

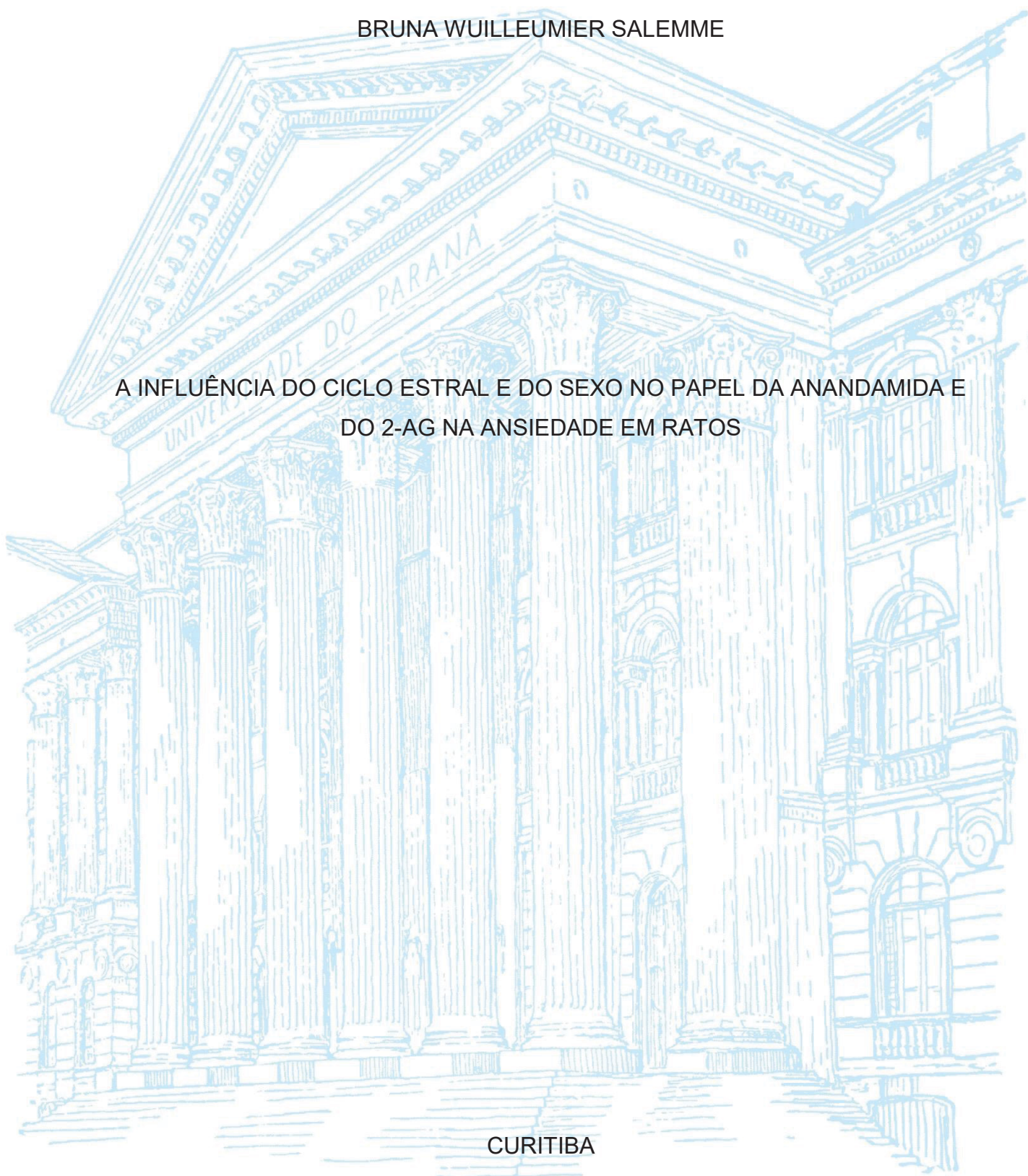
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BRUNA WUILLEUMIER SALEMME

A INFLUÊNCIA DO CICLO ESTRAL E DO SEXO NO PAPEL DA ANANDAMIDA E
DO 2-AG NA ANSIEDADE EM RATOS

CURITIBA

2022



BRUNA WUILLEUMIER SALEMME

A INFLUÊNCIA DO CICLO ESTRAL E DO SEXO NO PAPEL DA ANANDAMIDA E
DO 2-AG NA ANSIEDADE EM RATOS

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cristina Aparecida Jark Stern

CURITIBA

2022

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Salemme, Bruna Wuilleumier

A influência do ciclo estral e do sexo no papel da anandamida e do 2-AG na ansiedade em ratos / Bruna Wuilleumier Salemme.
– Curitiba, 2022.

1 recurso on-line : PDF.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná,
Setor de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em
Farmacologia.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Cristina Aparecida Jark Stern.

1. Transtornos de ansiedade. 2. Teste de labirinto em cruz elevado. 3. Ciclo estral. 4. Estradiol. I. Stern, Cristina A. J. II. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. IV. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO FARMACOLOGIA -
40001016038P0

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **BRUNA WUILLEUMIER SALEMME** intitulada: **A INFLUÊNCIA DO CICLO ESTRAL E DO SEXO NO PAPEL DA ANANDAMIDA E DO 2-AG NA ANSIEDADE EM RATOS**, sob orientação da Profa. Dra. CRISTINA APARECIDA JARK STERN, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 17 de Fevereiro de 2022.

Assinatura Eletrônica

22/02/2022 12:26:56.0

CRISTINA APARECIDA JARK STERN

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

22/02/2022 12:35:25.0

BRUNO JACSON MARTYNHAK

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

22/02/2022 14:25:28.0

FABRÍCIO DE ARAÚJO MOREIRA

Avaliador Externo (32001010)

Centro Politécnico - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 81531990 - Tel: (0xx41)3361-1693 - E-mail: pgfarmacologia@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 154069

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 154069

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente à minha orientadora, Profa. Dra. Cristina A. J. Stern, pela paciência e todos os ensinamentos nesses vários anos de orientação, dentro e fora do mestrado. Aos colegas de laboratório, Daiane, Mariana, Nathalie, e em especial, Ana Maria e Jeferson, por toda ajuda, incentivo, críticas, ensinamentos e principalmente por nunca me deixarem desistir. O Fear Memory Lab me fez uma cientista e uma pessoa melhor, e eu não teria chego aqui sem a amizade e apoio de vocês.

Aos amigos, presentes e que já partiram, à minha família, em especial meus pais, Manuel e Roselene, e minha irmã, Isabelle, e ao meu namorado, Felipe, obrigada pela paciência, compreensão e incentivo. A jornada não foi fácil, envolveu muito esforço e sacrifício, e vocês foram ímpares no caminho até aqui.

Aos professores do Departamento de Farmacologia da UFPR, obrigada pelos anos de ensinamentos, discussões, críticas e trocas. Aos funcionários e colaboradores do Departamento de Farmacologia e do Biotério do setor de Ciências Biológicas, obrigada por fazerem um trabalho impecável antes e durante essa pandemia.

Aos membros da banca, Prof. Dr. Fabrício A. Moreira e Prof. Dr. Bruno J. Martynhak, e membros suplentes, Profa. Dra. Maria A. B. F. Vital e Dr. Thiago R. da Silva, obrigada por aceitarem o convite e se disponibilizarem a avaliar e criticar meu trabalho.

Aos animais que possibilitaram a realização desse trabalho, meus sinceros agradecimentos.

À CAPES, pelo apoio financeiro para o desenvolvimento da pesquisa.

À todos que apoiaram e ajudaram de qualquer forma no desenvolvimento desse trabalho, obrigada!

Nunca duvide do sonho
(SALEMME, C.E., 1995)

RESUMO

O transtorno de ansiedade generalizada (TAG) é o transtorno mental mais prevalente no mundo, afetando consideravelmente mais mulheres do que homens. O sistema endocanabinoide (eCB) está implicado na ansiedade e transtornos afetivos, e a popularidade do uso da *Cannabis sp.* ou de medicamentos baseados na modulação do sistema eCB têm aumentado consideravelmente. Nesse sentido, as mulheres que fazem esse tipo de tratamento reportam mais efeitos adversos que homens, sendo o mais comum deles os sintomas de ansiedade. Mesmo com as estatísticas apontando para a importância de se conduzir estudos sobre ansiedade e canabinoides no sexo feminino, a maioria dos estudos pré-clínicos nessa área segue sendo conduzido em machos. Em vista disso, o objetivo desse estudo foi investigar o papel diferencial dos endocanabinoides (eCBs) anandamida (AEA) e 2-araquidonoilglicerol (2-AG) no comportamento tipo-ansioso em fêmeas em fase reprodutiva e ovariectomizadas (OVX) com e sem reposição hormonal, e por fim, comparar com machos. Utilizando o URB597 (URB), um inibidor da amida hidrolase de ácidos graxos (FAAH), e o MJN110 (MJN), um inibidor da monoacilglicerol lipase (MAGL), exploramos os efeitos da elevação dos níveis de AEA e 2-AG em fêmeas nas diferentes fases do ciclo estral, em fêmeas OVX tratadas com 17 β -estradiol (E₂) e em machos, submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado (LCE). Os parâmetros analisados foram: a porcentagem de tempo e de entradas nos braços abertos (%TBA e %EBA, respectivamente) e o comportamento de avaliação de risco (CAR), como parâmetros de comportamento tipo-ansioso; e as entradas nos braços fechado (EBF) como parâmetro de locomoção. A administração i.p. de URB 0,3 mg/kg reduziu a %TBA e a %EBA no estro, enquanto que a dose de 1,0 mg/kg aumentou a %TBA no diestro. Nenhum efeito foi encontrado no pró-estro ou quando o ciclo estral não foi considerado, sugerindo que o efeito do URB sobre a ansiedade em fêmeas foi dependente da fase do ciclo estral. Em machos, ambas as doses de URB apresentaram efeitos tipo-ansiolítico. Nas fêmeas OVX pré-tratadas com veículo, o efeito tipo-ansiolítico da menor dose do inibidor da FAAH persistiu, mas quando elas foram pré-tratadas com E₂ esse efeito foi abolido, indicando que o efeito tipo-ansiolítico do URB depende de níveis baixos de E₂. A administração i.p. de MJN 3,0 mg/kg aumentou a %TBA no estro e reduziu o CAR no estro e diestro, sugerindo um efeito ansiolítico. A redução no CAR também foi observada quando o ciclo estral não foi considerado. Nenhum efeito do MJN sobre os parâmetros avaliados foi encontrado em machos. Nas fêmeas OVX pré-tratadas com veículo, o efeito do inibidor da MAGL foi abolido, entretanto, quando houve administração de E₂, a dose de 1.0 mg/kg gerou um efeito tipo-ansiogênico, indicando que o efeito do MJN em fêmeas provavelmente depende tanto dos níveis de E₂ como de progesterona ou outros hormônios ovarianos. Juntos, nossos resultados sugerem que as fêmeas respondem de forma diferente dos machos às elevações de AEA e 2-AG. Ainda, os resultados sugerem que os efeitos da AEA sobre a ansiedade em fêmeas dependem da fase do ciclo estral, enquanto que os efeitos do 2-AG são parcialmente influenciados pelo ciclo estral, ressaltando que durante a fase reprodutiva o 2-AG pode ser mais relevante do que a AEA no controle da ansiedade em fêmeas. Por fim, esse trabalho resalta a importância dos estudos com fêmeas na pesquisa pré-clínica.

Palavras-chave: Labirinto em Cruz Elevado. Sistema endocanabinoide. Fêmeas. Estradiol. Hormônios ovarianos.

ABSTRACT

Generalized Anxiety Disorder (GAD) is the most common mental illness in the world, affecting considerably more women than men. The endocannabinoid (eCB) system has been implicated in anxiety and affective disorders, and the use of *Cannabis sp.* or drugs that modulate the eCB system has gained popularity and grown exponentially. Women that adhere to these treatments report more adverse effects than their male counterparts, the most common of them being anxiety symptoms. Even with statistics pointing towards the importance of conducting studies on anxiety and cannabinoids in the female sex, the vast majority of pre-clinical studies in this area continues to be conducted in males. The objective of this study was to investigate the differential role of the endocannabinoids (eCBs) anandamide (AEA) and 2-arachidonoylglycerol (2-AG) in the anxiety-like behavior in females in reproductive age and ovariectomized (OVX) females with and without hormone replacement, and compare those results to males. Using URB597 (URB), a fatty-acid amide hydrolase (FAAH) inhibitor, and MJN110 (MJN), a monoacylglycerol lipase (MAGL) inhibitor, we explored the effects of the elevation of AEA and 2-AG levels in females in different phases of the estrous cycle, in OVX females treated with 17 β -estradiol (E₂), and in males, submitted to the elevated plus maze test (EPM). The parameters analyzed were: percentage of open arms time and entries (%OAT and %OAE, respectively), and risk assessment behavior (RAB), as measures of anxiety-like behavior; and enclosed arms entries (EAE) as a locomotion parameter. The i.p. administration of URB 0.3 mg/kg reduced %OAT and %OAE on estrus, while the 0.1 mg/kg dose elevated the %OAT on diestrus. No effects were observed on pro-estrus or when the cycle phase was not considered, suggesting that the effect of URB in the anxiety-like behavior in females depends on the estrous cycle phase. In males, both doses of URB elicited anxiolytic-like responses. In OVX females pre-treated with vehicle, the anxiolytic-like effect of the lower dose of the FAAH inhibitor persisted, but when they were pre-treated with E₂, the effect was abolished, indicating that the anxiolytic-like effect of URB597 depends on low levels of E₂. The i.p. administration of MJN 3.0 mg/kg elevated the %OAT on estrus and reduced the RAB on estrus and diestrus, suggesting an anxiolytic-like effect. This reduction in RAB was also observed when the cycle phase was not considered. In males, no effects of MJN in the parameters evaluated were found. In OVX females pre-treated with vehicle, the effects of the MAGL inhibitor were abolished; however, when they were pre-treated with E₂, the 1 mg/kg dose elicited an anxiogenic-like response, indicating that the effects of MJN in females probably depend on E₂ levels as well as progesterone or other ovarian hormones' levels. Together, our results suggest that females respond differently than males to the elevations of AEA and 2-AG. They also suggest that the effects of AEA in the anxiety-like behavior in females depend on the estrous cycle phase, while the effects of 2-AG are partially influenced by the estrous cycle, highlighting that during the reproductive phase 2-AG might be more relevant than AEA in the anxiety control in females. In conclusion, our research highlights the importance of studies in females in pre-clinical settings.

Keywords: Elevated Plus Maze. Endocannabinoid system. Females. Estradiol. Ovarian hormones.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Ciclo estral em roedores e ciclo menstrual em mulheres.....	23
FIGURA 2 – Labirinto em Cruz Elevado.....	31
FIGURA 3 – Exemplos de citologia de lavado vaginal	32
FIGURA 4 – O efeito da inibição da FAAH no comportamento tipo-ansioso em fêmeas ciclando naturalmente	35
FIGURA 5 – O efeito da inibição da FAAH no comportamento tipo-ansioso depende da fase do ciclo estral	37
FIGURA 6 – A fase do ciclo estral não influencia o comportamento tipo-ansioso no LCE	38
FIGURA 7 – O efeito da inibição da FAAH no comportamento tipo-ansioso em machos	39
FIGURA 8 – O efeito da inibição da FAAH no comportamento tipo-ansioso depende dos níveis de estradiol	41
FIGURA 9 – O efeito da inibição da MAGL no comportamento tipo-ansioso em fêmeas ciclando naturalmente	42
FIGURA 10 – O efeito da inibição da MAGL no comportamento tipo-ansioso depende da fase do ciclo estral	44
FIGURA 11 – A fase do ciclo estral não influencia o comportamento tipo-ansioso no LCE	45
FIGURA 12 – O efeito da inibição da MAGL no comportamento tipo-ansioso em machos	46
FIGURA 13 – O efeito da inibição da MAGL no comportamento tipo-ansioso depende dos níveis de estradiol.....	48

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Comparação da média do peso dos animais experimentais	30
TABELA 2 – Resumo dos resultados obtidos	48

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

%EBA	- Porcentagem de Entradas nos Braços Abertos
%TBA	- Porcentagem de Tempo nos Braços Abertos
2-AG	- 2-araquidonoilglicerol
AA	- Ácido Araquidônico
AEA	- Anandamida; N-araquidonoilglicerol
CAR	- Comportamento de Avaliação de Risco
CB/s	- Canabinoide/s
CB1	- [receptor] Canabinoide do tipo 1
CB2	- [receptor] Canabinoide do tipo 2
CBD	- Cannabidiol
E ₂	- 17 β -estradiol
EBF	- Entradas nos Braços Fechados
eCB/s	- Endocanabinoide/s
FAAH	- Amida Hidrolase de Ácidos Graxos (<i>Fatty Acid Amide Hydrolase</i>)
GABA	- Ácido Gama-Aminobutírico
GPCR/s	- Receptor Acoplado à Proteína G (<i>G Protein Coupled Receptor</i>)
HPA	- [eixo] Hipotálamo-Pituitária-Adrenal
i.p.	- Intraperitoneal
LCE	- Labirinto em Cruz Elevado
MAGL	- Monoacilglicerol Lipase
MJN	- MJN110
OVX	- Ovariectomizada/s
P	- Progesterona
s.c.	- Subcutâneo
SNC	- Sistema Nervoso Central
TAG	- Transtorno de Ansiedade Generalizada
TRPV1	- [receptor] de Potencial Transitório Vanilóide do Tipo 1
URB	- URB597
Veh	- Veículo
Δ^9 -THC	- Δ -9-tetrahydrocannabinol

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1. TRANSTORNO DE ANSIEDADE GENERALIZADA	16
1.2. LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO	17
1.3. SISTEMA ENDOCANABINOIDE	18
1.3.1. Receptores Canabinoides	19
1.3.2. Endocanabinoides	20
1.4. SISTEMA ENDOCANABINOIDE E A ANSIEDADE	21
1.5. CICLO ESTRAL	22
1.6. SISTEMA ENDOCANABINOIDE E OS HORMÔNIOS OVARIANOS	24
1.7. ANSIEDADE E SISTEMA ENDOCANABINOIDE NO SEXO FEMININO	26
1.8. JUSTIFICATIVA	27
1.9. HIPÓTESE	27
2. OBJETIVOS	28
2.1. OBJETIVO GERAL	28
2.1.1. Objetivos específicos.....	28
3. MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1. ANIMAIS	29
3.2. DROGAS	29
3.3. OVARIECTOMIA	30
3.4. LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO	31
3.5. LAVADO VAGINAL	32
3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
3.7. DESENHO EXPERIMENTAL	34
4. RESULTADOS	35
4.1. RESULTADO 1: EFEITO DA INIBIÇÃO DA FAAH NO COMPORTAMENTO TIPO-ANSIOSO EM FÊMEAS CICLANDO NATURALMENTE	35
4.2. RESULTADO 2: AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO CICLO ESTRAL NO EFEITO DA INIBIÇÃO DA FAAH NO COMPORTAMENTO TIPO-ANSIOSO	36
4.3. RESULTADO 3: AVALIAÇÃO DO EFEITO DA INIBIÇÃO DA FAAH NO COMPORTAMENTO TIPO-ANSIOSO EM MACHOS.....	39

4.4. RESULTADO 4: AVALIAÇÃO DO EFEITO DA INIBIÇÃO DA FAAH NO COMPORTAMENTO TIPO-ANSIOSO EM FÊMEAS OVARIECTOMIZADAS COM TRATAMENTO AGUDO DE 17B-ESTRADIOL	40
4.5. RESULTADO 5: EFEITO DA INIBIÇÃO DA MAGL NO COMPORTAMENTO TIPO-ANSIOSO EM FÊMEAS CICLANDO NATURALMENTE.....	42
4.6. RESULTADO 6: AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO CICLO ESTRAL NO EFEITO DA INIBIÇÃO DA MAGL NO COMPORTAMENTO TIPO-ANSIOSO	43
4.7. RESULTADO 7: AVALIAÇÃO DO EFEITO DA INIBIÇÃO DA MAGL NO COMPORTAMENTO TIPO-ANSIOSO EM MACHOS.....	46
4.8. RESULTADO 8: AVALIAÇÃO DO EFEITO DA INIBIÇÃO DA MAGL NO COMPORTAMENTO TIPO-ANSIOSO EM FÊMEAS OVARIECTOMIZADAS COM TRATAMENTO AGUDO DE 17B-ESTRADIOL.....	47
5. DISCUSSÃO	49
5.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS	58
REFERÊNCIAS.....	59

1. INTRODUÇÃO

1.1. TRANSTORNO DE ANSIEDADE GENERALIZADA

O transtorno de ansiedade generalizada (TAG) é a doença neuropsiquiátrica mais prevalente no mundo, afetando cerca de 263 milhões de pessoas (OMS, 2017). Esse transtorno caracteriza-se pela sensação de ansiedade e preocupação excessiva, que ocorrem na maioria dos dias por pelo menos seis meses, e durante diversas situações. Essa perturbação é acompanhada de sintomas como: inquietação, fadiga, dificuldade em concentrar-se, irritabilidade, tensão muscular e perturbação do sono. Esses sintomas causam sofrimento ou prejuízo no funcionamento social e profissional, e não são consequentes do uso de substâncias ou de outra patologia (DSM-5, 2013).

