

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

YARA BEZERRA DE PAIVA

**Estudo do papel de receptores CB1, 5-HT1A e de canais iônicos TRPV1 da divisão dorsomedial do hipotálamo ventromedial sobre as respostas defensivas inatas evocadas por *Cavia porcellus* ameaçadas com serpentes**

RIBEIRÃO PRETO

2016

**YARA BEZERRA DE PAIVA**

**Estudo do papel de receptores CB1, 5-HT1A e de canais iônicos TRPV1 da divisão dorsomedial do hipotálamo ventromedial sobre as respostas defensivas inatas evocadas por *Cavia porcellus* ameaçadas com serpentes**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: **Neurologia.**

**Orientador: Prof. Dr. Norberto Cysne Coimbra**

**RIBEIRÃO PRETO**

**2016**

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.

## FICHA CATALOGRÁFICA

Paiva, Yara Bezerra

Estudo do papel de receptores CB1, 5-HT1A e de canais iônicos TRPV1 da divisão dorsomedial do hipotálamo ventromedial sobre as respostas defensivas inatas evocadas por *Cavia porcellus* ameaçadas com serpentes / Yara Bezerra de Paiva. / Orientador: Prof. Dr. Norberto Cysne Coimbra. Ribeirão Preto, 2016.

89p.: 12il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de Concentração: Neurologia.

1. Canabidiol; 2. Hipotálamo ventromedial; 3. Comportamento de defesa; 4. Ansiedade; 5. Cobaias (*Cavia porcellus*).

## FOLHA DE APROVAÇÃO

**Aluno:** Yara Bezerra de Paiva

**Título:** Estudo do papel de receptores CB1, 5-HT1A e de canais iônicos TRPV1 da divisão dorsomedial do hipotálamo ventromedial sobre as respostas defensivas inatas evocadas por *Cavia porcellus* ameaçadas com serpentes.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: **Neurologia.**

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

## **Dedicatória**

À minha mãe, ***Maria José Bezerra de Paiva***, pelo seu amor incondicional, apoio e pela dedicação incansáveis.

## Agradecimentos

Aos meus irmãos, **Sarah e Isaac Bezerra de Paiva**, pelo amor e pela amizade sempre presente. Obrigada por tornarem os dias mais leves, mesmo à distância!

Ao **Ricardo**, pelo amor, companheirismo e apoio incondicional.

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

Ao **Prof. Dr. Norberto Cysne Coimbra**, pela oportunidade e confiança. Por todo o aprendizado, compreensão e pela paciência durante esses anos.

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

***Resumo***

---

PAIVA, Y.B. **Estudo do papel de receptores CB1, 5-HT<sub>1A</sub> e de canais iônicos TRPV1 da divisão dorsomedial do hipotálamo ventromedial sobre as respostas defensivas inatas evocadas por *Cavia porcellus* ameaçadas com serpentes.** 2016. 89f. Dissertação (mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP. Ribeirão Preto-SP, 2016.

Há evidências de que os endocanabinoides e os receptores CB1 estejam envolvidos em diversos transtornos emocionais, dentre eles a ansiedade e a depressão. A interação deste sistema endocanabinoide com outros neurotransmissores, como a serotonina (5-HT), tem sido alvo de diversos estudos, uma vez que o aumento na atividade deste sistema promove respostas ansiolíticas e antidepressivas. Alguns estudos mostraram que a porção ventromedial do hipotálamo modula algumas respostas defensivas, como fuga e a imobilidade tônica, respostas estas eliciadas pelos animais frente a situações de medo intenso, como ocorre em um confronto com um dado predador. Dentro desta perspectiva, o presente estudo teve por objetivos avaliar o efeito do tratamento crônico durante 21 dias com canabidiol (CBD) sobre as respostas defensivas em cobaias (*Cavia porcellus*), evocadas diante de um predador natural. Avaliamos, ainda, o efeito da microinjeção intradiencefálica de AM251 (antagonista de receptores CB1; 100pmol/0,2µl), de 6-I-CPS (antagonista de canais iônicos TRPV1; 9nmol/0,2µl), de WAY-100635 (antagonista 5-HT<sub>1A</sub>; 0,37nmol/0,2µl) e seus respectivos veículos em diferentes grupos de cobaias, após o tratamento crônico com canabidiol sobre as respostas defensivas evocadas diante do predador. Os resultados mostraram que, muito embora o tratamento crônico com CBD não tenha atenuado a resposta de imobilidade tônica (IT), devido ao fenômeno de habituação da resposta, diminuiu a expressão de outras respostas comportamentais, como a atenção defensiva e fuga orientada para a toca, promovendo, pois, um efeito ansiolítico e panicolítico. Ademais, a microinjeção de AM251 tendeu a abolir o efeito ansiolítico causado pelo tratamento crônico com CBD, potencializando as respostas defensivas diante de um predador natural. Tais resultados indicam que o CBD promove seu efeito farmacológico também mediante tratamento crônico, e que os receptores canabinoides do tipo CB1 do hipotálamo ventromedial parecem desempenhar algum um papel nesse mecanismo de ação.

**Palavras-chave:** Canabidiol; Hipotálamo Ventromedial; Comportamento de defesa; Ansiedade; Cobaias (*Cavia porcellus*).



***Abstract***

---

PAIVA, Y.B. **Study of the role of CB1 and 5-HT1A receptors, and TRPV1 ion channels of the dorsomedial division of ventromedial hypothalamus on innate defensive responses evoked by *Cavia porcellus* threatened by snakes.** 2016. 89f. Dissertation (Master). Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo. Ribeirão Preto-SP, 2016.

Evidence has shown that endocannabinoids and CB1 receptors are involved in several emotional disorders, including anxiety and depression. The endocannabinoid system and its interaction with other neurotransmitters such as serotonin (5-HT) has been the subject of several studies, since the increase in the activity of this system promotes anxiolytic and antidepressant responses. Some studies have shown that the ventromedial division of the hypothalamus modulates some defensive responses such as flight and tonic immobility, elicited by preys experiencing intense fear-like reactions when facing dangerous situations, as confrontation with a given predator. From this perspective, this study aimed to evaluate the effect of chronic treatment for 21 days with cannabidiol (CBD) on the defensive responses displayed by guinea pigs (*Cavia porcellus*), in the presence of a natural predator. We also studied the effect of intradiencephalic microinjection of AM251 (a CB1 receptor antagonist; 100pmol / 0.2µL), 6-PSC-I (TRPV1 ion channel antagonist; 9nmol / 0.2µL), or WAY-100635 (antagonist 5-HT1A; 0.37nmol / 0.2µL) and their respective controls in different groups of mice after chronic treatment with cannabidiol on the defensive responses evoked in the presence of the predator. The results showed that although the chronic treatment with CBD attenuated tonic immobility response (IT) and other behavioural responses, such as defensive attention and oriented escape behaviour, promoting a significant anxiolytic and panicolytic effect. In addition, intra-hypothalamic microinjection of AM251 exert a potential impairment of the antipanic effect caused by chronic treatment with CBD, increasing the defensive responses displayed in the presence of the predator. These results indicate that the CBD also promotes its pharmacological effect upon chronic treatment, and that medial hypothalamus CB1 receptors seem to play a role in its mechanism of action.

**Keywords:** Cannabidiol; Ventromedial Hypothalamus; Defensive behaviour; Anxiety; Panic-like responses; Guinea pigs (*Cavia porcellus*).

## ***Lista de Figuras***

---

- Figura 1:** Fotografias de uma cobaia durante episódio de imobilidade tônica.....36
- Figura 2:** Aparato experimental mostrando a arena munida com toca, utilizada durante a habituação dos animais **(A)** e durante os experimentos **(B)**. Note a cobaia evocando o comportamento de alerta defensivo, posicionando-se próximo à toca e a uma distância segura do predador .....38
- Figura 3:** Fotografia **(A)** e representação gráfica **(B)** da arena de acrílico, de forma retangular, com paredes transparentes, cobertas com película refletora de luz (80% de reflexão luminosa), medindo 145 cm x 72 cm x 64 cm, com o assoalho dividido em vinte secções iguais, na qual as interações entre as cobaias e a jiboia foram registradas.....39
- Figura 4:** Fotografia de uma cobaia anestesiada e fixada no estereotáxico para realização do procedimento cirúrgico para implante de cânula-guia na região de interesse .....41
- Figura 5:** Efeito do tratamento crônico de canabidiol (3 mg/kg) sobre a duração dos episódios de IT, nos períodos “antes do tratamento”, “21 dias de tratamento” e “após confronto”. Os dados foram apresentados como *scatter dot-plot*, utilizando-se mediana. \*,  $p < 0,001$  comparado ao seu respectivo controle, segundo o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste *post hoc* de Dunn;  $n=6$  e  $n=9$  para VEH e CBD, respectivamente .....48
- Figura 6:** Efeito do tratamento crônico de canabidiol (3 mg/kg; IP) ou veículo (VEH) sobre os comportamentos de aproximação cautelosa, atenção defensiva e fuga orientada. Os dados foram apresentados como *scatter dot-plot*, utilizando-se mediana, CG,  $n = 8$ ; Ctrl,  $n = 6$ ; VEH,  $n = 6$ , CBD,  $n = 9$ , \* representa  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  em relação ao grupo VEH+Serpente segundo o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste *post hoc* de Dunn .....49
- Figura 7:** Efeito do tratamento crônico de canabidiol sobre os comportamentos de interação com o predador, permanência na toca e cruzamentos. Os dados foram apresentados como *scatter dot-plot*, utilizando-se mediana, CG,  $n = 8$ ; Ctrl,  $n = 6$ ; VEH,  $n = 6$ , CBD,  $n = 9$ . \*  $p < 0,05$  com relação ao grupo tratado com VEH+Serpente, segundo o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste *post hoc* de Dunn.....51

- Figura 8:** (A) Fotomicrografia de secção coronal de cérebro de cobaia, representativa do sítio de uma microinjeção localizado no hipotálamo ventromedial parte dorsomedial (HVMdm; Seta = sítio da microinjeção). (B) Representação esquemática dos cortes coronais do cérebro de cobaia. Adaptado do Atlas de Rösner para cobaias. Cx = córtex; HVM = hipotálamo ventromedial; HMVdm = divisão dorsomedial do hipotálamo ventromedial; AP = ântero-posterior .....52
- Figura 9:** Efeito do pré-tratamento central com antagonistas seletivos para receptores 5-HT<sub>1A</sub>, CB<sub>1</sub> e TRPV<sub>1</sub>, ou microinjeção de seu veículo (salina+DMSO), sobre as respostas defensivas eliciadas a partir do confronto com o predador. Todas as administrações foram realizadas no HVMdm, após o tratamento sistêmico crônico com CBD (grupos VEH, WAY, AM251 e 6-I-CPS; n= 8, 13, 11 e 6, respectivamente) ou com Salina (Sal-Sal; n= 12). Grupos CG e Ctrl representam controles do protocolo (CG: sem tratamento/sem predador; Ctrl: sem tratamento/com predador; n= 8 e 6, respectivamente). Os dados foram apresentados como *scatter dot-plot*, utilizando-se mediana. \* p < 0,05 em relação ao grupo Sal+Sal+Serpente e # p < 0,05 em relação ao grupo WAY+CBD+Serpente, segundo o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste *post hoc* de Dunn .....55
- Figura 10:** Efeito do pré-tratamento com WAY, AM251, 6-I-CPS, ou veículo (salina+DMSO), sobre as respostas defensivas eliciadas a partir do confronto com o predador. Os dados foram apresentados como *scatter dot-plot*, utilizando-se mediana. & p < 0,05 em relação ao grupo VEH+CBD+Serpente, segundo o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste *post hoc* de Dunn .....57
- Figura 11:** Efeito do pré-tratamento central com antagonistas seletivos para receptores 5-HT<sub>1A</sub>, CB<sub>1</sub> e TRPV<sub>1</sub>, ou microinjeção de seu controle (salina+DMSO), sobre as respostas defensivas eliciadas a partir do confronto com o predador. Todas as administrações foram realizadas no HVMdm, após o tratamento sistêmico crônico com CBD (grupos VEH, WAY, AM251 e 6-I-CPS; n= 8, 13, 11 e 6, respectivamente) ou com Salina (Sal-Sal; n= 12). Grupos CG e Ctrl representam controles do protocolo (CG: sem tratamento/sem predador; Ctrl: sem tratamento/com predador; n= 8 e 6, respectivamente). Os dados foram apresentados como *scatter dot-plot*, utilizando-se mediana; p > 0.05 em todos os casos, segundo o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste *post hoc* de Dunn .....58

**Figura 12:** Efeito do pré-tratamento central com antagonistas seletivos para receptores 5-HT1A, CB1 e TRPV1, ou microinjeção de seu veículo (salina+DMSO), sobre as respostas defensivas eliciadas a partir do confronto com o predador. Todas as administrações foram realizadas no HVMdm, após o tratamento sistêmico crônico com CBD (grupos *VEH*, *WAY*, *AM251* e *6-I-CPS*; n= 8, 13, 11 e 6, respectivamente) ou com Salina (*Sal-Sal*; n= 12). Grupos *CG* e *Ctrl* representam controles do protocolo (*CG*: sem tratamento/sem predador; *Ctrl*: sem tratamento/com predador; n= 8 e 6, respectivamente). \*\*\* p < 0,001 em relação ao grupo *Sal+Sal+Serpente*, ## p < 0,01 em relação ao grupo *WAY+CBD+Serpente*, + p < 0,05 em relação ao *AM251+CBD+Serpente*, segundo o Teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste *post hoc* de Dunn .....61

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
1.1. <i>Cannabis sativa</i> : um breve histórico.....	16
1.2. Sistema endocanabinoide encefálico .....	16
1.3. Ansiedade.....	19
1.4. Transtornos do pânico .....	20
1.5. Neurobiologia do comportamento defensivo .....	21
1.6. Imobilidade tônica .....	24
1.7. Substrato neural do comportamento defensivo de IT .....	27
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>30</b>
2.1. Objetivo geral.....	31
2.2. Objetivos específicos .....	31
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>32</b>
3.1. Animais.....	33
3.2. Drogas utilizadas .....	34
3.3. Procedimento experimental .....	34
3.3.1. Indução e quantificação da IT .....	34
3.3.2. Teste de confronto .....	36
3.3.3. Aparelho experimental .....	38
3.4. Intervenção cirúrgica.....	39
3.5. Microinjeções intradiencefálicas das drogas .....	41
3.6. Protocolos experimentais.....	42
3.7. Histologia.....	42
3.8. Análise dos resultados.....	43
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>45</b>
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>63</b>
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	<b>71</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>73</b>

## **1- *Introdução***

---



## 1.1 *Cannabis sativa*: um breve histórico

A *Cannabis sativa* foi uma das primeiras plantas cultivadas pelo homem. A primeira evidência histórica e arqueológica indica que esta planta foi cultivada na China desde 4.000 a.C., e das suas fibras eram feitas cordas, tecidos e até mesmo papel, além do que seus frutos eram usados como alimento. Em meados do século XIX, ela começou a ser introduzida na Medicina Ocidental, e suas indicações englobavam três aplicações: como droga sedativa ou hipnótica; analgésica; entre outras indicações (problemas do apetite e digestão, problemas gástricos gerais, nefrites, problemas cardíacos, vertigem, *diabetes mellitus* entre outros; ZUARDI, 2006).

Apesar da sua vasta aplicação, seu uso começou a declinar após a terceira década do século XX, dado ao fato de que, na época, seus princípios ativos não haviam sido isolados e seus extratos variavam de potência e composição, o que acarretava não somente diferenças entre seus efeitos, mas também efeitos indesejáveis (CRIPPA et al., 2010). Além disso, novas substâncias foram produzidas, como hipnóticos e sedativos, tendo como exemplo o hidrato de cloral, barbitúricos e paraldeído (MARTIN et al., 1999) e, em razão das restrições pela posterior determinação do estado ilegal da droga, seu uso como potencial medicamento em psiquiatria foi ainda mais limitado.

Na metade do século passado, Raphael Mechoulam e seu grupo identificaram o  $\Delta^9$ -tetraidrocanabinol ( $\Delta^9$ -THC) como principal componente psicoativo da *Cannabis sativa*. Atualmente, sabe-se que a *Cannabis sativa* contém mais de 60 substâncias, como o canabidiol (CBD), o canabinol e o canabicromeno, denominados fitocanabinoides (MECHOULAM, 1970).

## 1.2 Sistema endocanabinoide encefálico

Os efeitos biológicos do  $\Delta^9$ -THC se devem à sua interação com dois tipos de receptores proteicos, CB1 (HOWLETT et al., 1988; MATSUDA et al.,

1990) e CB2 (MUNRO et al., 1993). Tais receptores são acoplados à proteína G<sub>1</sub>, atuando através da inibição da enzima adenilato ciclase celular (BAYEWITCH et al., 1996; RHEE et al., 1997; STEFFENS et al., 2004), com consequente diminuição dos níveis intracelulares de AMPc.

Os receptores do tipo CB1 são expressos em sua maioria em tecidos nervosos da periferia e do sistema nervoso central (SNC), podendo ser encontrados em maiores concentrações em fibras axônicas, especialmente localizadas em botões terminais de neurônios pré-sinápticos (KATONA, SPERLAGH et al., 2000) e sua função parece ser a de modular a liberação de neurotransmissores, tais como dopamina, noradrenalina, glutamato e serotonina, na fenda sináptica (ISHAC et al., 1996; SHEN et al., 1996; KATHMANN et al., 1999; SZABO et al., 1999).

Estudos mais detalhados mostraram que os receptores CB1 são densamente expressos no hipocampo, cerebelo, núcleos da base e neocórtex (HERKENHAM et al., 1990; HERKENHAM, 1991; HERKENHAM et al., 1991; TSOU et al., 1998). O receptor CB2 é expresso em células imunológicas e, também, no sistema nervoso central, ainda que em menor quantidade que os receptores CB1 (ONAIVI, 2006; ONAIVI et al., 2006). Ademais, os endocanabinoides são capazes de se ligarem a outros alvos farmacológicos, como os canais iônicos TRPV1 (receptores vaniloides) e receptores acoplados à proteína G55 (GPR55; ROSS, 2003; BAKER et al., 2006).

Os principais agonistas endógenos de receptores CB1 e CB2 são os derivados do ácido araquidônico. A etanolamina araquidonoil (AEA) foi o primeiro endocanabinoide caracterizado e chamado de anandamida, do sânscrito *ananda*, que significa “felicidade” (DEVANE et al., 1992) e, anos mais tarde, foi identificado outro ligante endógeno, o 2-araquidonilglicerol (2-AG)(MECHOULAM et al., 1995). Atualmente, estes são os dois ligantes endocanabinoides mais estudados e bem caracterizados (DI MARZO et al., 1998; PIOMELLI, 2003).

A biossíntese de anandamida e 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 fosfolípidios 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-araquidonil-fosfatidiletanolamina que pode ficar armazenado na membrana e ser convertido a anandamida por uma fosfolipase D ativada por  $\text{Ca}^{2+}$  (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 pela 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-araquidonil-lisofosfolípido (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  $\text{Ca}^{2+}$ . 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 (DI MARZO et al., 1998; PIOMELLI, 2003).

### 1.3 Ansiedade

A ansiedade é caracterizada por um conjunto de manifestações físicas e psíquicas que podem ser experimentadas tanto por indivíduos sadios, como acompanhar ou caracterizar enfermidades, sendo qualificada subjetivamente como um estado emocional desagradável, acompanhado por sentimentos de apreensão, insegurança e uma série de alterações comportamentais, neurovegetativas e hormonais (NUTT; GEORGE, 1990). No âmbito comportamental, o indivíduo pode ter tremores exagerados, irritabilidade e inquietação, bem como dificuldades de concentração e perturbações do sono. A ansiedade também foi definida como uma emoção capaz de organizar comportamentos eficientes para atender às exigências dinâmicas do ambiente (LEVENSON, 1999), levando em consideração que, em determinados níveis, a ansiedade se assemelha a um fenômeno adaptativo, visto que ela pode otimizar ou potencializar recursos do indivíduo frente a exigências do meio.

