



**PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS – ASSOCIAÇÃO AMPLA UFSCar/UNESP**



**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA  
LABORATÓRIO DE FARMACOLOGIA**

**ENVOLVIMENTO DA NEUROTRANSMISSÃO ENDOCANABINÓIDE NO  
NÚCLEO LEITO DA ESTRIA TERMINAL NAS RESPOSTAS AUTÔNOMAS  
DESENCADEADAS PELO ESTRESSE DE RESTRIÇÃO AGUDO EM RATOS**

Lucas Gomes de Souza

Araraquara-SP

-2016-

Lucas Gomes de Souza

**ENVOLVIMENTO DA NEUROTRANSMISSÃO ENDOCANABINÓIDE NO  
NÚCLEO LEITO DA ESTRIA TERMINAL NAS RESPOSTAS AUTÔNOMAS  
DESENCADEADAS PELO ESTRESSE DE RESTRIÇÃO AGUDO EM RATOS**

Dissertação a ser apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

**Orientador: Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani**

Araraquara-SP  
-2016-

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar  
Processamento Técnico  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S729e Souza, Lucas Gomes de  
Envolvimento da neurotransmissão endocanabinóide no núcleo leito da estria terminal nas respostas autônomas desencadeadas pelo estresse de restrição agudo em ratos / Lucas Gomes de Souza. -- São Carlos : UFSCar, 2016.  
44 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2016.

1. Estresse emocional. 2. NLET. 3. Anandamida. 4. 2-araquidonoilglicerol. 5. Receptor CB1. I. Título.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

---

**Folha de Aprovação**

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Lucas Gomes de Souza, realizada em 31/03/2016:

---

Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani  
UNESP

---

Prof. Dr. Fábio Cardoso Cruz  
IFSC/USP

---

Prof. Dr. Marcelo Tadeu Marin  
UNESP

*Dedico este trabalho à minha família!*

*Obrigado...*

*O que as suas mãos tiverem que fazer que o façam  
com toda a sua força, pois na sepultura, para onde  
você vai, não há atividade nem planejamento, não  
há conhecimento nem sabedoria!*

*(Eclesiastes 9:10)*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente eu agradeço a DEUS por ter me concedido a vida, saúde e a fiel esperança de ter confiado em seu poder e misericórdia para comigo! Felicidade esta que transborda em meu coração por ter confiado nas promessas de DEUS e ver o cumprimento de todas as palavras que foram gravadas em minha mente e coração.

Ao meu respeitado orientador Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani por todo o apoio, cuidado, ensino e dedicação. Sou imensamente grato pela a oportunidade concedida e por toda a paciência e tempo que você se dedicou para me orientar. Está aqui o tão sonhado mestrado! Obrigado.

Aos amigos do laboratório de farmacologia, pela a ajuda e companheirismo durante esses anos... E acima de tudo, agradeço todas as risadas que não foram poucas, mas fizeram toda a diferença, nós somos “farmacolindos.”

Ao grupo “Quarteto fantástico”, sendo eles Leandro (lê), Ricardo (ry) e Patrícia (pati), com vocês está meu imenso agradecimento... Quantas dificuldades, choros, experimentos e sem deixar de falar principalmente dos momentos incríveis que passamos juntos. Sou totalmente grato a cada um de vocês.

À meus amigos que tornaram irmãos Willian e Gessynger, pois é com lágrimas que agradeço toda a compreensão que tiveram, eu posso dizer com toda a verdade do mundo: “Entreí no mestrado no momento certo e com a certeza que DEUS tinha colocado anjos sem asas em meu lado. Tamo junto sempre.”

Aos companheiros de mestrado Mariane (baiana), Carol, Naiara, Isley, Karine e a Lígia Renata... Foram os momentos incríveis nesta caminhada e que venha o doutorado!

À minha segunda mãe Áurea e minha irmã de coração Lilian, somente elas sabem do quanto eu sonhava com o mestrado e sempre me apoiando e direcionando no caminho certo, eu não sei o que seria de mim sem vocês.

Aos professores Marcelo e Ricardo e professora Cleopatra por conseguirem mostrar o caminho do “ensinar” que sempre me orgulhei.

Às técnicas do laboratório Rosana (rô) e Elisabete (bete), e a grande secretária de departamento Tirene (ti), vocês sempre prontas a me ajudar e ensinar durante este momento meu de aprendizado.

À FCFar/UNESP pelo espaço físico e equipamentos oferecidos para o desenvolvimento do projeto e ao Programa Interinstitucional de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas (PIPGCF-UFSscar/UNESP), pela a oportunidade.

À CAPES, pelo apoio financeiro que foi concedido para a pesquisa e ao estudo.

À toda a minha família, meus pais José e Valdelice, minha irmã Jaqueline e especialmente a minha irmã mais velha Andreza, meu cunhado Paulinho e meu lindo príncipe Brayan... Quantos foram os momentos difíceis que passamos juntos, dificuldades, tristezas mais DEUS nos deu forças e conseguimos atravessar todo esse mar de provas, chegando a terra prometida.



E hoje estamos juntos, contentes com mais uma vitória. A todos meus primos, tios e avós.

Muito obrigado.

## RESUMO

A neurotransmissão endocanabinóide tem sido reportada como um importante mecanismo neuroquímico envolvido em respostas comportamentais e fisiológicas ao estresse. Estudos anteriores forneceram evidências da liberação de endocanabinóides no núcleo leito da estria terminal (NLET) durante os estímulos aversivos. No entanto, um possível envolvimento deste mecanismo neuroquímico do NLET nas respostas ao estresse nunca foi investigada. Portanto, no presente estudo nós investigamos o envolvimento da neurotransmissão endocanabinóide no NLET, agindo via receptor CB<sub>1</sub> local, nas respostas cardiovasculares desencadeadas pelo estresse de restrição agudo em ratos. A microinjeção de AM251 (antagonista seletivo do receptor CB<sub>1</sub>) (1, 30 e 100 pmol/100 nL) no NLET aumentou a resposta de taquicardia causada pelo o estresse de restrição agudo, sem afetar as respostas de aumento da pressão arterial e a de vasoconstrição cutânea. Por outro lado, o aumento dos níveis endógenos do endocanabinóide anandamida (AEA) no NLET causado pelo tratamento local com URB597 (inibidor da enzima ácido graxo amino hidrolase -FAAH) (30 pmol/100 nL) atenuou o aumento da frequência cardíaca desencadeada pelo o estresse de restrição agudo. O aumento nos níveis locais de 2-araquidonoilglicerol (2-AG) no NLET causado pelo tratamento local com JZL184 (inibidor da enzima monoacilglicerol lipase - MAGL) (30 pmol/100 nL) também reduziu a resposta taquicárdica desencadeada pelo o estresse de restrição agudo. Os efeitos tanto do URB597 quanto do JZL184 foram abolidos após o pré-tratamento local do NLET com o antagonista seletivo do receptor CB<sub>1</sub> (AM251). Estes resultados indicam um envolvimento da neurotransmissão endocanabinóide no NLET, agindo via receptor CB<sub>1</sub>, nos ajustes cardiovasculares durante o estresse emocional. Além disso, nossos achados fornecem evidências de que este controle pode ser mediado pela liberação local tanto de anandamida quanto de 2-AG.

**Palavras-chave:** estresse emocional; NLET; anandamida; 2-araquidonoilglicerol; receptor CB<sub>1</sub>; FAAH; MAGL; pressão arterial; frequência cardíaca; atividade simpática; atividade autônoma.

## ABSTRACT

The endocannabinoid neurotransmission has been reported as an important neurochemical mechanism involved in behavioral and physiological responses to stress. Previous studies provided evidence of endocannabinoid release in the bed nucleus of the stria terminalis (BNST) during aversive stimuli. Nevertheless, a possible involvement of this neurochemical mechanism in stress responses has never been evaluated. Therefore, in the present study we investigated the involvement of endocannabinoid neurotransmission within the BNST, acting via local CB<sub>1</sub> receptor, in cardiovascular responses evoked by acute restraint stress in rats. We found that microinjection of the selective CB<sub>1</sub> receptor antagonist AM251 (1, 30, and 100 pmol/100 nL) into the BNST enhanced the heart rate increase caused by restraint stress, without affecting the arterial pressure increase and the sympathetic-mediated cutaneous vasoconstriction response. Conversely, increase in endogenous levels of anandamide in the BNST evoked by local treatment with the fatty acid amide hydrolase (FAAH) enzyme inhibitor URB597 (30 pmol/100 nL) decreased restraint-evoked tachycardia. Inhibition of the hydrolysis of 2-arachidonoylglycerol (2-AG) in the BNST by local microinjection of the monoacylglycerol lipase (MAGL) enzyme inhibitor JZL184 (30 pmol/100 nL) also decreased the HR response to restraint. Effects of BNST treatment with either URB597 or JZL184 were inhibited by local pretreatment with the CB<sub>1</sub> receptor antagonist AM251. These findings indicate an involvement of BNST endocannabinoid neurotransmission, acting via CB<sub>1</sub> receptor, in cardiovascular adjustments during emotional stress. Furthermore, present findings provide evidence that this control may be mediated by local release of either anandamide or 2-AG.

**Keywords:** emotional stress; BNST; anandamide; 2-arachidonoylglycerol; CB<sub>1</sub> receptor; FAAH; MAGL; blood pressure; heart rate; sympathetic activity; autonomic activity.

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática da neurotransmissão endocanabinóide. ....	15
Figura 2 - Sítios de microinjeção no NLET .....	26
Figura 3 - Curvas temporais de variação da pressão arterial média ( $\Delta$ PAM), frequência cardíaca ( $\Delta$ FC) e temperatura cutânea da cauda ( $\Delta$ temperatura) induzidas pelo estresse de restrição agudo. ....	28
Figura 4 - Curvas temporais de variação da pressão arterial média ( $\Delta$ PAM), frequência cardíaca ( $\Delta$ FC) e temperatura cutânea da cauda ( $\Delta$ temperatura) induzidas pelo estresse de restrição agudo. ....	30
Figura 5 - Curvas temporais de variação da pressão arterial média ( $\Delta$ PAM), frequência cardíaca ( $\Delta$ FC) e temperatura cutânea da cauda ( $\Delta$ temperatura) induzidas pelo estresse de restrição agudo .....	32