O TAG é uma doença debilitante e crônica, que gera altos custos para os pacientes, para a economia e para o sistema de saúde (WITTCHEN, 2002). A comorbidade com outros transtornos psiquiátricos é comum e mais prevalente em mulheres (cerca de 1.25x maior; MCLEAN et al., 2011). A comorbidade com transtornos depressivos chega a afetar entre 40% e 67% dos pacientes com TAG (MCLEAN et al., 2011), o que aumenta a dificuldade de recuperação e diminui as taxas de remissão da doença (HOWELL et al., 2001; WITTCHEN, 2002).

Os tratamentos mais utilizados para o TAG incluem diversos tipos de psicoterapia e o tratamento farmacológico com medicamentos psicotrópicos. Os tratamentos farmacológicos mais utilizados no TAG são baseados na modulação do sistema serotoninérgico e noradrenérgico (usando inibidores seletivos da recaptação de serotonina e/ou noradrenalina e antidepressivos tricíclicos). Porém, o uso desses medicamentos traz consigo uma gama de efeitos colaterais significativos, como agitação, dor de cabeça, fadiga, confusão mental, tontura, sintomas de mania e de abstinência, além de perturbações gastrointestinais, sexuais, motoras e do sono. Além disso, possuem um prolongado tempo de início de ação, o que, em conjunto, diminui a adesão de pacientes a esses tratamentos (BANDELOW et al., 2013). O uso de benzodiazepínicos também é comum, visto que eles possuem um início de ação mais rápido, podendo ser usados em conjunto com os antidepressivos no começo do tratamento. Entretanto, esses medicamentos causam dependência em cerca de 40% dos pacientes em tratamento prolongado e por isso só devem ser usados por períodos curtos (até 8 semanas; BANDELOW et al., 2013).

Os tratamentos farmacológicos para o TAG têm eficácia entre 44% e 81% (BANDELOW et al., 2013) porém, a grande incidência de efeitos colaterais e possibilidade de dependência causados por esses medicamentos incentivou a busca por outros compostos ansiolíticos que não apresentassem essas desvantagens. Com a crescente legalização dos produtos à base de *Cannabis*, houve um aumento da adesão de pacientes com TAG aos tratamentos com esse tipo de produto (FREEMAN et al., 2019), sendo a ansiedade o motivo de uso da *Cannabis* medicinal para mais de 50% dos pacientes (CUTTLE; MISCHLEY; SEXTON, 2016; WEBB; WEBB, 2014). Entretanto, assim como os tratamentos mais clássicos, o uso de *Cannabis* pode causar efeitos colaterais. Paradoxalmente, um dos efeitos adversos mais comuns é a ansiogênese, afetando 2x mais mulheres do que homens (AVIRAM et al., 2021). Desse modo, há grande interesse no desenvolvimento de fármacos que modulem o sistema endocanabinoide (eCB) de modo que ainda se mantenham os efeitos benéficos da planta, mas que diminuam os efeitos colaterais e os efeitos indesejados.

1.2. LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

O Labirinto em Cruz Elevado (LCE) é um dos testes pré-clínicos mais populares atualmente utilizados. É frequentemente utilizado na seleção de drogas com efeitos no comportamento tipo-ansioso (FLORES et al., 2020; GUIMARÃES et al., 1990; NOMIKOS; SPYRAKI, 1988; PAVÓN et al., 2021; SCIOLINO; ZHOU; HOHMANN, 2011), mas também é útil no estudo das bases biológicas da emocionalidade relativa ao aprendizado e memória, dor, hormônios, dependência e diversos dos subtipos de transtornos de ansiedade, como o TAG, fobias e o estresse pós-traumático (CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005).

O LCE é considerado um modelo animal “etológico” para o estudo da ansiedade, de modo que a aversão gerada pelo teste tem um significado ecológico para o animal, envolvendo a exploração espontânea do ambiente na ausência de recompensas (CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005). Também é considerado um modelo incondicionado, o que implica que a tarefa é aversiva *per se* – devido à altura e o espaço aberto – fazendo com que exista uma clara preferência dos animais pela segurança dos braços fechados (HOGG, 1996; WALF; FRYE, 2007b).

Os parâmetros analisados no teste consistem em parâmetros de evitação (*avoidance*) e de avaliação de risco. Os índices clássicos de comportamento tipo-

ansioso no LCE são medidas espaço-temporais de evitação do braço aberto – a porcentagem de tempo e entradas nos braços abertos (%TBA e %EBA, respectivamente; PELLOW et al., 1985; PELLOW; FILE, 1986). Drogas com efeito tipo-ansiolítico, como o midazolam, causam aumento %TBA e %EBA, em relação aos animais controle, e elas podem ser utilizadas como controle positivo quando testando o efeito de novas drogas sobre o comportamento tipo-ansioso (RUBINO et al., 2008).

O comportamento de avaliação de risco (CAR) está intimamente relacionado com o medo e a ansiedade, agindo para guiar as estratégias comportamentais em situações potencialmente perigosas. Ele é considerado um parâmetro de análise do comportamento etológico do LCE, podendo ser mais sensível a drogas que modulam o comportamento tipo-ansioso do que os parâmetros de evitação (CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005; MIKICS et al., 2005). O número de entradas nos braços fechados (EBF) é utilizado neste teste como um parâmetro de locomoção - ajudando a identificar respostas que podem estar relacionadas com a hipo ou hiper-locomoção (HOGG, 1996; PELLOW; FILE, 1986).

1.3. SISTEMA ENDOCANABINOIDE

O sistema eCB é um sistema ubíquo de sinalização lipídica que é altamente conservado evolutivamente e está presente em todos os vertebrados, exibindo importantes funções regulatórias tanto no sistema nervoso central (SNC) como na maioria dos sistemas periféricos (BATTISTA et al., 2012; RODRÍGUEZ DE FONSECA et al., 2005).

O sistema eCB é composto pelos receptores canabinoides do tipo 1 (CB1) e 2 (CB2), seus ligantes endógenos anandamida (N-araquidonoiletanolamida; AEA) e 2-araquidonoilglicerol (2-AG), além de outras etanolamidas de ácidos graxos como oleoiletanolamida e palmitoiletanolamida, e suas enzimas de síntese e degradação.

O caminho para o seu descobrimento começou em 1940, com o isolamento de um constituinte da *Cannabis sp.*, o canabidiol (CBD; ADAMS; HUNT; CLARK, 1940; JACOB; TODD, 1940), seguido do componente ativo dessa planta, o Δ -9-tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC, GAONI; MECHOULAM, 1964). Depois, foi descoberto e caracterizado o receptor CB1 (DEVANE et al., 1988), posteriormente a AEA (DEVANE et al., 1992), o receptor CB2 (MUNRO; THOMAS; ABU-SHAAR, 1993) e o 2-AG

(MECHOULAM et al., 1995). Desde então vêm crescendo os estudos e o interesse por esse sistema altamente relevante para as mais diversas doenças e sintomas.

É particularmente interessante a implicação do sistema eCB em doenças neuropsiquiátricas, incluindo os transtornos de humor, afetivos e de ansiedade, onde ele se destaca nas pesquisas pré-clínicas como um potencial alvo terapêutico para o tratamento dessas doenças (HILL; GORZALKA, 2009; LOMAZZO et al., 2015; MOREIRA et al., 2008; MORENA et al., 2016a; THORNTON et al., 2021).

1.3.1. Receptores Canabinoides

O receptor CB1, no cérebro de ratos, foi descoberto em 1988 por Howlett e colaboradores (DEVANE et al., 1988). Ele é um receptor acoplado à proteína $G_{i/o}$ (GPCR) e está entre os GPCRs mais abundantes no cérebro. A maior densidade de receptores CB1 no cérebro de roedores está nos núcleos da base, na substância negra, no *globus pallidus*, no cerebelo e no hipocampo. Esse receptor tem grande importância na motivação e cognição, e parece estar envolvido na transmissão GABAérgica e glutamatérgica, sendo encontrado nesses neurônios. Os receptores CB1 são majoritariamente encontrados na pré-sinapse de neurônios centrais e periféricos, facilitando a inibição da liberação de neurotransmissores, uma das maiores funções do sistema eCB. Esses receptores podem, ainda, formar complexos com outros GPCRs que se ligam a diferentes tipos de canais de cálcio e potássio, aumentando seu repertório de funções (MECHOULAM; PARKER, 2013).

A sinalização eCB ocorre de forma retrógrada, onde a liberação de neurotransmissores na pré-sinapse e a consequente ativação de receptores na pós-sinapse levam a um aumento do cálcio intracelular, que por sua vez estimula a biossíntese de eCBs na pós-sinapse. Depois da sua biossíntese, os eCBs migram da pós-sinapse para a pré-sinapse, onde ativam os receptores CB1, e a ativação desses GPCRs levam à inibição da adenilil ciclase e à regulação dos canais iônicos, que suprimem a liberação de neurotransmissores. Após a sua ação, são degradados por enzimas específicas (MORENA et al., 2016a).

O receptor CB2 também é um GPCR e foi descoberto em 1993 por Munro e colaboradores (MUNRO; THOMAS; ABU-SHAAR, 1993). Acreditava-se que esse receptor era exclusivamente periférico e expresso em células do sistema imune, entretanto, ele já foi identificado no SNC, especialmente em células da micróglia.

Acredita-se que ele possa fazer parte de um sistema de proteção geral anexo ao sistema imune, sendo responsável por diversos efeitos protetores (MECHOULAM; PARKER, 2013).

1.3.2. Endocanabinoides

A AEA foi o primeiro eCB a ser descoberto, em 1992 (DEVANE et al., 1992). Ela é um derivado do Ácido Araquidônico (AA), sintetizada sob demanda a partir de precursores fosfolipídicos pela N-acetiltransferase e pela fosfolipase D (MORENA et al., 2016a). Os maiores níveis de AEA são encontrados em regiões cerebrais com grande expressão de receptores CB1, como hipocampo, estriado, cerebelo e córtex. Dentre os efeitos causados pela AEA, encontram-se a tétrede canabinoide - antinocicepção, hipotermia, hipolocomoção e catalepsia (SVÍŽENSKÁ; DUBOVÝ; ŠULCOVÁ, 2008). A AEA age tanto em receptores CB1 como CB2, tendo significativa seletividade e alta afinidade pelo receptor CB1, e baixa afinidade pelo receptor CB2 (PALMER; KHANOLKAR; MAKRIYANNIS, 2000). Além de se ligar aos receptores CBs, a AEA pode agir como agonista total ou parcial dos receptores de potencial transitório vanilóide tipo 1 (TRPV1; ROSS, 2003), entretanto, apresenta baixa afinidade por esses receptores (MECHOULAM; PARKER, 2013). A AEA tem sua atividade terminada pela enzima amida-hidrolase de ácidos graxos (FAAH), na pós-sinapse, onde é hidrolisada em AA e etanolamina (MECHOULAM; FRIDE; DI MARZO, 1998; MORENA et al., 2016a). A FAAH tem distribuição por todo o cérebro, tendo maior concentração em áreas ricas em receptores CB1, como o hipocampo, córtex, cerebelo e tálamo (THOMAS et al., 1997), e foi demonstrado que sua inibição causa aumento significativo dos níveis de AEA no cérebro de roedores (BEDSE et al., 2018).

O 2-AG foi descoberto logo após a AEA, em 1995 (MECHOULAM et al., 1995). É um derivado do AA, de estrutura semelhante à AEA, sintetizado sob demanda à partir do fosfatidilinositol, pela fosfolipase C e pela diacilglicerol lipase (MORENA et al., 2016a). Os maiores níveis de 2-AG foram encontrados no tálamo e no hipocampo, e ele tem efeitos na função imune, proliferação celular, desenvolvimento embrionário, potenciação de longa duração no hipocampo, neuroproteção, neuromodulação, função cardiovascular e respostas inflamatórias (SVÍŽENSKÁ; DUBOVÝ; ŠULCOVÁ, 2008). Além disso, sua administração intravenosa, em camundongos, leva à expressão dos efeitos da tétrede canabinoide (MECHOULAM et al., 1995). O 2-AG

age tanto em receptores CB1 como CB2, tendo maior afinidade pelo receptor CB1 (MECHOULAM et al., 1995). A afinidade do 2-AG pelo receptor CB1 é menor do que a da AEA (LIN et al., 1998), porém os níveis de 2-AG no cérebro são 170x maiores que os de AEA (STELLA; SCHWEITZER; PIOMELLI, 1997; SUGIURA et al., 1995) o que coloca o 2-AG como um dos principais neuromoduladores do sistema eCB (DI MARZO, 1999). O 2-AG tem sua ação terminada majoritariamente pela enzima monoacilglicerol lipase (MAGL) na pré-sinapse e minoritariamente pela alfa-beta-hidrolase 6/12, na pós-sinapse (MORENA et al., 2016a). A MAGL é expressa primariamente no hipocampo, cerebelo, núcleo anterodorsal do tálamo, e córtex, regiões em que há alta densidade de receptores CB1 (DINH et al., 2002). A MAGL termina a ação do 2-AG através da sua hidrólise em AA e glicerol (MORENA et al., 2016a), e foi demonstrado que a sua inibição resulta em aumentos significativos da concentração de 2-AG no cérebro de roedores (BEDSE et al., 2018).

A ação da maioria dos agonistas de receptores CBs, incluindo dos eCBs, é bifásica de modo dose-dependente – ou seja, enquanto doses baixas desses compostos apresentam uma ação, doses altas podem apresentar uma ação oposta (REY et al., 2012; SALVIATO et al., 2021; SULCOVA; MECHOULAM; FRIDE, 1998).

1.4. SISTEMA ENDOCANABINOIDE E A ANSIEDADE

A *Cannabis* tem sido usada medicinalmente há milênios, para um grande número de doenças e para melhorar o estado físico e mental dos seus usuários (MECHOULAM, 1986). Pacientes que fazem o uso de *Cannabis* ou seus derivados relatam uma melhora da ansiedade e seus sintomas relacionados (FREEMAN et al., 2019; MAHABIR et al., 2020). Esses relatos se relacionam com a influência do sistema eCB em áreas que modulam a emocionalidade, medo, ansiedade e respostas ao estresse, originada por um alto nível de receptores CB1 no hipocampo, amígdala, cortex pré-frontal e córtex cingulado anterior (HOWLETT et al., 1990; MECHOULAM; PARKER, 2013). O sistema eCB modula, ainda, o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), que está altamente implicado nas respostas ao estresse (STEINER; WOTJAK, 2008). Relacionado a isso, a disfunção do sistema límbico – composto pelo hipocampo, amígdala, hipotálamo e córtex pré-frontal medial – tem papel ímpar em diversas doenças neuropsiquiátricas relacionadas ao estresse, como depressão, transtorno do estresse pós-traumático e TAG (HERMAN et al., 2005).

Em roedores, a ativação de receptores CB1, assim como o aumento da concentração de eCBs como a AEA e o 2-AG, em áreas do sistema límbico como a amígdala, o hipotálamo, o hipocampo e a substância cinzenta periaquedutal, foram relacionados com respostas tipo-ansiolíticas (DANANDEH et al., 2018; KATHURIA et al., 2003; MARCO et al., 2004; SCHERMA et al., 2008; SCIOLINO; ZHOU; HOHMANN, 2011). Do mesmo modo, o bloqueio de receptores CB1, assim como a diminuição da concentração de AEA e 2-AG, foram relacionados com respostas tipo-ansiolíticas (GUNDUZ-CINAR et al., 2013; HILL et al., 2005; MORENA et al., 2016b). Esses estudos reforçam a importância do sistema eCB na modulação da ansiedade.

1.5. CICLO ESTRAL

Ciclo estral é como é denominado o ciclo reprodutivo em ratas. Ele tem duração média de 4 dias a partir da maturidade sexual e pode ser dividido em três fases: pró-estro, estro, diestro (Figura 1). Em um ciclo de 4 dias o diestro tem duração de 2 dias. Durante o pró-estro há aumentos dos níveis de estradiol (E_2) e maturação dos folículos ovarianos; a ovulação ocorre entre o fim do pró-estro e início do estro, quando há um pico de hormônio luteinizante, que é acompanhado de um aumento de progesterona (P). No diestro há baixos níveis tanto de E_2 como de P (MAEDA; OHKURA; TSUKAMURA, 2000). O anestro é considerado o período final da senescência reprodutiva em roedores, podendo também ser chamado de anestro persistente ou diestro persistente (WESTWOOD, 2008). É caracterizado por uma baixa de hormônios ovarianos e foi utilizado aqui para se referir à “fase” em que se encontram as fêmeas ovariectomizadas (OVX).

Em mulheres, o ciclo menstrual tem duração variável, entre 26-34 dias para mulheres de 15 a 45 anos (GOLDMAN; HATCH, 1999), sendo composto de três fases: o período menstrual (com duração de cerca de 5 dias), a fase folicular (com, em média, 14 dias) e a fase lútea (com, em média, 13 dias; ECOCHARD; GOUGEON, 2000). A ovulação ocorre entre a fase folicular e a fase lútea. Ainda, o padrão de flutuação hormonal em mulheres é diferente do observado em roedores (Figura 1; DONNER; LOWRY, 2013).

Mesmo com diversas diferenças entre o ciclo menstrual e o ciclo estral, investigar a influência do ciclo estral na modulação eCB ajuda a esclarecer o papel

diferencial dos hormônios envolvidos nesses ciclos – o que tem alto valor translacional.

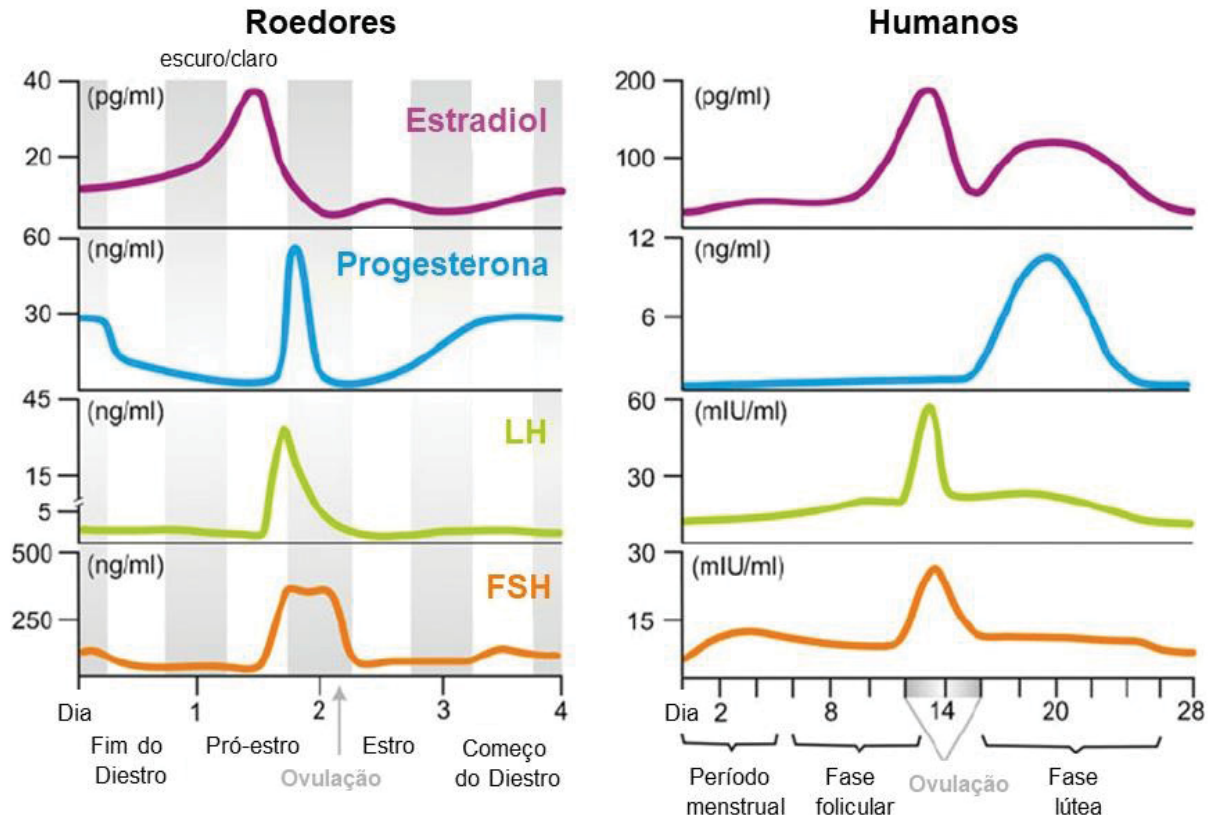


Figura 1. Ciclo estral em roedores e ciclo menstrual em mulheres. Imagem esquemática da flutuação hormonal que ocorre durante as fases do ciclo estral em ratas e durante as fases do ciclo menstrual em humanos (modificado de DONNER; LOWRY, 2013).

