- Duvarci, S., Bauer, E.P., Paré, D., 2009. The bed nucleus of the stria terminalis mediates inter-individual variations in anxiety and fear. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 10357–10361. doi:10.1523/JNEUROSCI.2119-09.2009
- Ennaceur, A., Chazot, P.L., 2016. Preclinical animal anxiety research - flaws and prejudices. *Pharmacol. Res. Perspect.* 4, e00223. doi:10.1002/prp2.223
- Fanselow, M.S., 2000. Contextual fear, gestalt memories, and the hippocampus. *Behav. Brain Res.* 110, 73–81.
- Fanselow, M.S., 1980. Conditioned and unconditional components of post-shock freezing. *Pavlov. J. Biol. Sci.* 15, 177–182.
- Feldberg, W., Guertzenstein, P.G., 1976. Vasodepressor effects obtained by drugs acting on the ventral surface of the brain stem. *J. Physiol.* 258, 337–355.

- Fendt, M., Siegl, S., Steiniger-Brach, B., 2005. Noradrenaline transmission within the ventral bed nucleus of the stria terminalis is critical for fear behavior induced by trimethylthiazoline, a component of fox odor. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 25, 5998–6004. doi:10.1523/JNEUROSCI.1028-05.2005
- File, S.E., Mabbutt, P.S., Hitchcott, P.K., 1990. Characterisation of the phenomenon of “one-trial tolerance” to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in the elevated plus-maze. *Psychopharmacology (Berl.)* 102, 98–101.
- File SE, 1992. Behavioural detection of anxiolytic action, in: Elliott JM, Heal DJ, Marsden CA (Ed.), *Experimental Approaches to Anxiety and Depression*. New York: Wiley, pp. 25–44.
- Fogaça, M.V., Aguiar, D.C., Moreira, F.A., Guimarães, F.S., 2012. The endocannabinoid and endovanilloid systems interact in the rat prelimbic medial prefrontal cortex to control anxiety-like behavior. *Neuropharmacology* 63, 202–210. doi:10.1016/j.neuropharm.2012.03.007
- Fontes, M.A., Tagawa, T., Polson, J.W., Cavanagh, S.J., Dampney, R.A., 2001. Descending pathways mediating cardiovascular response from dorsomedial hypothalamic nucleus. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 280, H2891–2901.
- Gaetani, S., Dipasquale, P., Romano, A., Righetti, L., Cassano, T., Piomelli, D., Cuomo, V., 2009. The endocannabinoid system as a target for novel anxiolytic and antidepressant drugs. *Int. Rev. Neurobiol.* 85, 57–72. doi:10.1016/S0074-7742(09)85005-8
- Gaoni, Y., Mechoulam, R., 1964. Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. *J. Am. Chem. Soc.* 86, 1646–1647. doi:10.1021/ja01062a046
- Garthwaite, J., Charles, S.L., Chess-Williams, R., 1988. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature* 336, 385–388. doi:10.1038/336385a0
- Garthwaite, J., Garthwaite, G., Palmer, R.M., Moncada, S., 1989. NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices. *Eur. J. Pharmacol.* 172, 413–416.
- Gomes, F.V., Reis, D.G., Alves, F.H.F., Corrêa, F.M.A., Guimarães, F.S., Resstel, L.B.M., 2012. Cannabidiol injected into the bed nucleus of the stria terminalis reduces the expression of contextual fear conditioning via 5-HT1A receptors. *J. Psychopharmacol. Oxf. Engl.* 26, 104–113. doi:10.1177/0269881110389095
- Gomes-de-Souza, L., Oliveira, L.A., Benini, R., Rodella, P., Costa-Ferreira, W., Crestani, C.C., 2016. Involvement of endocannabinoid neurotransmission in the bed nucleus of stria terminalis in cardiovascular responses to acute restraint stress in rats: Endocannabinoid signalling and stress responses. *Br. J. Pharmacol.* 173, 2833–2844. doi:10.1111/bph.13560
- Gong, J.-P., Onaivi, E.S., Ishiguro, H., Liu, Q.-R., Tagliaferro, P.A., Brusco, A., Uhl, G.R., 2006. Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain. *Brain Res.* 1071, 10–23. doi:10.1016/j.brainres.2005.11.035
- Grueter, B.A., Gosnell, H.B., Olsen, C.M., Schramm-Sapota, N.L., Nekrasova, T., Landreth, G.E., Winder, D.G., 2006. Extracellular-signal regulated kinase 1-dependent metabotropic glutamate receptor 5-induced long-term depression in the bed nucleus of the stria terminalis is disrupted by cocaine administration. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 26, 3210–3219. doi:10.1523/JNEUROSCI.0170-06.2006
- Guertzenstein, P.G., Silver, A., 1974. Fall in blood pressure produced from discrete regions of the ventral surface of the medulla by glycine and lesions. *J. Physiol.* 242, 489–503.