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	iv
RESUMO .....	vii
ABSTRACT .....	viii
1.INTRODUÇÃO.....	12
2. OBJETIVOS .....	18
2.1 Objetivo geral.....	18
2.2 Objetivos específicos.....	18
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1. Animais.....	19
3.2. Procedimentos cirúrgicos.....	19
3.3. Registro da pressão arterial e frequência cardíaca .....	20
3.4. Registro da temperatura cutânea da cauda.....	20
3.5. Microinjeção de drogas no NLET .....	21
3.6. Estresse de restrição agudo .....	21
3.7. Determinação histológica dos locais de microinjeção no NLET .....	21
3.8. Drogas e soluções.....	21
3.9. Análise de dados .....	22
4.PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS.....	23
4.1. Efeitos da microinjeção bilateral de antagonista seletivo do receptor $CB_1$ (AM251) nas respostas cardiovasculares desencadeadas pelo estresse de restrição agudo .....	23
4.2. Efeitos da microinjeção bilateral de inibidor da enzima FAAH (URB597) nas respostas cardiovasculares desencadeadas pelo estresse de restrição agudo .....	24
4.3. Efeito da microinjeção bilateral de inibidor da enzima MAGL (JZL184) nas respostas cardiovasculares desencadeadas pelo estresse de restrição agudo .....	24
5.RESULTADOS.....	25
5.1. Efeitos da microinjeção bilateral de antagonista seletivo do receptor $CB_1$ (AM251) nas respostas cardiovasculares desencadeadas pelo estresse de restrição agudo .....	25
5.2. Efeitos da microinjeção bilateral de antagonista seletivo do receptor $CB_1$ (AM251) e/ou inibidor da enzima FAAH (URB597) nas respostas cardiovasculares desencadeadas pelo estresse de restrição agudo .....	29
5.3. Efeito da microinjeção bilateral do antagonista seletivo do receptor $CB_1$ (AM251) e/ou inibidor da enzima MAGL (JZL184) nas respostas cardiovasculares desencadeadas pelo estresse de restrição agudo.....	31

6. DISCUSSÃO .....	33
7. CONCLUSÃO .....	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	39
ANEXO A - Comitê de Ética do Uso de Animais CEUA.....	44

## **1.INTRODUÇÃO**

A manutenção da homeostase durante situações de estresse depende da ativação coordenada dos sistemas autônomo e neuroendócrino (DAMPNEY; HORIUCHI; MCDOWALL, 2008; ULRICH-LAI; HERMAN, 2009). As respostas decorrentes da ativação do sistema autônomo são caracterizadas principalmente por alterações na função cardiovascular, que incluem: aumento da pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC), redistribuição do fluxo sanguíneo (redução da perfusão cutânea e visceral e aumento do fluxo sanguíneo para a musculatura esquelética) e alteração na atividade barorreflexa (DAMPNEY; KVETNANSKY *et al.*, 1979; ZHANG; JULIEN; BARRÈS, 1996; HORIUCHI; MCDOWALL, 2008; CRESTANI, *et al.*, 2010;). A diminuição do fluxo sanguíneo para a pele reduz a temperatura cutânea durante situações aversivas (VIANNA; CARRIVE, 2005; BUSNARDO *et al.*, 2013). A ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) durante o estresse promove aumento nos níveis plasmáticos de glicocorticóide, com valores máximos plasmáticos do hormônio observados alguns minutos após o início do estresse (KVETNANSKY *et al.*, 1979; CHOI *et al.*, 2007). Apesar da importância das respostas fisiológicas durante situações aversivas, os mecanismos neurobiológicos envolvidos com estas respostas ainda são pouco compreendidos.

As respostas fisiológicas durante o estresse são mediadas pela ativação de estruturas que compõe o sistema límbico no sistema nervoso central (JOËLS; BARAM, 2009; ULRICH-LAI; HERMAN, 2009). O núcleo leito da estria terminal (NLET) é uma estrutura límbica localizada no prosencéfalo rostral, a qual forma um contínuo rostralmente à amígdala (ALHEID; HEIMER, 1988; ALHEID, 2003). Estudos mostram um envolvimento desta estrutura nas respostas autônomas, neuroendócrinas e comportamentais observadas durante situações aversivas (ULRICH-LAI; HERMAN, 2009; WALKER; MILES; DAVIS, 2009;

CRESTANI, *et al.*, 2013;). O controle das respostas autônomas ao estresse pelo NLET parece depender do paradigma de estímulo aversivo empregado (CRESTANI, *et al.*, 2013). Por exemplo, resultados recentes do nosso grupo demonstraram que o bloqueio sináptico local no NLET facilitou o aumento de FC desencadeado pelo estresse por restrição agudo (estímulo aversivo não-condicionado) (CRESTANI, *et al.*, 2009), ao passo que as respostas comportamentais e cardiovasculares observadas no teste de medo condicionado ao contexto foram reduzidas após a inibição do NLET (RESSTEL *et al.*, 2008). No caso da ativação do eixo HPA, foi observado que a lesão química do NLET resultou em redução da resposta de aumento dos níveis circulantes de glicocorticóide induzida tanto por estímulos aversivos não-condicionados quanto condicionados (GRAY *et al.*, 1993; CHOI *et al.*, 2008). Baseado em evidências neuroanatômicas de conexão do NLET com outras estruturas límbicas e nos resultados demonstrando seu envolvimento nas respostas fisiológicas ao estresse, tem sido proposto que o NLET seria uma importante região no circuito neural das respostas a estímulos aversivos, no qual integraria informações de outras regiões límbicas, como o córtex pré-frontal medial, amígdala e hipocampo, e conectaria estas regiões com núcleos hipotalâmicos e do tronco cerebral envolvidos no controle da atividade autônoma e neuroendócrina (CHOI *et al.*, 2007; ULRICH-LAI; HERMAN, 2009; CRESTANI, *et al.*, 2013). Apesar das evidências do envolvimento do NLET no circuito das respostas ao estresse, os mecanismos neuroquímicos locais no NLET envolvidos no controle das respostas fisiológicas desencadeadas por estímulos aversivos ainda são pouco conhecidos.

Estudos tem demonstrado o envolvimento da neurotransmissão endocanabinóide nas respostas comportamentais e fisiológicas desencadeadas por estímulos aversivos (HILL, MATTHEW; MCEWEN, 2010; MORENA *et al.*, 2016). O termo endocanabinóide refere-se ao conjunto de ligantes endógenos dos receptores ativados pelo  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC), o composto responsável pela maioria dos efeitos induzidos pela planta *Cannabis sativa*

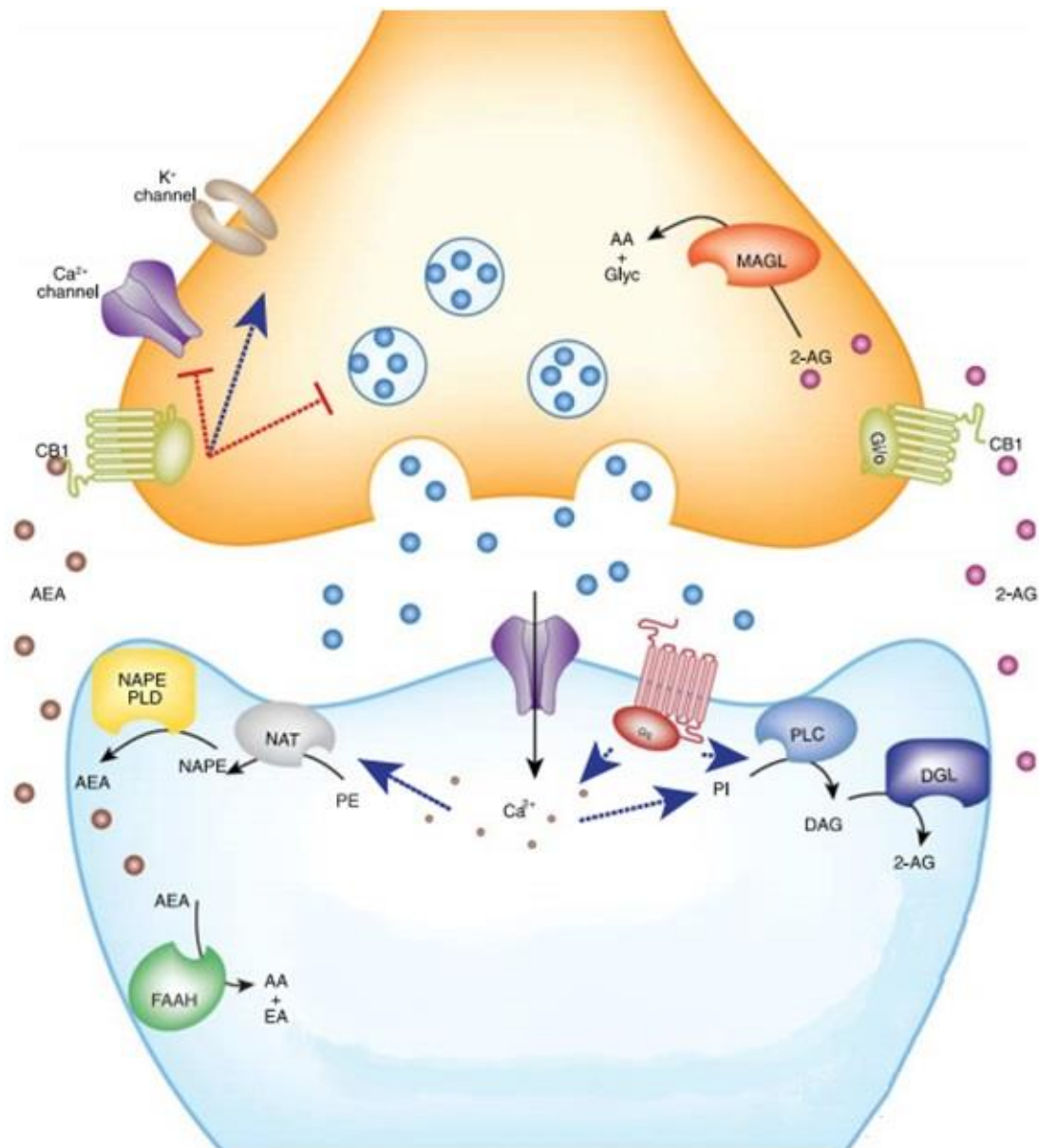


(conhecida popularmente como maconha) (HOWLETT, *et al.*, 2002). Os primeiros endocanabinóides identificados foram o araquidonil etanolamida, também conhecido como anandamida (DEVANE *et al.*, 1992), e o 2-araquidonil glicerol (2-AG) (MECHOULAM *et al.*, 1995; SUGIURA *et al.*, 1995). Apesar do relato de outros endocanabinóides (para revisão ver: HOWLETT *et al.*, 2002; PACHER; BÁTKAI; KUNOS, 2006), estudos sobre a biossíntese, transporte celular, metabolismo e ações fisiológicas tem focado na anandamida e 2-AG (PACHER; BÁTKAI; KUNOS, 2006).

No sistema nervoso central, a anandamida e o 2-AG são sintetizados “sob demanda” através da clivagem de fosfolipídeos de membrana em neurônios pós-sinápticos (BISOGNO; LIGRESTI; DI MARZO, 2005; PACHER; BÁTKAI; KUNOS, 2006), e agem como mensageiros retrógrados ao ativar o receptor CB<sub>1</sub> em terminais pré-sinápticos (HOWLETT *et al.*, 2004; KATONA; FREUND, 2012). Este receptor é amplamente expresso por todo o sistema nervoso central (HERKENHAM *et al.*, 1990; TSOU *et al.*, 1998; HOWLETT *et al.*, 2004;), e a sua ativação causa redução na liberação de neurotransmissores excitatórios e inibitórios (SCHLICKER; KATHMANN, 2001; PIOMELLI, 2003). Foi também identificado um segundo receptor ativado pelos endocanabinóides, designado como CB<sub>2</sub>, no qual foi inicialmente descrito como um receptor predominantemente periférico, e expresso em componentes do sistema imune (MUNRO; THOMAS; ABU-SHAAR, 1993). A possível expressão e função do receptor CB<sub>2</sub> no sistema nervoso central ainda é controversa (PACHER; BÁTKAI; KUNOS, 2006; PERTWEE *et al.*, 2010).

