UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP – DEPARTAMENTO DE PSICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOBIOLOGIA

**Recrutamento de receptores canabinoides do tipo 1 (CB1) no efeito do canabidiol
sobre as respostas defensivas inatas evocadas por camundongos ameaçados por
jararacas**

BRUNO MANGILI DE PAULA RODRIGUES

Dissertação apresentada à faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte
das exigências para a obtenção do título de Mestre em
Ciências, Área: Psicobiologia.

RIBEIRÃO PRETO - SP
2019

BRUNO MANGILI DE PAULA RODRIGUES

**Recrutamento de receptores canabinoides do tipo 1 (CB1) no efeito do canabidiol
sobre as respostas defensivas inatas evocadas por camundongos ameaçados por
jararacas**

Versão Original

Dissertação apresentada à faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte
das exigências para a obtenção do título de Mestre em
Ciências, Área: Psicobiologia.

Orientador: Prof. Dr. Norberto Cysne Coimbra

RIBEIRÃO PRETO – SP
2019

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

RODRIGUES, B. M. P

Recrutamento de receptores canabinoides do tipo 1 (CB1) no efeito do canabidiol sobre as respostas defensivas inatas evocadas por camundongos ameaçados por jararacas.

Ribeirão Preto, 2019.

64 p.: il.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Psicobiologia.

Orientador: Cysne Coimbra, Norberto.

1.Endocanabinoides. 2.Receptor canabinoide do tipo 1. 3.Antinocicepção induzida pelo medo. 4.Comportamento de defesa. 5.Confronto presa *versus* serpente.

Nome: RODRIGUES, B. M. P

Título: Recrutamento de receptores canabinoides do tipo 1 (CB1) no efeito do canabidiol sobre as respostas defensivas inatas evocadas por camundongos ameaçados por jararacas

Dissertação apresentada ao Departamento de Psicologia da Faculdade de filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção de título de *Magister Scientiae*.

.

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição _____

Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____

Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____

Julgamento _____

AGRADECIMENTOS

Chegou o momento de expressar meus sinceros agradecimentos a muitos e tão adorados familiares e amigos. Tenho consciência que não conseguirei dizer esse “muito obrigado” como é merecido, porque é difícil para mim, expressar a beleza deste momento.

A dissertação aqui apresentada é o resultado mais visível deste processo de construção de afetos, amizades e conhecimento. Dessa forma, dando continuidade à história, dedico algumas palavras àqueles que dela fazem parte direta ou indiretamente ou, ainda, pelo fato de simplesmente existirem.

Aos meus pais que sempre me apoiaram durante toda a minha caminhada. Devo a eles o que eu sou hoje. Deles eu tiro o exemplo das maiores qualidades do ser humano, como honestidade, determinação e responsabilidade. Aos meus irmãos Ananda e Gabriel pelo amor e carinho.

À minha namorada Julia, pela força que nos une e faz do nosso amor o mais puro e o maior. Muito obrigado pela sua força, companheirismo, por sua dedicação, pela espera paciente nos momentos de ausência, por toda a sua capacidade de compreensão, por sua confiança em mim.

Aos meus amigos do laboratório, Tayllon, Luiz, Guilherme, Priscila, Juliana, Rebeca, Yara, Daoud e Ivair pelos momentos de descontração vividos durante esse processo, pelos muitos cafés, pelo carinho, mas principalmente pela troca de experiências e grande aprendizado.

À Capes, pelo apoio financeiro, que possibilitou a realização deste projeto.

Aos meus queridos amigos, por tornarem toda essa experiência mais alegre e por serem pessoas com quem posso sempre contar e dividir momentos bons e ruins.

RESUMO

RODRIGUES, B. M. P. **Recrutamento de receptores canabinoides do tipo 1 (CB1) no efeito do canabidiol sobre as respostas defensivas inatas evocadas por camundongos ameaçados por jararacas.** 2019, 64 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

O sistema endocanabinoide desempenha um papel importante na organização dos comportamentos defensivos relacionados com o medo. Diferentes estratégias defensivas são adotadas dependendo da situação em que o animal se encontra, sendo algumas das respostas de defesa induzidas pelo medo instintivo caracterizadas por serem mais elaboradas e dirigidas para algum abrigo ou rota de fuga. Recentemente, experimentos com roedores, utilizando o confronto com um predador, têm sido conduzidos no sentido de eliciar reações defensivas em um modelo comportamental de ataques de pânico. Nessa abordagem, a natureza aversiva da situação ameaçadora e o risco iminente de morte permitem observar variações nas respostas defensivas. O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito do tratamento agudo com canabidiol sobre as respostas defensivas em camundongos (*Mus musculus*), evocadas diante de um predador natural, a serpente *Bothrops jararaca*. Os roedores foram submetidos à habituação a uma arena poligonal munida com uma toca artificial e plataformas de escape. Após o registro da linha de base do reflexo de retirada induzido por estímulos álgicos, registrados de 5 em 5 min, segundo o teste de retirada de cauda, as presas foram pré-tratadas com administrações intraperitoneais (IP) de um antagonista de receptores CB1, o AM251, em diferentes doses, seguidas, após 10 min, pelo tratamento IP com canabidiol (CBD), na dose de 3 mg/kg. Trinta minutos após o tratamento com CBD, os roedores foram submetidos ao confronto com jararacas durante 5 min na arena poligonal para serpentes, e as respostas instintivas de defesa, como atenção defensiva, aproximação cautelosa, imobilidade defensiva, e comportamento de fuga explosiva e direcionada para a toca ou para as plataformas de escape foram avaliadas. Imediatamente após o comportamento de fuga, as latências de retirada de cauda foram aferidas de 5 em 5 min, durante 30 min. Os camundongos ao serem submetidos ao confronto com um de seus predadores naturais apresentam diversos comportamentos antipredatórios e antinocicepção induzida pelo medo inato, em comparação às respostas exploratórias evocadas quando confrontados com uma serpente de brinquedo. O tratamento por via periférica com CBD causou um efeito ansiolítico e panicolíticos, reduzindo significativamente as respostas de atenção defensiva, aproximação cautelosa, imobilidade defensiva e de fuga, com consequente diminuição da antinocicepção induzida pelo medo. A atenuação do comportamento antipredatório causada pelo tratamento com CBD, foi revertida pelo tratamento por via intraperitoneal com AM251, o que sugere que o efeito antiaversivo do CBD depende pelo menos em parte do recrutamento de receptores canabinoides do tipo CB1.

Palavras-chave: Endocanabinoides, Receptor canabinoide do tipo 1, Antinocicepção induzida pelo medo, Comportamento de defesa, Confronto presa *versus* serpentes

ABSTRACT

RODRIGUES, B. M. P. *Recruitment of cannabinoid type 1 (CB1) receptors on the effect of cannabidiol on the innate defensive responses evoked by mice threatened by Bothrops jararaca*. 2019, 64 f. Dissertation (Magister Scientiae degree) – School of Medicine of Ribeirão Preto of the University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

*The endocannabinoid system plays an important role in the organisation of fear-related defense. Different defensive strategies are adopted by prey depending on different threatening situations, and some instinctive fear-induced defensive responses are characteristically more elaborated and directed to safe places. Recently, experiments with rodents, using a potential predator as aversive stimuli source have been suggested as a putative experimental model of panic attacks. In that approach, the aversive nature of the threatening situation and the risk of death elicit in prey a wide range of panic-like reactions. The aim of present study was to investigate the effect of the acute treatment with cannabidiol (CBD) on panic-like defensive responses elicited by mice (*Mus musculus*), against a potential predator, the venomous snake Bothrops jararaca. The rodents were submitted to the habituation in a polygonal arena for snakes provided with an artificial burrow and escape platforms. After recording the tail-flick test baseline prey were pretreated with intraperitoneal (i.p.) administrations of the cannabinoid type 1 receptor (CB1) antagonist AM-251 at different doses, followed after 10 min by the i.p. treatment with cannabidiol (CBD) at the dose of 3 mg/kg. Thirty Minutes after the treatment with CBD, rodents were submitted to the confrontation with *B. jararaca* for 5 min in the polygonal arena for snakes, and the following defensive responses were recorded: defensive attention, flat back approach, non-oriented and oriented escape behaviour. Immediately after the escape behaviour, the tail-flick latencies were recorded every 5 min for 30 min. Mice threatened by B. jararaca lancehead venomous snakes displayed several antipredatory defensive and innate fear-induced antinociception, in comparison to the exploratory behaviour of those confronted with a toy snake in the same environment. Peripheral treatment with CBD caused an anxiolytic- and panicolytic-like effects, significantly reducing the defensive attention, flat back approach, defensive immobility and escape, with a consequent decrease of fear-induced antinociception. The attenuation of mice anti-predatory behaviour by CBD treatment was reversed by the intraperitoneal treatment with AM251, suggesting that the antiaversive effect of CBD depends at least in part of the recruitment of CB1 receptors.*

Keywords: Endocannabinoids; Cannabinoid type 1 receptor; Fear-induced antinociception; Defensive behaviour; Prey versus snakes confrontation.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
1.1. Comportamento defensivo	10
1.2. Modulação da dor.....	14
1.3. Tratamento utilizando componentes da planta Cannabis sativa.....	16
1.4. Sistema endocanabinoide	18
2. OBJETIVOS.....	25
2.1. Objetivo Geral	25
2.2. Objetivos Específicos	25
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1. Animais	27
3.2. Equipamentos	27
3.3. Drogas	28
3.4. Procedimento experimental.....	28
3.4.1. Teste de confronto entre presa e predador (etograma)	28
3.4.2. Teste nociceptivo.....	29
3.5. Protocolos experimentais	30
4. RESULTADOS.....	32
4.1. Efeito do tratamento de CBD ou AM251 no comportamento defensivo e medo incondicionado em camundongos	32
4.2. Efeito do tratamento de CBD ou AM251 na nocicepção causada por medo incondicionado	36
4.3. Comportamento das serpentes.....	37
5. DISCUSSÃO.....	40
6. CONCLUSÃO	47
REFERÊNCIAS	49

1. INTRODUÇÃO

1.1. Comportamento defensivo

Na natureza, os animais vivem com a constante ameaça de serem atacados, feridos e mortos por predadores e congêneres. Animais que são capazes de responder à ameaça potencial ou real aumentaram as chances de sobrevivência (LIND; CRESSWELL, 2005). Tais respostas comportamentais, que diminuem a probabilidade do animal ser atacado, ferido ou morto, foram classificadas em termos funcionais como comportamento defensivo. O comportamento defensivo é filogeneticamente antigo e exibido por organismos em todo o reino animal (HOFER, 2002, KATS; DILL, 1998). A percepção do perigo potencial ou real ativas vias especializadas no encéfalo que medeiam o comportamento defensivo. Em um nível mais conceitual, tem sido sugerido que a atividade desses circuitos neurais está associada aos estados emocionais de medo e de ansiedade (BLANCHARD et al., 2003, HENDRIE et al., 1996). Consequentemente, as respostas a estímulos aversivos e ameaçadores também foram rotuladas como comportamentos relacionados com ataques de pânico e à ansiedade generalizada (BOLLES; FANSELOW, 1980; CASTELLAN-BALDAN et al., 2016; PASCHOALIN-MAURIN et al., 2018).

O estudo da neurobiologia do medo e o estabelecimento dos princípios etológicos do comportamento defensivo tiveram início com a publicação do livro “A expressão das emoções no homem e nos animais” (1872), escrito por Charles Darwin que descreve semelhanças entre as expressões comportamentais relacionadas às emoções primárias de seres humanos e de outros animais. A partir dessa obra, o estudo dos princípios etológicos, como também a relação adaptativa destes princípios com a sobrevivência da espécie começou a obter grandes avanços e desenvolver grandes questionamentos no meio científico, o que contribuiu para o surgimento da ideia de que o medo e a ansiedade apresentam um valor adaptativo por serem capazes de promover reações de defesa diante de situações aversivas, contribuindo para a sobrevivência das espécies (GRAEFF, 1991, LEDOUX, 1991).

As estratégias comportamentais de defesa se desenvolveram por um longo período de seleção natural, conforme a teoria sintética da evolução, surgindo certos padrões comportamentais defensivos, como a inibição comportamental e vigilância (COIMBRA; BRANDÃO, 1993), *freezing* (FANSELOW, 1980; COIMBRA 1989) ou

imobilidade defensiva (COIMBRA, 2017a,c; PASCHOALIN-MAURIN et al., 2018), fuga (PANKSEPP, 1990; COIMBRA; BRANDÃO, 1993) e imobilidade tônica (LEITE-PANISSI et al., 2003). Além das expressões comportamentais de defesa, ocorrem alterações neurovegetativas e endócrinas amplamente estudadas, tais como aumento da pressão arterial, taquicardia, taquipneia (KEIM; SHEKAR, 1996), piloereção, micção e defecção (SCHIMITTEL, 2012; BLACHARD; TAKANASHI, 1988).

O comportamento de *freezing* é um estado de imobilidade atenta que serve afim de evitar a detecção por predadores e aumentar a percepção frente a ameaças de níveis médios (LANG; DAVIS, 2006). Deste modo, a imobilidade tônica se assemelha ao *freezing* por ser caracterizada pela ausência de movimento em resposta à ameaça severa, mas é, em geral, induzida por manobras de contenção. No entanto, o comportamento de *freezing* pode ocorrer no início da cascata de defesa, diferente da imobilidade tônica que ocorre posteriormente, como nos casos de contato físico onde a luta, a fuga e o *freezing* não são mais ideais para a sobrevivência (KOZLOWSKA, 2015). Diferente da imobilidade tônica passiva (fingir-se de morto), o *freezing* prepara ativamente o animal para respostas defensivas adicionais (BLANCHARD, 2011).

Fatores ambientais também desempenham um papel importante na formação do comportamento defensivo, por exemplo, a distância do predador em relação à presa, presença de rotas de fuga, assim como a experiência prévia com um determinado estímulo aversivo influenciam na determinação das reações de congelamento ou de fuga. A ameaça distal evoca reações de imobilidade defensiva mais longas do que a ameaça proximal. Com as rotas de fuga disponíveis, a imobilidade defensiva é mais curta e mais provavelmente seguida de fuga em comparação com uma situação em que não há rotas de fuga disponíveis (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988, BLANCHARD, 2011).

Robert e Caroline Blanchard (1988) classificaram em seus trabalhos as estratégias comportamentais exibidas por roedores de acordo com o nível de ameaça potencial ou real. Em situações onde o risco de perigo é potencial, as estratégias observadas foram os comportamentos exploratórios cautelosos e hesitantes que possibilitam a aproximação e a investigação da possível ameaça, denominados de comportamentos de avaliação de risco (*risk assessment behaviour*). Tais estratégias estariam relacionadas à ansiedade em seres humanos e moduladas pelo complexo amigdalóide e pelo sistema septo-hipocampal. No contexto de risco real, porém distal, foi observada fuga ou *freezing*, evocados através da ação do complexo amigdalóide e da substância cinzenta periaquedutal ventral. Nos casos de ameaça real em que o predador

estava muito próximo ou em contato direto com o animal, ocorria a fuga, modulada pela substância cinzenta periaquedutal dorsal, ou a luta defensiva modulada pelo hipotálamo (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988); GRAEFF; GUIMARÃES, 2012). Em modelos de confrontos entre presas e serpentes, o comportamento de avaliação de risco mostra-se exuberante, sendo precedido por alerta defensivo e seguido por imobilidade defensiva (*freezing*) e fuga (URIBE-MARIÑO, 2012; COIMBRA, 2017a,c; PASCHOALIN-MAURIN et al., 2018).