- Haller, J., Barna, I., Barsvari, B., Gyimesi Pelczer, K., Yasar, S., Panlilio, L.V., Goldberg, S., 2009. Interactions between environmental aversiveness and the anxiolytic effects of

- enhanced cannabinoid signaling by FAAH inhibition in rats. *Psychopharmacology (Berl.)* 204, 607–616. doi:10.1007/s00213-009-1494-7
- Hammack, S.E., Todd, T.P., Kocho-Schellenberg, M., Bouton, M.E., 2015. Role of the bed nucleus of the stria terminalis in the acquisition of contextual fear at long or short context-shock intervals. *Behav. Neurosci.* 129, 673–678. doi:10.1037/bne0000088
- Häring, M., Kaiser, N., Monory, K., Lutz, B., 2011. Circuit specific functions of cannabinoid CB1 receptor in the balance of investigatory drive and exploration. *PloS One* 6, e26617. doi:10.1371/journal.pone.0026617
- Herkenham, M., Lynn, A.B., Little, M.D., Johnson, M.R., Melvin, L.S., de Costa, B.R., Rice, K.C., 1990. Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 1932–1936.
- Herman, J.P., Figueiredo, H., Mueller, N.K., Ulrich-Lai, Y., Ostrander, M.M., Choi, D.C., Cullinan, W.E., 2003. Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Front. Neuroendocrinol.* 24, 151–180.
- Hill, M.N., McEwen, B.S., 2010. Involvement of the endocannabinoid system in the neurobehavioural effects of stress and glucocorticoids. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 34, 791–797. doi:10.1016/j.pnpbp.2009.11.001
- Hogg, S., 1996. A review of the validity and variability of the Elevated Plus-Maze as an animal model of anxiety. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 54, 21–30. doi:10.1016/0091-3057(95)02126-4
- Horiuchi, J., McAllen, R.M., Allen, A.M., Killinger, S., Fontes, M. a. P., Dampney, R. a. L., 2004. Descending vasomotor pathways from the dorsomedial hypothalamic nucleus: role of medullary raphe and RVLm. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 287, R824–832. doi:10.1152/ajpregu.00221.2004
- Hott, S.C., Gomes, F.V., Fabri, D.R.S., Reis, D.G., Crestani, C.C., Côrrea, F.M.A., Resstel, L.B.M., 2012. Both $\alpha 1$ - and $\beta 1$ -adrenoceptors in the bed nucleus of the stria terminalis are involved in the expression of conditioned contextual fear. *Br. J. Pharmacol.* 167, 207–221. doi:10.1111/j.1476-5381.2012.01985.x
- Hott, S.C., Gomes, F.V., Uliana, D.L., Vale, G.T., Tirapelli, C.R., Resstel, L.B.M., 2016. Bed nucleus of the stria terminalis NMDA receptors and nitric oxide modulate contextual fear conditioning in rats. *Neuropharmacology*. doi:10.1016/j.neuropharm.2016.05.022
- Howlett, A.C., 2002. The cannabinoid receptors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 68–69, 619–631.
- Howlett, A.C., Barth, F., Bonner, T.I., Cabral, G., Casellas, P., Devane, W.A., Felder, C.C., Herkenham, M., Mackie, K., Martin, B.R., Mechoulam, R., Pertwee, R.G., 2002. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol. Rev.* 54, 161–202.