Os efeitos dos endocanabinóides são geralmente de curta duração devido a sua rápida remoção da fenda sináptica através de um processo realizado em duas fases. Primeiro, os endocanabinóides atravessam a membrana plasmática e são internalizados, evento esse que pode ser mediado por um transportador específico (BELTRAMO, 1997; HILLARD *et al.*, 1997) ou ocorrer através de difusão passiva (GLASER *et al.*, 2003). No interior de neurônios,

a anandamida é metabolizada pela enzima ácido graxo amido hidrolase (do inglês, FAAH), ao passo que a enzima monoacilglicerol lipase (MAGL) metaboliza o 2-AG (DINH *et al.*, 2002; MCKINNEY; CRAVATT, 2005). A **Figura 1** apresenta uma representação esquemática da neurotransmissão endocanabinóide no sistema nervoso central.



**Figura 1 - Representação esquemática da neurotransmissão endocanabinóide.** ( $\text{Ca}^{2+}$ ) cálcio, ( $\text{K}^+$ ) potássio, (channel) canal, (Gq) receptor acoplado a proteína Gq, (Gi/o) receptor acoplado a proteína Gi/o, ( $\text{CB}_1$ ) receptor de endocanabinóides, (PI) fosfatidilinositol, (PLC) fosfolipase C, (DAG) diacilglicerol, (DGL) diacilglicerol lipase, (2-AG) 2-araquidonoil glicerol, (PE) fosfatidiletanolamina, (NAT) N-acil transferase, (NAPE) N-araquidonoil fosfatidiletanolamina, (NAPE-PLD) N-araquidonoil fosfatidiletanolamina fosfolipase D, (AEA) anandamida, (FAAH) ácido graxo amino hidrolase, (AA) ácido araquidônico, (EA) etanolamina, (MAGL) monoacilglicerol lipase, (Glyc) glicerol. Fonte: adaptado de: MORENA *et al.*, 2016).

Foi identificada a expressão do receptor CB<sub>1</sub> no NLET (MATSUDA; BONNER; LOLAIT, 1993; TSOU *et al.*, 1998), e evidências mais recentes demonstraram sua localização em terminais glutamatérgicos e gabaérgicos no NLET (PUENTE *et al.*, 2010). Neste sentido, foi demonstrado que a ativação do receptor CB<sub>1</sub> no NLET inibe transmissões sinápticas excitatórias e inibitórias locais (MASSI *et al.*, 2008; PUENTE *et al.*, 2010). Foi também reportado que o tratamento sistêmico com um antagonista seletivo do receptor CB<sub>1</sub> (AM251) aumentou a ativação neuronal no NLET induzida por um estímulo aversivo (NEWSOM *et al.*, 2012), o que sugere que a neurotransmissão endocanabinóide no NLET é ativada durante situações aversivas.

Nós reportamos em um estudo recente que a microinjeção no NLET de canabidiol (CBD), um fitocanabinóide encontrado em altas concentrações no extrato da *Cannabis sativa* (MECHOULAM, 1970), facilitou a resposta taquicárdica desencadeada pelo estresse por restrição agudo, porém sem afetar a resposta de aumento da pressão arterial (GOMES *et al.*, 2013). Entretanto, o CBD possui baixa afinidade para os receptores canabinóides (THOMAS *et al.*, 1998). Foi relatado que o CBD pode atuar como agonista em receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub> (RUSSO *et al.*, 2005). Neste sentido, nós observamos que o efeito da microinjeção de CBD no NLET sobre a resposta taquicárdica desencadeada pelo estresse por restrição foi inibida após o pré-tratamento local com um antagonista seletivo de receptor serotoninérgico 5-HT<sub>1A</sub> (GOMES *et al.*, 2013), o que evidencia o envolvimento de mecanismos serotoninérgicos nos efeitos do CBD no NLET.

Deste modo, apesar das evidências da presença de mecanismos endocanabinóides no NLET e de sua ativação durante situações de estresse, em uma ampla busca na literatura nós não encontramos nenhum estudo que tenha investigado a participação da neurotransmissão endocanabinóide no NLET nas respostas fisiológicas desencadeadas pelo estresse. Assim, nós

nos propomos no presente estudo a testar a hipótese de que mecanismos endocanabinóides presentes no NLET estão envolvidos nas respostas cardiovasculares desencadeadas pelo estresse por restrição agudo em ratos. Para tanto, nós investigaremos o efeito do tratamento farmacológico local do NLET com um antagonista seletivo do receptor CB<sub>1</sub> e inibidores das enzimas de degradação dos endocanabinóides.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

O objetivo geral do presente estudo foi investigar o envolvimento da neurotransmissão endocanabinóide no NLET nas respostas cardiovasculares observadas durante o estresse por restrição agudo em ratos.

### **2.2 Objetivos específicos**

-Investigar o efeito da microinjeção bilateral no NLET de doses crescentes de um antagonista do receptor CB<sub>1</sub> sobre as respostas de aumento de pressão arterial e frequência cardíaca, bem como na redução da temperatura cutânea da cauda induzidas pelo estresse de restrição agudo em ratos;

-Estudar o efeito do aumento nos níveis de anandamida no NLET sobre as respostas cardiovasculares induzidas pelo estresse por restrição agudo em ratos; e investigar o envolvimento da ativação do receptor CB<sub>1</sub> local nesses efeitos.

-Investigar o efeito do aumento nos níveis de 2-AG no NLET sobre as respostas cardiovasculares induzidas pelo estresse por restrição agudo em ratos; e investigar o envolvimento da ativação do receptor CB<sub>1</sub> local nestes efeitos.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Animais**

Foram utilizados 73 ratos Wistar pesando 240-260 g (60 dias de idade). Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual Paulista (Botucatu-SP) e foram alojados em gaiolas de plástico em uma sala de temperatura controlada a 24°C no Biotério do Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP. Eles foram mantidos sob um ciclo claro-escuro 12:12 h (luzes acesas 07:00 - 19:00), com livre acesso a água e comida padrão de laboratório. As condições de habitação e procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética para Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas / UNESP (protocolo # 35/2014).

#### **3.2. Procedimentos cirúrgicos**

Cinco dias antes do experimento, os ratos foram anestesiados com tribromoetanol (250 mg/kg, i.p.). Após anestesia local com lidocaína a 2%, o crânio foi exposto e cânulas de guia de aço inoxidável (26G com 12 mm de comprimento) foram bilateralmente implantadas no NLET numa posição de 1 mm acima do local de microinjeção, utilizando um aparelho de estereotaxia (Stoelting, Wood Dale, IL, EUA). As coordenadas estereotáxicas para implantação das cânulas no NLET foram: antero-posterior = + 8,6mm da linha interaural; lateral = 4,0 mm a partir da sutura medial; dorso-ventral = -5.8 mm do crânio, com uma inclinação lateral de 23° (PAXINOS; WATSON, 1997). As cânulas foram fixadas ao crânio com cimento dental e um parafuso de metal. Após a cirurgia, os animais receberam um poli-antibiótico com estreptomicina e penicilina (560 mg/ml /kg, i.m.) para prevenir a infecção e a flunexina meglumina (anti-inflamatório não-esteroidal) (0,5 mg/ ml/kg, s.c.) para analgesia pós-operatória.

Um dia antes do experimento, os ratos foram anestesiados com tribromoetanol (250 mg/kg, i.p.) e um cateter (Clay Adams, Parsippany, NJ, EUA) preenchido com uma solução de heparina (50 UI/ml, Hepamax-S®, Blausiegel, Cotia-SP, Brasil) diluída em soro fisiológico (NaCl 0,9%) foi inserido na aorta abdominal através da artéria femoral para registo cardiovascular. Após a implantação, o cateter foi exteriorizado no dorso do animal e fixado à pele através de sutura cirúrgica. Após a cirurgia, os animais foram tratados com flunixinina meglumina (anti-inflamatório não-esteroidal) (0,5 mg/ml/kg, s.c.) para analgesia pós-operatória. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais durante o período pós-operatório e o período de registo cardiovascular.

### **3.3. Registro da pressão arterial e frequência cardíaca**

O cateter implantado na artéria femoral foi conectado a um transdutor de pressão (DPT100, Utah Medical Products Inc., Midvale, UT, EUA). A pressão arterial pulsátil foi registada utilizando um amplificador (ML 224, ADInstruments, NSW, Austrália) e uma placa de aquisição (PowerLab 4/30, ML866/P, ADInstruments, NSW, Austrália), ligadas a um computador pessoal. A pressão arterial média (PAM) e a FC foram derivados a partir do registo da pressão arterial pulsátil.

### **3.4. Registro da temperatura cutânea da cauda**

A temperatura cutânea da cauda foi registrada utilizando uma câmera térmica (IRI 4010, Infravermelho Integrated Systems Ltd., Northampton, Reino Unido). A análise foi realizada através de um software para análise termográfica, e a temperatura foi representada por variações de intensidade de cor. Para análise das imagens, a temperatura foi medida em cinco pontos de cauda do animal e o valor médio foi calculado para cada registo (CRUZ *et al.*, 2012; GOUVEIA *et al.*, 2016).

### **3.5. Microinjeção de drogas no NLET**

As agulhas (33G, Small Parts, Miami Lakes, FL, EUA) utilizados para a microinjeção no NLET foram 1 mm mais longa do que as cânulas guia e foram conectadas a uma seringa de 2  $\mu$ l (7002-KH, Hamilton Co., Reno, NV, EUA) utilizando um tubo de PE-10 (Clay Adams, Parsippany, NJ, EUA). As agulhas foram cuidadosamente inseridas nas cânulas guia sem restringir os animais, e as drogas foram microinjetadas em um volume final de 100 nL (CRESTANI, C C *et al.*, 2009; GOMES *et al.*, 2013; GOUVEIA *et al.*, 2016).

### **3.6. Estresse de restrição agudo**

Para o estresse de restrição agudo, cada rato foi colocado num tubo de plástico cilíndrico opaco (diâmetro de 6,5 cm, comprimento 15 cm), ventilados por orifícios (1 cm de diâmetro) que compunham aproximadamente 20% da superfície do tubo. A sessão de estresse de restrição durou 60 minutos (CRESTANI, C C *et al.*, 2009; GOMES *et al.*, 2013), e imediatamente após o fim do estímulo aversivo os ratos foram devolvidos às suas gaiolas. Cada rato foi submetido a apenas uma sessão de restrição a fim de evitar a habituação.

