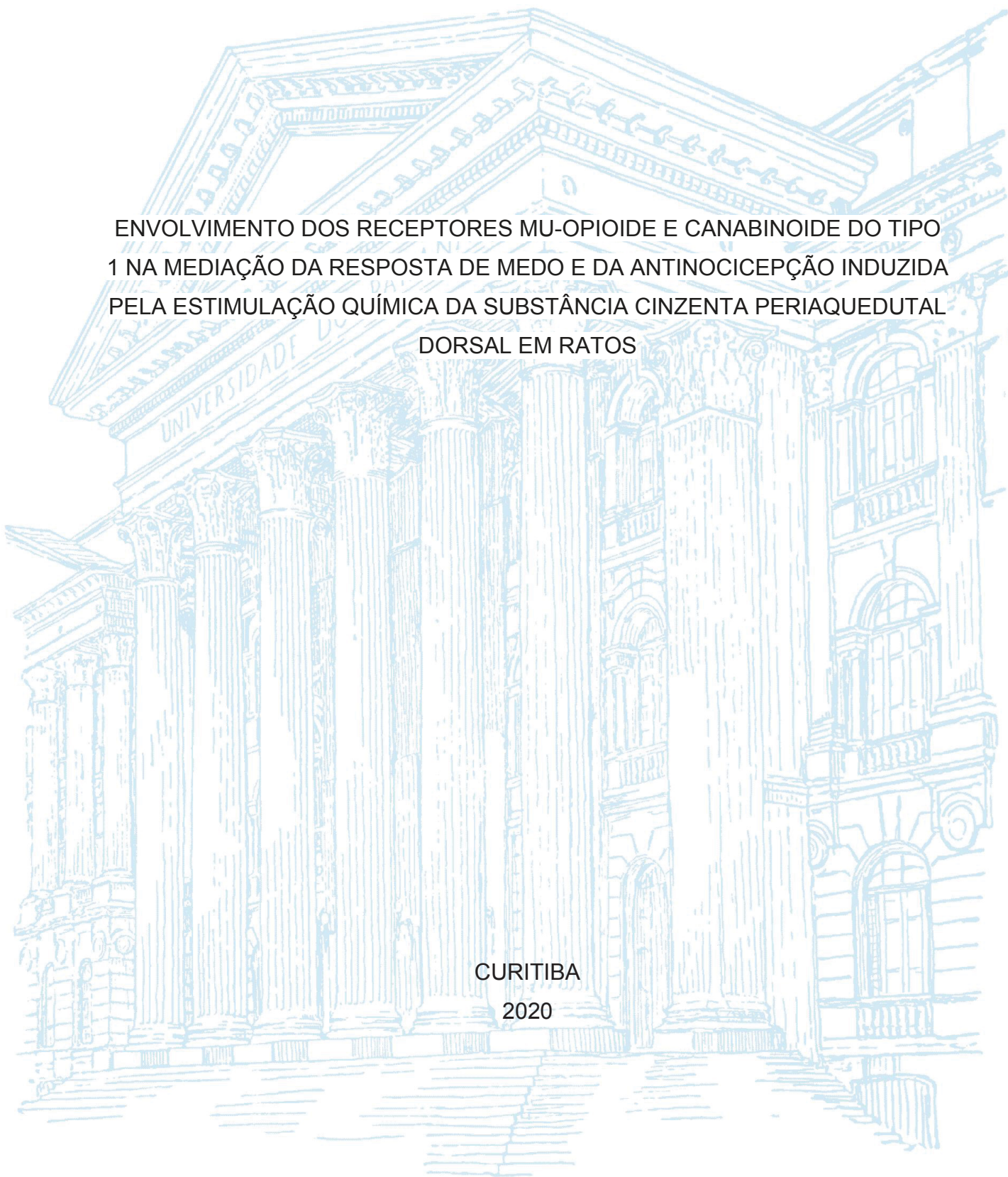


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MANUELLA MACHADO GODOI

ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES MU-OPIOIDE E CANABINOIDE DO TIPO
1 NA MEDIAÇÃO DA RESPOSTA DE MEDO E DA ANTINOCICEPÇÃO INDUZIDA
PELA ESTIMULAÇÃO QUÍMICA DA SUBSTÂNCIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL
DORSAL EM RATOS

CURITIBA
2020



MANUELLA MACHADO GODOI

ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES MU-OPIOIDE E CANABINOIDE DO TIPO
1 NA MEDIAÇÃO DA RESPOSTA DE MEDO E DA ANTINOCICEPÇÃO INDUZIDA
PELA ESTIMULAÇÃO QUÍMICA DA SUBSTÂNCIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL
DORSAL 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: Profa. Dra. Janaína Menezes Zanoveli

Coorientadora: Profa. Dra. Joice Maria da Cunha

CURITIBA

2020

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Rosilei Vilas Boas – CRB/9-939).

Godoi, Manuella Machado.

Envolvimento dos receptores mu-opioide e canabinoide do tipo 1 na mediação da resposta de medo e da antinocicepção induzida pela estimulação química da substância cinzenta periaquedutal dorsal em ratos. / Manuella Machado Godoi. – Curitiba, 2020.

76 f. : il.

Orientadora: Janaína Menezes Zanoveli.

Coorientadora: Joice Maria da Cunha.

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

1. Opioides. 2. Canabinóides. 3. Dor - Medição. 4. Medo. 5. Ratos Wistar. I. Título. II. Zanoveli, Janaína Menezes. III. Cunha, Joice Maria da. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

CDD (20. ed.) 616.08



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 em FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **MANUELLA MACHADO GODOI** intitulada: **Envolvimento dos receptores mu-opioide e canabinoide do tipo 1 na mediação da resposta de medo e da antinocicepção induzida pela estimulação química da substância cinzenta periaquedutal dorsal em ratos.**, sob orientação da Profa. Dra. JANAÍNA MENEZES ZANOVELI, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre 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, 20 de Fevereiro de 2020.

Assinatura Eletrônica

20/03/2020 10:10:15.0

JANAÍNA MENEZES ZANOVELI

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

20/03/2020 11:19:58.0

MARIA FERNANDA DE PAULA WERNER

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

17/03/2020 18:14:28.0

JHONATAN CHRISTIAN MARASCHIN

Avaliador Externo (FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO)

Dedico esse trabalho a todos que amam a ciência e que lutam pela sua disseminação. Nossos esforços contra o obscurantismo típico da Idade Média são incessáveis. RESISTIMOS!

AGRADECIMENTOS

A energia que antecede as estruturas, a causa e efeito do universo. Por alguns conotados como Deus, por outros Natureza. Grata pelo padrão de conectividade cerebral que me possibilitou capacidade técnica na elaboração dessa dissertação e a todas as circunstâncias sociais que me proporcionaram estar aqui.

A República Federativa do Brasil por depositar em mim e tantos outros jovens pesquisadores oportunidades de vivenciar e aprofundar questões na luz do método científico. Que mentes críticas e empáticas ocupem espaços na gestão pública e que a forma de pensar e se investir em ciência, educação e tecnologia sejam ampliados exponencialmente. A bolsa concedida pela CAPES não apenas me formou como mestre em Farmacologia, mas uma humana apta ao questionamento e busca de respostas complexas.

A Universidade Federal do Paraná por ser símbolo de diversidade, qualidade e, sobretudo, desenvolvimento humano. Especialmente ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia pela minha formação direta. Orgulho de ter essa instituição atrelada ao meu currículo.

A minha orientadora Dra. Janaína Menezes Zanoveli que me acolheu em seu laboratório e vida, e que a cada conversa estendia seu saber além do método científico. Tenho orgulho de ter como mentora uma mulher, cientista, sensível, persistente e competente como você. Os e-mails respondidos imediatamente, o trabalho incansável e suas cobranças só ressaltam sua paixão pela ciência. Obrigada pela lição de pontualidade, prontidão e humanidade.

A minha co-orientadora Dra. Joice Maria da Cunha, pela amizade, pelos ensinamentos, por ser exemplo de cientista, mulher e esposa. Admiro seu humor, espontaneidade e envolvimento social.

Aos meus amigos do Jana's Lab, Yane Chaves, Ana Waltrick, Alvaro Bernardo, Gabi Kreffta, Ana Carolina, Thiago Oliari, Helen Morais e Felipe Leão. Sem vocês essa trajetória não teria sido a mesma! Obrigada pelos inúmeros cafés filosóficos, discussões de artigos, manifestações pró-educação, viagens para congressos e programas culturais. É reconfortante saber que o trabalho em equipe sobressai a competição desmedida do mundo acadêmico. Nunca vou me esquecer de vocês. Serão sem sombra de dúvidas minha saudade diária.

Aos amigos que conheci na Farmacologia, Chii Trein, Letícia Mastrangelo, Gabi Neubert, Helô Guerra, Ana Raymundi, Luís Lomba, Juliana Varella, pelo afeto, desabafos, risadas, horas de bancada, trocas intelectuais e pessoais. Cada um de vocês tem espaço nas minhas memórias mais ternas.

Aos amigos da Representação Discente, Mary Clavero, Leo C. Souza e Anderson Gustavo que se mostraram ao longo do último ano, uma equipe gentil, ágil e engajada na promoção e divulgação da ciência e do nosso programa.

A todo corpo docente (especialmente a Prof. Dra. Juliana Chichorro e Prof. Roberto Andreatini), e discente do programa (Vitor Hélio, Dani Krebs, Priscilla Samaha, Zé Pochapski, William e Jeff Sohn). Ao Fernando Zonzini, Eli, Gisele e Silvinha e demais técnicos do Departamento de Farmacologia meu muito obrigada.

Ao Prof. Dr. Hélio Zangrossi por abrir as portas de seu laboratório no Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina USP-Ribeirão Preto e por colaborar imensamente com nosso grupo de pesquisa.

Aos amigos da Farmacologia na USP, Paloma Molina, Matheus Batistela, Alana Frias e Heloísa Vilela por me receberem tão bem em minha estada no laboratório, pelos conselhos, pela vibração nas partidas de LOL. Vocês são incríveis.

A minha banca, Prof. Dra. Maria Fernanda de Paula Werner e ao Dr. Jhonatan Maraschin por aceitarem o convite de avaliar esse trabalho.

A todos os professores que passaram pela minha vida, pelo conhecimento e criticidade contruídos, vocês são responsáveis por isso.

As minhas equipes de voluntariado no TETO Paraná (Cami, Gabi Maia, Fran, Annaisa) e no Rotaract (Ollavo Tozzi, Laura, Valéria Villegas, Julio, Georgia e Hillary) por terem me acolhido e propagado em mim a importância da doação a causas que acreditamos e do amor ao próximo.

Ao Rafael Rizzetto que inconscientemente reviveu meu amor pela ciência durante tempos sombrios, de incertezas e decepções. Por ser calma em meio à chuva de meteoros intergaláticos. Sua presença me remete ao brilho de centenas de constelações.

Aos meus amigos da vida toda, por me impulsionarem e me levarem a perceber o balanço necessário e harmônico entre o ser e o tornar-me. Somos, não apenas extensão de nossos trabalhos, mas sim seres humanos ávidos, complexos e dotados de profundidade. Ana, Vinícius e Víctor Siqueira, Matheus Salmi, Micael

Gomes, Sueli Marçal, Pedro Machado, Aparecida Baião, Ana Alcanfôr, Raul Moreira, Débora Maria, Ed Guimarães, Evelyn Pedroso, Luigi D'Angelo, Erica Frohlich, Caio Domingues e Maynara Horst todo meu afeto e amor.

Por último a minha família, especialmente aos meus avós Luzia e Manoel, a minha amada irmã, Gabriella e a minha mãe Luciana, meu mais profundo sentimento de gratidão. Obrigada por aceitarem a minha ausência, por elevarem o meu humor quando tudo parecia sem sentido, por acalentarem as minhas lamúrias e por exigirem silenciosamente que me doasse por completo a essa que foi a jornada mais desafiadora da minha vida. Amo vocês e nunca irei deixá-los independente da distância física. Como costumo pronunciar, estamos fundidos como parte, partícula e partitura.

A todos que indiretamente fizeram parte da minha formação, as trocas cotidianas se somam aqui, como resultado científico, social e cultural. São 24 anos de América do Sul, anos estes de conquistas, paixões, desesperanças e desafios. Ainda há muito que ser feito. A luz da ciência, o questionamento filosófico, a emergência e sensibilidade da arte e o amparo social são a única saída para o colapso eminente.

“É um fato importante, e conhecido por todos, que as coisas nem sempre são o que parecem ser. Por exemplo, no planeta Terra os homens sempre se consideraram mais inteligentes que os golfinhos [...]

Na verdade havia no planeta uma única espécie mais inteligente que os golfinhos, que passava boa parte do tempo nos laboratórios de pesquisas de comportamento, correndo atrás de rodas e realizando experiências incrivelmente elegantes e sutis com seres humanos [...]

(Douglas Adams em “O Guia do Mochileiro das Galáxias”, Cap. 23, 1979)

RESUMO

Várias evidências indicam um papel importante da substância cinzenta periaquedutal (SCP) nas respostas defensivas e no controle da dor. A ativação dos receptores canabinoides tipo 1 (CB1) ou mu-opioides (MOR) na região dorsal dessa estrutura (SCPd) inibe o medo e facilita a antinocicepção induzida por diferentes estímulos ou situações que elicem tal emoção. No entanto, ainda não se sabe se esses dois receptores podem funcionar cooperativamente para alcançar essas ações inibitórias. O presente estudo investiga uma possível interação funcional entre os receptores CB1 e MOR localizados na SCPd na regulação da resposta de medo e da antinocicepção evocada pela estimulação química da SCPd com o aminoácido excitatório N-metil-D-aspartato (NMDA). Assim, ratos Wistar machos foram submetidos a cirurgia estereotáxica para implante de uma cânula guia na SCPd. Esses animais foram estimulados quimicamente com NMDA microinjetado nesta região encefálica e foram testados quanto à expressão de uma resposta de medo, o congelamento, e a nocicepção, por avaliar a latência do tempo de retirada da cauda no analgesímetro térmico. No experimento 1, antes da administração deste aminoácido excitatório, os animais foram tratados intra-SCPd com o agonista CB1 ACEA (0,5 pmol) e com o antagonista do receptor CB1 AM251 (100 pmol). No experimento 2, antes da administração do NMDA, os animais foram tratados intra-SCPd com o agonista MOR DAMGO (0,5 nmol) e com o antagonista do receptor MOR CTOP (1 nmol). No experimento 3, para investigar a interação funcional entre os receptores MOR e CB1, a microinjeção de CTOP foi combinada com ACEA, enquanto a de AM251 foi combinada com DAMGO. Nossos resultados mostraram que a injeção de ACEA ou DAMGO na SCPd inibiu a expressão de congelamento induzida por NMDA, contudo, apenas o agonista MOR DAMGO aumentou a antinocicepção medida pelo teste de retirada da cauda. Mais importante, o efeito inibitório de ACEA ou DAMGO no congelamento foi bloqueado por CTOP e AM251, respectivamente, indicando uma interação funcional entre esses dois receptores na mediação de comportamentos defensivos relacionados ao medo. No entanto, essa interação cooperativa não foi observada na antinocicepção induzida por NMDA. Nossos achados apoiam a hipótese de que uma ação cooperativa entre os dois receptores, MOR e CB1, ocorre na SCPd e está envolvida na mediação da resposta defensiva induzida por NMDA, mas não na antinocicepção induzida por NMDA. Além disso, nossos achados destacam que, nessas condições experimentais, os receptores MOR, mas não os CB1, expressos na SCPd, estão envolvidos na modulação do efeito antinociceptivo que segue as reações de defesa semelhantes ao medo induzidas pela estimulação química da SCPd com NMDA.

Palavras-chave: medo, congelamento, opioide, endocanabinoide, antinocicepção.

ABSTRACT

A wealth of evidence indicates an important role of periaqueductal gray matter (PAG) in defensive responses and pain control. Activation of cannabinoid type-1 (CB1) or mu-opioid (MOR) receptors in the dorsal region of this structure (dPAG) inhibit fear and facilitate antinociception induced by different fear stimuli or situations. However, it is still unknown whether these two receptors can work cooperatively to achieve these inhibitory actions. This study investigates a possible functional interaction between CB1 and MOR receptors localized in the dPAG in the regulation of fear-like defensive response and antinociception evoked by the dPAG chemical stimulation with N-methyl-D-aspartate (NMDA). Male Wistar rats implanted with a guide-cannula aimed at the dPAG were tested for freezing expression and tail-flick latency after local microinjection of NMDA. In experiment 1, before the administration of this excitatory amino acid, animals were intra-dPAG injected with the CB1 agonist ACEA (0.5 pmol). Also, CB1 receptor antagonist AM251 (100 pmol) was administered. In experiment 2, before the administration of this excitatory amino acid, animals were intra-dPAG injected with the MOR agonist DAMGO (0.5 pmol). Additionally, MOR antagonist CTOP (1 nmol) was combined with DAMGO. In experiment 3, to investigate the functional interaction between MOR and CB1 receptors, microinjection of CTOP was combined with ACEA, whereas of AM251 was combined with DAMGO. Our results showed that ACEA or DAMGO injection in the dPAG inhibited NMDA-induced freezing expression, only the later drug increased antinociception measured by the tail-flick test. More importantly, the inhibitory effect of ACEA or DAMGO on freezing was blocked by CTOP and AM251, respectively, indicating a functional interaction between these two receptors in the mediation of defensive behaviors. However, this cooperative interaction was not observed on NMDA-induced antinociception. Our findings support the hypothesis that a cooperative action between both receptors, MOR and CB1 receptors, into dPAG occurs and it is involved with the mediation of NMDA-induced defensive response, but not with NMDA-induced antinociception that follows this defensive reaction. Moreover, our findings highlight that MOR, but not CB1 receptors, expressed in dPAG is involved in the modulation of antinociceptive effect that follows the fear-like defense-reactions induced by dPAG chemical stimulation with NMDA.