Alguns autores têm sugerido que as respostas defensivas são organizadas por estruturas encefálicas responsáveis pela integração dos estados aversivos. Esta relação funcional e neuroanatômica compõem o chamado sistema encefálico da aversão (SEA), compreendendo: o hipotálamo, o complexo amigdalóide e a substância cinzenta periaquedutal (SCP) (GRAEFF, 1990; CANTERAS, 2002). Outros estudos mostraram que diferentes neurotransmissores estão envolvidos no controle das respostas defensivas mediadas pelo SEA, como o GABAérgico, o colinérgico, o serotoninérgico e o opioidérgico (BRANDÃO et al., 1982; GRAEFF, 1990; CARDOSO et al., 1992; COIMBRA et al., 1992, 2017a,c; COIMBRA; BRANDÃO, 1993, 1997; LEITE-PANISSI et al., 2003).

Dentre as diversas divisões hipotalâmicas, aquelas anatomicamente e funcionalmente implicadas nas respostas de defesa evocadas durante confrontos entre *Rattus norvegicus* e felinos destacam-se, eminentemente, o núcleo hipotalâmico anterior (NHA), a divisão dorsomedial do hipotálamo ventrolateral (HVMdm) e o núcleo pré-mamilar dorsal do hipotálamo (NPD), além de alguns núcleos do complexo amigdalóide (CA) e as colunas da substância cinzenta periaquedutal (SCP) (CANTERAS et al., 1997; CANTERAS, 2000). Não obstante, em confrontos em serpentes corais e *Mesocricetus auratus*, ativam-se não somente o clássico sistema hipotalâmico de defesa, proposto por Canteras (2000), mas também o núcleo hipotalâmico posterior (HP), o núcleo periventricular do hipotálamo (PVnp), as colunas dorsais e ventrais da SCP, e os núcleos medial, central e basomedial do CA (PASCHOALIN-MAURIN et al., 2018). As diferentes porções do hipotálamo estão interconectadas e estão especialmente envolvidas na integração de respostas defensivas inatas frente a ameaças ambientais (SILVEIRA & GRAEFF, 1992; CANTERAS, 2002; SANTOS et al., 2008). A estimulação elétrica destas regiões hipotalâmicas induz comportamento de fuga em ratos (MILANI; GRAEFF, 1987; FERNANDEZ DE MOLINA; HUNSPERGER, 1962). A manipulação química, por meio da administração local de NMDA, um agonista glutamatérgico (SILVEIRA; GRAEFF, 1992; BAILEY; DIMICCO, 2001), ou a desinibição

GABAérgica, por meio da microinjeção do antagonista GABAérgico bicuculina no hipotálamo medial evocam, também, resposta de fuga em ratos (SCHMITT et al., 1985; SOLTIS; DIMICCO, 1991). A resposta de fuga tem sido associada ao medo gerado em situação críticas de sobrevivência (BLANCHARD et al., 2001; GRAEFF, 2004), e a disfunção das bases neurais que controlam este comportamento defensivo tem sido relatada como distúrbio de pânico (BLANCHARD et al., 2001; MCNAUGHTON; CORR, 2004).

Diferentes estratégias defensivas são adotadas dependendo a situação em que o animal se encontra (RATNER, 1967; BLANCHARD; BLANCHARD, 1988; ANSELONI et al., 1999). Tanto a atenção defensiva, como a imobilidade defensiva são respostas comportamentais emitidas pelo animal quando este identifica um perigo em potencial (presença do predador), mesmo a certa distância (COIMBRA et al., 2017). Já a resposta de fuga é a reação natural da presa quando a distância entre ela e o predador é pequena (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988; COIMBRA et al., 2017a,c; PASCHOALIN-MAURIN et al., 2018).

Recentemente, experimentos com roedores, utilizando o confronto com um predador, têm sido conduzidos no sentido de eliciar reações defensivas. Nesta abordagem, a natureza aversiva da situação ameaçadora e o risco iminente de morte permitem observar variações nas respostas defensivas (BLANCHARD et al., 2003; COIMBRA et al., 2017a,c; PASCHOALIN-MAURIN et al., 2018). Por exemplo, este teste permite observar diferenças entre reações explosivas/não orientadas de fuga, relacionadas à ativação da SCPd (GRAEFF, 1994; COIMBRA; BRANDÃO, 1993; EICHENBERGER et al, 2002; COIMBRA et al, 2006; MOBBS et al, 2007; BIAGIONI et al., 2016; ULLAH et al., 2017), e a fuga orientada, que pode ser relacionada à ativação hipotalâmica (BLANCHARD et al, 2003; GUIMARÃES-COSTA et al., 2007; FREITAS et al., 2009; BIAGIONI et al., 2016; ULLAH et al., 2017). Além disso, outras pesquisas mostraram, também, que drogas utilizadas no tratamento do transtorno de ansiedade generalizada e na síndrome de pânico em seres humanos foram capazes de alterar o padrão de respostas defensivas no teste de confronto entre roedores e predadores, indicando que este teste pode ser uma ferramenta adequada nos estudos destes distúrbios (GRIEBEL et al., 1996; BLANCHARD et al., 1998). O modelo de ataques de pânico, baseado no confronto entre pequenos roedores e serpentes, foi recentemente validado etologicamente, farmacologicamente e morfologicamente por nossa equipe PASCHOALIN-MAURIN et al., 2018).

1.2. Modulação da dor

Por muito tempo, a dor foi considerada uma forma de punição por faltas cometidas no âmbito religioso. A dor foi inicialmente conceituada pelo filósofo francês René Descartes (1596-1650), ao descrever que esta seria produzida por um sistema de transmissão direto, proveniente dos tecidos lesados na periferia até o cérebro, e que deveria haver uma relação entre o grau de dano tecidual e a intensidade da dor (SCHNEIDER; KAROLY, 1983). Nesse conceito, o antigo pressuposto de que a dor era "representada" no coração foi abandonado (pressuposto comum dos antigos egípcios). O cérebro assumiu o lugar do coração, e a teoria de Descartes abriu as portas para que a neurociência explicasse os mecanismos da dor (IASP, 2010). Atualmente, segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor, a dor é uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a dano real ou potencial de tecidos ou descrita em termos de tal dano (IASP, 1979).

Embora a intensidade da agressão tecidual e a amplitude da percepção dolorosa estejam frequentemente relacionadas, é possível ocorrer uma dissociação entre essas duas variáveis (LIMA; ALMEIDA, 2002). Em algumas situações, a dor pode ocorrer independentemente da presença de dano tecidual, por exemplo, em áreas amputadas do corpo (MELZACK, 1973). Em contrapartida, pode ocorrer lesão tecidual sem a percepção da dor, como, por exemplo, durante atividades físicas intensas ou em exposições a fatores de estresse e medo (WALL, 1979; RHUDY; MEGLER, 2000). “Sentir dor” é função adaptativa de extrema importância, de tal maneira que sua ausência, como ocorre em algumas condições clínicas hereditárias (COX et al., 2006; INDO, 2001), pode levar à repetidas lesões e à uma automutilação inconsciente (WOOLF, 2010).

Apesar dos animais não apresentarem a capacidade de relatar verbalmente a ocorrência da dor, eles exibem respostas comportamentais típicas, através das quais podemos constatar a presença da dor e sua intensidade (LANGFORD et al, 2010). Por isso, “nocicepção”, termo proposto por Sherrington (1906), referindo-se à percepção de um estímulo potencialmente lesivo ao organismo, é o termo que melhor substitui a denominação dor em animais por se tratar exclusivamente do componente fisiológico da condução do impulso nervoso até o cérebro, não levando em consideração o componente emocional, devido à dificuldade deste ser mensurado com fidelidade em animais

(BESSON; CHAOUCH, 1987). Entretanto, salientamos que a presença do componente emocional da dor nos animais não é questionada (JONES, 1992). A vocalização de *Cavia porcellus* submetidos a estímulos nociceptivos, foi, inclusive, proposto como um modelo de aferir os aspectos subjetivos da dor em cobaias (LEITE-PANISSI et al., 2003).

Segundo Woolf (2010), a dor pode ser classificada como nociceptiva, inflamatória ou patológica (neuropática ou disfuncional). A dor nociceptiva ocorre a partir da ativação direta do nociceptor por estímulos mecânico, térmico ou químico. A dor inflamatória, após lesão tecidual, dá origem a um processo inflamatório através da ativação celular e liberação de mediadores que ativam ou sensibilizam (diminuem o limiar de ativação) os neurônios nociceptivos periféricos. Finalmente, a dor patológica é um sintoma decorrente de um funcionamento anormal do sistema nervoso, sendo subdivida em dor neuropática e disfuncional. A dor neuropática é causada por uma lesão do sistema nervoso central ou periférico e a dor disfuncional não tem uma causa evidente, não sendo identificado estímulo, processo inflamatório, nem lesão no sistema nervoso, sendo a possível causa uma disfunção bioquímica e liberação de neurotransmissores.

Em relação a esta sinalização sensorial nociceptiva, em 1906, Charles Sherrington propôs a existência de um conjunto de terminações nervosas, cuja função seria receber estímulos nocivos. Posteriormente, foi postulada a definição de nociceptores: receptores em terminações nervosas responsáveis por detectar estímulos potencialmente lesivos (MCMAHON; KOLTZENBURG, 1990). Os corpos celulares desses neurônios encontram-se localizados nos gânglios da raiz dorsal dos nervos espinais ou no gânglio trigeminal. Os nociceptores diferenciam-se dos outros receptores sensoriais pelo seu limiar de disparo mais alto do que de outros neurônios, sendo normalmente ativados somente por estímulos de intensidade nociceptiva suficientes para causar algum grau de lesão tecidual (KUMAZAWA, 1990; CESARE; MCNAUGHTON, 1997).

A detecção do estímulo da dor ocorre primeiramente nos nociceptores, cuja função é transformar estímulos de natureza química, mecânica ou térmica em estímulos elétricos (potenciais de ação), carreando a informação nociceptiva da periferia ao corno dorsal da medula espinal (RANG et al., 1991). No corno dorsal da medula espinal haverá a ativação do segundo neurônio da via ascendente da dor, sendo o glutamato, a substância P e o CGRP (peptídeo relacionado ao gene da calcitonina) os transmissores predominantes nesta ativação (FÜRST, 1999). Após serem ativados, os neurônios de segunda ordem conduzirão os estímulos do corno dorsal da medula espinal até o tálamo

dorsal, ocorrendo aí a segunda sinapse da via entre os neurônios de segunda e terceira ordem, os quais transmitirão as informações para o córtex cerebral, onde serão processadas e interpretadas ao nível da consciência (BASBAUM; FIELDS, 1984). Esta projeção ascendente do estímulo nociceptivo não seria um evento estático e, sim, dinâmico, com várias possibilidades de controle ao longo de sua condução do sistema nervoso periférico ao sistema nervoso central, além da deflagração desta modulação após a sensibilização central. Além da substância cinzenta, existem numerosos sítios antinociceptivos supraespinhais originando vias descendentes para o corno dorsal da medula espinal; dentre elas, destacam-se o núcleo dorsal da rafe (FERREIRA; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, 2012; BIAGIONI et al., 2013; de SOUZA SOARES Jr., et al., 2019a,b), núcleo magno da rafe (da SILVA et al., 2012; de OLIVEIRA et al., 2017), núcleo reticular paragigantocelular (de OLIVEIRA et al., 2017), núcleo parabraquial (MENESCAL-DE-OLIVEIRA; HOFF (MANN, 1993), locus coeruleus (BIAGIONI et al., 2013), núcleo do trato solitário e núcleo reticular dorsal (MILLAN, 2002).

A antinocicepção induzida pelo medo tem sido considerada como parte integrante da reação de defesa (COIMBRA et al., 2006) e pode ser apresentada por animais submetidos ao confronto com um potencial predador (COIMBRA et al., 2017a). Sem a existência de um sistema de inibição dos impulsos nociceptivos, os animais, se levados em confronto com um predador, poderiam adquirir comportamentos de recuperação, induzidos pelo sofrimento, em vez de apresentarem postura defensiva, induzida pelo medo, traduzindo, assim, sua vulnerabilidade a futuras injúrias e sujeição à morte (FANSELOW; BOLLES, 1979).

Neste contexto, múltiplos sistemas endógenos vêm sendo descritos como envolvidos na modulação da dor, sendo o sistema endocanabinoide um deles (WOLKERS et al., 2017).

1.3. Tratamento utilizando componentes da planta Cannabis sativa

A “Marijuana” (*Cannabis sativa*), popularmente chamada de maconha, é uma das mais antigas drogas de abuso utilizada pelo homem. Foi na China onde se descobriram as primeiras evidências de uso farmacêutico dessa planta, datadas de 4000 anos a.C., sendo utilizada tanto para fins medicinais como espirituais (ESCOHOTADO, 2004). A utilização da *Cannabis* na medicina chinesa é descrita na mais antiga farmacopeia do mundo chamada de Pen-ts’Chin, a qual se refere ao uso da *Cannabis sativa* no tratamento

de diversos problemas, tais como, dores reumáticas, problemas de apetite e digestão, problemas intestinais, cardíacos, vertigem, malária e problemas no sistema reprodutor feminino (ZUARDI, 2005). A introdução da *Cannabis sativa* na Europa ocorre no século XIX, após a invasão do Egito pelo General Napoleão Bonaparte. Nesta invasão, Napoleão era acompanhado por dois médicos franceses, de Sacy e Rouyer, que recolheram amostras da planta para posteriormente a estudarem na Europa.

Apesar da sua vasta aplicação, seu uso declinou após a terceira década do século XX, dado ao fato de que, na época, seus princípios ativos ainda não haviam sido isolados e seus tratamentos variavam de potência e composição, acarretando não somente diferentes efeitos, mas também, efeito indesejáveis (CRIPPA et al., 2010).

O médico psiquiátrico francês Moreau de Tours foi o pai da psiquiatria experimental ao estudar em si mesmo os efeitos da *Cannabis sativa*, avançando com a hipótese de a *Cannabis sativa* alterar a atividade do sistema nervoso central (SNC), originando estados de insanidade mental e intoxicação.

