UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

*Estudo Neurofarmacológico da Interação entre Circuitos
Endocanabinoides e Opioides da Substância Negra, Parte Reticulada,
sobre a Atividade da Via GABAérgica Nigro-Tectal, e de seu Papel na
Modulação da Analgesia Induzida pelo Medo Inato*

Juliana Almeida da Silva

Ribeirão Preto - SP

2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
Departamento de Farmacologia

***Estudo Neurofarmacológico da Interação entre Circuitos
Endocanabinoides e Opioides da Substância Negra, Parte Reticulada,
sobre a Atividade da Via GABAérgica Nigro-Tectal, e de seu Papel na
Modulação da Analgesia Induzida pelo Medo Inato***

Juliana Almeida da Silva

Dissertação Apresentada ao Departamento de
Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão
Preto da Universidade de São Paulo, como requisito
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências.
Área de Pós-graduação: Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Norberto Cysne Coimbra

Ribeirão Preto - SP

2011

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Silva, Juliana Almeida

Estudo Neurofarmacológico da Interação entre Circuitos Endocanabinoides e Opioides da Substância Negra, Parte Reticulada, sobre a Atividade da Via GABAérgica Nigro-Tectal, e de seu Papel na Modulação da Analgesia Induzida pelo Medo Inato.

121 p.: il.: 30 cm

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Área de concentração: Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Norberto Cysne Coimbra

1. Comportamentos Defensivos; 2. Antinocicepção; 3. Neurotransmissão GABAérgica; 4. Opioides; 5. Endocanabinoides

FOLHA DE APROVAÇÃO

Juliana Almeida da Silva

Estudo Neurofarmacológico da Interação entre Circuitos Endocanabinoides e Opioides da Substância Negra, Parte Reticulada, sobre a Atividade da Via GABAérgica Nigro-Tectal, e de seu Papel na Modulação da Analgesia Induzida pelo Medo Inato.

Dissertação Apresentada ao Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Ciências.
Área de Pós-graduação: Farmacologia.

Aprovado em: ____/____/____.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Norberto Cysne Coimbra
Instituição: FMRP-USP

Assinatura: _____.

Prof. Dr. Leonardo Resstel Barbosa Moraes
Instituição: FMRP-USP

Assinatura: _____.

Prof^ª. Dra. Liana Lins Melo
Instituição: UNIFESP

Assinatura: _____.

DEDICO,

A minha mãe, **Deise Almeida da Silva** (*in memoriam*), “Não sei por que você se foi, quantas saudades eu senti! De tristezas vou viver... e aquele adeus não pude dar...” Um lar sem mãe é muito duro e triste, tudo soluça e chora; só sabe a dor da saudade quem um dia perdeu alguém, um alguém muito querido que aos poucos fosse deixando somente esperanças de vida. Pode até mesmo durar uma eternidade, mas, mãe, um dia eu sei que estarei ao seu lado e esquecerei toda essa saudade.

Especialmente, ao meu pai, **José Aparecido da Silva**, que, com respeito, viu-me crescer e deixou que tomasse decisões importantes, agradeço-lhe por cada amanhecer que compartilhei ao seu lado, por saber que está aqui comigo em todo momento, porque sei que estará aqui para sempre. Por toda minha vida, vou agradecer a Deus pelo pai maravilhoso que designou a mim. Obrigada, pai, por orientar o meu caminho, feito de lutas e incertezas, mas também de muitas esperanças e sonhos. Eu o amo.

Ao **Prof. Dr. Norberto Cysne Coimbra**, meu orientador, pelo imenso carinho e paciência incomensurável, por fazer do processo de aprendizagem, não um trabalho qualquer, mas sim, um contínuo e rico processo de promoção cognitiva agregado à felicidade e ao contentamento dele vivenciar e participar. Valorizo sua habilidade por fazer-me sentir-se como pessoa, com limitações, fraquezas e potenciais e, também, por ajudar-me a descobrir o que fazer de melhor e, assim, fazê-lo cada vez melhor. Obrigada por afastar o medo das coisas que, eventualmente, não pude compreender, levando-me, por fim, a compreendê-las; por resolver o que achava complicado e por ser uma pessoa a quem se pode sempre recorrer quando os caminhos da vida mostram-se mais difíceis.

AGRADEÇO,

A **Deus**, por sempre me iluminar e me mostrar o caminho nas horas incertas, e me suprir em todas as minhas necessidades.

Ao **Prof. Dr. Leonardo Resstel Barbosa Moraes** e a **Profª Dra. Liana Lins Melo**, por aceitarem participar da banca examinadora muito obrigada pelas suas correções e alterações. Elas enriqueceram muito o meu trabalho.

A tia **Helen** e ao tio **Flávio** os meus mais profundos agradecimentos por suas sábias lições de esperança e por sempre repetirem palavras cardinais, tais como, amor, crença, compreensão e alegria, infundiram-me a confiança necessária para realizar os meus sonhos.

Ao primo **Flávio**, agradeço seu carinho e a natureza por nos ter feito primos, mas no íntimo é como se fôssemos irmãos.

Ao meu irmão **Daniel** e a minha cunhada **Ingrid**, que mesmo fisicamente distantes, sempre estiveram próximos, e no meu coração.

A **Sueli**, que sempre me considerou sua filha adotiva, obrigada por todos os conselhos sempre tão coerentes e sábios, por todo apoio nos momentos mais difíceis e por emanar força quando dela precisei.

A **Dilú**, agradeço, especialmente, com afeto, carinho e consideração. Em conviver com ela, aprendi a respeitar esta mulher forte e generosa que não mede esforços para ajudar e amparar. Estiveste sempre ao meu lado, nos momentos em que mais precisei de apoio. Tantos nas horas alegres como nas horas tristes. Desde que te conheci, sua figura inspira amor e alegria no coração de todos os que te cercam. Ter a sua amizade e o seu carinho significam muito para mim. Quero estar sempre em sua história, compartilhando do seu sorriso e da sua alegria.

A **Jaqueline Bianchi**, minha irmã de coração, não encontro palavras para definir minha gratidão, consideração e carinho por você.

As minhas princesas **Letícia, Carol** e ao lindo **João Gabriel**, pelo carinho incondicional, e pela pureza de seus sorrisos. Titia Juju ama vocês.

A **Nathália Whitehead** e a **Danielle La Gamba**, que embora não tenham contribuído para a pesquisa aqui relatada, devo reconhecer e agradecer por terem feito com que, eventualmente, me convencessem a sair de casa, conversasse e, em algumas vezes, curtisse um “happy hour” sempre que meu envolvido pleno nos estudos estava quase me levando ao estado melancólico.

Amigo é aquele que te diz: eu te amo; sem qualquer medo de má interpretação. Amigo é quem te ama e ponto. É verdade, razão, sonho e sentimento. Amigo é pra sempre, mesmo que o sempre não exista. É aquele que entende seu desejo de voar, de sumir devagar, a angústia pela compreensão dos acontecimentos, a sede pelo por vir. É ao mesmo tempo espelho que te reflete, e óleo derramado sobre suas águas agitadas. É quem fica enfurecido por enxergar seu erro, querer tanto o seu bem e saber que a perfeição é utopia. É o sol que seca suas lágrimas, é a polpa que adocica ainda mais seu sorriso. Amigo são vocês: **Adálida e Renato Freitas**.

Aos meus amigos, do **Laboratório de Neuroanatomia e Neuropsicofarmacologia (LNN)**, que colaboraram, por meio de observações pertinentes sobre meu trabalho, para que eu pudesse chegar às conclusões que explorei; além de terem dado palpites importantes para a minha pesquisa, merecem ser agradecidos, também, por terem continuado a ser grandes amigos, mesmo que o envolvimento nas tarefas da elaboração da dissertação tenha me tornado um tanto distante. Nada na vida conquistamos sozinhos, sempre precisamos de outras pessoas para alcançar nossos objetivos. Muitas vezes, um simples gesto pode mudar a nossa vida e contribuir para nosso sucesso. Portanto, quero agradecer a **Rithiele Oliveira, Tati Maurin, Tati Felippotti, Carlos Salgado, Ricardo Oliveira, Andressa Zaparolli, Elaine Mazzei, André TW, Luana Bolognesi, Isaac Fischer, Daniele Peres, Tiago Furlanetto, Fabrício Calvo, Priscila Zanandréa, Bruno Lobão, Walter Ubiali**.

A **Audrey Francisco** e a **Márcia Rédua**, pelo carinho, paciência e por sempre dividirem comigo os seus conhecimentos, e por nunca me deixarem esquecer o quanto Deus é importante em nossas vidas.

A **Daoud**, pelo apoio técnico, pela amizade e pelas longas horas de malhação.

A todos os **Professores do Departamento de Farmacologia**.

A todos os **amigos e pós-graduandos do Departamento de Farmacologia**.

Aos funcionários da secretaria do Departamento de Farmacologia: **Fátima Helena Petean** e **José Waldik Ramon**, pelo carinho, dedicação e competência nas resoluções administrativas. Em especial, agradeço a **Sônia Maria Stefanelli**, pelos conselhos, amizade, paciência e por me fazer acreditar que sou capaz. Obrigada!

As bioteristas do Departamento de Farmacologia, **Maria Inês Nemoto** e **Eliana de Barros**, pelo cuidado com os animais do biotério.

A todos os funcionários e técnicos da FMRP-USP, pela disponibilidade em ajudarem. Em especial a **Eleni** e **Tadeu**, do Departamento de Farmacologia e a **Vani** e a **Izilda**, do Departamento de Biologia Celular.

Ao **CNPq** e a **FAPESP**, pelo apoio financeiro, imprescindível para a realização desse trabalho.