- Jacob, W., Yassouridis, A., Marsicano, G., Monory, K., Lutz, B., Wotjak, C.T., 2009. Endocannabinoids render exploratory behaviour largely independent of the test aversiveness: role of glutamatergic transmission. *Genes Brain Behav.* 8, 685–698. doi:10.1111/j.1601-183X.2009.00512.x
- Kanbar, R., Oréa, V., Barrès, C., Julien, C., 2007. Baroreflex control of renal sympathetic nerve activity during air-jet stress in rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 292, R362–367. doi:10.1152/ajpregu.00413.2006
- Kawahara, H., Drew, G.M., Christie, M.J., Vaughan, C.W., 2011. Inhibition of fatty acid amide hydrolase unmasks CB1 receptor and TRPV1 channel-mediated modulation of glutamatergic synaptic transmission in midbrain periaqueductal grey. *Br. J. Pharmacol.* 163, 1214–1222. doi:10.1111/j.1476-5381.2010.01157.x

- Kim, S.-Y., Adhikari, A., Lee, S.Y., Marshel, J.H., Kim, C.K., Mallory, C.S., Lo, M., Pak, S., Mattis, J., Lim, B.K., Malenka, R.C., Warden, M.R., Neve, R., Tye, K.M., Deisseroth, K., 2013. Diverging neural pathways assemble a behavioural state from separable features in anxiety. *Nature* 496, 219–223. doi:10.1038/nature12018
- Komaki, A., Hashemi-Firouzi, N., Shojaei, S., Souri, Z., Heidari, S., Shahidi, S., 2015. Study the Effect of Endocannabinoid System on Rat Behavior in Elevated Plus-Maze. *Basic Clin. Neurosci.* 6, 147–153.
- Korem, N., Zer-Aviv, T.M., Ganon-Elazar, E., Abush, H., Akirav, I., 2016. Targeting the endocannabinoid system to treat anxiety-related disorders. *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.* 27. doi:10.1515/jbcpp-2015-0058
- Lafenêtre, P., Chaouloff, F., Marsicano, G., 2009. Bidirectional regulation of novelty-induced behavioral inhibition by the endocannabinoid system. *Neuropharmacology* 57, 715–721. doi:10.1016/j.neuropharm.2009.07.014
- Lange, M.D., Daldrup, T., Remmers, F., Szkudlarek, H.J., Lesting, J., Guggenhuber, S., Ruehle, S., Jüngling, K., Seidenbecher, T., Lutz, B., Pape, H.C., 2016. Cannabinoid CB1 receptors in distinct circuits of the extended amygdala determine fear responsiveness to unpredictable threat. *Mol. Psychiatry*. doi:10.1038/mp.2016.156
- Lebow, M.A., Chen, A., 2016. Overshadowed by the amygdala: the bed nucleus of the stria terminalis emerges as key to psychiatric disorders. *Mol. Psychiatry* 21, 450–463. doi:10.1038/mp.2016.1
- Legler, A., Monory, K., Lutz, B., 2015. Age differences in the role of the cannabinoid type 1 receptor on glutamatergic neurons in habituation and spatial memory acquisition. *Life Sci.* 138, 57–63. doi:10.1016/j.lfs.2015.01.034
- Ligresti, A., Cascio, M.G., Di Marzo, V., 2005. Endocannabinoid metabolic pathways and enzymes. *Curr. Drug Targets CNS Neurol. Disord.* 4, 615–623.