Keywords: fear, freezing, opioid, endocannabinoids, antinociception.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Divisão anatômica da substância cinzenta periaquedutal.....	21
Figura 2 - Via aferente de transmissão da informação nociceptiva.....	26
Figura 3 - Via descendente da dor	31
Figura 4 - Efeito do tratamento com agonista CB1 ACEA 0,5 pmol/0,2µl e do antagonista CB1 AM 251 100 pmol/0,2µl, NMDA 1nmol/0,2µl ou veículos intra-SCPd em ratos testados na arena de estimulação química.....	46
Figura 5 - Efeitos do agonista CB1 ACEA 0,5 pmol/0,2µl e do antagonista CB1 AM251 100 pmol/0,2µl administrados intra-SCPd em ratos testados no teste de retirada da cauda.....	47
Figura 6 - Efeitos do agonista MOR DAMGO ,5 nmol/0,2µl e do antagonista MOR CTOP 1 nmol/0,2µl administrados intra-SCPd em ratos testados na arena de estimulação química.....	50
Figura 7 - Efeitos do agonista MOR DAMGO 0,5 nmol/0,2µl e do antagonista MOR CTOP 1 nmol/0,2µl administrados intra-SCPd em ratos testados no teste de retirada da cauda	51
Figura 8 - Efeitos da combinação de agonistas e antagonistas dos sistemas canabinoide (via CB1) e opioide (via MOR), administrados intra-SCPd em ratos testados na arena de estimulação química.....	53
Figura 9 - Efeitos da combinação de agonistas e antagonistas dos sistemas canabinoide (via CB1) e opioide (via MOR), administrados intra-SCPd em ratos testados no teste de retirada da cauda.....	54

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Grupos tratados no experimento 1.....	41
Quadro 2 – Grupos tratados no experimento 2.....	42
Quadro 3 – Grupos tratados no experimento 3.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

- 2-AG** - 2-araquidonoilglicerol
- 5HT** - 5-hidroxitriptamina
- ACEA** - araquidonil-2-cloroetilamida
- AM251** - 1-(2,4-diclorophenil)-5-(4-iodofenil)-4-metil-n-1-piperidinil-1h-pirazol-3-carboxamida
- ATP** - Adenosina trifosfato
- BDZ** - Benzodiazepínicos
- CB1** - Receptor Canabinoide Tipo 1
- CB2** - Receptor Canabinoide Tipo 2
- CBD** - Canabidiol
- CCA** - Córtex Cingulado Anterior
- CDME** - Corno Dorsal da Medula Espinhal
- CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais
- CGRP** - Gene Relacionado à Calcitonina
- CONCEA** - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
- CTOP** - D-Fe-Cis-Tir-D-Trp-Orn-Thr-Pen-Thr-NH₂
- DAMGO** - D-Ala²,NMe-Fe⁴, Gli-ol⁵] -encefalina
- DOR** - Receptor Delta-opioide
- DSM-V** - Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, 5ª edição
- ECS** - Endocanabinoides
- FAAH** - Amida hidrolase de ácido graxo
- GABA** - Ácido gama-aminobutírico
- KOR** - Receptor Kappa-opioide
- LC** - *Locus Coeruleus*
- LTE** - Labirinto em T Elevado
- MAGL** - Monoacilglicerol Lipase
- MOR** - Receptor Mu-opioide
- NDR** - Núcleo Dorsal da Rafe
- NMDA** - N-metil D-aspartato
- NMR** - Núcleo Magno da Rafe
- NS** - Nociceptores Específicos
- PG** - Prostaglandina

PGE2 - Prostaglandina E2

SCA - Sistema Cerebral Aversivo

SCP - Substância Cinzenta Periaquedutal

SCPd - Substância Cinzenta Periaquedutal Dorsal

SEC - Sistema Endocanabinoide

SI - Córtex Somatossensorial Primário

SIC - Sistema de Inibição Comportamental

SII - Córtex Somatossensorial Secundário

SNC - Sistema Nervoso Central

TAG - Transtorno de Ansiedade Generalizada

THC - Tetra-hidrocanabinol

TNF-ALFA - Fator de Necrose Tumoral Alfa

TP - Transtorno do Pânico

WDR - do inglês "*Wide Dynamic Range*"

SUMÁRIO

1 Introdução.....	16
1.1 Transtorno do pânico.....	16
1.2 Reações de defesa: envolvimento da substância cinzenta periaquedutal no transtorno do pânico.....	18
1.3 Substância cinzenta periaquedutal e a resposta de medo e antinocicepção.....	21
1.3.1 Via ascendente da dor.....	24
1.3.2 Via descendente da dor.....	27
1.4 Sistema opioidérgico: Envolvimento nas respostas de medo e dor.....	27
1.5 Sistema canabinoide: Envolvimento nas respostas de medo e dor.....	31
2 Objetivos e hipótese.....	35
2.1 Objetivo geral.....	35
2.2 Objetivos específicos.....	35
2.3 Hipótese.....	35
3 Material e métodos.....	36
3.1 Aspectos éticos.....	36
3.2 Animais.....	36
3.3 Drogas.....	36
3.4 Cirurgia estereotáxica.....	37
3.5 Injeções.....	37
3.6 Arena para estimulação química.....	38
3.7 Teste de retirada da cauda.....	38
3.8 Perfusão e histologia.....	39
3.9 Procedimento experimental.....	40
3.9.1 Experimento 1- Avaliação do envolvimento do receptor CB1 nas respostas de congelamento e antinocicepção induzidas pela estimulação química da SCPd.....	40

3.9.2 Experimento 2 - Avaliação do envolvimento do MOR nas respostas de congelamento e antinocicepção induzidas pela estimulação química da SCPd.....	42
3.9.3 Experimento 3 - Avaliação da interação entre o receptor CB1 e o MOR nas respostas de congelamento e antinocicepção induzidas pela estimulação química da SCPd.....	42
3.10 Análise estatística.....	43
4. Resultados.....	44
4.1 Ativação do receptor CB1 impediu a resposta de medo induzida por NMDA, sem alterar a antinocicepção induzida pelo medo.....	44
4.2 Ativação do MOR impediu a resposta aversiva ao congelamento induzida por NMDA e aumentou a antinocicepção induzida pelo medo.....	48
4.3 Receptores CB1 e o MOR interagem na mediação da resposta aversiva ao congelamento induzida por nmda, mas não da antinocicepção induzida pelo medo.....	52
5 Discussão.....	55
6 Conclusão.....	61
Referências.....	62

1 Introdução

1.1 Transtorno do pânico

Os transtornos psiquiátricos são considerados condições alarmantes em saúde pública e ganham espaço relevante entre as pesquisas científicas da área biomédica. As patologias mentais, em destaque os transtornos de ansiedade, imergem como elemento chave na pesquisa de filósofos, médicos e biólogos ao longo de séculos. Seu caráter multifacetado e o impacto imediato na produtividade, perturbações da conduta social, comprometimento familiar, ocupacional e prejuízo na execução de atividades cotidianas, criaram necessidade do entendimento do processo de saúde-doença, e não obstante as funcionalidades e debilidades da mente humana.

Dentre os estudiosos do cérebro humano, o renomado psiquiatra Sigmund Freud (1894) inseriu o termo “neurose de ansiedade” contrapondo a ansiedade realística, onde, devido à repetição de estímulos tensionais, acima do limiar tangível e homeostático, haveria o desdobramento de quadros nosológicos persistentes caracterizados por picos de ansiedade, hoje descritos como ataques de pânico. Dessa forma, a exacerbação de eventos que exigem aumento da percepção e eliciam estados de tensão e apreensão a uma ameaça prevista podem desencadear um efeito somatório negativo sobre a ansiedade basal ou estado, conceito introduzido por Spielberg et al (1970), e assim, promover ansiedade mau adaptativa ou patológica, por alterar o que seria característico do indivíduo, ou seja a ansiedade adaptativa.

Nesse aspecto, a ansiedade adaptativa é uma emoção essencial, usualmente relacionada ao aprimoramento de performance diante de uma situação de conflito. A ansiedade eleva a capacidade de atenção e cognição para execução de uma determinada tarefa ou circunstância potencialmente aversiva. Devido a essa singularidade de autopreservação, trata-se de um elo fundamental para garantia da sobrevivência e irrompe a barreira da espécie, ou seja, essa emoção é correlata em mamíferos seguindo a lógica evolutiva e competitiva de integridade e conservação de espécies (BLANCHARD; BLANCHARD, 1998, BRANDÃO et al., 1999, GRAY; MCNAUGHTON, 2000).

Em humanos a ansiedade patológica ou transtornos de ansiedade são categorizados, segundo a 5ª edição do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais feita pela Associação Psiquiátrica Americana (DSM-V, APA, 2013), como um conjunto de doenças com critérios diagnósticos específicos e diferenciais baseados em sinais e sintomas, e considera contextos culturais, socioeconômicos e de gênero. São detalhados nesse compêndio aspectos como prevalência, desenvolvimento e curso da doença, fatores de risco, prognóstico e tratamento de escolha. A saber, fazem parte dos Transtornos de Ansiedade: Ansiedade de separação, Mutismo seletivo, Fobia específica, Transtorno de Ansiedade social, Transtorno do pânico (TP) com ou sem Agorafobia, Transtorno de Ansiedade generalizada (TAG), Transtorno de Ansiedade induzido por substância/medicamento, Transtorno de Ansiedade devido a outra condição médica, e Transtornos de Ansiedade especificados e não-especificados.

De maior interesse para o presente estudo, o TP é caracterizado por ataques de medo intenso, inesperados e recorrentes acompanhado por alterações físicas e cognitivas. Os sintomas incluem palpitações, sudorese, tremores, sensação de asfixia, desconforto torácico, náusea, tontura, calafrios ou ondas de calor, parestesias, despersonalização, desrealização, medo de enlouquecer e de morrer. Para ser diagnosticado com o TP, o paciente deve apresentar no mínimo 4 dos 13 sintomas listados com durabilidade superior a 6 meses. A frequência e a gravidade do TP é altamente variável (DSM-V, APA, 2013). Sua incidência varia de acordo com a localização geográfica e em média atinge cerca de 0,3% da população global ao ano (que corresponde a cerca de 200 mil novos casos) e de 1,6% ao longo da vida (BANDELOW; MICHAELIS, 2015). Episódios de ataques de pânico assinalam 11,2% dos índices epidemiológicos entre os latino-americanos e estadunidenses.

Tendo em vista esses dados em relação ao TP, faz-se necessária a investigação das bases neuronais associadas a este transtorno de ansiedade, para que dessa forma, sejam desenvolvidos tratamentos mais eficazes necessários em casos de refratariedade e irresponsividade a farmacoterapia disponível atualmente.

1.2 Reações de defesa: Envolvimento da substância cinzenta periaquedutal no transtorno do pânico

Durante a evolução das espécies, estratégias defensivas foram traçadas com o intuito de promover eficiência das respostas a ambientes hostis e enfrentamento a predadores. O notável trabalho de Charles Darwin em "*The Expression of Emotions in Man and Animals*" (1872), sugere por mero senso observacional similaridades entre distintas espécies na expressão das emoções. Progressivamente, estudos com animais passaram a ser incorporados na pesquisa neurobiológica por serem capazes de criar associações entre as emoções, ativação de áreas encefálicas específicas e seu envolvimento direto na modulação e repercussão de fenômenos observados em caráter macroscópico como em circunstâncias sociais e expressão de comportamentos defensivos de forma homóloga interespecies.

Nesse sentido, a ablação de áreas encefálicas, estimulação elétrica, química e os estudos etológicos, que mimetizam contextos naturalísticos de medo/ameaça, tornaram-se frequentemente empregados na pesquisa comportamental no final do século XIX e início do século XX. A teoria das emoções de Canon-Bard (1927) baseada na teoria das emoções de James-Lange (1884), condicionamento Pavloviano (1927) e a descoberta do sistema de defesa emocional foram pautadas na inserção dessas novas metodologias de investigação científica. Autores como o cientista francês Claude Bernard (1866) e o italiano Angelo Mosso (1879) contribuíram no entendimento das alterações fisiológicas decorrentes da expressão das emoções. Na década de 1940, a estimulação elétrica do hipotálamo medial de gatos foi relacionada à existência de um circuito de defesa emocional (HESS; BRUGGER, 1943). A descoberta do envolvimento do diencéfalo na organização de respostas aversivas e a categorização estrutural hipotalâmica, rendeu a Walter Hess, médico e fisiologista suíço e Egas Muniz, neurologista português o Prêmio Nobel em Medicina de 1949.

Assim como o hipotálamo, o envolvimento de outras estruturas encefálicas (e suas minuciosas subdivisões) passou a ser relacionado às respostas defensivas. Graeff (1981) correlacionou o envolvimento do hipotálamo medial, substância cinzenta periaquedutal (SCP) e complexo amigdalóide na geração de comportamentos defensivos e elaboração de estados emocionais aversivos. A

integração dessas regiões na formulação de respostas defensivas constitui o denominado sistema cerebral aversivo (SCA). Adicionalmente ao SCA, Gray (1982) no livro "Neuropsicologia da ansiedade", infere a existência de um sistema de inibição comportamental (SIC) responsável por coordenar respostas de medo e ansiedade. Posteriormente, Gray e McNaughton (2000) aprimoram a teoria, e correlacionam SIC com o sistema de congelamento/fuga/luta e o sistema de aproximação comportamental.

Parte das inferências de Gray e McNaughton (2000) foram embasadas pelos clássicos estudos etológicos conduzidos pelo casal Robert e Caroline Blanchard, cuja pesquisa foi fundamentada na observação de estratégias comportamentais defensivas de animais. Para tanto, os animais eram expostos a diferentes condições experimentais, onde levava-se em consideração o tipo de oponente, seu tamanho e proximidade, a existência ou não de vias de fuga e tendências naturais do animal em atacar, fugir ou ficar imóvel. Eles observaram que os comportamentos defensivos espécie-específicos pareciam ser reações constantes, instintivas, estritamente coordenadas e comuns entre mamíferos (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988, 2001, 2003).

Resumidamente, no contexto de ameaça distante, o comportamento majoritário dos animais testados era o congelamento, postura adotada para passar despercebido, não chamar atenção do predador. Aqui, a estrutura recrutada majoritariamente é a porção ventrolateral da periaquedutal e a emoção correlata em humanos é o medo. Quando o predador estava próximo da presa, como em um confronto presa-predador, a estratégia comportamental adotada era congelamento seguido de luta e/ou fuga, e uma das estruturas encefálicas recrutadas é a SCP, mais especificamente a coluna dorsal. A emoção correlata em humanos é similar ao pânico. Quando a ameaça era potencial, ou seja, poderia vir a acontecer, os animais experimentais demonstravam comportamento de avaliação de risco, onde, à espreita, sondavam o ambiente, a fim de buscarem a melhor estratégia de defesa. Em humanos essa tensão ou antecipação de uma condição está relacionada a ansiedade, e, em ambas as espécies -homens e roedores- o septo-hipocampal e amígdala basolateral são regiões recrutadas e importantes para essa expressão comportamental (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988; BRANDÃO, 2008; GRAY; MCNAUGHTON, 2000).

Atualmente, o córtex cingulado anterior (CCA), estruturas límbicas como hipotálamo anterior, mesencefálicas como colículos inferior e camadas profundas do superior são amplamente investigados e inseridos a circuitaria do medo (FALCONI-SOBRINHO; COIMBRA, 2018; HAYES; NORTHOFF, 2011). Nesse contexto, a conformação e conectividade do sistema nervoso central parecem seguir uma ordem comum entre espécies, cuja finalidade crítica é a garantia da sobrevivência e integridade física do indivíduo envolvido no contexto onde, o reflexo correto é diretamente proporcional à continuidade de sua existência.

A SCP, estrutura alvo de nossa investigação é considerada parte do substrato neural elementar para a origem do medo, que pode ser visualizado em seu ápice como ataques de pânico. Cabe mencionar que esta área mesencefálica circunda o aqueduto cerebral ou aqueduto de Sylvius em nível de comissura posterior até a área tegmentar ventral (BANDLER; SHIPLEY, 1994; CARRIVE, 1993). É dividida anatomicamente em colunas dorsolateral, dorsomedial, lateral e ventrolateral que se estendem ao longo de um eixo rostro-caudal, cujos padrões de citoarquitetura, quimioarquitetura e conectividade se diferem funcionalmente (Fig. 1) (BENARROCH, 2012).

Desde a década de 60, com as observações feitas pelo neurocirurgião Nashold e colaboradores (1969), a SCP, principalmente a coluna dorsal vem sendo implicada na etiologia do TP. Os autores mostraram que a estimulação elétrica da região dorsolateral do tegmento mesencefálico induzia além da analgesia profunda em humanos, sensações desagradáveis como medo intenso, sustos, hiperventilação, sudorese e piloereção. Interessante notar que o mesmo tem sido observado em animais quando essa região é estimulada. Assim, vários estudos mostraram que a ativação dessa região eliciam reações de medo, desfecho acompanhado de alterações autonômicas, como piloereção, aumento da frequência cardíaca e respiratória, sendo a resposta de fuga explosiva e descoordenada observada mediante ativação mais pronunciada da região (COIMBRA; BRANDÃO, 1997; MORGAN et al., 1998; VARGAS et al., 2000; BRANDÃO et al., 2008; MARASCHIN et al., 2016). Além disso, vários estudos mostram a ocorrência de antinocicepção relacionada com o medo (MORGAN et al., 1998; JACQUET; LAJTHA, 1974; FERREIRA-NETTO et al., 2005; MAYER et al., 1971).

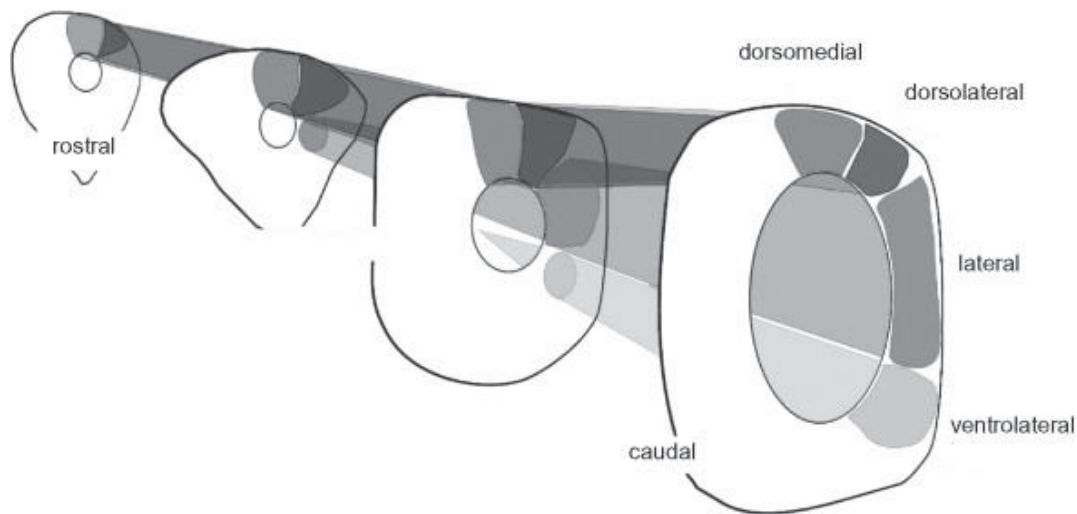


Figura 1- Divisão anatômica da substância cinzenta periaquedutal. Fonte: Adaptado de Gruber-Dujardin, 2010

1.3 Substância cinzenta periaquedutal e a resposta de medo e antinocicepção

Funcionalmente envolvida na responsividade a situações que eliciam medo, as colunas dorsais da SCP ganharam amplo suporte científico, pautadas no repertório defensivo observado em animais diante contextos naturais ou reproduzidos artificialmente por estimulação química ou elétrica da estrutura. Schenberg e colaboradores (1990) propuseram estudo neuroetológico com emprego de funções lineares para estabelecer quais respostas defensivas eram eliciadas pela estimulação das colunas dorsais da SCP (SCPd) em limiares crescentes de corrente elétrica em ratos. Concluíram que, dependendo da intensidade de voltagem empregada, isto é, intensidade do estímulo, os comportamentos dos animais consistiam em congelamento, corrida (fuga coordenada e horizontal) e saltos (fuga descoordenada e vertical) acompanhados de alterações autonômicas. Dessa forma, o congelamento foi detalhado como a resposta comportamental que antecede a resposta explosiva, diante ativação da SCPd.

Interessantemente, Borelli e colaboradores (2004) utilizando o mesmo modelo de estimulação elétrica da SCPd em ratos, sugeriram que a expressão do comportamento de congelamento (ou imobilidade tônica) se aproximava mais dos

ataques de pânico observados em humanos levando em consideração aspectos translacionais, em vista que relatos clínicos de pacientes estimulados diretamente na região, contavam com a manifestação do medo de forma paralisante, combinado com a urgência em fugir da situação, onde geralmente o estímulo associado era cessado. Nos animais experimentais, o estímulo elétrico na maioria dos protocolos estudados (BORELLI et al., 2004; CASAROTTO, et al., 2011; RANGEL et al., 2014) possui amplitude suficiente para induzir resposta de fuga, que ao longo das décadas de estudo foi consagrada como resposta comportamental que mimetiza de forma mais característica os ataques de pânico (MOREIRA et al., 2013). Dessa maneira, pode-se inferir que a SCPd elabora respostas rápidas e eficientes de defesa, caracterizado por um padrão comportamental defensivo progressivo, iniciado com estado de alerta, congelamento e fuga, e retomando o congelamento.

A estimulação química da SCPd com aminoácidos excitatórios produzem desfecho comportamental semelhante (BANDLER; CARRIVE, 1988). Ferreira-Netto e co-autores, mostram que o aminoácido excitatório N-metil D-aspartato (NMDA) administrado intra-SCPd, foi capaz de eliciar respostas de medo, que flutuavam entre o congelamento tenso em doses mais baixas (4 nmol), a reações de fuga explosiva em doses mais elevadas (7 nmol). A estimulação da SCPd foi homologada como modelo para estudo do transtorno do pânico em termos de validade preditiva e de face (JENCK et al., 1995). A validade preditiva está relacionada ao efeito farmacológico observado, enquanto a analogia, validade de face ou modelo isomórfico, trata-se das similaridades de traços comportamentais entre humanos e outras espécies de mamíferos.