Se, por um lado, em nível fisiológico, a ansiedade prepara o sujeito, proporcionando um meio ótimo para uma resposta efetiva e condizente com a demanda ambiental, por outro, ela pode também inibir o curso normal de uma série de atividades diárias, podendo se tornar patológica. Diferentes modelos teóricos têm sido propostos com o objetivo de compreender a origem patológica da ansiedade. Entretanto, não existem, ainda teorias suficientemente sólidas capazes de explicar apropriadamente a etiologia destes transtornos. Possivelmente, isto se deve ao fato de que os transtornos de ansiedade constituem patologias específicas e relativamente independentes umas das outras, ainda que todas compartilhem um mesmo sentimento subjetivo de mal-estar.

## 1.4 Transtornos do pânico

No Brasil, os transtornos de ansiedade apresentam uma alta prevalência (9,5% a 17,5%), estando associados a uma elevada (5,5% a 12%) demanda potencial estimada (prevalência de casos potencialmente necessitados de assistência). Esses dados, juntamente com a morbidade e os custos associados a essas patologias, indicam que os transtornos de ansiedade constituem um grupo de transtornos de grande importância para a saúde individual e pública.

A ansiedade patológica pode ser classificada em diferentes transtornos, dentre eles o transtorno do pânico, acompanhado ou não de agorafobia, de acordo com o Manual de Diagnóstico e Estatística das Doenças Mentais (DSM-V). Os ataques de pânico, por sua vez, são definidos como episódios recorrentes e inesperados de medo, terror, desconforto ou apreensão intensa, comumente associado ao sentimento de morte ou de perigo iminente e à necessidade de fuga daquela situação. A agorafobia é definida como medo de lugares ou situações em que o paciente sente-se desprotegido ou dos quais não possa evadir-se facilmente. Sintomas, como falta de ar, palpitações, dor ou desconforto torácico, asfixia ou sufocação, medo de morte ou de enlouquecer, ou ainda medo de perder o autocontrole, podem estar presentes nos ataques de pânico (GRAEFF; GUIMARÃES, 2012).

O transtorno do pânico frequentemente é acompanhado de comorbidades psiquiátricas, como depressão, transtorno bipolar, além da dependência ao álcool. Em crianças e adolescentes, costuma apresentar um curso crônico em comorbidade com outros transtornos de ansiedade ou do humor.

Modelos animais de ansiedade vêm sendo utilizados na investigação pré-clínica para selecionar novos fármacos com potencial terapêutico para os transtornos de ansiedade, bem como para investigar seu mecanismo de ação, ou, ainda, para testar hipóteses sobre a fisiopatologia desses transtornos (GRAEFF e ZANGROSSI, 2002). Por serem menos práticos, mais caros e,

---

sobretudo, por limites éticos, experimentos que induzem ansiedade ou emoções correlatas em seres humanos são menos frequentemente empregados. Contudo, apesar de tais limitações, podem constituir-se em importante elo entre a pesquisa básica realizada em animais de laboratório e testes terapêuticos conduzidos em pacientes (GRAEFF, 2007).

### **1.5 Neurobiologia do comportamento defensivo**

Do ponto de vista histórico, o estudo da neurobiologia do medo e da ansiedade se inicia nos relatos de Darwin sobre o caráter evolutivo do comportamento emocional no homem. Seus trabalhos na segunda metade do século XIX indicavam que o estudo do comportamento de outros animais era o caminho para a compreensão das emoções no homem (BRANDÃO et al., 2003).

Alguns autores têm sugerido que as respostas defensivas são organizadas por estruturas encefálicas responsáveis pela integração dos estados aversivos. Alguns dos substratos neurais que compõem o chamado sistema encefálico da aversão (SEA) compreendem o hipotálamo, o complexo amigdalóide e a substância cinzenta periaquedutal (SCP; GRAEFF, 1990; CANTERAS, 2002). Outros estudos mostraram, ainda, 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; COIMBRA & BRANDÃO, 1993, 1997; LEITE-PANISSI et al., 2003). Um exemplo desta modulação pode ser observada nos estudos de Zhang et al. (2000) e de Netto et al. (2002) que mostraram uma modulação da ansiedade por meio da manipulação da neurotransmissão GABAérgica e serotoninérgica.

O hipotálamo possui um papel muito importante na sobrevivência do indivíduo e da espécie. Essa estrutura é responsável pela integração das

respostas endócrinas, autonômicas e comportamentais (CANTERAS, 2002). Dentre as diversas divisões hipotalâmicas, aquelas anatomicamente e funcionalmente implicadas nas respostas de defesa evocadas durante confrontos entre presa e predadores destacam-se o núcleo hipotalâmico dorsomedial (HDM), anterior (NHA), a divisão dorsomedial do hipotálamo ventromedial (HVMdm) e o núcleo pré-mamilar dorsal (NPD) (CANTERAS et al., 1997). 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 de glutamato, agonista glutamatérgico (SILVEIRA & GRAEFF, 1992; BAILEY & DIMICCO, 2001) e de um antagonista GABAérgico, a bicuculina (SCHMITT et al., 1985; SOLTIS & DIMICCO, 1991), no hipotálamo medial evoca também resposta de fuga em ratos. A resposta de fuga tem sido associada ao medo gerado em situações críticas de sobrevivência (BLANCHARD et al., 2001; GRAEFF, 2004), e a disfunção no circuito encefálico que controla este comportamento defensivo tem sido relatada como distúrbio de pânico (BLANCHARD et al., 2001; MCNAUGHTON & CORR, 2004).

Diferentes estratégias defensivas são adotadas, dependendo da situação em que o animal se encontre (RATNER, 1967; BLANCHARD & BLANCHARD, 1988; ANSELONI et al., 1999). O congelamento é a resposta comportamental emitida pelo animal quando este identifica o perigo (presença do predador), mesmo a certa distância. Já a resposta de fuga é a reação natural da presa quando a distância entre ela e o predador é pequena (BLANCHARD & BLANCHARD, 1988). De acordo com Edmunds (1974), o sistema defensivo consiste num conjunto de componentes sensoriais, referentes à detecção de predadores, e de componentes motores relativos ao comportamento de escape ativo, que asseguram uma defesa passiva. O

mesmo autor dividiu o sistema defensivo em primário e secundário, onde o primeiro sistema operaria enquanto o predador estivesse na vizinhança, reduzindo as chances do mesmo encontrar a presa, e o segundo seria acionado, quando houvesse o encontro efetivo, para a tentativa de aumentar as chances de sobrevivência da presa.

Ratner (1967) propôs que, de acordo com a distância entre presa e o predador, diferentes respostas de comportamento defensivo poderiam ser acionadas. Esta distância foi denominada como “distância defensiva”. O primeiro nível de defesa é ativado quando o animal sai da área segura e passa a explorar outra área, de perigo incerto, seja em ambientes novos ou anteriormente associados ao predador. Nessa etapa, a presa passa a apresentar o comportamento que é caracterizado como movimentos exploratórios, conhecido como “risk assessment” ou avaliação de risco. Este comportamento consiste em abaixamento e estiramento do tronco, abertura máxima dos olhos, estiramento das orelhas e farejamento contínuo do ambiente (BLANCHARD & BLANCHARD, 1988).

Uma vez que a presa esteja a uma distância curta do predador já identificado por ela, poderá emitir a resposta de imobilidade defensiva (“congelamento” ou “*freezing*”), caracterizada pela inibição de atividade locomotora, exceto aquela relacionada aos movimentos respiratórios e de vibrissas, olhos mantidos bem abertos, orelhas externas viradas para a frente, acompanhado-se respostas cardiovasculares, como aumento de pressão arterial e de frequência cardíaca, além de defecação e micção (FANSELOW, 1980; BLANCHARD & BLANCHARD, 1988). Em caso de ataque do predador, a presa poderá emitir um comportamento ativo de defesa, podendo ocorrer luta ou fuga.

Caso o contato físico tenha sido estabelecido durante o confronto, é eliciada a resposta de imobilidade tônica (IT), caracterizando o último recurso do animal à tentativa de sobrevivência (RATNER, 1967; GALLUP, 1974; PRESTRUDE & JOHNSTONE, 1977; ROGERS & RANDALL, 1987).



Diversos trabalhos têm sido desenvolvidos no sentido de elucidar a participação de diferentes substratos neurais e neurotransmissores na expressão dos variados comportamentos defensivos. A estimulação elétrica do teto mesencefálico elicia respostas defensivas como “congelamento” e fuga, dependendo da região estimulada (BLANCHARD & BLANCHARD, 1988; LAMPREA et al., 2002; VIANNA et al., 2003). A microinjeção de semicarbazida, um inibidor da enzima glutamato descarboxilase, ou de bicuculina, um antagonista de receptores GABA<sub>A</sub>, na SCP dorsolateral induz uma resposta de congelamento e de fuga, respectivamente (BRANDÃO et al., 1986; BRANDÃO et al., 1999).

### **1.6 Imobilidade tônica**

A IT é uma resposta defensiva inata, caracterizada por um estado profundo e temporário de acinesia e de ausência relativa de resposta ao meio ambiente, perda do reflexo de endireitamento, o que mantém o animal em uma postura não habitual e desajeitada. A IT é o último recurso utilizado pela presa para sua sobrevivência num confronto entre presa e predador e visa a redução da probabilidade de manutenção do ataque do predador (SARGENT & EBEHARDT, 1975). Ratner (1967) sugere que a imobilidade neste momento possa reduzir ou mesmo suprimir o estímulo que evoca um contínuo ataque por parte do predador, possibilitando a presa manter-se viva. Dessa forma, o valor adaptativo da IT se manifesta em uma situação de medo e contato físico entre presa e predador, caracterizando-se como uma resposta extrema ou último recurso defensivo que dispõe a presa para sua sobrevivência, fato demonstrado por Sargent e Ebehardt (1975).

Experimentalmente, a IT pode ser induzida por manobras de inversão postural acompanhadas de uma pequena restrição física dos movimentos. O término de um episódio de IT é caracterizado pela abrupta e repentina recuperação de sua postura estacional. Desse modo, a duração do episódio de

IT é a medida entre o momento em que o experimentador retira suas mãos do animal até o instante em que este volte à postura normal, sobre os próprios pés (RATNER, 1967). Ainda segundo este autor, pequenos movimentos da cabeça e membros podem ocorrer durante a vigência do episódio de IT, não devendo ser confundidos com o término da resposta.

A IT pode variar intraespecificamente por susceptibilidade individual e genética, caracterizado por um padrão comportamental, no qual há perda do reflexo de endireitamento, tônus muscular elevado, falta de resposta a estímulos físicos ambientais, alterações nas frequências cardíaca e respiratória, alteração no traçado eletroencefalográfico, membros em extensão ou fletidos e, classicamente, decúbito dorsal ou lateral (RATNER, 1967; GALLUP, JR., 1974; KLEMM, 1971; HOFFMAN & MENESCAL-DE-OLIVEIRA, 1988; 1989). Ademais, na vigência da IT, ocorre um constante monitoramento do ambiente pela presa, possibilitando a escolha do momento mais eficaz para emissão do reflexo de endireitamento e fuga. Além do medo gerado no paradigma de confronto entre presa e predador que facilita a indução da IT (RATNER, 1967), outros fatores também são cruciais para a indução da imobilidade tônica, como os estímulos táteis e proprioceptivos (GILMAN et al., 1950).

Para a indução de IT em laboratório, utiliza-se um aparato em forma de “V”, quando coelhos e cobaias são utilizados como modelos animais, pois, dessa forma, a área de contato e, portanto, a área sensorial tátil, é aumentada, o que facilita o procedimento de indução do comportamento de defesa (CARLI, 1977). Além disso, também foi demonstrado que ocorreu uma redução do tempo dos episódios de IT de até dez vezes quando foram raspados os pelos de um coelho, o que acarretou redução da entrada sensorial proveniente da periferia (MCBRIDE, 1971).

Dentro deste contexto, a administração de tranquilizantes também reduz significativamente a duração da IT (GALLUP et al., 1972), enquanto que a pré-injeção sistêmica de adrenalina pode aumentar a duração dos episódio de IT (HOAGLAND, 1927; BRAUD & GINSBURG, 1973). Em outro estudo, foi

mostrado que animais sujeitos a um estresse apresentavam uma intensa resposta adrenérgica que, por sua vez, potencializava a resposta de IT (CARLTON, 1969). Podemos destacar a SCP (MONASSI et al., 1999), o núcleo magno da rafe (NMR) (da SILVA & MENESCAL-DE-OLIVEIRA, 2007) e a formação hipocampal dorsal (FAVARONI-MENDES, 2008), como estruturas potencialmente envolvidas na elaboração dessa resposta de defesa extrema.

A serotonina poderia influenciar direta ou indiretamente os neurônios hipotalâmicos envolvidos na resposta ao estresse, por meio de eferências dos núcleos mediano e dorsal da rafe (OWENS & NEMEROFF, 1991; HEIM & NEMEROFF, 2001). Alguns autores indicaram uma interação entre o sistema serotoninérgico e o eixo HPA, baseando-se no fato de que uma desregulação desse sistema tem sido implicada na fisiopatologia de algumas doenças, tais como transtornos afetivos, transtornos de ansiedade e obesidade (FRANCIS et al., 1999; PORTER et al., 2004). Além disso, os neurônios hipotalâmicos expressam os receptores 5-HT<sub>1A</sub> e 5-HT<sub>2</sub> (APPEL et al., 1990; ZHANG et al., 2001). Outra evidência que indica o papel funcional da 5-HT sobre o estresse foi obtida em experimentos onde foram examinados os níveis extracelulares de 5-HT no hipotálamo após a exposição de ratos a diferentes agentes estressores (SHIMIZU et al., 1992; FUNADA & HARA, 2001). Segundo Pacak e Palkovits (2001), grupos de neurônios noradrenérgicos, adrenérgicos e serotoninérgicos localizados no tronco cerebral estão envolvidos no processamento de respostas a estímulos estressores no hipotálamo (SAAVEDRA et al., 2006).

Recentemente, experimentos com roedores, utilizando o confronto com um predador, têm sido conduzidos no sentido 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; URIBE-MARIÑO et al., 2012). Por exemplo, este teste permite observar diferenças entre reações explosivas de fuga, relacionadas à ativação da SCPd (GUIMARÃES-COSTA et al., 2007; URIBE-MARIÑO et al., 2012; TWARDOWSCHY et al., 2013; ALMADA et al., 2015; ALMADA e COIMBRA,

2015), e as arenas poligonais munidas de toca utilizadas nesses estudos permitem a discriminação entre o comportamento de fuga explosiva, organizado por estruturas mesencefálicas, e o comportamento de fuga orientada, organizado por núcleos hipotalâmicos (ULLAH et al., 2015; BIAGIONI et al., 2016). 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 presa e predadores, indicando que esse teste pode ser uma ferramenta adequada nos estudos destes distúrbios (GRIEBEL et al., 1996; BLANCHARD et al., 1998; MAURIN, 2008; URIBE-MARIÑO et al., 2012; TWARDOWSCHY et al., 2013).

### **1.7 Substrato neural do comportamento defensivo de IT**

Ratner (1967) formulou a hipótese de que o neocórtex teria um papel inibitório tônico sobre o tronco cerebral e, assim, modularia a imobilidade tônica. Este conceito é apoiado pelo fato de que, em vertebrados filogeneticamente mais recentes, a resposta de IT é pouco duradoura e de difícil indução, e por isso eles são denominados não susceptíveis. Ademais, entre as espécies, a cobaia apresenta uma susceptibilidade moderada à IT, enquanto que, para ratos, é baixa e, em coelhos, é alta (MCGRAW & KLEMM, 1969).

Woodruff (1977), por sua vez, sugeriu que os episódios de IT podem ser modulados por estruturas límbicas claramente envolvidas na afetividade e emoções, como o medo, de modo que alguns animais eliciam a IT frente a situações perigosas ou outras situações que causem medo. Outras evidências sustentam esta hipótese, Gilmar et al. (1950) e Ratner & Thompson (1960) mostraram que o amansamento ou repetidos testes de indução de IT resultam em um declínio na duração da resposta. Nesse sentido, foi demonstrado que a administração de tranquilizantes reduz significativamente a duração da IT

(GALLUP et al., 1972). Por outro lado, a pré-injeção sistêmica de adrenalina foi eficaz ao produzir um aumento da resposta de imobilidade tônica (BRAUD & GINSBURG, 1973; HOAGLAND, 1927). Podemos dizer, então, que o medo ao menos potencializa a intensidade e a duração dos episódios de imobilidade (RATNER & THOMPSON, 1960; GALLUP et al., 1972).

Foi sugerido por Carlton (1969) que animais sujeitos a um estresse considerável apresentariam uma intensa resposta adrenérgica que ativaria sistemas colinérgicos que mediarão a inibição comportamental. De fato, Menescal-de-Oliveira et al. (1990) verificaram que a estimulação colinérgica da formação reticular mesencefálica promove a inibição na indução e também na duração dos episódios de IT em cobaias. Ainda nesse sentido, diferentes respostas podem ser observadas pela estimulação química de sub-regiões de uma mesma estrutura. Dessa forma, o hipotálamo medial, quando estimulado através de carbacol (CCh), causou aumento na duração dos episódios de IT, enquanto que a porção anterior do hipotálamo reduziu a duração do mesmo comportamento (OLIVEIRA et al., 1997). A aplicação de carbacol na substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPd) provocou uma redução da IT; entretanto, quando microinjetada na porção ventrolateral da SCP (SCPvl), a duração da IT aumentava (MONASSI et al., 1997).

Foi demonstrado, ainda, que agonistas específicos de receptores 5-HT<sub>1A</sub> e 5-HT<sub>2A</sub> na amígdala basolateral reduzem a duração da imobilidade tônica, efeito esse efeito explicável pela hipótese de que a ativação do sistema serotoninérgico naquela estrutura possui um efeito ansiolítico (LEITE-PANISSI et al., 2006). Silva e Menescal-de-Oliveira (2006) demonstraram que a estimulação colinérgica do núcleo magno da rafe (NMR) diminui a duração da IT ao mesmo tempo em que aumenta a atividade motora e promove hipoalgesia, fator indicativo de que o NMR provavelmente participa da modulação de IT e da nocicepção.

A indução repetida da IT em coelhos e em cobaias demonstrou que ocorre diminuição dos níveis encefálicos de serotonina, promovendo uma redução da duração dos episódios de IT (FARABOLLINI et al., 1984). De

acordo com Henning (1980) a 5-HT tem um efeito bifásico na modulação da IT, tendo sido observado que baixas doses são eficazes em promover um aumento desta resposta, enquanto que altas doses diminuem sua duração.

Assim sendo, provavelmente a modulação da IT depende da participação integrada de diversos neurotransmissores. Além disso, pode-se inferir que o substrato neural envolvido na modulação da imobilidade tônica não é exclusividade de uma única estrutura, mas envolve várias outras e de maneira integrada.

## **2. *Objetivos***

---

## 2.1 Objetivo geral

O objetivo do presente estudo é avaliar o papel dos receptores CB1, 5-HT<sub>1A</sub> e de canais iônicos TRPV1 da porção dorsomedial do hipotálamo ventromedial (HVMdm) no efeito do tratamento crônico com canabidiol (CBD), por via intraperitoneal, sobre as respostas defensivas inatas, como “congelamento”, fuga e imobilidade tônica.