- Lisboa, S.F., Borges, A.A., Nejo, P., Fassini, A., Guimarães, F.S., Resstel, L.B., 2015. Cannabinoid CB1 receptors in the dorsal hippocampus and prelimbic medial prefrontal cortex modulate anxiety-like behavior in rats: additional evidence. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 59, 76–83. doi:10.1016/j.pnpbp.2015.01.005
- Lisboa, S.F., Reis, D.G., da Silva, A.L., Corrêa, F.M.A., Guimarães, F.S., Resstel, L.B.M., 2010. Cannabinoid CB1 receptors in the medial prefrontal cortex modulate the expression of contextual fear conditioning. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 13, 1163–1173. doi:10.1017/S1461145710000684
- Lisboa, S.F., Resstel, L.B.M., Aguiar, D.C., Guimarães, F.S., 2008. Activation of cannabinoid CB1 receptors in the dorsolateral periaqueductal gray induces anxiolytic effects in rats submitted to the Vogel conflict test. *Eur. J. Pharmacol.* 593, 73–78. doi:10.1016/j.ejphar.2008.07.032
- Llorente-Berzal, A., Terzian, A.L.B., di Marzo, V., Micale, V., Viveros, M.P., Wotjak, C.T., 2015. 2-AG promotes the expression of conditioned fear via cannabinoid receptor type 1 on GABAergic neurons. *Psychopharmacology (Berl.)* 232, 2811–2825. doi:10.1007/s00213-015-3917-y
- Lourenço, J., Cannich, A., Carta, M., Coussen, F., Mülle, C., Marsicano, G., 2010. Synaptic activation of kainate receptors gates presynaptic CB1 signaling at GABAergic synapses. *Nat. Neurosci.* 13, 197–204. doi:10.1038/nn.2481
- Lutz, B., Marsicano, G., Maldonado, R., Hillard, C.J., 2015. The endocannabinoid system in guarding against fear, anxiety and stress. *Nat. Rev. Neurosci.* 16, 705–718. doi:10.1038/nrn4036
- Mackie, K., 2006. Mechanisms of CB1 receptor signaling: endocannabinoid modulation of synaptic strength. *Int. J. Obes.* 2005 30 Suppl 1, S19-23. doi:10.1038/sj.ijo.0803273

- Marco, E., 2011. Endocannabinoid system and psychiatry: in search of a neurobiological basis for detrimental and potential therapeutic effects. *Front. Behav. Neurosci.* 5. doi:10.3389/fnbeh.2011.00063
- Martin, M., Ledent, C., Parmentier, M., Maldonado, R., Valverde, O., 2002. Involvement of CB1 cannabinoid receptors in emotional behaviour. *Psychopharmacology (Berl.)* 159, 379–387. doi:10.1007/s00213-001-0946-5
- Massi, L., Elezgarai, I., Puente, N., Reguero, L., Grandes, P., Manzoni, O.J., Georges, F., 2008. Cannabinoid receptors in the bed nucleus of the stria terminalis control cortical excitation of midbrain dopamine cells in vivo. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 10496–10508. doi:10.1523/JNEUROSCI.2291-08.2008
- McDougall, S.J., Widdop, R.E., Lawrence, A.J., 2004. Medial prefrontal cortical integration of psychological stress in rats. *Eur. J. Neurosci.* 20, 2430–2440. doi:10.1111/j.1460-9568.2004.03707.x
- McGaraughty, S., Chu, K.L., Bitner, R.S., Martino, B., El Kouhen, R., Han, P., Nikkel, A.L., Burgard, E.C., Faltynek, C.R., Jarvis, M.F., 2003. Capsaicin infused into the PAG affects rat tail flick responses to noxious heat and alters neuronal firing in the RVM. *J. Neurophysiol.* 90, 2702–2710. doi:10.1152/jn.00433.2003
- Mechoulam, R., Ben-Shabat, S., Hanus, L., Ligumsky, M., Kaminski, N.E., Schatz, A.R., Gopher, A., Almog, S., Martin, B.R., Compton, D.R., 1995. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem. Pharmacol.* 50, 83–90.
- Mechoulam, R., Parker, L.A., 2013. The endocannabinoid system and the brain. *Annu. Rev. Psychol.* 64, 21–47. doi:10.1146/annurev-psych-113011-143739
- Metna-Laurent, M., Soria-Gómez, E., Verrier, D., Conforzi, M., Jégo, P., Lafenêtre, P., Marsicano, G., 2012. Bimodal control of fear-coping strategies by CB₁ cannabinoid receptors. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 32, 7109–7118. doi:10.1523/JNEUROSCI.1054-12.2012
- Miguel, T.T., Nunes-de-Souza, R.L., 2008. Anxiogenic-like effects induced by NMDA receptor activation are prevented by inhibition of neuronal nitric oxide synthase in the periaqueductal gray in mice. *Brain Res.* 1240, 39–46. doi:10.1016/j.brainres.2008.08.068
- Millan, M.J., 2003. The neurobiology and control of anxious states. *Prog. Neurobiol.* 70, 83–244.