O uso de drogas como a ioimbina (antagonista de receptores $\alpha 2$ -adrenérgicos) e a cafeína, precipitavam ataques de pânico quando administradas por via intraperitoneal em ratos estimulados com diferentes limiares de correntes elétricas intra-SCPd (JENCK, et al., 1995). De forma contrária, doses altas de benzodiazepínicos (BDZ) como alprazolam e midazolam revertiam o efeito aversivo induzido pelo estímulo elétrico, aumentando significativamente o limiar necessário para gerar ataques de pânico. Em contrapartida, a picrotoxina e bicolina (antagonistas GABA_A) foram capazes de desencadear comportamento de fuga em animais de maneira similar a estimulação elétrica, sugerindo que este sistema está sob a influência inibitória tônica do ácido gama-aminobutírico (GABA) (BRANDÃO et

al., 1982; BRANDÃO et al., 1999). Drogas que atuam no sistema GABAérgico, potencializando sua ação, como os BDZs, são usados clinicamente para o tratamento de ataques de pânico, o que corrobora com os resultados observados em animais experimentais (BALLENGER et al., 1988; CHOUINARD et al., 1982; NUTT; LAWSON, 1992).

Adicionalmente ao efeito panicolítico observado pelos BDZs, drogas que aumentam a biodisponibilidade de serotonina (5-Hidroxitriptamina- 5HT) apresentam eficácia em reduzir ataques de pânico. Conforme observado no estudo clínico conduzido por Kahn e Westenberg (1985), pacientes diagnosticados com TAG, TP ou agorafobia tratados com L-5-hidroxitriptofano (precursor imediato de 5HT) apresentaram melhora significativa ao longo de semanas de tratamento, contudo, os efeitos iniciais relatados eram de piora do quadro, ou seja, o aumento da serotonina agudamente eliciava respostas ansiogênicas e panicogênicas.

A fim de se estabelecer o papel dual da serotonina na modulação do medo e ansiedade, Deakin e Graeff (1991) propuseram que projeções de neurônios serotoninérgicos originados no núcleo dorsal da Rafe (NDR) para a SCPd inibiriam respostas fisiológicas e comportamentais do tipo pânico mediado pela ativação de receptores 5HT_{1A} e receptores 5HT_{2A} em interneurônios expressos na região (NOGUEIRA, GRAEFF, 1995; GRIFFITHS; LOVICK, 2002; PAUL et al., 2014; ZANGROSSI; GRAEFF, 2014; ZANOVELI et al., 2010). Em contrapartida, neurônios serotoninérgicos do NDR projetando-se para a amígdala facilitariam o medo condicionado e respostas semelhantes à ansiedade.

Nesse contexto, é relevante apontar que o medo inato se difere do medo condicionado. As respostas de medo incondicionado, são imediatas, instintivas, sem aprendizado prévio. Enquanto o medo condicionado esta associado a estímulo sensorial, até então neutro, como som, odor, luz ou contexto pareado ao estímulo aversivo, que propiciam a formação de memórias associativas, ou simplesmente aprendizado contextual ao medo (PAVLOV, 1927). A SCPd modula respostas de medo, seja ele inato ou condicionado (FANSELOW, 1991; SOUZA; GAROBREZ, 2016). Em ambos os casos estão associadas a mecanismos intrínsecos da supressão da informação dolorosa. Dependendo da intensidade do medo, o organismo suprime a dor a fim de conferir qualidade reacional ao organismo afetado. Essa constatação foi elaborada por Bolles e Fanselow (1980) que propuseram o

modelo perceptivo-defensivo-recuperativo da dor, onde a supressão da dor em dadas circunstâncias de perigo eminente possui caráter adaptativo e protetivo, ressaltando a necessidade da resposta comportamental imediata.

Cabe dizer que a dor é processada por substratos neurais envolvidos diretamente com processos cognitivos e afetivos: componente aversivo-cognitivo-motivacional e o componente perceptivo-discriminativo. No primeiro caso, trata-se de comportamentos defensivos geralmente acompanhados por sensações subjetivas de desconforto, enquanto o segundo, como o próprio nome indica, compreende a identificação do estímulo como doloroso (AUVRAY et al., 2010).

A modulação da dor envolve a ativação de vias descendentes da dor que se originam no córtex somato-sensorial, são influenciadas pelo sistema límbico onde há o envolvimento da amígdala e do hipotálamo, SCP no mesencéfalo, e terminam no corno dorsal da medula espinhal (CDME), bloqueando a transmissão de estímulos pela via sensório-discriminativa ascendente. Para melhor visualização de como ocorre a modulação a nível central, é fundamental a descrição do processo de condução ascendente do sinal nociceptivo, que se inicia nas terminações livres periféricas e ascendem por tratos específicos como descritos a seguir.

1.3.1 Via ascendente da dor

A nocicepção é regulada através de processos de facilitação de estímulos danosos de natureza mecânica, química e térmica. A estimulação nociceptiva recruta receptores especializados, que conduzem o sinal nociceptivo somatossensorial primário, traduzido como correntes elétricas por meio da despolarização de canais de Na^+ e Ca^{2+} voltagem dependentes, de instâncias periféricas ao CDME (ou nervo trigêmeo) e conseqüente ascensão para estruturas centrais (Fig. 2) (MILLAN, 2002).

A propagação dessa informação a nível primário é facilitada por mediadores químicos dentre eles: glutamato, bradicinina, histamina, metabólitos do ácido araquidônico como leucotrienos e prostaglandinas (PGI e PGE₂), peptídeo gene relacionado à calcitonina (CGRP), fator de necrose tumoral alfa (TNF α), fator de ativação plaquetário, ATP, adenosina, citocinas, aminoácidos excitatórios,

substância P, neurotrofinas, somatostatina e acetilcolina (FURST, 1999; JULIUS; BASBAUM, 2001).

Além disso, as fibras que conduzem o sinal nociceptivo primário são categorizadas conforme grau de mielinização axonal, diâmetro e especificidade de condução. As fibras A δ e C são responsáveis por deflagrarem estímulos dolorosos com diferentes velocidades de condução da informação. As fibras A δ por serem mielinizadas e apresentarem calibre mais espesso propagam o sinal com maior velocidade (5 a 30 m/s), enquanto as fibras C, não mielinizadas costumam ser relacionadas com resposta tardia/lenta da dor (0,5 a 2 m/s) e menos específica devido a ausência de organização somatotópica desses receptores polimodais. Ambas respondem ao calor em uma faixa de aproximadamente 43°. Adicionalmente, as fibras do tipo A β estão associadas a procicepção e respondem a estímulos táteis não nocivos (BASBAUM et al., 2009; BOURNE et al., 2014; KWON et al., 2014).

Quando o neurônio primário efetua a sinapse com neurônios de segunda ordem nas lâminas I, II, V e VI que compõem o CDME, há ativação de fibras dos tipos Wide Dynamic Range (WDR), interneurônios e nociceptores específicos (NS). Os neurônios NS são majoritariamente ativados por estímulos dolorosos provenientes das fibras A δ e C. As fibras A δ fazem sinapse com neurônios secundários das lâminas I, II e V, ao passo que as fibras C, fazem sinapse com neurônios da lâmina II (substância gelatinosa) (ALMEIDA et al., 2004; BASBAUM et al., 2009; MILLAN, 2002).

Ainda no CDME, os axônios desses neurônios decussam e transmitem o estímulo nociceptivo pelos tratos espinotalâmico e/ou trato espinoreticulotalâmico onde fazem sinapses de terceira ordem. Cabe ressaltar que os tratos espinotalâmico e espinoreticulotalâmico são originados filogeneticamente pela via neoespinotalâmica e paleoespinotalâmica, formadas pelo trato espinotalâmico lateral e para o tronco cerebral e tálamo, e então para o córtex somatossensorial primário (SI) e secundário (SII), para a ínsula e para o córtex cingulado anterior (ACC). Adicionalmente as vias ascendentes da dor até então citadas, inclui-se uma que projeta diretamente da medula espinal ao mesencéfalo (a formação reticular mesencefálica e SCP), denominada espino-mesencefálica (BARDIN, 2011; HYLDEN et al., 1985).

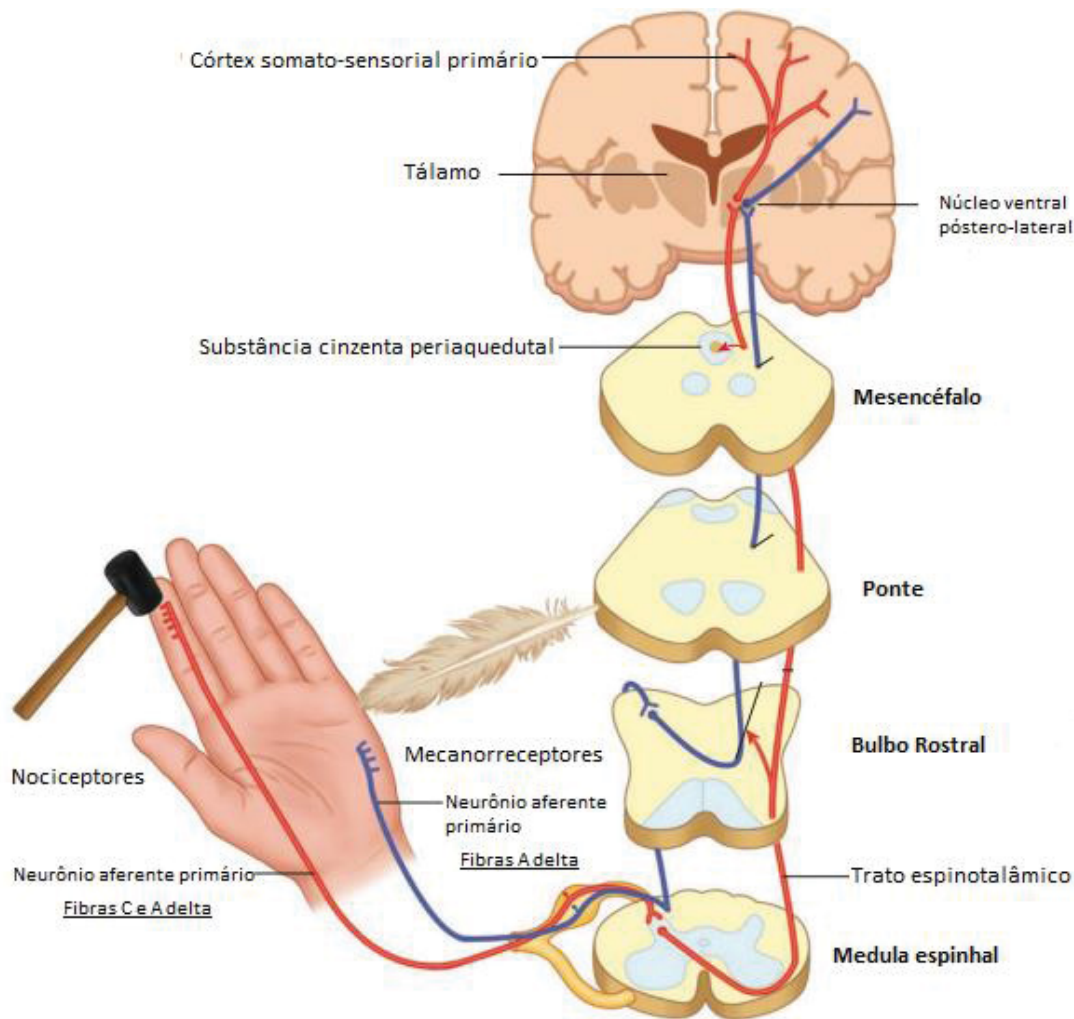


Figura 2- Via aferente de transmissão da informação nociceptiva. Fonte: Adaptado de Sengupta et al., 2019.

Entre as funções das vias tálamo-córtex na percepção da informação nociceptiva ascendente, destaca-se a dicriminação e predição da dor, em termos de localização e intensidade realizadas pelo SI. Além disso, a ativação do córtex pré-frontal favorece o planejamento de ações com intuito de cessar ou extinguir a dor. Estruturas como o CCA, ínsula, amígdala estão intrinsicamente ligadas à dimensão desagradável da dor, e levam em conta aspectos emocionais, sensoriais e cognitivos (AUVRAY et al., 2010; MILLAN, 2002; PEIRS;SEAL 2016).

1.3.2 Via descendente da dor

Quando a informação nociceptiva periférica chega ao SNC, tem-se início processos de modulação da dor. Entre eles destaca-se a antinocicepção, que é

basicamente a inibição da propagação dos potenciais de ação gerados por estímulos periféricos. Estruturas como a SCP, o núcleo magno da rafe (NMR), *locus coeruleus* (LC), núcleo dorsal da rafe (NDR), o núcleo gigantocelular, o núcleo paragigantocelular projetam-se diretamente ou indiretamente para o CDME e modulam a resposta a dor (BASBAUM; FIELDS, 1984).

A SCP é um centro crucial para o controle inibitório endógeno da dor (REYNOLDS, 1969; RHODES, 1979). Morgan e colaboradores (1998) indicaram proeminentes efeitos antinociceptivos mediados pela estimulação química das colunas dorsais e ventrolateral da SCP. A coluna ventrolateral vem sendo atribuída papel mais efetivo na antinocicepção (SAMINENI et al., 2019; GEBHART; TOLEIKIS, 1978), enquanto a inibição da dor pelas colunas dorsais da SCP parece ser recrutada em determinadas circunstâncias, como no enfrentamento de perigos reais e proximais, resultando em esforços adaptativos para manter a dor inibida (BANDLER; SHIPLEY, 1994; CARRIVE; BLANDER, 1991; CARRIVE, 1993; FARDIN et al., 1984). É importante enfatizar que a SCP contém uma rede intrínseca de conexões recíprocas e é provável que a ativação da coluna dorsal afete os neurônios de saída das colunas ventrolaterais (JANSEN et al., 1998).

Dentre as conexões da SCP, projeções do córtex somatossensorial e límbico podem influenciar suas projeções descendentes para LC (vias noradrenérgicas) e núcleo da Rafe (vias serotoninérgicas) e assim modular a dor antes de alcançar o CDME. Os mecanismos mediados por esses sistemas de neurotransmissão incluem a hiperpolarização de interneurônios opioides responsáveis pela transmissão da mensagem nociceptiva ao CDME, ativação de autorreceptores noradrenérgicos α -2 e 5HT3 já no CDME, ambos reduzindo a ativação de neurônios espinotalâmicos na medula espinhal (RIVOT et al., 1982; OLIVERAS et al., 1977; SAITO et al., 1990).

1.4 Sistema opioidérgico: Envolvimento nas respostas de medo e de dor

O sistema opioidérgico é composto por receptores e ligantes endógenos altamente distribuídos no SNC. A ligação aos receptores mu-opioide (MOR), kappa-opioide (KOR) e delta-opioide (DOR) por agonistas endógenos ou exógenos conduzem as principais respostas mediadas por esse sistema (COLASANTI et al., 2010). Os receptores opioidérgicos estão ancorados a proteínas Gi/o e os efeitos da

sua sinalização consistem na redução da atividade da adenilciclase, diminuição da condutância de cálcio pré-sináptica e aumento da condutância de potássio. Geralmente são recrutados em resposta a recompensas naturais, analgesia, na adição e na regulação das emoções. Os ligantes endógenos, dinorfinas A e B, β -endorfina e encefalina, são derivados dos precursores peptídeos pro-dinorfina, pro-opiomelanocortina e pro-encefalina, respectivamente (LEVITT et al., 2010). Sua modulação se estende no encéfalo em áreas como o neocórtex, amígdala, tálamo, hipotálamo, teto mesencefálico, núcleo accumbens, putamen, caudado e globo pálido. No mesencéfalo as conexões se estabelecem entre o núcleo central do colículo inferior, as colunas laterais e ventrolaterais da SCP e terminais GABAérgicos nigroestriatais, estando essas estruturas relacionadas a elaboração de respostas defensivas a perigos proximais (ERBS et al., 2015; MERRER et al., 2011)

Estudos apontam que o sistema opioidérgico modula ambivalentemente as respostas aversivas. Essa constatação surgiu a partir da observação em estudos pré-clínicos, de que a injeção intra-SCPd de morfina em baixas doses era capaz de atenuar respostas do tipo pânico evocadas por antagonistas GABAérgicos em ratos (BRANDÃO, 1999). Contudo, em altas doses o efeito da morfina, agonista não-seletivo de receptores MOR e KOR, elevou a resposta de medo de animais testados em arena de estimulação química. Interessantemente, o agonismo seletivo de receptores MOR foi associado a efeitos panicolíticos no labirinto em T elevado (LTE) e estimulação elétrica na SCPd, ao contrário dos relatos de agonistas KOR, cujo papel parece ser relativo a progressão de respostas aversivas (RONCON et al., 2013). De acordo com Twardowschy e Coimbra (2014) a ativação de receptores KOR no teto mesencefálico elicia respostas aversivas de fuga. Em seu protocolo foi observado que a injeção intra-SCPd de agonistas KOR e MOR seguido da estimulação elétrica do colículo possuíam efeitos distintos sobre o comportamento. No primeiro caso, houve elevação dos comportamentos de fuga, enquanto que a ativação de MOR mais uma vez apresentou caráter antiaversivo.

Adicionalmente, foi denotada acentuada depleção dos níveis de opioides endógenos durante ataques de pânico induzidos por condições de hipóxia. Essa experimentação fundou a chamada Teoria de Falso Alarme de Sufocamento, proposta por Klein (1993) e modificada por Preter e Klein (2008). Nesse contexto, foi verificado que indivíduos com déficits respiratórios (como a asma) tinham maior

propensão a apresentar sintomas similares a indivíduos diagnosticados com TP, fato percebido em humanos e em modelos animais com exposição a dióxido de carbono. Dessa forma, além da 5HT e do GABA, os opioides se mostraram intrinsecamente envolvidos na etiologia do TP.

Pesquisadores liderados pelo neurocientista brasileiro Frederico Guilherme Graeff aprofundaram seus estudos investigando uma possível interação entre opioides e serotonina. O primeiro estudo que visou investigar essa possível interação foi o trabalho de Roncon et al. (2012) onde foi observado que o antagonista não-seletivo de receptor MOR naloxona reverteu a ação panicolítica da fluoxetina, evidenciado pelo aumento da latência de fuga dos roedores no teste do labirinto em T elevado. Esse efeito foi observado tanto periféricamente quando a nível central, quando injeções foram feitas diretamente na SCPd. Para saber quais receptores eram responsáveis por essa ação, Rangel e cols. (2014) utilizaram agonistas e antagonistas seletivos dos receptores MOR e 5HT_{1A}. A administração do antagonista seletivo MOR CTOP antes do tratamento com DAMGO (agonista MOR) ou 8-OH-DPAT (agonista 5HT_{1A}) foi capaz de reduzir o limiar elétrico necessário para induzir o comportamento de fuga dos animais expostos ao modelo de estimulação elétrica da SCPd. Além disso, a associação de doses sub-eficazes dos agonistas DAMGO e 8-OH-DPAT produziram efeitos sinérgicos positivos, ou seja, aumentaram o limiar dos animais ao estímulo aversivo, apontando efeito panicolítico. Esse achado foi reforçado pelo grupo de Erbs e cols. (2015) que identificou a co-expressão de receptores MOR em populações neurais serotoninérgicas em várias regiões encefálicas, incluindo a SCPd. Cussac e colaboradores (2012) já haviam mostrado que a heterodimerização entre receptores 5HT_{1A} e MOR *in vitro*. A via de sinalização é a MAPkinase, dependente do envolvimento da proteína G.

Em conjunto, esses dados sugerem que os receptores MOR/5-HT_{1A} atuam de maneira sinérgica entre eles. Cabe ainda ressaltar que MOR pode também interagir com outros tipos de receptores, como por exemplo, com receptores canabinóides do tipo 1 (CB1). Estudos mostraram co-localização de receptores CB1 e MOR em populações neuronais glutamatérgicas e GABAérgicas na SCPd (WILSON-POE et al., 2012).