Aos **animais de laboratório**, indispensáveis para o desenvolvimento científico.

Por fim, agradeço a todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho e, também, a todos que passaram por minha vida.

RESUMO

SILVA, J.A. ESTUDO NEUROFARMACOLÓGICO DA INTERAÇÃO ENTRE CIRCUITOS CANABINOIDES E OPIOIDES DA SUBSTÂNCIA NEGRA, PARTE RETICULADA, SOBRE A ATIVIDADE DA VIA GABAÉRGICA NIGRO-TECTAL, E DE SEU PAPEL NA MODULAÇÃO DA ANALGESIA INDUZIDA PELO MEDO INATO. 2011. Dissertação de Mestrado- Laboratório de Neuroanatomia e Neuropsicobiologia. Departamento de Farmacologia de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto.

Existe um grande interesse científico voltado para a busca das bases neuropsicofarmacológicas dos comportamentos que têm sido associados ao medo e ao pânico. Muitos estudos sugerem o teto mesencefálico (TM) como responsável pelo controle de respostas defensivas elaboradas durante situações de perigo iminente. A substância cinzenta periaquedutal (SCP), as camadas profundas do colículo superior (cpCS) e o colículo inferior (CI) têm sido considerados importantes estruturas na elaboração do medo inato e do comportamento de defesa, assim como na organização da antinocicepção induzida pelo medo inato. Contudo, muitos estudos têm implicado a via neostriado-nigro-tectal no controle de respostas defensivas elaboradas no mesencéfalo dorsal, permeadas pela interação entre vias opioides e GABAérgicas. O presente trabalho tem por objetivo o estudo neurofarmacológico da anatomia conectiva funcional entre a substância negra (SN) e estruturas do TM, como a SCP e as cpCS, ligadas à organização do comportamento relacionado ao medo e à elaboração de processos antinociceptivos, avaliando-se o envolvimento da interação entre os sistemas opioide e canabinoide e a via nigro-tectal GABAérgica na modulação do comportamento de defesa e da antinocicepção induzida pelo medo evocado pela microinjeção de antagonista GABAérgico no *continuum* compreendido pela coluna dorsolateral da SCP e pelas cpCS. Com esse propósito, foram estudados os efeitos de microinjeções de agonistas e de antagonistas de receptores opioides ou canabinoides não-seletivos e seletivos na substância negra, parte reticulada (SNpr), sobre a antinocicepção que segue as diversas respostas comportamentais evocadas por microinjeções de bicuculina na SCPdl/cpCS de *Rattus norvegicus* (Rodentia, Muridae).

O presente trabalho mostrou que a microinjeção do antagonista de receptores GABA_A, bicuculina no TM, induziu comportamentos defensivos, elaborados concomitantemente com processos antinociceptivos, a interação entre vias opioides e aquelas mediadas por endocanabinoides SNpr modula o comportamento de defesa organizado no mesencéfalo dorsal sem alteração na antinocicepção induzida pelo medo. O pré-tratamento na substância negra, parte reticulada com agonistas opioides e canabinoides aumentou os limiares nociceptivos e a microinjeção de antagonistas opioides e canabinoides, causou redução dos limiares nociceptivos. Esses dados sugerem uma interação entre vias opioides e endocanabinoides da SNpr, na modulação do comportamento que tem sido relacionado ao medo inato e a ataques de pânico, sendo recrutados receptores endocanabinoides do tipo CB₁ e CB₂ do mesencéfalo ventral, ao lado de receptores opioides do tipo μ_1 e κ na modulação de vias GABAérgicas de projeção nigro-tectal.

ABSTRACT

SILVA, J.A. NEUROPHARMACOLOGICAL STUDY OF THE INTERACTION BETWEEN CANNABINOID AND OPIOID CIRCUITS OF THE SUBSTANTIA NIGRA, PARS RETICULATA, ON THE ACTIVITY OF THE NIGROTECTAL GABAERGIC PATHWAYS, AND OF THE YOUR ROLE IN THE MODULATION OF THE INNATE FEAR-INDUCED ANTINOCICEPTION.
2011. Masters Dissertation- Laboratory of Neuroanatomy and Neuropsychobiology. Pharmacology Department. Ribeirão Preto Medical School. University of São Paulo. Ribeirão Preto.

There is a great scientific interest in searching the neuropsychopharmacological bases of behavioural reactions associated to fear and panic. Many studies suggest that the mesencephalic tegmentum (MT) a mesencephalic division rich GABA, opioid and endocannabinoid containing neurons and/or receptors complex control on defensive responses during imminent danger conditions. It is also known that the periaqueductal grey matter (PAG), the deep layers of colliculus superior (cpCS) and the colliculus inferior (CI) are important structures related to innate fear and defence as well as to the organization of fear-induced antinociception. In addition neo-striatal-nigro-ectal pathways are involved in the modulation of defensive responses elaborated in the dorsal midbrain, the central mesencephalic is rich in endocannabinoids. There are interactions between opioid and GABAergic pathways in these processes. The aim of this work is to study the role of the interaction between opioid and endocannabinoid-mediated neurotransmission on the activity of GABAergic nigro-collicular pathways.

Microinjections of non-selective and selective agonist and antagonists of opioid and cannabinoid receptor were performed in the SNpr before the GABA_A receptor blockade in the dorsal midbrain (SCPdl/cpCS).

The GABA_A receptor blockade in the Mesencephalic tectum elicited vigorous defensive behaviour. This explosive escape behaviour was followed by significant antinociception. Microinjection of opioid and cannabinoid agonists in the SNpr increased the fear-induced antinociception and the treatment of the ventral midbrain with antagonists caused opposite effect. These data suggest a clear interaction between opioids and endocannabinoids pathways of the SNpr, in the modulation of the behaviour that has been related to the innate fear and the attacks of panic, being enlisted receiving endocannabinoids of type CB₁ and CB₂ of mesencephalic tegmentum, to the side of opioids receptors (κ -opioid receptor antagonist and μ 1-opioid receptor antagonist) in the modulation of nigro-ectal GABAergic pathways.

LISTA DE ABREVIATURAS

AC - ADENILATO CICLASE

AEA - ARAQUIDONILETANOLAMIDA OU ANANDAMIDA

ANOVA - ANÁLISE DE VARIÂNCIA

ATV - ÁREA TEGMENTAL VENTRAL

CB₁ - RECEPTORES CANABINOIDES DO TIPO 1

CB₂ - RECEPTORES CANABINOIDES DO TIPO 2

CBD - CANABIDIOL

CI - COLÍCULO INFERIOR

CPSC OU CS - CAMADAS PROFUNDAS DO COLÍCULO SUPERIOR

DMSO - DIMETILSULFOXIDO

EPM - ERRO PADRÃO DA MÉDIA

FAAH - *FATTY ACID AMIDE HYDROLASE*

GABA - ÁCIDO GAMA-AMINO BUTÍRICO

NCCI - NÚCLEO CENTRAL DO COLÍCULO INFERIOR

NMGR - NÚCLEO MAGNO DA RAFE

SCP - SUBSTÂNCIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL

SCPD - SUBSTÂNCIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL DORSAL

SCPVL - SUBSTANCIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL VENTROLATERAL

SEA - SISTEMA ENCEFÁLICO AVERSIVO

SN - SUBSTÂNCIA NEGRA

SNPC - SUBSTÂNCIA NEGRA PARTE COMPACTA

SNPL - SUBSTÂNCIA NEGRA PARTE LATERAL

SNPR - SUBSTÂNCIA NEGRA PARTE RETICULADA

TM - TETO MESENCEFÁLICO

TRPV1 - RECEPTOR VANILÓIDE DO TIPO 1

Δ^9 -THC - Δ^9 -TETRA-HIDROCANABINOIDE

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	13
Comportamentos Defensivos e a Modulação da dor	13
Camadas Profundas do Colículo Superior.....	16
Substância negra	18
O Sistema Opioidérgico	20
O Sistema Endocanabinoide	23
O Sistema GABAérgico	26
Interação entre os Sistemas Opioides e Endocanabinoides	29
Interação entre os Sistemas Opioidérgico e GABAérgico	31
Interação entre os Sistemas Endocanabinoide e GABAérgico.....	32
Sistema Opióide e Endocanabinoide na Modulação da Dor	33
 OBJETIVO.....	 35
Objetivo Geral	35
Objetivos Específicos	35
 MATERIAL E MÉTODOS	 36
Animais.....	36
Equipamentos.....	36
Cirurgia	37
Drogas	37
Procedimento Experimental	38
Teste Nociceptivo.....	39
Histologia	39
Análise Estatística	40
 RESULTADOS	 41
<i>Efeito do pré-tratamento da divisão reticulada da substância negra com agonistas e antagonistas de receptores canabinoides sobre as diversas respostas comportamentais induzidas bloqueio dos receptores GABA_A nas cpCS.....</i>	<i>41</i>
<i>Estudo do Limiar Nociceptivo.....</i>	<i>48</i>
<i>O efeito da interação entre o sistema opioide e canabinoide na divisão reticulada da substância negra nas respostas defensivas induzidas pelo bloqueio do receptor GABA_A nas camadas profundas do colículo superior: Ação da morfina na SNpr.....</i>	<i>50</i>

<i>Estudo do Limiar Nociceptivo.....</i>	<i>58</i>
<i>O efeito da interação entre o sistema opioide e canabinoide na divisão reticulada da substância negra nas respostas de comportamentos defensivos induzidas pelo bloqueio do receptor GABA_A nas camadas profundas do colículo superior: Ação do Naloxonazina na SNpr.....</i>	<i>60</i>
<i>Estudo do Limiar Nociceptivo.....</i>	<i>67</i>
<i>O efeito da interação entre o sistema opioide e canabinoide na divisão reticulada da substância negra nas respostas de comportamentos defensivos induzidas pelo bloqueio do receptor GABA_A nas camadas profundas do colículo superior: Ação da Nor-binaltorfimina na SNpr</i>	<i>69</i>
<i>Estudo do Limiar Nociceptivo.....</i>	<i>77</i>
DISCUSSÃO.....	86
CONCLUSÃO.....	93
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	94
ANEXOS.....	120

INTRODUÇÃO

Comportamentos Defensivos e a Modulação da dor

Desde os primórdios da história, os seres humanos têm investigado sobre a natureza e a importância de suas emoções. Controvérsias em relação à definição das emoções surgiram no que diz respeito ao número de emoções primárias existentes, se algumas delas têm maior importância que as outras, quais as mais frequentes respostas frente às diferentes espécies e, principalmente, quais as bases neurais envolvidas com o comportamento evocado.