### **3.7. Determinação histológica dos locais de microinjeção no NLET**

No final de cada experimento, os ratos foram anestesiados com uretana (250 mg/ml/200 g de peso corporal, i.p.) e 100 nL de corante azul de Evan's (1%) foi microinjetado no encéfalo como um marcador do sítio de microinjeção. Os encéfalos foram removidos e pós-fixados em formalina a 10% durante pelo menos 48 h à 4°C. Em seguida, secções de 40  $\mu$ m de espessura em série da região de NLET foram fatiadas utilizando um criostato (CM1900, Leica, Wetzlar, Alemanha). O posicionamento das agulhas microinjeção foi determinada de acordo com o atlas do cérebro de rato (PAXINOS; WATSON, 1997).

### **3.8. Drogas e soluções**

AM251 (antagonista seletivo do receptor CB<sub>1</sub>) (Tocris, West-woods Business Park,



Ellisville, MO, EUA), URB597 (inibidor seletivo da enzima FAAH) (Tocris) e JZL184 (inibidor seletivo de enzima MAGL) (Tocris) foram dissolvidos em DMSO a 20% diluído em solução salina (NaCl 0,9%). O tribromoetanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e a uretana (Sigma-Aldrich) foram dissolvidos em solução salina (NaCl 0,9%). A flunixinina meglumina (Banamine®; Schering-Plough, Cotia, SP, Brasil) e a preparação de poli-antibiótico (Pentabiotico®; Fort Dodge, Campinas, SP, Brasil) foram utilizados como determinado pelo fabricante.

### **3.9. Análise de dados**

Os dados foram expressos como média  $\pm$  EPM. Os valores basais de PAM, FC e temperatura cutânea da cauda foram comparados usando a análise de variância (ANOVA) monofatorial (resultados AM251) ou o teste t de *Student* (resultados URB597 e JZL184). As curvas temporais de variação da PAM, FC e temperatura cutânea da cauda foram analisadas utilizando a ANOVA bifatorial, com o tratamento como fator principal e o tempo como medida repetida. Um teste t *post-hoc* com uma correção de Bonferroni foi utilizado para a identificação de diferenças entre os grupos. Resultados de testes estatísticos com  $P < 0,05$  foram considerados significativos.

#### **4.PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS**

Os animais foram levados para a sala experimental em suas próprias gaiolas. Antes de iniciar os experimentos, os animais foram mantidos na sala de experimentação por um período de pelo menos 60 minutos para adaptação às condições da sala experimental, tais como som e iluminação. A sala de experimento teve a temperatura controlada (24°C) e foi acusticamente isolado dos outros ambientes. O registro cardiovascular iniciou pelo menos 30 minutos antes do início da restrição, e foi realizado durante toda a sessão de estresse. A temperatura cutânea da cauda foi mensurada 10, 5 e 0 minutos antes do início da sessão de estresse de restrição agudo para determinação dos valores basais, e aos 10, 20, 40 e 60 minutos durante o estresse agudo de restrição (BUSNARDO *et al.*, 2013). Cada animal recebeu um único tratamento farmacológico e foi submetido a uma única sessão de estresse de restrição agudo.

##### ***4.1. Efeitos da microinjeção bilateral de antagonista seletivo do receptor CB<sub>1</sub> (AM251) nas respostas cardiovasculares desencadeadas pelo estresse de restrição agudo***

Este protocolo teve como objetivo investigar o envolvimento do receptor CB<sub>1</sub> no NLET nas respostas cardiovasculares desencadeadas pelo estresse de restrição agudo. Para isso, grupos independentes de animais receberam microinjeção bilateral no NLET de diferentes doses (1, 30 ou 100 pmol/100 nL) de AM251 (antagonista seletivo do receptor CB<sub>1</sub>) ou veículo (DMSO a 20% diluído em solução salina) (100 nL) (FERREIRA-JUNIOR *et al.*, 2012; LISBOA *et al.*, 2008). Dez minutos após o tratamento farmacológico do NLET, os animais foram submetidos a uma sessão de 60 minutos de estresse agudo de restrição.

#### ***4.2. Efeitos da microinjeção bilateral de inibidor da enzima FAAH (URB597) nas respostas cardiovasculares desencadeadas pelo estresse de restrição agudo***

Este protocolo teve como objetivo investigar o efeito do aumento dos níveis endógenos de anandamida no NLET nas respostas cardiovasculares desencadeadas pelo estresse de restrição agudo, bem como avaliar o envolvimento do receptor CB<sub>1</sub> nos efeitos da anandamida. Para isso, grupos independentes de animais receberam microinjeção bilateral no NLET de AM251 (1 pmol/100 nL) ou veículo (DMSO a 20% diluído em solução salina) (100nL), seguido, 5 minutos depois, da microinjeção bilateral de URB597 (inibidor da enzima FAAH) (30 pmol /100 nL) ou veículo (DMSO a 20% diluído em solução salina) (100 nL). Cinco minutos após o tratamento farmacológico no NLET, os animais foram submetidos a uma sessão de 60 minutos de estresse de restrição agudo.

#### ***4.3. Efeito da microinjeção bilateral de inibidor da enzima MAGL (JZL184) nas respostas cardiovasculares desencadeadas pelo estresse de restrição agudo***

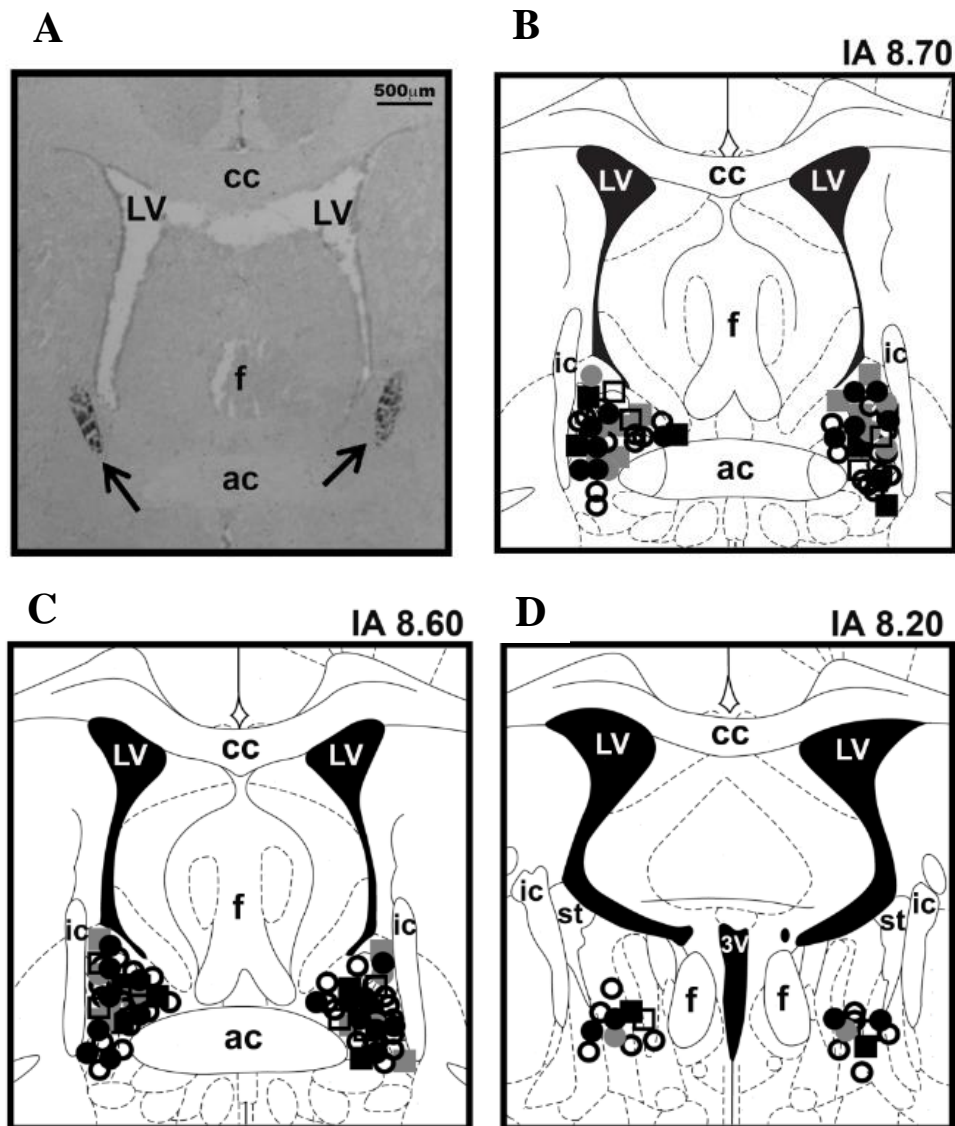
Este protocolo teve como objetivo investigar o efeito do aumento dos níveis endógenos de 2-AG no NLET nas respostas cardiovasculares desencadeadas pelo o estresse agudo de restrição, bem como avaliar o envolvimento do receptor CB<sub>1</sub> nos efeitos do 2-AG. Para isso, grupos independentes de animais receberam microinjeção bilateral no NLET de AM251 (1 pmol/100 nL) ou veículo (DMSO a 20% diluído em solução salina) (100nL), seguido, 5 minutos depois, da microinjeção bilateral de JZL184 (inibidor da enzima MAGL) (30 pmol /100 nL) ou veículo (DMSO a 20% diluído em solução salina) (100 nL). Cinco minutos após o tratamento farmacológico no NLET, os animais foram submetidos a uma sessão de 60 minutos de estresse de restrição agudo.

## **5.RESULTADOS**

Representações esquemáticas dos sítios de microinjeção bilaterais no NLET de todos os animais utilizados no presente estudo são apresentadas na Figura 2. A Figura 2 também mostra fotomicrografia de uma secção coronal do cérebro de rato ilustrando os sítios de microinjeção no NLET de um animal representativo.

### ***5.1. Efeitos da microinjeção bilateral de antagonista seletivo do receptor CB<sub>1</sub> (AM251) nas respostas cardiovasculares desencadeadas pelo estresse de restrição agudo***

A microinjeção bilateral no NLET de doses crescentes (1, 30 e 100 pmol/100 nL) do antagonista seletivo do receptor CB<sub>1</sub>, AM251, não alterou os valores basais de PAM, FC ou da temperatura cutânea da cauda (Tabela 1). O estresse de restrição agudo aumentou a PAM ( $F_{(34,594)} = 6$ ,  $P < 0,0001$ ) e a FC ( $F_{(34,594)} = 15$ ,  $P < 0,0001$ ) e reduziu a temperatura cutânea da cauda ( $F_{(7,136)} = 20$ ,  $P < 0,0001$ ) (Figura 3). O tratamento do NLET com AM251, nas doses de 30 pmol ( $P < 0,0001$ ) e 100 pmol ( $P < 0,0001$ ), aumentou a taquicardia desencadeada pelo estresse de restrição agudo ( $F_{(3,594)} = 35$ ,  $P < 0,0001$ ), porém sem afetar as respostas de aumento da PAM ( $F_{(3,594)} = 1,8$ ,  $P > 0,05$ ) e queda da temperatura cutânea da cauda ( $F_{(3,136)} = 1,2$ ,  $P > 0,05$ ) (Figura 3).