Dentre os 400 compostos químicos encontrados na planta, 60 são denominados canabinoides (ATAKAN, 2012). Dentre os principais compostos psicoativos desta planta, podemos destacar o Δ^9 -tetra-hidrocanabinol (Δ^9 -THC) e o canabidiol (CBD), e o uso destes possui uma grande controvérsia tanto na sociedade quanto na medicina com respeito a sua utilidade na terapêutica (GAONI; MECHOULAM, 1964; MECHOULAM; HANUS, 2002). O sistema canabinoide endógeno parece desempenhar uma função modulatória em vários processos neurobiológicos, tais como funções motoras e cognitivas, antinocicepção, sono e comportamento alimentar, como sugerido pela distribuição anatômica de seus receptores e pelos efeitos farmacológicos bem conhecidos dos compostos relacionados aos canabinoides (AMERI, 1999; FERNANDÉZ-RUIZ et al., 2000; HOWLETT et al 2002, 2004; PERTWEE, 1997, 2001; FRIDE, 2004). Vários estudos recentes também apontam os canabinoides endógenos como moduladores dos processos do desenvolvimento embrionário do encéfalo (BEGBIE et al., 2004; FERNANDÉZ-RUIZ et al., 2000, RAMOS et al., 2002; LEONELLI et al., 2005), propriedades neuroprotetoras em diversos modelos de neurotoxicidade (MATO et al., 2003; PARMENTIER-BATTEUR et al., 2002; GRUNDY et al., 2001; VAN DER STELT et al., 2001, 2005) e como mediador de processos de plasticidade em diversas estruturas do sistema nervoso central (ALVARES et al., 2006; TAGLIAFERRO et al., 2006; HASHIMOTODANI et al., 2007).

1.4. Sistema endocanabinoide

Os canabinoides podem produzir seus efeitos bioquímicos e farmacológicos interagindo principalmente com os receptores CB1 e CB2 (DEVANE et al., 1988; MUNRO et al., 1993). O receptor CB1 é encontrado no sistema nervoso central (HOWLETT et al. 2002), em alta densidade no cerebelo, hipocampo, corpo estriado, córtex e substância negra (GATLEY et al., 1998; HERKENHAM et al., 1990; MATSUDA et al., 1993; IVERSEN, 2003), bem como em áreas encefálicas e da medula espinal que participam do processamento de informações motoras e nociceptivas, além da cognição e memória (PERTWEE, 2001; IVERSEN, 2003). No entanto, o receptor CB1 pode, também, ser encontrado em uma variedade de outros órgãos, como gônadas, coração, útero e intestino delgado (BREIVOGEL; CHILDERS, 1998; PARIA et al., 1998; SCHUEL et al., 1999). Já os receptores CB2 são encontrados principalmente em células e tecidos do sistema imunológico (PERTWEE, 1997; HOWLETT et al., 2002), como o baço, podendo exercer um papel imunomodulador (MUNRO et al., 1993). Tais receptores são acoplados à proteína G1, atuando através da inibição da enzima adenilato ciclase celular (BAYEWITCH et al., 1996; STEFFENS et al., 2004), com consequente diminuição dos níveis intracelulares de AMPc.

Após a descoberta dos receptores para canabinoides exógenos, foi demonstrado que os mamíferos produzem agonistas endógenos para estes receptores, os endocanabinoides (DI MARZO et al., 1998; MECHOULAM et al., 1998). O principal endocanabinoide identificado é a N-araquidonoiletanolamida (anandamida; AEA); porém, outros compostos estão sendo incluídos ao grupo dos endocanabinoides, como 2-araquidonoilglicerol (2-AG), O-araquidonoiletanolamina (virodamine) e N-araquidonoildopamina (DEVANE et al., 1992; SUGIURA et al., 1995; PORTER et al., 2002; WALKER et al., 2002). Existem diferenças entre as concentrações dos tipos de canabinoides endógenos no tecido nervoso, sendo a concentração de 2-AG aproximadamente 200 vezes maior que a de anandamida. Entretanto, a distribuição deles no encéfalo é bastante similar, pois ambos existem em maiores concentrações no tronco encefálico, corpo estriado e hipocampo e em menores concentrações no córtex, diencéfalo e cerebelo. Curiosamente, parece não haver correlação entre as concentrações dos canabinoides endógenos e a distribuição de receptores canabinoides (FRODE, 2002).

Dessa maneira, os receptores específicos para canabinoides, juntamente com os endocanabinoides constituem o que hoje é conhecido como sistema endocanabinoide.

A biossíntese de anandamida e de 2-AG foi caracterizada logo após a identificação desses compostos (DI MARZO et al., 1994; DI MARZO et al., 1996; BISOGNO et al., 1997; STELLA et al., 1997) e, na atualidade, sabe-se que são derivados de fosfolipídios de membrana oriundos da degradação dos mesmos por fosfolipases específicas, as quais são ativadas pelo íon cálcio. A síntese de anandamida começa a partir da clivagem da fosfatidiletanolamina, catalisada pela enzima N-aciltransferase, ao precursor N-araquidonoil-fosfatidiletanolamina, que pode ficar armazenado na membrana e ser convertido em anandamida por fosfolipase D ativada por Ca^{2+} (DI MARZO et al., 1994; PIOMELLI, 2003). O ligante 2-AG, por sua vez, parece ter duas vias biossintéticas: uma degrada o fosfatidilinositol em 1,2-diacilglicerol (DAG), catalisada pelas fosfolipases C, seguida da formação de 2-AG pela catálise através da diacilglicerol-lipase (DGL); a segunda via consiste na formação de 2-AG através de catálise de fosfatidilinositol em 2-araquidonoil-lisofosfolipídio (Lyso-PL) pela fosfolipases A1. Posteriormente, ocorre formação de 2-AG a partir de Lyso-PL mediante a ação da Lyso-PLC (DI MARZO et al., 1996; BISOGNO et al., 1997; STELLA et al., 1997; PIOMELLI, 2003).

O processo de síntese e liberação dos endocanabinoides ocorre por “demanda”, promovido por concentrações aumentadas de íon cálcio, difundindo-se passivamente após sua síntese pelos neurônios pós-sinápticos, podendo agir em receptores pré-sinápticos e bloquear a entrada de Ca^{2+} . O sistema de neurotransmissão endocanabinoide apresenta função neuromodulatória inibitória atuando como mensageiro retrógrado. A duração da anandamida e do 2-AG é bastante efêmera devido aos processos de captação e degradação eficientes que utilizam transportadores microssômicos e enzimas específicas. Outro dado importante é que, devido ao seu metabolismo ocorrer em meio intracelular, a transmissão endocanabinoide pode ser intensificada por meio de drogas que bloqueiam o transportador microssômico envolvido na captação neuronal desses ligantes.

Estudos *in vivo* indicam que os canabinoides produzem efeitos antinociceptivos em sítios periféricos, bem como na região espinal e supraespinal, sendo esses efeitos mediados pela ativação dos receptores CB1 e CB2 devido a sua expressão em neurônios do sistema nervoso central e periférico, incluindo neurônios nociceptivos

aferentes primários. De fato, sabe-se que nas terminações centrais e periféricas de nervos sensoriais nociceptivos, receptores CB1 modulam a propagação de sinais de dor para o cérebro (SAGAR et al., 2010; WOODHAMS et al., 2012). Já os receptores localizados em regiões supraespinais, associadas com o processamento e controle da dor, tais como a PAG e o RVM, ao serem ativados podem levar a ativação da via descendente inibitória, ou bloquear a facilitação descendente da dor para a medula espinal (NADAL et al., 2013).

Como já mencionado, os receptores CB2 são expressos principalmente na periferia, em células imunológicas, tais como macrófagos, linfócitos e mastócitos. Já no SNC são encontrados em astrócitos e micróglia, e evidências mostram sua localização também em neurônios (WOODHAMS et al., 2015). Há estudos que mostram que a ativação de CB2 medeia efeitos anti-inflamatórios e antinociceptivos em modelos animais de dor inflamatória (QUARTILHO et al., 2003; KHASABOVA et al., 2011). Por exemplo, o agonista dos receptores CB1/CB2, WIN55,212-2, induziu efeitos antinociceptivos em modelos animais de hiperalgesia induzida por carragenina, tanto na dor associada ao câncer ósseo, como na dor inflamatória. Já um agonista do receptor CB2, o AM1241, reduziu a nocicepção térmica. Notem que todos esses efeitos foram bloqueados por antagonistas dos receptores CB2 (NACKLEY et al., 2003; KEHL et al., 2003).

O sistema endocanabinoide tem sido implicado no controle de diversas respostas neurofisiológicas e comportamentais. Chaperon e Thiebot (1999) mostraram uma redução na atividade locomotora e uma profunda catalepsia dose-dependente após a injeção de canabinoides em ratos. Corroborando este dado, Compton et al. (1996) e Ledent et al. (1999) sugeriram que a injeção de antagonistas CB1, como o SR141716A, e camundongos desprovidos de receptores CB1, respectivamente, causava um aumento da atividade locomotora, além de potencializar o efeito estimulante da anfetamina e da apomorfina (MASSERANO et al., 1999). Além de interagir com estes receptores, o CBD pode inibir a enzima hidrolase-amida de ácidos graxos (FAAH-*fatty acid amide hydrolase*), responsável pelo metabolismo do canabinoide endógeno anandamida (AEA); portanto, aumentando os níveis deste endocanabinoide (ECB). Desse modo, embora a afinidade do CBD pelos receptores CB1 e CB2 seja baixa, o CBD pode facilitar a sinalização do ECB através da inibição da FAAH (BISOGNO et al., 2001) e, portanto, seus efeitos poderiam ser mediados por essa via (ativação de receptores canabinoides).

Outros estudos, utilizando abordagem sistêmica, mostraram que a ativação do receptor CB1, a inibição do FAAH (enzima hidrolase que degrada AEA) e/ou a inibição da recaptação de endocanabinoides produzem efeitos ansiolíticos em modelos animais de ansiedade, tais como no labirinto em cruz elevado (GUIMARÃES et al., 1990; BORTOLATO et al., 2006; PATEL; HILLARD, 2006; NAIDU et al., 2007; MOREIRA et al., 2008; NADERI et al., 2008; MICALÉ et al., 2009), labirinto em zero elevado, uma modificação do labirinto em cruz elevado (KATHURIA et al., 2003), e na caixa claro-escuro (RUTKOWSKA et al., 2006; SCHERMA et al., 2008). Porém, os efeitos da estimulação dos receptores CB1 sobre a ansiedade ainda necessitam de mais atenção, uma vez que esta estimulação pode produzir efeitos bifásicos, sendo que baixas doses de canabinoides produzem respostas ansiolíticas, enquanto que altas doses evocam respostas ansiogênicas (MOREIRA; WOTJAK, 2010). A ativação dos receptores CB1 por via sistêmica pode produzir, ainda, respostas comportamentais do tipo antidepressivas no teste de nado forçado, tanto no tratamento agudo (HILL; GORZALKA, 2005; REALINI et al., 2011), quanto no crônico (JIANG et al., 2005). Respostas do tipo antidepressivas também têm sido mostradas após a inibição da recaptação da AEA no teste de suspensão da cauda (GOBBI et al., 2005; NAIDU et al., 2007). Outros trabalhos mostraram, ainda, que camundongos *knockout* para receptores CB1 apresentam uma hiperativação do eixo hipotálamo-hipofisário (HPA) (COTA et al., 2003; BARNA et al., 2004). Desta forma, podemos sugerir que o aumento da sinalização endocanabinoide pode produzir efeitos ansiolíticos e antidepressivos, e que alterações neste sistema podem acarretar distúrbios emocionais e neuro-hormonais.

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

Algumas evidências indicam, ainda, que o CBD poderia atuar como agonista dos receptores 5-HT_{1A} *in vitro* (RUSSO et al., 2005) e *in vivo* (MISHIMA et al. 2005; CAMPOS; GUIMARÃES, 2008).

Com relação à interação entre receptores CB1 e a serotonina, alguns autores mostraram que os receptores CB1 e o FAAH estão presentes no NDR e nos terminais dos neurônios serotoninérgicos (HOHMANN; HERKENHAM, 2000; EGASHIRA et al., 2002; HÄRING et al., 2007; MORANTA et al., 2009; SANO et al., 2008). A administração aguda de um inibidor da FAAH, o URB597, aumenta a taxa de disparos espontâneos dos neurônios 5-HT do NDR de ratos, efeito este bloqueado pelo pré-tratamento com SR141617A, um antagonista de receptores CB1 (GOBBI et al., 2005). A administração do SR141617A induz, também, uma diminuição na taxa de disparos dos neurônios do NDR, indicando que o sistema canabinoide possui um efeito tônico sobre os neurônios deste núcleo mesencefálico (MENDIGUREN; PINEDA, 2009). Estes dados indicam que o sistema endocanabinoide poderia atuar de uma maneira tônica, inibindo os neurônios monoaminérgicos (5-HT) não somente do NDR, mas de estruturas mais rostrais, diminuindo possivelmente a 5-HT em diferentes regiões encefálicas. A falha do padrão de interação entre o sistema endocanabinoide e o serotoninérgico poderia provocar distúrbios emocionais. A estimulação dos receptores CB1 no córtex “pré-frontal” medial (CPFm) e no hipocampo produz um acentuado efeito ansiolítico (RUBINO et al., 2008), além de uma resposta antidepressiva mediada pela 5-HT (MCLAUGHLIN et al., 2007), e a extinção da resposta de medo condicionado (LIN et al., 2009), possivelmente pela conexão do CPFm com o núcleo basolateral do complexo amigdalóide. Microinjeções de agonistas CB1 no núcleo central do complexo amigdalóide produz respostas ansiolíticas no teste do labirinto em cruz elevado, e esta resposta é potencializada pela injeção sistêmica de morfina (ZARRINDAST et al, 2008).

Os receptores canabinóides estão presentes em outros substratos neurais encefálicos mais caudais. A microinjeção de antagonistas CB1 na SCPdI reduz resposta de fuga explosiva mediada pela administração de aminoácidos excitatórios nesta mesma estrutura (FINN et al., 2003). Assim, podemos sugerir que a estimulação endocanabinoide em diferentes substratos neurais poderia diminuir a resposta induzida pelo medo contextual.

É importante ressaltar que o receptor CB1 é bem conservado ao longo da evolução, pois 97% do CB1 de camundongo, 84% do CB1 de anfíbios e 72% do CB1 de

peixes são idênticos à proteína do CB1 humana (LUTZ, 2002). Já para invertebrados a literatura apresenta controvérsias em relação à existência do receptor CB1. Lutz (2002) ressalta que até o momento o CB1 em invertebrados ainda não havia sido clonado; entretanto, há evidências da ação farmacológica dos canabinoides e suas enzimas de degradação em alguns Filos, tais como Celenterados, Anelídeos, Moluscos e Equinodermos. Mais recentemente, McPartland e colaboradores descrevem a existência desses receptores na maioria dos animais com simetria bilateral; entretanto, existem alguns dados curiosos como, por exemplo, a falta de receptor CB1 em insetos.

Diferentes modelos de experimentação animal validados em laboratório são utilizados para explorar o efeito analgésico dos compostos canabinoides. No entanto, uma vez que a maioria das respostas é quantificada por meio de testes comportamentais, é importante lembrar que os endocanabinoides podem inibir ou aumentar a atividade motora (SAÑUDO et al., 2000), dependendo da dose e da estrutura do composto administrado, o que pode influenciar as reações comportamentais e mascarar os resultados de testes analgésicos. Desta forma, podemos sugerir que a interação do sistema canabinoide e serotoninérgico em diferentes estruturas encefálicas envolvidas nos distúrbios emocionais e fisiológicos, como a SCP, o hipotálamo e o complexo amigdalóide, poderia modular informações de ameaças ao organismo, iniciando respostas comportamentais e fisiológicas adequadas a cada situação.