## 2.2 Objetivos específicos

- Estudar o padrão de respostas comportamentais de defesa evocadas diante de um predador natural em cobaias submetidas a uma arena poligonal, munida de toca artificial;
- Estudar o efeito do pré-tratamento crônico com canabidiol, sobre os comportamentos de inibição comportamental (“congelamento” e imobilidade tônica) e sobre as respostas explosivas e direcionadas de fuga evocadas diante de um predador natural (serpente constritora);
- Estudar o efeito da microinjeção de AM251 (antagonista CB1), de WAY-100635 (antagonista de receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT<sub>1A</sub>) ou de 6-I-CPS (antagonista de canais iônicos TRPV1) no HVMdm sobre a ação do tratamento crônico com canabidiol na organização das diversas respostas de defesa evocadas diante de um predador natural (serpente constritora).



### ***3. Materiais e Métodos***

---

### 3.1 Animais

Foram utilizadas cobaias machos (*Cavia porcellus*; *Rodentia*, *Caviidae*) pesando entre 450-500g, provenientes do Biotério Central do *Campus* USP de Ribeirão Preto. Os animais foram mantidos em caixas plásticas (56x37 x39cm) forradas com “maravalha”, sendo mantidos cinco animais por caixa. Os animais tiveram livre acesso ao alimento (ração para cobaias e capim fresco) e à água *ad libitum* durante todo o procedimento experimental, exceto durante os confrontos com o predador. Permaneceram em condições controladas de fotoperíodo (12/12h) e temperatura ( $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ ). Como predador, foi utilizada uma serpente constritora selvagem (*Boa constrictor amarali*; *Reptilia*; *Boidae*), pesando 1000-2500 g. Foram utilizadas serpentes coletadas na região sudeste brasileira, na zona rural de Ribeirão Preto e nos distritos vizinhos, doadas ao serpentário do biotério central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP). Durante o período experimental, as cobras foram mantidas em um campo murado iluminado, e com abrigos apropriados, grama e fontes de água, no Laboratório de Neuroanatomia e Neuropsicobiologia (LNN) da FMRP- USP, licenciado pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA, processo 1/35/1998/000846-1). O local onde as cobras foram alojadas no Ophidiarium LNN-FMRP-USP/INeC é iluminado naturalmente pela luz do sol e por irradiação ultravioleta fluorescente (*reptisun*; 20W; 5UVB) em dias de chuva, com cascatas e lagoas artificiais, pedras naturais e plantas naturais e artificiais. O ambiente foi mantido sob um ciclo de claro-escuro de 12-12 horas (com luzes acesas às 7:00 h e apagadas às 19:00 h) e a uma temperatura constante de  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$  (40-70% de umidade). As serpentes foram alimentadas 24h imediatamente antes do início de cada experimento com roedores da mesma espécie a ser utilizada neste trabalho (cobaias, *Cavia porcellus*). Nesta ocasião, as serpentes constritoras puderam evocar o comportamento de caça e o ataque predatório, seguidos de captura da presa e comportamento alimentar.

As cobaias foram adaptadas ao ambiente experimental por um período de 7 dias antes do experimento.

Todos os esforços foram feitos no intuito de evitar o sofrimento desnecessário aos animais, e o protocolo experimental está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da FMRP-USP.

### **3.2 Drogas utilizadas**

A droga que foi aplicada por via sistêmica neste estudo o Canabidiol (CBD, ~99,9% puro, BSPG-Pharm, Sandwich/UK) na dose de 3mg/kg. Para comparação com o efeito do CBD, que foi injetado perifericamente, outro grupo de animais recebeu injeção intraperitoneal de solução salina+Tween 80% (1:1, 0,2 ml/kg) para o controle da injeção de canabidiol.

Outros fármacos foram injetados intradiencefalicamente: WAY-100635 (antagonista de receptores 5-HT<sub>1A</sub>; 0,37nmol/0,2µl), AM251 (antagonista de receptores canabinoides do tipo 1 - CB1; 100pmol/0,2µl) e 6-I-CPS (antagonista de canais iônicos TRPV1). As doses das drogas injetadas foram estipuladas de acordo com dados prévios da literatura (BORELLI et al., 2004; BORTOLI et al., 2006; CASAROTTO et al., 2012; SOARES et al., 2010; FERREIRA & MENESCAL-DE-OLIVEIRA, 2012; URIBE-MARIÑO et al., 2012).

### **3.3 Procedimento experimental**

#### **3.3.1 Indução e quantificação da IT**

O procedimento de IT foi realizado sempre no mesmo período para que houvesse menor variabilidade entre os resultados. Para a indução da IT, o animal foi colocado em decúbito dorsal pelo experimentador, o qual mantivera

os membros anteriores e posteriores do animal contidos, exercendo uma pressão proporcional à resistência oferecida à manobra de indução da IT. Foi considerado como latência o período, em segundos, durante o qual a cobaia resistira à manobra de contenção. O tempo máximo de 60 s foi estabelecido como sendo o tempo de corte para as manobras de indução, ou seja, quando a latência foi superior a 60 s, a duração do episódio foi desconsiderada e a manobra era repetida depois de pelo menos 1 min. No momento em que o animal deixava de oferecer resistência à manobra de contenção, as mãos do experimentador que estavam sobre ele eram removidas e era cronometrada (em segundos) a duração do episódio de IT até o momento em que o animal retornasse à sua postura habitual. O término de um episódio de IT era caracterizado pela abrupta recuperação da posição ortostática do animal. Assim, a duração do episódio de IT constitui na medida entre o momento em que o experimentador retirava suas mãos do animal até o instante em que este voltava à posição ortostática (RATNER, 1967).

Os animais foram levados para a sala experimental 20 minutos antes do início do experimento para a habituação ao local dos procedimentos experimentais. A caixa utilizada para as sessões de indução de IT era forrada com uma espuma de *nylon*, fazendo o formato de um “V”. Durante todo o procedimento experimental, a sala permaneceu na penumbra e com o condicionador de ar ligado para que houvesse um ruído constante. Foram realizadas cinco manobras sucessivas de indução de IT, e entre uma indução e outra, foi respeitado um intervalo aleatório de 60 a 90 s. O teste de IT era realizado antes e após 21 dias de tratamento com as drogas (15 min depois da última dose de fluoxetina e 30 min depois da última dose de canabidiol). Os antagonistas endocanabinoide, vaniloide e serotoninérgico, e o respectivo veículo, foram administrados 10 min antes da última dose de canabidiol (Figura 1).



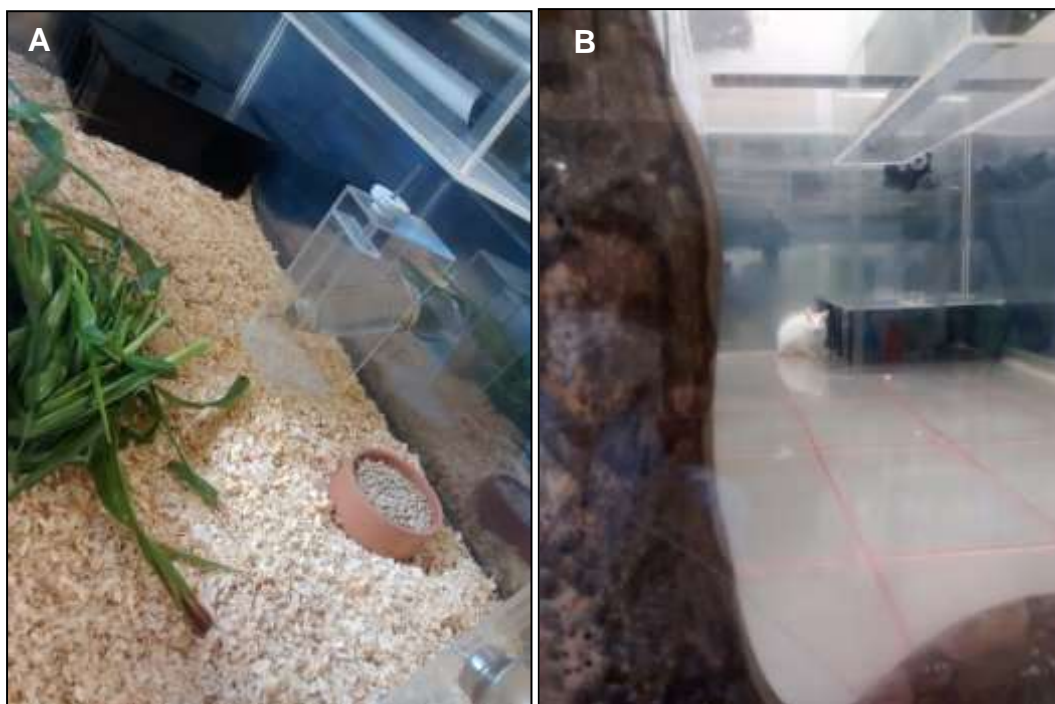
**Figura 1** - Fotografias de uma cobaia durante episódio de imobilidade tônica.

### 3.3.2 Teste de confronto

O teste de confronto foi realizado no vigésimo primeiro dia de tratamento com as drogas, perfazendo um tempo de 10 minutos de confronto para cada animal (cobaia). Foram registrados neste teste a duração e o número de comportamentos defensivos e não defensivos das cobaias. A resposta de atenção defensiva foi definida como uma interrupção do comportamento em curso por pelo menos 5 segundos para análise do ambiente, com farejoso do ar circundante. A imobilidade defensiva (*freezing*) foi considerada quando as

---

cobaias apresentavam imobilidade corporal (exceto pelos movimentos das vibrissas) seguida por reações autonômicas, como defecação, exoftalmia e/ou micção por pelo menos 6s. O comportamento de aproximação cautelosa, um tipo de avaliação de risco (*risk assessment*) foi definido quando o roedor estendera a parte anterior do corpo para monitorar o ambiente, mantendo o ventre raste ao piso da arena e aproximando-se do predador. Interação entre presa e predador foi considerada quando ocorreu um contato direto entre a presa e o predador. Fuga orientada foi definida como corridas em direção à toca. Comportamentos não defensivos também foram analisados, como cruzamentos, levantamentos e autolimpeza. Cruzamentos foram considerados quando o roedor pisava com suas quatro patas o interior de um retângulo delimitado na arena, depois de ultrapassar as divisões de cada seção. O comportamento de levantamento foi considerado quando a cobaia 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. Após os experimentos, cada serpente foi transferida ao serpentário da FMRP-USP, e submetida a uma quarentena. Após este período, as serpentes constritoras foram alojadas no serpentário principal da FMRP-USP (Figura 2).

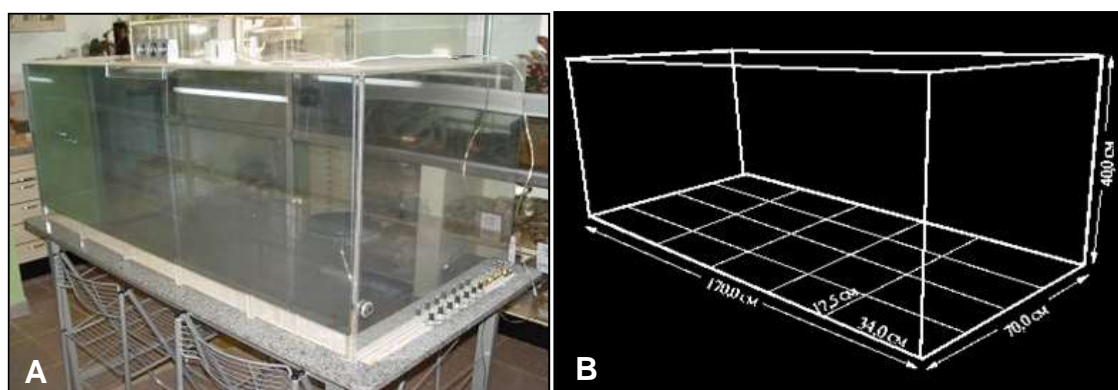


**Figura 2** - Aparato experimental mostrando a arena munida com toca, utilizada durante a habituação dos animais **(A)** e durante os experimentos **(B)**. Note a cobaia evocando o comportamento de alerta defensivo, posicionando-se próximo à toca e a uma distância segura do predador.

### 3.3.3 Aparelho experimental

Uma caixa de acrílico semitransparente foi utilizada para o teste de confronto com o predador. Uma arena retangular (145x72x64 cm) com a superfície inferior das paredes cobertas com um filme refletor de luz, proporcionado 80% de reflexão luminosa, para minimizar o contato visual do predador com o ambiente externo, permitindo sua atenção voltar-se para a presa. O assoalho da arena quadrangular, confeccionado a partir de uma plataforma de acrílico, foi posicionado sobre uma placa de aço inoxidável dividida em 20 retângulos iguais por meio de 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) elevada 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. A toca possuía duas entradas localizadas em lados opostos, permitindo às cobaias entrar e sair de seu interior em dois pontos distintos da arena. No dia do experimento, o teto da toca foi substituído por um modelo idêntico, confeccionado a partir de acrílico translúcido, para facilitar a gravação dos comportamentos exibidos pelos roedores dentro de seu interior (Figura 3).



**Figura 3** - Fotografia (A) e representação gráfica (B) da arena de acrílico, de forma retangular, com paredes transparentes, cobertas com película refletora de luz (80% de reflexão luminosa), medindo 145 cm x 72 cm x 64 cm, com o assoalho dividido em vinte secções iguais, na qual as interações entre as cobaias e a jiboia foram registradas.

### 3.4 Intervenção cirúrgica

Para os grupos de animais que foram pré-tratados intraencefalicamente com antagonistas farmacológicos e seus veículos, as cobaias foram submetidas a uma cirurgia estereotáxica para o implante da cânula-guia na região em estudo 14 dias após o início do tratamento crônico. Os animais foram anestesiados, por via intramuscular, com uma associação de cloridrato de cetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg). Após afixação da cabeça do



---

animal no estereotáxico para animais de pequeno porte (David-Kopff *Instruments*, EUA), aplicou-se lidocaína com vasoconstritor, para assegurar a total ausência de percepção dolorosa e sangramento local. Após a exposição da calota craniana, foram feitos dois orifícios na calvária com auxílio de uma broca odontológica acoplada a um motor elétrico. Em um dos orifícios foi rosqueado um parafuso, que serviu de apoio para o capacete de acrílico autopolimerizável; no outro orifício foi implantada a cânula-guia, confeccionada a partir de segmentos de agulhas hipodérmicas com 0,6 mm de diâmetro externo e 14 mm de comprimento. O implante foi realizado de acordo com o Atlas de Rössner (1965) para cobaias, segundo as seguintes coordenadas: para que fosse atingido o hipotálamo ventromedial, parte dorsomedial (HVMdm), tomando-se o Bregma como ponto de reparo anatômico de referência: ântero-posterior = - 3,9 mm; lateral: - 0,5 mm e dorsomedial: - 9,0 mm, tomada a partir da calota craniana, com 0° grau de angulação. A extremidade inferior da cânula-guia permaneceu um milímetro acima da região a ser estudada. Após a cirurgia, 60.000U.I. de penicilina G benzatina e uma dose (2,5 mg/kg) do analgésico e anti-inflamatório não esteroide flunixin meglumine (Banamine®) foram aplicados, por via intramuscular, em cada animal. O período de recuperação dos animais foi de 5 dias, sendo-lhes permitido acesso à água e à ração *ad libitum* no biotério do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP (Figura 4).



**Figura 4** - Fotografia de uma cobaia anestesiada e fixada no estereotáxico para realização do procedimento cirúrgico para implante de cânula-guia na região de interesse.

### 3.5 Microinjeções intradiencefálicas das drogas

Para as microinjeções no HVMdm utilizou-se uma seringa de Hamilton (10  $\mu$ l) conectada a uma agulha dental (Injex, Indústrias Cirúrgicas, Ltda., Brasil) de 15 mm de comprimento e 0,3 mm de diâmetro interno por meio de um segmento de polietileno (PE 10) de aproximadamente 45 cm.

A agulha de injeção foi preenchida com a droga a ser utilizada, enquanto que a seringa e o polietileno, com água destilada, com uma pequena bolha de ar separando a droga da água destilada. A microinjeção foi realizada em 60 segundos e a agulha foi deixada na cânula-guia por mais 60 segundos para evitar o refluxo das soluções injetadas no tecido cerebral. Após 5 minutos da microinjeção dos antagonistas farmacológicos, os animais foram submetidos ao teste de confronto com o predador, seguido pelo teste de IT.

### 3.6 Protocolos experimentais

**Experimento I:** Com o intuito de comparar o efeito do tratamento com canabidiol sobre as respostas de defesa, grupos independentes de animais foram submetidos a tratamento crônico (21 dias de tratamento contínuo) com a droga canabinoide injetada por via intraperitoneal (IP; canabidiol). Avaliou-se o efeito das injeções IP de canabidiol (3 mg/kg) e salina+Tween 80% (veículo da solução de canabidiol) sobre as respostas defensivas eliciadas por cobaias quando submetidas ao paradigma presa *versus* predador: atenção defensiva, imobilidade defensiva (*freezing*), comportamento de aproximação cautelosa (*risk assessment*), interação com o predador, fuga orientada, locomoção, levantamentos, autolimpeza e a resposta de imobilidade tônica.

**Experimento II:** Para o estudo dos mecanismos de ação do canabidiol, avaliou-se o efeito do pré-tratamento central com WAY-100635 (antagonista 5-HT<sub>1A</sub>; 0,37nmol), AM251 (antagonista CB1; 100pmol), 6-I-CPS (antagonista TRPV1; 9nmol) ou microinjeção de seus respectivos veículos (microinjeção de salina ou de salina+DMSO) na porção dorsomedial do hipotálamo ventromedial, após o tratamento sistêmico crônico com canabidiol (3mg/kg) por 21 dias, sobre as respostas defensivas eliciadas por cobaias quando submetidas ao paradigma presa *versus* predador: atenção defensiva, imobilidade defensiva (*freezing*), comportamento de aproximação cautelosa (*risk assessment*), interação com o predador, fuga orientada, locomoção, levantamentos, autolimpeza e a resposta de imobilidade tônica.

### 3.7 Histologia

Com o término de cada experimento, os animais foram anestesiados na proporção de 0,1ml de cetamina (Cetamina, frasco de 10ml) para 0,2ml de xilasina (Dopaser, frasco de 10ml) e perfundidos através do ventrículo cardíaco esquerdo com solução fisiológica (0,9%) seguida de paraformaldeído a 4% em volume suficiente para fixar os tecidos. Os encéfalos foram removidos e

embebidos primeiramente em paraformaldeído (mínimo de 48h) e posteriormente em sacarose (mínimo de 24h). Em seguida, foram realizados cortes coronais do cérebro, de 40 µm de espessura, no criostato e montados em lâminas para observação do sítio de microinjeção. Posteriormente, os cortes foram analisados com o auxílio de microscopia de luz (AxioImager Z1; Zeiss), de acordo com o atlas estereotáxico de Rössner (1965) para cobaias.

Somente animais com sítios de administração de drogas histologicamente confirmados na área estudada (HVMdm) foram incluídos na análise estatística.