1.6. SISTEMA ENDOCANABINOIDE E OS HORMÔNIOS OVARIANOS

Em fêmeas foi relatado que a concentração de AEA e 2-AG varia de acordo com a fase do ciclo estral assim como com a região cerebral analisada. Na pituitária os níveis de AEA e 2-AG estão elevados no pró-estro, mas os mesmos se encontram diminuídos no hipocampo nessa mesma fase do ciclo estral. Já no hipotálamo, a concentração desses eCBs se encontra elevada no diestro. Quando comparado aos machos, os níveis de 2-AG na pituitária estavam diminuídos em relação às fêmeas em todas as fases do ciclo estral, assim como a AEA e 2-AG no hipotálamo. No entanto, a AEA encontra-se aumentada no hipocampo de machos (BRADSHAW et al., 2006).

Também foi demonstrado que a densidade de receptores CBs e a afinidade dos ligantes por esses receptores muda de acordo com a região cerebral e com a fase do ciclo estral. No hipotálamo a densidade de receptores estava aumentada no diestro, mas a afinidade dos ligantes permaneceu inalterada; enquanto no prosencéfalo basal, a densidade de receptores era comparável entre machos e fêmeas em todas as fases do ciclo, mas a afinidade dos ligantes estava aumentada em machos e em fêmeas no diestro, e diminuída em fêmeas no estro (DE FONSECA et al., 1994). Ainda, foi demonstrado que a expressão de receptores CBs é regulada pelo E₂, de maneira dependente da região cerebral. Foi demonstrado que o E₂ exerce um efeito positivo na expressão de receptores CBs na amígdala, enquanto diminui a expressão desses receptores no hipotálamo e hipocampo. Essa quantidade maior de receptores na amígdala pode contribuir para uma maior sensibilidade das fêmeas aos efeitos tipo-ansiolíticos dos CBs (RIEBE et al., 2010).

Nesse sentido, um estudo do nosso grupo mostrou que fêmeas apresentam tanto efeitos tipo-ansiolíticos como tipo-ansiolíticos com doses de Δ^9 -THC que são sub efetivas em machos (SALVIATO et al., 2021). Ainda, estudos mostraram que agonistas CB1 (i.e. Δ^9 -THC, 11-OH-THC e CP55,940) são mais potentes em fêmeas do que em machos em modelos de dor aguda e crônica, quanto à diminuição da alodinia e hiperalgisia (CRAFT, 2012; CRAFT; KANDASAMY; DAVIS, 2013; ROMERO et al., 2002; TSENG; CRAFT, 2001).

Também foi demonstrado que os agonistas CB1 diminuem mais potentemente a atividade locomotora espontânea em fêmeas do que em machos (CRAFT, 2012; TSENG; CRAFT, 2001; WEED et al., 2016; WILEY et al., 2017).

Entretanto, um estudo mostrou que uma dose baixa de Δ^9 -THC foi capaz de aumentar a atividade locomotora em fêmeas mas não em machos (WILEY; BURSTON, 2014), sugerindo que as fêmeas são mais sensíveis aos efeitos dos CBs na atividade locomotora (COOPER; CRAFT, 2018). Em concordância, um estudo mostrou que o tratamento crônico com o inibidor da MAGL, JZL184, exacerbou o aumento de atividade resultante do estresse no início da vida em fêmeas, mas não em machos. Esse estudo mostrou, ainda, que o JZL184 teve efeito tipo-antidepressivo em machos não estressados, mas não em fêmeas (ALTEBA et al., 2020). De modo complementar, dois estudos independentes de Carnevali e colaboradores demonstraram que o tratamento com URB694 (um inibidor seletivo da FAAH) em fêmeas socialmente isoladas, assim como em machos que passaram por derrota social, reverte o comportamento tipo-depressivo observado após o estresse, de modo independente do ciclo estral (CARNEVALI et al., 2015, 2020).

Com relação ao comportamento de medo condicionado, foi demonstrado que a inibição da FAAH ou da MAGL não modificaram o comportamento de medo em machos. Entretanto, em fêmeas, a inibição da FAAH prejudicou a extinção da memória de medo através da ativação de receptores TRPV1, enquanto a inibição da MAGL favoreceu respostas de medo ativas invés de passivas, através da ativação CB1 (MORENA et al., 2021). Em conjunto esses trabalhos ressaltam a existência de diferenças importantes na modulação do sistema eCB entre os sexos, além da importância de entender essas diferenças frente à falta de estudos que as relacione com os hormônios e o ciclo estral em fêmeas.

1.7. ANSIEDADE E SISTEMA ENDOCANABINOIDE NO SEXO FEMININO

O TAG é mais prevalente em mulheres – sendo elas cerca de 63% das pessoas com esse transtorno (OMS, 2017) – e a incidência de efeitos colaterais do tratamento do TAG com produtos derivados de *Cannabis* também é mais prevalente em mulheres, sendo que o sintoma mais relatado é o aumento da ansiedade (AVIRAM et al., 2021).

Já foi demonstrado que o sexo, ciclo estral e os hormônios gonadais influenciam diversas funções não relacionadas com a reprodução, especialmente as respostas fisiológicas à estressores (MARCONDES et al., 1996; VIAU; MEANEY, 1991). Os níveis basais de comportamento tipo-ansioso podem variar em um mesmo animal, dependendo de uma gama de fatores internos (como o sexo e o ciclo estral) e externos que afetam os níveis de neurotransmissores no SNC. Essa variação influencia a percepção da dificuldade causada por um estressor, modificando o nível de estimulação do sistema límbico, dos nervos simpáticos e do eixo HPA (MARCONDES et al., 2001).

Foi demonstrado, em ratos, que fêmeas passam mais tempo nos braços abertos do LCE que machos, indicando um nível basal de comportamento tipo-ansioso mais baixo em fêmeas (JOHNSTON; FILE, 1991). Também foi demonstrado que ratas no pró-estro e estro apresentam mais tempo e entradas nos braços abertos do que ratas no diestro (DÍAZ-VÉLIZ, 1997), indicando que o ciclo estral *per se* tem efeito no comportamento tipo-ansioso. A flutuação dos hormônios ovarianos afeta a atividade neuronal através da modulação da síntese e metabolismo de neurotransmissores, além de influenciar na atividade e quantidade de receptores – por exemplo os receptores de serotonina e GABA_A – onde agem compostos tipo-ansiolíticos/ansiógênicos (MARCONDES et al., 2001). Isso também é verdade para o sistema eCB, onde foi demonstrado que os níveis de eCBs (BRADSHAW et al., 2006) assim como a quantidade de receptores CBs e a afinidade dos seus ligantes (DE FONSECA et al., 1994) mudam de acordo com a flutuação hormonal em ratas.

Entretanto, a grande maioria dos estudos pré-clínicos envolvendo CBs e sua influência no comportamento tipo-ansioso foram feitos em machos (AVIRAM et al., 2021), e aqueles que incluíram fêmeas, não consideram o sexo e a fase do ciclo estral como parâmetros nas análises (COOPER; CRAFT, 2018).

1.8. JUSTIFICATIVA

Devido ao crescente número de evidências apontando para a importância das diferenças sexuais e das flutuações hormonais do ciclo estral nos efeitos do sistema eCB no comportamento tipo-ansioso e a deficiência de estudos pré-clínicos que buscam entender essas diferenças, buscamos suprir em parte essa necessidade e incentivar a produção científica dessa área, com intuito de preencher o vazio de conhecimento científico em volta do funcionamento do sistema endocanabinoide em fêmeas.

1.9. HIPÓTESE

Fêmeas respondem de forma diferente aos CBs, de modo que a AEA e o 2-AG possivelmente tenham papéis distintos entre os sexos, sendo o 2-AG potencialmente mais relevante nas respostas tipo-ansiosas nas fêmeas. Ainda, essas diferenças parecem estar relacionadas com a fase do ciclo estral e os níveis de hormônios ovarianos.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Investigar o papel da AEA e do 2-AG no comportamento tipo-ansioso em ratos Wistar fêmeas ciclando naturalmente e ovariectomizadas com e sem reposição hormonal, e comparar com machos.

2.1.1. Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do tratamento com o inibidor da FAAH, URB597, no comportamento tipo-ansioso em fêmeas ciclando naturalmente.
- Avaliar o efeito do tratamento com o inibidor da MAGL, MJN110, no comportamento tipo-ansioso em fêmeas ciclando naturalmente.
- Avaliar o efeito do tratamento com o inibidor da FAAH, URB597, no comportamento tipo-ansioso em machos.
- Avaliar o efeito do tratamento com o inibidor da MAGL, MJN110, no comportamento tipo-ansioso em machos.
- Avaliar o efeito do tratamento com o inibidor da FAAH, URB597, no comportamento tipo-ansioso em fêmeas ovariectomizadas que receberam um pré-tratamento agudo com 17β -estradiol.
- Avaliar o efeito do tratamento com o inibidor da MAGL, MJN110, no comportamento tipo-ansioso em fêmeas ovariectomizadas que receberam um pré-tratamento agudo com 17β -estradiol.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar machos e fêmeas adultos, com cerca de 75 dias (250-350 g), obtidos no biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Os animais foram mantidos em gaiolas de policarbonato (480x375x210 mm), em grupos de quatro animais por gaiola, separados por sexo. Os animais permaneceram em um ciclo claro-escuro de 12 h (fase clara começando às 7:00), em temperatura controlada de 22 ± 2 ° C, com água e comida *ad libitum*. Todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA) sob o número 1272, de acordo com a legislação brasileira e as diretrizes ARRIVE (PERCIE DU SERT et al., 2020).

3.2. DROGAS

As drogas utilizadas foram o inibidor da FAAH, URB597 (URB; Cayman, EUA), nas doses de 0.1 ou 0.3 mg/kg, diluído em NaCl 0.9% (Ph = 7.4) contendo 5% de Tween 80[®]; e o inibidor da MAGL, MJN110 (MJN; Sigma, EUA), nas doses de 1 ou 3 mg/kg, diluído em NaCl 0.9% (pH = 7.4) contendo 10% de DMSO e 5% de Tween 80[®]. As drogas foram preparadas imediatamente antes do uso e administradas intraperitonealmente (i.p.) em um volume de 1 ml/kg. Foi utilizado também o 17 β -estradiol (E₂, 0.1 μ g/kg, Sigma, EUA; ÖSTERLUND et al., 1998), diluído em óleo de canola. A solução foi preparada imediatamente antes do uso e administrada por via subcutânea (s.c.) em volume de 0.1 ml/100 g.

As doses de URB, MNJ e E₂ foram escolhidas com base na literatura que mostra um efeito ansiolítico do URB, ausência de efeitos do MJN em machos e ausência de efeitos do E₂ na ansiedade em fêmeas (DANANDEH et al., 2018; GERRITS et al., 2005; HORST et al., 2009; ÖSTERLUND et al., 1998; SCHERMA et al., 2008; SERRANO et al., 2018; THORNTON et al., 2021).

3.3. OVARIECTOMIA

A cirurgia foi realizada como previamente descrito (BRITO et al., 2016). As ratas foram anestesiadas com uma combinação de cetamina e xilazina (33/6.5 mg/kg, i.p.), em seguida foi realizada a tricotomia e assepsia da região abdominal (suprapúbica) com álcool iodado. Foi realizada a laparotomia na região central (2 cm) e em seguida as tubas uterinas foram atadas com fio de sutura reabsorvível (CatGut) e os ovários foram removidos junto com a gordura adjacente. A incisão foi fechada internamente com CatGut, e externamente com sutura de nylon. Após a cirurgia os animais receberam uma dose de antibiótico (7500 um/100 g de peso corporal, Pentabiótico Veterinário, Zoetis, Brasil) e analgésico (Cetoprofeno, 5 mg/ 100 g de peso corporal) por via intramuscular, e foram mantidos em observação numa caixa aquecida por pelo menos 2 horas. 24 horas após a cirurgia os animais receberam analgesia de manutenção (Ibuprofeno, 2.5 mg/100 g de peso corporal) via oral, e se recuperaram por 21 dias antes do teste.

Foi descrito que a OVX causa um aumento significativo de peso corporal (WEGORZEWSKA et al., 2008), a tabela 1 mostra a diferença de peso entre ratas ciclando naturalmente, ratas pré- e pós-ovariectomia e machos. O ganho de peso pós-ovariectomia está de acordo com o mostrado na literatura, e o peso tanto de fêmeas como de machos está dentro da normalidade para os padrões do biotério do setor de Ciências Biológicas da UFPR.

TABELA 1. Comparação da média do peso dos animais experimentais

Condição	Peso (média ± E.P.M)	
Ciclando naturalmente	238 ± 3.58	
OVX	Pré-cirurgia	237 ± 2.59
	Pós-cirurgia	293 ± 3.63
Machos	359 ± 5.87	

Médias obtidas a partir dos pesos dos animais utilizados nos experimentos 1-8 no dia do teste, com exceção do peso pré-cirurgia, que foi obtido 21 dias antes do teste.

3.4. LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

O aparato consiste em dois braços abertos (50 x 10 x 0.5 cm) e dois braços fechados (50 x 10 x 40 cm), em forma de cruz em volta de uma plataforma central (10 x 10 cm), feitos de madeira pintada de preto, elevados a 50 cm do chão (Figura 2).

Os animais foram colocados na plataforma central voltados para um braço fechado e podiam explorar o aparato por 5 minutos. Os testes foram gravados com o auxílio de uma câmera posicionada acima do aparato, e analisados posteriormente por um experimentador treinado, cego para os grupos experimentais, que mediu o tempo e as entradas nos braços abertos e fechados, e o número de CAR (quando o animal se volta com a cabeça e pelo menos uma pata para um dos braços abertos, e depois retorna à sua posição original; CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005). Esses dados foram utilizados para calcular a %TBA $[(\text{tempo nos braços abertos}/300) \times 100]$ e %EBA $[\text{entradas nos braços abertos}/(\text{entradas nos braços abertos} + \text{fechados}) \times 100]$, como parâmetros de comportamento tipo-ansioso. O CAR foi utilizado como um terceiro parâmetro de comportamento tipo-ansioso e as entradas nos braços fechados (EBF) foram utilizadas como parâmetro de locomoção.

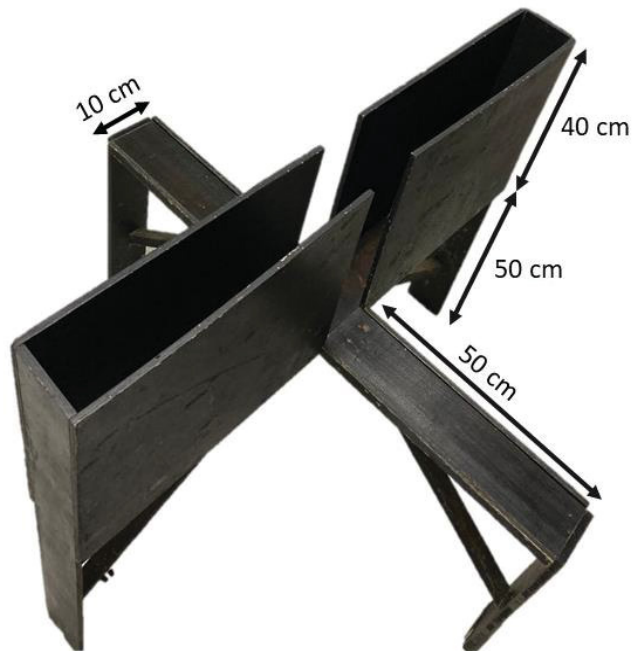


Figura 2. Labirinto em Cruz Elevado. O aparato consiste em dois braços abertos (50 x 10 x 0.5 cm) e dois braços fechados (50 x 10 x 40 cm), em forma de cruz em volta de uma plataforma central (10 x 10 cm), feitos de madeira pintada de preto, elevados a 50 cm do chão (Foto: a autora).

3.5. LAVADO VAGINAL

O lavado vaginal foi realizado imediatamente após o teste no LCE, em todas as fêmeas, com o intuito de evitar a manipulação e estresse prévio nos animais. Uma micropipeta foi utilizada para injetar 50 µl de salina estéril no canal vaginal e coletar esse líquido de 2 a 3 vezes antes de ser depositado em uma lâmina de vidro. O lavado foi analisado utilizando um microscópio óptico (Centauro) para identificar as células presentes e determinar a fase do ciclo estral ou o anestro nas fêmeas OVX. Foi considerado que o pró-estro contém predominantemente células epiteliais nucleadas, enquanto o estro contém predominantemente células cornificadas anucleadas, e o diestro contém predominantemente leucócitos; enquanto que o anestro contém poucas ou nenhuma célula, ou uma quantidade grande leucócitos (Figura 3; DA SILVA et al., 2016; MARCONDES; BIANCHI; TANNO, 2002).

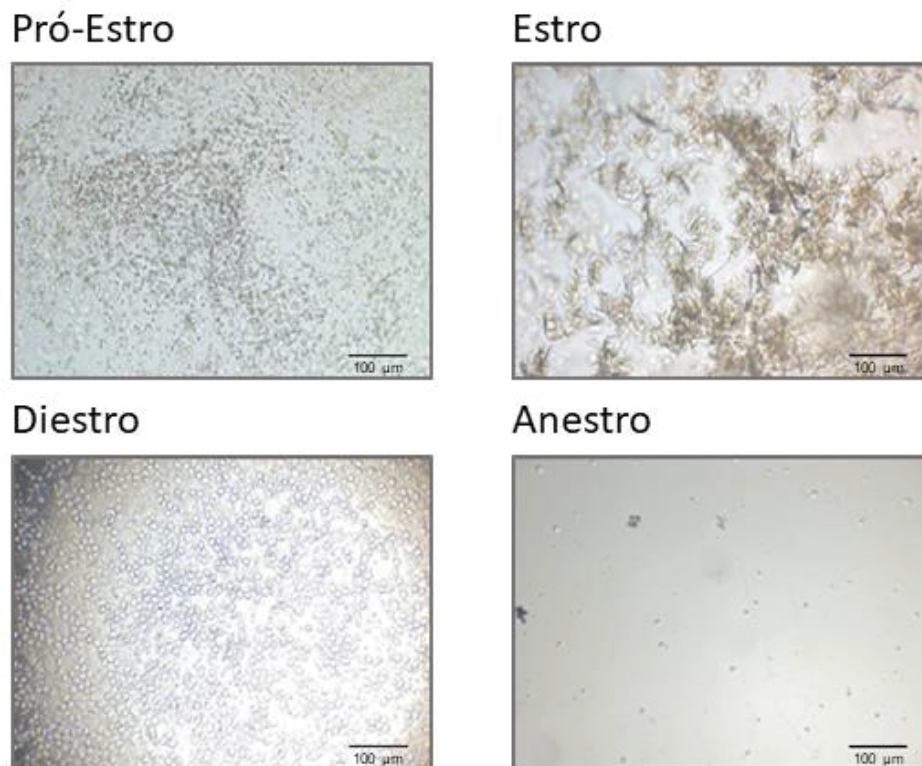


Figura 3. Exemplos de citologia de lavado vaginal. As fotos mostram o lavado vaginal, observado em microscópio óptico em aumento de 100x (a barra de escala corresponde a 100 µm), de fêmeas no Pró-Estro (predomínio de células epiteliais nucleadas), Estro (predomínio de células epiteliais cornificadas), Diestro (predomínio de leucócitos) e Anestro (fêmeas OVX; poucas células presentes, com predomínio de leucócitos). Imagens: a autora.

3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O tamanho da amostra determinado por análise de poder foi de no mínimo 8 animais por grupo ($\alpha = 0.05$; $\beta = 0.20$ e tamanho do efeito ou Cohen's $d = 1.0$). O tamanho dos grupos era igual no delineamento experimental, mas devido ao lavado vaginal e separação dos grupos ser realizada após o teste, o número final de animais por grupo ficou maior e desigual.

Os dados do LCE foram analisados por ANOVA de uma via para os experimentos com fêmeas ciclando naturalmente (resultados 2 e 6), utilizando cada parâmetro (%TBA, %EBA, EBF, CAR) separadamente como variável dependente e o tratamento como preditor categórico, individualmente para cada fase do ciclo. Para a análise independente do ciclo e dos machos (resultados 1, 3, 5 e 7), a ANOVA de uma via foi realizada da mesma maneira, incluindo todos os animais do experimento, enquanto para a análise por ciclo, independente do tratamento (resultados 2 e 6), os parâmetros foram utilizados como variável dependente e o ciclo como preditor categórico, incluindo somente os grupos veículo de cada experimento.