A partir do trabalho de Charles Darwin, começaram a aparecer os primeiros estudos apontando a importância adaptativa das emoções. Em seu livro “The Expression of Emotion in Men and Animals”, DARWIN em 1872 aborda a origem e desenvolvimento dos principais comportamentos emocionais, propondo que esses comportamentos defensivos determinados em animais filogeneticamente situados em outros patamares da escala evolutiva podem ser análogos às emoções humanas, como o medo, o pânico e a raiva que experimentamos (PANKSEPP, 1982).

Estímulos inatos ou aprendidos que sinalizem perigo e dano corporal iminente ativam circuitos neurais encefálicos responsáveis pela gênese e elaboração de estados aversivos (PANKSEPP, 1990; FANSELOW, 1991), que são interpretados em nossa espécie como estado motivacional do medo. Comportamentos defensivos podem, então, se expressar sob a forma de inibição comportamental e vigilância (GRAY, 1982; COIMBRA & BRANDÃO, 1993), congelamento (FANSELOW, 1980; COIMBRA e cols. 1989; ZHANG e cols. 1990), fuga (PANKSEPP, 1990; COIMBRA & BRANDÃO, 1993), ou por imobilidade tônica (GRAEFF, 1993a; MENESCAL-DE-OLIVEIRA & HOFFMANN, 1993), e por um conjunto de posturas ameaçadoras e vocalização, seguidas por ataque (na impossibilidade de fuga), a que se denomina defesa afetiva (HESS & BRUGER, 1943). Posturas apaziguadoras de submissão são frequentemente apresentadas no sentido de evitar um posterior comportamento ofensivo de um oponente dominante (MICZEK, 1984). A expressão do comportamento de defesa acompanha-se de acentuadas alterações neurovegetativas e endócrinas, largamente estudadas (MANCIA & ZANCHETTI, 1981; HILTON, 1982; LEÃO-BORGES e cols, 1988; BRANDÃO e cols. 1990).

Em uma tentativa de investigar o substrato neural responsável pela elaboração do comportamento defensivo, assim como determinar os neurotransmissores envolvidos nas conexões entre estruturas encefálicas, cuja estimulação evocaria reações de medo, extensas investigações têm sido feitas com a utilização de neurotraçadores, de técnicas imuno-histoquímicas, psicofarmacológicas e até mesmo utilização de clássicos métodos de estudo em neurofisiologia (STEINBUSH, 1981; FUCHS & SIEGEL, 1984; FUCHS e cols, 1985; BRANDÃO e cols, 1991, 1993; CARRIVE, 1993; COIMBRA & BRANDÃO, 1993).

Após serem estudadas as áreas encefálicas que traçam a suposta trajetória do medo, descobriu-se uma vasta gama de interconexões entre elas, como a conhecida ligação funcional e neuroanatômica entre a substância cinzenta periaqueductal dorsal (SCPd), o hipotálamo medial, o complexo amigdalóide e a área septal (BEN-ARI, 1981; SIEGEL & POTT, 1988; GRAEFF, 1990), o que permite situar a substância cinzenta periaqueductal (SCP) no cerne do sistema encefálico da aversão, que coordenaria a geração e elaboração do medo (GRAEFF, 1981), ao lado de outras estruturas, como as camadas profundas do colículo superior (cpCS) (COIMBRA & BRANDÃO, 1993; COIMBRA e cols., 1996) e o núcleo central do colículo inferior (CI) (BRANDÃO e cols., 1988, 1993; CARDOSO e cols., 1994; COIMBRA e cols., 2000; BRANDÃO e cols., 2001). Efetivamente, danos realizados na SCPd prejudicam a defesa afetiva induzida por estímulos ambientais ou pela estimulação elétrica do hipotálamo dorso-medial e amígdala, muito embora a destruição dessas últimas estruturas não seja suficiente para afetar a reação de defesa evocada na SCPd (FERNANDEZ de MOLINA & HUNSPERGER, 1959). A fuga e outros comportamentos defensivos, como as reações de esquiva, são reduzidas por lesões na amígdala e na SCPd (PELLEGRINO, 1968; BLANCHARD & BLANCHARD, 1972; BLANCHARD e cols., 1979, 1981; ISAACSON, 1982). Animais lesados na SCPd, caracteristicamente, além de exibirem poucas reações de medo, também não fogem de estímulos dolorosos e na presença de ruídos (LYON, 1964), mostrando resposta reduzida de fuga e esquiva ao choque nas patas (HALPERN, 1968). Interações entre vias estriado-nigro-tectais GABAérgicas (COIMBRA & BRANDÃO, 1993) e vias varicosas ricas em opioides endógenos intra-tectais e tecto-nigrais (EICHENBERGER e cols., 2002; OSAKI e col., 2003; RIBEIRO e cols., 2005) foram propostas como importantes elos conectivos envolvidos na modulação do medo e do pânico (CASTELLAN-BALDAN e col., 2006).

Trabalhos prévios (FARDIN e cols. 1984a,b; BANDLER & DEPAULIS, 1988; LOVICK, 1993; DEPAULIS e cols, 1992) demonstraram que a estimulação das colunas dorso-lateral e ventro-lateral (SCPvl) da SCP poderiam produzir efeito antinociceptivo, sendo a analgesia que segue a ativação dos aspectos dorsais da SCP precedida por reações motoras explosivas (comportamento de fuga). Com efeito, há relatos sugerindo que comportamentos eliciados por estimulação de estruturas, como o complexo amigdalóide, a SCPvl, a SCPd, as cpCS e o núcleo central do CI (NCCI) podem estar sendo moduladas por um circuito opioide e não-opioide (GRAEFF, 1981; BRANDÃO e cols., 1988, 1993; COIMBRA & BRANDÃO, 1993; CARDOSO e cols., 1994; SCHWEIMER e cols., 2005; COIMBRA e cols., 2006), e a antinocicepção que segue tais reações defensivas pode ter parte de seus mecanismos sediada nos núcleos do sistema endógeno de inibição de dor (FREITAS e cols., 2005; COIMBRA e cols., 2006). Conexões anatômicas têm sido demonstradas entre o CI, o colículo superior (CS) e SCPd (KUDO & NIIMI 1980; MEININGER e cols., 1986; HERRERA e cols., 1988; HUFFMAN & HENSON, 1990; COIMBRA e cols., 1998; BRANDÃO e cols., 1999; FREITAS e cols., 2005), e entre os aspectos ventrais da SCP e o hipotálamo (LEITE-PANISSI e cols., 2003), estruturas essas que, ao serem eletricamente estimuladas, evocam processos antinociceptivos (COIMBRA e cols., 1992; COIMBRA & BRANDÃO, 1997; LI e cols., 2004; COIMBRA e cols., 2006). Tem sido postulado que estruturas contendo polipeptídeos opioides endógenos, núcleos noradrenérgicos e serotonérgicos do sistema endógeno de inibição de dor podem se apresentar como estruturas-chave em fenômenos antinociceptivos diversos (FREITAS e cols., 2005; MIYASE e cols., 2005).

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

Antinocicepção pode ser definida como redução na resposta do sistema sensorial para os estímulos nocivos (BASBAUM & FIELDS, 1978). A sensação nociceptiva e os aspectos das respostas comportamentais da dor dependem de processamento neural de estímulos nocivos por estruturas superiores. Estas informações nociceptivas trafegam por meio dos funículos ântero-lateral e dorso-lateral da medula espinal ou através do

lemnisco trigeminal e são dirigidas para o tálamo e para o giro pós-central (SURMEIER e cols.; 1989).

O processamento de estímulos nociceptivos pode ser modulado no prosencéfalo, na medula espinal, no tronco encefálico e no diencéfalo (CASEY, 1999). A transmissão nociceptiva em nível espinal está sujeita a regulação por neurônios descendentes originados de diversas redes neurais encefálicas. Os corpos neuroniais das fibras que formam esse sistema de controle inibitório descendente estão localizados em diferentes núcleos incluindo a substância cinzenta periaquedutal, o núcleo magno da rafe, a formação reticular mesencefálica, o núcleo dorsal da rafe (PRADO & FAGANELLO, 2000), o núcleo reticular paragigantocelular, o *locus coeruleus*, o bulbo ventromedial rostral, a amígdala (BODNAR, 2000), o hipotálamo, o tálamo, o córtex somatossensorial e vários componentes do sistema límbico (WILLIS & WESTLUND, 1997). Estes sítios compreendem um relevante sistema interconectado anatômica e fisiologicamente que medeia respostas antinociceptivas por meio de interações regionais (BODNAR, 2000). A estimulação do córtex cerebral ou do tálamo pode facilitar ou suprimir as respostas dos neurônios dos tratos espino-talâmico ou trigêmino-talâmico (GEBHART e cols., 1983; YEZIERSKI e cols., 1983).