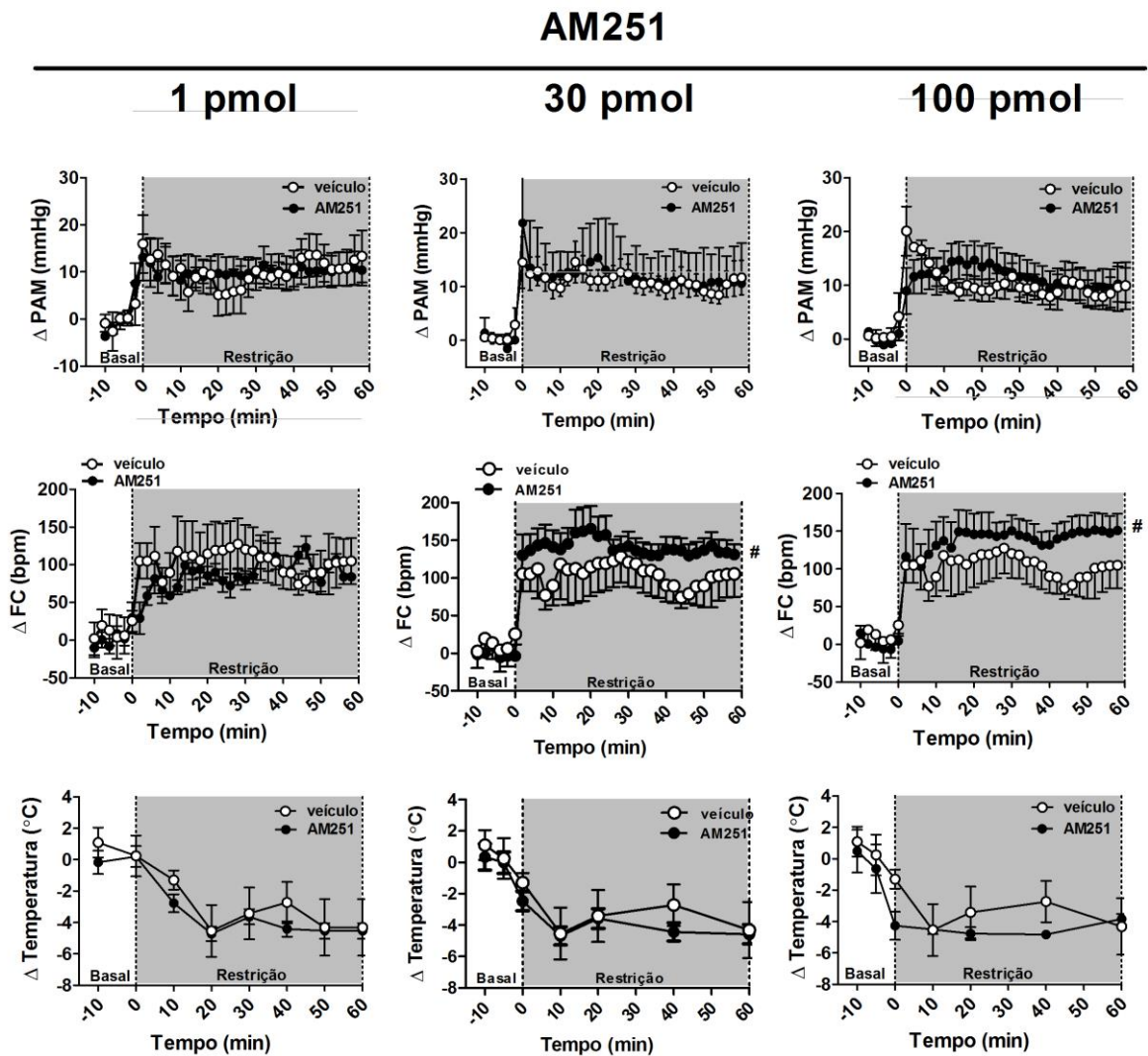


**Figura 2** - (A) Fotomicrografia de uma secção coronal do cérebro de um rato representativo mostrando os sítios bilaterais de microinjeção no NLET. As setas indicam os sítios de microinjeção. (B,C,D) Representação esquemática com base no atlas do cérebro de rato de (PAXINOS; WATSON, 1997), indicando os sítios de microinjeção no NLET de AM251 (círculos pretos), URB597 (quadrados pretos), AM251+URB597 (quadrados cinza), JZL184 (quadrados brancos), AM251+JZL184 (círculos cinza) e de veículo (círculos brancos). 3V - terceiro ventrículo, IA - coordenadas interaural; ac - comissura anterior; cc - corpo caloso; f - fórnix; ic - cápsula interna; LV - ventrículos laterais; st - estria terminal.

Tabela 1

Parâmetros basais da pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e temperatura cutânea da cauda após o tratamento farmacológico do NLET com diferentes doses do antagonista seletivo do receptor CB<sub>1</sub> (AM251) e/ou inibidor da enzima FAAH (URB597) e/ou inibidor da enzima MAGL (JZL184).

Grupo	n	PAM (mmHg)	FC (bpm)	Temperatura cutânea da cauda (°C)
Veículo	5	105±4	381±26	28±0.4
AM251 – 1 pmol	6	113±2	418±17	26±0.5
AM251 – 30 pmol	5	104±5	375±35	27±0.6
AM251 – 100 pmol	5	108±3	400±33	28±0.3
		$F_{(3,17)}=1.3, P>0.05$	$F_{(3,17)}=0.6, P>0.05$	$F_{(3,17)}=7, P>0.05$
Veículo	7	107±2	389±9	27±1
URB597 – 30 pmol	7	100±3	389±1	26±0.8
		$t=1.6, P>0.05$	$t=0.01, P>0.05$	$t=0.8, P>0.05$
Veículo	6	111±2	371±18	28±0.3
AM251 (1 pmol) + URB597 (30 pmol)	6	113±3	418±25	27±1.7
		$t=0.5, P>0.05$	$t=1.6, P>0.05$	$t=0.9, P>0.05$
Veículo	7	107±4	399±13	27±0.8
JZL184 – 30 pmol	7	107±2	389±12	29±0.6
		$t=0.06, P>0.05$	$t=0.5, P>0.05$	$t=3.4, P<0.05$
Veículo	6	108±4	402±16	26±0.4
AM251 (1 pmol) + JZL184 (30 pmol)	6	113±4	417±25	27±1.7
		$t=0.6, P>0.05$	$t=0.6, P>0.05$	$t=0.3, P>0.05$



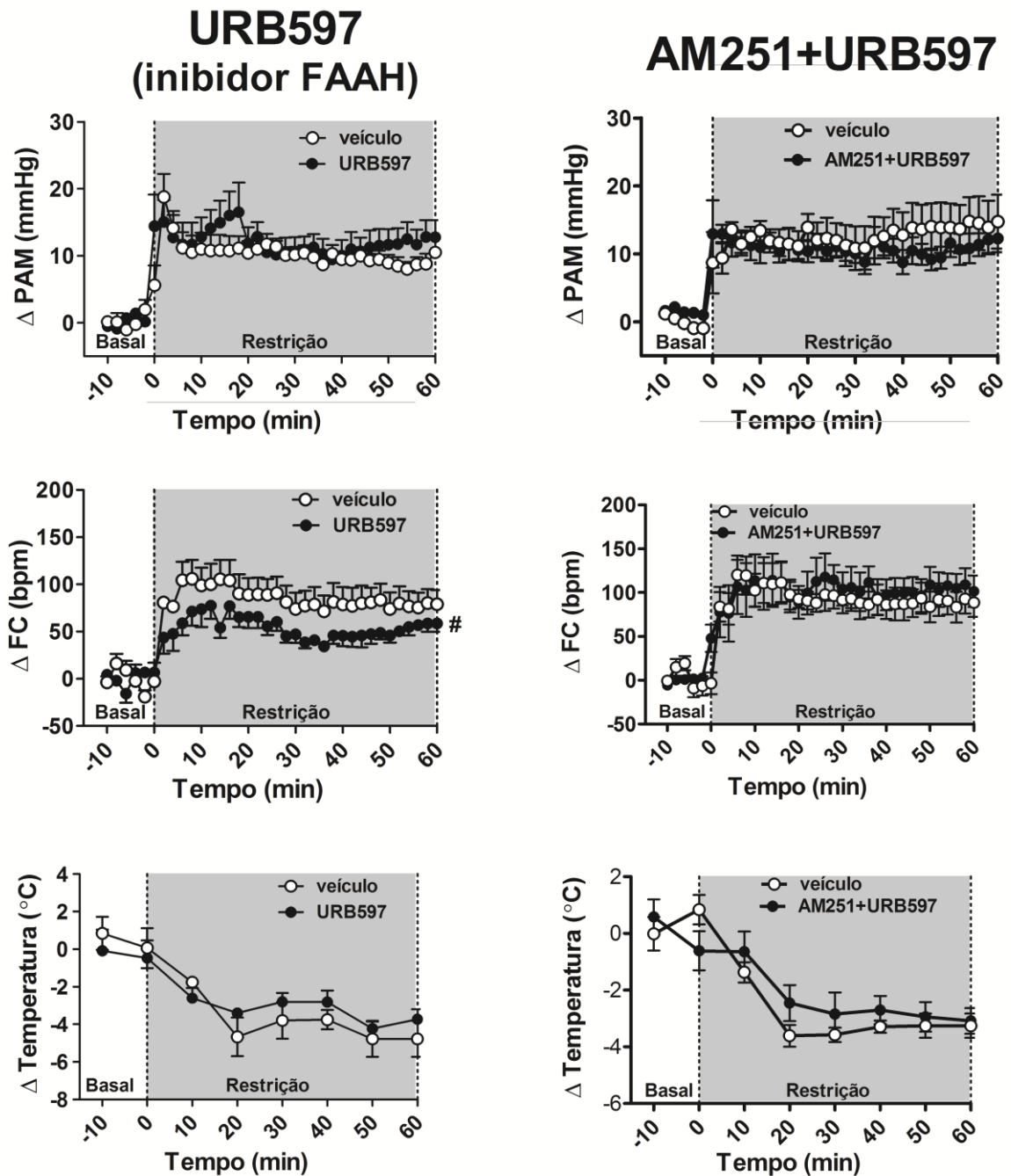
**Figura 3** - Curvas temporais de variação da pressão arterial média ( $\Delta$ PAM), frequência cardíaca ( $\Delta$ FC) e temperatura cutânea da cauda ( $\Delta$ temperatura) induzidas pelo estresse de restrição agudo em animais tratados com doses crescentes (1, 30 e 100 pmol/100 nL) do antagonista seletivo do receptor  $CB_1$ , AM251 no NLET. A área sombreada indica o período de restrição. Círculos representam à média e as barras o erro padrão da média EPM. #  $P < 0,05$  ao longo de todo o período de restrição em comparação com animais tratados com veículo, ANOVA seguido por teste *t post-hoc* com uma correção de Bonferroni.