Em relação à dor, a primeira evidência do envolvimento do sistema opioidérgico endógeno na regulação do controle da dor foi sustentada pela publicação de Basbaum e Fields (1978) que propuseram níveis de organização para

supressão da dor, o chamado neuroeixo, que compreendia o mesencéfalo, bulbo e a medula espinhal que funcionalmente inibem especificamente o disparo de neurônios de transmissão da dor no gânglio trigeminal e na coluna vertebral quando ativados por estimulação elétrica ou administração de opiáceos (Fig. 3). De maneira complementar, os mesmos autores detalharam o controle do tronco encefálico e da endorfina no controle nociceptivo (BASBAUM; FIELDS, 1984; BEHBAHANI, FIELDS, 1979).

Clinicamente, os opioides exógenos, tais como a morfina e derivados sintéticos, são usados para tratamento de dores moderadas a severas, em casos agudos e crônicos. Apesar do reconhecido papel na supressão da dor, a recomendação da prescrição dessa classe medicamentosa é restrita a casos onde o manejo da dor e a recuperação da qualidade de vida do paciente seja o objetivo principal da farmacoterapia, como em caso de doenças de curso crônico e pacientes oncológicos. Esses cuidados se devem aos mecanismos de tolerância, dependência, depressão respiratória e constipação comumente associadas aos opioides (BOSCARINO et al., 2011; PALMER et al., 2015; VOWLES et al., 2015). Hoje, a “crise dos opioides” é um dos maiores problemas de saúde pública nos Estados Unidos. O uso irracional seja ele de forma recreativa ou não está associado à endêmica população de adictos que somam gastos estimados de 78 bilhões de dólares/ano, sem considerar o impacto social, psíquico e familiar entre os usuários (NATIONAL INSTITUTE ON DRUG ABUSE, 2019; PERGOLIZZI et al., 2017).

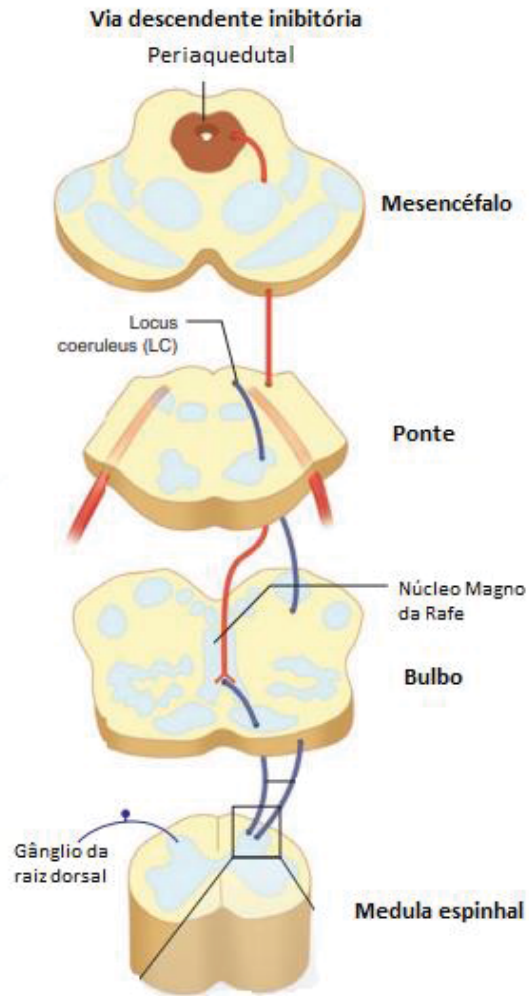


Figura 3- Via descendente da dor. Fonte: Adaptado de Sengupta et al., 2019.

1.5 Sistema canabinoide: Envolvimento nas respostas de medo e de dor

O sistema endocanabinóide (SEC) vem ganhando destaque nos últimos anos por apresentar efeitos benéficos em determinadas condições patológicas. Sabe-se que a sinalização endocanabinoide participa da modulação de diversos processos fisiológicos incluindo a percepção da dor, estados emocionais, adição a drogas de abuso, aprendizado e memória. Seu amplo espectro de ação tem chamado atenção pelo potencial terapêutico dos derivados sintéticos da *Cannabis spp.* O uso de agonistas CB₁ ou inibidores das enzimas amida hidrolase de ácidos graxos (FAAH) e monoacilglicerol lipase (MAGL) poderiam ser úteis no tratamento de alguns tipos de transtornos de ansiedade, transtorno de humor e aqueles relacionados com o estresse, como o transtorno do estresse pós-traumático por aumentar a

disponibilidade de ligantes endógenos (BAMBICO et al., 2016; BATISTA et al., 2015; MATSUDA et al. 1993; MOREIRA et al., 2012).

O SEC corresponde a uma via de sinalização lipídica composta por receptores canabinóides, seus ligantes endógenos (eECs) e as enzimas que participam da produção e da degradação dos ligantes endógenos. Sua descrição ocorreu após o isolamento do fitocanabinóide Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 THC), componente do metabolismo secundário da *Cannabis* spp., arbusto popularmente conhecido como maconha. A partir de então, foram isolados mais de 540 constituintes da planta entre eles o canabidiol (CBD), canabinol, canabigerol e canabicromeno. Análogos sintéticos do Δ^9 THC contribuíram para que fossem identificados e localizados receptores para canabinóide (CB₁ e CB₂) no sistema nervoso central (DEVANE et al., 1992; MECHOULAM et al. 1995).

Os receptores canabinóides do tipo 1 e do tipo 2 (CB₁ e CB₂) variam em termos de distribuição no organismo e estão localizados em terminais de neurônios pré-sinápticos. Os receptores CB₁ estão localizados principalmente em populações de neurônios GABAérgicos e glutamatérgicos no SNC, enquanto os receptores CB₂ se encontram a nível central e periféricamente em células e tecidos do sistema imunológico (MATSUDA et al. 1993). Esses receptores estão acoplados a proteína Gi/o e sua ativação por agonistas resulta na redução da excitabilidade neural pela inibição da adenil ciclase e da proteína quinase A, diminuição da condutância de íon cálcio para o meio intracelular e aumento da fosforilação de canais retificadores de potássio que favorecem o efluxo constante do íon para o meio extracelular (KATSIDONI et al., 2013; MECHOULAM et al. 1995; THOMAS et al., 2009).

A anandamida (AEA) e o 2-araquidonilglicerol (2-AG) são os principais endocanabinóides já descritos, sua síntese ocorre em neurônios pós-sinápticos como resposta ao aumento intracelular de cálcio, exercendo ação retrógrada sobre receptores CB₁ e CB₂ expressos na membrana pré-sináptica. A ação do AEA e do 2-AG é limitada pela degradação enzimática mediada pela amida de ácido graxo (FAAH) e lípase monoacilglicerol (MGL), respectivamente (BISOGNO, 2001; PARSONS; HURD, 2015).

A ação dos canabinóides parece possuir efeitos duais sobre o comportamento. Baixas doses de agonistas CB₁ são capazes de induzir efeito ansiolítico em roedores, enquanto altas doses acentuam o perfil ansiogênico (BISOGNO et al. 2001; KATSIDONI et al., 2013; THOMAS et al., 2009).

Adicionalmente, a razão entre a ativação de receptores CB1 e receptores vanilóide do tipo 1 (TRPV1) parece influenciar o desfecho comportamental observado na avaliação do comportamento do tipo ansioso, em vista que os agonistas canabinóides parecem se ligar em ambos e o pré-tratamento com antagonistas de receptores TRPV1 reduzem parâmetros de ansiedade em ratos (CASAROTTO, 2011). No estudo de Casarotto e colaboradores (2011), injeções intra-SCPd do agonista seletivo de receptores CB₁ ACEA foi capaz de aumentar o limiar elétrico necessário para induzir o comportamento de fuga dos animais expostos a estimulação elétrica da estrutura. Esse efeito panicolítico foi prevenido pelo antagonista CB₁ AM251. Resultado semelhante foi relatado por Viana e colaboradores (2014) utilizando a estimulação química por NMDA na SCPd. O pré-tratamento com ACEA e com o inibidor da FAAH URB597 reduziu os saltos e a travessia dos animais, indicando ação panicolítica dessas drogas.

No estudo de Lisboa e colaboradores (2014) foram investigados os efeitos da administração sistêmica e intra-SCPd de agonistas CB1 sobre alterações comportamentais induzidas em ratos pela exposição ao modelo etológico "presa-predador" com gato vivo. Os resultados mostraram que a administração sistêmica ou intra-DIPAG de AEA ou WIN atenuaram os comportamentos defensivos causados pela exposição ao gato em doses intermediárias. O antagonista CB1 AM251 impediu o efeito panicolítico da AEA. Estes resultados sugerem que a modulação do sistema canabinoide pode ser um alvo no tratamento de transtornos do pânico. No entanto, os efeitos duais desses compostos podem limitar seu potencial terapêutico.

Existe uma quantidade crescente de evidências sugerindo mecanismos sobrepostos entre os sistemas canabinoide endógeno e opioide em múltiplos comportamentos, incluindo respostas de medo e no controle da dor (HINE et al., 1975; VELA et al., 1995; PUGH et al., 1996; TANDA et al. ., 1997; NAVARRO et al., 2001; BEFORT, 2015; MANDUCA et al., 2016). De fato, foi demonstrada que a neurotransmissão opioidérgica e endocanabinoide interagem na motivação a interação social modulada pelo núcleo accumbens (MANDUCA et al., 2016). Estudos controversos apontam efeitos independentes sobre o controle da dor. Antagonistas MOR parecem inibir a antinocicepção suscitada pelo tratamento agudo e crônico com canabinóides no teste da placa quente (MANZANARES et al., 1999). Ratos com prejuízos na produção do precursor da encefalina apresentam antinocicepção pela ativação de receptores CB1, sem o desenvolvimento de

mecanismos de tolerância (VALVERDE et al., 2000). Contudo, não se sabe a função conjunta desses sistemas na SCPd, embora haja co-localização de receptores MOR e CB1 em populações neuronais nessa região (WILSON-POE et al., 2012). Até o momento, nenhum estudo investigou se esses receptores expressos na SCPd podem interagir cooperativamente na mediação de respostas defensivas relacionadas ao medo e na antinocicepção induzida pelo medo.

2. Objetivo

2.1 Objetivo geral

- Avaliar o envolvimento dos receptores mu-opioide e canabinoide do tipo 1 na mediação de resposta de medo e da antinocicepção induzida pela estimulação química da substância cinzenta periaquedutal dorsal em ratos.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o envolvimento do receptor CB1 localizado na SCPd sobre a expressão do comportamento de medo seguido de antinocicepção decorrente da estimulação química do aminoácido excitatório N-metil-D-Aspartato (NMDA);
- Avaliar o envolvimento do MOR localizado na SCPd sobre a expressão do comportamento de medo seguido de antinocicepção decorrente da estimulação química do aminoácido excitatório N-metil-D-Aspartato (NMDA);
- Investigar uma possível interação funcional entre os receptores MOR e CB1 através da observação dos efeitos dos agonistas de MOR e CB1 após injeção local prévia dos antagonistas de CB1 e MOR, respectivamente; avaliando os parâmetros comportamentais de medo e de antinocicepção induzidos pela estimulação química da SCPd.

2.3 Hipótese

Considerando que a estimulação química das colunas dorsais da SCP induz respostas de medo e antinocicepção relacionada ao medo, a hipótese do presente trabalho é que a ativação do sistema canabinoide, através do receptor CB1, e opioide, através do MOR, presente nesta região mesencefálica inibe respostas comportamentais de medo potencializando a antinocicepção associada ao medo. Mais ainda, uma cooperação funcional entre esses receptores ocorre na mediação dessas respostas comportamentais de medo e de dor.

3 Material e métodos

3.1 Aspectos éticos

Todos os experimentos deste estudo foram conduzidos de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Além disso, o projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Paraná (CEUA-UFPR) sob o número 1188.

3.2 Animais

Foram submetidos aos testes experimentais, ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, machos, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Paraná, com peso entre 270 a 300 g. Estes animais foram mantidos em caixas de polipropileno em condições controladas de temperatura (22 ± 2 °C) e iluminação artificial seguindo um ciclo claro/escuro de 12 horas (luzes ligadas às 7h), com água e ração *ad libitum*. Todos os esforços foram feitos para minimizar o número de animais utilizados, assim como seu sofrimento.

3.3 Drogas

As drogas utilizadas ao longo do período experimental compreenderam o agonista seletivo MOR DAMGO [D-Ala²,NMe-Fe⁴, Gli-ol⁵]-encefalina, Sigma, Switzerland] na dose de 0,5 nmol; antagonista seletivo MOR CTOP [D-Fe-Cis-Tir-D-Trp-Orn-Thr-Pen-Thr-NH₂, Sigma, Switzerland] na dose de 1 nmol; antagonista/agonista inverso CB₁ AM251 [1-(2,4-diclorofenil)-5-(4-iodofenil)-4-metil-N-1-piperidinil-1H-pirazole 3carboxamida, Cayman Chemicals] na dose de 100 pmol, agonista seletivo CB₁ ACEA [araquidonil-2-cloroetilamida, Cayman Chemicals] na dose de 0,5 pmol e o agonista de receptores inotrópicos NMDA, N-metil-D-Aspartato [NMDA, Sigma, USA] a 1 nmol. Todas as drogas foram preparadas imediatamente antes da administração no animal e dissolvidas em salina (NaCl 0,9%) ou solução de DMSO a 20% em soro fisiológico (AM251 e ACEA). As doses foram escolhidas baseadas achados literários (ALMEIDA-SANTOS et al., 2013; BAMBICO et al., 2016; BATISTA et al., 2015; RONCON et al., 2013) e estudos pilotos conduzidos em nosso laboratório.

3.4 Cirurgia estereotáxica

Os animais foram anestesiados com quetamina (60 mg/kg; União Química, Brasil) e xilazina (8 mg/kg; Bayer, Brasil). Após a indução anestésica, foi administrado por via intramuscular o antibiótico penicilina G benzatina (Fort Dodge, Brasil, 0,1 mL/100 g) a fim de prevenir possíveis infecções.

Os animais foram adaptados ao aparelho estereotáxico (David Kopf, USA), com a barra dos incisivos 2,5 mm abaixo da linha interaural. A seguir, foi realizada limpeza do campo cirúrgico com solução hidroalcoólica contendo iodo a 2%. Na região da incisão foi administrado, via subcutânea, 0,2 mL do anestésico local cloridrato de lidocaína associado a vasoconstritor (Novocol 100, S.S. White-Brasil). Posteriormente, realizou-se a incisão longitudinal a fim de expor a calvária e remover o periósteo por raspagem. Na sequência, um orifício foi perfurado com uma broca dental para a fixação de um parafuso de aço inoxidável. Este parafuso serviu como âncora da prótese de acrílico a ser disposta no crânio do animal. Outro orifício, perfurado a uma distância de -0,9 mm lateral ao lambda, foi utilizado para a introdução da cânula-guia. Esta foi introduzida -4,0 mm ventral à superfície craniana, com uma inclinação da haste de 22° em relação ao plano sagital, evitando-se, assim, a perfuração de seio venoso (PAXINOS; WATSON, 2005). A cânula-guia foi fixada à calota craniana por meio de uma resina acrílica autopolimerizável. Em seguida os animais retornaram à sala de aclimatização, respeitando as mesmas condições de alojamento.

3.5 Injeções

Para a administração de drogas na SCPd, os animais permaneceram com livre movimentação em uma caixa de polietileno (39 x 32 x 16 cm) com serragem no assoalho durante as duas primeiras injeções, enquanto que na terceira e última injeção, estes foram alocados a arena de estimulação química (25,5 x 40 x 36 cm). As drogas (DAMGO, AM251, CTOP, ACEA e NMDA) e seus respectivos veículos foram administrados por meio de uma agulha de injeção odontológica gengival do tipo Mizzy (0,3 mm de diâmetro externo e 14 mm de comprimento) conectada a uma microsseringa (Hamilton 701-RN, EUA) de 5 µL através de um tubo de polietileno (PE-10) preenchido com água. Uma bolha de ar dentro do tubo de polietileno

separou a água da droga administrada. Durante a injeção, o deslocamento desta bolha indicava a administração da droga *in loco*. Para controle do volume (0,2 µL) e do tempo de injeção, foi utilizada uma bomba injetora digital (Insight, Brasil), de forma que o volume especificado para cada droga atingido ao final fosse equivalente a 2 minutos. Após a injeção, a agulha permaneceu no sítio de injeção por mais 1 minuto a fim de evitar o refluxo do tratamento previamente administrado.

3.6 Arena para estimulação química

Para a verificação dos efeitos da estimulação química na SCPd, ratos Wistar foram colocados em uma arena de acrílico (25,5 cm de diâmetro na base, 40 cm de diâmetro na borda e 36 cm de altura) e analisados quanto a exibição de comportamentos de congelamento e número de cruzamentos (atividade locomotora). A cuba de estimulação contava com uma tela de nylon disposta na parte superior para impedir que os animais saltem para fora da área de teste durante as sessões de estimulação, caso fosse observado comportamento do tipo fuga (não passível de análise). A tela de nylon possui uma abertura no centro, que permite a passagem do fio de polietileno conectado a bomba de infusão. Este aparato permitiu a livre movimentação do animal na cuba. Após a injeção das drogas, os animais foram filmados por 5 minutos para posterior análise.

3.7 Teste de retirada da cauda

Esse teste tem como princípio verificar a percepção nociceptiva a nível central medular a partir da exposição da superfície medial da cauda de animais experimentais a uma fonte de calor. A aplicação de radiação térmica deu-se através de um analgesímetro do tipo *tail-flick* (Insight, Brasil). O filamento de metal contido na porção distal do equipamento, foi aquecido gradativamente a uma taxa de 9 °C/s a partir da temperatura ambiente (22 °C ± 2°C) com tempo de corte de 8 segundos (s) (podendo chegar a 72° C de temperatura máxima), afim de se evitar lesões teciduais em animais não responsivos (FALCONI-SOBRINHO et al.,2017). Este estímulo térmico provoca uma reação de retirada da cauda dos animais através de um movimento reflexo de origem espinhal rápido e vigoroso (HARDY et al.,1951). A antinocicepção foi determinada pelo aumento do tempo de retirada da cauda dos

animais tratados em relação às mesmas respostas dos animais do grupo controle, levando em consideração seu limiar de indução analgésica (D'AMOUR; SMITH, 1941). No protocolo experimental vigente, os animais foram submetidos ao pré-teste para medir o valor basal do limiar nociceptivo. No dia seguinte, após tratamento e exposição ao protocolo comportamental, foram realizadas medidas repetidas no teste de retirada de cauda ao longo do tempo com as medidas nos minutos 0, 5, 10, 15, 20 e 25, originando os tempos (T0, T1, T2, T3, T4 e T5, respectivamente).

Os resultados brutos obtidos foram normalizados por meio da seguinte equação:

$$IA = \frac{(Teste\ TF) - (Basal\ TF)}{(8s) - (Basal\ TF)} * 100$$

Sendo, IA = índice de analgesia; Teste TF = tempo de retirada da cauda após tratamento; Basal TF = tempo de retirada basal; [8s] = tempo de corte do analgesímetro *tail-flick*.

3.8 Perfusão e histologia para verificação do sítio de injeção

Após o término do experimento comportamental, os animais receberam uma solução anestésica contendo hidrato de cloral a 15% (2,5 mg/ml) e xilazina (10 mg/ml) via i.p., seguida por microinjeção de azul de evans (0,2 µl/hemisfério) e perfusão intracardíaca, inicialmente com solução salina (NaCl 0,9%), seguida de solução de formalina (10%). Os encéfalos foram, então, retirados e conservados individualmente em recipientes contendo solução de formalina 10%. Quarenta e oito horas antes da realização dos cortes histológicos, os encéfalos foram transferidos para recipientes contendo solução de sacarose 30%, para crioproteção.