Nos experimentos com ratas OVX os dados foram analisados por ANOVA de duas vias, utilizando cada parâmetro separadamente como variável dependente e o pré-tratamento e tratamento como preditores categóricos (resultados 4 e 8).

Previamente a todas as análises foi assegurada a normalidade dos dados. Para todas as análises, quando houve significância estatística, foi utilizado o post hoc de Newman-Keuls para identificar as diferenças. Os resultados são expressos pela média \pm E.P.M. e o nível de significância estatística foi considerado $p < 0.05$. Todas as análises foram feitas utilizando o programa Statistica 12 (StatSoft, EUA), e os gráficos foram feitos utilizando o programa GraphPad Prism 8 (GraphPad, EUA).

3.7. DESENHO EXPERIMENTAL

Todos os experimentos foram realizados entre 13h00 e 17h00, sob iluminação de 30 lux e temperatura ambiente de 22 ± 2 °C. Antes dos testes os animais foram alocados em uma sala adjacente, permanecendo por 1 h nessa sala, sob iluminação de 70 lux e temperatura ambiente de 22 ± 2 °C. A administração das drogas foi feita individualmente em uma terceira sala, nas mesmas condições da sala de alocação.

Nos experimentos 1-3 e 5-7 os animais receberam o tratamento (veículo, URB ou MJN) e 30 min depois foram expostos ao aparato por 5 min. Imediatamente após o teste, as fêmeas (experimentos 1, 2, 5 e 6) passaram pelo lavado vaginal para determinar a fase do ciclo estral.

Nos experimentos 4 e 8 as ratas receberam o pré-tratamento (veículo ou 17β -estradiol) e 1 h 30 min depois o tratamento (veículo, URB ou MJN), e 30 min depois foram expostos ao aparato por 5 min. Imediatamente após o teste, as ratas passaram pelo lavado vaginal para confirmar o anestro.

O desenho experimental específico está disponível esquematicamente acima de cada figura na sessão de resultados.

4. RESULTADOS

4.1. RESULTADO 1: EFEITO DA INIBIÇÃO DA FAAH NO COMPORTAMENTO TIPO-ANSIOSO EM FÊMEAS CICLANDO NATURALMENTE

Para avaliar os efeitos do URB597 no comportamento tipo-ansioso, 90 ratas foram randomicamente distribuídas em grupos experimentais que receberam URB (0.1 ou 0.3 mg/kg) ou veículo, 30 min antes do teste no LCE. E após o teste foram redistribuídas em grupos baseados na fase do ciclo estral determinada pelo lavado vaginal (pró-estro, estro ou diestro).

Quando a fase do ciclo estral não foi considerada, a ANOVA de uma via demonstrou que não há efeito significativo do tratamento com URB na %TBA [$F_{(2, 87)}=2.01, p=0.140$], na %EBA [$F_{(2, 87)}=1.02, p=0.364$], nas EBF [$F_{(2, 87)}=1.62, p=0.204$] ou no CAR [$F_{(2,87)}=0.74, p=0.481$]. Conforme observado na figura 4, o tratamento com URB não mudou nenhum parâmetro avaliado.

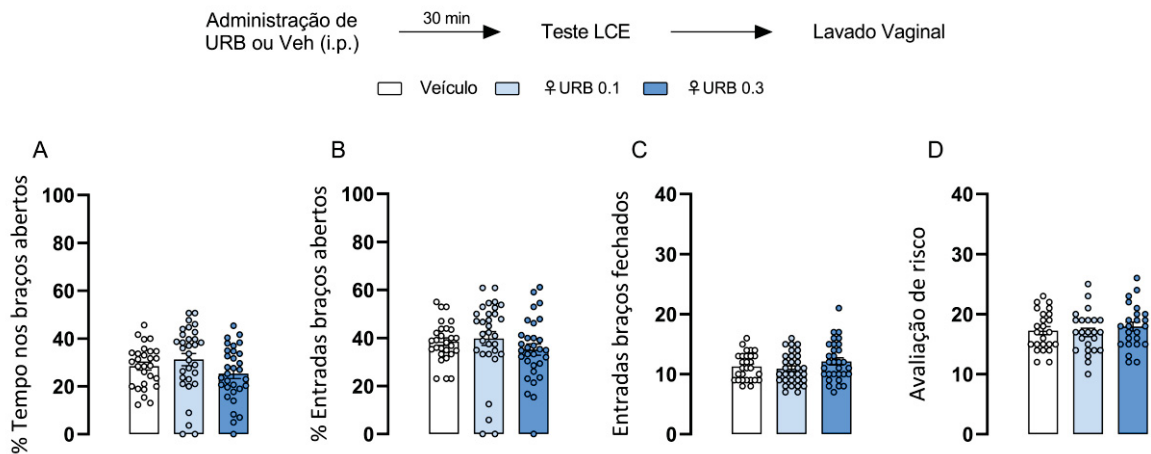


Figura 4. Efeito da inibição da FAAH no comportamento tipo-ansioso em fêmeas ciclando naturalmente. O diagrama acima dos gráficos representa o delineamento experimental adotado. Os gráficos mostram a %TBA (A), a %EBA (B), as EBF (C) e o CAR (D), de fêmeas tratadas com veículo (n = 28) ou URB597 nas doses de 0.1 (n = 31) ou 0.3 mg/kg (n = 31). O tratamento com URB não alterou nenhum dos comportamentos avaliados. Os resultados estão representados como média \pm E.P.M. e valores individuais.

4.2. RESULTADO 2: AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO CICLO ESTRAL NO EFEITO DA INIBIÇÃO DA FAAH NO COMPORTAMENTO TIPO-ANSIOSO

Quando separadas por fase do ciclo estral, a ANOVA de uma via mostrou efeito significativo do tratamento na %TBA no estro [$F_{(2,26)}=6.14$, $p=0.007$] e diestro [$F_{(2,28)}=6.44$, $p=0.005$], mas não no pró-estro [$F_{(2,27)}=0.63$, $p=0.537$]. A ANOVA de uma via mostrou efeito significativo do tratamento na %EBA no estro [$F_{(2,26)}=4.613$, $p=0.019$] mas não no diestro [$F_{(2,28)}=2.68$, $p=0.086$] ou no pró-estro [$F_{(2,27)}=0.51$, $p=0.607$]. O post hoc de Newman-Keuls mostrou uma diferença significativa entre as fêmeas no estro que receberam URB 0.3 mg/kg e o grupo controle. Como mostrado na Figura 5 (5A e 5B), esses animais apresentaram menor %TBA e %EBA quando comparados ao grupo veículo (%TBA: $p=0.025$; %EBA: $p=0.047$), sugerindo um efeito tipo-ansiolítico. Em contrapartida, as fêmeas no diestro que receberam URB 0.1 mg/kg apresentaram %TBA maior que o grupo controle ($p=0.002$; Figura 5A), sugerindo um efeito tipo-ansiolítico. Não houve diferenças nas EBF no pró-estro [$F_{(2,27)}=0.23$, $p=0.793$], estro [$F_{(2,26)}=0.09$, $p=0.916$] ou no diestro [$F_{(2,28)}=2.09$, $p=0.143$], sugerindo que não houve mudanças na locomoção (Figura 5C). Também não houve diferenças no CAR (Figura 5D) no pró-estro [$F_{(2,27)}=0.62$, $p=0.545$], estro [$F_{(2,26)}=0.18$, $p=0.836$] ou no diestro [$F_{(2,28)}=0.52$, $p=0.602$].

Quando somente a fase do ciclo estral foi comparada entre os grupos veículo, para determinar a presença de diferenças basais causadas pelo ciclo, nenhum efeito foi observado [Figura 6; %TBA: $F_{(2, 25)}=1.71$, $p=0.201$; %EBA: $F_{(2, 25)}=0.32$, $p=0.731$; EBF: $F_{(2, 25)}=0.24$, $p=0.789$; CAR: $F_{(2, 25)}=0.12$, $p=0.886$]. Esses dados sugerem que os efeitos encontrados com o URB nas diferentes fases do ciclo não dependem de diferenças basais entre os grupos.

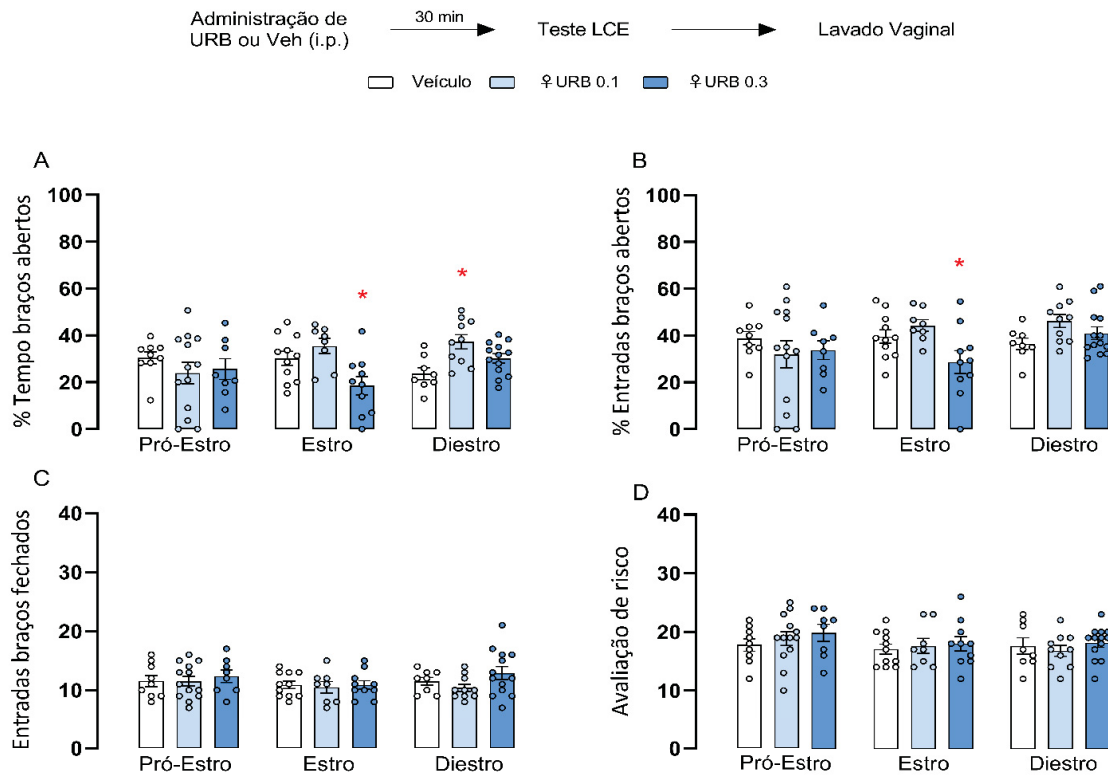


Figura 5. O efeito da inibição da FAAH no comportamento tipo-ansioso depende da fase do ciclo estral. O diagrama acima dos gráficos representa o delineamento experimental adotado. Os gráficos mostram a %TBA (A), a %EBA (B), as EBF (C) e o CAR (D), de fêmeas tratadas com veículo ($n = 28$) ou URB597 nas doses de 0.1 ($n = 31$) ou 0.3 mg/kg ($n = 31$), separadas pela fase do ciclo estral (pró-estro, estro e diestro, identificadas abaixo de cada grupo de barras para cada parâmetro). O tratamento com URB597 na dose 0.3 mg/kg diminuiu a %TBA e %EBA em fêmeas no estro (A e B), enquanto o tratamento com URB597 na dose de 0.1 mg/kg aumentou a %TBA em fêmeas no diestro (A). Os resultados estão representados como média \pm E.P.M. e valores individuais. O * denota diferença estatística significativa ($p < 0.05$) em relação ao respectivo grupo veículo.

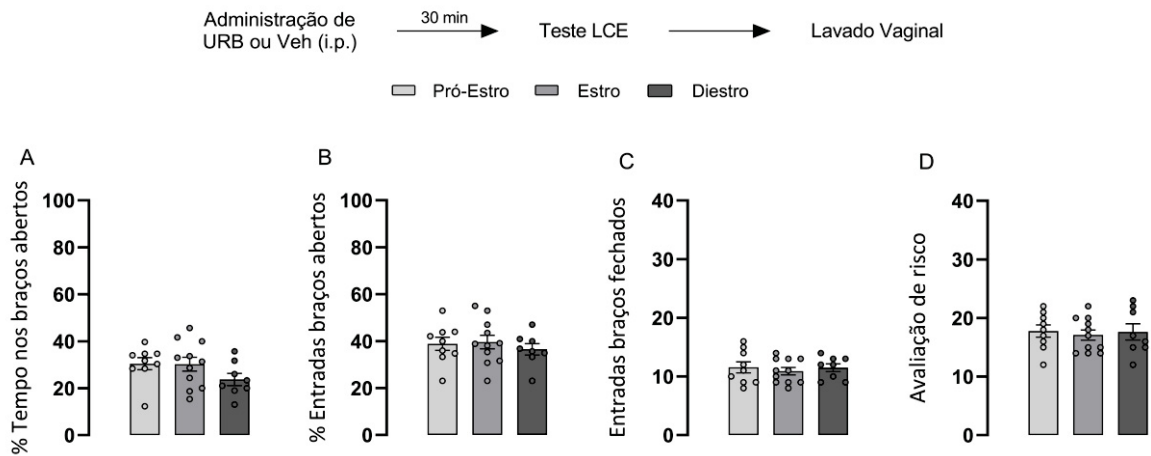


Figura 6. A fase do ciclo estral não influencia o comportamento tipo-ansioso no LCE. O diagrama acima dos gráficos representa o delineamento experimental adotado. Os gráficos mostram a %TBA (A), a %EBA (B), as EBF (C) e o CAR (D), de fêmeas tratadas com veículo, separadas pela fase do ciclo estral [pró-estro (n = 9), estro (n = 11) e diestro (n = 8)]. A fase do ciclo estral não alterou nenhum dos comportamentos avaliados. Os resultados estão representados como média \pm E.P.M. e valores individuais.

4.3. RESULTADO 3: AVALIAÇÃO DO EFEITO DA INIBIÇÃO DA FAAH NO COMPORTAMENTO TIPO-ANSIOSO EM MACHOS

Para avaliar o efeito do URB597 no comportamento tipo-ansioso, 44 ratos machos foram alocados randomicamente em grupos tratados com veículo ($n = 15$), URB 0.1 ($n = 15$) ou 0.3 mg/kg ($n = 14$), 30 min antes do teste no LCE.

A ANOVA de uma via mostrou efeitos significativos do tratamento na %TBA [$F_{(2, 40)}=3.59, p=0.037$], %EBA [$F_{(2, 40)}=5.59, p=0.007$] e no CAR [$F_{(2, 40)}=8.14, p=0.001$], mas não nas EBF [$F_{(2, 40)}=1.18, p=0.319$]. Como mostrado na Figura 7A e 7B, o post hoc de Newman-Keuls revelou que o tratamento com URB 0.3 mg/kg aumentou significativamente a %TBA ($p=0.029$) e a %EBA ($p=0.014$) quando comparado com os controles; além disso, o tratamento com URB 0.1 mg/kg reduziu significativamente o CAR quando comparado com o grupo veículo (Figura 7D; $p=0.004$). Em conjunto, esses resultados sugerem um efeito tipo-ansiolítico das duas doses de URB em machos. Não houve efeito nas EBF, sugerindo que nenhuma das doses utilizadas afetou a locomoção.

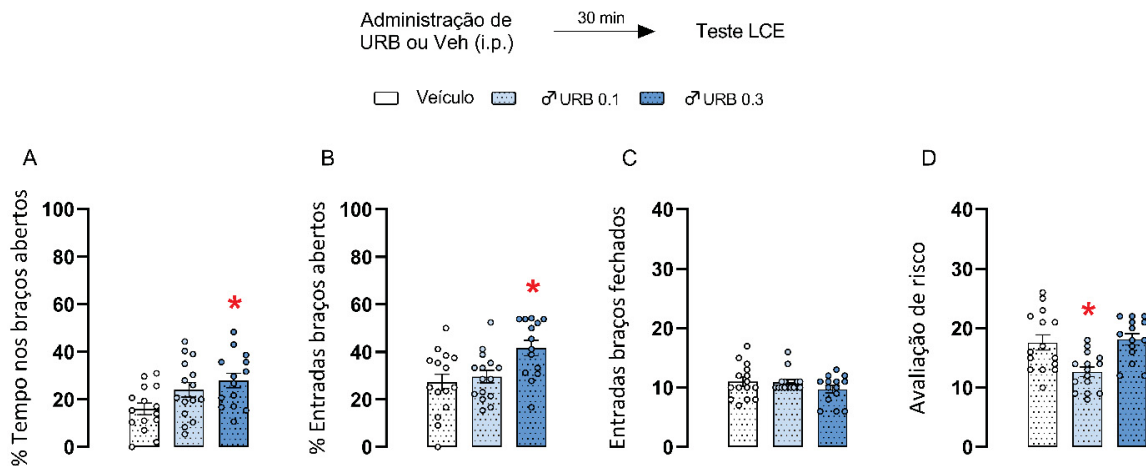


Figura 7. O efeito da inibição da FAAH no comportamento tipo-ansioso em machos. O diagrama acima dos gráficos representa o delineamento experimental adotado. Os gráficos mostram a %TBA (A), a %EBA (B), as EBF (C) e o CAR (D), de machos tratados com veículo ou URB597 nas doses de 0.1 ou 0.3 mg/kg. O tratamento com URB597 na dose 0.3 mg/kg aumentou a %TBA e %EBA, enquanto o tratamento com URB597 na dose de 0.1 mg/kg diminuiu o CAR. Os resultados são apresentados como média \pm E.P.M e valores individuais. O * denota diferença estatística significativa ($p < 0.05$) em relação ao respectivo grupo veículo.

4.4. RESULTADO 4: AVALIAÇÃO DO EFEITO DA INIBIÇÃO DA FAAH NO COMPORTAMENTO TIPO-ANSIOSO EM FÊMEAS OVARIECTOMIZADAS COM TRATAMENTO AGUDO DE 17 β -ESTRADIOL

Para avaliar o efeito da influência do hormônio ovariano 17 β -estradiol no efeito do URB597 no comportamento tipo-ansioso, 59 fêmeas OVX foram randomicamente distribuídas nos grupos conforme o pré-tratamento (E₂ 0.1 μ g/kg ou veículo) e o tratamento (veículo, URB 0.1 ou 0.3 mg/kg; n = 9-10) e testadas no LCE.

A ANOVA de duas vias mostrou efeito significativo do pré-tratamento [$F_{(1,53)}=10.33$, $p=0.002$] e do tratamento [$F_{(2,53)}=4.08$, $p=0.022$] mas não da interação entre os dois fatores [$F_{(2,53)}=0.91$, $p=0.408$] para a %TBA. Como observado na figura 8A, o post hoc de Newman-Keuls descoberto mostrou um aumento significativo da %TBA no grupo Veh-URB 0.1 ($p=0.032$) quando comparado com o grupo Veh-Veh. Para a %EBA, houve efeito significativo do pré-tratamento [$F_{(1,53)}=10.45$, $p=0.002$] mas não do tratamento [$F_{(2,53)}=1.52$, $p=0.228$] ou da interação entre eles [$F_{(2,53)}=2.09$, $p=0.134$]. Como observado na Figura 8B, o grupo Veh-URB 0.1 apresentou uma maior %EBA que o grupo Veh-Veh ($p=0.046$). Para as EBF, houve um efeito do pré-tratamento [$F_{(1,53)}=7.80$, $p=0.007$], mas o post hoc mostrou que não há diferenças significativas entre os grupos tratados e seus respectivos controles; não houve efeito do tratamento [$F_{(2,53)}=1.53$, $p=0.226$] ou da interação entre pré-tratamento e tratamento [$F_{(2,53)}=0.79$, $p=0.460$]. Para o CAR, houve efeito do tratamento [$F_{(2,53)}=6.70$, $p=0.002$], mas o post hoc mostrou que não há diferenças significativas entre os grupos tratados e seus respectivos controles; não houve efeito do pré-tratamento [$F_{(1,53)}=1.97$, $p=0.166$] ou da interação [$F_{(2,53)}=0.20$, $p=0.822$].

Nos grupos Veh – que não receberam o pré-tratamento com E₂ – a elevação da %TBA e %EBA causadas pelo tratamento com URB 0.1 mg/kg sugere um efeito tipo-ansiolítico, enquanto nos grupos tratados com E₂ nenhum efeito do URB foi observado, sugerindo que o efeito tipo-ansiolítico é dependa de baixos níveis de E₂.