### 3.8 Análise dos resultados

Os resultados dos grupos de imobilidade tônica foram expressos em médias das durações dos cinco episódios de IT de cada animal e erro padrão da média (EPM). A duração da IT (em segundos) foi analisada por meio da análise de variância para medidas repetidas (ANOVA). O programa estatístico utilizado foi o *Prism*, versão 5.0. As diferenças estatísticas foram determinadas pelo teste *post hoc* de Bonferroni. As frequências dos comportamentos foram registradas proporcionalmente em relação ao tempo gasto por cada animal dentro ou fora da toca. Estes dados foram apresentados como índices do comportamento (BI) foram calculados pela seguinte fórmula:  $BI = (100 \times \text{número de respostas comportamentais}) / (\text{tempo em segundos gasto fora ou dentro da toca})$  (URIBE-MARIÑO et al., 2012). A duração de cada comportamento foi expressa em relação como porcentagem entre o tempo total do experimento e o tempo gasto em uma dada resposta evocada fora ou dentro da toca. As variáveis quantitativas com distribuição não-gaussiana foram comparadas pelo teste Kruskal-Wallis, seguido pelo teste *post hoc* de Dunn de comparações múltiplas, enquanto que as variáveis quantitativas com distribuição normal gaussiana ou com amplo desvio padrão foram comparadas por meio da análise de variância de uma via (*one-way-ANOVA*), seguida pelo

teste *post hoc* de Bonferroni. Os dados foram apresentados como *scatter dot-plot*, utilizando-se média ou mediana, segundo seguiam ou não uma distribuição normal. Para todos os experimentos, os dados foram considerados estatisticamente significantes para  $p < 0,05$ .

## **4. Resultados**

---

**Experimento I: Efeito do tratamento crônico do canabidiol comparado ao controle, sobre as respostas defensivas e duração de episódios de IT**

Na Figura 5 pode-se observar que, no decorrer dos 21 dias de tratamento, tanto os animais que receberam canabidiol (3mg/kg + *Tween* 80; n = 9), quanto os que receberam veículo (salina a 0,9% + *Tween* 80; n = 6) mostraram diferença significativa (Kruskal-Wallis;  $H_6 = 31,11$ ;  $p < 0,0001$ ) na duração dos episódios de IT em relação à linha de base. Nota-se, ainda, que, embora o tratamento com canabidiol não tenha diferido significativamente do respectivo controle após 21 dias de tratamento e após confronto com o predador, houve uma tendência não estatisticamente significativa de diminuição da IT apresentada por animais tratados cronicamente com CBD em relação àqueles tratados como veículo. Os valores médios das durações do comportamento de IT nestes animais nos três períodos do protocolo foram de  $131,5 \pm 58,4$  s e  $116,0 \pm 58,6$ s;  $52,8 \pm 38,0$  s e  $16,0 \pm 9,6$  s;  $46,5 \pm 34,7$  s e  $3,1 \pm 2,6$  s para veículo e canabidiol, respectivamente (Figura 5).

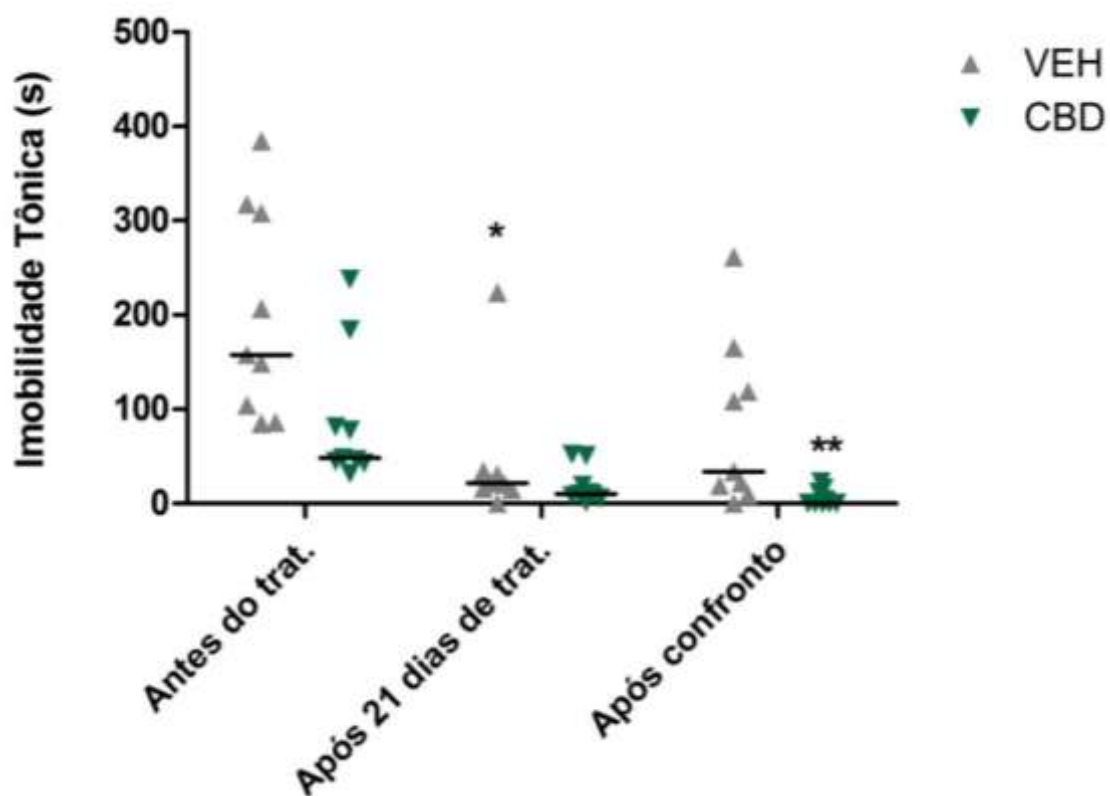
A Figura 6 mostra o efeitos do tratamentocrônico com CBD nas resposta de aproximação cautelosa, atençãodefensiva e fuga orientada evocadas por *C. porcellus* confrontadas comum predador natural. Muito embora o teste de KW tenha indicado que não ocorreram diferenças significativas entre os grupos, seja no que se refere à frequência de aproximação cautelosa ( $H = 4,08$ ;  $p > 0,05$ ; CG:  $3,171 \pm 1,840$ ; Ctrl:  $5,078 \pm 3,369$ ; VEH:  $5,594 \pm 1,343$ ; CBD:  $2,563 \pm 0,663$ ), seja no que se refere à duração desse comportamento ( $H = 1,50$ ;  $p > 0,05$ ; CG:  $7,811 \pm 3,647$ ; Ctrl:  $4,610 \pm 1,746$ ; VEH:  $7,319 \pm 1,509$ ; CBD:  $5,531 \pm 1,722$ ), a exposição à serpente causouuma tendência não significante em aumentar a frequência dessa reação comportamental, o que tendeu a ser revertido com o tratamento crônico com CBD, como mostrado na figura 6A.

No que se refere ao comportamento de atenção defensiva, a exposição à serpente causou uma clara tendência, muito embora não significante, em aumentar não somente a frequência, mas também a duração essa resposta relacionada à ansiedade (Figuras 6 C e D). O tratamento crônico com CBD na dose de 3 mg/kg causou um claro efeito ansiolítico, no que se refere tanto à

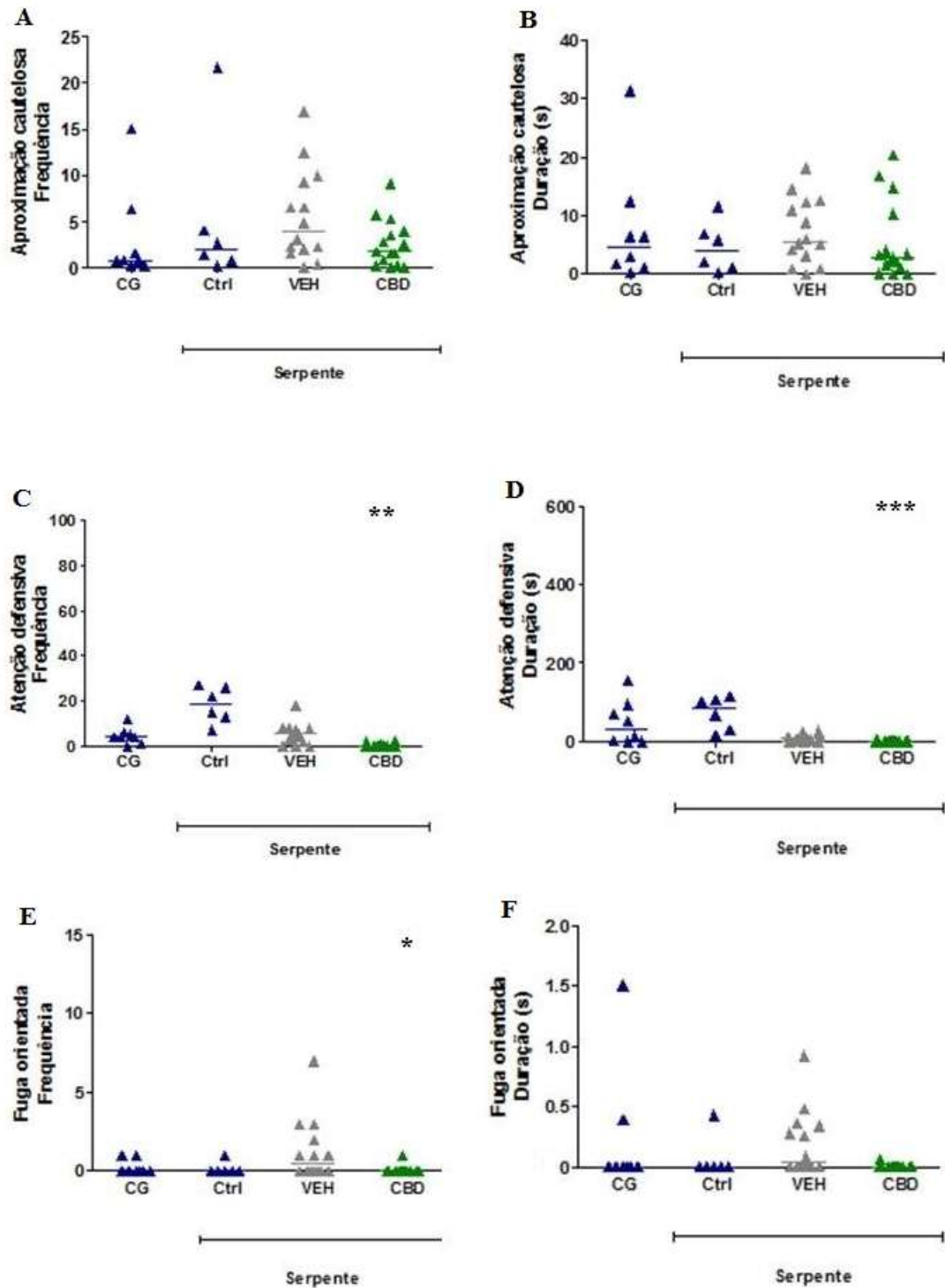
frequência (teste de KW;  $H= 26,4$ ;  $p < 0,01$ ; VEH:  $5,357 \pm 1,261$ ; CBD:  $0,333 \pm 0,187$ ), quanto à duração (teste de KW;  $H= 24,5$ ;  $p < 0,001$ ; CBD:  $0,907 \pm 2,280$ ; Ctrl:  $72,62 \pm 16,81$ ) da atenção defensiva, tendo havido uma redução estatisticamente significativa dessa resposta comportamental (Figuras 6C e D, respectivamente).

Na Figura 6, representam-se tanto a frequência como a duração do comportamento de fuga orientada. Animais ameaçados pelo predador apresentaram uma tendência não significativa a eliciar fuga orientada para a toca. Animais que receberam tratamento crônico com CBD apresentaram uma redução significativa na frequência desse comportamento, quando comparados aos do grupo tratado com veículo (teste de KW;  $H= 8,39$ ;  $p < 0,05$ ; CBD:  $0,066 \pm 0,066$ ; VEH:  $1,286 \pm 0,528$ ), como mostrado na figura 6E. No que se refere à duração da resposta de fuga orientada, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (teste de KW;  $H= 7,16$ ;  $p > 0,05$ ; CG:  $0,238 \pm 0,188$ ; Ctrl:  $0,072 \pm 0,072$ ; VEH:  $0,196 \pm 0,072$ ; CBD:  $0,004 \pm 0,004$ ) (Figura 6F).



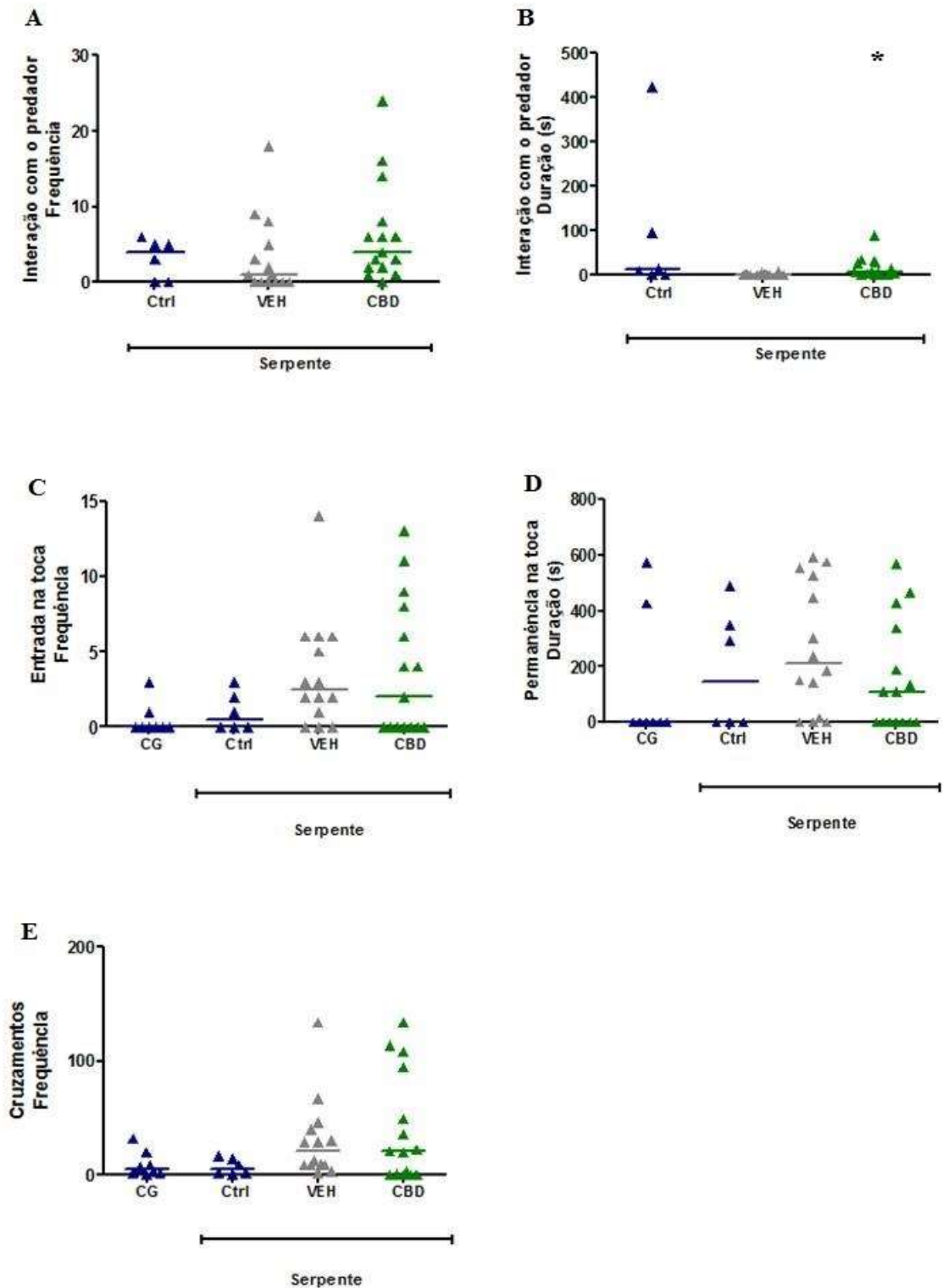


**Figura 5** - Efeito do tratamento crônico de canabidiol (3 mg/kg) sobre a duração dos episódios de IT, nos períodos “antes do tratamento”, “21 dias de tratamento” e “após confronto”. Os dados foram apresentados como *scatter dot-plot*, utilizando-se mediana. \*,  $p < 0,001$  comparado ao seu respectivo controle, segundo o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste *post hoc* de Dunn;  $n=6$  e  $n=9$  para VEH e CBD, respectivamente.

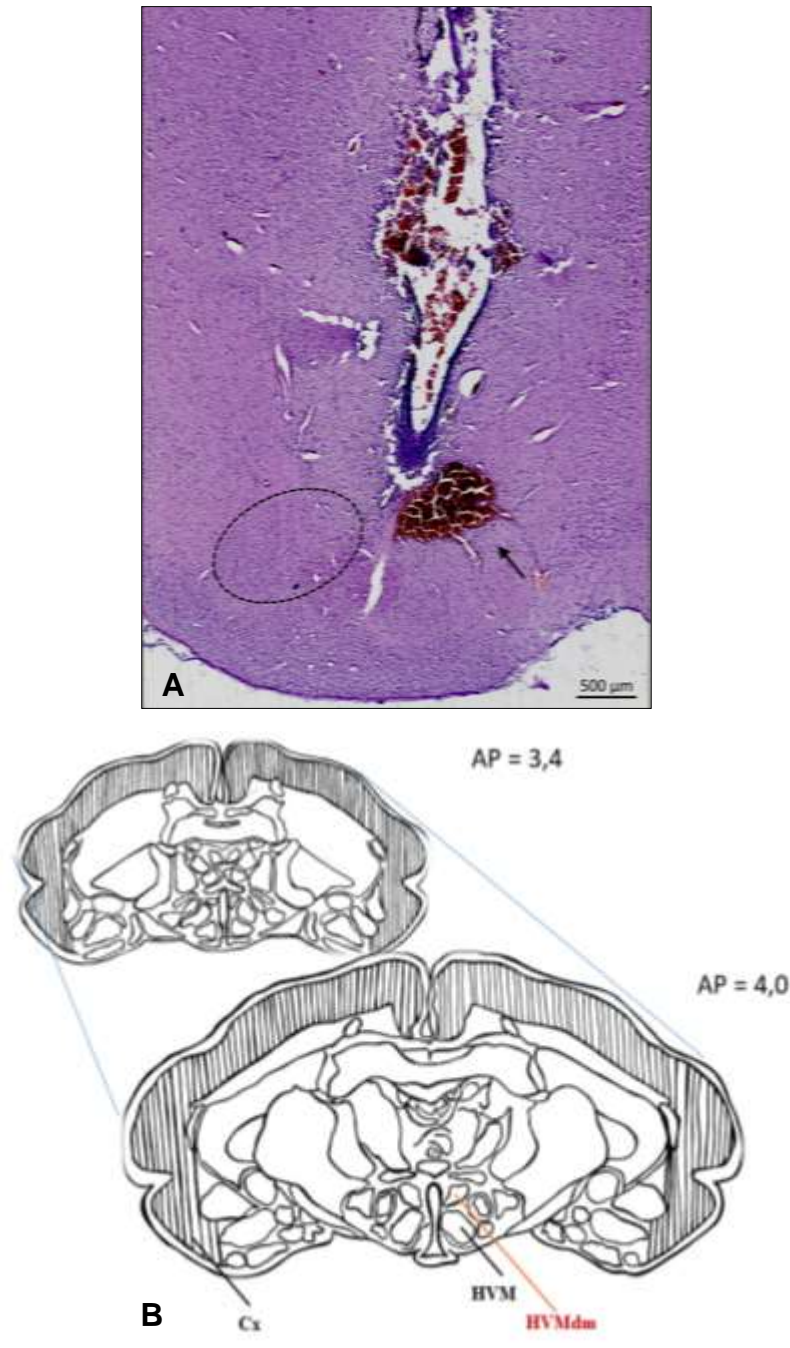


**Figura 6** - Efeito do tratamento crônico de canabidiol (3 mg/kg; IP) ou veículo (VEH) sobre os comportamentos de aproximação cautelosa, atenção defensiva e fuga orientada. Os dados foram apresentados como *scatter dot-plot*, utilizando-se mediana, CG, n = 8; Ctrl, n = 6; VEH, n = 6; CBD, n = 9, \* representa  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  em relação ao grupo VEH+Serpente segundo o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste *post hoc* de Dunn.