No entanto, deve-se lembrar que o controle da dor não é necessariamente apenas inibitório. A transmissão nociceptiva também está sujeita à modulação descendente facilitatória que pode favorecer o desenvolvimento de condições patológicas, como alodinia (dor evocada por um estímulo não nocivo) e hiperalgesia (maior intensidade da dor associada a um estímulo nocivo leve).

Camadas Profundas do Colículo Superior

Os colículos superiores estão localizados no teto mesencefálico e são formados por uma série de camadas alternadas. Os colículos superiores são divididos em camadas superficiais e profundas. Foram divididos desta maneira devido a seus aspectos morfológicos, fisiológicos, à elaboração de comportamentos específicos e também em razão de suas conexões (STEIN, 1984).

De acordo com suas projeções aferentes, as camadas superficiais e intermediárias cinzentas do colículo superior recebem projeções que se originam da retina, e de fibras córtico-estriatais provenientes do córtex visual. As camadas profundas e intermediárias recebem fibras aferentes da medula espinal, do colículo inferior e de

densas projeções aferentes e eferentes que se originam da SCP ou para ela se destinam (MEHLER e cols., 1960; MANTYH, 1983). As fibras córtico-tectais, que têm origem no córtex visual, projetam-se ipsilateralmente às regiões anteriores do CS e não recebem fibras da retina, que são, por sua vez, bilaterais, com predomínio contralateral (CARPENTER, 1978). Além disso, as cpCS recebem fibras córtico-tectais originadas do córtex auditivo, via colículo inferior (CARPENTER, 1991). Porém, as cpCS também recebem aferências de áreas corticais não visuais, como o córtex temporal, parietal e córtex pré-frontal, incluindo regiões somato-sensoriais (áreas 1, 2 e 3 de Broadmann) (BRODAL, 1992).

As fibras tecto-talâmicas, tecto-reticulares, tecto-pontinas e tecto-espinais fazem parte das projeções eferentes do colículo superior. Das células situadas nas camadas superficiais, originam-se as fibras eferentes ascendentes do CS e, das células localizadas nas camadas profundas, originam-se as fibras descendentes. No entanto, fibras tecto-talâmicas originam-se das camadas mais superficiais do CS e se projetam ipsilateralmente, não somente para o *pulvinar*, mas também para a área pré-tectal, para o núcleo parabigeminal, e para os núcleos geniculados laterais dorsais. Já as fibras tecto-reticulares dirigem-se bilateralmente para as regiões dorsais da formação reticular mesencefálica.

As fibras tecto-pontinas e tecto-bulbares não cruzadas fazem conexões com os núcleos pontinos dorso-laterais ipsilaterais, no núcleo retículo-tegmentar e núcleos reticulares pontinos. As fibras tecto-espinais e tecto-bulbares cruzadas descem ao longo da rafe, cruzando o eixo mediano, no mesencéfalo. No bulbo, essas fibras unem-se ao fascículo longitudinal medial, e as fibras tecto-espinais dirigem-se até a medula cervical, ramificando-se dentro das lâminas VII e VIII (CARPENTER, 1991). Com todas estas conexões, o colículo superior desempenha várias funções durante um estímulo aversivo apresentado ao animal, tais como a movimentação da cabeça, orelhas e olhos em direção ao estímulo (SPARKS & NELSON, 1987), e mesmo na elaboração de respostas comportamentais evocadas pelo medo (COIMBRA & BRANDÃO, 1993; EICHENBERGER e cols., 2002).

Alguns estudos mostram que a microinjeção de antagonistas GABAérgicos no teto mesencefálico também provoca reações defensivas, sugerindo, assim, uma função inibitória tônica do GABA em neurônios responsáveis pela elaboração de respostas de defesa nestas regiões (BRANDÃO e cols., 1982; DI SCALA e cols., 1984; COIMBRA e cols., 1989; COIMBRA & BRANDÃO, 1993; EICHENBERGER e cols., 2002).

Como já descrito anteriormente, comportamentos induzidos por estímulos aversivos, como aqueles evocados através do estímulo elétrico do teto mesencefálico, são seguidos de antinocicepção (FARDIN e cols., 1984; COIMBRA e cols., 1992; COIMBRA & BRANDÃO, 1997). Como provável base neuroanatômica desse fenômeno antinociceptivo, podemos salientar as conexões, basicamente serotoninérgicas, de núcleos da formação reticular, tais como os núcleos da rafe, núcleo paragigantocelular e gigantocelular, parte alfa, com o CS e a SCP (BEITZ, 1986). Esses núcleos bulbares, assim como a SCP, fazem parte do sistema endógeno que modula a percepção de estímulos nociceptivos (WILLIS & WESTLUND, 1997).

Neurônios da SCP fazem conexões com núcleos monoaminérgicos da formação reticular, como o núcleo magno da rafe (NMgR) e o núcleo reticular paragigantocelular (área B₃), sendo que essas projeções são basicamente serotoninérgicas (BEITZ e cols., 1986) e desempenham um papel crucial no processo antinociceptivo supraespinal (FARDIN e cols., 1984; KIEFEL e cols., 1992).

Substância negra

A substância negra é a maior estrutura nuclear do mesencéfalo (MARTIN, 1998), situada entre o tegmento e a base do pedúnculo cerebral (MACHADO, 2000), e é classificada morfológicamente em três subdivisões: a parte compacta (SNpc), a parte reticulada (SNpr) e a parte lateral (SNpl), onde seus neurônios são caracterizados morfológicamente como pequenos, com forma poligonal, fusiformes, triangulares, esféricos e semelhantes a elementos neurogliais (DANNER & PFISTER, 1982), além de possuírem uma coloração escura devido à presença de melanina em algumas áreas, como ocorre a divisão compacta de substância negra, em primatas.

A SNpc de roedores pode ser subdividida em uma parte rostral e outra, caudal, as quais apresentam diferentes características celulares. Na porção rostral, os neurônios consistem nos maiores e mais pigmentados da substância negra; caudalmente, as células são menores e mais pálidas (FALLON & LOUGHLIN, 1985).

A SNpr está localizada adjacente à base do pedúnculo e contém GABA como neurotransmissor (MARTIN, 1998). Alguns trabalhos na literatura mostraram que áreas específicas do caudado-*putamen* se projetam à SNpr (STAINES, 1980; BOLAM e cols., 1981; PARENT, 1990), e a SNpr é considerada uma das áreas em que o GABA é encontrado em maior concentração no encéfalo.

No rato, gato, macaco e no homem, a SNpl está localizada dorso-lateralmente à SNpr, e à SNpc. No rato e no macaco, a SNpl possui menor extensão rostro-caudal e se inicia caudalmente às demais subdivisões da substância negra. Muitos de seus neurônios contêm dopamina ou colecistocinina, alguns dos quais se dirigem para dentro da região do núcleo peripeduncular (FALLON e cols., 1983).

Estudos demonstraram que, quando se comparam os neurônios da parte reticulada com os da parte compacta, os da reticulada são vinte vezes mais sensíveis ao GABA (GRACE & BUNNEY, 1979), esse neurotransmissor é liberado de maneira cálcio-dependente (SHNEIDERMAN e col., 1993) e sintetizado a partir do glutamato, em uma reação catalizada pela enzima ácido glutâmico-descarboxilase. Esse processo ocorre em todo o sistema nervoso onde o GABA é sintetizado. O GABA exerce um efeito inibitório tônico sobre os neurônios do *tectum*, ou seja, os que elaboram o medo e o pânico, sugerindo, assim, que a SN exerce uma função de regulação e controle de algumas respostas emocionais (DICHARA e col., 1979, CHEVALIER e col., 1981) como as sensações subjetivas de medo (COIMBRA e col., 1989).

Alguns estudos demonstraram que os axônios da substância negra, parte reticulada, fazem sinapses com os neurônios do colículo superior, que comandam o movimento dos olhos (PURVES e col., 2001) e também com as camadas profundas do colículo superior, que elaboram parte das reações defensivas (EICHENBERGER e col., 2002). Em decorrência de uma vasta conexão aferente e proveniente de neurônios da substância negra, descreveremos essas conexões de maneira mais sucinta.

A área tegmental ventral (ATV), localizada dorso medialmente à substância negra, contém neurônios dopaminérgicos e se projeta para o estriado (MARTIN, 1998; PURVES e cols., 2001).

A SNpc dá origem ao sistema dopaminérgico nigro-estriatal (FAULL & MEHLER, 1978; SWANSON, 1982; MARTIN, 1998) e a degeneração desse sistema é a maior causa das síndromes parkinsonianas. Por sua vez, a SNpr, junto com o globo pálido, constitui a principal fonte de saída dos núcleos basais. As duas principais projeções eferentes da SNpr se dirigem ao núcleo ventro-medial do tálamo (FAULL & MEHLER, 1978; GROFOVÁ e cols., 1982) e ao colículo superior (FAULL & MEHLER, 1978; MAY & HALL, 1986; WILLIAMS & FAULL, 1988; HARTING e cols., 1988; EICHENBERGER e cols., 2002). Os neurotransmissores potencialmente envolvidos são a dopamina e o GABA.

Outras projeções provenientes de neurônios da substância negra, parte reticulada, destinam-se à formação reticular mesencefálica caudal e mais especificamente ao núcleo pedúnculo-pontino (JACKSON & CROSSMAN, 1983; DENIAU & CHEVALIER, 1992).