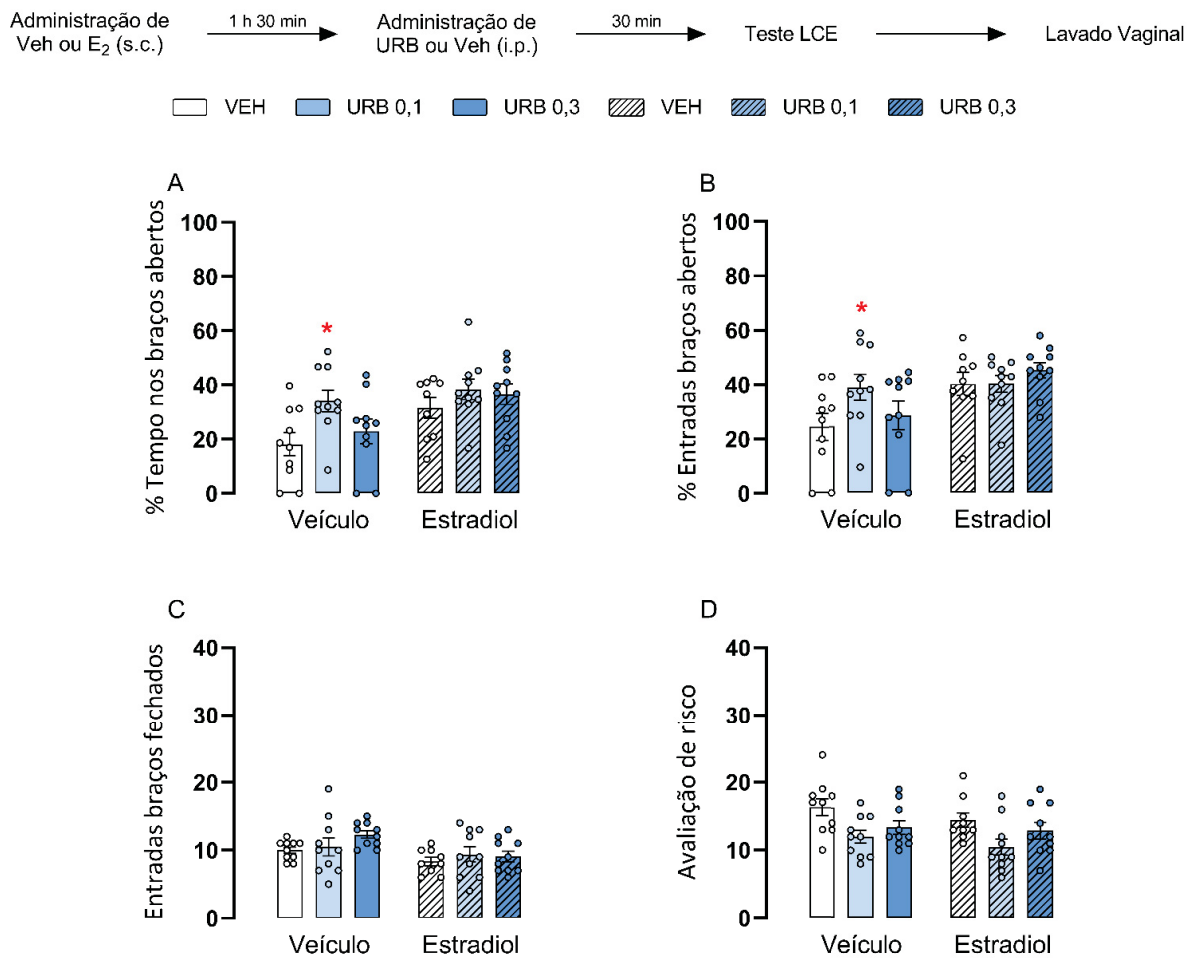


Figura 8. O efeito da inibição da FAAH no comportamento tipo-ansioso depende dos níveis de estradiol. O diagrama acima dos gráficos representa o delineamento experimental adotado. Os gráficos mostram a %TBA (A), a %EBA (B), as EBF (C) e o CAR (D), de fêmeas tratadas com veículo ou URB597 nas doses de 0.1 ou 0.3 mg/kg, separadas pelo pré-tratamento com veículo ou 17 β -estradiol (identificado abaixo de cada grupo de barras para cada parâmetro; n = 9 - 10). O tratamento com URB597 na dose 0.1 mg/kg aumentou a %TBA e %EBA, e diminuiu o CAR em fêmeas pré-tratadas com veículo. Não houve diferença significativa entre os grupos pré-tratados com E₂. O * significa que há diferença estatística significativa ($p < 0.05$) em relação ao respectivo grupo veículo.

4.5. RESULTADO 5: EFEITO DA INIBIÇÃO DA MAGL NO COMPORTAMENTO TIPO-ANSIOSO EM FÊMEAS CICLANDO NATURALMENTE

Para avaliar os efeitos do MJN110 no comportamento tipo-ansioso, 88 ratas foram randomicamente distribuídas em grupos experimentais que receberam MJN (1.0 ou 3.0 mg/kg) ou veículo, 30 min antes do teste no LCE. Após o teste foram redistribuídas em grupos baseados na fase do ciclo estral determinada pelo lavado vaginal (pró-estro, estro ou diestro).

Quando a fase do ciclo estral não foi considerada, a ANOVA de uma via não mostrou diferenças significativas do tratamento com MJN na %TBA [$F_{(2,84)}=2.88$, $p=0.062$] e na %EBA [$F_{(2,84)}=1.22$, $p=0.30$], mas houve um efeito significativo do tratamento nas EBF [$F_{(2,84)}=5.08$, $p=0.008$] e no CAR [$F_{(2,84)}=9.87$, $p=0.0001$]. O post hoc de Newman-Keuls mostrou que as fêmeas tratadas com MJN 1.0 mg/kg tiveram um aumento nas EBF quando comparadas ao grupo veículo (Figura 9C; $p=0.015$), sugerindo um efeito hiperlocomotor. Ainda, as fêmeas tratadas com MJN 3.0 mg/kg mostraram uma redução do CAR quando comparadas ao grupo veículo (Figura 9D; $p=0.005$), sugerindo um efeito tipo-ansiolítico para esse parâmetro.

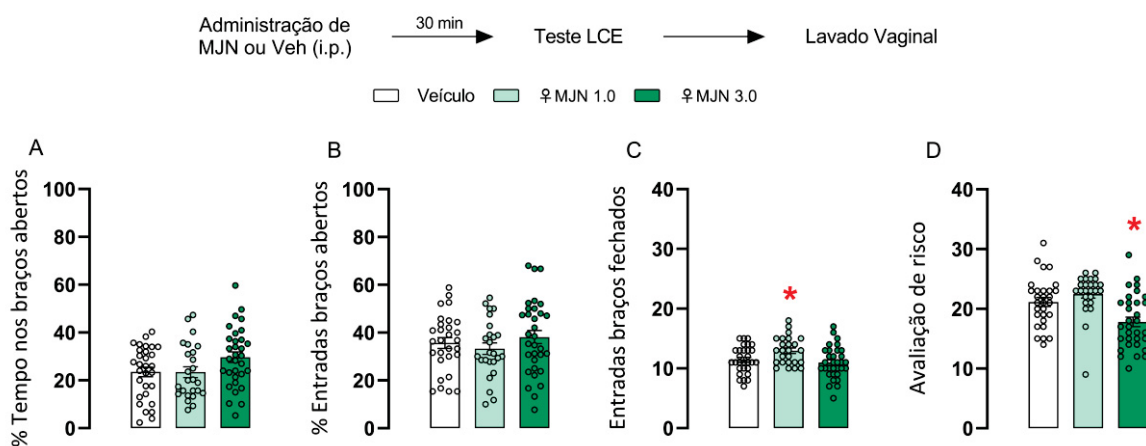


Figura 9. Efeito da inibição da MAGL no comportamento tipo-ansioso em fêmeas ciclando naturalmente. O diagrama acima dos gráficos representa o delineamento experimental adotado. Os gráficos mostram a %TBA (A), a %EBA (B), as EBF (C) e o CAR (D), de fêmeas tratadas com veículo ($n = 30$) ou MJN110 nas doses de 1.0 ($n = 26$) ou 3.0 mg/kg ($n = 32$). O tratamento com MJN110 1.0 mg/kg aumentou as EBF (C), enquanto o tratamento com MJN110 3.0 mg/kg diminuiu o CAR (D). Os resultados estão representados como média \pm E.P.M. e valores individuais. O * denota diferença estatística significativa ($p < 0.05$) em relação ao respectivo grupo veículo.

4.6. RESULTADO 6: AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO CICLO ESTRAL NO EFEITO DA INIBIÇÃO DA MAGL NO COMPORTAMENTO TIPO-ANSIOSO

Quando separadas pela fase do ciclo estral, a ANOVA de uma via mostrou um efeito significativo do tratamento na %TBA no estro [$F_{(2,31)}=4.19$, $p=0.025$], mas não no pró-estro [$F_{(2,27)}=1.01$, $p=0.377$] ou no diestro [$F_{(2,19)}=0.52$, $p=0.60$]. Como observado na figura 10A, as fêmeas no estro que receberam MJN 3.0 mg/kg apresentaram a %TBA significativamente mais alta que os controles ($p=0.019$), sugerindo um efeito tipo-ansiolítico. A ANOVA de uma via não mostrou efeito significativo do tratamento na %EBA no pró-estro [$F_{(2,27)}=0.72$, $p=0.496$], estro [$F_{(2,31)}=1.79$, $p=0.183$] ou diestro [$F_{(2,19)}=0.05$, $p=0.954$]. A ANOVA de uma via mostrou efeito significativo do tratamento nas EBF no estro [$F_{(2,31)}=3.39$, $p=0.047$], e diestro [$F_{(2,19)}=3.82$, $p=0.040$] mas não no pró-estro [$F_{(2,27)}=0.01$, $p=0.985$], porém o post hoc de Newman-Keuls mostrou que não houve diferença significativa entre os grupos tratados e o grupo veículo nas EBF. A ANOVA de uma via mostrou efeito significativo do tratamento no CAR no estro [$F_{(2,31)}=6.59$, $p=0.004$] e diestro [$F_{(2,19)}=6.97$, $p=0.005$], mas não no pró-estro [$F_{(2,27)}=0.68$, $p=0.516$]. O post hoc de Newman-Keuls mostrou que o tratamento com MJN 3.0 mg/kg diminuiu o CAR no estro ($p=0.038$) e diestro ($p=0.036$) quando comparado com os respectivos grupos controles (Figura 10D), sugerindo um efeito tipo-ansiolítico.

Quando somente a fase do ciclo estral foi comparada entre os grupos veículo, para determinar a presença de diferenças basais causadas pelo ciclo, nenhum efeito foi observado [Figura 11; %TBA: $F_{(2, 27)}=1.39$, $p=0.267$; %EBA: $F_{(2, 27)}=0.76$, $p=0.478$; EBF: $F_{(2, 27)}=1.15$, $p=0.331$; CAR: $F_{(2, 27)}=0.27$, $p=0.767$] sugerindo que o efeito observado do tratamento com MJN não foi devido a diferenças basais.

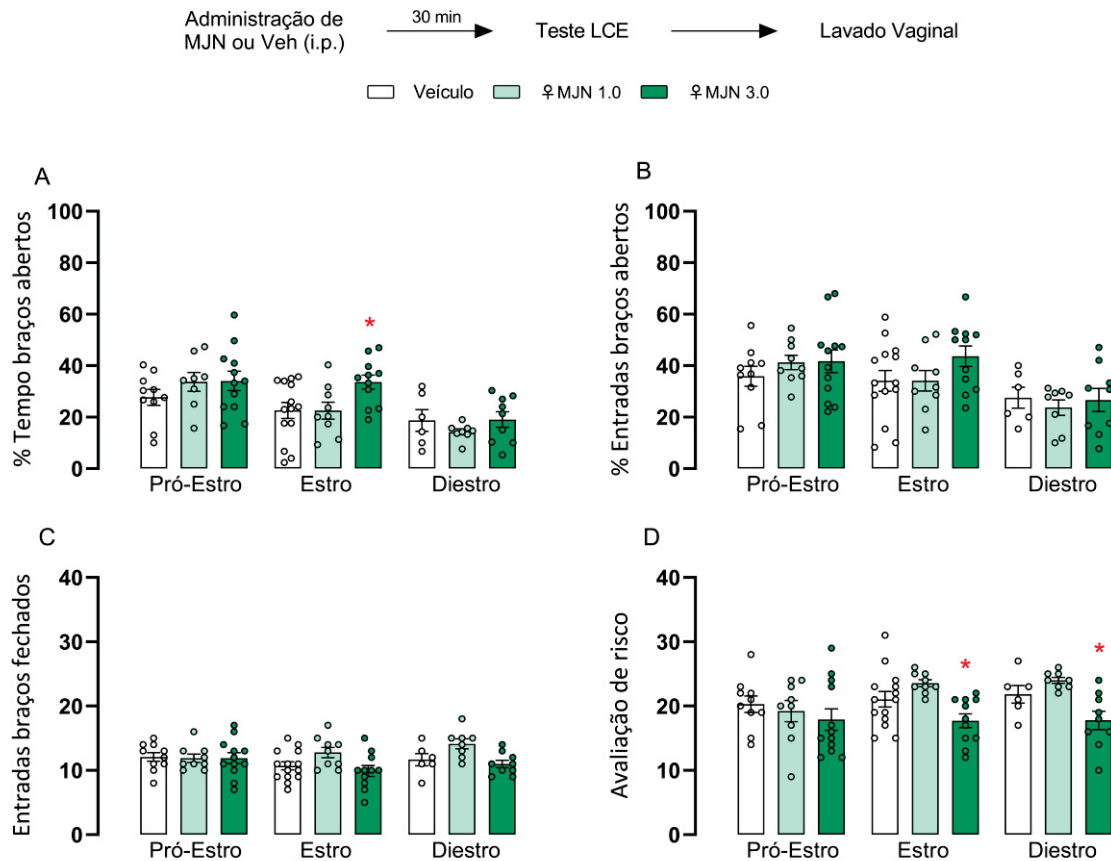


Figura 10. O efeito da inibição da MAGL no comportamento tipo-ansioso depende da fase do ciclo estral. O diagrama acima dos gráficos representa o delineamento experimental adotado. Os gráficos mostram a %TBA (A), a %EBA (B), as EBF (C) e o CAR (D), de fêmeas tratadas com veículo ($n = 30$) ou MJN110 nas doses de 1.0 ($n = 26$) ou 3.0 mg/kg ($n = 32$), separadas pela fase do ciclo estral (pró-estro, estro e diestro, identificadas abaixo de cada grupo de barras para cada parâmetro). O tratamento com MJN110 na dose 3.0 mg/kg aumentou a %TBA em fêmeas no estro (A), e diminuiu o CAR em fêmeas no estro e diestro (D). Os resultados estão demonstrados como média \pm E.P.M. e valores individuais. O * denota diferença estatística significativa ($p < 0.05$) em relação ao respectivo grupo veículo.

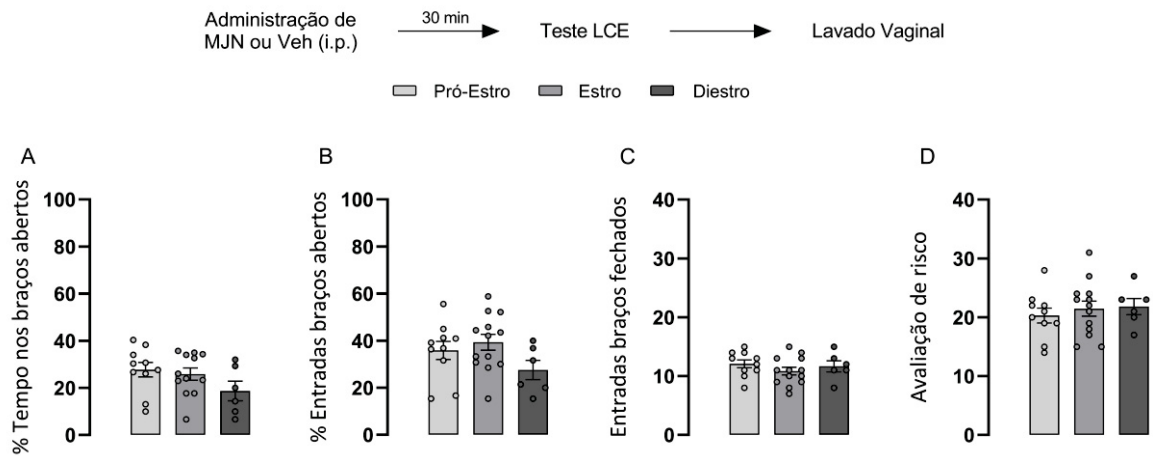


Figura 11. A fase do ciclo estral não influencia o comportamento tipo-ansioso no LCE. O diagrama acima dos gráficos representa o delineamento experimental adotado. Os gráficos mostram a %TBA (A), a %EBA (B), as EBF (C) e o CAR (D), de fêmeas tratadas com veículo, separadas pela fase do ciclo estral [pró-estro (n = 10), estro (n = 12) e diestro (n = 6)]. A fase do ciclo estral não alterou nenhum dos comportamentos avaliados. Os resultados estão representados como média \pm E.P.M. e valores individuais.

4.7. RESULTADO 7: AVALIAÇÃO DO EFEITO DA INIBIÇÃO DA MAGL NO COMPORTAMENTO TIPO-ANSIOSO EM MACHOS

Para avaliar o efeito do MJN110 no comportamento tipo-ansioso, 28 ratos machos foram alocados randomicamente em grupos que foram tratados com veículo (n = 10), MJN 1.0 mg/kg (n = 9) ou MJN 3.0 mg/kg (n = 9), 30 min antes do teste no LCE.

A ANOVA de uma via não mostrou efeitos significativos do tratamento na %TBA [$F_{(2, 25)}=1.27, p=0.297$], %EBA [$F_{(2, 25)}=0.57, p=0.573$] e CAR [$F_{(2, 25)}=1.54, p=0.234$], sugerindo que a droga não afetou os parâmetros de comportamento tipo-ansioso. Também não houve efeito nas EBF [$F_{(2, 25)}=1.22, p=0.311$], sugerindo que o tratamento não afetou a locomoção. Em conjunto, esses resultados sugerem que nas doses testadas, a inibição da MAGL não afeta o comportamento tipo-ansioso em machos (Figura 12).

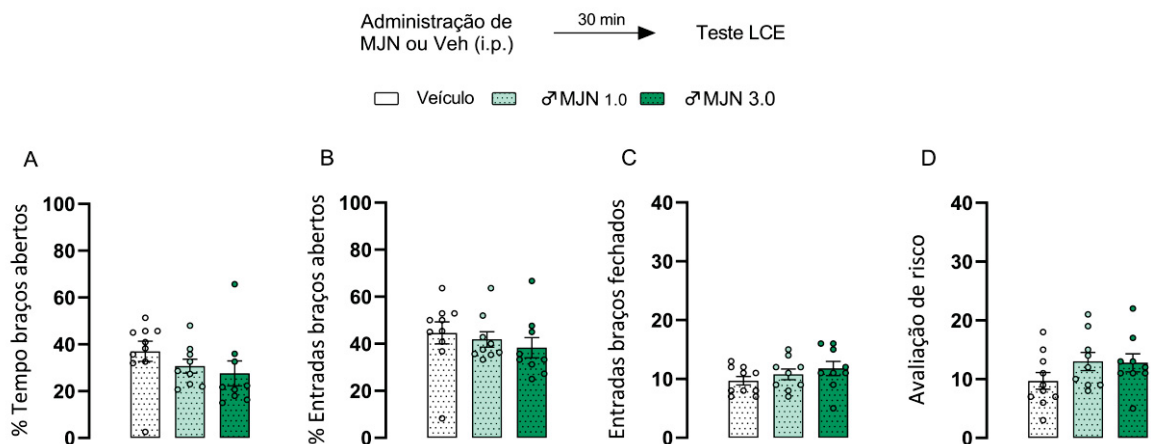


Figura 12. O efeito da inibição da MAGL no comportamento tipo-ansioso em machos. O diagrama acima dos gráficos representa o delineamento experimental adotado. Os gráficos mostram a %TBA (A), a %EBA (B), as EBF (C) e o CAR (D), de machos tratados com veículo (n = 10) ou MJN110 nas doses de 1.0 ou 3.0 mg/kg (n = 9). O tratamento com MJN110 não alterou significativamente os parâmetros analisados. Os resultados são apresentados como média \pm E.P.M e valores individuais.

4.8. RESULTADO 8: AVALIAÇÃO DO EFEITO DA INIBIÇÃO DA MAGL NO COMPORTAMENTO TIPO-ANSIOSO EM FÊMEAS OVARIETOMIZADAS COM TRATAMENTO AGUDO DE 17 β -ESTRADIOL

Para avaliar o efeito da influência do hormônio ovariano 17 β -estradiol no efeito do MJN110 no comportamento tipo-ansioso, 63 fêmeas OVX foram randomicamente distribuídas nos grupos de pré-tratamento (E₂ 0.1 μ g/kg ou veículo) e tratamento (veículo, URB 0.1 ou 0.3 mg/kg; n = 10 - 13) e testadas no LCE.