Segundo a OMS (Organização Mundial da Saúde) os transtornos mentais atingem cerca de 700 milhões de pessoas no mundo, representando cerca de 13% do total de todas as doenças que afetam o ser humano. Estudar o papel dos receptores CB1, 5-HT_{1A} e canais iônicos TRPV1 é de suma importância, visto que vários estudos evidenciaram o envolvimento destes receptores em diversos transtornos emocionais. Entretanto, o conhecimento sobre o papel de tais receptores na ação de canabinoides ainda é limitado, sendo por isso necessário maior esclarecimento.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O objetivo do presente estudo é avaliar o papel do receptor canabinoide do tipo 1 (CB1) no efeito do tratamento agudo com canabidiol (CBD), administrado por via intraperitoneal, sobre as respostas inatas de defesa evocadas em uma situação ameaçadora.

2.2. Objetivos Específicos

Estudar o padrão de respostas comportamentais de defesa e o efeito de um ambiente ameaçador sobre o limiar de dor em camundongos submetidos ao confronto com um potencial predador em uma arena poligonal, munida de toca artificial;

Estudar o efeito do pré-tratamento agudo com canabidiol sobre as respostas de defesa evocadas por roedores diante de um predador natural (serpente jararaca), assim como sobre a antinocicepção induzida pelo medo;

Estudar o efeito do pré-tratamento com AM251 (antagonista CB1) sobre a ação do canabidiol na organização das diversas respostas inatas de defesa evocadas por roedores ameaçados por um predador natural (serpente jararaca) e sobre a antinocicepção induzida pelo medo inato.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

São utilizados camundongos machos (*Mus musculus*; *Rodentia*, *Muridae*), da linhagem C57, pesando entre 25-30g, provenientes do Biotério Central do *Campus* da USP em Ribeirão Preto. Os animais eram mantidos em caixas plásticas (56x37x39 cm) forradas com “maravalha” sendo cinco animais por caixa. Aos animais era permitido livre acesso ao alimento (ração comercial balanceada para roedores) e à água *ad libitum* durante todo o procedimento experimental. Permanecendo em condições controladas de fotoperíodo (12/12h) e temperatura ($24\pm 1^\circ\text{C}$). Como predador, utilizou-se uma serpente peçonhenta selvagem (*Bothrops jararaca*; *Reptilia*; *Viperidae*), pesando 500-800 g. Foram utilizadas serpentes que foram coletadas na região sudeste brasileira, na zona rural de Ribeirão Preto e nos distritos vizinhos, doadas ao *Ophidiarium* LNN-FMRP-USP/INeC, autorizado pelo Governo Brasileiro (IBAMA; processos 3543.6986/2012-SP e 3543.6984/2012-SP) e pela Secretaria de Meio Ambiente do Estado de São Paulo (SMA/DeFau 15.335/2012; Projeto MEDUSA, processos SISBIO 41435-1 e 41435-2). O local onde as serpentes são alojadas no LNN-FMRP-USP/INeC é iluminado naturalmente pela luz do sol e por irradiação ultravioleta fluorescente (*reptisun*; 20W; 5UVB) em dias de chuva, e possui cascatas e lagoas artificiais, pedras naturais e plantas naturais e artificiais. O ambiente é mantido sob um ciclo de claro-escuro de 12-12 horas (com luzes acesas a 7:00 h e apagadas as 19:00 h) e a uma temperatura constante de $27\pm 1^\circ\text{C}$ (40-70% de humidade). As serpentes foram alimentadas sete dias, 24 h e imediatamente antes do início de cada experimento com roedores da mesma espécie utilizada neste trabalho (*Mus musculus*). Nesta ocasião, as serpentes evocavam o comportamento de caça e o ataque predatório, seguido de captura da presa e comportamento alimentar. Os roedores foram adaptados ao ambiente experimental por um período de 7 dias antes do experimento, sendo manuseados delicadamente 3 dias antes do tratamento farmacológico.

3.2. Equipamentos

Uma caixa de acrílico semitransparente foi utilizada para o teste de confronto com o predador. Foi utilizada uma arena poligonal (145x72x64 cm) com a superfície

interior das paredes cobertas com um filme refletor de luz, proporcionado 80% de reflexão luminosa, para minimizar o contato visual do predador com as superfícies adjacentes, deixando sua atenção voltada para a presa. O assoalho da arena quadrangular, confeccionado a partir de uma plataforma de acrílico, era posicionado sobre uma placa de aço inoxidável dividido em 20 retângulos iguais usando uma linha verde fluorescente. Para minimizar um possível estímulo vibratório, o aparato foi posicionado sobre uma superfície de granito (170 x 85 x 02 cm) elevado 83 cm do chão do laboratório. Em um dos cantos da arena foi posicionado um abrigo (36 x 26 x 12,5 cm) com paredes de acrílico negro, e um labirinto central em L. A toca possui duas entradas localizadas em lados opostos, permitindo aos camundongos entrar e sair da toca em dois pontos distintos da arena. No dia do experimento, o teto da toca era substituído por um modelo idêntico, confeccionado a partir de acrílico translúcido, para facilitar a gravação dos comportamentos exibidos pelos roedores dentro da toca. Em dois dos quadrantes próximos à toca, foram dispostas duas plataformas elevadas para a proteção das presas.

3.3. Drogas

As drogas administradas por via sistêmica neste estudo foram: 0,03, 0,3 ou 3mg/kg de AM251 (Sigma, USA) ou veículo (NaCl a 0,9 %, 1 ml/kg); 3mg/kg de Canabidiol (CBD, ~99,9% puro, *STI-Pharmaceuticals*, UK) ou veículo (salina 0,9% + *tween*-80 na proporção de 1:1, 0,2 ml/kg). As doses das drogas injetadas estão de acordo com dados prévios da literatura (DONO; CURIE, 2012; URIBE-MARIÑO et al., 2012; TWARDOWSCHY et al., 2013).

3.4. Procedimento experimental

3.4.1. Teste de confronto entre presa e predador (etograma)

Foi utilizado o teste de confronto entre roedores e serpentes em uma arena poligonal para serpentes, sendo realizado 30 minutos após a administração por via intraperitoneal de canabidiol ou veículo, perfazendo um tempo de 5 minutos de confronto entre presa e predador para cada animal. Foram registrados neste teste a duração e o número de comportamentos defensivos e não defensivos dos roedores e das serpentes. A

resposta de atenção defensiva foi definida como uma interrupção do comportamento em curso por 5s, com farejo do ar circundante e atenção voltada para o predador. A imobilidade defensiva (*freezing*) foi considerada quando os camundongos apresentavam imobilidade corporal (exceto pelos movimentos das vibrissas) por no mínimo 6s, seguida por reações autonômicas, como defecação, exoftalmia e/ou micção. O comportamento de aproximação cautelosa (*flat-back approach*), um tipo de avaliação de risco, foi definido quando o roedor estendia a parte anterior do corpo para monitorar o ambiente, mantendo o ventre raste ao piso da arena. A interação entre presa e predador foi considerada quando ocorria um contato direto entre eles. O comportamento de fuga orientada foi definido como corridas ou saltos verticais em direção à toca ou às plataformas de escape, enquanto que fuga explosiva ou não orientada foi definida como corridas ou saltos horizontais em qualquer direção da arena que não à toca ou as plataformas de escape. Comportamentos não defensivos também foram analisados, como cruzamentos e levantamentos. Cruzamentos foram considerados quando o roedor pisava com suas quatro patas o interior de um retângulo delimitado na arena, depois de ultrapassar o limite de cada seção. O comportamento de levantamento foi considerado quando a presa apresentava uma postura ereta, ficando apoiada sobre as duas patas posteriores e mantendo as duas patas anteriores no ar ou apoiadas em uma das paredes da arena ou da toca. No que se refere ao comportamento do predador, foram quantificados o comportamento de postura ameaçadora (elevação do terço anterior do corpo, e envergadura em forma de “S”; “bote armado”), sinalização sonora (movimentos rápidos e intermitentes da extremidade da cauda), ataque defensivo (bote sem picada), ataque ofensivo (bote com picada), postura defensiva (imobilidade na postura helicoidal), cruzamentos (movimentos da parte anterior do corpo, cruzando os limites de pelo menos três quadrantes seguidos, com os dois terços rostrais do corpo). Após os experimentos, cada serpente era transferida ao ofidário do LNN-FMRP-USP/INeC, e submetida a uma quarentena, após o que eram alojadas no Ofidário LNN-FMRP-USP/INeC.

3.4.2. Teste nociceptivo

Todos os camundongos terão seus limiares nociceptivos aferidos, utilizando-se para o isso o teste de retirada de cauda. Cada animal será colocado em uma cela de contenção com paredes de acrílico, e terá sua cauda colocada sobre o sensor de uma fonte

de calor (*Tail-Flick* algômetro; Oficina de Precisão da FMRP-USP), cuja elevação progressiva de calorimetria era automaticamente interrompida, tão logo o animal retirasse a cauda do dispositivo. Um pequeno ajuste da intensidade e corrente poderia ser realizado, se necessário, no início do experimento, com o propósito de se obterem três latências consecutivas de retirada de cauda (LRC), entre 2,5 e 3,5 s. Caso o animal não removesse a cauda da fonte de calor dentro de 6s, o dispositivo era desligado para prevenir danos teciduais. A linha de base era formada pela média de três LRC, tomadas em intervalos de 5 min. O limiar nociceptivo era igualmente aferido em sequência à exposição ao predador chegue a seu fim (tempo zero) e 10, 15, 20, 25, e 30, min após as interações entre presa e predador.

3.5. Protocolos experimentais

Experimento I: Com o intuito de comparar o efeito da presença do predador sobre o sistema límbico das presas, após registro da linha de base para o teste de retirada de cauda, era realizado um tratamento IP com veículo (NaCl a 0,9% + NaCl a 0,9% e *tween*-80) em dois grupos independentes de animais que foram submetidos ou ao confronto com uma serpente de brinquedo, ou com serpentes em livre movimentação no interior da arena poligonal, sendo registrado tanto o comportamento defensivo quanto o comportamento exploratório dos animais durante 5 min, seguindo-se novas medidas da latência de retirada de cauda tomadas de 5 em 5 min, durante 30 min.

Experimento II: Com o intuito de estudar os mecanismos de ação do canabidiol, após registro da linha de base para o teste de retirada de cauda, avaliou-se o efeito do pré-tratamento IP com AM251 (antagonista CB1; 0,03, 03 ou 3 mg/kg) ou com salina fisiológica, seguido, após 15 min, da administração de CBD na dose de 3 mg/kg, por via IP, ou de seu respectivo veículo, no comportamento de camundongos expostos a um ambiente ameaçador. Trinta minutos após a administração de CBD, registraram-se o comportamento defensivo e o comportamento exploratório dos animais durante 5 min, na arena poligonal, na presença de uma jararaca, seguindo-se novas medidas da latência de retirada de cauda tomadas de 5 em 5 min, durante 30 min.

4. RESULTADOS

4.1. Efeito do tratamento de CBD ou AM251 no comportamento defensivo e medo incondicionado em camundongos

De acordo com a ANOVA de uma via, houve um efeito significativo do tratamento na frequência [$F(6, 50) = 63.4$, $p < 0.0001$] e na duração [$F(6, 50) = 70.58$, $p < 0.0001$] do comportamento de atenção defensiva. A presença do predador eliciu comportamentos de atenção defensiva em camundongos quando comparado com controle, aumentando significativamente tanto sua frequência como sua duração (teste *post hoc* de Bonferroni; $p < 0.0001$ em ambos os casos). O tratamento com CBD reduziu significativamente tanto a frequência como a duração do comportamento de atenção defensiva (teste *post hoc* de Bonferroni; $p < 0.0001$ em ambos os casos). Além disso, o pré-tratamento com AM251 nas doses de 0.3 e 0.03 mg/kg antagonizou o efeito antiaversivo do CBD sobre a frequência (teste *post hoc* de Bonferroni; $p < 0.01$, $p < 0.0001$, respectivamente) e duração (teste *post hoc* de Bonferroni; $p < 0.001$, $p < 0.0001$, respectivamente) de atenção defensiva. O AM251 na dose 3 mg/kg não apresentou efeito significativo. Esses dados são mostrados na Figura 1 A e B.

De acordo com a ANOVA de uma via, seguida do teste *post hoc* de Bonferroni houve um efeito significativo na frequência [$F(6, 50) = 23.23$, $p < 0.0001$] e duração [$F(6, 50) = 18.74$, $p < 0.0001$] do comportamento de aproximação cautelosa. A presença das serpentes causou maior incidência de aproximação cautelosa em comparação ao grupo exposto à serpente de brinquedo (teste *post hoc* de Bonferroni; $p < 0.0001$). O tratamento com CBD causou uma significativa redução da resposta de aproximação cautelosa evocada pelas presas na presença do predador, quando comparado ao controle (Veh-Veh) (teste *post hoc* de Bonferroni; $p < 0.0001$). O pré-tratamento com AM251, nas três doses usadas no presente trabalho, seguido de CBD reverteu o efeito ansiolítico do CBD (teste *post hoc* de Bonferroni; $p < 0,05$) sobre a resposta de aproximação cautelosa, como mostrado na Figura 1, C e D.

Figura 1 – Efeito da presença de serpente em livre movimentação ou serpente de brinquedo (sem ameaça) sobre o comportamento de defesa de *Mus musculus* tratados com tratamento canabidiol (CBD), AM251 + CBD ou veículo na frequência (A, C, E) e na duração (B, D, F) dos comportamentos de atenção defensiva (A e B), aproximação cautelosa (C e D) e interação entre presa e predador (E e F). As colunas representam a média e as barras, o erro padrão da média; n = 7 roedores por grupo. *, P<0.05, **, P<0.01, ***, P<0.001, ****, P<0.0001 comparado ao grupo sem ameaça da serpente; ++ P<0.01, +++ P<0.0001 comparado ao grupo ameaçado pela serpente; ## P<0.01, ##### P<0.0001 quando comparado ao grupo tratado com CBD + Veículo e ameaçado pela serpente, segundo a *one-way RM-ANOVA* seguido pelo teste *post hoc* de Bonferroni.

Em relação ao comportamento de fuga orientada, houve um efeito significativo do tratamento na frequência [$F(6, 50) = 44.75$, $p < 0.001$] e na duração [F

(6, 50) = 71.23, $p < 0.001$] de fuga. O grupo ameaçado pela serpente apresentou maior frequência de fuga quando comparado ao grupo controle (teste *post hoc* de Bonferroni; $p < 0.001$). O tratamento com CBD (Veh-CBD) diminuiu o número de fuga orientada (teste *post hoc* de Bonferroni; $p < 0.001$), e o pré-tratamento com AM251 em diferentes doses (3, 0.3 mg/kg) diminuiu esse efeito panicolítico (teste *post hoc* de Bonferroni; $p < 0.001$ e $p < 0.01$, respectivamente); porém, o AM251 na dose 0.03 mg/kg não causou efeito significativo comparado ao grupo tratado com veículo (Veh-CBD). Considerando os cruzamentos durante a fuga orientada, o pré-tratamento com AM251 seguido de CBD não causou efeito estatisticamente significativo. Esses dados são mostrados na Figura 2, A e B.