O Sistema Opioidergico

A investigação de aspectos modulatórios, exercidos por mecanismos opioides, tem sido o foco de atenção de pesquisas com o objetivo de esclarecer a organização das finas redes neurais e a neurotransmissão que modulam o medo no *tectum* (EICHENBERGER e cols., 2002; OSAKI e cols., 2003). É sabido que pequenas doses de morfina microinjetadas na SCPd atenuam, de uma forma dependente da dose, as respostas defensivas obtidas através de estimulação elétrica dessa estrutura (JENCK e cols., 1983; JENCK e cols., 1986; BRANDÃO e cols., 1985; BRANDÃO e cols., 1990). Mecanismos opioides parecem estar envolvidos no controle das reações de defesa, desde que microinjeções de morfina na SCPd atenuam tanto as respostas comportamentais como alterações autonômicas eliciadas por estimulação elétrica do mesencéfalo dorsal (JENCK e cols., 1983, 1988). Microinjeções de antagonistas de receptores opioides na SCPv possuem a propriedade de atenuar o medo eliciado por estímulos nocivos externos (FANZELLOW & BOLLES, 1979). Embora essas estruturas mesencefálicas, como a SCPd, cpCS e o colículo inferior, estejam envolvidas com a elaboração do comportamento induzido por estímulos aversivos, ainda não está claro se esse substrato neural pode vir a ser modulado unicamente no *tectum*, ou se também envolve estruturas do tegmento mesencefálico. É possível que os opioides endógenos não estejam apenas envolvidos em respostas antinociceptivas induzidas por estimulação da SCPv, mas também regulem as reações comportamentais eliciadas por estimulação da SCPd, cpCS e colículo inferior, estruturas envolvidas com a organização e elaboração de comportamento explosivo de fuga (COIMBRA e cols., 2000; EICHENBERGER e cols., 2002; OSAKI e cols., 2003).

Os efeitos dos antagonistas opioides dependem do tipo de receptores com que estes interagem (CARDOSO e cols., 1992; MOTTA & BRANDÃO, 1993). Tem sido mostrado que agonistas μ e κ evocam estados emocionais como aqueles decorrentes de estímulos de natureza aversiva e, como a morfina tem maior afinidade por receptores μ do que por κ (JENCK e cols., 1983; WALKER e cols., 1991), é possível que tais

receptores possam mediar diferentemente efeitos paradoxais de doses baixas e altas desse fármaco opiáceo, quando administrado no colículo inferior de roedores (CARDOSO e cols., 1992). As respostas de medo e pânico podem ser moduladas por bloqueadores do receptor GABAérgico do tipo A, e por antagonistas de receptores opioides em sítios mais craniais do *tectum*, como a SCPd e as cpCS (EICHENBERGER e cols., 2002; RIBEIRO e col., 2005), como também em sítios mais caudais do mesencéfalo dorsal, como o colículo inferior (COIMBRA e col., 2000; CALVO & COIMBRA, 2006). Portanto, interação entre o sistema opioide e GABAérgico no controle do comportamento de defesa parece envolver todo o mesencéfalo dorsal, mas recrutando também neurônios do mesencéfalo ventral, como aqueles situados na substância negra, parte reticulada, como foi recentemente demonstrado (RIBEIRO e col., 2005).

Além dos sistemas neurais mais conhecidos, como discutidos anteriormente, outros neurotransmissores parecem também estar envolvidos na mediação das respostas defensivas moduladas, ou geradas, no colículo inferior. Existe uma ampla gama de relatos na literatura que sugerem um papel modulatório exercido pelos opioides no SEA. Alguns trabalhos têm revelado que o colículo inferior possui alta concentração de receptores μ e moderada concentração de receptores do subtipo κ (MANSOUR e cols., 1994). Dessa maneira, o fato da morfina ter maior afinidade por receptores μ do que por receptores κ (MARTIN, 1983), seu efeito pode depender do tipo de receptores com os quais a droga interage em função da dose. Assim, tem sido sugerido que agonistas de receptores μ atuam como reforçadores positivos, enquanto os receptores κ , quando ativados, podem eliciar estados aversivos (MUCHA e HERZ, 1985; BECHARA e cols., 1985; BALS-KUBIK e cols., 1989).

Não obstante, nosso grupo tem mostrado consistentemente o envolvimento tanto de receptores μ como κ nos efeitos pró-aversivos de neuropeptídeos opioides endógenos, pois o antagonismo de tais receptores, seja por via periférica, seja por via central, eleva significativamente os limiares do comportamento de defesa que tem sido relacionado a sensações de medo intenso (COIMBRA e col., 1996, 2000; EICHENBERGER e col., 2002; OSAKI e col., 2003; RIBEIRO e col., 2005; CALVO & COIMBRA, 2006; CASTELLAN-BALDAN e col., 2006).

Receptores opioides foram identificados em terminais de pequeno diâmetro na medula espinal e sobre o corpo de neurônios localizados no gânglio da raiz dorsal do nervo espinal (STEIN e col., 1990). Sob uma vasta gama de condições experimentais e

clínicas, uma série de opioides e seus antagonistas evidenciam efeitos analgésicos periféricos (RUSSEL e col., 1987; STEIN e col., 1991; CZLONKOWSKI e col., 1993).

São propostas três classes de receptores opioides definidas como: μ , κ e δ . Os receptores μ têm sido classificados em dois distintos subtipos μ_1 e μ_2 , os receptores δ em δ_1 e δ_2 . Os receptores κ estão divididos nos subtipos κ_1 , κ_2 ou κ_3 . Todos esses subtipos modulam a percepção da dor, com exceção do receptor κ_2 , que não tem sido adequadamente estudado. Sistemas supraespinais têm sido descritos envolvendo os receptores μ_1 , enquanto μ_2 , κ_1 e δ_1 modulam a dor na região espinal. Além de possuírem capacidade de agir independentemente, os vários sistemas também interagem sinergicamente entre si. Assim, o alívio da dor envolve a complexa interação de pelo menos seis sistemas de receptores (PASTERNAK, 1993).

Receptores opioides estão distribuídos diferentemente na medula espinal. Os receptores μ localizam-se de forma altamente concentrada em camadas superficiais do corno dorsal em toda a medula espinal, os receptores δ estão mais difusamente distribuídos na substância cinzenta, principalmente localizada nas porções cervical e torácica, enquanto os receptores κ estão presentes em elevadas quantidades nas camadas superficiais da porção lombo-sacral e essas densidades diminuem nos níveis mais altos da medula espinal. Processo semelhante é observado com relação à localização dos peptídeos opioides derivados da pró-encefalina e pró-dinorfina. Enquanto pró-encefalinas encontram-se preferencialmente localizados na porção sacral da medula pró-dinorfinas estão concentrados na medula espinal cervical (QUIRION, 1984).

Os receptores opioides μ parecem ser indiferentemente ativados por estímulos nocivos térmicos, por pressão e por estímulo visceral. Os receptores δ provavelmente estão mais envolvidos com estímulos nociceptivos térmicos, enquanto sítios de ligação de opioides κ estão associados a estímulos nociceptivos de dor visceral (QUIRION, 1984).

Há evidência do envolvimento de receptores μ e δ na antinocicepção opioide induzida pelo estresse (FANSELOW e col., 1989 b) e os receptores δ estão envolvidos na antinocicepção induzida pelo medo (FANSELOW e col., 1989 a).

O fato de que a microinjeção de opioides (MURFIN e col., 1976) ou a estimulação elétrica da SCP (BASBAUM e col., 1977) gera antinocicepção (por meio de vias que compõem o funículo dorsolateral) e hiperpolariza alguns neurônios localizados no corno dorsal da medula espinal (LIEBESKIND e col., 1973) está em consonância com o ponto de vista de alguns autores, segundo os quais antinocicepção

opioide e aquelas induzidas por estimulação elétrica da SCP possuem um substrato neural comum (MAYER & LIEBESKIND, 1974; MAYER & HAYES, 1975; MAYER & PRICE, 1976). O substrato anatômico dessas duas formas de antinocicepção pode, entretanto, não ser completamente similar. Em alguns estudos, encontrou-se que há sítios na SCP que são mais propensos à antinocicepção induzida por estimulação elétrica do que a eliciada por ativação de mecanismos estritamente opioides, pois esses efeitos podem ser antagonizados pela depleção de monoaminas (TENEN, 1968).

O Sistema Endocanabinoide

Cannabis sativa é uma planta arbustiva anual grosseira, com folhas palmadas e aglomerados de pequenas flores verdes que crescem espontaneamente em regiões de clima temperado ou tropical e pode atingir uma altura de 3 metros. A *Cannabis* foi efetivamente utilizada ao longo da história para uma variedade de fins, incluindo a produção de fibras para fabricação de papel e têxtil. No entanto, sua popularidade atual reside no seu uso como droga recreativa com propriedades psicoativas. Extratos de flores secas, flores ou folhas são conhecidas como “Cannabis” ou maconha (termo norte-americano, provavelmente proveniente da gíria mexicana). O haxixe é fabricado a partir de uma resina secretada pelas flores das plantas femininas. O Consumo de derivados de *Cannabis* (por meio do ato de fumar, comer ou beber) produz euforia, relaxamento, uma sensação geral de bem-estar e distorção de tempo. O consumo exagerado pode precipitar alucinações, depressão, ansiedade e psicose (MANZANARES e col., 2006).

A *Cannabis sativa* tem sido utilizada há séculos em todo o mundo para o tratamento de doenças. Seus derivados foram nomeados como “*panacéia*”, ou “cura-tudo”, e eram vendidos como remédios legalizados, principalmente para o alívio da dor (FARQUHAR e col., 2000).