A Figura 7 mostra as respostas de interação com o predador (figura 7 A e B), entrada/permanência na toca (figura 7 C e D) e de cruzamentos (figura 7E). Em A está representado o gráfico de frequência de interação com o predador. Houve uma tendência não estatisticamente significativa de redução da interação da presa com o predador, o que tendeu a ser revertido pelo tratamento crônico com o CBD (teste de KW;  $H= 15,0$ ;  $p > 0,05$ ; Ctrl:  $3,167 \pm 1,078$ ; VEH:  $6,400 \pm 1,732$ ; CBD:  $3,357 \pm 1,389$ ), como mostrado na figura 7A. O tratamento crônico com CBD na dose de 3 mg/kg causou um claro efeito panicolítico, ao reverter significativamente a tendência de diminuição da duração da interação com o predador, evocada pelas presas (teste de KW;  $H= 18,9$ ;  $p < 0,05$ ; CBD:  $17,17 \pm 6,124$ ; VEH:  $1,660 \pm 0,679$ ), como mostrado na figura 7B. No que se refere à entrada e permanência na toca, a presença da serpente causou uma tendência em aumentara frequência de entradas no abrigo (teste de KW;  $H= 6,93$ ;  $p > 0,05$ ; CG:  $0,500 \pm 0,378$ ; Ctrl:  $1,000 \pm 0,5164$ ; VEH:  $3,571 \pm 0,998$ ; CBD:  $3,800 \pm 1,176$ ) e de permanência das presas na toca (teste de KW;  $H= 4,43$ ;  $p > 0,05$ ; CG:  $125,0 \pm 82,97$ ; Ctrl:  $189,0 \pm 88,4$ ; VEH:  $266,5 \pm 62,0$ ; CBD:  $156,3 \pm 51,31$ ), muito embora não tenha havido diferenças estatisticamente significantes entre os grupos, como mostrado na figura 7 C e D. A exposição ao predador, causou também uma tendência não significativa em aumentar o número de cruzamentos, principalmente em animais tratados com CBD (teste de KW;  $H= 5,01$ ;  $p > 0,05$ ; CG:  $9,375 \pm 3,937$ ; Ctrl:  $7,500 \pm 2,814$ ; VEH:  $30,71 \pm 9,384$ ; CBD:  $40,20 \pm 12,43$ ), como mostrado na Figura 7E.



**Figura 7** - Efeito do tratamento crônico de canabidiol sobre os comportamentos de interação com o predador, permanência na toca e cruzamentos. Os dados foram apresentados como *scatterdot-plot*, utilizando-se mediana, CG, n = 8; Ctrl, n = 6; VEH, n = 6, CBD, n = 9. \* p < 0,05 com relação ao grupo tratado com VEH+Serpente, segundo o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste *post hoc* de Dunn.

**Experimento II - Localização dos sítios de injeção (Figura 8)**

**Figura 8 - (A)** Fotomicrografia de secção coronal de cérebro de cobaia, representativa do sítio de uma microinjeção localizado no hipotálamo ventromedial parte dorsomedial (HVMdm; Seta = sítio da microinjeção). **(B)** Representação esquemática dos cortes coronais do cérebro de cobaia. Adaptado do Atlas de Rösner para cobaias. Cx = córtex; HVM = hipotálamo ventromedial; HVMdm = divisão dorsomedial do hipotálamo ventromedial; AP = ântero-posterior.

**Experimento II - Efeito do pré-tratamento central com antagonistas seletivos para receptores 5-HT1A, CB1 e TRPV1, ou microinjeção do respectivo controle (microinjeção de salina+DMSO), na porção dorsomedial do hipotálamo ventromedial após o tratamento sistêmico crônico com canabidiol sobre as respostas defensivas eliciadas por cobaias quando submetidas ao paradigma presa *versus* predador**

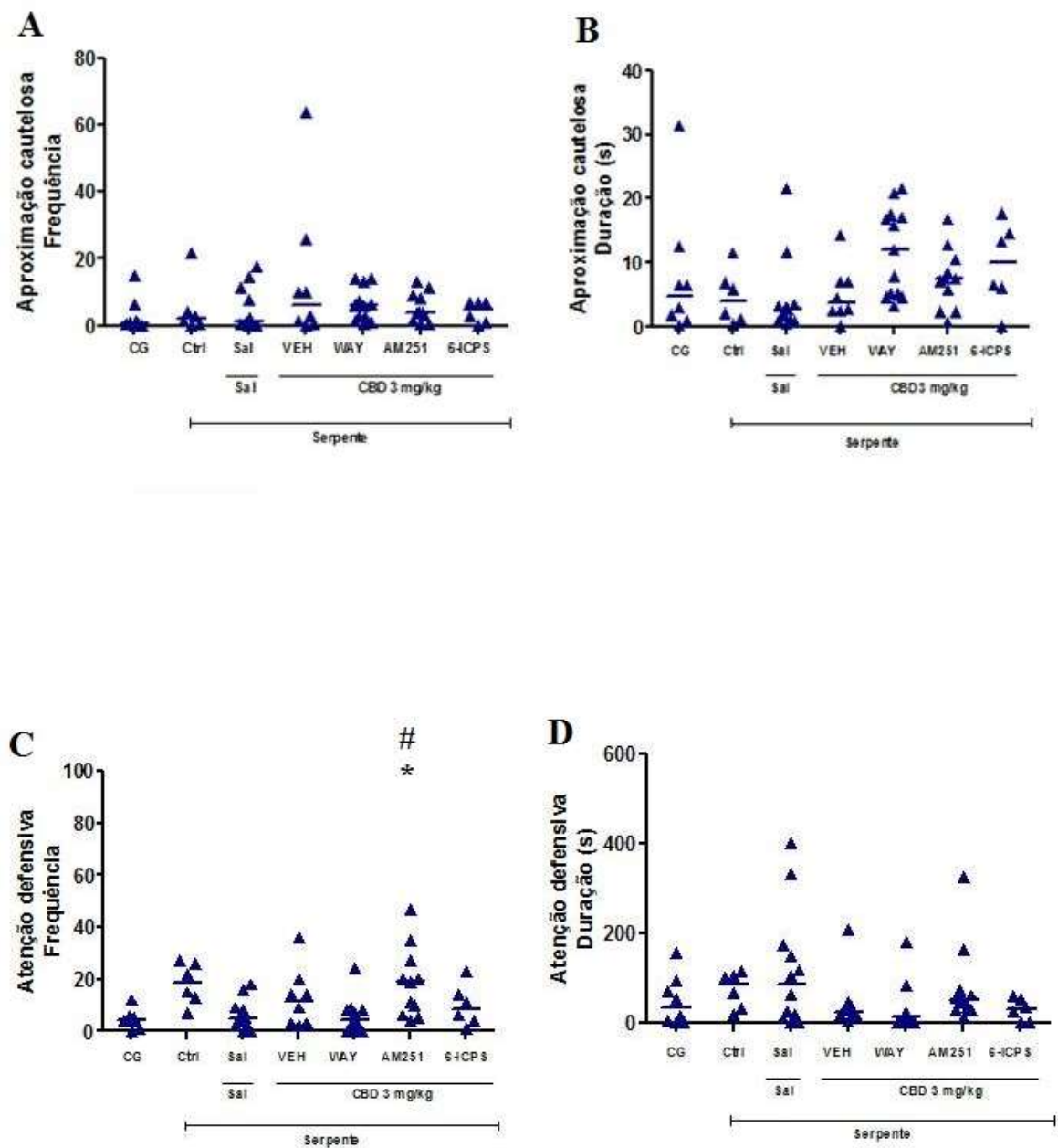
Os comportamentos induzidos pelo pré-tratamento do HVMdm com antagonistas seletivos caracterizaram-se por respostas de atenção defensiva, aproximação cautelosa, fuga orientada, interação com o predador, imobilidade defensiva, permanência na toca e frequência de cruzamentos. Respostas de levantamento e autolimpeza não foram observadas após os tratamentos realizados. Para análise mais rica destes comportamentos, os grupos tratados com veículo ou canabidiol foram comparados também com grupos controles adicionais, envolvendo ou não a presença de predador: um grupo Controle Geral (CG; animais não tratados e expostos à arena sem a presença de serpente), e seu respectivo Controle (Ctrl; animais não tratados e expostos à arena com serpente). Foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (KW) seguido de *post hoc* Dunn para a análise das respostas defensivas.

Com relação ao comportamento de aproximação cautelosa, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, seja no concernente à frequência (teste de KW;  $H = 4,91$ ;  $p > 0,05$ ; CG:  $3,171 \pm 1,840$ ; Ctrl:  $5,078 \pm 3,369$ ; SAL:  $4,809 \pm 1,843$ ; VEH:  $14,33 \pm 7,732$ ; WAY:  $5,913 \pm 1,401$ ; AM251:  $5,452 \pm 1,342$ ; 6-I-CPS:  $4,028 \pm 2,692$ ), seja no que se refere à duração ( $H = 13,2$ ;  $p > 0,05$ ; CG:  $7,811 \pm 3,647$ ; Ctrl:  $4,610 \pm 1,746$ ; SAL:  $4,465 \pm 1,768$ ; VEH:  $5,048 \pm 1,564$ ; WAY:  $11,72 \pm 1,887$ ; AM251:  $7,457 \pm 1,438$ ; 6-I-CPS:  $9,688 \pm 2,692$ ) desse comportamento, como mostrado nas Figuras 9 A e B. No entanto, uma tendência não significativa de diminuição da duração da interação entre a presa e o predador, causada pelo tratamento crônico com CBD, parece tender a ser revertida pelo pré-tratamento do HVMdm com cada um dos antagonistas de receptores 5-HT1A, CB1 e TRPV1.

No que se refere à atenção defensiva, de acordo com o teste de KW seguido de *post hoc* de Dunn, houve diferença estatística entre o grupo pré-

---

tratado com AM251, quando comparado ao grupo Sal (animais que receberam salina IP por 21 dias e pré-tratamento intradiencefálico com de Sal + DMSO) e WAY100635. Os animais do grupo AM251 apresentaram um aumento significativo na frequência desta resposta defensiva ( $H= 20,0$ ;  $p < 0,05$ ; AM251:  $18,55 \pm 4,088$ ; SAL:  $6,250 \pm 1,666$ ; WAY:  $5,308 \pm 1,841$ ). Nos demais grupos não foram observadas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ; CG:  $4,500 \pm 1,282$ ; Ctrl:  $18,33 \pm 3,242$ ; VEH:  $12,63 \pm 4,044$ ; 6-I-CPS:  $9,833 \pm 3,260$ ). Com relação à duração da atenção defensiva, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos analisados ( $H= 12,3$ ;  $p > 0,05$ ; CG:  $48,49 \pm 19,85$ ; Ctrl:  $72,62 \pm 16,81$ ; SAL:  $116,2 \pm 38,14$ ; VEH:  $46,87 \pm 23,63$ ; WAY:  $27,71 \pm 14,31$ ; AM251:  $79,72 \pm 27,34$ ; 6-I-CPS:  $28,99 \pm 9,997$ ). Esses dados foram mostrados nas Figuras 9 C e D. Curiosamente, a tendência não estatisticamente significativa de o tratamento crônico com CBD diminuir tanto a frequência, como a duração da atenção defensiva parece tender a ser revertida pelo pré-tratamento do HVMdm com AM251, o que sugere a potencial implicação do receptor CB1.

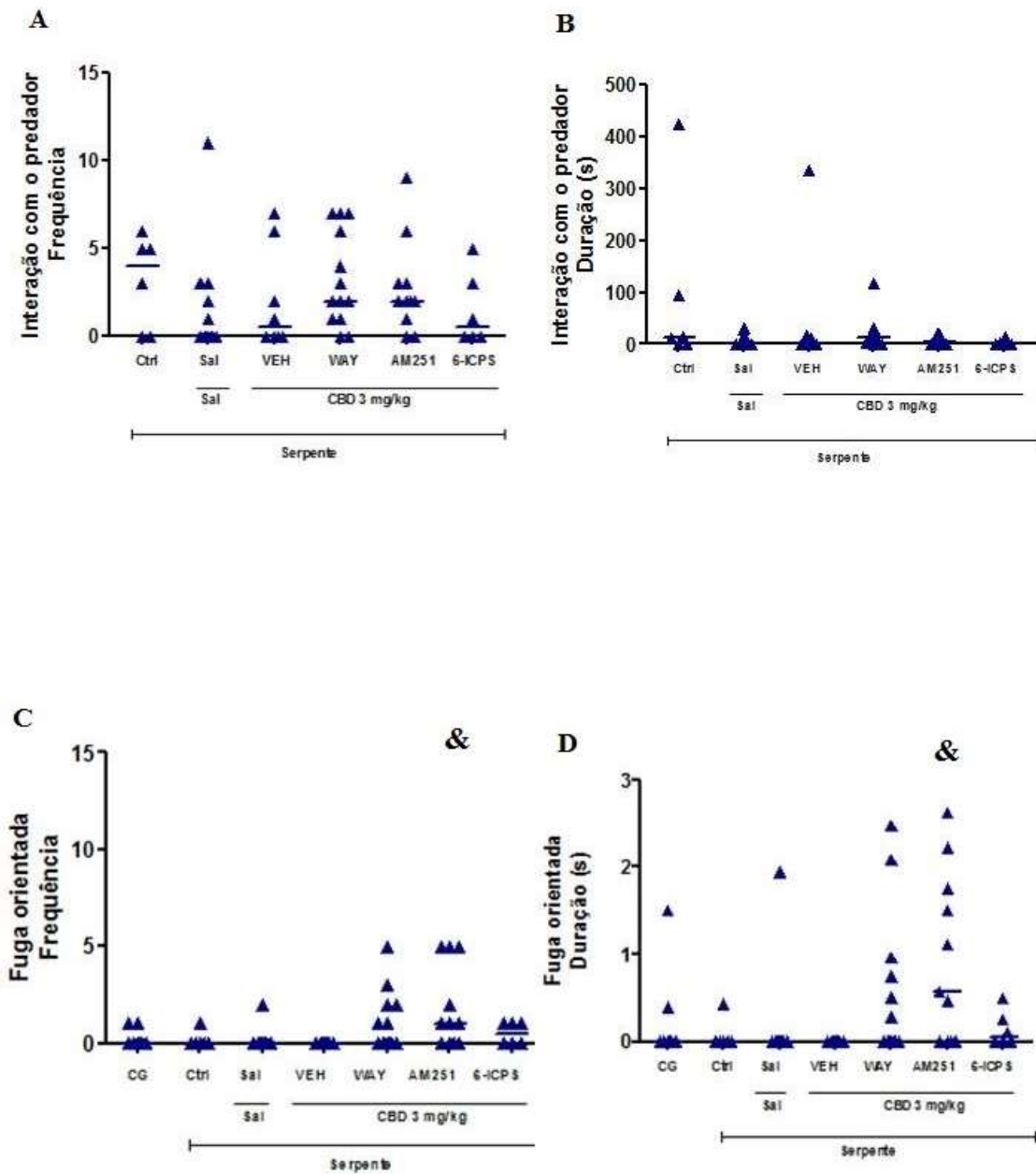


**Figura 9** - Efeito do pré-tratamento central com antagonistas seletivos para receptores 5-HT<sub>1A</sub>, CB<sub>1</sub> e TRPV<sub>1</sub>, ou microinjeção de seu veículo (salina+DMSO), sobre as respostas defensivas eliciadas a partir do confronto com o predador. Todas as administrações foram realizadas no HVMdm, após o tratamento sistêmico crônico com CBD (grupos *VEH*, *WAY*, *AM251* e *6-ICPS*; n = 8, 13, 11 e 6, respectivamente) ou com Salina (*Sal-Sal*; n = 12). Grupos *CG* e *Ctrl* representam controles do protocolo (*CG*: sem tratamento/sem predador; *Ctrl*: sem tratamento/com predador; n = 8 e 6, respectivamente). Os dados foram apresentados como *scatter dot-plot*, utilizando-se mediana. \* p < 0,05 em relação ao grupo *Sal+Sal+Serpente* e # p < 0,05 em relação ao grupo *WAY+CBD+Serpente*, segundo o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste *post hoc* de Dunn.

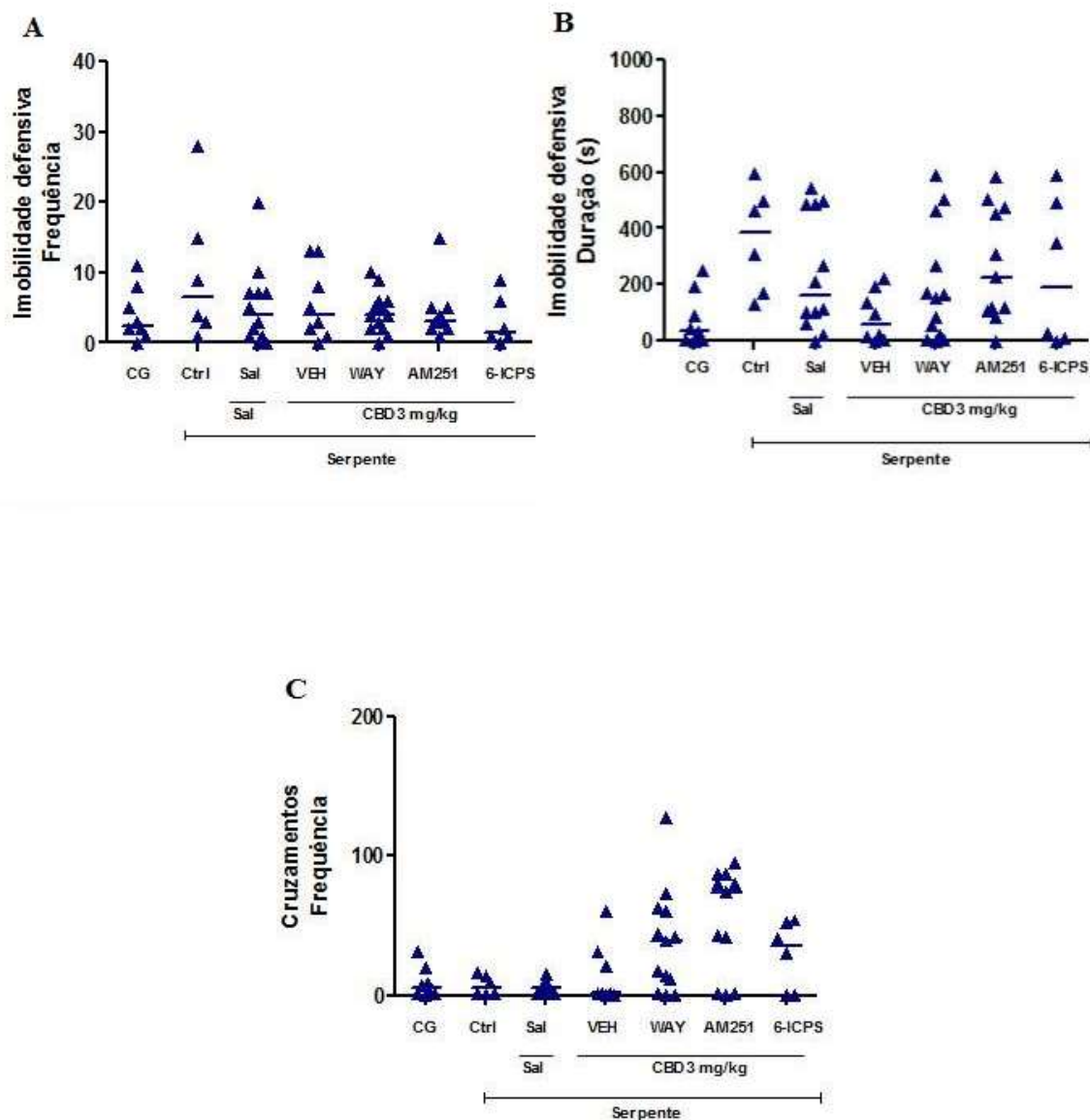


No que se refere à frequência (H= 6,12;  $p > 0,05$ ; Ctrl:  $3,167 \pm 1,078$ ; SAL:  $1,667 \pm 0,9156$ ; VEH:  $2,000 \pm 1,018$ ; WAY:  $3,231 \pm 0,7438$ ; AM251:  $2,727 \pm 0,7988$ ; 6-I-CPS:  $1,500 \pm 0,8466$ ) e duração (H= 6,60;  $p > 0,05$ ; Ctrl:  $90,86 \pm 68,31$ ; SAL:  $7,206 \pm 3,480$ ; VEH:  $45,64 \pm 41,52$ ; WAY:  $20,30 \pm 8,600$ ; AM251:  $7,676 \pm 2,616$ ; 6-I-CPS:  $3,615 \pm 2,525$ ) do comportamento de interação como predador (Figuras 10 A e B), não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos tratados e seus respectivos controles.