A ANOVA de duas vias mostrou um efeito significativo do tratamento [$F_{(2,57)}=6.69$, $p=0.002$], mas não do pré-tratamento [$F_{(1,57)}=0.03$, $p=0.890$] ou da interação entre eles [$F_{(2,57)}=2.77$, $p=0.071$], para a %TBA. O post hoc de Newman-Keuls descoberto revelou uma diferença significativa entre o grupo E₂-Veh e o grupo E₂-MJN 1.0 ($p=0.040$; Figura 13A). Para a %EBA, houve efeito significativo do tratamento [$F_{(2,57)}=5.42$, $p=0.007$], mas não do pré-tratamento [$F_{(1,57)}=0.10$, $p=0.747$] ou da interação entre eles [$F_{(2,57)}=2.06$, $p=0.137$]. O post hoc de Newman-Keuls descoberto mostrou que não houve diferença significativa entre os grupos tratados e os grupos veículo, entretanto, mostrou uma tendência de uma diferença entre os grupos E₂-Veh e E₂-MJN 1.0 ($p=0.055$). Para as EBF (Figura 13C), não houve efeito significativo do tratamento [$F_{(2,57)}=3.04$, $p=0.056$], do pré-tratamento [$F_{(1,57)}=2.74$, $p=0.103$] ou da interação entre eles [$F_{(2,57)}=0.58$, $p=0.565$]. Para o CAR (Figura 13D), não houve efeito do tratamento [$F_{(2,57)}=0.54$, $p=0.583$], pré-tratamento [$F_{(1,57)}=0.88$, $p=0.353$], ou da interação entre eles [$F_{(2,57)}=1.11$, $p=0.335$].

O tratamento com MJN 1.0 diminuiu a %TBA, e mostrou uma tendência a diminuir a %EBA, no grupo pré-tratado com E₂, mas não nos grupos pré-tratados com veículo, o que indica que houve um efeito tipo-ansio gênico que é dependente de níveis altos de E₂.

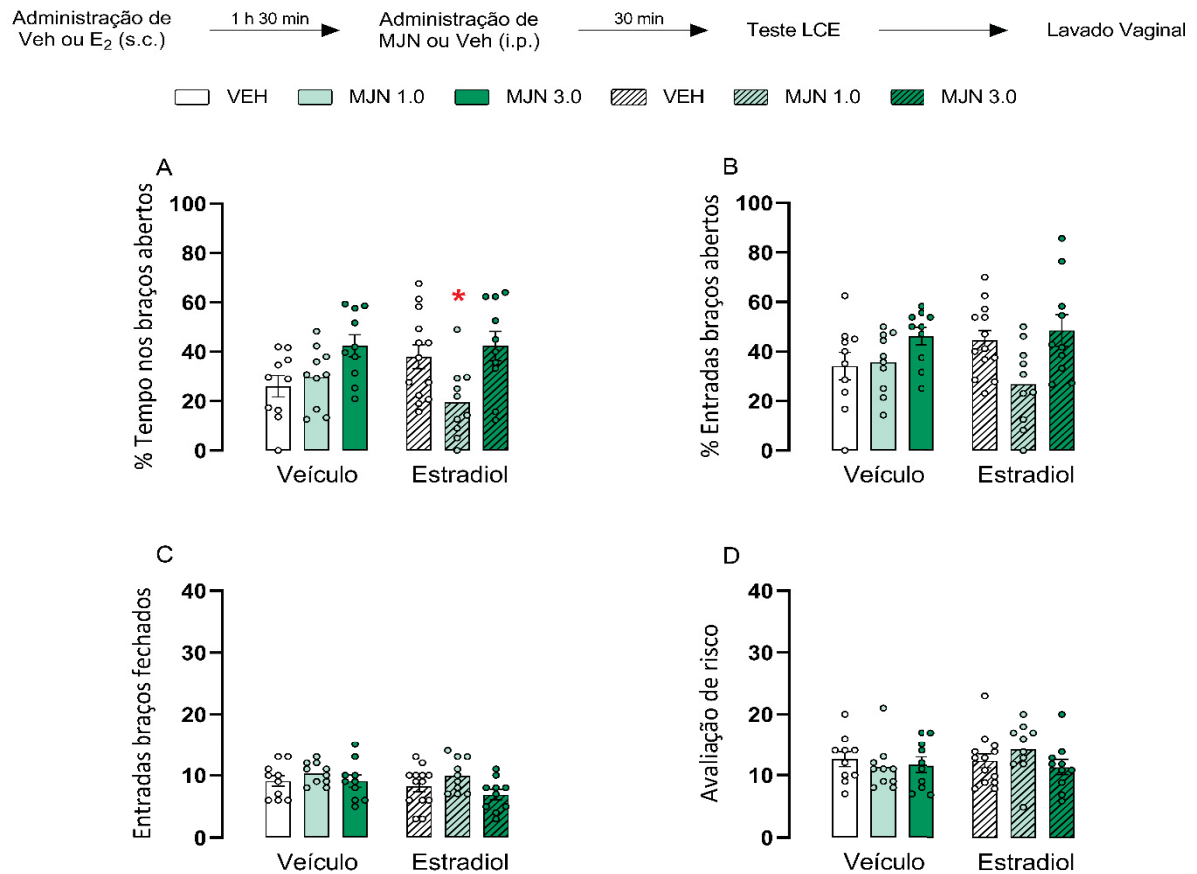


Figura 13. O efeito da inibição da MAGL no comportamento tipo-ansioso depende dos níveis de estradiol. O diagrama acima dos gráficos representa o delineamento experimental adotado. Os gráficos mostram a %TBA (A), a %EBA (B), as EBF (C) e o CAR (D), de fêmeas tratadas com veículo ou MJN110 nas doses de 1.0 ou 3.0 mg/kg, separadas pelo pré-tratamento com veículo ou 17 β -estradiol (identificado abaixo de cada grupo de barras para cada parâmetro; n = 10 - 13). O tratamento com MJN110 na dose 1.0 mg/kg diminuiu a %TBA e %EBA, em fêmeas pré-tratadas com E₂. O * significa que há diferença estatística significativa ($p < 0.05$) em relação ao respectivo grupo veículo.

TABELA 2. Resumo dos resultados obtidos

	URB 0.1	URB 0.3	MJN 1	MJN 3
Estro	–	Ansiogênico	–	Ansiolítico
Pró-estro	–	–	–	–
Diestro	Ansiolítico	–	–	Ansiolítico
OVX + Veh	Ansiolítico	–	–	–
OVX + E ₂	–	–	Ansiogênico	–
Machos	Ansiolítico	Ansiolítico	–	–

OVX: Ovariectomizadas; Veh: Veículo; E₂: Estradiol

5. DISCUSSÃO

O inibidor da FAAH, URB597, teve um efeito bifásico, dependente da dose e da fase do ciclo estral – sendo tipo-ansiolítico, com a dose mais baixa no diestro, e tipo-ansio gênico, com a dose mais alta no estro. O experimento nas fêmeas OVX demonstrou que o efeito tipo-ansiolítico do URB é dependente de níveis baixos de E₂. Em machos, o tratamento com URB apresentou um efeito tipo-ansiolítico dose-dependente.

O inibidor da MAGL, MJN110, teve um efeito tipo-ansiolítico, parcialmente dependente da dose e da fase do ciclo estral – com a dose mais alta, no estro (para a %TBA e CAR) e diestro (para o CAR). Entretanto, o efeito tipo-ansiolítico no CAR estava presente também quando o ciclo estral não foi considerado. O experimento nas fêmeas OVX demonstrou que esse efeito é dependente de hormônios ovarianos, entretanto, o aumento dos níveis de E₂ promoveu um efeito tipo-ansio gênico. Em machos, as duas doses utilizadas não apresentaram efeito.

O efeito tipo-ansiolítico da elevação da AEA através do bloqueio da FAAH já é bem descrito, tanto em machos (MOREIRA et al., 2008) como em fêmeas (FLANNERY et al., 2018), entretanto, nunca foi relacionado com a fase do ciclo estral. Em condições aversivas, a atividade da FAAH está aumentada em regiões cerebrais que regulam as respostas tipo-ansiosas, conseqüentemente diminuindo os níveis de AEA. Foi demonstrado que a redução da sinalização da AEA em resposta às condições aversivas leva a estados tipo-ansiosos, enquanto a inibição da FAAH e a conseqüente melhora da sinalização da AEA reduzem o comportamento tipo-ansioso associado (GUNDUZ-CINAR et al., 2013; MORENA et al., 2016b). Um estudo demonstrou, ainda, que o efeito tipo-ansiolítico induzido pelo bloqueio da FAAH, pelo URB, foi abolido pelo bloqueio dos receptores CB1 (KATHURIA et al., 2003), implicando esses receptores no efeito tipo-ansiolítico observado.

Quando a fase do ciclo estral não foi considerada, o tratamento com URB não teve efeito no comportamento tipo-ansioso nas fêmeas. Em trabalhos que demonstraram o efeito do URB em fêmeas (sem considerar o ciclo estral) o tratamento era em geral acompanhado de um estresse prévio. Foi demonstrado que o tratamento com URB (1 mg/kg) reverteu o comportamento tipo-ansioso associado com a administração de poly I:C (um agonista de receptores *toll-like* tipo 3, que causa neuroinflamação), em fêmeas (FLANNERY et al., 2018). Ainda, um estudo

demonstrou que o tratamento com URB (0.3 mg/kg) teve efeito positivo na memória, no teste de reconhecimento de objetos, em machos, mas não em fêmeas (HLAVACOVA et al., 2015). Esses estudos apoiam a hipótese de que o efeito tipo-ansiolítico da inibição da FAAH em fêmeas é mais pronunciado quando existe um estresse prévio – e, como nosso protocolo não envolveu esse tipo de estresse, o efeito do URB não foi aparente quando o ciclo estral não foi considerado. Apesar disso, um estudo utilizando machos e fêmeas, sem distinção, demonstrou que o URB (0.1 mg/kg) teve efeito tipo-ansiolítico (KATHURIA et al., 2003) – porém, ao não separar machos e fêmeas, existe a possibilidade de que esse resultado tenha sido causado pelo efeito nos machos, que já é bem descrito, tanto em situações estressantes (DANANDEH et al., 2018; VECCHIARELLI et al., 2021) como não estressantes (BUSQUETS-GARCIA et al., 2011; SCHERMA et al., 2008).

Entretanto, quando separadas por fase do ciclo estral, a maior dose de URB (0.3 mg/kg) diminuiu a %TBA e a %EBA de fêmeas no estro, sugerindo um efeito tipo-ansio gênico, enquanto a menor dose (0.1 mg/kg) aumentou a %TBA em fêmeas no diestro, sugerindo um efeito contrário, tipo-ansiolítico. Curiosamente, uma dose que é tipicamente relatada como ansiolítica em machos (0.3 mg/kg; DANANDEH et al., 2018; SCHERMA et al., 2008), e que apresentou esse mesmo efeito nos nossos resultados, causou uma resposta contrária (tipo-ansio gênica) nas fêmeas no estro; enquanto a dose mais baixa foi ansiolítica, aumentando a %TBA nas fêmeas no diestro, e reduzindo o CAR nos machos. O resultado bifásico do URB nas fêmeas no estro e diestro remete ao fato de que os CBs seguem uma curva dose-resposta em forma de sino (GUIMARÃES et al., 1990), assim como o inibidor da FAAH (SCHERMA et al., 2008). Isso torna o efeito tipo-ansiolítico da dose mais alta de URB nos machos particularmente interessante, porque esse resultado nos mostra que, aparentemente, a curva em sino nas fêmeas está deslocada para a esquerda, de forma dependente da fase do ciclo estral, de modo que elas reagem de forma diferente dos machos com a mesma dose do inibidor. Um resultado parecido foi observado em um trabalho recente do nosso grupo, onde o tratamento com Δ^9 -THC teve um efeito tipo-ansiolítico (0.075 e 0.1 mg/kg) e tipo-ansio gênico (1.0 mg/kg) em fêmeas no LCE, mas nenhum efeito foi observado em machos com as mesmas doses (SALVIATO et al., 2021), concordando com a nossa observação de que as fêmeas reagem diferentemente dos machos aos efeitos de diversos CBs.

De forma importante, não foram observadas diferenças basais entre as fases do ciclo estral nos parâmetros avaliados no LCE. Assim, os efeitos encontrados com o tratamento com URB provavelmente dependem de outros fatores que não as diferenças prévias entre as fases do ciclo.

Como os resultados com o URB parecem depender da fase do ciclo estral, e portanto, dos hormônios ovarianos, nós decidimos investigar o papel do 17β -estradiol nesse efeito, utilizando ratas OVX pré-tratadas com veículo ou E₂. Nesse experimento, encontramos que, no grupo OVX-Veh, o tratamento com a menor dose de URB aumentou a %TBA e %EBA, além de diminuir o CAR, indicando um efeito tipo-ansiolítico. Esse efeito foi muito similar ao efeito observado nas ratas no diestro – fase do ciclo estral onde existe uma baixa hormonal tanto de E₂ como de P (FACCIO et al., 2013), semelhante com o que acontece nas ratas OVX (ALAGWU; NNELI, 2005; WALF; FRYE, 2007a). Esse resultado concorda com um estudo que mostrou que o URB (0.1 e 0.3 mg/kg) teve efeito tipo-ansiolítico em ratas OVX (HILL; KARACABEYLI; GORZALKA, 2007). Porém, quando as OVX foram pré-tratadas com E₂, esse efeito foi abolido, de modo similar às ratas no pró-estro – fase em que o nível de E₂ está mais alto (FACCIO et al., 2013). Esses resultados indicam que o E₂ tem um papel importante no efeito do URB e, por consequência, da AEA, sugerindo que o efeito tipo-ansiolítico depende de níveis baixos de E₂, que estão presentes tanto nas OVX-Veh como nas ratas no diestro. Esse resultado é contraintuitivo quando consideramos que já foi demonstrado que o E₂ tem efeito tipo-ansiolítico (HILL; KARACABEYLI; GORZALKA, 2007; WALF; FRYE, 2005, 2007a, 2009), assim como o URB (HILL; KARACABEYLI; GORZALKA, 2007). Entretanto, a dose de E₂ usada aqui (0.1 µg/kg) não teve efeito *per se* no comportamento tipo-ansioso – o objetivo de usar uma dose bem mais baixa do que a geralmente considerada uma dose “fisiológica” (10 µg/kg; GERRITS et al., 2005; HILL; KARACABEYLI; GORZALKA, 2007; HOLM et al., 2014; MORA; DUSSAUBAT; DÍAZ-VÉLIZ, 1996; NOMIKOS; SPYRAKI, 1988; PANDARANANDAKA; POONYACHOTI; KALANDAKANOND-THONGSONG, 2009; RIEBE et al., 2010; SIMONE; MALIVOIRE; MCCORMICK, 2015; WALF; FRYE, 2005) foi evitar o efeito tipo-ansiolítico *per se* do E₂ que prejudicaria a interpretação dos resultados. O efeito ansiolítico do E₂ é mediado por receptores CB1 (HILL; KARACABEYLI; GORZALKA, 2007), assim como o efeito ansiolítico da AEA (BUSQUETS-GARCIA et al., 2011; KATHURIA et al., 2003), além disso, a AEA é agonista de receptores TRPV1 (ROSS, 2003) – cuja ativação causa efeitos tipo-

ansiofênicos (TERZIAN et al., 2009) – e sabe-se que o E₂ modula a expressão tanto de receptores CB1 como TRPV1 no hipocampo (KUMAR et al., 2018; RIEBE et al., 2010). A soma desses fatores pode ter causado a falta de efeito do URB nas fêmeas OVX-E₂ – de modo que, a combinação de E₂ e AEA levou a ativação completa de receptores CB1, desencadeando a ativação de receptores TRPV1 pela AEA restante, o que aboliu o efeito ansiofêtico da ativação CB1. Ainda, foi demonstrado que o E₂ (10 µg/kg) aboliu o efeito ansiolítico do diazepam em fêmeas OVX (NOMIKOS; SPYRAKI, 1988), o que pode indicar que os efeitos do E₂ também estejam envolvidos com os receptores GABA_A.

Foi demonstrado que o estresse crônico e imprevisível prejudica a sinalização do 2-AG (HILL et al., 2005) e que a melhora da sinalização do 2-AG em resposta ao bloqueio da MAGL produz efeitos tipo-ansiolíticos em condições aversivas (SCIOLINO; ZHOU; HOHMANN, 2011; SUMISLAWSKI; RAMIKIE; PATEL, 2011). Por outro lado, um estudo mostrou que inibidores da MAGL não têm efeitos no comportamento tipo-ansioso e que, em machos, o 2-AG não interfere nas respostas de medo (LOMAZZO et al., 2015). Um estudo utilizando o inibidor da MAGL, JZL184, demonstrou que os efeitos tipo-ansiolíticos dessa droga eram independentes de receptores CB1, e dependentes de receptores CB2 (BUSQUETS-GARCIA et al., 2011). Ainda, um estudo recente demonstrou que o 2-AG atenua as respostas de medo através da facilitação da extinção da memória de medo em fêmeas, mas não em machos; enquanto o aumento da sinalização da AEA prejudicou a extinção da memória de medo (MORENA et al., 2021), o que indica que o 2-AG pode ter um papel mais relevante no controle das respostas de medo e ansiedade em fêmeas do que a AEA.

Quando analisado independentemente da fase do ciclo estral, o tratamento com MJN na menor dose (1.0 mg/kg) aumentou as EBF, sugerindo um efeito hiperlocomotor para essa dose. A maior dose (3.0 mg/kg) diminuiu o CAR, indicando um efeito tipo-ansiolítico da droga que só foi detectável nesse parâmetro. O CAR pode ser mais sensível a drogas que modulam o comportamento tipo-ansioso do que os parâmetros de evitação (CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005), sendo assim, esse parâmetro possivelmente detectou um efeito tipo-ansiolítico da droga, independente do ciclo estral. O resultado nas EBF concorda em partes com um estudo que avaliou o efeito do JZL184 no comportamento tipo-ansioso induzido por estresse – eles encontraram que, no teste de transição claro-escuro, a inibição da MAGL aumentou o

tempo e distância percorridos no compartimento claro, indicando um efeito tipo-ansiolítico, além da distância total percorrida, o que pode indicar um efeito hiperlocomotor (BEDSE et al., 2018), entretanto, esse estudo foi feito em camundongos machos. A falta de efeitos nos parâmetros de evitação (%TBA e %EBA) pode ser um artefato da baixa aversividade do teste, uma vez que foi demonstrado que a inibição da MAGL só tem efeitos no comportamento tipo-ansioso em condições altamente aversivas (MORENA et al., 2016b), entretanto, esse estudo foi feito em machos, e como não há estudos que investigaram o efeito da inibição da MAGL em condições basais em fêmeas, não é possível afirmar que essa falta de efeito está ou não relacionada apenas com o sexo.

Quando analisado por fase do ciclo estral, o tratamento com a dose mais alta de MJN aumentou a %TBA e diminuiu o CAR de fêmeas no estro, e diminuiu o CAR de fêmeas no diestro, indicando que a fase do ciclo estral interfere nos efeitos da inibição da MAGL, que nesse caso são tipo-ansiolíticos. O efeito no CAR, tanto no estro como no diestro concorda com o efeito observado nesse parâmetro quando a fase do ciclo estral foi desconsiderada, entretanto, a falta de efeito no pró-estro indica que existe a influência de hormônios ovarianos nesse efeito – possivelmente sendo relacionado com níveis mais baixos de E₂ que estão presentes no estro e diestro, mas não no pró-estro (FACCIO et al., 2013). O efeito tipo-ansiolítico no estro concorda com essa hipótese, apontando para a razão entre os níveis de E₂ e P como fator importante nessa modulação: uma vez que o efeito existiu no estro que é a fase em que existe baixo E₂ e alta P, em comparação com o pró-estro, onde os níveis dos dois hormônios estão altos, e no diestro onde ambos estão baixos (FACCIO et al., 2013). Um estudo recente demonstrou que a depressão da liberação sináptica de ácido gama-aminobutírico (GABA) na via do septo medial/ núcleo da banda diagonal e habenula medial é um potencial mecanismo através do qual o 2-AG exerce seus efeitos tipo-ansiolíticos (VICKSTROM et al., 2021), ainda, a P age como um modulador positivo dos receptores GABA_A, tendo efeito tipo-ansiolítico em diversos modelos animais (BITRAN; DOWD, 1996) – o que pode ter auxiliado os efeitos tipo-ansiolíticos observados no estro com o tratamento com MJN 3.0.