Em 1964, Mechoulam e colaboradores (*apud* GAONI e col., 1964) descobriram que o delta-9-tetra-hidrocanabinol ($\Delta^9\text{-THC}$) era o principal componente psicoativo da *Cannabis sativa*. O $\Delta^9\text{-THC}$ provoca uma variedade de efeitos em diferentes espécies animais, tais como antinocicepção, hipoatividade, catalepsia, hipotermia e alterações cardiovasculares (COMPTON e cols., 1992, MARTIN e cols., 1991). Na década de 1980, Howlett e colaboradores (*apud* DEVANE e col., 1988) identificaram e caracterizaram um receptor no cérebro de ratos que preenchia os critérios para uma alta

afinidade, estereosseletiva, distinto do receptor canabinoide farmacologicamente, através de agonistas marcados com substâncias radioativas para ensaios de acoplamento receptores ligados à atividade da proteína G.

Além disso, eles encontraram uma correlação entre a potência de compostos canabinoides na produção de analgesia *in vivo* e a inibição da adenilciclase *in vitro*, indicando a presença de uma proteína G ligada a um receptor canabinoide que medeia efeito analgésico no cérebro (HOWLETT e col., 1988). Alguns anos depois, em 1990, o receptor CB₁ foi clonado a partir de tecido cerebral (MATSUDA e col., 1990), seguido por clonagem de receptores de canabinoides expresso no sistema nervoso central (MUNRO e col., 1993).

A expressão do receptor CB₁ foi detectada no sistema nervoso, especificamente na substância negra, no *globus palidus*, no cerebelo, no hipocampo e no córtex cerebral e gânglio da raiz dorsal dos nervos espinais (MATSUDA e col., 1990). Por outro lado, a expressão do receptor CB₂ ocorre predominantemente, mas não exclusivamente, em células do sistema imune como os macrófagos, monócitos e linfócitos B (MUNRO e col., 1993, LYNN e col., 1994), sendo encontrado no cordão espinal (BELTRANO e col., 2006), no córtex e no cerebelo (VAN SICKLE e col., 2005).

Pertencentes à superfamília dos receptores com sete domínios transmembrana, os receptores canabinoides (HOWLETT e col., 2002) são acoplados à proteína G, regulando negativamente a AC, reduzindo a atividade da proteína cinase A (PKA) e os efeitos biológicos mediados por ela e, possivelmente também da proteína cinase ativadora de mitógeno (MAPK) (PERTWEE, 1997). Além disso, modulam a atividade de canais de potássio e os canais de Ca²⁺ (PERTWEE, 1997 e 1998). Com relação aos canais de Ca²⁺, HILLARD e col. (1990) demonstraram que a inibição de canais de Ca²⁺ do tipo N ou P/Q mediada por CB₁, atenua a despolarização induzida pela ativação da enzima de síntese do óxido nítrico (NOS) neuronal por reduzir o influxo de Ca²⁺, o que pode sugerir que estes receptores realmente possuem papel na regulação neuronal.

Consequentemente, alguns ligantes endógenos dos receptores de canabinoides têm sido atualmente bastante investigados, bem como a sua síntese, transporte e degradação (FREUND e col., 2003, e PORTER e col., 2001; BUCKLEY e col., 2001, CRAVATT e col., 2001 e LEDENT e col., 1999).

A descoberta dos receptores canabinoides levou à busca por ligantes endógenos para estes receptores. Existiam duas grandes evidências da existência dos endocannabinoides, a primeira está relacionada com o fato de que as drogas que

mimetizam os efeitos canabinoides exercem seu efeito por se ligarem com alta afinidade a receptores específicos da membrana, os CB₁, os CB₂ ou ambos, (DEVANE e col., 1988, MATSUDA e col., 1990, MUNRO e col., 1993), e a segunda diz a respeito às descobertas de substâncias com atividades similares àquelas exercidas pelos canabinoides em tecido animal, mas com estruturas químicas muito diferentes das estruturas químicas dos compostos encontrados na planta (DEVANE e col., 1992, SUGIRA e col., 1995, MECHOULAM e col., 1995).

Os endocanabinoides ou canabinoides endógenos são uma família de lipídeos bioativos que ativam os receptores canabinoides, modulando a transmissão neural. Eles estão presentes no cérebro e outros tecidos e participam da regulação de várias funções encefálicas, incluindo a percepção da dor, o humor, o apetite e a memória (FRIDE, 2005). O endocanabinoide isolado pela primeira vez (de cérebro suíno) foi caracterizado estruturalmente como (araquidoniletanolamida) (AEA) sendo que o prefixo “*ananda*” é oriundo do sânscrito que significa “felicidade serena” (DEVANE e col., 1992).

A AEA possui efeitos centrais e periféricos (DI MARZO e cols., 2000). A AEA é uma amida derivada de ácido araquidônico e etanolamina. É sintetizada pela hidrólise do precursor do N-araquidonoil fosfatidiletanolamina, que é catalisada pela enzima fosfodilesterase fosfolipase D (CHAPMAN e col., 1999, DI MARZO e col., 1994). Ela é rapidamente removida da fenda sináptica por um sistema de transporte de alta afinidade em astrócitos e neurônios (DI MARZO e col., 1994). Uma vez internalizada, a anandamida é hidrolisada pela enzima hidrolase do terminal amina de ácidos graxos (FAAH), uma enzima intracelular ligada à membrana (DI MARZO e col., 1994). No hipocampo, cerebelo e neocórtex, a FAAH é expressa em níveis elevados nas regiões dos neurônios pós-sinápticos (DI MARZO e col., 1994). Assim, receptores CB₁ e a enzima FAAH têm uma distribuição anatômica e complementar.

Diferentes modelos de experimentação animal validados são utilizados para explorar o efeito analgésico dos compostos canabinoides. No entanto, uma vez que a maioria das respostas é quantificada por meio de testes comportamentais, é importante lembrar que os endocanabinoides podem inibir ou aumentar a atividade motora (SANUDO e col., 2000), dependendo da dose e da estrutura do composto administrado, o que pode influenciar as reações comportamentais e mascarar os resultados de testes analgésicos.

Após a estimulação térmica nociva, agonistas de receptores canabinoides diminuem a estimulação dos neurônios do corno dorsal, enquanto antagonistas

específicos CB₁ como SR141716A facilitam as respostas nociceptivas (CHAPMAN, 1999, HOHMANN e col., 1998). O papel do sistema endocanabinoide no controle da dor pode ser comprovado pelo fato de que o bloqueio dos receptores de canabinoides, seja por antagonistas, anticorpos, ou deleção genética, inibe ou atenua a percepção da dor (COMPTON e col., 1996, EDSALL e col., 1996, LENDENT e col., 1999). O efeito antinociceptivo de agonistas do receptor canabinoide pode ser correlacionado a sua capacidade para deslocar radioligantes do receptor canabinoide CB₁ e de inibir a adenilato ciclase, sendo que a antinocicepção mediada por canabinoides podem ser atenuada por substâncias que interferem com a transdução de sinais de receptores CB₁ ligados à proteína G (RAFFA e col., 1999).

Os receptores canabinoides, tanto CB₁ e CB₂, parecem modular a dor crônica. De forma que umas das respostas do organismo em processos de dor crônica é o aumento do número destes receptores, sugerindo desta forma, que sua função em tais situações pode ser importante (MANZANARES e cols., 2006). Por exemplo, em modelo de dor neuropática, estimula a regulação da expressão de receptores CB₁ em nervos e estruturas envolvidas com o processamento da dor, como as divisões mais superficiais do corno dorsal da medula espinal (LIM, e col., 2003) ou a região contralateral do tálamo (SIEGLING e col., 2001). Aumentando o efeito analgésico dos receptores endocanabinoides. Esta regulação central de receptores CB₁ após lesão periférica do nervo indica papel dos efeitos dos receptores agonistas canabinoides nas condições de dor crônica e dor neuropática. Modelo de dor crônica associados com lesão do nervo periférico, porém não com inflamação induz a expressão de receptores CB₂ de forma altamente restrita e específica na medula espinal lombar. De forma que a aparência de expressão de CB₂ coincide com a aparência de ativação na microglia (ZANG e cols., 2003).

O Sistema GABAérgico

O ácido γ -aminobutírico (GABA) é o neurotransmissor mais amplamente distribuído no sistema nervoso central dos vertebrados (BORMANN, 2000). Sintetizado a partir do glutamato pela ação da enzima *ácido glutâmico descarboxilase*, atua em três tipos de receptores, o GABA-A, o GABA-B e o GABA-C. Os receptores GABAérgicos do tipo A são formados a partir de uma proteína transmembrana constituída por cinco subunidades proteicas (duas α 1, duas β 2 e uma γ 2) (CHEBIB & JOHNSTON, 1999,

ZWANZGER & RUPPRECHT, 2004) que contém um poro central, o qual atravessa a membrana celular e é permeável a íons cloro e a outros ânions. Estudos bioquímicos (ADAMS, 1979; CONTRERAS & BACHELARD, 1979) e imunológicos (THOMPSON e cols., 1985) revelaram altos níveis de GABA no mesencéfalo dorsal, além das enzimas responsáveis por sua síntese – a descarboxilase do ácido glutâmico (GAD) – e degradação, mediada pela GABA-transaminase (TACHIBANA & KURIYAMA, 1974; FISHER & DAVIES, 1976; CONTRERAS & BACHELARD, 1979; ADAMS & WENTHOLD, 1979).