Considerando o comportamento de esquia inibitória (entrada na toca), de acordo com a ANOVA de uma via, houve um efeito significativo do tratamento na frequência [$F(6, 50) = 35$, $p < 0.001$] e duração [$F(6, 50) = 62.37$, $p < 0.0001$] das respostas de entrada na toca. A presença da serpente aumentou significativamente tanto a frequência (teste *post hoc* de Bonferroni; $p < 0.001$), como o tempo de permanência (teste *post hoc* de Bonferroni; $p < 0.001$) das presas nas áreas protegidas. O tratamento com CBD reduziu significativamente tanto a frequência de entradas na toca, como o tempo de permanência na área de abrigo (teste *post hoc* de Bonferroni; $p < 0.0001$ em ambos os casos) quando comparado com o controle. Além disso, o pré-tratamento com AM251 nas doses de 3, 0.3 e 0.03 mg/kg antagonizou o efeito antiaversivo do CBD, aumentando o número de entradas na toca (teste *post hoc* de Bonferroni; $p < 0.001$, em todos os casos), sendo que apenas o pré-tratamento com AM251 na maior dose (3 mg/kg) causou uma redução estatisticamente significativa no tempo de permanência nas áreas protegidas em roedores tratados com CBD e ameaçados pelas serpentes, como mostrado na Figura 2 C e D. Esses dados seguiram uma curva dose-resposta.

Em relação ao comportamento de interação presa-predador, houve um efeito significativo do tratamento na frequência [$F(6, 50) = 31.85$, $p < 0.001$] e na duração [$F(6, 50) = 23.05$, $p < 0.0001$] desse comportamento. O grupo de roedores ameaçados pela serpente apresentou menor frequência do comportamento de interação com o predador quando comparado ao grupo exposto à serpente de brinquedo (teste *post hoc* de Bonferroni; $p < 0.001$). O tratamento com CBD (Veh-CBD) aumentou significativamente a frequência da interação entre presas e predador quando comparado ao grupo controle (Veh-Veh), também exposto à serpente teste *post hoc* de Bonferroni; $p < 0.001$). O pré-

tratamento com AM251 nas maiores doses (3, 0.3 mg/kg) reverteu esse efeito panicolítico do CBD (teste *post hoc* de Bonferroni; $p < 0.001$), no que se refere à frequência da interação entre a presa e o predador (Figura 1E), e o bloqueio de receptores CB1 com AM251 na maior dose (3 mg/kg) foi capaz de reverter também o efeito panicolítico do CBD no que se refere ao tempo de interação entre a presa e a serpente (teste *post hoc* de Bonferroni; $p < 0.001$), como mostrado na Figura 1F.

Figura 2 – Efeito da presença de serpente em livre movimentação na arena poligonal em comparação com a serpente de brinquedo (ausência de ameaça) sobre o comportamento de defesa de *Mus musculus*, e efeito do tratamento com canabidiol (CBD), AM251 ou veículo (Veh) na frequência (A, C, E) ou na duração (B, D) dos comportamentos de fuga orientada (A e B), frequência de entrada na toca (C), tempo de permanência na toca (D) e frequência de cruzamentos durante a fuga (E). As colunas representam a média e a barra, o S.E.M.; n = 7. *, P<0.05, **, P<0.01, ***, P<0.001, ****, P<0.0001 comparado ao grupo não ameaçado pela serpente; ++ P<0.01, ++++ P<0.0001 comparado ao grupo ameaçado pela serpente; #, P<0.05, ## P<0.01, ##### P<0.0001 quando comparado ao grupo tratado com CBD+ Veículo e submetido ao confronto com a serpente, segundo a *one-way RM-ANOVA*, seguido pelo teste *post hoc* de Bonferroni.

4.2. Efeito do tratamento de CBD ou AM251 na nocicepção causada por medo incondicionado

No que se refere à antinocicepção induzida pelo medo, segundo a análise de variância de duas vias, de medidas repetidas (*repeated measure two-way RM-ANOVA*), houve efeito significativo do tratamento [$F(6,50) = 110.3$, $P < 0.0001$], do tempo [$F(6,300) = 295.4$, $P < 0.0001$.] e da interação tratamento *versus* tempo [$F(36;300) = 27.13$, $p < 0.0001$]. A presença da serpente eliciou uma maior antinocicepção em relação ao grupo não ameaçado pelo predador (serpente de brinquedo) (teste *post hoc* de Bonferroni, $P < 0,05$). O tratamento com CBD causou uma significativa atenuação da antinocicepção induzida pelo medo inato, eliciada nas presas pela presença das serpentes, e o pré-tratamento com injeção do antagonista de receptores CB1, o AM251, nas doses 0.3 e 3 mg/kg, 30 minutos antes da administração do CBD, prejudicou o efeito atenuador da antinocicepção induzida pelo medo incondicionado, causado pelo CBD, quando comparado ao controle.

Figura 3- Efeito do pré-tratamento IP com AM251 (antagonista CB1; 3 mg/kg) ou de salina fisiológica, seguido, após 15 min, da administração de CBD na dose de 3 mg/kg, por via IP, ou de seu respectivo veículo, na antinocicepção induzida pelo medo inato, apresentada por camundongos ameaçados por serpentes e submetidos ao teste de *tail-flick*, $n = 7$. *, $P < 0.001$, quando comparado com o grupo não ameaçado pela serpente; +, $P < 0.01$, comparado ao grupo controle (Veh+Veh) ameaçado pela serpente; #, $P < 0.05$, quando comparado ao grupo tratado com CBD+ Veículo e submetido ao confronto com serpentes, segundo a *repeated measure two-way RM-ANOVA* seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni.

4.3. Comportamento das serpentes

No que se refere aos comportamentos emitidos pelas serpentes em contato com os camundongos tratados com CBD ou AM251 + CBD, na arena poligonal (Tabela 1), as serpentes apresentaram comportamentos mais voltados a defesa, como postura defensiva, ataque defensivo e sinalização sonora, quando comparados aos comportamentos relacionados à predação e exploração, como ataque ofensivo e cruzamentos (Tabela 2). É possível observar, também, que nenhum comportamento de

ataque ofensivo seguido de inoculação de peçonha, com consequente óbito da presa foi observado no decorrer do presente trabalho.

Tabela 1- Descrição dos comportamentos exibidos pelo predador (jararaca) na arena poligonal.

Parâmetros comportamentais	
POSTURA AMEAÇADORA	Elevação do terço anterior do corpo, e envergadura em forma de “S”; “bote armado”.
SINALIZAÇÃO SONORA	Movimentos rápidos e intermitentes da parte posterior do corpo.
ATAQUE DEFENSIVO	Bote sem picada.
ATAQUE OFENSIVO	Bote com picada.
POSTURA DEFENSIVA	Imobilidade na postura helicoidal.
CRUZAMENTOS	Movimentos da parte anterior do corpo, cruzando os limites de pelo menos três quadrantes seguidos, com os dois terços rostrais do corpo.

Tabela 2- Frequência dos comportamentos emitidos por jararacas na arena poligonal durante 5 minutos de exposição aos camundongos.

PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS	FREQUÊNCIA
Postura ameaçadora	18
Sinalização sonora	2
Ataque defensivo	7
Ataque ofensivo	0
Postura defensiva	32
Cruzamentos	13

5. DISCUSSÃO

Durante a evolução, espera-se que a seleção natural aumente a eficiência com que predadores detectam e capturam presas. Por outro lado, também se espera que a seleção melhore a capacidade da presa em evitar a captura e escapar de situações ameaçadoras. As complexas adaptações e contra adaptações que vemos entre predadores e suas presas são testemunhas de sua longa coexistência e reflete o resultado de uma corrida de estratégias defensivas elaboradas por redes neurais através do tempo evolutivo. Assim, diferentes comportamentos defensivos preparam a presa para as mais diversas ameaças presentes no ambiente natural.

O presente estudo utilizou um paradigma presa-versus-serpente, que contempla a interação entre presa e predador em arenas poligonais para serpentes, como uma proposta de modelo de ataques de pânico, que foi etologicamente validado pela equipe do Dr. Coimbra ao longo da última década (GUIMARÃES-COSTA et al., 2007; LOBÃO-SOARES et al., 2008; COIMBRA et al., 2017a,c) e, recentemente, foi também farmacologicamente validado por Paschoalin-Maurin et al (2018), com correlatos morfológicos no sistema límbico. Esses autores demonstraram que o confronto de pequenos roedores com serpentes corais peçonhentos (*Micrurus frontalis*) evocou uma série de comportamentos relacionados com ansiedade, como a atenção defensiva e a avaliação de risco e com ataques de pânico, como a imobilidade defensiva e a fuga, que formam modulados pelo tratamento crônico com uma droga benzodiazepínica, o alprazolam, e por uma droga usada para o tratamento da síndrome do pânico em seres humanos, a paroxetina. A presença a serpente peçonhenta aumentou a imunomarcagem da proteína *Fos* em núcleos do sistema hipotalâmico de defesa, como o hipotálamo anterior, o hipotálamo medial e o núcleo pré-mamilar dorsal, além de núcleos do complexo amigdalóide e colunas da substância cinzenta periaquedutal dorsal relacionados com a elaboração do comportamento de defesa. Essa ativação neural foi revertida pelo tratamento crônico com alprazolam e com paroxetina. Esses dados propiciaram uma validação de face, constructo e preditiva do modelo de ataques de pânico baseado no confronto entre pequenos roedores e serpentes constritoras e peçonhentas (COIMBRA et al., 2017a,c; PASCHOALIN-MAURIN et al., 2018). Esse modelo comportamental tem se mostrado ainda muito útil para o estudo da atividade antiaversiva de drogas com potencial ansiolítico e panicolítico, como o canabidiol (URIBE-MARIÑO et al., 2012;

TWARDOWSCHY et al., 2013) e antagonistas de receptores opioides (Coimbra et al., 2017a; Calvo et al., 2019ab).

Os resultados obtidos no presente trabalho indicam que camundongos ao serem submetidos ao confronto com um de seus predadores naturais, a serpente *Bothrops jararaca*, apresentam diversos comportamentos antipredatórios, em comparação às respostas exploratórias evocadas quando confrontados com uma serpente de brinquedo. Foram apresentados comportamentos defensivos diante do predador, tais como atenção defensiva, avaliação de risco (aproximação cautelosa) e fuga orientada, respostas emocionais que diminuíram significativamente nos grupos tratados com CBD (3 mg/kg) por via intraperitoneal em comparação com o controle. A atenuação do comportamento antipredatório causada pelo tratamento com CBD sugere que essa droga derivada da planta *Cannabis sativa* possui uma ação panicolítica, minimizando o medo inato eliciado pela presença de um predador em potencial. Efeito similar do CBD foi previamente demonstrado por nosso grupo de pesquisa (URIBE-MARIÑO et al., 2012). Esses autores demonstraram que o tratamento de camundongos com CBD, administrado por via intraperitoneal, diminuiu a incidência e a duração dos comportamentos de imobilidade defensiva e de fuga não orientada, respostas relacionadas a ataques de pânico (BORELLI et al., 2004; PASCHOALIN-MAURIN et al., 2018), sem causar alterações nas respostas de atenção defensiva e de avaliação de risco, respostas relacionadas com ansiedade (COIMBRA ET al., 2017a; PASCHOALIN-MAURIN et al., 2018). O efeito panicolítico do CBD em camundongos confrontados com serpentes constritoras parece dever-se pelo menos em parte ao receptor serotoninérgico do tipo 5-HT_{1A} (TWARDOWSCHY et al., 2013). Esses dados se harmonizam com nossos presentes resultados, na medida em que o pré-tratamento com CBD causou em camundongos confrontados com jararacas um claro efeito panicolítico, diminuindo significativamente o comportamento de fuga. Curiosamente, no presente trabalho, o tratamento com CBD ainda diminuiu a expressão de respostas comportamentais relacionadas com ansiedade, como a atenção defensiva e a avaliação de risco, o que sugere que o CBD também teve uma propriedade ansiolítica em camundongos ameaçados por jararacas. Com efeito, ação ansiolítica do CBD, mediada por receptores 5-HT_{1A}, também já foi reportada na literatura (CAMPOS; GUIMARÃES, 2008). Não obstante, o presente trabalho, dá um passo adicional nesse campo de investigação, na medida que demonstra que tanto o efeito ansiolítico, como o efeito panicolítico do CBD foram antagonizados com o pré-tratamento com AM251, uma droga

antagonista de receptores canabinoides do tipo 1 (CB1). O recrutamento de receptores canabinoide do tipo CB1, ou serotoninérgico da família 5-HT_{1A}, pelo CBD depende da estrutura neural em que essa droga canabinoide age. Por exemplo, há evidências de que a atenuação dos comportamentos de imobilidade defensiva e de fuga não orientada eliciada pela estimulação elétrica das camadas profundas do colículo superior, causada pela microinjeção de CBD na divisão reticulada da substância negra, depende do receptor CB1, e não do receptor 5HT_{1A} (DA SILVA et al., 2015; COIMBRA et al., 2017b). Entretanto, o CBD parece não atuar diretamente no receptor CB1. De fato, há evidências de que o CBD inibe a recaptação da anandamida, tem uma pequena ação inibitória da hidrólise da anandamida e ativa o canal iônico TRPV1 (BISOGNO et al., 2001). A anandamida consiste em um endocanabinoide com comprovada ação panicolítica como já demonstrado inclusive em camundongos confrontados com serpentes constritoras (DOS ANJOS-GARCIA; COIMBRA, 2019).

O confronto de *Rattus norvegicus* com cascavéis elicia antinocicepção opioide, como recentemente demonstrado por nossa equipe (COIMBRA et al., 2017a). Nossos resultados se harmonizam com essa evidência, na medida em que mostramos que o confronto entre camundongos e jararacas também foi seguido de antinocicepção induzida pelo medo inato. Esse fenômeno antinociceptivo mostrou-se significativamente diminuído com o tratamento sistêmico com CBD, sugerindo que o efeito antiaversivo do CBD culminou também na diminuição da antinocicepção induzida pelo medo incondicionado; efeito atenuado pelo bloqueio de receptores canabinoides do tipo CB1.

Muito embora haja evidências de que o efeito antiaversivo e antinociceptivo do CBD nem sempre se apresentam relacionados (DA SILVA et al., 2015), os presentes resultados vêm ao encontro de estudos realizados *in vivo*, indicando que os canabinoides produzem efeitos antinociceptivos em sítios periféricos, bem como na região espinal e supraespinal, sendo esses efeitos mediados pela ativação dos receptores CB1 e CB2 devido a sua expressão em neurônios do sistema nervoso central e periférico, incluindo neurônios nociceptivos aferentes primários (ROSS et al., 2001). De fato, sabe-se que nas terminações centrais e periféricas de nervos sensoriais nociceptivos, receptores CB1 modulam a propagação de sinais de dor para o cérebro (SAGAR et al., 2010; WOODHAMS et al., 2012).

Curiosamente, o tratamento dos animais com o antagonista de receptores CB1, seguido de veículo, apresentou uma acentuação da antinocicepção induzida pelo

medo inato. É possível que a anandamida endógena liberada por demanda durante o confronto entre presa e serpentes, possa ter agido em outros receptores, como o canal iônico TRPV1, culminando em um paradoxal efeito pró-aversivo mediado pelo mencionado receptor vaniloide. Um efeito similar da anandamida foi recentemente demonstrado por nossa equipe em camundongos tratados no hipotálamo medial com anandamida e confrontados com serpentes constritoras (DOS ANJOS-GARCIA; COIMBRA, 2019).