Em machos, as duas doses utilizadas não tiveram efeitos no comportamento tipo-ansioso, o que concorda com a literatura, que mostra efeitos tipo-ansiolíticos nos machos após a inibição da MAGL somente com doses bem mais altas desse inibidor (MORENA et al., 2016a; SCIOLINO; ZHOU; HOHMANN, 2011; SERRANO et al.,

2018). Outro fator que pode ter influenciado a falta de efeito do MJN em machos é o fato de que já foi demonstrado que o efeito da inibição da MAGL (com JZL184) só é observado em situações altamente aversivas (SCIOLINO; ZHOU; HOHMANN, 2011) – o que não foi o caso do nosso protocolo. Também foi demonstrado que o MJN nas doses de 10 e 20 mg/kg, não teve efeito no comportamento tipo-ansioso em machos em condições basais (SERRANO et al., 2018). Entretanto, outro estudo demonstrou que um inibidor diferente da MAGL (o KML29) apresentou efeitos tipo-ansiolíticos em machos em um contexto pouco aversivo, mas não em um contexto altamente aversivo (MORENA et al., 2016b). Portanto, é provável que a dose do inibidor seja a responsável pela falta de efeitos do MJN nos machos, mas é possível que mesmo em doses mais altas, o inibidor ainda não tivesse efeito por causas da condição de baixa aversividade, como demonstrado em outros estudos (SCIOLINO; ZHOU; HOHMANN, 2011; SERRANO et al., 2018).

Quando investigamos a influência do E₂ na ação do MJN, não encontramos diferenças entre os grupos OVX-Veh, para nenhuma das doses utilizadas. Como esperado, o resultado nas OVX-Veh segue a mesma linha do resultado das ratas no diestro – uma vez que ambos possuem baixos níveis tanto de E₂ como P (ALAGWU; NNELI, 2005; FACCIO et al., 2013), fortalecendo a hipótese de que tanto os níveis de E₂ como de P são importantes para os efeitos do MJN. Esses resultados concordam, também, com a hipótese de que o efeito tipo-ansiolítico da maior dose de MJN no estro dependeu de hormônios ovarianos, visto que esse efeito foi abolido nas OVX-Veh. Entretanto, esse efeito não dependeu de níveis altos de E₂, uma vez que, nas OVX-E₂ não houve efeito tipo-ansiolítico com a dose mais alta. Nas OVX-E₂ tratadas com a dose mais baixa de MJN (1.0 mg/kg) observamos um efeito tipo-ansiogênico. Em concordância, um estudo demonstrou que a inibição da MAGL (com JZL195) pode causar efeitos tipo-ansiogênicos em machos, de modo dose-dependente, e que esse efeito é revertido com o antagonismo dos receptores CB1 (MANDUCA et al., 2015). Também já foi demonstrado que o efeito tipo-ansiolítico do E₂ depende de receptores CB1 (HILL; KARACABEYLI; GORZALKA, 2007), então é possível que a ativação de receptores CB1 pela combinação do aumento do 2-AG e do E₂ tenha gerado um efeito tipo-ansiogênico semelhante ao observado por Manduca e colaboradores (MANDUCA et al., 2015). Ainda, um estudo recente demonstrou que o bloqueio da MAGL causou um aumento do comportamento tipo-ansioso em fêmeas, mas não em machos, em um modelo de autismo induzido pelo ácido valpróico (THORNTON et al., 2021),

reforçando a hipótese de que os hormônios ovarianos têm papel importante no efeito da modulação do sistema eCB no comportamento tipo-ansioso.

Também, um estudo recente demonstrou que o efeito do 2-AG, diferente da AEA, não depende somente do agonismo CB1, mas também do CB2 (BRIANIS et al., 2021). Pode ser que o agonismo dos receptores CB2 tenha sido um fator importante no efeito do MJN nas fêmeas: um estudo usando o agonista CB1/CB2, HU-210, demonstrou que o tratamento com essa droga gera efeitos tanto ansiolíticos como ansiogênicos, em ratos machos não estressados, sendo que a dose mais baixa teve efeito tipo-ansiolítico enquanto a dose mais alta teve efeito tipo-ansio-gênico (HILL; GORZALKA, 2004). É possível que o efeito tipo-ansio-gênico observado nas fêmeas OVX-E₂, com a menor dose de MJN, tenha sido causado por uma ativação muito grande de receptores CB1 e CB2, gerando efeitos similares aos do HU-210. Entretanto, também é possível – considerando as doses e o pré-tratamento com E₂ – que o efeito tipo-ansio-gênico tenha sido causado por uma ativação CB1 muito alta; e quando a dose foi aumentada, esse efeito foi revertido após o recrutamento dos receptores CB2, levando à falta de efeito do MJN 3 mg/kg nas OVX-E₂.

Em suma, parece que os efeitos do MJN, nas doses baixas que foram utilizadas, dependem da proporção de E₂ para P presente – sendo que uma maior proporção de E₂ facilita o efeito tipo-ansio-gênico, enquanto uma maior proporção de P facilita o efeito tipo-ansiolítico.

Estudos sugerem que a fase do ciclo estral pode influenciar o comportamento das ratas no LCE (IMHOF et al., 1993; MARCONDES et al., 2001; MORA; DUSSAUBAT; DÍAZ-VÉLIZ, 1996), entretanto, isso não foi observado nos nossos experimentos. Quando comparamos os grupos veículo de cada fase do ciclo estral, não encontramos diferenças significativas para nenhum dos parâmetros analisados, tanto no experimento 2 como no experimento 6. Nossos resultados discordam dos trabalhos supracitados, mas concordam com outros trabalhos que demonstraram que a fase do ciclo estral não influencia o comportamento das ratas no LCE (BITRAN; HILVERS; KELLOGG, 1991; NOMIKOS; SPYRAKI, 1988).

Foi demonstrado que os níveis de eCBs, especificamente de AEA e 2-AG, variam em diferentes áreas do cérebro envolvidas no comportamento tipo-ansioso e nas respostas ao estresse (BUCZYNSKI; PARSONS, 2010), e essas variações são dependentes do sexo e do ciclo estral (BRADSHAW et al., 2006; LEVINE et al., 2021). A densidade e afinidade dos ligantes pelos receptores CBs também variam, em

diversas regiões cerebrais, de modo dependente do sexo, ciclo estral e E₂ (DE FONSECA et al., 1994; RIEBE et al., 2010). No pró-estro são observadas flutuações opostas e dependentes da região cerebral nos níveis de eCBs. Nessa fase, os níveis de AEA e 2-AG estão aumentados na pituitária e diminuídos no hipocampo (BRADSHAW et al., 2006). Essa é a fase do ciclo estral onde há aumento tanto de E₂ como de P (BUTCHER; COLLINS; FUGO, 1974), e foi demonstrado que ratas nessa fase apresentam níveis intermediários de afinidade dos ligantes pelos receptores CBs, e que a densidade de receptores CBs aumenta em ratas OVX tratadas com E₂, mas é revertida quando o tratamento é combinado com P (DE FONSECA et al., 1994). Desse modo, essas forças opostas agindo no sistema eCB em conjunto, mantendo de certo modo um equilíbrio durante o pró-estro, podem explicar a falta de efeitos tanto do URB como do MJN nessa fase, no nosso estudo.

No diestro, o 2-AG e a AEA estão aumentados no hipotálamo (BRADSHAW et al., 2006), o que provavelmente levaria a uma potenciação da sinalização eCB nessa região que está altamente implicada nas respostas tipo-ansiosas (BANNERMAN et al., 2004; BERTOGLIO; JOCA; GUIMARÃES, 2006; ENGIN; TREIT, 2007; MCHUGH et al., 2004). Essa potenciação pode ter sido responsável pelo efeito tipo-ansiolítico observado com o tratamento com URB 0.1 mg/kg, que não foi suficiente para promover uma resposta nas outras fases ou nos machos, mas teve esse efeito quando a sinalização estava potencializada no diestro.

No estro, foi demonstrado uma diminuição da densidade de receptores CBs no hipotálamo e da afinidade dos ligantes no prosencéfalo límbico (DE FONSECA et al., 1994), além de uma diminuição do conteúdo de AEA na área cinzenta periaquedutal (LEVINE et al., 2021), indicando, em geral, uma sinalização eCB prejudicada nessa fase do ciclo. Esse prejuízo pode explicar o efeito tipo-ansiolítico do MJN nessa fase, mesmo quando a dose utilizada foi menor do que a usada na maioria dos estudos. De modo que a ligeira elevação no conteúdo de 2-AG seria suficiente para ativar os receptores CB1 disponíveis, gerando a resposta tipo-ansiolítica, que já é bem descrita (KATHURIA et al., 2003). Ao mesmo tempo, pode explicar o efeito tipo-ansio gênico da dose mais alta de URB nessa fase. Possivelmente nesse estado de prejuízo da sinalização, o aumento de AEA causado por essa dose pode ter sido suficiente para se ligar nos receptores CB1 disponíveis e ainda ativar os receptores TRPV1, nos quais a AEA pode agir como agonista parcial

ou total (ROSS, 2003), cuja ativação causa respostas tipo-ansiolíticas (HAKIMIZADEH et al., 2012), como a que foi observada aqui.

O Cannabidiol (CBD) é um composto não psicotomimético da *Cannabis* que, diferente do Δ^9 -THC, tem baixa afinidade pelos receptores CBs, mas age preferencialmente inibindo a FAAH e aumentando os níveis endógenos de AEA (DE PETROCELLIS et al., 2011; LIGRESTI; DE PETROCELLIS; DI MARZO, 2016). Sua popularidade tem aumentando muito para o uso medicinal, uma vez que, não produzindo os efeitos “recreativos” do THC, sua liberação em países onde a *Cannabis* ainda é ilegal, como o Brasil, parece ser mais fácil (ZAMENGO et al., 2020).

No contexto deste trabalho, o CBD em mulheres em idade reprodutiva provavelmente teria efeitos semelhantes aos observados com a inibição da FAAH. Considerando a flutuação dos hormônios ovarianos em mulheres, o CBD seria mais efetivo quando os níveis de estradiol se encontram baixos – no fim da fase lútea, na fase pré-menstrual e menstrual (DONNER; LOWRY, 2013; EL-TALATINI; TAYLOR; KONJE, 2010), de modo análogo ao observado com o URB nas fêmeas no diestro. Entretanto, o CBD teria potencial de causar efeitos adversos durante a fase lútea – quando há diminuição de estradiol e aumento de progesterona (DONNER; LOWRY, 2013; EL-TALATINI; TAYLOR; KONJE, 2010), de modo semelhante ao observado em fêmeas no estro. Sua administração em mulheres no período de menopausa, porém, apresentaria provavelmente a maior vantagem terapêutica – uma vez que, aqui, os efeitos ansiolíticos mais pronunciados ocorreram nas fêmeas OVX, que apresentam uma deficiência hormonal semelhante à observada na menopausa (ALAGWU; NNELI, 2005; EL-TALATINI; TAYLOR; KONJE, 2010). Em concordância, um trabalho do nosso grupo mostrou que o CBD, em doses baixas, tem efeito ansiolítico e foi capaz de reverter os efeitos ansiolíticos do THC em fêmeas (SALVIATO et al., 2021), entretanto, esse efeito não foi avaliado nas diferentes fases do ciclo estral o que pode ter mascarado um possível efeito ansiolítico ligado à flutuação hormonal. Ainda, o CBD apresenta outros mecanismos de ação que não a inibição da FAAH, como o agonismo de receptores serotoninérgicos (5-HT_{1A}) que contribuem para os efeitos ansiolíticos, mas também o agonismo de receptores TRPV1, que gera efeitos ansiolíticos (DE PETROCELLIS et al., 2011; PATEL et al., 2017). Então, é possível que o CBD tenha efeitos parecidos com o URB em fêmeas, porém mais estudos são necessários para compreender os efeitos do CBD em fêmeas em relação as fases do ciclo estral.

Os efeitos de um inibidor da MAGL no período da menopausa provavelmente não seriam tão efetivos, considerando que aqui ele não teve efeito nas fêmeas OVX. Porém, esse tipo de inibidor apresentaria uma vantagem em relação ao CBD (ou outro fármaco que iniba a FAAH) durante a fase lútea, visto que o efeito ansiolítico desse inibidor foi visto em fêmeas no estro. Com esse balanço delicado entre efeitos ansiolíticos e ansiogênicos, a melhor aposta para o tratamento da ansiedade com inibidores da hidrólise de eCBs, em mulheres em fase reprodutiva, seria um tratamento individualizado, alternando entre inibidores da FAAH e da MAGL de acordo com a fase do ciclo menstrual. Já para mulheres na menopausa, a inibição da FAAH teria efeitos mais interessantes, sem a necessidade de se ajustar à flutuação hormonal visto que essa já cessou (EL-TALATINI; TAYLOR; KONJE, 2010).

5.1. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Juntos, os nossos resultados reforçam que há diferenças importantes nos efeitos dos eCBs no comportamento tipo-ansioso entre machos e fêmeas, além de demonstrar como o ciclo estral influencia a sinalização eCB em fêmeas. Entender como o sistema eCB se relaciona com a flutuação hormonal é um passo importante para a criação de tratamentos para o TAG que sejam efetivos e causem menos efeitos colaterais em mulheres.

Até a conclusão deste trabalho, não há estudos relacionando os níveis de hormônios ovarianos nas diferentes fases do ciclo estral com os níveis de eCBs em diferentes regiões cerebrais ligadas com o comportamento tipo-ansioso. Nossa intenção para o futuro é elucidar essa relação e possivelmente investigar mais a fundo os mecanismos através dos quais os eCBs exercem seus efeitos no comportamento tipo-ansioso, particularmente em fêmeas.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R.; HUNT, M.; CLARK, J. H. Structure of Cannabidiol, a Product Isolated from the Marijuana Extract of Minnesota Wild Hemp. **Journal of the American Chemical Society**, v. 62, n. 1, p. 196–200, 1940.
- ALAGWU, E. A.; NNELI, R. O. Effect of ovariectomy on the levels of plasma sex hormones in albino rats. **Nigerian Journal of Physiological Sciences**, v. 20, n. 1, p. 90–94, 2005.
- ALTEBA, S. et al. Antidepressant-like effects of URB597 and JZL184 in male and female rats exposed to early life stress. **European Neuropsychopharmacology**, v. 39, p. 70–86, 1 out. 2020.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais (DSM-5). **Artmed**, v. 5, 2014.
- AVIRAM, J. et al. Sex Differences in Medical Cannabis Related Adverse effects. **Pain**, p. 1–37, 26 ago. 2021.
- BANDELOW, B. et al. The Diagnosis and Treatment of Generalized Anxiety Disorder. **Deutsches Ärzteblatt International**, v. 110, n. 17, p. 300–310, abr. 2013.
- BANNERMAN, D. M. et al. Regional dissociations within the hippocampus—memory and anxiety. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, Festschrift in Honour of Jeffrey Gray - Issue 1: Anxiety and Neuroticism. v. 28, n. 3, p. 273–283, 1 maio 2004.
- BATTISTA, N. et al. The endocannabinoid system: an overview. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 6, p. 9, 14 mar. 2012.
- BEDSE, G. et al. Therapeutic endocannabinoid augmentation for mood and anxiety disorders: comparative profiling of FAAH, MAGL and dual inhibitors. **Translational Psychiatry**, v. 8, n. 1, p. 1–14, 26 abr. 2018.
- BERTOGLIO, L. J.; JOCA, S. R. L.; GUIMARÃES, F. S. Further evidence that anxiety and memory are regionally dissociated within the hippocampus. **Behavioural Brain Research**, v. 175, n. 1, p. 183–188, 25 nov. 2006.
- BITRAN, D.; DOWD, J. A. Ovarian steroids modify the behavioral and neurochemical responses of the central benzodiazepine receptor. **Psychopharmacology**, v. 125, n. 1, p. 65–73, maio 1996.
- BITRAN, D.; HILVERS, R. J.; KELLOGG, C. K. Ovarian endocrine status modulates the anxiolytic potency of diazepam and the efficacy of γ -aminobutyric acid-benzodiazepine receptor-mediated chloride ion transport. **Behavioral Neuroscience**, v. 105, n. 5, p. 653, 1991.
- BRADSHAW, H. B. et al. Sex and hormonal cycle differences in rat brain levels of pain-related cannabimimetic lipid mediators. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 291, n. 2, p. R349–R358, ago. 2006.

BRIANIS, R. C. et al. Anti-aversive effect of 2-arachidonoylglycerol in the dorsolateral periaqueductal gray of male rats in contextual fear conditioning and Vogel tests. **Behavioural Pharmacology**, 1 jun. 2021.

BUCZYNSKI, M. W.; PARSONS, L. H. Quantification of brain endocannabinoid levels: methods, interpretations and pitfalls. **British Journal of Pharmacology**, v. 160, n. 3, p. 423–442, 2010.

BUSQUETS-GARCIA, A. et al. Differential role of anandamide and 2-arachidonoylglycerol in memory and anxiety-like responses. **Biological Psychiatry**, v. 70, n. 5, p. 479–486, 1 set. 2011.

BUTCHER, R. L.; COLLINS, W. E.; FUGO, N. W. Plasma Concentration of LH, FSH, Prolactin, Progesterone and Estradiol-17 β Throughout the 4-Day Estrous Cycle of the Rat. **Endocrinology**, v. 94, n. 6, p. 1704–1708, jun. 1974.

CARNEVALI, L. et al. Antidepressant-like activity and cardioprotective effects of fatty acid amide hydrolase inhibitor URB694 in socially stressed Wistar Kyoto rats. **European Neuropsychopharmacology**, v. 25, n. 11, p. 2157–2169, 1 nov. 2015.

CARNEVALI, L. et al. Antidepressant-like effects of pharmacological inhibition of FAAH activity in socially isolated female rats. **European Neuropsychopharmacology**, v. 32, p. 77–87, mar. 2020.

CAROBREZ, A. P.; BERTOGLIO, L. J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: The elevated plus-maze model 20 years on. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, Defensive Behavior. v. 29, n. 8, p. 1193–1205, 1 jan. 2005.

COOPER, Z. D.; CRAFT, R. M. Sex-Dependent Effects of Cannabis and Cannabinoids: A Translational Perspective. **Neuropsychopharmacology**, v. 43, n. 1, p. 34–51, jan. 2018.

CRAFT, R. M. et al. Sex Differences in Cannabinoid 1 vs. Cannabinoid 2 Receptor-Selective Antagonism of Antinociception Produced by Δ 9-Tetrahydrocannabinol and CP55,940 in the Rat. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 340, n. 3, p. 787-800, 2012.

CRAFT, R. M.; KANDASAMY, R.; DAVIS, S. M. Sex differences in anti-allodynic, anti-hyperalgesic and anti-edema effects of Δ 9-tetrahydrocannabinol in the rat. **PAIN®**, v. 154, n. 9, p. 1709–1717, 1 set. 2013.

CUTTLE, C.; MISCHLEY, L. K.; SEXTON, M. Sex Differences in Cannabis Use and Effects: A Cross-Sectional Survey of Cannabis Users. **Cannabis and Cannabinoid Research**, v. 1, n. 1, p. 166–175, dez. 2016.

DANANDEH, A. et al. Effects of fatty acid amide hydrolase inhibitor URB597 in a rat model of trauma-induced long-term anxiety. **Psychopharmacology**, v. 235, n. 11, p. 3211–3221, nov. 2018.

DE FONSECA, F. R. et al. Cannabinoid receptors in rat brain areas: Sexual differences, fluctuations during estrous cycle and changes after gonadectomy and sex steroid replacement. **Life Sciences**, v. 54, n. 3, p. 159–170, 1 jan. 1994.

DE PETROCELLIS, L. et al. Effects of cannabinoids and cannabinoid-enriched Cannabis extracts on TRP channels and endocannabinoid metabolic enzymes. **British Journal of Pharmacology**, v. 163, n. 7, p. 1479–1494, 2011.

DEVANE, W. A. et al. Determination and Characterization of a Cannabinoid Receptor in Rat Brain, **Molecular Pharmacology**, 1988.

DEVANE, W. A. et al. Isolation and Structure of a Brain Constituent That Binds to the Cannabinoid Receptor. **Science**, 1992.

DI MARZO, V. Biosynthesis and inactivation of endocannabinoids: Relevance to their proposed role as neuromodulators. **Life Sciences**, v. 65, n. 6, p. 645–655, 9 jul. 1999.

DÍAZ-VÉLIZ, G. Ketanserin and Anxiety Levels: Influence of Gender, Estrous Cycle, Ovariectomy and Ovarian Hormones in Female Rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 58, n. 3, p. 637–642, nov. 1997.

DINH, T. P. et al. Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 16, p. 10819–10824, 6 ago. 2002.

DONNER, N.; LOWRY, C. Sex difference in anxiety and emotional behavior. **Pflugers Archiv : European journal of physiology**, v. 465, 16 abr. 2013.

ECOCHARD, R.; GOUGEON, A. Side of ovulation and cycle characteristics in normally fertile women. **Human Reproduction**, v. 15, n. 4, p. 752–755, 1 abr. 2000.

EL-TALATINI, M. R.; TAYLOR, A. H.; KONJE, J. C. The relationship between plasma levels of the endocannabinoid, anandamide, sex steroids, and gonadotrophins during the menstrual cycle. **Fertility and Sterility**, v. 93, n. 6, p. 1989–1996, 1 abr. 2010.