- Montgomery, K.C., 1955. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 48, 254–260.
- Moreira, F.A., Aguiar, D.C., Campos, A.C., Lisboa, S.F., Terzian, A.L., Resstel, L.B., Guimarães, F.S., 2009. Antiaversive effects of cannabinoids: is the periaqueductal gray involved? *Neural Plast.* 2009, 625469. doi:10.1155/2009/625469
- Moreira, F.A., Aguiar, D.C., Guimarães, F.S., 2007. Anxiolytic-like effect of cannabinoids injected into the rat dorsolateral periaqueductal gray. *Neuropharmacology* 52, 958–965. doi:10.1016/j.neuropharm.2006.10.013
- Moreira, F.A., Lutz, B., 2008. The endocannabinoid system: emotion, learning and addiction: The endocannabinoid system. *Addict. Biol.* 13, 196–212. doi:10.1111/j.1369-1600.2008.00104.x
- Moreira, F.A., Molchanov, M.L., Guimarães, F.S., 2004. Ionotropic glutamate-receptor antagonists inhibit the aversive effects of nitric oxide donor injected into the dorsolateral periaqueductal gray of rats. *Psychopharmacology (Berl.)* 171, 199–203. doi:10.1007/s00213-003-1569-9
- Morena, M., Leidl, K.D., Vecchiarelli, H.A., Gray, J.M., Campolongo, P., Hill, M.N., 2016. Emotional arousal state influences the ability of amygdalar endocannabinoid signaling

- to modulate anxiety. *Neuropharmacology* 111, 59–69.
doi:10.1016/j.neuropharm.2016.08.020
- Newsom, R.J., Osterlund, C., Masini, C.V., Day, H.E., Spencer, R.L., Campeau, S., 2012. Cannabinoid receptor type 1 antagonism significantly modulates basal and loud noise induced neural and hypothalamic-pituitary-adrenal axis responses in male Sprague–Dawley rats. *Neuroscience* 204, 64–73. doi:10.1016/j.neuroscience.2011.11.043
- Pacher, P., Bátkai, S., Kunos, G., 2006. The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol. Rev.* 58, 389–462. doi:10.1124/pr.58.3.2
- Pamplona, F.A., Prediger, R.D.S., Pandolfo, P., Takahashi, R.N., 2006. The cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 facilitates the extinction of contextual fear memory and spatial memory in rats. *Psychopharmacology (Berl.)* 188, 641–649.
doi:10.1007/s00213-006-0514-0
- Patel, S., Hillard, C.J., 2006. Pharmacological evaluation of cannabinoid receptor ligands in a mouse model of anxiety: further evidence for an anxiolytic role for endogenous cannabinoid signaling. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 318, 304–311.
doi:10.1124/jpet.106.101287
- Patel, S., Roelke, C.T., Rademacher, D.J., Cullinan, W.E., Hillard, C.J., 2004. Endocannabinoid signaling negatively modulates stress-induced activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Endocrinology* 145, 5431–5438.
doi:10.1210/en.2004-0638
- Pellow, S., Chopin, P., File, S.E., Briley, M., 1985. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Methods* 14, 149–167.
- Pellow, S., File, S.E., 1986. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 24, 525–529.
- Pertwee, R.G., 2009. Emerging strategies for exploiting cannabinoid receptor agonists as medicines. *Br. J. Pharmacol.* 156, 397–411. doi:10.1111/j.1476-5381.2008.00048.x
- Piomelli, D., Tarzia, G., Duranti, A., Tontini, A., Mor, M., Compton, T.R., Dasse, O., Monaghan, E.P., Parrott, J.A., Putman, D., 2006. Pharmacological profile of the selective FAAH inhibitor KDS-4103 (URB597). *CNS Drug Rev.* 12, 21–38.
doi:10.1111/j.1527-3458.2006.00021.x
- Puente, N., Elezgarai, I., Lafourcade, M., Reguero, L., Marsicano, G., Georges, F., Manzoni, O.J., Grandes, P., 2010. Localization and function of the cannabinoid CB1 receptor in the anterolateral bed nucleus of the stria terminalis. *PloS One* 5, e8869.