***5.2. Efeitos da microinjeção bilateral de antagonista seletivo do receptor CB<sub>1</sub> (AM251) e/ou inibidor da enzima FAAH (URB597) nas respostas cardiovasculares desencadeadas pelo estresse de restrição agudo***

A microinjeção bilateral no NLET do inibidor da enzima FAAH, URB597 (30 pmol/100 nL), sozinho ou em combinação com AM251 (1pmol/100nL) não alterou os valores basais de PAM, FC e temperatura cutânea da cauda (Tabela 1). O estresse de restrição agudo aumentou a PAM ( $F_{(35,432)} = 7$ ,  $P < 0,0001$ ) e a FC ( $F_{(35,432)} = 8$ ,  $P < 0,0001$ ) e diminuiu a temperatura cutânea da cauda ( $F_{(7,96)} = 11$ ,  $P < 0,0001$ ) (Figura 4). O tratamento do NLET com URB597 reduziu o aumento da FC ( $F_{(1,432)} = 60$ ,  $P < 0,0001$ ) desencadeada pelo estresse de restrição agudo, porém sem afetar a queda da temperatura cutânea da cauda ( $F_{(1,96)} = 0,6$ ,  $P > 0,05$ ) e o aumento da PAM ( $F_{(1,432)} = 0,8$ ,  $P > 0,05$ ) (Figura 4).

O pré-tratamento do NLET com AM251 (1pmol/100 nL) aboliu completamente o efeito do URB597 na resposta de aumento FC desencadeada pelo estresse de restrição ( $F_{(1,354)} = 3$ ,  $P > 0,05$ ) (Figura 4). O tratamento combinado com AM251 + URB597 não alterou as respostas pressora ( $F_{(1,354)} = 3$ ,  $P > 0,05$ ) e de queda da temperatura cutânea da cauda ( $F_{(1,80)} = 1$ ,  $P > 0,05$ ) (Figura 4).



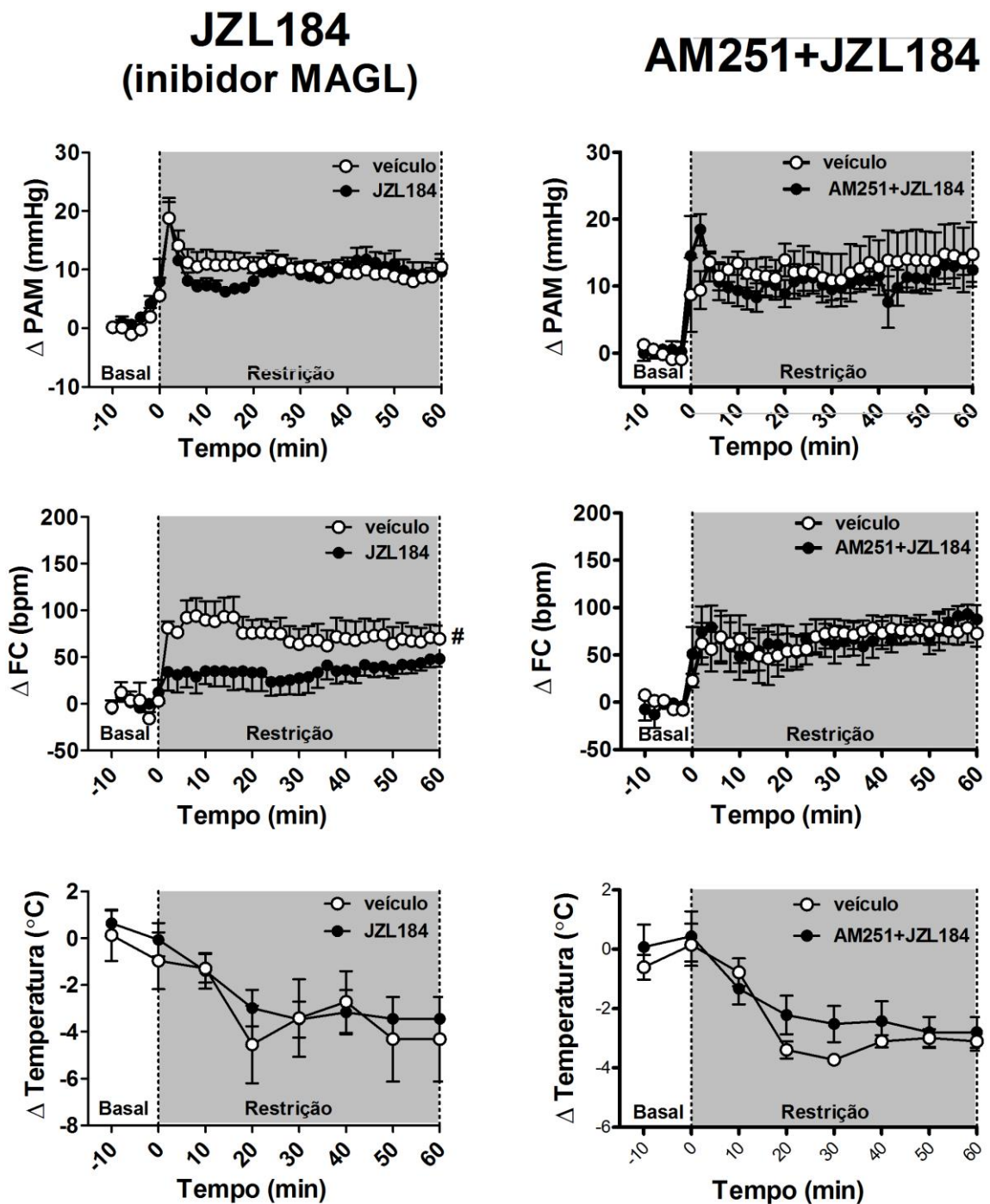


**Figura 4** - Curvas temporais de variação da pressão arterial média ( $\Delta$ PAM), frequência cardíaca ( $\Delta$ FC) e temperatura cutânea da cauda ( $\Delta$ temperatura) induzidas pelo estresse de restrição agudo em animais tratados com o inibidor da enzima FAAH (URB597) (30 pmol/100 nL) no NLET (**Esquerda**) e em animais tratados com o URB597 (30 pmol/100 nL) no NLET após pré-tratamento local com o antagonista seletivo do receptor CB<sub>1</sub>, AM251 (1pmol/100 nL) (**Direita**). A área sombreada indica o período de restrição. Círculos representam à média e as barras o EPM. # P<0,05 ao longo de todo o período de restrição em comparação com animais tratados com veículo, ANOVA seguido por teste t *post-hoc* com uma correção de Bonferroni.

### ***5.3. Efeito da microinjeção bilateral do antagonista seletivo do receptor CB<sub>1</sub> (AM251) e/ou inibidor da enzima MAGL (JZL184) nas respostas cardiovasculares desencadeadas pelo estresse de restrição agudo***

A microinjeção bilateral no NLET do inibidor de enzima MAGL, JZL184 (30 pmol/100 nL), isolado ou em combinação com AM251 (1pmol/100nL) não alterou os valores basais de PAM, FC ou temperatura cutânea da cauda (Tabela 1). O estresse de restrição agudo aumentou a PAM ( $F_{(35,432)} = 9$ ,  $P < 0,0001$ ) e a FC ( $F_{(35,432)} = 4$ ,  $P < 0,0001$ ) e reduziu a temperatura cutânea da cauda ( $F_{(7,96)} = 5$ ,  $P < 0,0001$ ) (Figura 5). O tratamento do NLET com JZL184 reduziu o aumento da FC ( $F_{(1,432)} = 86$ ,  $P < 0,0001$ ), sem afetar a diminuição da temperatura cutânea da cauda ( $F_{(1,96)} = 0,8$ ,  $P > 0,05$ ) e o aumento na PAM ( $F_{(1,432)} = 1$ ,  $P > 0,05$ ) desencadeados pelo estresse de restrição agudo (Figura 5).

O pré-tratamento do NLET com AM251 (1pmol/100 nL) aboliu completamente os efeitos do JZL184 (30 pmol / 100nL) na resposta taquicárdica desencadeada pelo o estresse agudo de restrição ( $F_{(1,354)} = 0,1$ ,  $P > 0,05$ ) (Figura 5). O tratamento combinado com AM251+JZL184 não afetou as respostas de aumento da PAM ( $F_{(1,354)} = 3$ ,  $P > 0,05$ ) e a queda da temperatura cutânea da cauda ( $F_{(1,80)} = 3$ ,  $P > 0,05$ ) (Figura 5)



**Figura 5** - Curvas temporais de variação da pressão arterial média ( $\Delta$ PAM), frequência cardíaca ( $\Delta$ FC) e temperatura cutânea da cauda ( $\Delta$ temperatura) induzidas pelo estresse de restrição agudo em animais tratados com o inibidor da enzima MAGL (JZL184) (30 pmol/100 nL) no NLET (Esquerda) e em animais tratados com o JZL184 (30 pmol/100 nL) no NLET após pré-tratamento local com o antagonista seletivo do receptor CB<sub>1</sub>, AM251 (1 pmol/100 nL) (Direita). A área sombreada indica o período de restrição. Círculos representam à média e as barras o EPM. # P<0,05 ao longo de todo o período de restrição em comparação com animais tratados com veículo, ANOVA seguido por teste t *post-hoc* com uma correção de Bonferroni.

## **6. DISCUSSÃO**

O presente estudo fornece a primeira evidência do envolvimento da neurotransmissão endocanabinóide no NLET nos ajustes cardiovasculares durante o estresse agudo de restrição. Os resultados demonstraram que a microinjeção bilateral do antagonista seletivo do receptor CB<sub>1</sub>, AM251, no NLET facilitou o aumento da FC durante o estresse agudo de restrição, porém sem afetar as respostas de aumento da pressão arterial e de diminuição da temperatura cutânea da cauda. Por outro lado, o aumento dos níveis endógenos locais de anandamida e 2-AG, mediante tratamento local do NLET com os inibidores das enzimas FAAH (URB597) e MAGL (JZL184), respectivamente, atenuou o aumento da FC desencadeado pelo estresse de restrição agudo. Os efeitos tanto do URB597 quanto do JZL184 foram abolidos após o pré-tratamento do NLET com AM251, confirmando assim que o controle das respostas cardiovasculares durante o estresse agudo de restrição pela anandamida e 2-AG no NLET são mediados pela ativação do receptor CB<sub>1</sub> local.

A facilitação da resposta taquicárdica durante o estresse de restrição agudo após o tratamento com o antagonista seletivo do receptor CB<sub>1</sub> indica um papel inibitório da neurotransmissão endocanabinóide no NLET nas respostas cardíacas durante o estresse emocional. Nossos achados corroboram com a ideia geral de que a neurotransmissão endocanabinóide suprime as respostas fisiológicas durante situações aversivas (HILL; TASKER, 2012; MORENA *et al.*, 2016), além de fornecer evidências do NLET como parte do substrato neural envolvido nos efeitos dos endocanabinóide sobre as respostas fisiológicas ao estresse.