Em se tratando da resposta de fuga orientada, segundo o teste de KW seguido do teste *post hoc* de Dunn, os animais pré-tratados com AM251 apresentaram um aumento estatisticamente significativo da frequência deste comportamento (Figura 10C), quando comparado ao grupo VEH (H= 15,61;  $p < 0,05$ ; AM251:  $1,818 \pm 0,6441$ ; VEH:  $0,000 \pm 0,000$ ). Muito embora os animais pré-tratados com WAY tenham apresentado uma tendência a ter um aumento deste comportamento, isto não foi significativo, assim como nos demais grupos ( $p > 0,05$ ; CG:  $0,2500 \pm 0,1637$ ; Ctrl:  $0,16667 \pm 0,1667$ ; SAL:  $0,1667 \pm 0,1667$ ; WAY:  $1,077 \pm 0,4306$ ; 6-I-CPS:  $0,500 \pm 0,2236$ ). No que se refere à duração da fuga orientada (Figura 10D), a duração deste comportamento aumentou de forma significativa no grupo pré-tratado com AM251 quando comparado ao VEH (H= 15,51;  $p < 0,05$ ; AM251:  $0,9345 \pm 0,2927$ ; VEH:  $0,000 \pm 0,000$ ). Os animais pré-tratados com WAY, novamente, parecem ter uma tendência a ter um aumento deste comportamento; entretanto, isto não foi estatisticamente significativo, assim como nos demais grupos estudados ( $p > 0,05$ ; CG:  $0,2376 \pm 0,1878$ ; Ctrl:  $0,0718 \pm 0,0718$ ; SAL:  $0,1620 \pm 0,1620$ ; WAY:  $0,5437 \pm 0,2331$ ; 6-I-CPS:  $0,1433 \pm 0,0820$ ).



**Figura 10** - Efeito do pré-tratamento com WAY, AM251, 6-I-CPS, ou veículo (salina+DMSO), sobre as respostas defensivas eliciadas a partir do confronto com o predador. Os dados foram apresentados como *scatter dot-plot*, utilizando-se mediana. &  $p < 0,05$  em relação ao grupo VEH+CBD+Serpente, segundo o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste *post hoc* de Dunn.



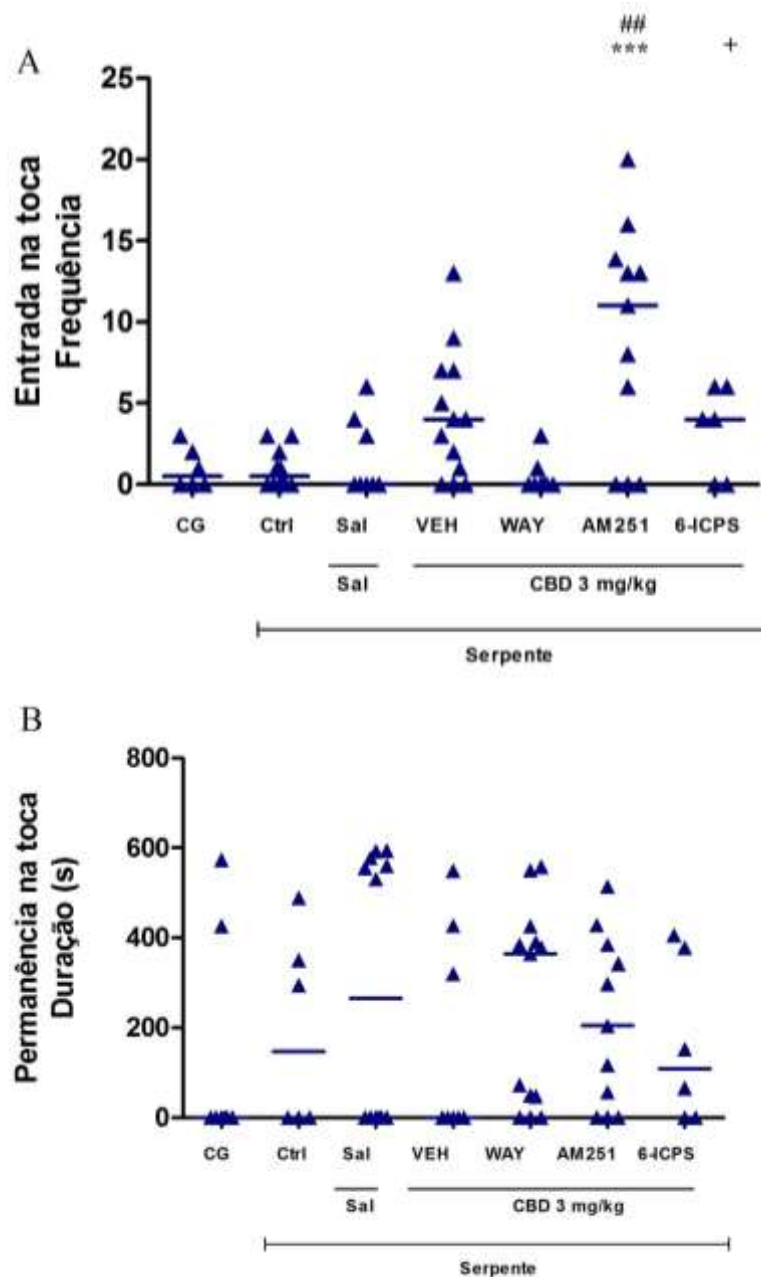
**Figura 11** - Efeito do pré-tratamento central com antagonistas seletivos para receptores 5-HT<sub>1A</sub>, CB<sub>1</sub> e TRPV<sub>1</sub>, ou microinjeção de seu controle (salina+DMSO), sobre as respostas defensivas eliciadas a partir do confronto com o predador. Todas as administrações foram realizadas no HVMdm, após o tratamento sistêmico crônico com CBD (grupos *VEH*, *WAY*, *AM251* e *6-I-CPS*;  $n = 8, 13, 11$  e  $6$ , respectivamente) ou com Salina (*Sal-Sal*;  $n = 12$ ). Grupos *CG* e *Ctrl* representam controles do protocolo (*CG*: sem tratamento/sem predador; *Ctrl*: sem tratamento/com predador;  $n = 8$  e  $6$ , respectivamente). Os dados foram apresentados como *scatter dot-plot*, utilizando-se mediana;  $p > 0.05$  em todos os casos, segundo o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste post hoc de Dunn.

Na Figura 11A está representado o gráfico de frequência de imobilidade defensiva. O teste de KW seguido de *post hoc* de Dunn demonstrou que não ocorreram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos analisados ( $H= 3,37$ ;  $p > 0,05$ ; CG:  $4,00 \pm 1,34$ ; Ctrl:  $10,0 \pm 4,15$ ; SAL:  $5,25 \pm 1,64$ ; VEH:  $5,63 \pm 1,83$ ; WAY:  $4,38 \pm 0,813$ ; AM251:  $4,18 \pm 1,14$ ; 6-I-CPS:  $3,17 \pm 1,45$ ). Na Figura 11B está representado o gráfico de duração de imobilidade defensiva. O teste de KW seguido de *post hoc* de Dunn indicou que, assim como não foram vistas diferenças significantes deste comportamento com relação à frequência, também não foram vistas diferenças importantes com relação à duração, quando comparados os grupos entre si ( $H= 11,6$ ;  $p > 0,05$ ; CG:  $75,6 \pm 33,7$ ; Ctrl:  $361 \pm 76,7$ ; SAL:  $242 \pm 59,9$ ; VEH:  $85,1 \pm 31,6$ ; WAY:  $191 \pm 57,0$ ; AM251:  $271 \pm 61,1$ ; 6-I-CPS:  $244 \pm 109$ ). Na Figura 11C está representado o gráfico de frequência de cruzamentos. O teste de KW seguido de *post hoc* de Dunn demonstrou que não ocorreram diferenças significativas entre os grupos analisados ( $H= 10,85$ ;  $p > 0,05$ ; CG:  $9,375 \pm 3,937$ ; Ctrl:  $7,500 \pm 2,814$ ; SAL:  $6,000 \pm 1,261$ ; VEH:  $14,63 \pm 7,676$ ; WAY:  $37,92 \pm 10,20$ ; AM251:  $53,64 \pm 11,44$ ; 6-I-CPS:  $29,50 \pm 9,966$ ).

Na Figura 12A está representado o gráfico de duração de permanência na toca. O teste de KW seguido de *post hoc* de Dunn demonstrou que, para este parâmetro, não ocorreram diferenças estatisticamente importantes entre os grupos analisados ( $H= 4,182$ ;  $p > 0,05$ ; CG:  $0,5000 \pm 0,3980$ ; Ctrl:  $1,000 \pm 0,5164$ ; SAL:  $0,9167 \pm 0,3362$ ; VEH:  $1,625 \pm 0,8438$ ; WAY:  $4,231 \pm 1,093$ ; AM251:  $9,170 \pm 2,094$ ; 6-I-CPS:  $3,333 \pm 1,116$ ). Na Figura 12B está representado o gráfico de frequência de entrada na toca. O teste de KW seguido de *post hoc* de Dunn indicou que animais pré-tratados com AM251 apresentaram um aumento significativo do tempo em que permaneceram na toca, quando comparados aos animais pré-tratados com 6-ICPS ( $H= 18,3$ ;  $p < 0,05$ ; AM251:  $213,1 \pm 57,22$ ; 6-I-CPS:  $167,0 \pm 74,80$ ). O grupo que recebeu pré-tratamento com AM251 também foi estatisticamente diferente quando comparado ao grupo pré-tratado com WAY ( $p < 0,01$ ; AM251:  $213,1 \pm 57,22$ ; WAY:  $247,7 \pm 61,16$ ). Ademais, o teste indicou que, quando comparados com

---

os animais do grupo VEH (*VEH-CBD*) e Sal (*Sal-Sal*), tais diferenças foram ainda mais acentuadas ( $p < 0,001$ ; AM251:  $213,1 \pm 57,22$ ; VEH:  $162,1 \pm 82,0$ ; SAL:  $284,4 \pm 85,87$ ). Curiosamente, a tendência não estatisticamente significativa de diminuição do tempo de permanência na toca evocado por animais tratados cronicamente com CBD na dose de 3 mg/kg parece tender a ser revertida pelo pré-tratamento do HVMdm com cada um dos antagonistas seletivos de receptores 5-HT<sub>1A</sub>, CB<sub>1</sub> e TRPV<sub>1</sub>, como mostrado na Figura 12A.



**Figura 12** - Efeito do pré-tratamento central com antagonistas seletivos para receptores 5-HT<sub>1A</sub>, CB<sub>1</sub> e TRPV<sub>1</sub>, ou microinjeção de seu veículo (salina+DMSO), sobre as respostas defensivas eliciadas a partir do confronto com o predador. Todas as administrações foram realizadas no HVMdm, após o tratamento sistêmico crônico com CBD (grupos *VEH*, *WAY*, *AM251* e *6-I-CPS*; n = 8, 13, 11 e 6, respectivamente) ou com Salina (*Sal-Sal*; n = 12). Grupos *CG* e *Ctrl* representam controles do protocolo (*CG*: sem tratamento/sem predador; *Ctrl*: sem tratamento/com predador; n = 8 e 6, respectivamente). \*\*\* p < 0,001 em relação ao grupo *Sal+Sal+Serpente*, ## p < 0,01 em relação ao grupo *WAY+CBD+Serpente*, + p < 0,05 em relação ao *AM251+CBD+Serpente*, segundo o Teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste *post hoc* de Dunn.

## **5. DISCUSSÃO**

---

Os resultados do presente estudo indicam que tratamento crônico utilizando canabidiol (3mg/kg) por via intraperitoneal, no período de 21 dias, muito embora tenha apresentado uma tendência de redução não estatisticamente significativa da IT após 21 dias de tratamento crônico, e tenha também aparentemente atenuado o comportamento de imobilidade tônica em cobaias após o confronto com o predador, esse efeito só foi significativo em relação à resposta ao comportamento de IT da linha de base, mas não em relação ao respectivo grupo controle. Uma redução significativa da IT foi observada no grupo controle após 21 dias de tratamento, o que pode sugerir efeito intrínseco do fenômeno de habituação da cobaia ao experimentador.

A grande variabilidade observada nos episódio de IT pode ter influenciado ausência de significância estatística do tratamento, visto que os dados coletados no primeiro dia do protocolo experimental, em que os animais não haviam recebido ainda qualquer tratamento, apresentaram acentuadas disparidades entre os grupos, refletindo uma variação biológica expressiva.

A habituação do animal ao experimentador pode ter sido gradualmente estabelecida durante os 21 dias de manejo e administração de drogas e veículo, o que poderia ter sido evitado com o uso de cápsulas subcutâneas de liberação contínua de drogas. Ademais, as práticas de manejo constantemente aplicadas aos animais em gaiolas onde eles têm exposição contínua aos seres humanos e a outros animais de mesma espécie têm efeito importante na atenuação da resposta emocional ao longo da vida do animal (PRICE, 1999).

Em outros estudos, como o de Ronderburg & Koene (2007), foi observado que o efeito do grupo é um fator importante com relação ao sistema de alojamento e de manejo. Os resultados encontrados por Bilciket *al* (1998), que estudaram o efeito do tamanho do grupo sobre a IT em galinhas poedeiras (grupos de 15, 30, 60 e 120 aves), corroboram os presentes resultados. Foi demonstrado por aqueles autores que o tamanho do grupo afetou o nível de medo nos animais, tendo sido concluído que, muito embora a função da IT seja a redução da chance do animal ser morto por predadores, o ambiente social é um fator relevante que afeta o tempo em IT em aves domésticas. Questiona-se



então se, além da variabilidade na susceptibilidade da IT em cada animal, seria possível haver a interferência do fator grupo também em cobaias e se este fator estaria influenciando-as antes ainda da chegada dos animais do biotério de criação.

Além disso, Rocha (2016) constatou em seu estudo o efeito do contato humano sobre as respostas de IT em cobaias, comparando animais sem contato com seres humanos, com outros manuseados e amansados. Ele verificou que a manipulação ou amansamento por 10 dias não suprimiu a IT, mas aumentou a latência e diminuiu a duração da IT nas cobaias, sugerindo que as formas de interação humana, podem reduzir o medo do experimentador em cobaias. Seu trabalho demonstrou, ainda, que animais não amansados parecem aprender a não temer o experimentador devido ao convívio com animais amansados. Nesse sentido, pode-se inferir que os resultados da IT no presente estudo corroboram os resultados do autor supracitado. Possivelmente, o manuseio diário por 21 dias pelo mesmo experimentador para a aplicação IP das drogas utilizadas pode ter sido a causa de não termos encontrado diferenças estatisticamente significantes entre os tratamentos e, além disso, de ter ocorrido uma redução significativa na duração dos episódios de IT ao final do procedimento experimental no grupo controle. Apesar de constatada a eficácia do CBD em atenuar tal resposta defensiva evocada diante do predador, seu efeito total pode não ter sido verificado com maior clareza devido ao protocolo de tratamento crônico utilizado, que parece ter causado o amansamento nos animais, sejam eles do grupo tratado ou controle. Eventualmente, o efeito ansiolítico do canabidiol seria ainda mais significativo se não fosse a habituação ocorrida. Uma possibilidade para eventos futuros seria testarmos o efeito grupo e o efeito habituação, estudando-se o efeito do tratamento agudo com canabidiol em animais alojados individualmente, aos pares e em grupos de quatro cobaias e confrontados com o predador.

Não obstante, o modelo experimental adotado neste estudo nos permitiu avaliar, ainda, diversos comportamentos, tendo em vista que se trata de uma arena munida com toca, 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 os comportamentos de defesa, já que a presença da toca permite a ocorrência de comportamentos mais elaborados e em direção a possíveis rotas seguras de fuga.

Neste estudo, diversos comportamentos foram avaliados, tais como a atenção defensiva, aproximação cautelosa (avaliação de risco), a interação com o predador, a fuga orientada, a imobilidade defensiva, a permanência na toca e a frequência de cruzamentos do animal na arena poligonal utilizada.

Atualmente, os inibidores da recaptação da serotonina de longo prazo são o tratamento de primeira linha para o transtorno do pânico. No entanto, os perfis de efeitos colaterais comuns e interações medicamentosas podem induzir os pacientes a abandonarem o tratamento. O canabidiol possui propriedades ansiolíticas que têm sido sugeridas como uma alternativa para o tratamento de perturbações de ansiedade e, quando presente, parece ter efeito colateral mínimo.

De acordo com Blessing et al. (2015), 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. Entretanto, efeitos ansiolíticos quando administrado agudamente, ainda apresentam algumas discrepâncias entre espécies. Ainda de acordo com a autora, mais estudos são necessários para estabelecer a eficácia de CBD quando administrado na dosagem crônica. Ademais, há relativamente poucos estudos relevantes, com resultados mistos, incluindo tanto resultados ansiolíticos, quanto ansiogênicos. Os resultados verificados no presente estudo sugerem que o tratamento crônico com CBD (3mg/kg) por 21 dias, foi potencialmente eficaz em atenuar as respostas defensivas dos animais expostos a uma situação ameaçadora. Entretanto, precisaríamos aumentar a amostragem para diluir a variação biológica, ou utilizarmos outros meio de aplicação crônica de CBD.

Ao serem submetidos ao confronto com um de seus predadores naturais, os animais tratados com CBD apresentaram o comportamento de atenção defensiva significativamente reduzido, em sua duração e frequência, quando comparado às respostas de atenção defensiva de animais que receberam injeções de veículo. Assim também, ocorreu redução estatisticamente significante na frequência do comportamento de avaliação de risco (aproximação cautelosa). Diferente do efeito colateral de drogas panicolíticas clássicas, tais como a fluoxetina, os animais tratados com CBD não apresentaram sonolência (observação pessoal). Além disso, o caráter ansiolítico da droga na dose testada ficou bem demonstrado quando observamos que os animais tratados tiveram maior interação comportamental com o seu predador, aproximando-se com frequência significativamente maior, bem como permanecendo em contato com ele por tempo também significativamente maior.