Para a análise histológica e verificação do sítio de injeção da droga, cortes coronais (50 µm de espessura) foram obtidos utilizando um criostato (LeicaCM 1850, Microsystems AG, Alemanha) a uma temperatura aproximada de -20 °C. Os cortes foram fixados em lâminas de vidro para microscopia, gelatinizadas. Após secagem das lâminas com os cortes fixados, as mesmas foram coradas com a coloração de Giemsa modificada, cobertas com lamínulas e seladas com resina sintética. As lâminas foram fotografadas e comparadas com os diagramas do atlas de

neuroanatomia (PAXINOS; WATSON, 2005). Em todos os experimentos, apenas os animais com histologia para SCPd foram incluídos na análise estatística.

3.9 Procedimento experimental

Seis dias após a cirurgia estereotáxica para implante da cânula-guia na SCPd, os animais foram submetidos a medida basal do teste de retirada de cauda. Em seguida, foram manipulados gentilmente por 5 minutos. No dia do teste, os animais foram aclimatados a sala experimental por 1 hora, assim como no dia anterior. Individualmente foram conduzidos a sala de onde receberam as injeções intracranianas em três momentos distintos, com intervalo de 10 minutos entre as duas primeiras injeções, para favorecer os efeitos cinéticos coincidentes das drogas testadas. Para as duas primeiras injeções foram utilizados antagonistas e agonistas (respectivamente) de MOR e CB1 ou seus veículos e foram administradas em uma caixa contendo maravalha (ver quadros 1, 2 e 3). A terceira injeção que compreendeu nosso modelo de estimulação química com NMDA (ou veículo), foi administrada na arena de estimulação química (descrito no item 3.6). No interior do aparato o animal teste foi gravado por 5 minutos para avaliação dos comportamentos de congelamento e número de cruzamentos. Imediatamente após ao tempo na arena de estimulação, os ratos foram expostos ao teste de retirada da cauda. Em seguida, a exposição ao analgesímetro tipo tail-flick foi repetida sequencialmente com intervalo de 5 minutos entre cada medida totalizando 25 minutos. Ao final do protocolo acima descrito, os animais foram profundamente anestesiados e tiveram seus encéfalos removidos para conferência do sítio de injeção.

Experimento 1: Avaliação do envolvimento do receptor CB1 nas respostas de congelamento e antinocicepção induzidas pela estimulação química da SCPd.

Após serem habituados a sala de aclimatização, os animais com peso entre 270 a 300g passaram pelo procedimento cirúrgico descrito no item 3.4 para o implante da cânula-guia direcionada a SCPd. Seis dias após a recuperação cirúrgica os animais foram expostos ao teste de retirada de cauda para obtenção do valor

basal do limiar nociceptivo. Em sequência, os animais foram manuseados gentilmente de forma individual por 5 minutos. No dia seguinte, os animais receberam três injeções intracranianas, formando os grupos tratados, como descrito no quadro 1:

Quadro 1 – Grupos tratados no experimento 1

Tratamento 1	Tratamento 2	Estimulação Química	N
Veículo	Veículo	Veículo	8
Veículo	Veículo	NMDA	8
Veículo	ACEA	NMDA	9
AM251	Veículo	NMDA	8
AM251	ACEA	NMDA	8

FONTE: O autor (2020).

O antagonista AM251 ou seu respectivo veículo (DMSO 20% em solução de salina estéril) foram injetados 10 min antes do agonista ACEA ou veículo. Após 10 min da injeção do agonista, os animais foram submetidos a estimulação química com NMDA seguido da observação comportamental por 5 minutos na arena de estimulação. Após esse período foi medido o índice de analgesia desses animais no teste de retirada de cauda ao longo de 25 minutos. Ao final do período experimental os animais foram eutanasiados, perfundidos e os encéfalos removidos para conferência do sítio de implantação da cânula-guia.

Experimento 2: Avaliação do envolvimento do MOR nas respostas de congelamento e antinocicepção induzidas pela estimulação química da SCPd.

Os animais passaram pelo mesmo protocolo do experimento 1, contudo, receberam a administração de CTOP e/ou DAMGO, conforme exibido no quadro 2:

Quadro 2 – Grupos tratados no experimento 2

Tratamento 1	Tratamento 2	Estimulação Química	N
---------------------	---------------------	--------------------------------	----------

Veículo	Veículo	Veículo	8
Veículo	Veículo	NMDA	7
Veículo	DAMGO	NMDA	8
CTOP	Veículo	NMDA	8
CTOP	DAMGO	NMDA	8

FONTE: O autor (2020).

O antagonista CTOP ou seu respectivo veículo (salina estéril) foram injetados 10 min antes do agonista DAMGO ou veículo. Após 10 min da injeção do agonista, os animais foram submetidos a estimulação química com NMDA seguido da observação comportamental por 5 minutos na arena de estimulação. Após esse período foi medido o índice de analgesia desses animais no teste de retirada de cauda ao longo de 25 minutos. Ao final do período experimental os animais foram eutanasiados, perfundidos e os encéfalos removidos para conferência do sítio de implantação da cânula-guia.

Experimento 3: Avaliação da interação entre o receptor CB1 e o MOR nas respostas de congelamento e antinocicepção induzidas pela estimulação química da SCPd

Novamente, os procedimentos experimentais foram semelhantes aos experimentos 1 e 2, formando os grupos conforme apresentado no quadro 3:

Quadro 3 – Grupos tratados no experimento 3

Tratamento 1	Tratamento 2	Estimulação Química	N
Veículo	Veículo	Veículo	8
Veículo	Veículo	NMDA	7
CTOP	ACEA	NMDA	8
AM 251	DAMGO	NMDA	9

FONTE: O autor (2020).

3.10 Análise estatística

O software GraphPad Prism 7.0 para Windows (San Diego, CA, EUA) foi utilizado para a análise dos dados. O teste de Levene foi utilizado para determinar a homogeneidade da variância, seguindo o perfil de distribuição normal (curvatura gaussiana). A análise de variância de uma via (ANOVA *one-way*) foi utilizada para mensurar o comportamento de congelamento, número de cruzamentos e o tempo total de retirada da cauda (fatores dependentes) e os distintos tratamentos farmacológicos (fatores independentes). Além disso, a análise temporal do índice de analgesia no teste de retirada da cauda (nos minutos 0, 5, 10, 15, 20 e 25) foi obtida pela ANOVA para medidas repetidas, a fim de observar a presença (ou não) de discrepâncias intragrupo e intergrupos. Os dados expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M). Quando apropriado, foi utilizado o teste *post hoc* de Bonferroni para análise de comparações múltiplas. O nível de significância adotado foi de 5%.

4 Resultados

4.1. A ativação do receptor CB1 impediu a resposta de medo induzida por NMDA, sem alterar a antinocicepção induzida pelo medo

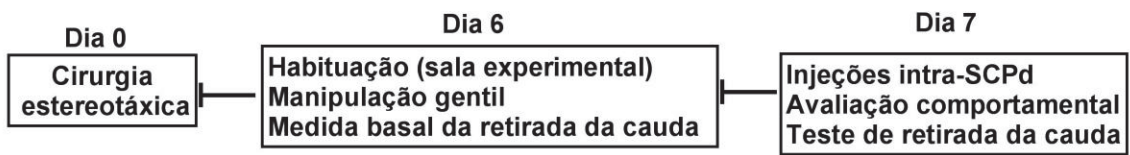
A avaliação do efeito do agonista de receptores CB1 ACEA na dose de 0,5 pmol/0,2 µl e do antagonista AM251 a 100 pmol/0,2 µl expressos na SCPd sobre respostas de medo inato é mostrado na figura 4. Em relação ao comportamento de congelamento (painel A), a análise de variância (ANOVA) de uma via apontou diferença significativa em relação ao tratamento [$(F_{(4,36)} = 20,76; p < 0,0001)$]. O teste de comparações múltiplas de Bonferroni mostrou que os animais tratados unicamente com veículo (grupo VEI/VEI/VEI) apresentaram menor tempo de congelamento em relação ao grupo experimental tratado com NMDA (VEI/VEI/NMDA), demonstrando claro efeito pró-aversivo do agonista de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA. Contudo, quando associado ao agonista de receptores CB1 ACEA (0,5 pmol/0,2 µl) (grupo VEI/ACEA/NMDA) houve prevenção do comportamento de congelamento, evidenciando efeito anti-aversivo dessa droga. Em contrapartida, o tratamento prévio com antagonista seletivo/agonista inverso de receptores CB1 AM251 foi capaz de bloquear o efeito de ACEA, que mostra o envolvimento de receptores CB1 na modulação de respostas de medo em populações neurais na periaquedutal dorsal.

Em relação ao número de cruzamentos (painel B), a ANOVA de uma via apontou diferença estatística para o fator tratamento [$(F_{(4,36)} = 10,44; p < 0,0001)$]. O *post hoc* de Bonferroni mostrou que houve diferença entre os animais dos grupos VEI/VEI/VEI e VEI/VEI/NMDA. De forma ilustrada graficamente, na ausência de intervenção farmacológica, os animais do grupo veículo apresentam determinado perfil de locomoção e após injeção intracraniana de NMDA, houve redução do número de cruzamentos entre os quadrantes da arena de estimulação química, efeito aqui entendido como aversivo. O tratamento com ACEA (0,5 pmol/0,2 µl) foi capaz de neutralizar o medo induzido pelo NMDA, precipitado pela ativação do teto mesencefálico. Esse resultado mostra efeito somatório na atividade anti-aversiva do agonista CB1 sobre esses comportamentos. Além disso, o grupo tratado apenas com AM251(AM251/VEI/NMDA) não foi capaz de alterar per se a resposta aversiva

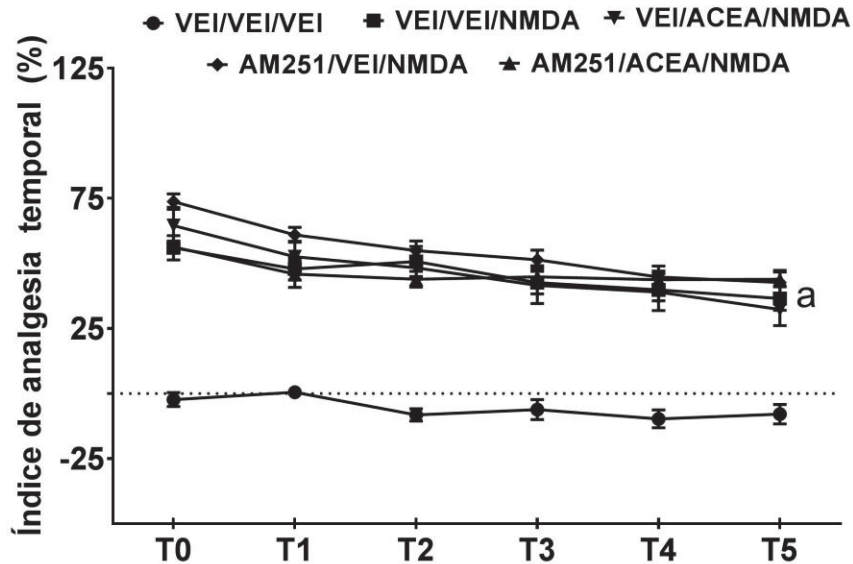
induzida por NMDA, contudo, preveniu a normalização do número de cruzamentos suscitado por ACEA (AM251/ACEA/NMDA).

Quando avaliada a analgesia temporal (figura 5C) a ANOVA para medidas repetidas apontou diferença significativa entre os grupos em relação ao tempo [(F_(5,180) = 33,16; p < 0,0001)] tratamento [(F_(4,36) = 38,42; p < 0,0001)] e interação entre esses fatores [(F_(20,180) = 2,51; p < 0,0001)]. O *post hoc* de Bonferroni apontou aumento do índice analgésico dos grupos tratados com NMDA (VEI/VEI/NMDA e VEI/ACEA/NMDA) em comparação ao grupo veículo ao longo dos 25 minutos de observação. De maneira similar, quando analisado o índice analgésico total (figura 5D), a ANOVA de uma via apontou diferença significativa entre os tratamentos [(F_(4,36) = 41,24; p < 0,0001)]. Foi observado aumento da analgesia caudal dos animais tratados previamente com NMDA (VEI/VEI/NMDA) em relação ao gr

upo veículo (VEI/VEI/VEI). Cabe ressaltar que o tratamento com ACEA não foi eficaz em amplificar a faixa analgésica induzida por NMDA.



C)



D)

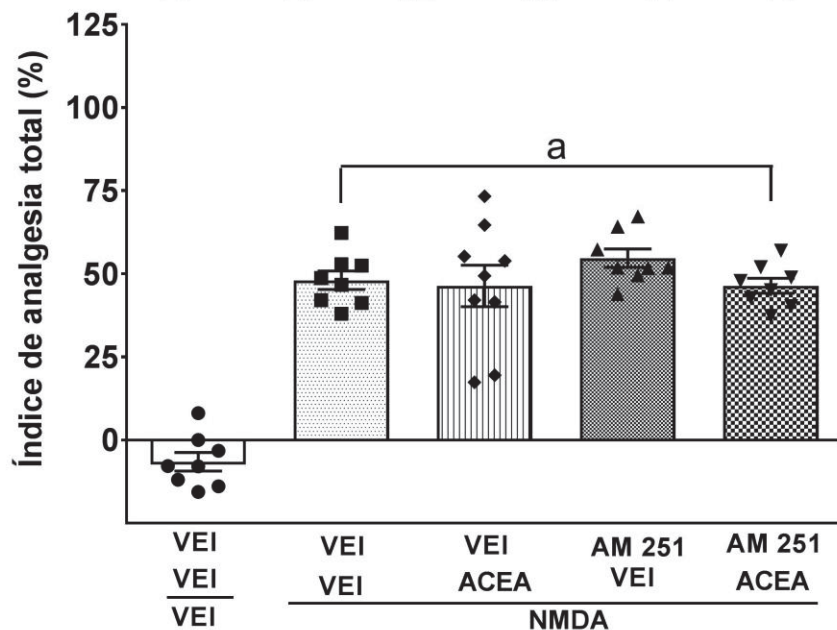


Figura 5- Efeitos do agonista CB1 ACEA 0,5 pmol/0,2 μ l e do antagonista CB1 AM251 100 pmol/0,2 μ l administrados intra-SCPd em ratos testados no teste de retirada da cauda. No painel (C) o índice temporal de analgesia e enquanto que em (D), o índice total de analgesia ao longo de 25 minutos. Todos os valores foram expressos como média \pm E.P.M. ^a indica diferença significativa do grupo veículo (p < 0,05, ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni; n = 8-9 / grupo).

4.2. Ativação do MOR impediu a resposta aversiva ao congelamento induzida por nmda e aumentou a antinocicepção induzida pelo medo

O efeito da ativação de receptores MOR pelo agonista DAMGO (0,5 nmol/0,2 µl) e pelo antagonismo seletivo realizado por CTOP na dose de 1 nmol/0,2 µl é mostrado na figura 6. No painel A, destaca-se o tempo de congelamento dos animais na arena de estimulação química após respectivo tratamento. A ANOVA de uma via apontou diferença significativa entre os grupos nos distintos tratamentos [(F_(4,33) = 62,63; p<0,0001)]. O teste de comparações múltiplas de Bonferroni apontou diminuição do tempo de congelamento entre os animais do grupo veículo (VEI/VEI/VEI) em relação aos grupos experimentais tratados com NMDA (VEI/VEI/NMDA; CTOP/VEI/NMDA; CTOP/DAMGO/NMDA) exceto o grupo tratado com DAMGO (VEI/DAMGO/NMDA) que apresentou reversão do efeito aversivo induzido por NMDA, observado pela expressiva redução do comportamento de congelamento. Quanto ao número de cruzamentos, a ANOVA de uma via apontou diferença estatística para o tratamento [(F_(4,33) = 13,90; p<0,0001)]. O *post hoc* de Bonferroni evidenciou que houve redução do número de cruzamentos entre os animais VEI/VEI/NMDA em relação ao grupo veículo (VEI/VEI/VEI). A redução do perfil locomotor foi mantida entre os animais pertencentes aos grupos CTOP/VEI/NMDA e CTOP/DAMGO/NMDA, contudo o tratamento com DAMGO (0,5 nmol/0,2 µl) foi capaz de aumentar o número de passadas se equiparando ao veículo.

Em relação ao efeito de DAMGO e CTOP sobre o índice de analgesia temporal (figura 7C), a ANOVA de medidas repetidas apontou diferença significativa entre os grupos experimentais na variável tempo [(F_(5,165) = 40,58; p<0,0001)] tratamento [(F_(4,33) = 141,1; p<0,0001)] e interação entre esses fatores [(F_(20,165) = 5,73; p<0,0001)]. O *post hoc* de Bonferroni apontou aumento do índice analgésico dos grupos tratados com NMDA (VEI/VEI/NMDA, CTOP/VEI/NMDA; CTOP/DAMGO/NMDA; CTOP/ACEA/NMDA) em comparação ao grupo veículo (VEI/VEI/VEI) ao longo dos 25 minutos de observação. Houve aumento do índice analgésico entre o grupo VEI/DAMGO/NMDA comparado aos grupos VEI/VEI/VEI e VEI/VEI/NMDA em todos os tempos. Ademais, foi notada reversão do efeito analgésico de DAMGO na dose de 0,5 nmol/0,2 µl quando associado ao antagonista CTOP a 1 nmol/0,2 µl (grupo CTOP/DAMGO/NMDA).

Em relação a análise do índice analgésico total (figura 7D), houve diferença significativa entre os tratamentos apontado pela ANOVA de uma via [(F_(4,33) = 83,91; p<0,0001)]. De maneira similar ao descrito no índice de analgesia temporal, o teste de comparações múltiplas de Bonferroni mostrou aumento do índice analgésico de todos os grupos tratados com NMDA em relação ao grupo controle. Além disso, houve somação analgésica entre os animais VEI/DAMGO/NMDA, efeito revertido pelo pré-tratamento com antagonista CTOP (CTOP/DAMGO/NMDA). O presente resultado, nos leva a inferir que existe estreita relação entre o sistema opioidérgico na analgesia induzida pelo medo inato na SCPd.