Dados obtidos de estudos comportamentais utilizando modelos animais de aversão revelaram, de forma consistente, a relação entre ações antiaversivas dos benzodiazepínicos com mecanismos GABAérgicos localizados no *tectum* (BRANDÃO e cols., 1982; BOVIER e cols., 1982; BRANDÃO e cols., 1985; GRAEFF e cols., 1986; BORGES e cols., 1988; BRANDÃO e cols., 1990; MELO e cols., 1992; BRANDÃO e cols., 1993; BRANDÃO e cols., 1994; BRANDÃO e cols., 1999; PANDÓSSIO & BRANDÃO, 1999; BRANDÃO e cols., 2003). De fato, microinjeções de agonistas GABAérgicos em estruturas relacionadas ao processamento da informação aversiva têm efeito ansiolítico similar ao dos benzodiazepínicos (BRANDÃO e cols., 1982; AUDI & GRAEFF, 1987). Esses efeitos característicos dos benzodiazepínicos, estão vinculados à modulação da atividade GABAérgica diretamente na abertura do canal de Cl^- ligado ao seu receptor GABA_A pós-sináptico (OLSEN, 1982; HAEFELY, 1985). A administração de antagonistas GABAérgicos nessas mesmas estruturas mesencefálicas elicia o comportamento de fuga acompanhado de respostas autonômicas características da reação de defesa (MILLAN e cols., 1986).

A pesquisa da efetiva participação do sistema GABAérgico do colículo superior (COIMBRA e BRANDÃO, 1993) na mediação de respostas de defesa evocadas pela administração do antagonista de receptores GABA_A , a bicuculina, nessa estrutura revelaram uma clara ativação comportamental, acompanhada de saltos, intercalada por curtos períodos de imobilidade defensiva (“congelamento”), além de alterações autonômicas, como aumentos na pressão arterial e na frequência cardíaca. Essas são respostas similares àsquelas observadas após estimulação da SCPd, ou do hipotálamo medial, estruturas já sabidamente envolvidas nas reações de defesa e que compõem o chamado sistema encefálico da aversão (SEA) (GRAEFF, 1990).

O estudo neuromorfológico de vias GABAérgicas, que se projetam ao *tectum*, e a investigação de seu papel na modulação do comportamento de defesa, assim como de

seus alvos sinápticos a nível mesencefálico têm sido foco das mais recentes pesquisas em nosso laboratório (EICHENBERGER e cols., 2002; OSAKI e cols., 2003). Os corpos celulares desses neurônios provavelmente não estão localizados em estruturas telencefálicas, já que ratos privados dessas estruturas ainda apresentam atividade comportamental acompanhada de saltos depois da microinjeção de antagonista GABAérgico na substância cinzenta periaquedutal dorsal ou hipotálamo medial (TOMAZ e cols., 1988).

Encontra-se estabelecido que neurônios GABAérgicos estriado-nigrais (GROFOVÁ, 1978), exercem uma forte influência inibitória na SNpr (CASTELLAN-BALDAN e col., 2006). Essa inibição age particularmente em neurônios nigrocoliculares que também são inibitórios (COIMBRA & BRANDÃO, 1993; RIBEIRO e col., 2005; CASTELLAN-BALDAN e col., 2006). A SNpr é conhecida por enviar projeções às camadas intermediárias do colículo superior (CICS), que pode funcionar como um canal sensorial aos neurônios do *tectum* responsáveis pela organização de reações de defesa em regiões mais ventrais desse substrato neural (REDGRAVE e cols., 1992; EICHENBERGER e col., 2002).

Diante da necessidade de um melhor entendimento dos aspectos neuroquímicos da organização do comportamento de defesa, a estimulação elétrica e o bloqueio GABAérgico, através da administração central de bicuculina no *tectum*, tornaram-se métodos amplamente utilizados na elucidação de respostas comportamentais de defesa, caracterizadas por corridas, saltos e rotações, a que se denomina comportamento explosivo de fuga (COIMBRA & BRANDÃO, 1993; EICHENBERGER e cols., 2002; COIMBRA e col., 2006). Além disso, sabe-se que aumentos graduais de intensidade na estimulação elétrica nessa estrutura mesencefálica, à semelhança do que ocorre com a substância cinzenta periaquedutal dorso-lateral (SCPdl) e com as cpCS, evocam o comportamento de defesa onde a fuga é precedida por um comportamento caracterizado por alerta e congelamento, seguido de reações autonômicas (MANCIA & ZANCHETTI, 1981; HILTON, 1982; LEÃO-BORGES e cols., 1988; COIMBRA & BRANDÃO, 1993).

No teste *Open Field*, o aumento da rotação animal sobre o mesmo eixo, comportamento caracteristicamente relacionado às respostas de defesa, após a lesão da SNpr também já foi sugerido por outros estudos (IMPERATO e cols., 1981; COIMBRA e cols., 1989) como sendo resultado da diminuição na transmissão GABAérgica através da via nigro-colicular. Logo, o aumento da manifestação do comportamento de fuga

comumente observado após a lesão da SNpr (COIMBRA & BRANDÃO, 1993; CASTEALLAN-BALDAN e col., 2006) pode dever-se à remoção do controle inibitório exercido pelas fibras GABAérgicas no substrato neural do comportamento defensivo induzido por estimulação do mesencéfalo dorsal. Por conseguinte, vias GABAérgicas de projeção nigro-tectal possuem um papel-chave no controle de respostas comumente relacionadas ao medo inato e ao pânico.

Interação entre os Sistemas Opioides e Endocanabinoides

Recentemente, tem sido postulado que endocanabinoides e peptídeos opioides endógenos, neuromoduladores e neurotransmissores respectivamente, psicoativos independentes, atuam em dois sistemas neurais que interagem entre si (MANZANARES e col., 1999; VIGANÒ e col., 2005). Tais mediadores neurais ativam diferentes receptores celulares (receptores opioides μ , delta e kappa, e receptores endocanabinoides CB₁ e CB₂, que são acoplados a proteínas Gi/Go GTP que inibem a atividade da enzima adenilato-ciclase, bloqueia canais de cálcio dependentes de voltagem, ativam os canais de potássio e estimulam a cascata de cinases MAP (CHILDERS 1991; CHILDERS e col., 1992; HOWLETT e col., 1995).

Tanto os receptores endocanabinoides quanto os receptores opioides localizam-se na membrana pré-sináptica, onde sua ativação causa inibição da liberação de diferentes neurotransmissores (MANSOUR e col., 1995; SCHLICKE & KATHMANN, 2001). Estudos morfológicos demonstraram haver uma distribuição similar de receptores endocanabinoides CB₁ e opioides do tipo μ no corno dorsal da medula espinal (WELCH & STEVENS, 1992; HOHMANN e col., 1999; SALIO e col., 2001). Regiões encefálicas, como o neostriado, o hipocampo dorsal, e a substância negra são ricos tanto em receptores canabinoides como opioides (MANSOUR e col., 1988; HERKENHAM e col., 1991; MAILEUX & VANDERHAEGHEN, 1992; RODRIGUEZ e col., 2001), sendo possível, ainda, a colocalização de tais receptores.

Estruturas do diencéfalo, como o tálamo medial e o hipotálamo medial, e do tronco encefálico, como a PAG, e os núcleos da Rafe, também possuem receptores endocanabinoides e opioides, e exercem um importante papel na mediação de processos defensivos (EICHENBERGER e col., 2002; OSAKI e col., 2003; RESSTEL e col., 2007), ansiolíticos (MOREIRA e col., 2007) e antinociceptivos (LICHTMAN e col., 1996; HOHMANN e col., 2005; COIMBRA e col., 2006; SUPLITA II e col., 2006).

Canabinoides endógenos e os opioides endógenos compartilham de vários efeitos farmacológicos semelhantes. Estes sistemas, ainda, parecem potencializar um ao outro, indicando uma interação sinérgica entre eles. Ainda, estudos comportamentais e moleculares têm sugerido que o efeito analgésico dos canabinoides é, pelo menos em parte, mediado por opioides endógenos, indicando uma íntima relação entre eles na modulação da percepção da dor (CICHEWICZ, 2003). Além, do papel dessa interação entre o sistema opioide endógeno e endocanabinoide na antinocicepção (FLOR e DEWEY, 1978; BHARGAVA e MATWYSHYN, 1980; FUENTES, 1999), os canabinoides endógenos interagem com o sistema opioide em uma variedade de funções biológicas, incluindo hipotermia (BHARGAVA, 1980), mobilidade intestinal (DEWEY, 1986; FREDERICKSON e cols., 1976; BASILICO e cols., 1999; KULKARNI-NARLA e BROWN, IZZO e cols., 1999, 2000) e atividade imune (MASSI e cols., 2001, 2003), assim como a modulação da ansiedade (BERRENDERO e MALDONADO, 2002; KIEFFER, 2002), exercendo ainda influência na locomoção (AYHAN e col., 1979; ULKU e col., 1980; TULUNAY e col., 1981, 1982; BUTTARELLI e cols., 2002), especificamente no comportamento exploratório (PONCELET e col., 1999), e reações de catalepsia (NARIMATSU e cols., 1987; PONTIERI e col., 2001a, b).

A administração crônica de fármacos opiáceos e canabinoides produz a tolerância a seus efeitos analgésicos e hipotérmicos (PERTWEE, 1988; BHARGAVA, 1991; RUBINO e cols., 1997b) e conduz ao desenvolvimento da dependência física, embora com intensidades diferentes (BHARGAVA, 1991; TSOU e col., 1995; ACETO e col., 1996, 1998, 2001). Os canabinoides são usados historicamente em combinação com opiáceos para o tratamento de diferentes tipos de dor nos seres humanos devido a suas interações sinérgicas na modulação de estímulos nocivos (WELCH, 1993; WELCH E EADS, 1999; CICHEWICZ, 2004). Efetivamente, os canabinoides são considerados como drogas de abuso; estudos mostraram que canabinoides endógenos e exógenos interferiam com o efeito da nicotina (COHEN e col., 2002), álcool (MECHOULAM e PARKER, 2003), cocaína (FATTORE e cols., 1999), ou penicilina (DOTY e cols., 1994).