É de comum conhecimento que a cobaia é uma espécie bastante susceptível a situações estressantes, e entram facilmente em “freezing”. Os dados obtidos nesse estudo mostraram que a duração da imobilidade defensiva foi reduzida significativamente em relação ao controle. Ademais, os animais tratados com CBD também tiveram a frequência da resposta de fuga orientada estatisticamente atenuada. Nenhum dos grupos experimentais apresentou diferenças significativas quanto ao tempo em entraram na toca ou em que permaneceram em seu interior. Parece ter ocorrido uma tendência de o animal tratado entrar mais vezes na toca, mas não permanecer muito tempo dentro dela, movimentando-se mais pela arena, ao contrário do grupo controle, ainda que esta diferença não tenha sido verificada estatisticamente. Essa reação comportamental refletiu-se também na frequência de cruzamentos dos animais: enquanto o controle parece ter apresentado uma tendência de andar menos pela arena, o grupo tratado parece ter se movimentado mais, o que pode ter resultado também na maior interação com o predador em relação ao controle, provavelmente por ação do efeito ansiolítico e panicolítico do canabidiol.

A partir desses dados prévios sobre o efeito do CBD administrado periféricamente, a nossa próxima pergunta foi sobre o papel dos receptores CB<sub>1</sub>, 5-HT<sub>1A</sub> e TRPV1 no efeito panicolítico do CBD nas respostas defensivas evocadas por cobaias em uma situação ameaçadora. Como visto, o CBD foi potencialmente eficaz em atenuar alguns dos comportamentos analisados quando o animal foi exposto ao predador, o que tende a sustentar a hipótese inicial de seu efeito ansiolítico/panicolítico. Os novos grupos foram tratados com CBD periféricamente, por 21 dias, e depois, pré-tratados no HVMdm com antagonistas específicos para estudo dos receptores supracitados.

No experimento II, foi visto que a microinjeção de AM251 (antagonista de receptores CB<sub>1</sub>; 100pmol) no HVMdm tendeu a reverter o potencial efeito panicolítico do tratamento sistêmico com CBD, sugerindo que um possível recrutamento de receptores canabinoides do tipo 1 do HVMdm pelo CBD, mais frequentemente descritos no sistema nervoso central, pode modular as respostas de pânico em situações ameaçadoras. Como descrito por Lisboa e Guimarães (2012), o pré-tratamento da substância cinzenta periaquedutal com AM251 aumentou, ao invés de diminuir ou não alterar, as reações de fuga induzidas por bicuculina. Não obstante, um trabalho prévio, realizado em nosso laboratório, mostrou um efeito antiaversivo do pré-tratamento do córtex pré-límbico com AM251 em diferentes doses (25, 100 ou 400pmol), o qual atenuou as respostas comportamentais defensivas elaboradas pelo hipotálamo dorsomedial e ventromedial (FREITAS et al. 2013). Já no HVMdm, dos Anjos-Garcia e colaboradores mostraram que o AM251 antagonizou o efeito panicolítico da administração de anandamida no HVMdm, no que se refere a comportamentos de defesa evocados pelo bloqueio de receptores GABAérgicos do tipo A no hipotálamo medial e potencializou a fuga não orientada induzida por bicuculina, efeito este que foi antagonizado com o pré-tratamento do HVMdm com 6-iodo-capsaicina (6-ICPS), antagonista de canais iônicos TRPV1 (DOS ANJOS-GARCIA et al. 2016), e os resultados do presente estudo tendem a corroborar parcialmente esses dados previamente publicados.

Outros estudos nos quais os animais receberam tratamento com antagonistas dos receptores CB1 demonstraram que esses animais exibiram perfil comportamental correlacionado com ansiogênese, tanto em modelos de caixa claro escuro (CCE) quanto no labirinto em cruz elevado (LCE) (AKINSHOLA et al., 1999; HALLER et al., 2004; RODGERS et al., 2005), além disso, dados da literatura mostraram que essa droga também desencadeia comportamentos do tipo ansiogênico em outros modelos animais (RODGERS et al., 2005; SINK et al., 2010). Em nosso trabalho, foi visto também que esse efeito não teve relação com uma possível alteração na atividade locomotora, uma vez que não foi vista diferença com relação ao controle.

A partir dos resultados obtidos com o AM251, pode-se inferir que os receptores CB1 desempenham papel relevante na modulação dos transtornos de ansiedade avaliados no nosso modelo experimental. É bem descrito na literatura que os receptores CB1 medeiam as reações promovidas por agonistas canabinoides (HOWLETT, 1995; HOWLETT et al., 2002). Nossos resultados, muito embora ainda não conclusivos apontam na direção do papel proposto dos receptores CB1 em mediar comportamentos tipo ansiolíticos promovidos por agonistas canabinoides (BORTOLATO et al., 2006; HALLER et al., 2004; MOREIRA et al., 2007; PATEL AND HILLARD, 2006).

Sabe-se que o receptor canabinoide tipo 1 (CB1) pode mediar efeitos bifásicos dose-dependentes de agonistas canabinoides sobre as respostas relacionadas com a ansiedade. Baixas doses desses agonistas induzem efeitos ansiolíticos, enquanto que altas doses são ineficazes ou ansiogênicas, e isso se deve provavelmente à ativação dos canais iônicos TRPV1. Foi visto que doses elevadas de 6-ICPS induziu efeitos ansiolíticos. Ademais, foi mostrado (RUBINO et al., 2008) que a capsazepina, um antagonista menos seletivo do que o 6-ICPS (APPENDINO et al., 2003), foi capaz de bloquear os efeitos ansiogênicos de uma dose elevada de metanandamida injetada no córtex pré-frontal medial. Nossos resultados mostraram que o pré-tratamento com 6-ICPS não reverteu o efeito ansiolítico do tratamento crônico com CBD, não tendo sido por isso, diferente de seu controle, e esse efeito não alterou a frequência

de cruzamentos dos animais.

O antagonista de receptores 5-HT<sub>1A</sub>, WAY100635, o qual seletivamente impede as respostas induzidas pela estimulação de ambos receptores 5-HT<sub>1A</sub> pós-sinápticos e somatodendríticos, bloqueia as propriedades ansiolíticas de agonistas serotoninérgicos (AHLENIUS et al., 1999; FLETCHER et al., 1996; FORSTER et al., 1995). Em nosso trabalho, foi mostrado que a microinjeção desse antagonista seletivo no HVM não antagonizou o efeito ansiolítico produzido pelo tratamento crônico prévio com canabidiol. Outros trabalhos que utilizaram o mesmo antagonista, porém em outros substratos neurais, como a substância cinzenta periaquedutal (SCP), também demonstraram que o WAY10635 reduziu os comportamentos de ansiedade, sem alterar a atividade locomotora (NUNES-DE-SOUZA, 2011). No presente trabalho, o WAY100635 não foi capaz de antagonizar o efeito antiaversivo do CBD, merecendo possivelmente uma investigação do efeito de outras doses desse antagonista serotoninérgico.

Muito embora nossos dados venham ao encontro de alguns estudos prévios e contribuam para melhor explicar o efeito do tratamento com canabidiol sobre as respostas comportamentais eliciadas a partir do confronto com o predador (TWARDOWSCHY et al., 2013), nossas expectativas não foram atingidas, e novos experimentos estão sendo planejados para aumentar o n de cada grupo experimental e utilizar outras doses de CBD e dos antagonistas. Além disso, visto o potencial efeito ansiolítico do CBD cronicamente administrado sobre as respostas de defesa evocadas por cobaias frente a um de seus predadores naturais, os dados sugerem que nem o antagonismo dos receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub>, nem dos receptores vaniloides TRPV1, abole o efeito ansiolítico do CBD nesses animais. Uma investigação mais aprofundada no que se refere a uma possível curva dose-resposta desses antagonistas em cobaias poderia definitivamente contribuir para melhor entendimento do recrutamento de cada um desses receptores na ação ansiolítica/panicolítica do CBD.

Abordagens neurofarmacológicas como aquelas contempladas no presente trabalho podem contribuir significativamente para melhor elucidar o mecanismo pelo qual o canabidiol pode vir a atuar para promover a atenuação de respostas defensivas em situações panicogênicas. Ressalta-se, ainda, a importância desse tipo de abordagem farmacológica, por haver ainda poucos trabalhos que utilizem o canabidiol de forma crônica, e esperamos com isso que mais investigações sejam realizadas para entendermos com maior profundidade o mecanismo de ação pelo qual ele exerce seus efeitos ansiolíticos, e seu potencial efeito terapêutico em desordens psiquiátricas.

## **6. CONCLUSÕES**

---



- 
- O canabidiol exerce efeito ansiolítico e panicolítico em cobaias, tratadas cronicamente, por 21 dias, por via intraperitoneal.
  - Com relação à imobilidade tônica, foi demonstrado que o tempo de tratamento é um fator importante dentro de cada grupo, sugerindo que a atenuação desse comportamento se mostra efetiva a longo prazo.
  - Não ficou claro o papel de receptores CB1, 5-HT<sub>1A</sub> e de canais iônicos TRPV1 da divisão dorsomedial do hipotálamo ventromedial na ação antiaversiva do tratamento crônico com canabidiol.
  - O modelo de confronto entre roedores serpentes na arena poligonal munida com toca artificial, muito embora seja uma excelente ferramenta neuropsicobiológica para o estudo do efeito de drogas com potencial ação panicolítica em *Rattus norvegicus*, *Mesocricetus auratus*, *Meriones unguiculatus* e *Mus musculus*, não se mostrou uma boa ferramenta para o estudo do comportamento de defesa em *Cavia porcellus*.

## **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

---

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 plus maze test". *Exp Brain Res* 129: 260-66, 1999.

AHLENIUS, S., HENRIKSSON, I., MAGNUSSON, O., SALMI, P. "In vivo intrinsic efficacy of the 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonists NAD-299, WAY 100635 and (S)-(-)-UH-301 at rat brain monoamine receptors". *Eur Neuropsychopharm* 9: 15-16, 1999.

AKINSHOLA, B.E. CHAKRABARTI, A., ONAIVI, E.S. "In-vitro and in-vivo action of cannabinoids". *Neurochem Res* 24, 1233-1240, 1999.

ALMADA, R.C., RONCON, C.M., ELIAS-FILHO, D.H., COIMBRA, N.C. "Endocannabinoid signaling mechanisms in the substantia nigra pars reticulata modulate GABAergic nigrothalamic pathways in mice threatened by urutu-cruzeiro venomous pi viper". *Neuroscience* 10: 303-503-14, 2015.

ALMADA, R.C., COIMBRA, N.C. "Recruitment of striatonigral disinhibitory and nigrothalamic inhibitory GABAergic pathways during the organization of defensive behaviour by mice in a dangerous environment with the venomous snake *Bothrops alternatus* (Reptilia, Viperidae)". *Synapse* 69 (6): 299-313, 2015.

APPEL, N.M., MITCHELL, W.M., GARLICK, R.K., GLENNON, R.A., TEITELER, M., de SOUZA, E.B. "Autoradiographic characterization of (F)-1-(2,5-dimethoxy-4-[125I]iodophenyl)-2-aminopropane ([125I]DOI) binding to 5-HT<sub>2</sub> and 5-HT<sub>1c</sub> receptors in rat brain". *J Pharmacol Exp Ther* 255: 843-57, 1990.

APPENDINO, G., HARRISON, S., DE PETROCELLIS, L., DADDARIO, N., BIANCHI, F., MORIELLO ANIELLO, S., TREVISANI, M., BENVENUTI, F., GEPPETTI, P., & DI MARZO, V. "Halogenation of a capsaicin analogue leads to novel vanilloid TRPV1 receptor antagonists". *Br J Pharmacol* 139: 1417-1424, 2003.

ARAÚJO, A.C., NETO, L.F. "A nova classificação Americana para os Transtornos Mentais – o DSM-5". *Rev Bras ter comport cogn* 16, 2014.13 (5), 481-504, 1999.

---

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.

BAKER, D., PRYCE, G., DAVIES, W.L. HILEY, C.R. "In silico patent searching reveals a new cannabinoid receptor". *Trends Pharmacol Sci.* 27:1-4, 2006.

BAYEWITCH, M., RHEE, M.H., AVIDOR-REISS, T., BREUER, A., MECHOULAM, R., VOGEL, Z. "(-)-Delta9-tetrahydrocannabinol antagonizes the peripheral cannabinoid receptor-mediated inhibition of adenylyl cyclase". *Journal of Biological Chemistry* 271, 992-5, 1996.

BIAGIONI, A.F., de OLIVEIRA, R.C., de Oliveira, R., da SILVA, J.A., dos ANJOS-GARCIA, T., RONCON, C.M., CORRADO, A.P., ZANGROSSI, H. Jr., COIMBRA, N.C. "5-Hydroxytryptamine 1A receptors in the dorsomedial hypothalamus connected to dorsal raphe nucleus inputs modulate defensive behaviours and mediate innate fear-induced antinociception". *Eur Neuropsychopharmacol* 26 (3): 532-45, 2016.

BILCIK, B., KEELING, L.J., NEWBERRY, R.C. "The effect of group size on tonic immobility in laying hens". *Behav Proc* 43: 53-59, 1998.

BISOGNO, T., MAURELLI, S., MELCK, D., DE PETROCELLIS, L., DI MARZO, V. "Biosynthesis, uptake, and degradation of anandamide and palmitoylethanolamide in leukocytes". *Journal of Biological Chemistry* 272, 3315-23, 1997.

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

BLANCHARD, D.C., GRIEBEL, G., BLANCHARD, R..J. "The mouse defense test battery: pharmacological and behavioural assays for anxiety and panic". *Eur J Pharmacol* 463: 97-116, 2003.

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

---

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

BLESSING, E.M., STEENKAMP, M.M., MANZANARES, J., MARMAR, C.R. "Cannabidiol as a Potential Treatment for Anxiety Disorders". *Neurotherapeutics* 12 (4): 825-36, 2015.

BRANDÃO, M.L., ANSELONI, V.Z., PANDOSSIO, J.E., DE ARAUJO, J.E., CASTILHO, V.M. "Neurochemical mechanisms of the defensive behaviour in the dorsal midbrain". *Neurosci Biobehav Rev* 23: 863-75, 1999.

BRANDÃO, M.L., AGUIAR, J.C. & GRAEFF, F.G. – " GABA mediation of the antiaversive action of the minor tranquilizers". *Pharmacol Biochem Behav* 13: 397-402, 1982.

BRANDÃO, M.L., DiSCALA, G., BOUCHET, M.J., SCHMITTH, P. "Escape behaviour produced by the blockade of glutamic acid decarboxylase (GAD) in mesencephalic central gray or medial hypothalamus". *Pharmacol Biochem Behav* 24: 497-501, 1986.

BRANDÃO, M.L., VIANNA, D.M., MASSON, S., SANTOS, J. "Organização neural de diferentes tipos de medo e suas implicações na ansiedade". *Rev Bras Psiquiatr* 25 (Supl II): 36-41, 2003.

BRAUD, W.G., GINSBURG, H.J. "Effect of administration of adrenalin on immobility reaction in domestic fowl". *J Comp Physiol Psychol* 83 (1): 124-127, 1973.

BORTOLATO, M., CAMPOLONGO, P., MANGIERI, R.A., SCARTTONI, M.L., TREZZA, V., LA RANA, G., RUSSO, R., CALIGNANO, A., GESSA, G.L., et al. "Anxiolytic-like properties of the anandamide transport inhibitor AM404". *Neuropsychopharmacology* 31, 2652-2659, 2006.

CANTERAS, N.S., CHIAVEGATTO, S. "Severe reduction of rat defensive behaviour to a predator by discrete hypothalamic chemical lesions". *Brain Res Bull* 44(3): 297-305, 1997.

---

CANTERAS, N.S. "The medial hypothalamic defensive system: hodological organization and functional implications". *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 71: 481-91, 2002.

CARLTON, P.L. "Brain-acetylcholine and inhibition reinforcement and Behavior". *New York: Academic Press* 1969, p. 238-287.

CARDOSO, S.H., COIMBRA, N.C. & BRANDÃO, M.L. "Defensive reactions evoked by activation of NMDA receptors in distinct sites of the inferior colliculus". *Behav Brain Res* 63: 17-24, 1994.

CRIPPA, J.A.S., ZUARDI, A.W., HALLAK, J.E.C. [Therapeutical use of the cannabinoids in psychiatry]. *Rev. Bras. Psiquiatr.* 2010;32(Suppl 1):S56-66.

COIMBRA, N.C. & BRANDÃO, M.L. "-Effects of 5 HT2 receptors blockade on ferar-induced analgesia elicited by electrical stimulation of the deep layers of the superior colliculus and dorsal periaqueductal gray". *Behav Brain Res* 87: 97-103, 1997.

COIMBRA, N.C. & BRANDÃO, M.L. "GABAergic nigro-collicular pathways modulate the defensive behaviour elicited by midbrain tectum stimulation". *Behav Brain Res* 59: 131-139, 1993.

COIMBRA, N.C., TOMAZ, C. & BRANDÃO, M.L. "- Evidence for the involvement of serotonin in the antinociception induced by electrical or chemical stimulation of the mesencephalic tectum". *Behav Brain* 50: 77-83, 1992.

da SILVA, L.F., MENESCAL-DE-OLIVEIRA, L. "Cholinergic modulation of tonic immobility and nociception in the NRM of guinea pig". *Physiol Behav* 87 (4): 821-7, 2006.

DA SILVA, L.F.S., MENESCAL-DE-OLIVEIRA, L. "Role of opioidergic and GABAergic neurotransmission of the nucleus raphe magnus in the modulation of tonic immobility in guinea pigs". *Brain Research Bulletin* 72: 25-31, 2007.

DEVANE, W.A., HANUS, L., BREUER, A., PERTWEE, R.G., STEVENSON, L.A., GRIFFIN, G., GIBSON, D., MANDELBAUM, A., ETINGER, A., ETINGER,

---

A., MECHOULAM, R. "Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor". *Science* 258, 1946-9, 1992.

DEVANE, W. A., HANUS, L., BREUER, A., PERTWEE, R. G., STEVENSON, L. A., GRIFFIN, G., GIBSON, D., MANDELBAUM, A., ETINGER, A., MECHOULAM R. "Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor." *Science*. 1992;258(5090):1946-9.

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

de FREITAS, R.L., C.J. SALGADO-ROHNER, et al. "NMDA and AMPA/Kainate Glutamatergic Receptors in the Prelimbic Medial Prefrontal Cortex Modulate the Elaborated Defensive Behaviour and Innate Fear-Induced Antinociception Elicited by GABAA Receptor Blockade in the Medial Hypothalamus". *Cereb Cortex* 213b.

DI MARZO, V., MELCK, D., BISOGNO, T., DE PETROCELLIS, L. "Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action". *Trends in Neurosciences* 21, 521-528, 1998.

DI MARZO, V., DE PETROCELLIS, L., SUGIURA, T., WAKU, K. "Potential biosynthetic connections between the two cannabimimetic eicosanoids, anandamide and 2-arachidonoyl-glycerol, in mouse neuroblastoma cells". *Biochem Biophys Res Commun*, 227, 281-8, 1996.

DI MARZO, V., FONTANA, A., CADAS, H., SCHINELLI, S., CIMINO, G., SCHWARTZ, J.C., PIOMELLI, D. "Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons". *Nature* 372, 686-91, 1994.

Dos ANJOS-GARCIA, T., ULLAH, F., FALCONI-SOBRINHO, L.L., COIMBRA, N.C. "CB1 cannabinoid receptor-mediated anandamide signalling reduces the defensive behaviour evoked through GABAA receptor blockade in the dorsomedial division of the ventromedial hypothalamus". *Neuropharmacology* 2016.

---

EDMUNDS, M. "Defence in animals: a survey of anti-predator defences". *New York: Longman*, 1974.

FANSELOW, M.S. "Conditional and unconditional components of post-shock freezing". *J Biol Sci* 15: 177-182, 1980.