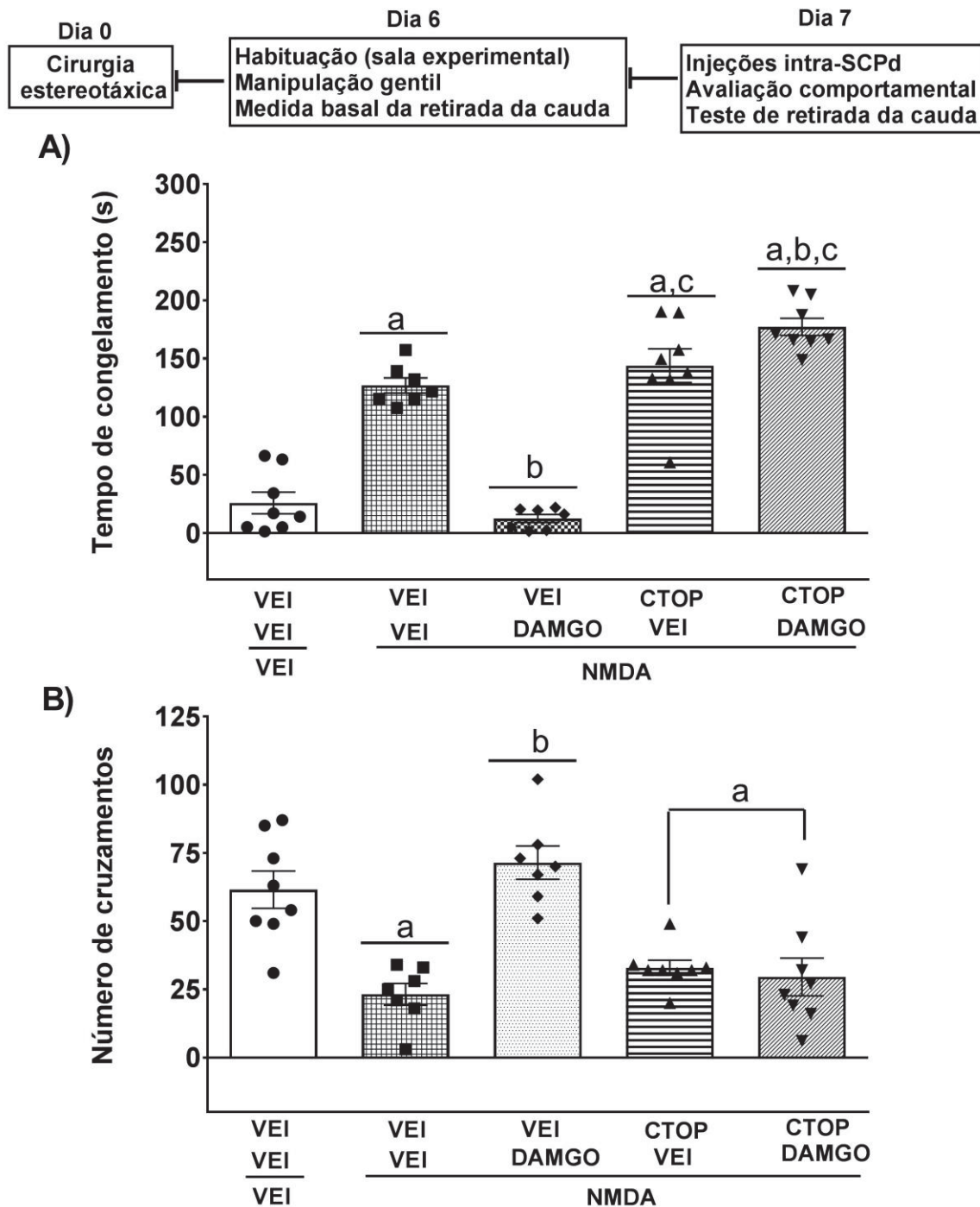


Figura 6- Efeitos do agonista MOR DAMGO 0,5 nmol/0,2 μ l e do antagonista MOR CTOP 1 nmol/0,2 μ l administrados intra-SCPd em ratos testados na arena de estimulação química. No painel (A) está representado o tempo de congelamento e em (B), o número de cruzamentos dentro do aparato. As barras representam a média \pm E.P.M. ^a indica diferença significativa do grupo veículo ($p < 0,05$, ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni; $n = 8$ / grupo). ^b indica diferença significativa entre os tratamentos e grupo VEI/VEI/NMDA ($p < 0,05$, ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni; $n = 7-8$ / grupo) ^c indica diferença significativa do agonista DAMGO ($p < 0,05$, ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni; $n = 8$ / grupo).

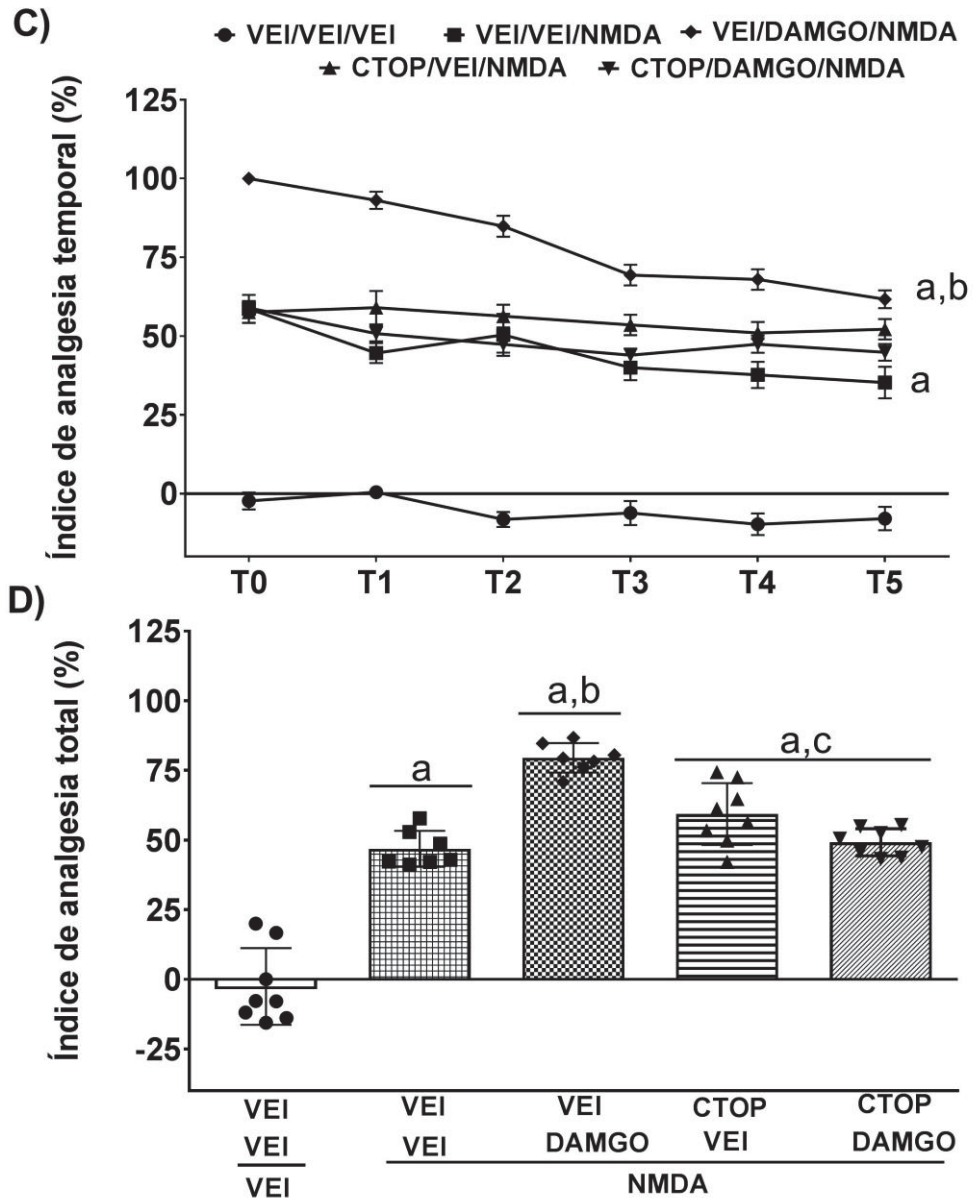
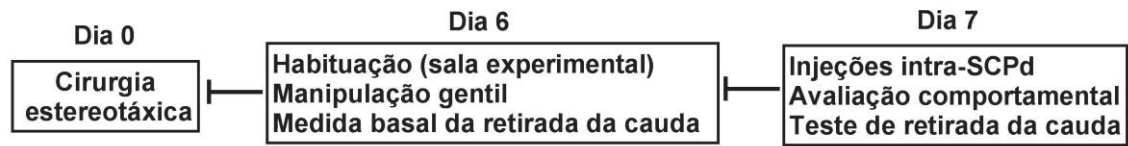


Figura 7- Efeitos do agonista MOR DAMGO 0,5 nmol/0,2 μ l e do antagonista MOR CTOP 1 nmol/0,2 μ l administrados intra-SCPd em ratos testados no teste de retirada da cauda. No painel (C) o índice temporal de analgesia e enquanto que em (D), o índice total de analgesia ao longo de 25 minutos. As barras representam a média \pm E.P.M. ^a indica diferença significativa do grupo veículo ($p < 0,05$, ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni; $n = 8$ / grupo). ^b indica diferença significativa entre os tratamentos e grupo VEI/VEI/NMDA ($p < 0,05$, ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni; $n = 7-8$ / grupo). ^c indica diferença significativa do agonista DAMGO ($p < 0,05$, ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni; $n = 7-8$ / grupo)

4.3. Receptores CB1 e MOR interagem na mediação da resposta aversiva ao congelamento induzida por NMDA, mas não da antinocicepção induzida pelo medo

A figura 8A ilustra o tempo de congelamento dos animais tratados com a combinação de agonistas e antagonistas de receptores CB1 e MOR. A ANOVA de uma via apontou diferença estatística entre os grupos experimentais em relação ao tratamento [(F_(3,28) = 23,05; p<0,0001)]. O *post hoc* de Bonferroni mostrou que ao longo dos 5 minutos de teste, os animais tratados com NMDA (VEI/VEI/NMDA) aumentaram o comportamento de congelamento em relação ao grupo VEI/VEI/VEI, característica aversiva repetida ao longo de todo protocolo experimental. Adicionalmente, os animais do grupo AM251/DAMGO/NMDA e CTOP/ACEA/NMDA aumentaram ainda mais o congelamento em relação à VEI/VEI/NMDA. Em relação a variável número de cruzamentos (painel 8B) a ANOVA de uma via não apresentou diferença estatística entre os grupos experimentais [(F_(3,28) = 2,31; p>0,05)], dado curioso, em vista que nos experimentos anteriores, foi observado redução da locomoção dos animais quando tratados com NMDA.

Quanto ao índice de analgesia temporal (painel 9C), a ANOVA para medidas repetidas apontou diferença significativa entre os grupos experimentais na variável tempo [(F_(5,140) = 11,82; p<0,0001)] tratamento [(F_(3,28) = 181,4; p<0,0001)] e interação entre esses fatores [(F_(15,140) = 3,31; p<0,0001)]. O *post hoc* de Bonferroni apontou aumento do índice analgésico dos grupos tratados com NMDA (VEI/VEI/NMDA, CTOP/VEI/NMDA; CTOP/DAMGO/NMDA; CTOP/ACEA/NMDA) em comparação ao grupo veículo (VEI/VEI/VEI) ao longo dos 25 minutos de observação. Um dado interessante foi que o tratamento prévio com AM251 (100 pmol/0,2 µl) seguido de DAMGO (0,5 nmol/0,2 µl), não foi capaz de impedir o efeito analgésico do agonista MOR, apesar de inibir sua atividade antiaversiva (9D). Dessa forma, podemos presumir que os mecanismos envolvidos na indução analgésica são dependentes de receptores MOR e que, em contextos de medo inato, não haveria participação direta e interativa com receptores CB1.

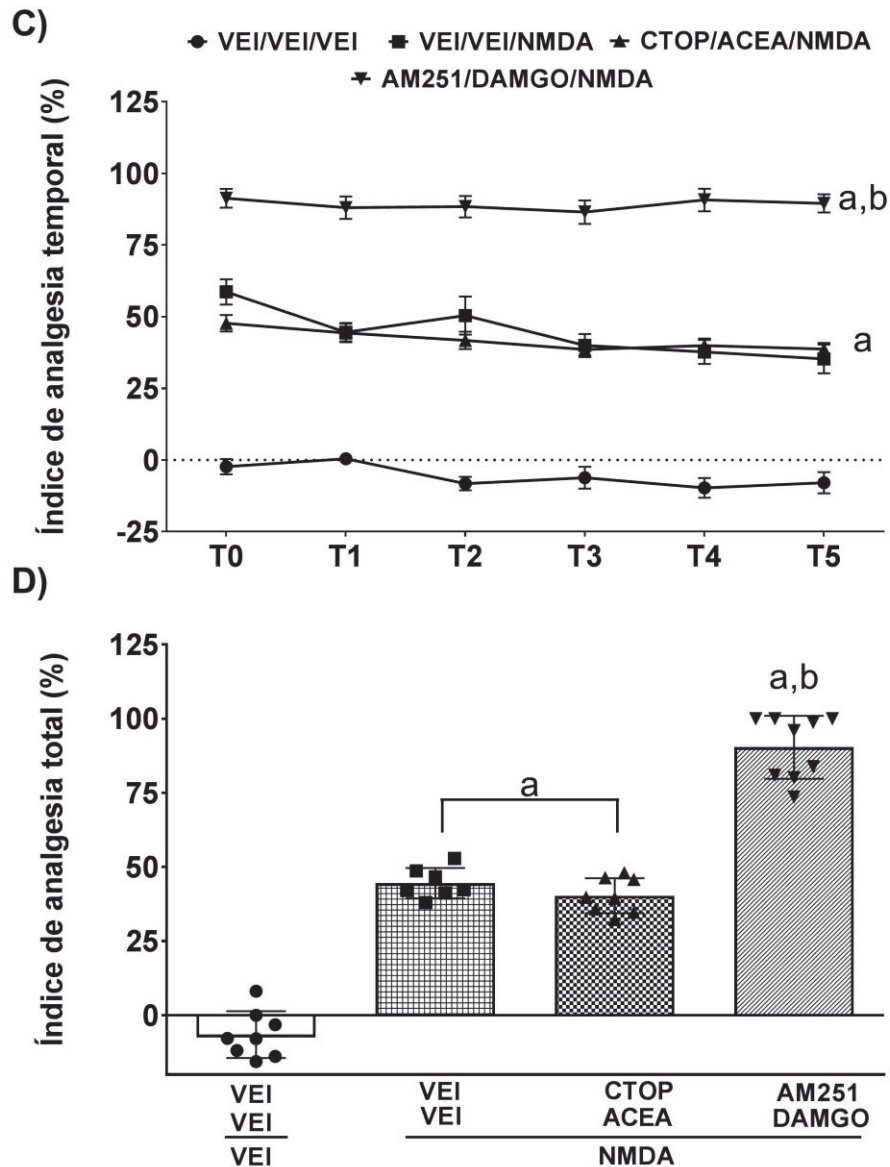
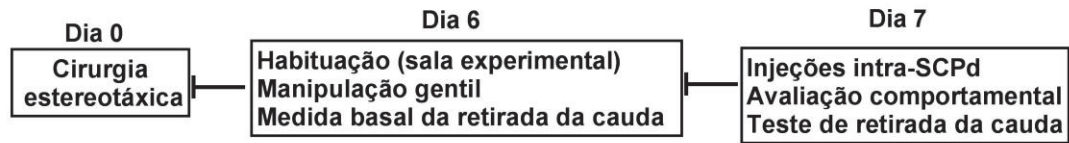


Figura 9- Efeitos da combinação de agonistas e antagonistas dos sistemas canabinoide (via CB1) e opioide (via MOR), administrados intra-SCPd em ratos testados no teste de retirada da cauda. No painel (C) o índice temporal de analgesia e enquanto que em (D), o índice total de analgesia ao longo de 30 minutos. Todos os resultados foram expressos em média \pm E.P.M. ^a indica diferença significativa do grupo veículo ($p < 0,05$, ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni; $n = 8-9$ / grupo). ^b indica diferença significativa entre os tratamentos e grupo VEI/VEI/NMDA ($p < 0,05$, ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni; $n = 7-9$ / grupo).

5 DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo suportam a hipótese da existência de interação funcional entre os receptores MOR e CB1 expressos na SCPd na mediação da resposta ao medo, mas não na antinocicepção induzida pelo medo. Adicionalmente, nossos achados corroboram evidências anteriores que mostram que ambos -os receptores CB1 e o MOR- na SCPd desempenham um papel no sistema anti-aversivo, enquanto apenas o MOR está relacionado à mediação do efeito antinociceptivo associado à resposta ao medo induzida por estimulação química com NMDA.

Segundo relatos da literatura, a injeção intra-SCPd de NMDA induz pronunciado comportamento de congelamento e uma resposta antinociceptiva duradoura (FERREIRA-NETTO et al., 2005; JACQUET; LAJTHA, 1974; MAYER et al., 1971; MIGUEL; NUNES-DE-SOUZA, 2006; MORGAN et al., 1998; REYNOLDS, 1969). Nesse sentido, Ferreira-Netto e colaboradores (2005) mostraram que doses menores que 7 nmol na SCPd causam comportamento de congelamento, enquanto reações de fuga sustentadas e intercaladas com congelamento são geralmente vistas após doses mais altas de NMDA (KRIEGER; GRAEFF, 1985). A resposta defensiva do congelamento seguida da fuga também pode ser adotada quando o animal é confrontado com estímulos perigosos proximais ou repentinos (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988). Curiosamente, infusões intra-SCPd de agonistas de receptores NMDA também provocam alta magnitude de antinocicepção (BERRINO et al., 2001; MIGUEL; NUNES-DE-SOUZA, 2006; SIEGFRIED; NUNES-DE-SOUZA, 1989), apresentando um valor adaptativo em essas situações extremas de medo. Em nossas condições experimentais, esse efeito antinociceptivo durou pelo menos 25 minutos.

Nossos dados corroboram com pesquisa desenvolvida anteriormente onde o ACEA foi capaz de prevenir o comportamento aversivo induzido pela injeção intra-SCPd de NMDA (VIANA et al., 2014). Além disso, nossos resultados mostram que o efeito em reduzir parâmetros de medo do ACEA foi bloqueado pelo antagonista CB1 AM251, apoiando nossa hipótese de que a ativação da sinalização canabinoide pode, através dos receptores CB1, reduzir significativamente a atividade neural excitatória que ocorre após a injeção de NMDA na SCPd. Estudos anteriores já confirmaram que a ativação dos receptores CB1 pode induzir uma liberação

diminuída de glutamato ou um aumento indireto da neurotransmissão GABAérgica nos dois casos, atenuando a aversividade da situação experimental (FOGAÇA et al., 2013; LISBOA, et al., 2013 ; RESSTEL et al., 2008; REY et al., 2012). Usando microinjeção intra-SCPd de outro aminoácido excitatório, o ácido D, L-homocisteico, Finn e colegas (2003) também mostraram que a administração intra-SCPd de um potente agonista do receptor CB1/CB2 HU210 atenuou o comportamento aversivo. O mesmo foi observado com a estimulação elétrica da SCPd, ou seja, o ACEA foi capaz de elevar o limiar de corrente elétrica capaz de evocar resposta defensiva, indicando resposta anti-aversiva (CASAROTTO et al., 2011).

Em relação à regulação da dor, sabe-se que a SCPd recebe abundantes entradas somáticas aferentes do corno dorsal da medula espinhal (KEAY et al., 1997) e envia projeções neuronais descendentes para a medula (MCGARAUGHTY et al., 2003). Fanselow (1981) e Brandão (1999) discutem que as vias que induzem a antinocicepção pela ativação da SCPd, são dependentes principalmente da modulação não-opioide, efetuada por fibras serotonérgicas. Contudo, os mecanismos entre tais sistemas podem ser sobreponíveis diante o perigo imediato.

Nossos resultados mostram que a ativação específica do receptor CB1 não alterou o efeito da antinocicepção observado após a estimulação química da SCPd, o que indica que, na dose testada e nessas condições experimentais, o receptor CB1 não participa dessa modulação. No entanto, Walker e colaboradores (1999) demonstraram que a estimulação elétrica do SCP dorsal e lateral produzia analgesia mediada pelo receptor CB1 acompanhada por um aumento acentuado na liberação de anandamida na SCP, sugerindo que a anandamida endógena medeia a analgesia comportamental. Aqui, é importante enfatizar que, diferentemente da estimulação química com NMDA, a estimulação elétrica é menos específica porque ativa os corpos celulares e as fibras de passagem.

Estudos que envolvem modelos animais de dor nociceptiva não relacionados ao medo demonstram que a administração do agonista CB1 WIN 55.212-2 na SCPd reduziu significativamente as respostas nociceptivas no modelo de dor inflamatória induzida por formalina (FINN et al., 2003). Além disso, Mascarenhas e colaboradores (2017) mostraram que a microinjeção intra-SCPd do agonista pleno do receptor CB1 WIN induziu efeito antinociceptivo na dor aguda no teste de retirada de cauda. Esses achados aparentemente contraditórios podem destacar que a modulação da dor através do receptor CB1 na SCPd pode ser dependente de alguns

fatores importantes, como por exemplo: a presença ou não do estímulo aversivo e/ou da origem da dor - se foi desencadeada por um estímulo de medo ou apenas por um estímulo nociceptivo periférico, por exemplo. Assim, com base em nossos resultados, especulamos que a ACEA, na dose escolhida e após uma estimulação mais específica da SCPd induzida por injeção de NMDA, poderia atuar nos receptores CB1, reduzindo a liberação de glutamato ou aumentando indiretamente a liberação de GABA e, portanto, a resposta aversiva seria prejudicada sem desinibição de saídas antinociceptivas da estrutura.