O modelo de confronto entre presa e predadores, recentemente validado etologicamente, morfolologicamente e farmacologicamente por nossa equipe (PASCHOALIN-MAURIN et al., 2018), em conjunto com a arena poligonal, compreende um ambiente experimental complexo com uma toca artificial para o estudo dos comportamentos de pânico e ansiedade (BIAGIONI et al., 2016; ULLAH et al., 2015). Além disso, mostrou-se sensível ao efeito de outras drogas de ação ansiolíticas e panicolítica (COIMBRA et al., 2017a). O uso de modelos de confronto entre presa e predadores tem sido proposto desde longa data para o estudo de respostas ligadas à ansiedade e ao medo inato (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988; BLANCHARD et al., 1998, 2003). Não obstante, o modelo experimental adotado nos permitiu avaliar, ainda, diversos comportamentos, tendo em vista que se trata de uma arena munida com toca e áreas elevadas (escadas), em que os animais foram previamente habituados. Uma vez que a toca, nestas condições experimentais, seria um lugar seguro para os animais, foi possível verificar com maior riqueza de detalhes do comportamento e caracterizar melhor a resposta de fuga orientada.

Curiosamente, as serpentes exibiram baixa frequência de comportamentos exploratórios dentro da arena, intercalado com frequência moderada de comportamentos ligados ao estado de alerta e reações de defesa ativa, caracterizadas por recolhimento da cabeça ou corpo, ou por movimentos do terço anterior do corpo até o camundongo ou até mesmo para o lado da arena oposto àquele relacionado com a localização do roedor. Os estudos anteriores mostraram que camundongos exibem respostas inatas induzidas pelo medo, como alerta, avaliação de risco, e preferência por se posicionar em locais opostos à localização da ameaça, como imobilidade defensiva, *place preference*, esquiva inibitória e fuga orientada em direção à toca na presença de serpentes (COIMBRA et al., 2017a,c).

Além disso, Swaisgood e sua equipe demonstraram que esquilos exibem um comportamento de avaliação de risco maior ao confrontar serpentes grandes e investem mais tempo monitorando essas serpentes a partir de uma distância segura, sendo que fêmeas de esquilo com filhotes discriminam mais claramente serpentes grandes e pequenas, talvez refletindo a maior vulnerabilidade de seus filhotes a serpentes de maiores dimensões (SWAISGOOD et al., 1999).

O caráter panicolítico da droga canabinoide na dose presentemente testada ficou bem demonstrado quando observamos que os animais tratados tiveram maior interação comportamental com o seu predador natural, aproximando-se com frequência significativamente maior, bem como permanecendo em contato com ele por tempo também maior. Além disso, o CBD também causou uma significativa redução do comportamento de fuga, outra resposta comportamental considerada comumente relacionada a ataques de pânico (RIBEIRO et al., 2005, CASTELLAN-BALDAN et al., 2006), e que se mostra arrefecida quando roedores são tratados com drogas panicolíticas, como a paroxetina e confrontado com serpentes corais peçonhentos (PASCHOALIN-MAURIN et al., 2018). A ansiedade e os estados de pânico envolvem diferentes substratos neurais, respostas fisiológicas particulares e comportamentos motores característicos (GORMAN et al., 2000). Além disso, ansiedade e pânico são evocados por diferentes cenários (URIBE-MARIÑO et al., 2012). Comportamentos defensivos, como a avaliação de risco, são eliciados no organismo em situações de perigo potencial e são comumente relacionados à ansiedade. No entanto, respostas defesa ativas, tais como fuga orientada e explosiva, além de respostas de defesa inibitórias, como a imobilidade defensiva, são exibidas em circunstâncias nas quais o estímulo aversivo não está apenas presente, mas também a uma distância proximal e representa uma ameaça iminente à sobrevivência do organismo (TWARDOWSCHY et al., 2013). O confronto de roedores com serpentes cascavéis ainda evoca respostas defensivas condicionadas (COIMBRA et al., 2017a; CALVO et al., 2019a,b). Evidências recentes sugerem que a modulação da neurotransmissão endocanabinoide pode ter efeitos sobre a aquisição e expressão de condicionamento de medo contextual.

Estudos demonstraram que a administração do antagonista CB1 leva a uma diminuição na expressão do medo condicionado, enquanto que a administração do agonista CB1 levou a um aumento da expressão do medo. Além disso, outro estudo recente observou que a administração de um antagonista CB1, o AM251, também

diminuiu a aquisição do medo contextual (ARENOS *et al*, 2006). No entanto, estudos sugerem que o aumento da ativação do receptor CB1 leva a um aumento na aquisição do medo (PAMPLONA *et al*, 2006). Embora tais dados venham ao encontro de alguns estudos prévios e contribuam para melhor explicar o efeito do canabidiol sobre respostas comportamentais (TWARDOWSCHY *et al.*, 2013), Blessing *et al.* (2015) pontua que os efeitos ansiolíticos do CBD quando administrado agudamente, ainda apresenta algumas discrepâncias entre espécies.

Outra reação defensiva geralmente observada em roedores é a antinocicepção induzida pelo medo instintivo, como aquela avaliado pelo teste *tail-flick* (COIMBRA *et al*, 2006, 2017a; FALCONI-SOBRINHO, 2017), uma resposta de defesa também observada no presente trabalho. Esse comportamento tem um claro valor adaptativo, permitindo ao animal exibir outros comportamentos defensivos, mesmo que uma lesão tenha ocorrido, consequentemente aumentando chance de sobrevivência em uma situação perigosa. O presente estudo demonstrou que o camundongo possui um aumento na antinocicepção ao se encontrar em um ambiente munido de ameaça real, uma serpente peçonhenta com alto potencial letal.

Em conclusão, o modelo experimental adotado permitiu avaliar o efeito panicolítico e ansiolítico do CBD, e o efeito do pré-tratamento utilizando diferentes dosagens de AM251, um antagonista de receptores CB1. O pré-tratamento com AM251, prejudicou significativamente a ação panicolítica do CBD. Pode-se inferir que os receptores CB1 desempenham papel relevante no efeito do CBD em modular as respostas de defesa relacionadas aos transtornos de ansiedade avaliados neste modelo experimental. É bem descrito na literatura que os receptores CB1 medeiam as reações promovidas por agonistas canabinoides (HOWLLET, 1995; HOWLETT *et al.*, 2002). No geral, evidências farmacológicas obtidas nos estudos pré-clínicos existentes apoiam firmemente o uso do CBD como um potencial fármaco para o tratamento para as desordens de ansiedade.

6. CONCLUSÃO

A interação entre *Mus musculus* e serpentes *Bothrops jararaca* causou nas presas uma exuberante resposta comportamental e antinocicepção induzida pelo medo, mostrando que o modelo de confronto entre presas e serpentes em uma arena poligonal para serpentes mostra-se pertinente como modelo para o estudo de respostas inatas de defesa;

O tratamento com CBD diminuiu as respostas de avaliação de risco, de atenção defensiva, de fuga orientada e aumentou a interação entre presa e predador, além de diminuir a antinocicepção induzida pelo medo inato, sugerindo um efeito ansiolítico e panicolítico do CBD;

O pré-tratamento com AM251 diminuiu o efeito antiaversivo do CBD, sugerindo que pelo menos parte do efeito ansiolítico e panicolítico do CBD depende do recrutamento de receptores canabinoides do tipo CB1.

Referências

REFERÊNCIAS

- ALGER, B. E. Retrograde signaling in the regulation of synaptic transmission: focus on endocannabinoids. *Progress in Neurobiology*; 68: 247–86, 2002.
- ALVARES, L. O.; GENRO, B. P.; VAZ BREDA, R.; PEDROSO, M. F.; da COSTA, J. C.; QUILLFED, T. J. A. AM251, a selective antagonist of the CB1 receptor, inhibits the induction of long-term potentiation and induces retrograde amnesia in rats. *Brain Res.*, v. 1075, p. 60-67, 2006.
- AMERI, A. The effects of cannabinoids on the brain *Prog. Neurobiol.*, 58 (1999), pp. 315-348.
- ANSELONI, V. C.; COIMBRA, N. C.; MORATO, S.; BRANDÃO, M. L. A comparative study of the effects of morphine in the dorsal periaqueductal gray and nucleus accumbens of rats submitted to the elevated plusmaze test. *Exp Brain Res*; 129: 260–66, 1999.
- ATAKAN, Z. Cannabis, a complex plant: different compounds and different effects on individuals. *Ther Adv Psychopharmacol* 2012; 2: 241– 254.
- BAILEY, T. W.; DIMICCO, J. A. Chemical stimulation of the dorsomedial hypothalamus elevates plasma ACTH in conscious rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*; 280: 8-15, 2001.
- BARNA, I.; ZELENÁ, D.; ARSZOVSKI, A. C.; LEDENT, C. (2004). The role of endogenous cannabinoids in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis regulation: in vivo and in vitro studies in CB1 receptor knockout mice. *Life Sci*; 75: 2959–70.
- BAYEWITCH, M.; RHEE, M.-H.; AVIDOR-REISS, T.; BREUER, R.; MECHOULAM, Z. Vogel (–)- Δ^9 -Tetrahydrocannabinol antagonizes the peripheral cannabinoid receptor-mediated inhibition of adenylyl cyclase *J. Biol. Chem.*, 271 (1996), pp. 9902-9905.
- BIAGIONI, A. F.; de FREITAS, R. L.; da SILVA, L. A. (2013) Serotonergic neural links from the dorsal raphe nucleus modulate defensive behaviours organised by the dorsomedial hypothalamus and the elaboration of fear-induced antinociception via locus coeruleus pathways. *Neuropharmacology* 67: 379–394.
- BASBAUM, A. I.; FIELDS, H. L. Endogenous pain control mechanism: review and hypothesis *Ann. Neurol.*, 4 (1978), pp. 451-462.

BESSON J. M.; CHAOUCH, A. Peripheral and spinal mechanisms of nociception *Physiol. Rev.*, 67 (1987), pp. 67-186.

BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J. (1988). Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. *Annu Rev Psychol*; 39; 43–68.

BLANCHARD, D. C.; GRIEBEL, G.; RODGERS, R. J.; BLANCHARD, R. J. (1998). Benzodiazepine and serotonergic modulation of antipredator and conspecific defense. *Neurosci Biobehav Rev*; 22: 597–612.

BLANCHARD, D. C.; GRIEBEL, G.; BLANCHARD, R. J. (2001). Mouse defensive behaviors: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. *Neurosci Biobehav Rev*; 25: 205-218.

BLANCHARD, D. C.; GRIEBEL, G.; BLANCHARD, R. J. (2003). The mouse defense test battery: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. *Eur J Pharmacol*; 463: 97–116.

BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C. Bringing natural behaviors into the laboratory: a tribute to Paul MacLean. *Physiol Behav.* 2003; 79:515–524.

BORTOLATO, M.; CAMPOLONGO, P.; MANGIERI, R. A.; SCATTONI, M. L.; FRAU, R. (2006). Anxiolytic-like properties of the anandamide transport inhibitor AM404. *Neuropsychopharmacology*; 31: 2652–9.

BOLLES, R. C.; FANSELOW, M. S. A perceptual-defensive-recuperative model of fear and pain. *Behav Brain Sci.* 1980;3:291–323.

BRANDÃO, M. L.; de AGUIAR, J. C.; GRAEFF, F. G. (1982). GABA mediation of the antiaversive action of minor tranquilizers. *Pharmacol Biochem Behav*; 16: 397–402.

BREIVOGEL, C. S.; CHILDERS, S. R. (1998). The functional neuroanatomy of brain cannabinoid receptors. *Neurobiol Dis.*; 5: 417–31.

CAMPOS, A. C.; GUIMARÃES, F. S. (2008). Involvement of 5HT1A receptors in the anxiolytic-like effects of cannabidiol injected into the dorsolateral periaqueductal gray of rats. *Psychopharmacology*; 199: 223–30.

- CARDOSO, S. H.; MELO, L.; COIMBRA, N. C.; BRANDÃO, M. L. (1992). Opposite effects of low and high doses of morphine in the inferior colliculus. *Behav Pharmacol*; 3: 489–95.
- CANTERAS, N. S.; CHIAVEGATTO, S.; RIBEIRO do VALE, L. E.; SWANSON, L. W. (1997). Severe reduction of rat defensive behavior to a predator by discrete hypothalamic chemical lesions. *Brain Res. Bull.* 1997; 44: 297-305.
- CANTERAS, N. S. (2002). The medial hypothalamic defensive system: hodological organization and functional implications. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 71, 481–491
- CHAPERON, F.; THIEBOT, M. H. (1999). Behavioral effects of cannabinoid agents in animals. *Crit Rev Neurobiol*; 13: 243–81.
- CESARE, P.; MCNAUGHTON, P. A novel heat-activated current in nociceptive neurons and its sensitization by bradykinin *Proc. natl Acad. Sci. U.S.A.*, 93 (1996), pp. 15435-15439.
- COIMBRA, N. C.; TOMAZ, C.; BRANDÃO, M. L. (1992). Evidence for the involvement of serotonin in the antinociception induced by electrical or chemical stimulation of the mesencephalic tectum. *Behav Brain Res*; 50: 77–83.
- COIMBRA, N. C.; BRANDÃO, M. L. (1993). GABAergic nigro-collicular pathways modulate the defensive behavior elicited by midbrain tectum stimulation. *Behav Brain Res*; 59: 131–9.
- COIMBRA, N. C.; BRANDÃO, M. L. (1997). Effects of 5-HT₂ receptors blockade on fear induced analgesia elicited by electrical stimulation of the deep layers of the superior colliculus and dorsal periaqueductal gray. *Behav Brain Res*; 87: 9.
- COIMBRA, N. C.; de OLIVEIRA, R.; FREITAS, R. L.; RIBEIRO, S. J.; BORELLI, K. G. (2006). Neuroanatomical approaches of the tectum-reticular pathways and immunohistochemical evidence for serotonin-positive perikarya on neuronal substrates of the superior colliculus and periaqueductal gray matter involved in the elaboration of the defensive behavior and fear-induced analgesia. *Exp Neurol*; 197: 93–112.
- COIMBRA, N. C.; CALVO, F.; ALMADA, R. C.; FREITAS, R.; PASCHOALIN-MAURIN, L.; dos ANJOS-GARCIA, T.; ... & TRACEY, I. (2017). Opioid

neurotransmission modulates defensive behavior and fear-induced antinociception in dangerous environments. *Neuroscience*, 354, 178-195.

COMPTON, D. R.; ACETO, M. D.; LOWE, J.; MARTIN, B. R. (1996). In vivo characterization of a specific cannabinoid receptor antagonist (SR141716A): inhibition of delta 9-tetrahydrocannabinol-induced responses and apparent agonist activity. *J Pharmacol Exp Ther*; 277: 586–94.

COTA, D.; MARSICANO, G.; TSCHÖP, M.; GRÜBLER, Y.; FLACHSKAMM, C.; SCHUBERT, M. (2003). The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. *J Clin Invest*; 112: 423–31.