doi:10.1371/journal.pone.0008869
- Radley, J.J., Gosselink, K.L., Sawchenko, P.E., 2009. A discrete GABAergic relay mediates medial prefrontal cortical inhibition of the neuroendocrine stress response. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 7330–7340. doi:10.1523/JNEUROSCI.5924-08.2009
- Resstel, L.B.M., Alves, F.H.F., Reis, D.G., Crestani, C.C., Corrêa, F.M.A., Guimarães, F.S., 2008a. Anxiolytic-like effects induced by acute reversible inactivation of the bed nucleus of stria terminalis. *Neuroscience* 154, 869–876.
doi:10.1016/j.neuroscience.2008.04.007
- Resstel, L.B.M., Joca, S.R.L., Moreira, F.A., Corrêa, F.M.A., Guimarães, F.S., 2006. Effects of cannabidiol and diazepam on behavioral and cardiovascular responses induced by contextual conditioned fear in rats. *Behav. Brain Res.* 172, 294–298.
doi:10.1016/j.bbr.2006.05.016
- Resstel, L.B.M., Lisboa, S.F., Aguiar, D.C., Corrêa, F.M.A., Guimarães, F.S., 2008b. Activation of CB1 cannabinoid receptors in the dorsolateral periaqueductal gray

- reduces the expression of contextual fear conditioning in rats. *Psychopharmacology* (Berl.) 198, 405–411. doi:10.1007/s00213-008-1156-1
- Rey, A.A., Purrio, M., Viveros, M.-P., Lutz, B., 2012. Biphasic Effects of Cannabinoids in Anxiety Responses: CB1 and GABAB Receptors in the Balance of GABAergic and Glutamatergic Neurotransmission. *Neuropsychopharmacology* 37, 2624–2634. doi:10.1038/npp.2012.123
- Roohbakhsh, A., Keshavarz, S., Hasanein, P., Rezvani, M.E., Moghaddam, A.H., 2009. Role of endocannabinoid system in the ventral hippocampus of rats in the modulation of anxiety-like behaviours. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 105, 333–338. doi:10.1111/j.1742-7843.2009.00449.x
- Rosen, J.B., Schulkin, J., 1998. From normal fear to pathological anxiety. *Psychol. Rev.* 105, 325–350.
- Rubino, T., Guidali, C., Vigano, D., Realini, N., Valenti, M., Massi, P., Parolaro, D., 2008. CB1 receptor stimulation in specific brain areas differently modulate anxiety-related behaviour. *Neuropharmacology* 54, 151–160. doi:10.1016/j.neuropharm.2007.06.024
- Rubino, T., Sala, M., Viganò, D., Braida, D., Castiglioni, C., Limonta, V., Guidali, C., Realini, N., Parolaro, D., 2007. Cellular Mechanisms Underlying the Anxiolytic Effect of Low Doses of Peripheral Δ^9 -Tetrahydrocannabinol in Rats. *Neuropsychopharmacology* 32, 2036–2045. doi:10.1038/sj.npp.1301330
- Ruehle, S., Remmers, F., Romo-Parra, H., Massa, F., Wickert, M., Wörtge, S., Häring, M., Kaiser, N., Marsicano, G., Pape, H.-C., Lutz, B., 2013. Cannabinoid CB1 receptor in dorsal telencephalic glutamatergic neurons: distinctive sufficiency for hippocampus-dependent and amygdala-dependent synaptic and behavioral functions. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 33, 10264–10277. doi:10.1523/JNEUROSCI.4171-12.2013
- Scherma, M., Medalie, J., Fratta, W., Vadivel, S.K., Makriyannis, A., Piomelli, D., Mikics, E., Haller, J., Yasar, S., Tanda, G., Goldberg, S.R., 2008. The endogenous cannabinoid anandamide has effects on motivation and anxiety that are revealed by fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibition. *Neuropharmacology* 54, 129–140. doi:10.1016/j.neuropharm.2007.08.011
- Shammah-Lagnado, S.J., Beltramino, C.A., McDonald, A.J., Miselis, R.R., Yang, M., de Olmos, J., Heimer, L., Alheid, G.F., 2000. Supracapsular bed nucleus of the stria terminalis contains central and medial extended amygdala elements: evidence from anterograde and retrograde tracing experiments in the rat. *J. Comp. Neurol.* 422, 533–555.