Os resultados obtidos com os inibidores da hidrólise dos endocanabinóides (isto é, URB597 e JZL184) indicou que o controle das respostas cardiovasculares durante o estresse emocional pelo NLET pode ser mediada pela a neurotransmissão endocanabinóide através da

ação tanto da anandamida quanto do 2-AG. Este resultado corrobora com estudo anterior que reportou que a liberação de ambos os endocanabinóides modula a transmissão sináptica no NLET (PUENTE *et al.*, 2010). Estudos anteriores relataram a presença de uma liberação tônica de anandamida em algumas estruturas límbicas, como a amígdala e o hipocampo, de modo que o controle das respostas ao estresse pela neurotransmissão endocanabinóide nessas estruturas estaria relacionada com uma diminuição nos níveis desse endocanabinóide (MORENA *et al.*, 2016). Por outro lado, foi demonstrado que o estresse aumenta os níveis do endocanabinóide 2-AG em várias estruturas no encéfalo (MORENA *et al.*, 2016). Estudos eletrofisiológicos não identificaram efeitos de antagonistas do receptor CB<sub>1</sub> sobre a atividade basal de neurônios no NLET (MASSI *et al.*, 2008; PUENTE *et al.*, 2010), o que sugere ausência de uma liberação tônica de endocanabinóide no NLET. Portanto, o controle da resposta cardiovascular pela neurotransmissão endocanabinóide no NLET durante ameaças aversivas é necessariamente mediada por um aumento, e não diminuição, na formação local de anandamida e/ou 2-AG.

Estudos prévios também reportaram que as alterações nos níveis de anandamida em estruturas límbicas parecem ocorrer rapidamente durante o estresse, enquanto a liberação de 2-AG parece ser mais lenta (MORENA *et al.*, 2016). Baseado nessas evidências, a anandamida no NLET poderia controlar a resposta da FC durante as fases iniciais de estresse, enquanto a liberação de 2-AG no NLET afetaria as respostas cardiovasculares durante situações aversivas em períodos posteriores. No entanto, alterações nos níveis dos endocanabinóides especificamente no NLET nunca foi investigado. Além disso, nós observamos efeito do inibidor da enzima MAGL (enzima que hidrolisa o 2-AG) já nos períodos iniciais da sessão de estresse de restrição. Assim, mais estudos avaliando os níveis endógenos dos endocanabinóides no NLET durante situações aversivas são necessários para esclarecer a hipótese de um controle específico pela anandamida e pelo 2-AG no NLET.

A maioria dos receptores CB<sub>1</sub> são expressos em terminais de axônios, e a sua ativação suprime a liberação de outros neurotransmissores na transmissão sináptica (KATONA; FREUND, 2012). Estudos anteriores relataram que o tratamento local no NLET com um antagonista  $\alpha_1$ -adrenérgico ou um antagonista de receptores colinérgicos muscarínicos facilitou o aumento da FC induzidos pelo estresse de restrição agudo (CRESTANI, *et al.*, 2009; GOUVEIA *et al.*, 2016), o que sugere uma influência inibitória desses neurotransmissores nas respostas cardíacas durante situações aversivas. Por outro lado, um estudo recente documentou que o antagonismo de receptores do fator de liberação de corticotropina (CRF) no NLET reduziu a resposta taquicárdica induzidas pelo estresse de restrição (OLIVEIRA *et al.*, 2015), o que indica um envolvimento do CRF no NLET na geração das respostas de FC durante o estresse. Considerando essas evidências, o controle da resposta da FC durante o estresse de restrição pela neurotransmissão endocanabinóide no NLET estaria provavelmente relacionada com uma inibição da liberação de CRF local, ao invés de controle da liberação dos neurotransmissores noradrenalina e acetilcolina. No entanto, um possível controle do CRF local pela neurotransmissão endocanabinóide no NLET ainda não foi investigada. Foram identificados receptores CB<sub>1</sub> em terminais glutamatérgicos e GABAérgicos no NLET (PUENTE *et al.*, 2010), mas nenhum estudo investigou o papel desses mecanismos neuroquímicos no NLET no controle das respostas cardiovasculares ao estresse. Portanto, mais estudos são necessários para elucidar o mecanismo neuroquímico local em que a neurotransmissão endocanabinóide interage para controlar as respostas cardiovasculares durante a ameaça aversiva.

O sistema nervoso autônomo tem uma participação no controle da função cardiovascular durante estímulos aversivos (CARRIVE, 2006; DOS REIS *et al.*, 2014). Por exemplo, o bloqueio de tônus parassimpático para o coração aumentou a taquicardia induzida pelo estresse de restrição agudo, enquanto a inibição da atividade simpática cardíaca diminuiu

o aumento da FC (CRESTANI, *et al.*, 2009; DOS REIS *et al.*, 2014), o que sugere uma co-ativação do sistema nervoso simpático e parassimpático cardíacos durante o estresse de restrição agudo. O NLET possui conexões diretas com estruturas bulbares envolvidas com controle autônomo, como o núcleo do trato solitário, o núcleo ambíguo, e as regiões ventrolaterais (GRAY; MAGNUSON, 1987; DONG; SWANSON, 2004). Desse modo, esses resultados sugerem que a influência inibitória da neurotransmissão endocanabinóide no NLET nas respostas de taquicardia desencadeadas pelo o estresse de restrição agudo pode ser mediada por uma facilitação de sinais excitatórios para neurônios parassimpáticos e/ou ativação de vias inibitórias para neurônios simpáticos.

Tem sido proposto que o NLET é uma região que integra informações de estruturas límbicas como o hipocampo, a amígdala, o córtex pré-frontal e medial (CPFm), e conecta essas regiões com estruturas hipotalâmicas e do tronco cerebral envolvidas na geração das respostas fisiológicas durante o estresse emocional (ULRICH-LAI; HERMAN, 2009; CRESTANI, *et al.*, 2013; ADHIKARI, 2014). Nesse sentido, foi reportado que lesões do CPFm diminuiu a ativação de neurônios do NLET induzidos pelo estresse de restrição agudo (FIGUEIREDO *et al.*, 2003). Foram identificados receptores CB<sub>1</sub> no NLET em terminais pré-sinápticos excitatórios da região infra-límbica do CPFm (MASSI *et al.*, 2008), e a neurotransmissão endocanabinóide local atua inibindo a transmissão glutamatérgica do CPFm para o NLET (MASSI *et al.*, 2008; GLANGETAS *et al.*, 2013). Inibição sináptica do córtex infra-límbico causou atenuação da resposta de aumento da FC induzida pelo estresse de restrição, porém sem afetar a resposta da pressão arterial (TAVARES; CORRÊA; RESSTEL, 2009), indicando assim uma influência facilitatória desta região cortical nas respostas cardíacas durante a ameaça aversiva. Portanto, é possível que a liberação de endocanabinóides no NLET durante o estresse iniba informações excitatórias do córtex infra-límbico, o que resulta em inibição da resposta de FC. No entanto, aferências glutamatérgicas e GABAérgicas para o NLET também

são provenientes da amígdala e hipocampo (MYERS *et al.*, 2014), e o NLET é parte do circuito neural envolvido no controle de respostas fisiológicas exercido por essas estruturas (RODER; CIRIELLO, 1993; ZHU *et al.*, 2001). Assim, não podemos excluir a possibilidade de que o controle das respostas cardiovasculares ao estresse pela neurotransmissão endocanabinóide no NLET também seja mediada por uma modulação de informações provenientes de outras estruturas límbicas além do CPFm.



## **7. CONCLUSÃO**

Os resultados indicam que a neurotransmissão endocanabinóide no NLET, atuando via receptores CB<sub>1</sub> locais, desempenha um papel inibitório na resposta de taquicardia ao estresse agudo de restrição. Os nossos dados também fornecem evidências de que este efeito pode ser mediado pela liberação local no NLET tanto de anandamida quanto de 2-AG.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- ADHIKARI, A. Distributed circuits underlying anxiety. *Frontiers in behavioral neuroscience*, v. 8, p. 112, 2014.
- ALHEID, G. F. Extended amygdala and basal forebrain. *Ann N Y Acad Sci*, v. 985, p. 185–205, 2003.
- ALHEID, G. F.; HEIMER, L. New perspectives in basal forebrain organization of special relevance for neuropsychiatric disorders: The striatopallidal, amygdaloid, and corticopetal components of substantia innominata. *Neuroscience*, v. 27, n. 1, p. 1–39, 1988.
- BELTRAMO, M. Functional Role of High-Affinity Anandamide Transport, as Revealed by Selective Inhibition. *Science*, v. 277, n. 5329, p. 1094–1097, 1997.
- BISOGLIO, T.; LIGRESTI, A.; DI MARZO, V. The endocannabinoid signalling system: Biochemical aspects. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 81, n. 2 SPEC. ISS., p. 224–238, 2005.
- BUSNARDO, C. *et al.* Paraventricular nucleus of the hypothalamus glutamate neurotransmission modulates autonomic, neuroendocrine and behavioral responses to acute restraint stress in rats. *European neuropsychopharmacology: the journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, v. 23, n. 11, p. 1611–22, nov. 2013.
- CARRIVE, P. Dual activation of cardiac sympathetic and parasympathetic components during conditioned fear to context in the rat. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*, v. 33, n. 12, p. 1251–4, dez. 2006.
- CHOI, D. C. *et al.* Bed Nucleus of the Stria Terminalis Subregions Differentially Regulate Hypothalamic – Pituitary – Adrenal Axis Activity : Implications for the Integration of Limbic Inputs. *Animals*, v. 27, n. 8, p. 2025–2034, 2007.
- CHOI, D. C. *et al.* The anteroventral bed nucleus of the stria terminalis differentially regulates hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis responses to acute and chronic stress. *Endocrinology*, v. 149, n. 2, p. 818–826, 2008.
- CRESTANI, C.C. *et al.* Role of the bed nucleus of the stria terminalis in the cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. *Stress*, v. 12, n. 3, p. 268–78, 2009.
- CRESTANI, C. C. *et al.* Effect of acute restraint stress on the tachycardiac and bradycardiac responses of the baroreflex in rats. *Stress (Amsterdam, Netherlands)*, v. 13, n. 1, p. 61–72, 2010.
- CRESTANI, C. C. *et al.* Mechanisms in the bed nucleus of the stria terminalis involved in control of autonomic and neuroendocrine functions: a review. *Current neuropharmacology*, v. 11, n. 2, p. 141–59, 2013.
- CRUZ, F. C. *et al.* Influence of the single or combined administration of cocaine and testosterone in autonomic and neuroendocrine responses to acute restraint stress. *Journal of psychopharmacology*, v. 26, n. 10, p. 1366–1374, 2012.

DAMPNEY, R.A.L.; HORIUCHI, J.; MCDOWALL, L.M. Hypothalamic mechanisms coordinating cardiorespiratory function during exercise and defensive behaviour. *Autonomic Neuroscience*, v. 142, n. 1-2, p. 3–10, nov. 2008.

DEVANE, W. *et al.* Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science (New York, N.Y.)*, v. 258, n. 5090, p. 1946–9, 18 dez. 1992.

DINH, T. P. *et al.* Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 99, n. 16, p. 10819–24, 2002.

DONG, H.; SWANSON, L. W. Organization of axonal projections from the anterolateral area of the bed nuclei of the stria terminalis. *The Journal of comparative neurology*, v. 468, n. 2, p. 277–98, 6 jan. 2004.