É bem descrito na literatura que o decréscimo dos níveis basais de peptídeos opioides endógenos facilitam ataques de pânico em seres humanos (PRETER; KLEIN, 2008). De acordo com tal premissa, nossos resultados demonstraram que o agonista MOR DAMGO atenuou a expressão de medo nos animais tratados, fato observado pela redução do comportamento de congelamento induzido pela estimulação química da SCPd, sendo esse efeito bloqueado pelo antagonista MOR, CTOP. Esses resultados corroboram os achados de que o tratamento intra-SCPd com DAMGO aumenta significativamente o limiar elétrico aplicado nessa estrutura mesencefálica para induzir o comportamento do tipo fuga (RANGEL et al., 2014). Curiosamente, Maraschin et al. (2016) mostraram que os efeitos sistêmicos e intra-dPAG da injeção de opiorfina (inibidor da degradação enzimática das encefalinas) prejudicaram ataques de pânico induzido pela estimulação elétrica do dPAG. Além disso, os autores mostraram uma redução de um comportamento semelhante ao pânico quando os animais foram avaliados em um modelo etológico, o labirinto em T elevado descrito por Graeff (para revisão ver GRAEFF, 1993). Todos esses efeitos foram bloqueados pelo pré-tratamento com o antagonista da MOR CTOP, indicando um papel nesse receptor na mediação de respostas aversivas recrutadas pela estimulação da SCPd.

Conforme descrito classicamente, o sistema opioidérgico desempenha papel importante na analgesia (BASBAUM, 1984; FIELDS, 2000) e parece estar envolvido na mediação das respostas à dor, independentemente do estímulo associado. A ativação do MOR está entre os mecanismos analgésicos mais poderosos (GUTSTEIN et al., 1998), mediando as ações fisiológicas dos opióides usados clinicamente (KIEFFER, 1999; LE MERRER et al., 2009; RAEHAL et al., 2011). De acordo com nossos resultados, a microinjeção intra-SCPd do agonista MOR DAMGO (0,5 nmol) aumentou o perfil antinociceptivo relacionado à estimulação

química da SCPd com NMDA. Para enfatizar o envolvimento do sistema opioidérgico na modulação da dor, Haghparast e Ahmad-Molaei (2009) observaram que a lesão da SCPd atenuou o efeito da morfina microinjetada em outra área do cérebro implicada na modulação da dor, o núcleo cuneiforme. Os autores sugerem a existência de uma projeção direta ou indireta do núcleo cuneiforme para o SCPd pelo menos no nível da antinocicepção da morfina na modulação da dor. Em outro estudo (MOHRLAND; GEBHART, 1980), a microinjeção de morfina ou estimulação elétrica do SCP resultou em excitação e inibição da atividade neuronal espontânea da formação reticular medular. Tais respostas mistas podem ser indicativas do destino ou participação eventual desses neurônios em mecanismos antinociceptivos.

Considerando uma provável interação funcional entre os receptores MOR e CB1 na SCPd, nossos dados mostraram que os efeitos anti-aversivos induzidos pelo agonista MOR e agonista CB1 foram, respectivamente, impedidos pelo antagonista CB1 e antagonista MOR. Apesar disso, quando analisamos a antinocicepção induzida por NMDA, o antagonista CB1 não bloqueou o efeito antinociceptivo mais pronunciado induzido após a injeção do agonista MOR. Adicionalmente, o antagonista MOR não alterou o efeito ausente do agonista CB1 na antinocicepção induzida pela estimulação química na SCPd. Dessa forma, Wilson et al. (2008) observaram que a co-administração de canabinoides e opioides em outra coluna da SCP, a coluna ventrolateral, não produziu sinergia antinociceptiva aguda quando os animais foram avaliados no teste da placa quente. No entanto, o pré-tratamento por dois dias com canabinóides induziu uma resposta antinociceptiva à morfina sensibilizada e atenuou o desenvolvimento da tolerância à morfina. Altun e colaboradores (2015) mostraram que o tratamento sistêmico com ACEA aumentou os efeitos antinociceptivos de injeções repetidas de morfina de animais submetidos aos testes de retirada da cauda e placa quente, além de aumentar a tolerância à antinocicepção da morfina. Por outro lado, o antagonista CB1 AM251 diminuiu o efeito antinociceptivo da morfina e atenuou a tolerância à morfina. Essa interação funcional entre canabinoide/opioide já foi demonstrada por vários estudos usando diferentes ferramentas comportamentais e parece depender das vias de administração e da duração do tratamento (AYHAN et al., 1979, LAURENTIIS et al., 2014).

Curiosamente, os receptores CB1 e MOR são descritos como co-localizados nas colunas ventrolateral e dorsolateral da SCP (WILSON-POE et al., 2012). Mais

especificamente, Pugh et al. (1996) demonstraram que os receptores CB1 e MOR estão co-localizados em regiões somatodendríticas de neurônios no corno dorsal da medula espinhal. Nesse sentido, vários estudos indicam que os receptores CB1 parecem formar homodímeros e heterodímeros com outros receptores acoplados à proteína G, incluindo a ancoragem MOR (FERRÉ; FRANCO, 2010; NAVARRO et al., 2001). As interações físicas potenciais entre os dímeros são específicas ao tipo de célula e dependem de modulações alostéricas entre protômeros (componentes individuais), alterações no reconhecimento de ligantes, acoplamento de proteínas G, tráfego e sinalização de diferentes grupos de ligantes (BUSQUETS-GARCIA et al., 2017).

Em conjunto, o efeito cooperativo entre os receptores CB1 e o MOR localizado na SCPd na mediação do medo e/ou antinocicepção pode ter relevância para o tratamento dos estados de medo e/ou dor. O entendimento da atividade recíproca entre os sistemas canabinoide e opioide na modulação das respostas de medo e antinocicepção sugerem duas alternativas interessantes para o direcionamento de pesquisas clínicas e continuidade da pesquisa neurobiológica. Primeiramente, abrangendo a aplicação em cuidados para saúde humana, nosso estudo mostra que o tratamento agudo com agonista CB1 não teve efeito sobre a antinocicepção induzida pelo medo; contudo, uma série de relatos literários afirma que em regimes de tratamento prolongado, drogas que atuam sobre receptores CB1 ampliam significativamente o efeito de agonistas MOR, como da morfina. Assim, poderia ser interessante no manejo de dores crônicas como observado na neuralgia do trigêmeo e dor oncológica, por exemplo. Em segunda instância, ainda se pensando em uma escala de interesse humano, a formulação e teste de medicamentos contendo agonistas MOR e de receptor CB1 pode ser promissor no tratamento do TP, devido à ação cooperativa entre drogas que atuam como agonistas desses receptores, e que, supostamente, exigiriam doses menores para induzir efeito terapêutico almejado. Dessa maneira haveria uma redução dos efeitos colaterais e ainda uma redução da baixa aderência de pacientes atualmente tratados e muitos deles refratários ao tratamento com inibidores seletivos da recaptção de serotonina (ISRS) e benzodiazepínicos (BDZ), comumente empregados. Por fim, tendo em vista as limitações do presente estudo, seria interessante reproduzir os dados utilizando técnicas de optogenética, bem como outros compostos para estimular quimicamente a SCPd. Mais ainda, verificar por meio de técnicas

moleculares, como imunohistoquímica, ensaios morfológicos de neurotraçamentos e técnicas de heterodimerização de receptores, a natureza da interação entre receptores CB1 e MOR na SCPd, a fim de melhor compreender os achados obtidos no comportamento e ampliar o conhecimento acerca dos mecanismos neurofarmacológicos envolvidos.

6 CONCLUSÃO

Em relação à hipótese inicial, concluímos que:

A ativação de receptores CB1 e MOR localizados nas colunas dorsais da SCP propiciou a reversão da expressão do comportamento de medo induzido pela estimulação química da região. Contudo, apenas a ativação de MOR potencializou a antinocicepção induzida pela estimulação química da SCPd com NMDA. Adicionalmente, foi demonstrada cooperação funcional entre os sistemas, marcada pela atividade sinérgica entre receptores CB1 e MOR na SCPD no controle da resposta de medo. Todavia, esse sinergismo funcional não foi observado na modulação da antinocicepção associada ao medo.

REFERÊNCIAS

Almeida-Santos, A. F., Gobira, P. H., Rosa, L. C., Guimaraes, F. S., Moreira, F. A., & Aguiar, D. C. (2013). Modulation of anxiety-like behavior by the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol (2-AG) in the dorsolateral periaqueductal gray. *Behavioural Brain Research*, 252, 10–17.

Almeida, T. F., Roizenblatt, S., & Tufik, S. (2004). Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. *Brain Research*, 1000(1-2), 40–56.

Altun, A., Yildirim, K., Ozdemir, E., Bagcivan, I., Gursoy, S., & Durmus, N. (2015). Attenuation of morphine antinociceptive tolerance by cannabinoid CB1 and CB2 receptor antagonists. *The Journal of Physiological Sciences*, 65(5), 407–415. doi:10.1007/s12576-015-0379-2

American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. (2013). 5 edition . APA Press: Washington DC.

Auvray, M., Myin, E., & Spence, C. (2010). The sensory-discriminative and affective-motivational aspects of pain. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 34(2), 214–223.

Ayhan, I. H., Kaymakcalan, S., & Tulunay, F. C. (1979). Interaction between delta 9-tetrahydrocannabinol and morphine on the motor activity of mice. *Psychopharmacology*, 63(2), 169–172.

Ballenger, J. C. (1988). Alprazolam in Panic Disorder and Agoraphobia: Results From a Multicenter Trial. *Archives of General Psychiatry*, 45(5), 413.

Bambico, F. R., Duranti, A., Nobrega, J. N., & Gobbi, G. (2016). The fatty acid amide hydrolase inhibitor URB597 modulates serotonin-dependent emotional behaviour, and serotonin1A and serotonin2A/C activity in the hippocampus. *European Neuropsychopharmacology*, 26(3), 578–590.

Bandelow, B.; Michaelis, S. (2015) Epidemiology of anxiety disorders in the 21st century. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 17 (3), 327-335.

Bandler, R., & Carrive, P. (1988). Integrated defence reaction elicited by excitatory amino acid microinjection in the midbrain periaqueductal grey region of the unrestrained cat. *Brain Research*, 439(1-2), 95–106

Bandler, R., & Shipley, M. T. (1994). Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray: modules for emotional expression? *Trends in Neurosciences*, 17(9), 379–389.

- Bardin, L., & Colpaert, F. C. (2004). Role of spinal 5-HT_{1A} receptors in morphine analgesia and tolerance in rats. *European Journal of Pain*, 8(3), 253–261.
- Basbaum, A. I., Bautista, D. M., Scherrer, G., & Julius, D. (2009). Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. *Cell*, 139(2), 267–284.
- Basbaum, A. I., & Fields, H. L. (1984). Endogenous Pain Control Systems: Brainstem Spinal Pathways and Endorphin Circuitry. *Annual Review of Neuroscience*, 7(1), 309–338.
- Basbaum, A. I., & Fields, H. L. (1978). Endogenous pain control mechanisms: Review and hypothesis. *Annals of Neurology*, 4(5), 451–462.
- Batista, L. A., Bastos, J. R., & Moreira, F. A. (2015). Role of endocannabinoid signalling in the dorsolateral periaqueductal grey in the modulation of distinct panic-like responses. *Journal of Psychopharmacology*, 29(3), 335–343.
- Befort, K. (2015). Interactions of the opioid and cannabinoid systems in reward: Insights from knockout studies. *Frontiers in Pharmacology*, 6 (6), 1-16.
- Behbahani, M. M., & Fields, H. L. (1979). Evidence that an excitatory connection between the periaqueductal gray and nucleus raphe magnus mediates stimulation produced analgesia. *Brain Research*, 170(1), 85–93.
- Benarroch, E. E. (2012). GABA_B receptors: Structure, functions, and clinical implications. *Neurology*, 78(8), 578–584.
- Bernard, C. (1866). On the physiology of the heart and its rapport with the brain. *Leçons sur les propriétés des tissus vivants* (pp. 421–471).
- Berrino, L. et al. (2001). Interaction between metabotropic and NMDA glutamate receptors in the periaqueductal grey pain modulatory system. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 364(5), 437–443.
- Bisogno, T. et al. (2001). Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. *British Journal Of Pharmacology*, 134 (4), 845-852.
- Blanchard, R. J., Wall, P. M., & Blanchard, D. C. (2003). Problems in the study of rodent aggression. *Hormones and Behavior*, 44(3), 161–170.
- Blanchard, C. D., Hynd, A. L., Minke, K. A., Minemoto, T., & Blanchard, R. J. (2001). Human defensive behaviors to threat scenarios show parallels to fear- and anxiety-related defense patterns of non-human mammals. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 25(7-8), 761–770.

Blanchard, D. C., & Blanchard, R. J. (1988). Ethoexperimental Approaches to the Biology of Emotion. *Annual Review of Psychology*, 39(1), 43–68.

Bolles, R. C., & Fanselow, M. S. (1980). A perceptual-defensive-recuperative model of fear and pain. *Behavioral and Brain Sciences*, 3(02), 291.

Borelli, K. G., Nobre, M. J., Brandão, M. L., & Coimbra, N. C. (2004). Effects of acute and chronic fluoxetine and diazepam on freezing behavior induced by electrical stimulation of dorsolateral and lateral columns of the periaqueductal gray matter. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 77(3), 557–566.

Boscarino, J. A., Rukstalis, M. R., Hoffman, S. N., Han, J. J., Erlich, P. M., Ross, S. Stewart, W. F. (2011). Prevalence of Prescription Opioid-Use Disorder Among Chronic Pain Patients: Comparison of the DSM-5 vs. DSM-4 Diagnostic Criteria. *Journal of Addictive Diseases*, 30(3), 185–194.

Bourne, S., Machado, A. G., & Nagel, S. J. (2014). Basic Anatomy and Physiology of Pain Pathways. *Neurosurgery Clinics of North America*, 25(4), 629–638.

Brandão, M. L., Zanoveli, J. M., Ruiz-Martinez, R. C., Oliveira, L. C., & Landeira-Fernandez, J. (2008). Different patterns of freezing behavior organized in the periaqueductal gray of rats: Association with different types of anxiety. *Behavioural Brain Research*, 188(1), 1–13.

Brandão, M. L., Anseloni, V. Z., Pandóssio, J. E., De Araújo, J. E., & Castilho, V. M. (1999). Neurochemical mechanisms of the defensive behavior in the dorsal midbrain. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 23(6), 863–875.

Brandão, M. L., De Aguiar, J. C., & Graeff, F. G. (1982). GABA mediation of the anti-aversive action of minor tranquilizers. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 16(3), 397–402.

Busquets-Garcia, A., Bains, J., & Marsicano, G. (2017). CB1 Receptor Signaling in the Brain: Extracting Specificity from Ubiquity. *Neuropsychopharmacology*, 43(1), 4–20.

Cannon, W. B. (1927). The James–Lange theory of emotions: A critical examination and an alternative theory. *The American Journal of Psychology*, 39, 106–124.

Carrive, P. (1993). The periaqueductal gray and defensive behavior: Functional representation and neuronal organization. *Behavioural Brain Research*, 58(1-2), 27–47.

Carrive, P., & Bandler, R. (1991). Viscerotopic organization of neurons subserving hypotensive reactions within the midbrain periaqueductal grey: a correlative functional and anatomical study. *Brain Research*, 541(2), 206–215.

Casarotto, P. C., Terzian, A. L. B., Aguiar, D. C., Zangrossi, H., Guimarães, F. S., Wotjak, C. T., & Moreira, F. A. (2011). Opposing Roles for Cannabinoid Receptor Type-1 (CB1) and Transient Receptor Potential Vanilloid Type-1 Channel (TRPV1) on the Modulation of Panic-Like Responses in Rats. *Neuropsychopharmacology*, 37(2), 478–486.

Chouinard, G., Annable, L., Fontaine, R., & Solyom, L. (1982). Alprazolam in the treatment of generalized anxiety and panic disorders: A double-blind placebo-controlled study. *Psychopharmacology*, 77(3), 229–233.

Coimbra, N., & Brandão, M. (1997). Effects of 5-HT₂ receptors blockade on fear-induced analgesia elicited by electrical stimulation of the deep layers of the superior colliculus and dorsal periaqueductal gray. *Behavioural Brain Research*, 87(1), 97–103.

Colasanti, A. et al. (2010). Opioids and anxiety. *Journal Of Psychopharmacology*, 25, (11), 1415-1433.

Cussac, D. et al. (2012). μ -opioid and 5-HT_{1A} receptors heterodimerize and show signalling crosstalk via G protein and MAP-kinase pathways. *Cellular signaling*, 24, 1648-1657.

D'Amour, F. E.; Smith, D. L. A method for determining loss of pain sensation. *Journal of Pharmacological Experimental Therapeutic*, 72:74-79.

Darwin, Charles. *The Expression of the Emotions in Man and Animals*. London: J. Murray, 1872.

Deakin, J. F. W., & Graeff, F. G. (1991). 5-HT and mechanisms of defence. *Journal of Psychopharmacology*, 5(4), 305–315.

Devane, W. et al. (1992) Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*, 258 (5090), 1946-1949.

Erbs, E. (2015) A mu–delta opioid receptor brain atlas reveals neuronal co-occurrence in subcortical networks. *Brain Structure and Function*, 220 (2), 677–702.

Fardin, V., Oliveras, J.-L., & Besson, J.-M. (1984). A reinvestigation of the analgesic effects induced by stimulation of the periaqueductal gray matter in the rat. II. Differential characteristics of the analgesia induced by ventral and dorsal PAG stimulation. *Brain Research*, 306(1-2), 125–139.

Falconi-Sobrinho, L. L., Anjos-Garcia, T. dos, de Oliveira, R., & Coimbra, N. C. (2017). Decrease in NMDA receptor-signalling activity in the anterior cingulate cortex diminishes defensive behaviour and unconditioned fear-induced antinociception elicited by GABAergic tonic inhibition impairment in the posterior hypothalamus. *European Neuropsychopharmacology*, 27(11), 1120–1131.

Fanselow MS (1991). The midbrain periaqueductal gray as a coordinator of action in response to fear and anxiety. In: Depaulis A & Bandler R (Editors), *The Midbrain Periaqueductal Gray Matter*. Plenum, New York.

Ferré, S., & Franco, R. (2010). Oligomerization of G-protein-coupled receptors: A reality. *Current Opinion in Pharmacology*, 10(1), 1–5.

Ferreira-Netto, C., Genaro Borelli, K., & Lira Brandão, M. (2005). Neural segregation of Fos-protein distribution in the brain following freezing and escape behaviors induced by injections of either glutamate or NMDA into the dorsal periaqueductal gray of rats. *Brain Research*, 1031(2), 151–163.

Fields, H. L. (2000). Pain modulation: expectation, opioid analgesia and virtual pain. *Progress in Brain Research*, 245–253.

Finn, D. P., Jhaveri, M. D., Beckett, S. R. G., Roe, C. H., Kendall, D. A., Marsden, C. A., & Chapman, V. (2003). Effects of direct periaqueductal grey administration of a cannabinoid receptor agonist on nociceptive and aversive responses in rats. *Neuropharmacology*, 45(5), 594–604.

Fogaca, M. V., Gomes, F. V., Moreira, F. A., Guimaraes, F. S., & Aguiar, D. C. (2013). Effects of glutamate NMDA and TRPV1 receptor antagonists on the biphasic responses to anandamide injected into the dorsolateral periaqueductal grey of Wistar rats. *Psychopharmacology*, 226(3), 579–587.

Freud, S. (1894). *As neuropsicoses de defesa*, Edição standard das obras psicológicas completas. Rio de Janeiro: Imago. v.3, p.51 a 72.

Fürst, S. (1999). Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. *Brain Research Bulletin*, 48(2), 129–141.

Gebhart, G. F., & Toleikis, J. R. (1978). An evaluation of stimulation-produced analgesia in the cat. *Experimental Neurology*, 62(3), 570–579.