- Shen, M., Piser, T.M., Seybold, V.S., Thayer, S.A., 1996. Cannabinoid receptor agonists inhibit glutamatergic synaptic transmission in rat hippocampal cultures. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 16, 4322–4334.
- Singewald, N., Salchner, P., Sharp, T., 2003. Induction of c-Fos expression in specific areas of the fear circuitry in rat forebrain by anxiogenic drugs. *Biol. Psychiatry* 53, 275–283.
- Spencer, S.J., Buller, K.M., Day, T.A., 2005. Medial prefrontal cortex control of the paraventricular hypothalamic nucleus response to psychological stress: possible role of the bed nucleus of the stria terminalis. *J. Comp. Neurol.* 481, 363–376. doi:10.1002/cne.20376
- Spencer, S.J., Day, T.A., 2004. Role of catecholaminergic inputs to the medial prefrontal cortex in local and subcortical expression of Fos after psychological stress. *J. Neurosci. Res.* 78, 279–288. doi:10.1002/jnr.20242
- Spiacchi, G.B.L., Antero, L.S., Reis, D.G., Lisboa, S.F., Resstel, L.B., 2016. Dorsal hippocampus cannabinoid type 1 receptors modulate the expression of contextual fear conditioning in rats: Involvement of local glutamatergic/nitrgic and GABAergic

- neurotransmissions. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 26, 1579–1589.
doi:10.1016/j.euroneuro.2016.08.010
- Starowicz, K., Maione, S., Cristino, L., Palazzo, E., Marabese, I., Rossi, F., de Novellis, V., Di Marzo, V., 2007. Tonic endovanilloid facilitation of glutamate release in brainstem descending antinociceptive pathways. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 13739–13749. doi:10.1523/JNEUROSCI.3258-07.2007
- Steiner, M.A., Wotjak, C.T., 2008. Role of the endocannabinoid system in regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Prog. Brain Res.* 170, 397–432.
doi:10.1016/S0079-6123(08)00433-0
- Stella, N., Piomelli, D., 2001. Receptor-dependent formation of endogenous cannabinoids in cortical neurons. *Eur. J. Pharmacol.* 425, 189–196.
- Sugiura, T., Kondo, S., Sukagawa, A., Nakane, S., Shinoda, A., Itoh, K., Yamashita, A., Waku, K., 1995. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 215, 89–97.
- Sulcova, E., Mechoulam, R., Frider, E., 1998. Biphasic effects of anandamide. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 59, 347–352.
- Terzian, A.L., Drago, F., Wotjak, C.T., Micale, V., 2011. The Dopamine and Cannabinoid Interaction in the Modulation of Emotions and Cognition: Assessing the Role of Cannabinoid CB1 Receptor in Neurons Expressing Dopamine D1 Receptors. *Front. Behav. Neurosci.* 5, 49. doi:10.3389/fnbeh.2011.00049
- Terzian, A.L.B., Aguiar, D.C., Guimarães, F.S., Moreira, F.A., 2009. Modulation of anxiety-like behaviour by Transient Receptor Potential Vanilloid Type 1 (TRPV1) channels located in the dorsolateral periaqueductal gray. *Eur. Neuropsychopharmacol. J. Eur. Coll. Neuropsychopharmacol.* 19, 188–195. doi:10.1016/j.euroneuro.2008.11.004
- Thompson, R.H., Swanson, L.W., 1998. Organization of inputs to the dorsomedial nucleus of the hypothalamus: a reexamination with Fluorogold and PHAL in the rat. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 27, 89–118.