DOS REIS, D. G. *et al.* Role of the autonomic nervous system and baroreflex in stress-evoked cardiovascular responses in rats. *Stress (Amsterdam, Netherlands)*, v. 17, n. 4, p. 362–72, jul. 2014.

FERREIRA-JUNIOR, N. C. *et al.* Medial prefrontal cortex endocannabinoid system modulates baroreflex activity through CB(1) receptors. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, v. 302, n. 7, p. R876–85, 2012.

FIGUEIREDO, H. F. *et al.* The medial prefrontal cortex differentially regulates stress-induced c-fos expression in the forebrain depending on type of stressor. *The European journal of neuroscience*, v. 18, n. 8, p. 2357–64, out. 2003.

GLANGETAS, C. *et al.* Stress switches cannabinoid type-1 (CB1) receptor-dependent plasticity from LTD to LTP in the bed nucleus of the stria terminalis. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 33, n. 50, p. 19657–63, 11 dez. 2013.

GLASER, S. T. *et al.* Evidence against the presence of an anandamide transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 100, n. 7, p. 4269–4274, 2003.

GOMES, F. V. *et al.* Cannabidiol administration into the bed nucleus of the stria terminalis alters cardiovascular responses induced by acute restraint stress through 5-HT<sub>1A</sub> receptor. *European neuropsychopharmacology: the journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, v. 23, n. 9, p. 1096–104, set. 2013.

GOUVEIA, M. K. *et al.* Dissociation in control of physiological and behavioral responses to emotional stress by cholinergic neurotransmission in the bed nucleus of the stria terminalis in rats. *Neuropharmacology*, v. 101, p. 379–88, fev. 2016.

GRAY, T. S. *et al.* Ibotenic acid lesions in the bed nucleus of the stria terminalis attenuate conditioned stress-induced increases in prolactin, ACTH and corticosterone. *Neuroendocrinology*, v. 57, n. 3, p. 517–24, mar. 1993.

GRAY, T. S.; MAGNUSON, D. J. Neuropeptide neuronal efferents from the bed nucleus of the stria terminalis and central amygdaloid nucleus to the dorsal vagal complex in the rat. *The Journal of comparative neurology*, v. 262, n. 3, p. 365–74, 15 ago. 1987.

- HERKENHAM, M. *et al.* Cannabinoid receptor localization in brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 87, n. 5, p. 1932–6, 1990.
- HILL, M. N.; TASKER, J. G. Endocannabinoid signaling, glucocorticoid-mediated negative feedback, and regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Neuroscience*, v. 204, p. 5–16, 1 mar. 2012.
- HILL, M.N.; MCEWEN, B.S. Involvement of the endocannabinoid system in the neurobehavioural effects of stress and glucocorticoids. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, v. 34, n. 5, p. 791–797, 2010.
- HILLARD, C. J. *et al.* Accumulation of N-arachidonylethanolamine (anandamide) into cerebellar granule cells occurs via facilitated diffusion. *Journal of neurochemistry*, v. 69, n. 2, p. 631–638, 1997.
- HOWLETT, A. C. *et al.* International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacological reviews*, v. 54, n. 2, p. 161–202, 2002.
- HOWLETT, A. C. *et al.* Cannabinoid physiology and pharmacology: 30 Years of progress. *Neuropharmacology*, v. 47, n. SUPPL. 1, p. 345–358, 2004.
- JOËLS, M.; BARAM, T. Z. The neuro-symphony of stress. *Nature reviews. Neuroscience*, v. 10, n. 6, p. 459–66, jun. 2009.
- KATONA, I.; FREUND, T. F. Multiple functions of endocannabinoid signaling in the brain. *Annual review of neuroscience*, v. 35, p. 529–58, 2012.
- KVETNANSKY, R. *et al.* Sympatho-adrenal responses of spontaneously hypertensive rats to immobilization stress. *The American journal of physiology*, v. 236, n. 3, p. H457–62, mar. 1979.
- LISBOA, S. F. *et al.* Activation of cannabinoid CB1 receptors in the dorsolateral periaqueductal gray induces anxiolytic effects in rats submitted to the Vogel conflict test. *European journal of pharmacology*, v. 593, n. 1-3, p. 73–8, 28 set. 2008.
- MASSI, L. *et al.* Cannabinoid receptors in the bed nucleus of the stria terminalis control cortical excitation of midbrain dopamine cells in vivo. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 28, n. 42, p. 10496–508, 15 out. 2008.
- MATSUDA, L. A.; BONNER, T. I.; LOLAIT, S. J. Localization of cannabinoid receptor mRNA in rat brain. *The Journal of comparative neurology*, v. 327, n. 4, p. 535–50, 22 jan. 1993.
- MCKINNEY, M. K.; CRAVATT, B.F. Structure and function of fatty acid amide hydrolase. *Annual review of biochemistry*, v. 74, p. 411–32, 2005.
- MECHOULAM, R. *et al.* Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochemical pharmacology*, v. 50, n. 1, p. 83–90, 29 jun. 1995.
- MECHOULAM, R. Marijuana chemistry. *Science (New York, N.Y.)*, v. 168, n. 3936, p. 1159–66, 5 jun. 1970.

- MORENA, M. *et al.* Neurobiological interactions between stress and the endocannabinoid system. *Neuropsychopharmacology*, v. 41, n. 1, p. 80–102, 2016.
- MUNRO, S.; THOMAS, K. L.; ABU-SHAAR, M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, v. 365, n. 6441, p. 61–5, 2 set. 1993.
- MYERS, B. *et al.* Central stress-integrative circuits: forebrain glutamatergic and GABAergic projections to the dorsomedial hypothalamus, medial preoptic area, and bed nucleus of the stria terminalis. *Brain structure & function*, v. 219, n. 4, p. 1287–303, jul. 2014.
- NEWSOM, R. J. *et al.* Cannabinoid receptor type 1 antagonism significantly modulates basal and loud noise induced neural and hypothalamic-pituitary-adrenal axis responses in male Sprague-Dawley rats. *Neuroscience*, v. 204, p. 64–73, 1 mar. 2012.
- OLIVEIRA, L. A. *et al.* CRF1 and CRF2 receptors in the bed nucleus of the stria terminalis modulate the cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. *Pharmacological research*, v. 95-96, p. 53–62, 2015.
- PACHER, P.; BÁTKAI, S.; KUNOS, G. The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacological reviews*, v. 58, n. 3, p. 389–462, set. 2006.
- PAXINOS, G.; WATSON, C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Sidney, Australia: [s.n.], 1997.
- PERTWEE, R. G. *et al.* International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub>. *Pharmacological reviews*, v. 62, n. 4, p. 588–631, dez. 2010.
- PIOMELLI, D. The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nature reviews. Neuroscience*, v. 4, n. 11, p. 873–84, nov. 2003.
- PUENTE, N. *et al.* Localization and function of the cannabinoid CB1 receptor in the anterolateral bed nucleus of the stria terminalis. *PloS one*, v. 5, n. 1, p. e8869, 2010.
- RESSTEL, L. B. M. *et al.* Anxiolytic-like effects induced by acute reversible inactivation of the bed nucleus of stria terminalis. *Neuroscience*, v. 154, n. 3, p. 869–76, 26 jun. 2008.
- RODER, S; CIRIELLO, J. Contribution of bed nucleus of the stria terminalis to the cardiovascular responses elicited by stimulation of the amygdala. *Journal of the autonomic nervous system*, v. 45, n. 1, p. 61–75, out. 1993.
- RUSSO, E.B. *et al.* Agonistic properties of cannabidiol at 5-HT<sub>1a</sub> receptors. *Neurochemical research*, v. 30, n. 8, p. 1037–43, ago. 2005.
- SCHLICKER, E; KATHMANN, M. Modulation of transmitter release via presynaptic cannabinoid receptors. *Trends in pharmacological sciences*, v. 22, n. 11, p. 565–72, nov. 2001.
- SUGIURA, T. *et al.* 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 215, n. 1, p. 89–97, 4 out. 1995.

TAVARES, R. F.; CORRÊA, F. M. A.; RESSTEL, L. B. M. Opposite role of infralimbic and prelimbic cortex in the tachycardiac response evoked by acute restraint stress in rats. *Journal of neuroscience research*, v. 87, n. 11, p. 2601–7, 15 ago. 2009.

THOMAS, B. F. *et al.* Comparative receptor binding analyses of cannabinoid agonists and antagonists. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, v. 285, n. 1, p. 285–292, 1998.

TSOU, K. *et al.* Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience*, v. 83, n. 2, p. 393–411, mar. 1998.

ULRICH-LAI, Y.M.; HERMAN, J.P. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 10, n. 6, p. 397–409, 13 jun. 2009.

VIANNA, D.M. L.; CARRIVE, P. Changes in cutaneous and body temperature during and after conditioned fear to context in the rat. *The European journal of neuroscience*, v. 21, n. 9, p. 2505–12, maio 2005.

WALKER, D. L.; MILES, L. A.; DAVIS, M. Selective participation of the bed nucleus of the stria terminalis and CRF in sustained anxiety-like versus phasic fear-like responses. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, v. 33, n. 8, p. 1291–308, 13 nov. 2009.

ZHANG, Z. Q.; JULIEN, C.; BARRÈS, C. Baroreceptor modulation of regional haemodynamic responses to acute stress in rat. *Journal of the autonomic nervous system*, v. 60, n. 1-2, p. 23–30, 27 ago. 1996.

ZHU, W. *et al.* Involvement of the bed nucleus of the stria terminalis in hippocampal cholinergic system-mediated activation of the hypothalamo--pituitary--adrenocortical axis in rats. *Brain research*, v. 916, n. 1-2, p. 101–6, 19 out. 2001.

**ANEXO A - Comitê de Ética do Uso de Animais CEUA**

Protocolo CEUA/FCF/CAr nº 35/2014

Interessado: LUCAS GOMES DE SOUZA

Orientador: Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani

Projeto: Estudo do envolvimento da sinalização endocanabinóide no núcleo leito da estria terminal nas respostas autonômicas e neuroendócrinas desencadeadas pelo estresse Poe restrição agudo em ratos

**Parecer nº 91/2015 – Comissão de Ética no Uso de Animais**

A Comissão de Ética no Uso de Animais desta Faculdade, reunida em 16 de setembro de 2015, analisou e aprovou o pedido de prorrogação do protocolo para uso de animais na pesquisa “Estudo do envolvimento da sinalização endocanabinóide no núcleo leito da estria terminal nas respostas autonômicas e neuroendócrinas desencadeadas pelo estresse Poe restrição agudo em ratos”, apresentado pelo pós-graduando LUCAS GOMES DE SOUZA, sob orientação do Professor Doutor Carlos Cesar Crestani, do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicológicos desta Faculdade.

O relatório final do protocolo de pesquisa deverá ser entregue em MARÇO de 2016 em formulário para este fim.

Araraquara, 21 de SETEMBRO de 2015.

  
Profª Drª ALEXANDRA IVO DE MEDEIROS  
Vice-coordenadora da CEUA