Graeff, F.G., Viana, M.B., Tomaz, C., (1993). The elevated T maze, a new experimental model of anxiety and memory: effect of diazepam. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 26, 67–70.

Graeff, F.G. (1981). Minor tranquilizers and brain defense systems. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 14(4-5):239-65.

Gray, J.A. & McNaughton, N. (2000). *Neuropsychology of Anxiety: An Enquiry into the Function of the Septo-Hippocampal System*, 2nd ed, Oxford: Oxford University Press, 204–232.

Gray, J. A. (1982). *The neuropsychology of anxiety: An enquiry into the functions of the septo-hippocampal system*. Clarendon Press/Oxford University Press.

Griffiths, J. L., & Lovick, T. A. (2002). Co-localization of 5-HT_{2A}-receptor- and GABA-immunoreactivity in neurones in the periaqueductal grey matter of the rat. *Neuroscience Letters*, 326(3), 151–154.

Gruber-Dujardin, E. (2010). Role of the periaqueductal gray in expressing vocalization. *Handbook of Mammalian Vocalization - An Integrative Neuroscience Approach*, 313–327.

Gutstein, H. B., Mansour, A., Watson, S. J., Akil, H., & Fields, H. L. (1998). Mu and kappa opioid receptors in periaqueductal gray and rostral ventromedial medulla. *NeuroReport*, 9(8), 1777–1781.

Haghparast, A., & Ahmad-Molaei, L. (2009). Effects of electrolytic lesion of dorsolateral periaqueductal gray on analgesic response of morphine microinjected into the nucleus cuneiformis in rat. *Neuroscience Letters*, 451(2), 165–169.

Hardy, J. D., Goodell, H., Wolff, H.G. (1951). The influence of skin temperature upon the pain threshold as evoked by thermal radiation. *Science* 114:149-150.

Hess WR & Brugger M. (1943) Das subkortikale Zentrum der affektiven Abwehrreaktion. *Helv Physiol Pharmacol Acta*, 1:33 – 52.

Hine, B., Friedman, E., Torrelío, M., & Gershon, S. (1975). Morphine-dependent rats: blockade of precipitated abstinence by tetrahydrocannabinol. *Science*, 187(4175), 443–445.

Hylden, J. L. K., Hayashi, H., Bennett, G. J., & Dubner, R. (1985). Spinal lamina I neurons projecting to the parabrachial area of the cat midbrain. *Brain Research*, 336(1), 195–198.

Jacquet, Y. F., & Lajtha, A. (1974). Paradoxical Effects after Microinjection of Morphine in the Periaqueductal Gray Matter in the Rat. *Science*, 185(4156), 1055–1057.

James, W. (1884). What is an emotion? *Mind*, 9, 188–205

Jansen, A. S. ., Farkas, E., Mac Sams, J., & Loewy, A. D. (1998). Local connections between the columns of the periaqueductal gray matter: a case for intrinsic neuromodulation. *Brain Research*, 797(2), 368

Jenck, F., Moreau, J.-L., & Martin, J. R. (1995). Dorsal periaqueductal gray-induced aversion as a simulation of panic anxiety: Elements of face and predictive validity. *Psychiatry Research*, 57(2), 181–191.

Julius, D., & Basbaum, A. I. (2001). Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, 413(6852), 203–210.

Kahn, R., & Westenberg, H. G. M. (1985). L-5-Hydroxytryptophan in the treatment of anxiety disorders. *Journal of Affective Disorders*, 8(2), 197–200.

Katsidoni, V.; Kastellakis, A.; Panagis, G. (2013) Biphasic effects of Δ^9 -tetrahydrocannabinol on brain stimulation reward and motor activity. *The International Journal Of Neuropsychopharmacology*, 16 (10), 2273-2284.

Keay, K. A., Feil, K., Gordon, B. D., Herbert, H., & Bandler, R. (1997). Spinal afferents to functionally distinct periaqueductal gray columns in the rat: An anterograde and retrograde tracing study. *The Journal of Comparative Neurology*, 385(2), 207–229.

Kieffer, B. L. (1999). Opioids: first lessons from knockout mice. *Trends in Pharmacological Sciences*, 20(1), 19–26.

Klein, D. F. (1993) False suffocation alarms, spontaneous panics, and related conditions. An integrative hypothesis. *Archieve in Genetic Psychiatry*. 50,306–17.

Krieger JE, Graeff FG. (1985) Defensive behavior and hypertension induced by glutamate in the midbrain central gray of the rat. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 18(1):61-7.

Kwon, M., Altin, M., Duenas, H., & Alev, L. (2013). The Role of Descending Inhibitory Pathways on Chronic Pain Modulation and Clinical Implications. *Pain Practice*, 14(7), 656–667.

Laurentiis, A. et al (2014). Role of the endocannabinoid system in the neuroendocrine responses to inflammation. *Current pharmaceutical design*, 80(29), 1-10.

Le Merrer, J., Becker, J. A. J., Befort, K., & Kieffer, B. L. (2009). Reward Processing by the Opioid System in the Brain. *Physiological Reviews*, 89(4), 1379–1412.

Levitt, E. S.; Purington, I. C.; Traynor, J. R. (2010). Gi/o-Coupled Receptors Compete for Signaling to Adenylyl Cyclase in SH-SY5Y Cells and Reduce Opioid-Mediated cAMP Overshoot. *Molecular Pharmacology*, 79 (3), 461-471.

Lisboa, S. F., Camargo, L. H. A., Magesto, A. C., Resstel, L. B. M., & Guimarães, F. S. (2014). Cannabinoid modulation of predator fear: involvement of the dorsolateral periaqueductal gray. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 17(08), 1193–1206.

Lisboa, S. F., Magesto, A. C., Aguiar, J. C., Resstel, L. B. M., & Guimaraes, F. S. (2013). Complex interaction between anandamide and the nitergic system in the dorsolateral periaqueductal gray to modulate anxiety-like behavior in rats. *Neuropharmacology*, 75, 86–94.

Mascarenhas, D. C., Gomes, K. S., Sorregotti, T., & Nunes-de-Souza, R. L. (2017). Blockade of Cannabinoid CB1 Receptors in the Dorsal Periaqueductal Gray Unmasks the Antinociceptive Effect of Local Injections of Anandamide in Mice. *Frontiers in Pharmacology*, 8.

Manduca, A. et al. (2016). Interacting Cannabinoid and Opioid Receptors in the Nucleus Accumbens Core Control Adolescent Social Play. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 10, 10 (211), 1-17.

Manzanares, J., Corchero, J., Romero, J., Fernández-Ruiz, J. J., Ramos, J. A., & Fuentes, J. A. (1999). Pharmacological and biochemical interactions between opioids and cannabinoids. *Trends in Pharmacological Sciences*, 20(7), 287–294.

Maraschin, J. C., Rangel, M. P., Bonfim, A. J., Kitayama, M., Graeff, F. G.,

Zangrossi, H., & Audi, E. A. (2016). Opiorphin causes a panicolytic-like effect in rat panic models mediated by μ -opioid receptors in the dorsal periaqueductal gray. *Neuropharmacology*, 101, 264–270.

Matsuda, L. A.; Bonner, T. I.; Lolait, S. J. (1993). Localization of cannabinoid receptor mRNA in rat brain. *The Journal Of Comparative Neurology*, 327 (4), 535-550..

Mayer, D. J., Wolfle, T. L., Akil, H., Carder, B., & Liebeskind, J. C. (1971). Analgesia from Electrical Stimulation in the Brainstem of the Rat. *Science*, 174(4016), 1351–1354.

McGaraughty, S., et al. (2003). Capsaicin Infused Into the PAG Affects Rat Tail Flick Responses to Noxious Heat and Alters Neuronal Firing in the RVM. *Journal of Neurophysiology*, 90(4), 2702–2710.

Mechoulam, Raphael et al.(1995) Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochemical Pharmacology*, 50 (1), 83-90.

Merrer, J. L et al. (2009). Reward Processing by the Opioid System in the Brain. *Physiological Review*, 89 (4), 1379–1412.

Millan, M. J. (2002). Descending control of pain. *Progress in Neurobiology*, 66(6), 355–474.

Miguel, T. T., & Nunes-de-Souza, R. L. (2006). Defensive-like behaviors and antinociception induced by NMDA injection into the periaqueductal gray of mice depend on nitric oxide synthesis. *Brain Research*, 1076(1), 42–48.

Mohrland, J. S., & Gebhart, G. F. (1980). Effects of focal electrical stimulation and morphine microinjection in the periaqueductal gray of the rat mesencephalon on neuronal activity in the medullary reticular formation. *Brain Research*, 201(1), 23–37.

Moreira, F. A., Gobira, P. H., Viana, T. G., Vicente, M. A., Zangrossi, H., & Graeff, F. G. (2013). Modeling panic disorder in rodents. *Cell and Tissue Research*, 354(1), 119–125.

Moreira, F., Aguiar, D., Resstel, L., Lisboa, S., Campos, A., Gomes, F., & Guimarães, F. (2012). Neuroanatomical substrates involved in cannabinoid modulation of defensive responses. *Journal of Psychopharmacology*, 26(1), 40–55.

Morgan, M. M., Whitney, P. K., & Gold, M. S. (1998). Immobility and flight associated with antinociception produced by activation of the ventral and lateral/dorsal regions of the rat periaqueductal gray. *Brain Research*, 804(1), 159–166.

Mosso, A. (1879). *The diagnostics of the pulse with respect to its local alterations*. Leipzig, Germany: Verlag von Veit.

Motta, V., & Brandão, M. L. (1993). Aversive and antiaversive effects of morphine in the dorsal periaqueductal gray of rats submitted to the elevated plus-maze test. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 44(1), 119–125.

Motta, V., Penha, K., & Brandão, M. L. (1995). Effects of microinjections of μ and κ receptor agonists into the dorsal periaqueductal gray of rats submitted to the plus maze test. *Psychopharmacology*, 120(4), 470–474.

Nashold, B. S., Wilson, W. P., & Slaughter, D. G. (1969). Sensations Evoked by Stimulation in the Midbrain of Man. *Journal of Neurosurgery*, 30(1), 14–24.

Navarro et al. (2001). Functional interaction between opioid and cannabinoid receptors in drug self-administration. *Journal of Neuroscience*. Jul 15;21(14):5344-50.

Nogueira, R. L., & Graeff, F. G. (1995). Role of 5-HT receptor subtypes in the modulation of dorsal periaqueductal gray generated aversion. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 52(1), 1–6.

Nutt, D., & Lawson, C. (1992). Panic Attacks. *British Journal of Psychiatry*, 160(02), 165–178.

Oliveras, J. L., Hosobuchi, Y., Redjemi, F., Guilbaud, G., & Besson, J. M. (1977). Opiate antagonist, naloxone, strongly reduces analgesia induced by stimulation of a raphe nucleus (centralis inferior). *Brain Research*, 120(2), 221–229.

Palmer, R. E., Carrell, D. S., Cronkite, D., Saunders, K., Gross, D. E., Masters, E., Von Kroff, M. (2015). The prevalence of problem opioid use in patients receiving chronic opioid therapy. *PAIN*, 156(7), 1208–1214.

Parsons, L. H., & Hurd, Y. L. (2015). Endocannabinoid signalling in reward and addiction. *Nature Reviews Neuroscience*, 16(10), 579–594.

Pavlov I. P. (1927). *Conditioned Reflexes*. London: Oxford University Press.

Paxinos G., Watson C. (2005). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 5th Edn San Diego, Elsevier Academic Press.

Paul, E. D., Johnson, P. L., Shekhar, A., & Lowry, C. A. (2014). The Deakin/Graeff hypothesis: Focus on serotonergic inhibition of panic. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 46, 379–396.

Peirs, C., & Seal, R. P. (2016). Neural circuits for pain: Recent advances and current views. *Science*, 354(6312), 578–584.

Pergolizzi, J. V., LeQuang, J. A., Berger, G. K., & Raffa, R. B. (2017). The Basic Pharmacology of Opioids Informs the Opioid Discourse about Misuse and Abuse: A Review. *Pain and Therapy*, 6(1), 1–16.

Preter, M., & Klein, D. F. (2008). Panic, suffocation false alarms, separation anxiety and endogenous opioids. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 32(3), 603–612.

Pugh G, Jr, Smith Pb, Dombrowski Ds, Welch Sp. (1996). The Role Of Endogenous Opioids In Enhancing The Antinociception Produced By The Combination Of Delta 9-Tetrahydrocannabinol And Morphine In The Spinal Cord. *Journal Pharmacology and Experimental Therapeutics*; 279:608–616.

Raehal, K. M., Schmid, C. L., Groer, C. E., & Bohn, L. M. (2011). Functional Selectivity At The Mu-Opioid Receptor: Implications For Understanding Opioid Analgesia And Tolerance. *Pharmacological Reviews*, 63(4), 1001–1019.

Rangel, M. P., Zangrossi, H., Roncon, C. M., Graeff, F. G., & Audi, E. A. (2014). Interaction Between M-Opioid And 5-Ht1a Receptors In The Regulation Of Panic-Related Defensive Responses In The Rat Dorsal Periaqueductal Grey. *Journal Of Psychopharmacology*, 28(12), 1155–1160.

Resstel, L. B., Lisboa, S. F., Aguiar, D. C., Correa, F. M., & Guimaraes, F. S. (2008). Activation Of Cb1 Cannabinoid Receptors In The Dorsolateral Periaqueductal Gray Reduces The Expression Of Contextual Fear Conditioning In Rats. *Psychopharmacology*, 198(3), 405–411

Rey Aa, Purrio M, Viveros Mp, Lutz B (2012) Biphasic Effects Of Cannabinoids In Anxiety Responses: Cb1 And Gaba(B) Receptors In The Balance Of Gabaergic And Glutamatergic Neurotransmission. *Neuropsychopharmacology*, 37(12):2624–2634.

Reynolds, D. V. (1969). Surgery In The Rat During Electrical Analgesia Induced By Focal Brain Stimulation. *Science*, 164(3878), 444–445.

Rivot, J. P., Chiang, C. Y., & Besson, J. M. (1982). Increase of serotonin metabolism within the dorsal horn of the spinal cord during nucleus raphe magnus stimulation, as revealed by in vivo electrochemical detection. *Brain Research*, 238(1), 117–126.

Rhodes, D. L., & Liebeskind, J. C. (1978). Analgesia from rostral brain stem stimulation in the rat. *Brain Research*, 143(3), 521–532.

Roncon, C. M., Biesdorf, C., Coimbra, N. C., Audi, E. A., Zangrossi, H., & Graeff, F. G. (2013). Cooperative Regulation Of Anxiety And Panic-Related Defensive Behaviors In The Rat Periaqueductal Grey Matter By 5-Ht1a And μ -Receptors. *Journal Of Psychopharmacology*, 27(12), 1141–1148.

Roncon, C. M., Biesdorf, C., Santana, R. G., Zangrossi, H., Graeff, F. G., & Audi, E. A. (2012). The panicolytic-like effect of fluoxetine in the elevated T-maze is mediated by serotonin-induced activation of endogenous opioids in the dorsal periaqueductal grey. *Journal of Psychopharmacology*, 26(4), 525–531.

Saito, Y., Collins, J. G., & Iwasaki, H. (1990). Tonic 5-HT modulation of spinal dorsal horn neuron activity evoked by both noxious and non-noxious stimuli: a source of neuronal plasticity. *Pain*, 40(2), 205–219.

Samineni, V.K., Grajales-Reyes, J.G., Sundaram, S.S. *et al.* (2019). Cell type-specific modulation of sensory and affective components of itch in the periaqueductal gray. *Nature Communication*, 10, 4356.

Schenberg, L. C., Costa, M. B., Borges, P. C. L., & Castro, M. F. S. (1990). Logistic analysis of the defense reaction induced by electrical stimulation of the rat mesencephalic tectum. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 14(4), 473–479.

Sengupta, V., Qian, S., Urbiztondo, N., & Haider, N. (2019). Pain-Relieving Mechanisms in Neuromodulation. *Deer's Treatment of Pain*, 79–90.

Siegfried, B., & Nunes De Souza, R. L. (1989). Nmda Receptor Blockade In The Periaqueductal Grey Prevents Stress-Induced Analgesia In Attacked Mice. *European Journal Of Pharmacology*, 168(2), 239–242.

Souza, R. R., & Carobrez, A. P. (2016). Acquisition and expression of fear memories are distinctly modulated along the dorsolateral periaqueductal gray axis of rats exposed to predator odor. *Behavioural Brain Research*, 315, 160–167.

Spielberger CD & Gorsuch RL & Lushene RE. Manual for the state-trait anxiety inventory. Palo Alto: *Consulting Psychologist Press*; 1970.

Tanda, G. (1997). Cannabinoid And Heroin Activation Of Mesolimbic Dopamine Transmission By A Common μ 1 Opioid Receptor Mechanism. *Science*, 276(5321), 2048–2050.

Thomas, A. *et al.* (2009). Cannabidiol displays unexpectedly high potency as an antagonist of CB1 and CB2 receptor agonists in vitro. *British Journal Of Pharmacology*, 150 (5), 613-623.

Twardowschy, A., & Cysne Coimbra, N. (2015). μ - and κ -Opioid receptor activation in the dorsal periaqueductal grey matter differentially modulates panic-like behaviours induced by electrical and chemical stimulation of the inferior colliculus. *Brain Research*, 1597, 168–179.

Valverde O., Maldonado R., Valjent E., Zimmer A. M., Zimmer A. (2000). Cannabinoid withdrawal syndrome is reduced in pre-proenkephalin knock-out mice. *Journal of Neuroscience*. 20 9284–9289.

Vargas, L. C., De Azevedo Marques, T., & Schenberg, L. C. (2000). Micturition And Defensive Behaviors Are Controlled By Distinct Neural Networks Within The Dorsal Periaqueductal Gray And Deep Gray Layer Of The Superior Colliculus Of The Rat. *Neuroscience Letters*, 280(1), 45–48.

Vela, G., Ruiz-Gayo, M., & Fuentes, J. A. (1995). Anandamide Decreases Naloxone-Precipitated Withdrawal Signs In Mice Chronically Treated With Morphine. *Neuropharmacology*, 34(6), 665–668.

Viana, T. G., Hott, S. C., Resstel, L. B., Aguiar, D. C., & Moreira, F. A. (2014). Anti-Aversive Role Of The Endocannabinoid System In The Periaqueductal Gray Stimulation Model Of Panic Attacks In Rats. *Psychopharmacology*, 232(9), 1545–1553.

Vowles, K. E., McEntee, M. L., Julnes, P. S., Frohe, T., Ney, J. P., & van der Goes, D. N. (2015). Rates of opioid misuse, abuse, and addiction in chronic pain. *PAIN*, 156(4), 569–576.

Walker, J. M., Huang, S. M., Strangman, N. M., Tsou, K., & Sanudo-Pena, M. C. (1999). Pain Modulation By Release Of The Endogenous Cannabinoid Anandamide. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, 96(21), 12198–12203.

Wilson, A. R., Maher, L., & Morgan, M. M. (2008). Repeated Cannabinoid Injections Into The Rat Periaqueductal Gray Enhance Subsequent Morphine Antinociception. *Neuropharmacology*, 55(7), 1219–1225.

Wilson-Poe, A. R., Morgan, M. M., Aicher, S. A., & Hegarty, D. M. (2012). Distribution Of Cb1 Cannabinoid Receptors And Their Relationship With Mu-Opioid Receptors In The Rat Periaqueductal Gray. *Neuroscience*, 213, 191–200.

Zangrossi, H., & Graeff, F. G. (2014). Serotonin In Anxiety And Panic: Contributions Of The Elevated T-Maze. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 46, 397–406.

Zanoveli, J. M., Pobbe, R. L. H., de Bortoli, V. C., Carvalho, M. C., Brandão, M. L., & Zangrossi, H. . (2010). Facilitation of 5-HT(1A)-mediated neurotransmission in dorsal periaqueductal grey matter accounts for the panicolytic-like effect of chronic fluoxetine. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 13(8),1079–1088.