COX, J. J.; REIMANN, F.; NICHOLAS, A. K.; THORNTON, G.; ROBERTS, E.; SPRINGELL, K.; KARBANI, G.; JAFRI, H.; MANNAN, J.; RAASHID, Y.; AL-GAZALI, L.; HAMAMY, H.; VALENTE, E. M.; GORMAN, S.; WILLIAMS, R.; MCHALE, D. P.; WOOD, J. N.; GRIBBLE, F. M.; WOODS, C. G. An SCN9A channelopathy causes congenital inability to experience pain. *Nature*. 444 (7121): 894-898, 2006.

CRIPPA, J. A.; ZUARDI, A. W.; GARRIDO, G. E.; et al. Effects of cannabidiol (CBD) on regional cerebral blood flow. *Neuropsychopharmacology* 2004;29:417-426.

DEVANE, W. A.; HANUS, L.; BREUER, A.; PERTWEE, R. G.; STEVENSON, L. A.; GRIFFIN, G. (1992). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*; 258: 1946–9.

DEVANE, W. A.; DYSARZ, F. A.; JOHNSON, M. R.; MELVIN, L. S.; HOWLETT, A. C. (1998). Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol*; 34: 605–13.

DI MARZO, V.; MELCK, D.; BISOGNO, T.; de PETROCELLIS, L. (1998). Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. *Trends Neurosci*; 21: 521–8.

EGASHIRA, N.; MISHIMA, K.; KATSURABAYASHI, S.; YOSHITAKE, T.; MATSUMOTO, Y.; ISHIDA, J. (2002). Involvement of 5-hydroxytryptamine neuronal system in delta9-tetrahydrocannabinol-induced impairment of spatial memory. *Euro J of Pharmacol*; 445: 221–9.

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

EICHENBERGER, G. C. D.; RIBEIRO, S. J.; OSAKI, M. Y.; MARUOKA, R. Y.; RESENDE, G. C. C.; CASTELLAN-BALDAN, L. et al. Neuroanatomical and psychopharmacological evidence for interaction between opioid and GABAergic neural pathways in the modulation of fear and defense elicited by electrical and chemical stimulation of the deep layers of the superior colliculus and dorsal periaqueductal gray matter. *Neuropharmacology*; 42: 48–59. 2002

ESCOHOTADO, A. (2004) *História Elementar das Drogas*. Lisboa: Antígona.

FANSELOW, M. S.; POULOS, A. M. The neuroscience of mammalian associative learning. *Annu Rev Psychol*. 2005;56:207–234.

FANSELOW, M. S.; BOLLES, R. C. 1979. Naloxone and shock-elicited freezing in the rat. *J. Comp. Physiol. Psychol*. 93(4):736-44.

FERNANDEZ de MOLINA, A.; HUNSPERGER, R. W. Organization of the subcortical system governing defence and flight reactions in the cat. *J Physiol*; 160: 200-13. 1962

FERNANDEZ-RUIZ, J.; BERRENDERO, F.; HERNANDEZ, M. L. & RAMOS, J. A. (2000) The endogenous cannabinoid system and brain development. *Trends in Neurosciences* 23, 14–20.

FINN, D. P.; JHAVERI, M. D.; BECKETT, S. R.; ROE, C. H.; KENDALL, D. A.; MARSDEN, C. A. et al. Effects of direct periaqueductal grey administration of a cannabinoid receptor agonist on nociceptive and aversive responses in rats. *Neuropharmacology*; 45: 594–604. 2003.

FREITAS, R. L.; URIBE-MARIÑO, A.; CASTIBLANCO-URBINA, M. A.; ELIAS-FILHO, D. H.; COIMBRA, N. C. GABAA receptor blockade in dorsomedial and ventromedial nuclei of the hypothalamus evokes paniclike elaborated defensive behaviour followed by innate fear-induced antinociception. *Brain Res*; 1305: 118–31. 2009.

FREUND, T. F.; KATONA, I.; PIOMELLI, D. Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol Rev*; 83: 1017–66. 2003

FRIDE, E. The endocannabinoid-CB(1) receptor system in pre- and postnatal life. *Eur. J. Pharmacol.* 500, 289–297 (2004).

FÜRST, S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. *Brain Research Bulletin*, v.48, n.2, p.129-141, Jan. 1999.

GAONI, Y.; MECHOULAM, R.; HASHISH. III. Isolation, structure, and partial synthesis of an active constituent of hashish. *J Am Chem Soc*; 86: 1646–7 1964.

GATLEY, S. J.; LAN, R.; VOLKOW, N. D.; PAPPAS, N.; KING, P.; WONG, C. T.; GIFFORD, A. N.; PYATT, B.; DEWEY, S. L.; MAKRIYANNIS, A. Imaging the brain marijuana receptor: development of a radioligand that binds to cannabinoid CB1 receptors in vivo. *J Neurochem*; 70: 417–23. 1998.

GOBBI, G.; BAMBICO, F. R.; MANGIERI, R.; BORTOLATO, M.; CAMPOLONGO, P.; SOLINAS, M. et al. Antidepressant-like activity and modulation of brain monoaminergic transmission by blockade of anandamide hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci USA*; 102: 18620–5. 2005.

GRAEFF, F. G. Brain defense systems and anxiety. In: Roth M, Burrows GD, Noyes Jr R, editors. *Handbook of anxiety*. Amsterdam: Elsevier: 307–54. 1991.

GRAEFF, F. G. Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviors and related emotions in mammals. *Braz J Med Biol Res.* 1994; 27: 811–29. 1994.

GRAEFF, F. G. Serotonin, the periaqueductal gray and panic. *Neurosci Biobehav Rev*; 28: 239-59. 2004

GRAEFF, F. G.; GUIMARÃES, F. S. *Fundamentos de psicofarmacologia*. 2nd ed. São Paulo: Ateneu; 2012.

GRUNDY, R. I.; RABUFFETTI, M.; BELTRAMO, M. Cannabinoids and Neuroprotection. *Mol. Neurobiol.*, v.24 p. 29-51, 2001.

GUIMARÃES, F. S.; CHIARETTI, T. M.; GRAEFF, F.; ZUARDI, A. W. Antianxiety effect of cannabidiol in the elevated plus-maze. *Psychopharmacology (Berl)*; 100: 558–9. 1990.

GUIMARÃES-COSTA, R.; GUIMARÃES-COSTA, M. B.; PIPPA-GADIOLI, L.; WELTSON, A.; UBIALI, W. A.; PASCHOALIN-MAURIN, T. et al. Innate defensive

behavior and panic-like reactions evoked by rodents during aggressive encounters with Brazilian constrictor snakes in a complex labyrinth: behavioural validation of a new model to study affective and agonistic reactions in a prey vs predator paradigm. *J Neurosci Meth*; 165: 25–37. 2007

GRIEBEL, G.; BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J. Predator-elicited flight responses in Swiss-Webster mice: an experimental model of panic attacks. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry*; 20: 185–205. 1996.

HÄRING, M.; MARSICANO, G.; LUTZ, B.; MONORY, K. Identification of the cannabinoid receptor type 1 in serotonergic cells of raphe nuclei in mice. *Neuroscience*; 146: 1212–9. 2007

HENDRIE, C. A.; WEISS, S. M.; EILAM, D. Exploration and predation models of anxiety: evidence from laboratory and wild species. *Pharmacol Biochem Behav*. 1996;54:13–20.

HERKENHAM, M.; LYNN, A. B.; LITTLE, M. D.; JOHNSON, M. R.; MELVIN, L. S.; de COSTA, B. R.; RICE, K. C. Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc Natl Acad Sci USA*; 87: 1932–6. 1990

HILL, M. N.; GORZALKA, B. B. Pharmacological enhancement of cannabinoid CB1 receptor activity elicits an antidepressant-like response in the rat forced swim test. *Eur Neuropsychopharmacol*; 15: 593-9. 2005

HOFER, M. A. Evolutionary concepts of anxiety. In: Stein DJ, Hollander E, editors. *Textbook of Anxiety Disorders*. American Psychiatric Publishing; Washington, DC: 2002. pp. 57–69.

HOHMANN, A. G.; HERKENHAM, M. Localization of cannabinoid CB(1) receptor mRNA in neuronal subpopulations of rat striatum: a double-label in situ hybridization study. *Synapse*; 37: 71–80. 2000

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. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev*; 54: 161– 202. 2002

INDO, Y.; MARDY, S.; MIURA, Y.; MOOSA, A.; ISMAIL, E. A.; TOSCANO, E.; ANDRIA, G.; PAVONE, V.; BROWN, D. L.; BROOKS, A.; ENDO, F.; MATSUDA, I. Congenital insensitivity to pain with anhidrosis (CIPA): novel mutations of the TRKA (NTRK1) gene, a putative uniparental disomy, and a linkage of the mutant TRKA and PKLR genes in a family with CIPA and pyruvate kinase deficiency. *Human Mutation*. 18: 308-18, 2001.

IVERSEN, L. Cannabis and the brain. *Brain*; 126: 1252–70. 2003

JIANG, W.; ZHANG, Y.; XIAO, L.; VAN CLEEMPOT, J.; JI, S. P.; BAI, G. et al. Cannabinoids promote embryonic and adult hippocampus neurogenesis and produce anxiolytic- and antidepressant-like effects. *J Clin Invest* 115:3104–3116. 2005

JONES, S. L. Anatomy of pain. In: SINATRA, R. S.; HORD, A. H.; GINSBERG, B.; PREBLE, L. *Acute Pain: Mechanisms & Management*. St Louis: Mosby-Year Book, 1992.

KATHURIA, S.; GAETANI, S.; FEGLEY, D.; VALIÑO, F.; DURANTI, A.; TONTINI, A. et al. Modulation of anxiety through blockade of anandamide hydrolysis. *Nat Med* 9:76–81. 2003.

KATS, L. B.; DILL, L. M. The scent of death: Chemosensory assessment of predation risk by prey animals. *Ecoscience*. 1998;5:361–394.

KEIM, S. R.; SHEKHAR, A. (1996) Effects of GABAA receptor blockade in the dorsomedial hypothalamic nucleus on corticotrophin (ACTH) and corticosterone secretion in male rats. *Brain Res* 739:46–51.

KEHL, L. J.; HAMAMOTO, D. T.; WACNIK, P. W.; CROFT, D. L.; NORSTED, B. D.; WILCOX, G. L. et al. A cannabinoid agonist differentially attenuates deep tissue hyperalgesia in animal models of cancer and inflammatory muscle pain

PAIN, 103 (2003), pp. 175-186

KHASABOVA, I. A.; CHANDIRAMANI, A.; HARDING-ROSE, C.; SIMONE, D. A.; SEYBOLD, V. S (2011) Increasing 2-arachidonoyl glycerol signaling in the periphery attenuates mechanical hyperalgesia in a model of bone cancer pain. *Pharmacol Res* 64:60–67

- KOZLOWSKA, K.; WALKER, P.; MCLEAN, L.; CARRIVE, P. Fear and the defense cascade: Clinical implications and management. *Harv. Rev. Psychiatry*. 2015;23:263–287.
- KUMAZAWA, T.; MIZUMURA, K.; MINAGAWA, M.; TSUJII, Y. Sensitizing effects of bradykinin on the heat responses of the visceral nociceptor *J. Neurophysiol.*, 66 (1991), pp. 1819-1824.
- LANG, P. J. & DAVIS, M. (2006). Emotion, motivation, and the brain: Reflex foundations in animal and human research. *Progress in Brain Research*, 156, 3-29.
- LANGFORD, D. J.; BAILEY, A. L.; CHANDA, M. L.; CLARKE, S. E.; DRUMMOND, T. E.; ECHOLS, S.; GLICK, S.; INGRAO, J.; KLASSEN-ROSS, T.; LACROIX-FRALISH, M. L.; MATSUMIYA, L.; SORGE, R. E.; SOTOCINAL, S. G.; TABAKA, J. M.; WONG, D.; VAN DEN MAAGDENBERG, A. M.; FERRARI, M. D.; CRAIG, K. D.; MOGIL, J. S. Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. *Nat Methods* 2010;7:447–U452.
- LEDENT, C.; VALVERDE, O.; COSSU, G.; PETITET, F.; AUBERT, J.; BESLOT, F.; BOHME, G.; IMPERATO, A.; PEDRAZZINI, T.; ROQUES, B.; VASSART, G.; FRATTA, W.; PARMENTIER, M. Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice. *Science* 283:401–404. 1999
- LEDOUX, J. E. Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci*. 2000;23:155–184.
- LEITE-PANISSI, C. R. A.; FERRARESE, A. A.; TERZIAN, A. L.; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, L. Serotonergic activation of the basolateral amygdala and modulation of tonic immobility in guinea pig. *Brain Res. Bull*; 69 (4): 356-364. 2006
- LEONELLI, M.; BRITTO, L. R.; CHAVES, G. P.; TORRAO, A. S. Developmental expression of cannabinoid receptors in the chick retinotectal system. *Develop. Brain. Res.*, v. 156, p. 176-182, 2005.
- LIN, H. C.; MAO, S. C.; SU, C. L.; GEAN, P. W. The role of prefrontal cortex CB1 receptors in the modulation of fear memory. *Cereb Cortex* 19:165–175. 2009
- LIMA, D.; ALMEIDA, A. The medullary dorsal reticular nucleus as a pronociceptive centre of the pain control system *Prog. Neurobiol.*, 66 (2002), pp. 81-108. 2002.