- Tomasini, M.C., Ferraro, L., Bebe, B.W., Tanganelli, S., Cassano, T., Cuomo, V., Antonelli, T., 2002. Delta(9)-tetrahydrocannabinol increases endogenous extracellular glutamate levels in primary cultures of rat cerebral cortex neurons: involvement of CB(1) receptors. *J. Neurosci. Res.* 68, 449–453. doi:10.1002/jnr.10242
- Ueda, N., Tsuboi, K., Uyama, T., Ohnishi, T., 2011. Biosynthesis and degradation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *BioFactors Oxf. Engl.* 37, 1–7.
doi:10.1002/biof.131
- Uliana, D.L., Hott, S.C., Lisboa, S.F., Resstel, L.B.M., 2016. Dorsolateral periaqueductal gray matter CB1 and TRPV1 receptors exert opposite modulation on expression of contextual fear conditioning. *Neuropharmacology* 103, 257–269.
doi:10.1016/j.neuropharm.2015.12.020
- Urigüen, L., Pérez-Rial, S., Ledent, C., Palomo, T., Manzanares, J., 2004. Impaired action of anxiolytic drugs in mice deficient in cannabinoid CB1 receptors. *Neuropharmacology* 46, 966–973. doi:10.1016/j.neuropharm.2004.01.003
- van der Stelt, M., Trevisani, M., Vellani, V., De Petrocellis, L., Schiano Moriello, A., Campi, B., McNaughton, P., Geppetti, P., Di Marzo, V., 2005. Anandamide acts as an intracellular messenger amplifying Ca²⁺ influx via TRPV1 channels. *EMBO J.* 24, 3026–3037. doi:10.1038/sj.emboj.7600784
- Vaughan, C.W., Connor, M., Bagley, E.E., Christie, M.J., 2000. Actions of cannabinoids on membrane properties and synaptic transmission in rat periaqueductal gray neurons in vitro. *Mol. Pharmacol.* 57, 288–295.
- Vertes, R.P., 2004. Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. *Synap. N. Y. N* 51, 32–58. doi:10.1002/syn.10279

- Vianna, D.M.L., Carrive, P., 2005. Changes in cutaneous and body temperature during and after conditioned fear to context in the rat. *Eur. J. Neurosci.* 21, 2505–2512. doi:10.1111/j.1460-9568.2005.04073.x
- Vriens, J., Appendino, G., Nilius, B., 2009. Pharmacology of vanilloid transient receptor potential cation channels. *Mol. Pharmacol.* 75, 1262–1279. doi:10.1124/mol.109.055624
- Walker, D.L., Davis, M., 1997. Double dissociation between the involvement of the bed nucleus of the stria terminalis and the central nucleus of the amygdala in startle increases produced by conditioned versus unconditioned fear. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 17, 9375–9383.
- Walker, D.L., Miles, L.A., Davis, M., 2009. Selective participation of the bed nucleus of the stria terminalis and CRF in sustained anxiety-like versus phasic fear-like responses. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 33, 1291–1308. doi:10.1016/j.pnpbp.2009.06.022
- Walker, P., Carrive, P., 2003. Role of ventrolateral periaqueductal gray neurons in the behavioral and cardiovascular responses to contextual conditioned fear and poststress recovery. *Neuroscience* 116, 897–912.
- Xing, J., Li, J., 2007. TRPV1 receptor mediates glutamatergic synaptic input to dorsolateral periaqueductal gray (dl-PAG) neurons. *J. Neurophysiol.* 97, 503–511. doi:10.1152/jn.01023.2006
- Yassa, M.A., Hazlett, R.L., Stark, C.E.L., Hoehn-Saric, R., 2012. Functional MRI of the amygdala and bed nucleus of the stria terminalis during conditions of uncertainty in generalized anxiety disorder. *J. Psychiatr. Res.* 46, 1045–1052. doi:10.1016/j.jpsychires.2012.04.013
- Zarrindast, M.-R., Sarahroodi, S., Arzi, A., Khodayar, M.J., Taheri-Shalmani, S., Rezayof, A., 2008. Cannabinoid CB1 receptors of the rat central amygdala mediate anxiety-like behavior: interaction with the opioid system. *Behav. Pharmacol.* 19, 716–723. doi:10.1097/FBP.0b013e3283123c83
- Zuardi, A.W., 2006. History of cannabis as a medicine: a review. *Rev. Bras. Psiquiatr. Sao Paulo Braz.* 1999 28, 153–157. doi:/S1516-44462006000200015
- Zygmunt, P.M., Petersson, J., Andersson, D.A., Chuang, H., Sjørgård, M., Di Marzo, V., Julius, D., Högestätt, E.D., 1999. Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* 400, 452–457. doi:10.1038/22761