FARABOLINI, F., CARLI, G., LUPO, C. "Changes in brain serotonin and 5-hydroxyindolacetic acid levels in the rabbit following tonic immobility". *Physiol Behav* 32 (2): 205-209, 1984.

FAVARONI-MENDES, L.A., MENESCAL-DE-OLIVEIRA, L. "Role of cholinergic, opioidergic and GABAergic neurotransmission of the dorsal hippocampus in the modulation of nociception in guinea pigs". *Life Sciences* 83: 644-650, 2008.

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

FLETCHER, J.M., PAGE, J.B., FRANCIS, D.J., COPELAND, K., NAUS, M.J., DAVIS, C.M., MORRIS, R., KRAUSKOPF, D., SATZ, P. "Cognitive correlates of long-term Cannabis use in Costa Rica men". *Arch Gen Psychiatric* 53: 1051-1057, 1996.

FORSTER, E.A., CLIFFE, I.A., BILL, D.J., DOVER, G.M., JONES, D., REILLY, Y., FLETCHER, A. "A pharmacological profile of the selective silent 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonist, WAY-100635". *Eur J Pharmacol* 281(1): 81-8, 1995.

FRANCIS, D.D., CALDJI, C., CHAMPAGNE, F., PLOTSKY, P.M., MEANEY, M.J. "The role of corticotropin-releasing factor-norepinephrine systems in mediating the effects of early experience on the development of behavioral and endocrine responses to stress". *Biol Psychiatric* 46: 1153-66, 1999.

FUNADA, M., HARA, C. "Differential effects of psychological stress in activation of the 5-hydroxytryptamine – and dopamine – containing neurons in the brain of freely moving rats". *Brain Res* 901: 247-51, 2001.

GALLUP, G.G.Jr. "Tonic immobility role of fear and predation". *Psychol Rec* 27: 41-61, 1974.



---

GALLUP, G.G., Jr., ROSEN, T.S., BROWN, C.W. "Effect of conditioned fear on tonic immobility in domestic chickens". *J Comp Physiol Psychol* 78 (1): 22-25, 1972.

GILMAN, T.T., MARCUE, F.L., MOORE, A.U. "Animal hypnosis: a study in the induction of tonic immobility in chickens". *J Comp Physiol Psychol* 43 (2): 99-111, 1950.

GUIMARÃES-COSTA, R., GUIMARÃES-COSTA, M.B., PIPPA-GADIOLI, L., WELTSON, A., UBIALI, W.A., PASCHOALIN-MAURIN, T., et al. "Innate defensive 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". *Neurosci Meth* 165: 25-37, 2007.

GRAEFF, F.G. "Ansiedade experimental humana". *Rev Psiq Clín* 34(5), 251-253, 2007.

GRAEFF, F.G., ZANGROSSI, H. "Animal models of anxiety disorders". In: D'HAENEN, H., DEN BOER, J.A., WESTENBERG, H., WILLNER, P. (eds.). *Textbook of biological psychiatry*. John Wiley & Sons, London, 879-893, 2002.

GRAEFF, F.G. "Brain defense systems and anxiety", In: *Handbook of Anxiety*. M. Roth, M., G.D. Burrows, G.D., Noyes, R. vol. 3, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 307-357, 1990.

GRAEFF, F.G., GUIMARÃES, F.S. "Fundamentos da Psicofarmacologia". ATHENEU, 2012.

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

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 Psychiatric* 20: 185-205, 1996.

---

HALLER, J., VARGA, B., LEDENT, C., FREUND, T.F. "CB1 cannabinoid receptors mediate anxiolytic effects: convergent genetic and pharmacological evidence with CB1-specific agents". *Behav Pharmacol* 15, 299-304, 2004.

HEIM, C., NEMEROFF, C.B. "The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: preclinical and clinical studies". *A Journal of Psychiatric Neuroscience and Therapeutics* 49: 1023-1039, 2001.

HENNING, C.W. "Biphasic effects of serotonin on tonic immobility in domestic fowl". *Pharmacol Biochem Behav* 12: 519-523, 1980.

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". *Proceedings of the National Academy of Science USA* 87, 1932-6, 1990.

HERKENHAM, M., LYNN, A.B., JOHNSON, M.R., MELVIN, L.S., de COSTA, B.R., RICE, K.C. "Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study". *Journal of Neuroscience* 11, 563-83, 1991.

HERKENHAM, M. "Characterization and localization of cannabinoid receptors in brain: an *in vivo* technique using slide-mounted tissue sections". *Natl Inst Drug Abuse Res Monogr Ser*, in press. 1991.

HOAGLAND, H. "Quantitative Aspects of Tonic Immobility in Vertebrates". *Proc Natl Acad Sci USA* 12 912): 838-843, 1927.

HOFFMANN, A., MENESCAL-DE-OLIVEIRA, L. "Electrical activity of the toad telencephalon during tonic immobility (animal hypnosis)". *Braz J Med Biol Res* 21 (1): 141-145, 1988.

HOFFMANN, A., MENESCAL-DE-OLIVEIRA, L. "Functional characteristics (EEG) of the thalamo-telencephalic projections of toads". *Braz J Med Biol Res* 22 (12): 1515-1518, 1989.

HOWLETT, A.C., JOHNSON, M.R., MELVIN, L.S., MILNE, G.M. "Nonclassical cannabinoid analgetics inhibit adenylate cyclase: development of a cannabinoid receptor model". *Molecular Pharmacology* 33, 297-302, 1988.

---

HOWLETT, A.C. "Pharmacology of cannabinoid receptors". *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 35, 607-634, 1995.

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., et al. "International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors". *Pharmacol Rev* 54, 161-202, 2002.

ISAHC, E.J., JIANG, L., LAKE, K.D., VARGA, K., ABOOD, M.E., KUNOS, G. "Inhibition of exocytic noradrenaline release by presynaptic cannabinoid CB1 receptors on peripheral sympathetic nerves". *British Journal of Pharmacology* 118, 2023-8, 1996.

KATHMANN, M., BAUER, U., SCHLICKER, E., GÖTHERT, M. "Cannabinoid CB1 receptor-mediated inhibition of NMDA- and kainate-stimulated noradrenaline and dopamine release in the brain". *Naunyn Schmiedebergs's Archives Pharmacology* 359, 466-70, 1999.

KATONA, I., SPERLAGH, B., MAGLOCZKY, Z., SANTHA, E., CZIRJÁK, S., MACKIE, K., VIZI, S., FREUND, T.F. "GABAergic interneurons are the targets of cannabinoid actions in the human hippocampus". *Neuroscience* 100, 797-804, 2000.

KATONA, I., SPERLÁGH, B., SÍK, A., KÄFALVI, A., VIZI, E.S., MACKIE, K., FREUND, T.F. "Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons". *Journal of Neuroscience* 19, 4544-58, 1999.

LAMPREA, M.R., CARDENAS, F.P., VIANNA, D.M., CASTILHO, V.M., CRUZ-MORALES, S.E., BRANDÃO, M.L. "The distribution of fos immunoreactivity in rat brain following freezing and escape responses elicited by electrical stimulation of the inferior colliculus". *Brain Res* 950: 186-194, 2002.

LEITE-PANISSI, C.R., COIMBRA, N.C. & MENESCAL-DE-OLIVEIRA, L. "The cholinergic stimulation of the central amygdala modifying the tonic immobility response and antinociception in guinea pigs depends on the ventrolateral periaqueductal gray". *Brain Res Bull* 60: 167-178, 2003.

---

LEITE-PANISSI, C.R., 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.

LEVENSON, R.W. "The intrapersonal functions of emotion". *Cognition and Emotion* for endogenous cannabinoid signaling". *J Pharmacol Exp Ther* 318, 304-311, 2006.

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

MARTIN, B.R., MECHOULAM R., RAZDAN R.K. "Discovery and characterization of endogenous cannabinoids. *Life Sci.* 1999; 65(6-7):573-95.

MATSUDA, L.A., LOLAIT, S.J., BROWNSTEIN, M.J., YOUNG, A.C., BONNER, T.I. "Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA". *Nature* 346, 561-4, 1990.

McGRAW, C.P. & KLEMM, W.R. "Mechanisms of the immobility reflex ('animal hypnosis'): neocortical inhibition in rats". *Communications on Behav Biol* 3: 53-59, 1969.

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.. "Marihuana chemistry". *Science*, 1970;168(936):1159-66.

MECHOULAM, R., BEN-SHABAT, S., HANUS, L., LIGUMSKY, M., KAMINSKI, N.E., SCHATZ, A.R., GOPHER, A., ALMOG, S., MARTIN, B.R., COMPTON, D.R. "Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors". *Biochemical Pharmacology* 50, 83-90, 1995.

---

MENESCAL-DE-OLIVEIRA, L., HOFFMAN, A. "The parabrachial region as a possible region modulating simultaneously pain and tonic immobility". *Behav Brain Res* 56 (2): 127-132, 1990.

MILANI, H., GRAEFF, F.G. "GABA-benzodiazepine modulation of a version in the medial hypothalamus of the rat". *Pharmacol Biochem Behav* 8: 21-27, 1987.

MONASSI, C.R., LEITE-PANISSI, C.R., MENESCAL-DE-OLIVEIRA, L. "Ventrolateral periaqueductal gray matter and the control of tonic immobility". *Brain Res Bull* 50 (3): 201-208, 1999.

MONASSI, C.R., LEITE-PANISSI, C.R., MENESCAL-DE-OLIVEIRA, L. "Involvement of the cholinergic system and periaqueductal gray matter in the modulation of tonic immobility in the guinea pig". *Physiol Behav* 62 (1): 53-59, 1997.

MOREIRA, F.A., AGUIAR, D.C., CAMPOS, A.C., LISBOA, S.F., TERZIAN, A.L., RESSTR, L.B. and GUIMARAES, F.S. "Antiaversive effects of cannabinoids: is the periaqueductal gray involved?". *Neural Plast* 625469, 2009.

MUNRO, S., THOMAS, K.L., ABU-SHAAR, M. "Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids". *Nature* 365, 61-5, 1993.

NETTO, S.M., SILVEIRA, R., COIMBRA, N.C., JOCA, S.R.L., GUIMARÃES, F.S. "Anxiogenic effect of median raphe nucleus lesion in stressed rats". *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 26: 1135-41, 2002.

NUNES-DE-SOUZA, V. "Bloqueio dos receptores 5HT2 da substância cinzenta periaqueductal suprime o efeito ansiolítico resultante do antagonismo dos receptores 5HT1A do núcleo mediano da rafe em camundongos". 2011. 77f. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) – Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas UFSCar/UNESP, São Carlos.

NUTT, D.J., GEORGE, D.T. "Serotonin and Anxiety". In: BURROW, G.D., ROTH, M., NOYES, JR., R. (Ed.). *Handbook of Anxiety*. Vol. 3: *The Neurobiology of Anxiety*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1990.

---

OLIVEIRA, L., HOFFMAN, A. & MENESCAL-DE-OLIVEIRA, L. "Participation of the medial and anterior hypothalamus in the modulation of tonic locomotion in guinea pigs". *Physiol Behav* 62 (5): 1171-1178, 1997.

ONAIVI, E.S., ISHIGURO, H., GONG, J.P., PATEL, S., PERCHUK, A., MEOZZI, P.A., MORA, Z., TAGLIAFERRO, P., GARDNER, E., BRUSCO, A., AKINSHOLA, B.E., LIU, Q.R., HOPE, B., IWASAKI, S., ARINAMI, T., TEASENFITZ, L., UHL, G.R. "Discovery of the presence and functional expression of cannabinoid CB2 receptors in brain". *Annals of the New York Academy of Science* 1074, 514-36, 2006.

OWENS, M.J., NEMEROFF, C.B. "Physiology and pharmacology of corticotropin-releasing factor". *Pharmacol Rev* 43: 425-473, 1991.

PACAK, K., PALKOVITS, M. "Stressor specific of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders". *Endocr Rev* 22: 502-548, 2001.

PASCHOALIN-MAURIN, T., COIMBRA, N.C. "Acute paroxetine or alprazolam attenuate defensive responses of hamsters confronted with venomous coral snake".

PATEL, S., and 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: 304-11, 2006.

PIOMELLI, D. "The molecular logic of endocannabinoid signaling". *Nat Rev Neurosci* 4, 873-84, 2003.

PORTER, R.J., GALLAGHER, P., WATSON, S., YOUNG, A.H. "Corticosteroid-serotonin interactions in depression: a review of the human evidence". *Psychopharmacology (Berl)* 173: 1-17, 2004.

PRESTRUDE, A.M., JOHNSTONE, S.M. "Effect of skin surface temperature on localization error and two-point threshold". *TIT J Life Sci* 7(3-4): 59-64, 1977.

PRICE, E.O. "Behavioral development in animals undergoing domestication". *Applied Animal Behaviour Science* 65: 254-271, 1999.

---

RATNER, C.S. "Comparative aspects of hypnosis". *Handbook of Clinical and Experimental Hypnosis* 550-587, 1967.

RATNER, C.S. & THOMPSON, R.W. "Immobility reactions (fear) of domestic fowl as a functional of age and prior experience". *Anim Behav* 8: 186-191, 1960.

RHEE, M.H., VOGEL, Z., BARG, J., BAYEWITCH, M., LEVY, R., HANUS, L., BREUER, A., MECOULAM, R.. "Cannabinol derivates: binding to cannabinoid receptors and inhibition of adenylylcyclase". *Journal of Medicinal Chemistry* 40, 3228-33, 1997.

ROCHA, A.D.L. "Efeito do contato humano e da aprendizagem social intra-específica na imobilidade tônica em cobaias (*Cavia porcellus*)". 2016. 130 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) –Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Areia, PB. 2016.

RODGERS, R.J., EVANS, P.M. MURPHY, A. "Anxiogenic profile of AM-251, a selective cannabinoid CB1 receptor antagonist, in plus-maze-naïve and plus-maze-experienced mice". *Behav Pharmacol* 16, 405-413, 2005.

RODENBURG, B. & KOENE, P. "The impact of group size on damaging behaviours, aggression, fear and stress in farm animals". *Applied Animal Behaviour Science* 103 (3): 205-214, 2007.

ROGERS, R.J., and RANDALL, J.I. "Defenseive analgesia in rats and mice". *Psychol Rec* 37: 335-347, 1987.

ROSS, R.A. "Anandamide and vanilloid TRPV1 receptors". *Br J Pharmacol* 140, 790-801, 2003.

RUBINO, T., GUIDALI, C., VIGANO, D., REALINI, N., VALENTI, M., MASSI, P., and PAROLARO, D. "CB1 receptor stimulation in specific brain areas differently modulate anxiety-related behaviour". *Neuropharmacology* 54, 151-160, 2008.

SAAVEDRA, J.M., ARMANDO, I., BREGONZIO, C., JUORIO, A., MACOVA, M., PAVEL, J., et al. "Acentrally acting, anxiolytic angiotensin II AT1 receptor antagonist prevents the isolation stress-induced decrease in cortical CRF1

---

receptor and benzodiazepine binding". *Neuropsychopharmacology* 31: 1123-1134, 2006.

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.

SARGENT, A.B., & EBERHARDT, L.E. "Death feigning by ducks in response to predation by red foxes (*Vulpes fulva*)". *American Midland Naturalist* 94: 108-119, 1975.

SHIMIZU, N., TAKE, S., HORI, T., OOMURA, Y. "In vivo measurement of hypothalamic serotonin release by intracerebral microdialysis: significant enhancement by immobilization stress in rats". *Brain Res Bull* 28: 727-34, 1992.

SCHMITT, P., DI SCALA, G., BRANDÃO, M.L., KARLI, P. "Behaviour effects of microinjection of SR 95103, a new GABA-A antagonist, into the medial hypothalamus or the mesencephalic central gray". *Eur J Pharmacol* 117: 149-158, 1985.

SHEN, M., PISER, T.M., SEYBOLD, V.S., THAYER, S.S. "Cannabinoid receptor agonists inhibit glutamatergic synaptic transmission in rat hippocampal cultures". *Journal of Neuroscience* 16, 4322-34, 1996.

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.

SINK, K.S., SEGOVIA, K.N., SINK, J., RANDALL, P.A., COLLINS, L.E., CORREA, M., MARKUS, E.J., VEMURI, V.K., MAKRIYANNIS, A., SALAMONE, J.D. "Potential anxiogenic effects of cannabinoid CB1 receptor antagonists/inverse agonists in rats: comparisons between AM4113, AM251 and the benzodiazepine inverse agonist FG-7142". *Eur Neuropsychopharmacol* 20, 112-122, 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.



---

STELLA, N., SCHWEITZER, P., PIOMELLI, D. "A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation". *Nature* 388, 773-8, 1997.

STEFFENS, M., ENGLER, C., ZENTNER, J., FEUERSTEIN, T.J. "Cannabinoid CB1 receptor-mediated modulation of evoked dopamine release and of adenylyl cyclase activity in the human neocortex". *British Journal of Pharmacology* 141, 1193-203, 2004.

SZABO, B., DÖRNER, L., PFREUNDTNER, C., NÖRENBERG, W., STARKE, K. "Inhibition of GABAergic inhibition postsynaptic currents by cannabinoids in rat corpus striatum". *Neuroscience* 85, 395-403, 1999.

TSOU, K., BROWN, S., SAÑUDO-PEÑA, M.C., MACKIE, K., WALKER, J.M. "Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system". *Neuroscience* 83, 393-411, 1998.

TWARDOWSCHY, A., CASTIBLANCO-URBINA, M.A., URIBE-MARIÑO, A., BIAGIONI, A., SALGADO-ROHNER, C.J., CRIPPA, J.A., COIMBRA, N.C. "The role of 5-HT1A receptors in the anti-aversive effects of cannabidiol on panic attack-like behaviours evoked in the presence of the wild snake *Epicrates cenchria crassus* (Reptilia, Boidae)". *J Psychopharmacol.* 27: 1149-59, 2013.

ULLAH, F., dos ANJOS-GARCIA, T., dos SANTOS, I.R., BIAGIONI, A.F., COIMBRA, N.C. "Relevance of dorsomedial hypothalamus and the dorsal periaqueductal gray matter in the organization of freezing or oriented and non-oriented escape emotional behaviours". *Behav Brain Res* 293: 143-52, 2015.

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 behaviours evoked by an ethological model of panic attacks based on a prey vs the wild snake *epicrates cenchria crassus* confrontation paradigm". *Neuropsychopharmacology* 37: 421-421, 2012.

VIANNA, D.M., BRANDÃO, M.L. "Anatomical connections of the periaqueductal gray: specific neural substrates for modulation". *Chem Phys Lipids* 121: 159-172, 2002.

---

ZHANG, Y., DUDAS, B., MUMA, N.A., BATTAGLIA, G., VAN de KAR, L.D. "Co-localization of 5-HT1A and 5-HT2A serotonin receptors on oxytocin cells in the hypothalamic paraventricular nucleus". *Neurosci Abstr* 17: 136, 2001.

ZHANG, Y., RAAP, D.K., GARCIA, F., SERRES, F., MA, Q., BATTAGLIA, G., et al. "Long-term fluoxetine produces behavioral anxiolytic effects without inhibiting neuroendocrine responses to conditioned stress in rats". *Brain Res* 855: 58-66, 2000.

CARLI, G. "Animal hypnosis in the rabbit". *The Psychological Record* 27: 123-143, 1977.

ZUARDI, A. W. (2006) "História da *cannabis* como medicamento: uma revisão." *Rev. Bras. Psiquiatr.* 2006:28(2):153-7

WOODRUFF, M.L., "Limbic modulation of contact defensive immobility ('animal hypnosis'). *The psychological Record* 1: 161-175, 1977.

\