- LIND, J.; CRESSWELL, W. Determining the fitness consequences of anti-predation behaviour. *Behavioral Ecology*. 2005 Sep;16:945-956.
- LUTZ, B. Molecular biology of cannabinoid receptors. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*. 2002. 66:123-142.
- MCMAHON, S. B.; KOLTZENBURG, M. Novel classes of nociceptors: beyond Sherrington *Trends Neurosci.*, 13 (1990), pp. 199-201.
- MARSICANO, G.; LUTZ, B. Expression of the cannabinoid receptor CB1 in distinct neuronal subpopulations in the adult mouse forebrain. *Eur J Neurosci*. 1999
- MASSERANO, J. M.; KAROUM, F.; WYATT, R. J. SR 141716A, a CB1 cannabinoid receptor antagonist, potentiates the locomotor stimulant effects of amphetamine and apomorphine. *Behav Pharmacol* 10:429–432. 1999.
- MATSUDA, L. A.; BONNER, T. I.; LOLAIT, S. J. Localization of cannabinoid receptor mRNA in rat brain. *J Comp Neurol* 327:535–550. 1993
- MATO, S.; DEL OLMO, E.; PAZOS, A. Ontogenetic development of cannabinoid receptor expression and signal transduction functionality in the human brain. *Eur. J. Neurosci.*, v. 17, p. 1747-1754, 2003.
- MELZACK, R. (1973). *The puzzle of pain*. Penguin.
- MENESCAL-de-OLIVEIRA, L.; HOFFMANN, A.; SILVA, L. F. S. Córtex cingulado anterior e respostas nociceptivas em cobaias: modulação GABAérgica, colinérgica e opioidérgica. 2012. Dissertação (Mestrado em Fisiologia) - Fac Medicina de Ribeirão Preto-USP.
- MCLAUGHLIN, R. J.; HILL, M. N.; MORRISH, A. C.; GORZALKA, B. B. Local enhancement of cannabinoid CB1 receptor signalling in the dorsal hippocampus elicits an antidepressant-like effect. *Behav Pharmacol* 18:431–438. 2007
- MCNAUGHTON, N.; CORR, P. J. A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. *Neurosci Biobehav Rev*; 28: 285-305. 2004
- MECHOULAM, R.; HANUS, L. Cannabidiol: an overview of some chemical and pharmacological aspects. Part I: chemical aspects. *Chem Phys Lipids*; 121:35–43. 2002

- MENDIGUREN, A.; PINEDA, J. Effect of the CB1 receptor antagonists rimonabant and AM251 on the firing rate of dorsal raphe nucleus neurons in rat brain slices. *British Journal of Pharmacology*; 158:1579–87. 2009
- MICALE, V.; CRISTINO, L.; TAMBURELLA, A.; PETROSINO, S.; LEGGIO, G. M.; DRAGO, F. et al. Anxiolytic effects in mice of a dual blocker of fatty acid amide hydrolase and transient receptor potential vanilloid type-1 channels. *Neuropsychopharmacology* 34:593–606. 2009
- MILANI, H.; GRAEFF, F. G. GABA-benzodiazepine modulation of aversion in the medial hypothalamus of the rat. *Pharmacol Biochem Behav.* 8: 21-27. 1987.
- MILLAN, M. J.; MAIOFISS, L.; CUSSAC, D.; AUDINOT, V.; BOUTIN, J.-A.; NEWMAN-TANCREDI, A. Differential actions of antiparkinson agents at multiple classes of monoaminergic receptor. I. A multivariate analysis of the binding profiles of 14 drugs at 21 native and cloned human receptor subtypes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 303 (2002), pp. 791-804
- MISHIMA, K.; HAYAKAWA, K.; ABE, K.; IKEDA, T.; EGASHIRA, N.; IWASAKI, K. Cannabidiol prevents cerebral infarction via a serotonergic 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor-dependent mechanism. *Stroke* 36: 1077–1082. 2005.
- MOBBS, D.; PETROVIC, P.; MARCHANT, J. L.; HASSABIS, D.; WEISKOPF, N.; SEYMOUR, B. When fear is near: threat imminence elicits prefrontal-periaqueductal gray shifts in humans. *Science* 314: 1079–1083. 2007
- MORANTA, D.; ESTEBAN, S.; GARCÍA-SEVILLA, J. A. Chronic treatment and withdrawal of the cannabinoid agonist WIN 55, 212-2 modulate the sensitivity of presynaptic receptors involved in the regulation of monoamine syntheses in rat brain. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*; 379: 61–72. 2009
- MOREIRA, F. A.; KAISER, N.; MONORY, K.; LUTZ, B. Reduced anxiety-like behaviour induced by genetic and pharmacological inhibition of the endocannabinoid-degrading enzyme fatty acid amide hydrolase (FAAH) is mediated by CB1 receptors. *Neuropharmacology* 54: 141–150. 2008
- MOREIRA, F. A.; WOTJAK, C. T. Cannabinoids and anxiety. *Curr Top Behav Neurosci* 2:429–450. 2010

- MUNRO, S.; THOMAS, K. L.; ABU-SHAAR, M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 365:61–65. 1993.
- NACKLEY, A. G.; MAKRIYANNIS, A.; HOHMANN, A. G. Selective activation of cannabinoid CB2 receptors suppresses spinal fos protein expression and pain behavior in a rat model of inflammation *Neuroscience*, 119 (2003), pp. 747-757.
- NADERI, N.; HAGHPARAST, A.; SABER-TEHRANI, A.; REZAIL, N.; ALIZADEH, A. M.; KHANI, A. et al. Interaction between cannabinoid compounds and diazepam on anxiety-like behaviour of mice. *Pharmacol Biochem Behav* 89:64–75. 2008
- NADAL, X.; LA PORTA, C.; ANDREEA BURA, S.; MALDONADOIS, R. (2013) Involvement of the opioid and cannabinoid systems in pain control: new insights from knockout studies. *Eur J Pharmacol* 716(1–3):142.
- NAIDU, P. S.; VARVEL, S. A.; AHN, K.; CRAVATT, B. F.; MARTIN, B. R.; LICHTMAN, A. H. Evaluation of fatty acid amide hydrolase inhibition in murine models of emotionality. *Psychopharmacology (Berl)* 192:61–70. 2007
- PANKSEPP, J. (1990a) The psychoneurology of fear: Evolutionary perspectives and the role of animal models in understanding anxiety. In: Burrows, G. D./Roth, M./Noyes Jr, R. (eds) *Handbook of anxiety, Vol. 3: The Neurobiology of Anxiety*. Elsevier: Amsterdam, pp. 3–58.
- PARIA, B. C.; MA, W.; ANDRENYAK, D. M.; SCHMID, P. C.; SCHMID, H. H. O.; MOODY, D. E.; DENG, H.; MAKRIYANNIS, A.; DEY, S. K. Effects of cannabinoids on preimplantation mouse embryo development and implantation are mediated by brain-type cannabinoid receptors. *Biol Reprod* 58:1490–1495. 1998.
- PARMENTIER-BATTEUR, S.; JIN, K.; MAO, X. O.; XIE, L. GREENBERG D. A.; Increased severity of stroke in CB1 cannabinoid receptor Knock-out mice. *J, Neurosci.*, v. 22, p. 9771-9775, 2002
- PASCHOALIN-MAURIN, T.; dos ANJOS-GARCIA, T.; FALCONI-SOBRINHO, L. L.; de FREITAS, R. L.; COIMBRA, J. P. C.; LAURE, C. J.; COIMBRA, N. C. The rodent-versus-wild snake paradigm as a model for studying anxiety- and panic-like behaviors: face, construct and predictive validities. *Neuroscience*, 2017.

- PATEL, S.; HILLARD, C. J. 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. 2006
- PERTWEE, R. G. Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol Ther* 74:129–180. 1997
- PERTWEE, R. G. Cannabinoid receptors and pain. *Prog Neurobiol* 63:569–611. 2001.
- PIOMELLI, D. The Molecular Logic of Endocannabinoid Signalling. *Nat. Rev. Neurosci.* 2003, 4, 873–884.
- PORTER, A. C.; SAUER, J.-M.; KNIERMAN, M. D.; BECKER, G. W.; BERNA, M. J.; BAO, J.; NOMIKOS, G. G.; CARTER, P.; BYMASTER, F. P.; LEESE, A. B.; FELDER, C. C. Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 301:1020–1024. 2002.
- QUARTILHO, A.; MATA, H. P.; IBRAHIM, M. M.; VANDERAH, T. W.; PORRECA, F.; MAKRIYANNIS, A.; MALAN, T. P. (2003) Inhibition of inflammatory hyperalgesia by activation of peripheral CB2 cannabinoid receptors. *Anesthesiology* 99:955–960
- RANG, H. P.; BEVAN, S.; DRAY, A. Chemical activation of nociceptive peripheral neurons *Br. Med. Bull.*, 47 (1991), pp. 534–548.
- RAMOS, J.A.; DE MIGUEL, R.; CEBEIRA, M.; HERNANDEZ, M.; FERNANDEZ-RUIZ, J.J. Exposure to cannabinoids in the development of endogenous cannabinoid system *Neurotox. Res.*, v.4, p. 372, 2002
- RATNER, C. S. Comparative aspects of hypnosis. *Handbook of Clinical and Experimental Hypnosis*; p. 550–587. 1967
- REALINI, N.; VIGANO, D.; GUIDALI, C.; ZAMBERLETTI, E.; RUBINO, T.; PAROLARO, D. Chronic URB597 treatment at adulthood reverted most depressive-like symptoms induced by adolescent exposure to THC in female rats. *Neuropharmacology* 60:235–243. 2011
- RUBINO, T.; GUIDALI, C.; VIGANO, D.; REALINI, N.; VALENTI, M.; MASSI, P. et al. CB1 receptor stimulation in specific brain areas differently modulate anxiety-related behaviour. *Neuropharmacology* 54:151–160. 2008

- RHODY, J. L.; MEAGHER, M. W. Fear and anxiety: divergent effects on human pain thresholds. *Pain*. 84 (1): 65-75, 2000.
- RUSSO, E. B.; BURNETT, A.; HALL, B.; PARKER, K. K. Agonistic properties of cannabidiol at 5-HT_{1A} receptors. *Neurochem Res* 30: 1037–1043. 2005
- RUTKOWSKA, M.; JAMONTT, J.; GLINIAK, H. Effects of cannabinoids on the anxiety-like response in mice. *Pharmacol Rep* 58:200–206. 2006
- SANO, K.; MISHIMA, K.; KOUSHI, E.; ORITO, K.; EGASHIRA, N.; IRIE, K. et al. M. Δ^9 -Tetrahydrocannabinol-induced catalepsy-like immobilization is mediated by decreased 5-HT neurotransmission in the nucleus accumbens due to the action of glutamate-containing neurons. *Neuroscience*; 151:320–8. 2008.
- SANTOS, J. M.; MACEDO, C. E.; BRANDÃO, M. L. Gabaergic mechanisms of hypothalamic nuclei in the expression of conditioned fear. *Neurobiol Learn Mem*; 90: 560-568. 2008.
- SAÑUDO-PEÑA, M. C.; ROMERO, J.; SEALE, G. E.; et al. Activational role of cannabinoids on movement. *Eur J Pharmacol* 2000; 391: 269–74.
- SAGAR, D. R.; STANIASZEK, L. E.; OKINE, B. N.; WOODHAMS, S.; NORRIS, L. M.; PEARSON, R. G.; GARLE, M. J.; ALEXANDER, S. P.; BENNETT, A. J.; BARRETT, D. A.; KENDALL, D. A.; SCAMMELL, B. E.; CHAPMAN, V. Tonic modulation of spinal hyperexcitability by the endocannabinoid receptor system in a rat model of osteoarthritis pain. *Arthritis Rheum*. 2010;62:3666–3676.
- SCHERMA, M.; MEDALIE, J.; FRATTA, W.; VADIVEL, S. K.; MAKRIYANNIS, A.; PIOMELLI, D. et al. The endogenous cannabinoid anandamide has effects on motivation and anxiety that are revealed by fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibition. *Neuropharmacology* 54:129–140. 2008.
- SCHNEIDER, F. & KAROLY, P. (1983). Conceptions of the pain experience: The emergence of multidimensional models and their implications for contemporary clinical practice. *Clinical Psychology Review*, 3(1), 61-86.
- SCHMITT, P.; DI SCALA, G.; BRANDAO, M. L.; KARLI, P. Behavioral effects of microinjections of SR 95103, a new GABA-A antagonist, into the medial hypothalamus or the mesencephalic central gray. *Eur J Pharmacol*; 117: 149-158. 1985.

SCHLICKER, E.; KATHMANN, M. Modulation of transmitter release via presynaptic cannabinoid receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*; 22:565–72. 2001.

SCHIMITEL, F. G.; ALMEIDA, G. M.; PITOL, D. N.; SCHENBERG, L. C. Evidence of a suffocation alarm system within the periaqueductal gray matter of the rat. *Neuroscience*, v. 200, p. 59-73, 2012.

SCHUEL, H.; CHANG, M. C.; BURKMAN, L. J.; PICONE, R. P.; MAKRIYANNIS, A.; ZIMMERMAN, A. M.; ZIMMERMAN, S. Cannabinoid receptors in sperm. In: Nahas GG, Sutin KM, Agurell S (eds) *Marihuana and medicine*. Humana Press, Totowa, pp 335–345. 1999

SILVEIRA, M. C.; GRAEFF, F. G. Defense reaction elicited by microinjection of kainic acid into the medial hypothalamus of the rat: antagonism by a GABAA receptor agonist. *Behav Neural Biol*; 57: 226-232. 1992.

SOARES, V. de P.; CAMPOS, A. C.; BORTOLI, V. C.; ZANGROSSI Jr., H.; GUIMARÃES, F. S.; ZUARDI, A. W. Intra-dorsal periaqueductal Gray administration of cannabidiol blocks panic-like response by activating 5-HT_{1A} receptors. *Behav Brain Res*; 213 (2): 225-9. 2010.

SOLTIS, R. P.; DIMICCO, J. A. GABAA and excitatory amino acid receptors in dorsomedial hypothalamus and heart rate in rats. *Am J Physiol*; 260: R13-R20. 1991.

STEFFENS, M.; FEUERSTEIN, T. J. Receptor-Independent Depression of DA and 5-HT Uptake by Cannabinoids in Rat Neocortex Involvement of Na⁺/K⁺-ATPase. *Neurochem. Int.* 2004, 44, 529–538.

STELLA, N.; SCHWEITZER, P.; PIOMELLI, D. A Second Endogenous Cannabinoid That Modulates Long-Term Potentiation. *Nature* 1997, 388, 773–778.

STRAUSS, C. V. A.; MAISONNETTE, S.; COIMBRA, N. C.; ZANGROSSI Jr., H. Effects of Nmethyl-D-aspartate-induced amygdala lesion in rats submitted to the elevated T-maze test of anxiety. *Physiol Behav*; 78:157–63. 2003.

SUGIURA, T.; KONDO, S.; SUKAGAWA, A.; NAKANE, S.; SHINODA, A.; ITO, H. et al. 2- Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun* 215:89–97. 1995

SZABO, B.; SCHLICKER, E. Effects of cannabinoids on neurotransmission. *Handbook of Experimental Pharmacology*; 168:327–65.2005.

URIBE-MARIÑO, A.; FRANCISCO, A.; CASTIBLANCO-URBINA, M. A.; TWARDOWSCHY, A.; SALGADO-ROHNER, C. J.; CRIPPA, J. A.; HALLAK, J. E.; ZUARDI, A. W.; COIMBRA, N. C. Anti- Aversive Effects of Cannabidiol on Innate Fear-Induced Behaviors Evoked by an Ethological Model of Panic Attacks Based on a Prey vs the Wild Snake *Epicrates cenchria crassus* Confrontation Paradigm. *Neuropsychopharmacology* 37, 412–421. 2012.

WALKER, J. M.; KREY, J. F.; CHU, C. J.; HUANG, S. M. Endocannabinoids and related fatty acid derivatives in pain modulation. *Chem Phys Lipids* 121:159–172. 2002.

WOODHAMS, S. G.; WONG, A.; BARRETT, D. A.; BENNETT, A. J.; CHAPMAN, V.; ALEXANDER, S. P. H. Spinal administration of the monoacylglycerol lipase inhibitor JZL184 produces robust inhibitory effects on nociceptive processing and the development of central sensitization in the rat *Br. J. Pharmacol.*, 167 (2012), pp. 1609-1619.

WOOLF, C. J. What is this thing called pain? *Journal of Clinical Investigation*. 120 (11): 3742–3744, 2010.

ZARRINDAST, M. R.; SARAHRoodi, S.; ARZI, A.; KHODAYAR, M. J.; TAHERI-SHALMANI, S.; REZAYOF, A. Cannabinoid CB1 receptors of the rat central amygdala mediate anxiety-like behavior: interaction with the opioid system. *Behav Pharmacol* 19: 716–723. 2008.