ENGIN, E.; TREIT, D. The role of hippocampus in anxiety: intracerebral infusion studies. **Behavioural Pharmacology**, v. 18, n. 5–6, p. 365–374, set. 2007.

FACCIO, L. et al. Serum levels of LH, FSH, estradiol and progesterone in female rats experimentally infected by *Trypanosoma evansi*. **Experimental Parasitology**, v. 135, n. 1, p. 110–115, 1 set. 2013.

FLANNERY, L. E. et al. FAAH inhibition attenuates TLR3-mediated hyperthermia, nociceptive- and anxiety-like behaviour in female rats. **Behavioural Brain Research**, v. 353, p. 11–20, nov. 2018.

FLORES, R. J. et al. Estradiol promotes and progesterone reduces anxiety-like behavior produced by nicotine withdrawal in female rats. **Psychoneuroendocrinology**, v. 119, p. 104694, 1 set. 2020.

FREEMAN, T. P. et al. Medicinal use of cannabis based products and cannabinoids. **BMJ**, v. 365, p. l1141, 4 abr. 2019.

GAONI, Y.; MECHOULAM, R. Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. **American Chemical Society**, v. 86, n. 8, p. 1646-1647, 1 abr. 1964.

GERRITS, M. et al. Cyclic estradiol replacement attenuates stress-induced c-Fos expression in the PVN of ovariectomized rats. **Brain Research Bulletin**, v. 67, n. 1–2, p. 147–155, set. 2005.

GOLDMAN, M. B.; HATCH, M. C. **Women and Health**. [s.l.] Elsevier, 1999.

GUIMARÃES, F. S. et al. Antianxiety effect of cannabidiol in the elevated plus-maze. **Psychopharmacology**, v. 100, n. 4, p. 558–559, 1 abr. 1990.

GUNDUZ-CINAR, O. et al. Amygdala FAAH and anandamide: mediating protection and recovery from stress. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 34, n. 11, p. 637–644, 1 nov. 2013.

HAKIMIZADEH, E. et al. Endocannabinoid System and TRPV1 Receptors in the Dorsal Hippocampus of the Rats Modulate Anxiety-like Behaviors. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 15, n. 3, p. 795–802, 2012.

HERMAN, J. P. et al. Limbic system mechanisms of stress regulation: Hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, Experimental Stress: from Basic to Clinical Aspects. v. 29, n. 8, p. 1201–1213, 1 dez. 2005.

HILL, M. N. et al. Downregulation of Endocannabinoid Signaling in the Hippocampus Following Chronic Unpredictable Stress. **Neuropsychopharmacology**, v. 30, n. 3, p. 508–515, mar. 2005.

HILL, M. N.; GORZALKA, B. B. Enhancement of anxiety-like responsiveness to the cannabinoid CB1 receptor agonist HU-210 following chronic stress. **European Journal of Pharmacology**, v. 499, n. 3, p. 291–295, 24 set. 2004.

HILL, M. N.; GORZALKA, B. B. The Endocannabinoid System and the Treatment of Mood and Anxiety Disorders. **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**, v. 8, n. 6, p. 451–458, 1 dez. 2009.

HILL, M. N.; KARACABEYLI, E. S.; GORZALKA, B. B. Estrogen recruits the endocannabinoid system to modulate emotionality. **Psychoneuroendocrinology**, v. 32, n. 4, p. 350–357, maio 2007.

HLAVACOVA, N. et al. Inhibition of fatty-acid amide hydrolyse (FAAH) exerts cognitive improvements in male but not female rats. **Endocrine regulations**, v. 49, n. 3, p. 131–136, 1 jul. 2015.

HOGG, S. A review of the validity and variability of the Elevated Plus-Maze as an animal model of anxiety. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, Anxiety, Stress and Depression. v. 54, n. 1, p. 21–30, 1 maio 1996.

HOLM, L. et al. Acute effects on brain cholecystokinin-like concentration and anxiety-like behaviour in the female rat upon a single injection of 17 β -estradiol. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 122, p. 222–227, 1 jul. 2014.

HORST, G. J. T. et al. Sex differences in stress responses: Focus on ovarian hormones. **Physiology & Behavior**, v. 97, n. 2, p. 239–249, 25 maio 2009.

HOWELL, H. B. et al. Generalized Anxiety Disorder in Women. **Psychiatric Clinics of North America**, v. 24, n. 1, p. 165–178, 1 mar. 2001.

HOWLETT, A. C. et al. The cannabinoid receptor: biochemical, anatomical and behavioral characterization. **Trends in Neurosciences**, v. 13, n. 10, p. 420–423, 1 out. 1990.

IMHOF, J. T. et al. Influence of gender and age on performance of rats in the elevated plus maze apparatus. **Behavioural Brain Research**, v. 56, n. 2, p. 177–180, 30 set. 1993.

JACOB, A.; TODD, A. R. Cannabidiol and Cannabiol, Constituents of Cannabis indica Resin. **Nature**, v. 145, n. 350, 1940.

JOHNSTON, A. L.; FILE, S. E. Sex differences in animal tests of anxiety. **Physiology & Behavior**, v. 49, n. 2, p. 245–250, 1 fev. 1991.

KATHURIA, S. et al. Modulation of anxiety through blockade of anandamide hydrolysis. **Nature Medicine**, v. 9, n. 1, p. 76–81, jan. 2003.

KUMAR, S. et al. Transient receptor potential vanilloid 1-6 (Trpv1-6) gene expression in the mouse brain during estrous cycle. **Brain Research**, v. 1701, p. 161–170, 15 dez. 2018.

LEVINE, A. et al. Sex differences in the expression of the endocannabinoid system within V1M cortex and PAG of Sprague Dawley rats. **Biology of Sex Differences**, v. 12, n. 1, p. 60, dez. 2021.

LIGRESTI, A.; DE PETROCELLIS, L.; DI MARZO, V. From Phytocannabinoids to Cannabinoid Receptors and Endocannabinoids: Pleiotropic Physiological and Pathological Roles Through Complex Pharmacology. **Physiological Reviews**, v. 96, n. 4, p. 1593–1659, 1 out. 2016.

LIN, S. et al. Novel Analogues of Arachidonylethanolamide (Anandamide): Affinities for the CB1 and CB2 Cannabinoid Receptors and Metabolic Stability. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 41, n. 27, p. 5353–5361, 1 dez. 1998.

LOMAZZO, E. et al. Therapeutic Potential of Inhibitors of Endocannabinoid Degradation for the Treatment of Stress-Related Hyperalgesia in an Animal Model of Chronic Pain. **Neuropsychopharmacology**, v. 40, n. 2, p. 488–501, jan. 2015.

MAEDA, K.; OHKURA, S.; TSUKAMURA, H. Chapter 9 - Physiology of Reproduction. In: KRINKE, G. J. (Ed.). **The Laboratory Rat**. Handbook of Experimental Animals. London: Academic Press, 2000. p. 145–176.

MAHABIR, V. K. et al. Medical cannabis use in the United States: a retrospective database study. **Journal of Cannabis Research**, v. 2, n. 1, p. 32, 29 set. 2020.

MANDUCA, A. et al. Distinct roles of the endocannabinoids anandamide and 2-arachidonoylglycerol in social behavior and emotionality at different developmental ages in rats. **European Neuropsychopharmacology**, v. 25, n. 8, p. 1362–1374, ago. 2015.

- MARCO, E. M. et al. Involvement of 5-HT_{1A} receptors in behavioural effects of the cannabinoid receptor agonist CP 55,940 in male rats: **Behavioural Pharmacology**, v. 15, n. 1, p. 21–27, fev. 2004.
- MARCONDES, F. K. et al. Stress-induced subsensitivity to catecholamines depends on the estrous cycle. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 74, n. 6, jun. 1996.
- MARCONDES, F. K. et al. Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze test. **Physiology & Behavior**, v. 74, n. 4, p. 435–440, 12 nov. 2001.
- MARCONDES, F. K., BIANCHI, F. J., TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Brazilian Journal of Biology**, v. 62, p. 609-614, nov. 2002.
- MCHUGH, S. B. et al. Amygdala and Ventral Hippocampus Contribute Differentially to Mechanisms of Fear and Anxiety. **Behavioral Neuroscience**, v. 118, n. 1, p. 63–78, 2004.
- MCLEAN, C. P. et al. Gender differences in anxiety disorders: Prevalence, course of illness, comorbidity and burden of illness. **Journal of Psychiatric Research**, v. 45, n. 8, p. 1027–1035, 1 ago. 2011.
- MECHOULAM, R. The Pharmacohistory of Cannabis Sativa. In: **Cannabinoids as Therapeutic Agents**. [s.l.] Chapman and Hall/CRC, 1986.
- 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.; FRIDE, E.; DI MARZO, V. Endocannabinoids. **European Journal of Pharmacology**, v. 359, n. 1, p. 1–18, 16 out. 1998.
- MECHOULAM, R.; PARKER, L. A. The Endocannabinoid System and the Brain. **Annual Review of Psychology**, v. 64, n. 1, p. 21–47, 2013.
- MIKICS, É. et al. Behavioral specificity of non-genomic glucocorticoid effects in rats: Effects on risk assessment in the elevated plus-maze and the open-field. **Hormones and Behavior**, v. 48, n. 2, p. 152–162, 1 ago. 2005.
- MORA, S.; DUSSAUBAT, N.; DÍAZ-VÉLIZ, G. Effects of the estrous cycle and ovarian hormones on behavioral indices of anxiety in female rats. **Psychoneuroendocrinology**, v. 21, n. 7, p. 609–620, 1 out. 1996.
- MOREIRA, F. A. et al. Reduced anxiety-like behaviour induced by genetic and pharmacological inhibition of the endocannabinoid-degrading enzyme fatty acid amide hydrolase (FAAH) is mediated by CB₁ receptors. **Neuropharmacology**, v. 54, n. 1, p. 141–150, jan. 2008.

MORENA, M. et al. Neurobiological Interactions Between Stress and the Endocannabinoid System. **Neuropsychopharmacology**, v. 41, n. 1, p. 80–102, jan. 2016a.

MORENA, M. et al. Emotional arousal state influences the ability of amygdalar endocannabinoid signaling to modulate anxiety. **Neuropharmacology**, v. 111, p. 59–69, 1 dez. 2016b.

MORENA, M. et al. Sex-dependent effects of endocannabinoid modulation of conditioned fear extinction in rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 178, n. 4, p. 983–996, fev. 2021.

MUNRO, S.; THOMAS, K. L.; ABU-SHAAR, M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. **Nature**, v. 365, n. 6441, p. 61–65, set. 1993.

NOMIKOS, G. G.; SPYRAKI, C. Influence of oestrogen on spontaneous and diazepam-induced exploration of rats in an elevated plus maze. **Neuropharmacology**, v. 27, n. 7, p. 691–696, 1 jul. 1988.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Depression and Other Common Mental Disorders: Global Health Estimates. Geneva: **World Health Organization**; 2017. License: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

ÖSTERLUND, M. et al. Differential distribution and regulation of estrogen receptor- α and - β mRNA within the female rat brain. **Molecular Brain Research**, v. 54, n. 1, p. 175-180, 1 fev. 1998.

PALMER, S. L.; KHANOLKAR, A. D.; MAKRIYANNIS, A. Natural and Synthetic Endocannabinoids and Their Structure-Activity Relationships. **Current Pharmaceutical Design**, v. 6, n. 13, p. 1381–1397, 2000.

PANDARANANDAKA, J.; POONYACHOTI, S.; KALANDAKANOND-THONGSONG, S. Differential effects of exogenous and endogenous estrogen on anxiety as measured by elevated T-maze in relation to the serotonergic system. **Behavioural Brain Research**, v. 198, n. 1, p. 142–148, 2 mar. 2009.

PATEL, S. et al. The endocannabinoid system as a target for novel anxiolytic drugs. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 76, p. 56-66, 2017.

PAVÓN, F. J. et al. Selective inhibition of monoacylglycerol lipase is associated with passive coping behavior and attenuation of stress-induced dopamine release in the medial prefrontal cortex. **Neurobiology of Stress**, v. 14, p. 100293, 1 maio 2021.

PELLOW, S. et al. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, n. 3, p. 149-167, 1985.

PELLOW, S.; FILE, S. E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: A novel test of anxiety in the rat. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 24, n. 3, p. 525–529, 1 mar. 1986.

PERCIE DU SERT, N. et al. The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 40, n. 9, p. 1769-1777, set. 2020.

REY, A. A. et al. Biphasic Effects of Cannabinoids in Anxiety Responses: CB1 and GABAB Receptors in the Balance of GABAergic and Glutamatergic Neurotransmission. **Neuropsychopharmacology**, v. 37, n. 12, p. 2624–2634, nov. 2012.

RIEBE, C. J. N. et al. Estrogenic Regulation of Limbic Cannabinoid Receptor Binding. **Psychoneuroendocrinology**, v. 35, n. 8, p. 1265–1269, set. 2010.

RODRÍGUEZ DE FONSECA, F. et al. The endocannabinoid system: physiology and pharmacology. **Alcohol and Alcoholism (Oxford, Oxfordshire)**, v. 40, n. 1, p. 2–14, fev. 2005.

ROMERO, E. M. et al. Antinociceptive, behavioural and neuroendocrine effects of CP 55,940 in young rats. **Developmental Brain Research**, v. 136, n. 2, p. 85–92, 30 jun. 2002.

ROSS, R. A. Anandamide and vanilloid TRPV1 receptors. **British Journal of Pharmacology**, v. 140, n. 5, p. 790–801, 2003.

RUBINO, T. et al. Role in Anxiety Behavior of the Endocannabinoid System in the Prefrontal Cortex. **Cerebral Cortex**, v. 18, n. 6, p. 1292–1301, 1 jun. 2008.

SALVIATO, B. Z. et al. Female but not male rats show biphasic effects of low doses of Δ^9 -tetrahydrocannabinol on anxiety: can cannabidiol interfere with these effects? **Neuropharmacology**, v. 196, 15 set. 2021.

SCHERMA, M. et al. The endogenous cannabinoid anandamide has effects on motivation and anxiety that are revealed by fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibition. **Neuropharmacology**, v. 54, n. 1, p. 129–140, jan. 2008.

SCIOLINO, N. R.; ZHOU, W.; HOHMANN, A. G. Enhancement of endocannabinoid signaling with JZL184, an inhibitor of the 2-arachidonoylglycerol hydrolyzing enzyme monoacylglycerol lipase, produces anxiolytic effects under conditions of high environmental aversiveness in rats. **Pharmacological research: the official journal of the Italian Pharmacological Society**, v. 64, n. 3, p. 226–234, set. 2011.

SERRANO, A. et al. Deficient endocannabinoid signaling in the central amygdala contributes to alcohol dependence-related anxiety-like behavior and excessive alcohol intake. **Neuropsychopharmacology**, v. 43, n. 9, p. 1840–1850, ago. 2018.

SIMONE, J. J.; MALIVOIRE, B. L.; MCCORMICK, C. M. Effects of CB1 receptor agonism and antagonism on behavioral fear and physiological stress responses in adult intact, ovariectomized, and estradiol-replaced female rats. **Neuroscience**, v. 306, p. 123–137, 15 out. 2015.

STEINER, M.; WOTJAK, C. Role of the endocannabinoid system in regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. In: **Progress in Brain Research**. [s.l.] Elsevier, 2008. v. 170p. 397–432.

STELLA, N.; SCHWEITZER, P.; PIOMELLI, D. A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. **Nature**, v. 388, n. 6644, p. 773–778, ago. 1997.

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, out. 1995.

SULCOVA, E.; MECHOULAM, R.; FRIDE, E. Biphasic Effects of Anandamide. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 59, n. 2, p. 347–352, 1 fev. 1998.

SUMISLAWSKI, J. J.; RAMIKIE, T. S.; PATEL, S. Reversible Gating of Endocannabinoid Plasticity in the Amygdala by Chronic Stress: A Potential Role for Monoacylglycerol Lipase Inhibition in the Prevention of Stress-Induced Behavioral Adaptation. **Neuropsychopharmacology**, v. 36, n. 13, p. 2750–2761, dez. 2011.

SVÍŽENSKÁ, I.; DUBOVÝ, P.; ŠULCOVÁ, A. Cannabinoid receptors 1 and 2 (CB1 and CB2), their distribution, ligands and functional involvement in nervous system structures — A short review. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 90, n. 4, p. 501–511, 1 out. 2008.

TERZIAN, A. L. B. et al. Modulation of anxiety-like behaviour by Transient Receptor Potential Vanilloid Type 1 (TRPV1) channels located in the dorsolateral periaqueductal gray. **European Neuropsychopharmacology**, v. 19, n. 3, p. 188–195, 1 mar. 2009.

THOMAS, E. A. et al. Fatty acid amide hydrolase, the degradative enzyme for anandamide and oleamide, has selective distribution in neurons within the rat central nervous system. **Journal of Neuroscience Research**, v. 50, n. 6, p. 1047–1052, 1997.

THORNTON, A. M. et al. Increasing Endocannabinoid Tone Alters Anxiety-Like and Stress Coping Behaviour in Female Rats Prenatally Exposed to Valproic Acid. **Molecules**, v. 26, n. 12, p. 3720, 18 jun. 2021.

TSENG, A. H.; CRAFT, R. M. Sex differences in antinociceptive and motoric effects of cannabinoids. **European Journal of Pharmacology**, v. 430, n. 1, p. 41–47, 26 out. 2001.

VECCHIARELLI, H. A. et al. Comorbid anxiety-like behavior in a rat model of colitis is mediated by an upregulation of corticolimbic fatty acid amide hydrolase. **Neuropsychopharmacology**, v. 46, n. 5, p. 992–1003, abr. 2021.

VIAU, V.; MEANEY, M. J. Variations in the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Response to Stress during the Estrous Cycle in the Rat. **Endocrinology**, v. 129, n. 5, p. 2503–2511, 1 nov. 1991.

VICKSTROM, C. R. et al. Role of endocannabinoid signaling in a septohabenular pathway in the regulation of anxiety- and depressive-like behavior. **Molecular psychiatry**, v. 26, n. 7, p. 3178–3191, jul. 2021.

- WALF, A. A.; FRYE, C. A. Antianxiety and Antidepressive Behavior Produced by Physiological Estradiol Regimen may be Modulated by Hypothalamic–Pituitary–Adrenal Axis Activity. **Neuropsychopharmacology**, v. 30, n. 7, p. 1288–1301, jul. 2005.
- WALF, A. A.; FRYE, C. A. Estradiol decreases anxiety behavior and enhances inhibitory avoidance and gestational stress produces opposite effects. **Stress**, v. 10, n. 3, p. 251–260, 1 jan. 2007a.
- WALF, A. A.; FRYE, C. A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. **Nature Protocols**, v. 2, n. 2, p. 322–328, fev. 2007b.
- WALF, A. A.; FRYE, C. A. Effects of two estradiol regimens on anxiety and depressive behaviors and trophic effects in peripheral tissues in a rodent model. **Gender Medicine**, v. 6, n. 1, p. 300–311, 1 abr. 2009.
- WEBB, C. W.; WEBB, S. M. Therapeutic Benefits of Cannabis: A Patient Survey. **Hawai'i Journal of Medicine & Public Health**, v. 73, n. 4, p. 109–111, abr. 2014.
- WEED, P. F. et al. Chronic Δ^9 -Tetrahydrocannabinol during Adolescence Differentially Modulates Striatal CB1 Receptor Expression and the Acute and Chronic Effects on Learning in Adult Rats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 356, n. 1, p. 20–31, 1 jan. 2016.
- WEGORZEWSKA, I. N. et al. Postovariectomy weight gain in female rats is reversed by estrogen receptor α agonist, propylpyrazoletriol. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 199, n. 1, p. 67.e1-67.e5, 1 jul. 2008.
- WESTWOOD, F. R. The Female Rat Reproductive Cycle: A Practical Histological Guide to Staging. **Toxicologic Pathology**, v. 36, n. 3, p. 375–384, 1 abr. 2008.
- WILEY, J. L. et al. Comparison of the discriminative stimulus and response rate effects of Δ^9 -tetrahydrocannabinol and synthetic cannabinoids in female and male rats. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 172, p. 51–59, 1 mar. 2017.
- WILEY, J. L.; BURSTON, J. J. Sex differences in Δ^9 -tetrahydrocannabinol metabolism and in vivo pharmacology following acute and repeated dosing in adolescent rats. **Neuroscience Letters**, v. 576, p. 51–55, 25 jul. 2014.
- WITTCHEN, H.-U. Generalized anxiety disorder: prevalence, burden, and cost to society. **Depression and Anxiety**, v. 16, n. 4, p. 162–171, 2002.
- ZAMENGO, L. et al. Cannabis knowledge and implications for health: Considerations regarding the legalization of non-medical cannabis. **Medicine, Science and the Law**, v. 60, n. 4, p. 309–314, out. 2020.