Como literatura tem demonstrado uma estreita relação entre os sistemas opioides e canabinoides (FATTORE e cols., 2005), sendo que ambos os sistemas atuam em locais comuns, e considerando ainda que seus receptores estão distribuídos conjuntamente em áreas importantes para o controle da dor e também de respostas de defesa inata, é de

nosso interesse investigar o efeito da interação entre vias mediadas por polipeptídeos opioides endógenos e por endocanabinoides no controle das respostas comportamentais que têm sido relacionadas ao medo inato e também no controle da antinocipção que segue o comportamento defensivo.

Interação entre os Sistemas Opioidérgico e GABAérgico

O comportamento defensivo tem sido evocado em decorrência de microinjeções de agentes antagonistas de receptores GABA_A ou de inibidores da enzima GAD em sítios mesencefálicos, cuja estimulação induz reações de fuga (BRANDÃO e cols., 1982, 1986, 1988). Vigorosas reações defensivas também podem ser evocadas por administrações de drogas opiáceas ou por ativação de receptores NMDA no colículo inferior (CARDOSO e cols., 1992; 1994; BRANDÃO e cols., 2001).

Partindo desse pressuposto, o estudo de vias GABAérgicas e de projeções peptidérgicas opioides deve ser incluído na busca do substrato neural do medo, do pânico e da ansiedade, ressaltando-se mecanismos neuroquímicos que integram as reações de defesa. Contudo, há na literatura dados conflitantes acerca dos efeitos pró ou antiaversivos de drogas opioides no sistema nervoso central sejam administradas por via intraperitoneal ou intramesencefálica, pois agonistas ou antagonistas opioides têm causado, em diferentes modelos animais, tanto efeitos pró-aversivos (JENK e cols., 1986;) como antiaversivos (COIMBRA e cols., 1996; 2000; CALVO & COIMBRA, 2006). A própria morfina, ao ser microinjetada no *tectum*, seja em nível cranial (LEÃO-BORGES e cols., 1988; BRANDÃO e cols., 1990), seja em nível caudal (CARDOSO e cols., 1992), dependendo da dose, pode evocar comportamentos de defesa ou atenuá-los.

Recentemente, tem sido constantemente demonstrado que a administração intramesencefálica de antagonistas opioides clássicos causa efeitos antiaversivos (COIMBRA e cols., 1996, 2000; OSAKI e cols., 2003). Considerando que os opioides endógenos possuem a propriedade de causarem potenciais pós-sinápticos inibitórios, para ser explicada a ação antiaversiva dos antagonistas opioides, tem sido sugerida uma interação entre vias opioides e GABAérgicas no mesencéfalo dorsal; aquelas promovendo inibição pré-sináptica sobre estas (COIMBRA e cols., 1996, 2000; EICHENBERGER e cols., 2002). Supõe-se que os terminais GABAérgicos modulados

por interneurônios opioides tenham sua origem em vias de projeção nigro-colicular (COIMBRA e cols., 1993; CASTELLAN-BALDAN e col., 2006).

Recentes evidências imuno-histoquímicas, neuroanatômicas e psicofarmacológicas deram um novo impulso a essa teoria (EICHENBERGER e cols., 2002; RIBEIRO e cols., 2005; CASTELLAN-BALDAN e cols., 2006), pois demonstraram tanto morfológicamente como farmacológica e comportamentalmente que essa hipótese é factível considerando os aspectos mais craniais do *tectum*.

Interação entre os Sistemas Endocanabinoide e GABAérgico

A localização pré-sináptica de receptores CB₁ indica que os endocanabinoides modulam a liberação de neurotransmissores dos terminais do axônio (MANZANARES e cols., 2006). Os efeitos de endocanabinoides sobre a função sináptica consistem na inibição da liberação de uma variedade de neurotransmissores e também a inibição da atividade elétrica por um fenômeno (KATONA e col., 2000, SCHLICKER e col., 2001). Os neurotransmissores, cuja liberação é inibida por ativação de receptores de canabinoides incluem o L-glutamato, o GABA, a noradrenalina, a dopamina, a serotonina e a acetilcolina (KATONA e col., 2000).

Os endocanabinoides estão envolvidos na modulação da transmissão sináptica rápida no sistema nervoso central por um caminho retrógrado de sinalização que pode influenciar as sinapses em uma região local, com efeito inibitório sobre a liberação do neurotransmissor tanto excitatório como inibitório que persiste por dezenas de segundos (MANZANARES, e cols., 2006). Isso pode ser importante no controle dos circuitos neurais, tais como sinalização nociceptiva.

A ativação dos receptores endocanabinoides inibe a transmissão sináptica GABAérgica em um número de regiões do sistema nervoso central, incluindo as áreas que participam na sinalização nociceptiva como a amígdala (MANNING e col., 2003), a matéria cinzenta periaquedutal (VAUGHAN e col., 2000), o bulbo ventromedial rostral (RVM) (VAUGHAN e col., 1999) e as camadas superficiais do corno dorsal da medula espinal (JENNINGS e col., 2001).

Sistema Opioide e Endocanabinoide na Modulação da Dor

A combinação de duas drogas antinociceptivas atuando através de receptores específicos traz benefícios importantes. Quando administrado em combinação com substâncias sinérgicas, a dose necessária de cada agente pode ser reduzida. O benefício clínico das associações farmacológicas é importante no tratamento analgésico porque um alívio efetivo da dor pode ser conseguido com pouco ou nenhum efeito colateral. O estudo de novas associações entre fármacos no tratamento da dor, contudo, necessita abordar mais profundamente suas bases neurais e farmacológicas dos sistemas neurais envolvidas.

O sistema opioides é um dos sistemas neurais que interagem com as vias mediadas por endocanabinoides que tem sido mais explorado (CORCHERO e cols., 2004, FUENTES e col., 1999, MANZANARES e cols., 1999). Estudos revelaram que os endocanabinoides têm efeitos semelhantes aos provocados pela morfina (MENG e cols. 1998). Endocanabinoides e receptores opioides existem em vários níveis dos circuitos da dor e estes dois sistemas neurais podem operar em sinergia. THC e morfina também atuam sinergicamente, potencializando mutuamente suas ações antinociceptivas.

Curiosamente, essa ação é inibida por antagonistas dos receptores opioides e canabinoides em separado, conforme demonstrado em modelos de dor aguda (FUENTES e cols., 1999) e em modelos de dor crônica (SMITH e cols., 1998, WELCH e cols., 1992). No entanto, apesar de canabinoides e opioides produzirem analgesia no corno dorsal, seus mecanismos de ação farmacológica são diferentes. Por exemplo, os agonistas do receptor opioide μ inibem a liberação de glutamato de terminais aferentes primários em nível de corno dorsal da medula espinal, enquanto que receptores CB₁ não têm nenhum efeito inibitório sobre neurônios excitatórios (GRUDT e cols., 1994, KOHNO e cols., 1999).

Por outro lado, agonistas do receptor canabinoide induzem a síntese e / ou liberação de peptídeos opioides endógenos (CORCHERO e cols., 1997, MANZANARES e cols., 1999). O tratamento com Δ^9 -THC produz um aumento na expressão gênica de opioides na medula espinal, sustentando a hipótese de haver uma interação entre os sistemas canabinoide e opioide nesta região (CORCHERO e cols. 1997). Embora a antinocicepção causada pela morfina seja mediada predominantemente

por receptores μ -opioides, pode ser reforçada por Δ^9 -THC através da ativação de receptores opioides do tipo kappa e delta.

Os receptores CB₂, quando ativados, estimulam a liberação de β -endorfina, que então age em receptores μ -opioides para inibir a nocicepção (IBRAHIM e cols., 2005).

Dessa forma, o propósito do presente trabalho é investigar o papel da interação entre vias mediadas por opioides endógenos e por endocanabinoides da divisão reticulada da substância negra, rica em ambos os sistemas neurônicos presentemente abordados, na elaboração das respostas de defesa organizadas no mesencéfalo dorsal.

É possível que a organização do comportamento defesa no teto mesencefálico possa ser influenciada pela interação entre aferências endocanabinoides e opioides a neurônios GABAérgicos da divisão reticulada da substância negra que se projetam ao mesencéfalo dorsal.

OBJETIVO

Objetivo Geral

Estudar o efeito da interação entre circuitos canabinoides e opioides da SNpr, na elaboração do comportamento de defesa e dos processos antinociceptivos que seguem as diversas respostas comportamentais evocadas pela microinjeção de antagonista de receptores GABA_A no mesencéfalo dorsal.

Objetivos Específicos

- ✓ Estudar o efeito de morfina, agonista não-seletivo de receptores opioides, naloxonazine, antagonista seletivo de receptores opioides do tipo μ -1, ou nor-binaltorfimina, antagonista seletivo de receptores opioides do tipo κ , na SNpr, sobre as diversas respostas comportamentais, evocadas pela microinjeção de bicuculina (um antagonista de receptores GABAérgicos do tipo A) no *continuum* compreendido pelas cpCS e SCPdl;
- ✓ Estudar o efeito da microinjeção de salina fisiológica (ou DMSO), canabidiol, um canabinoide natural, anandamida, agonista não-seletivo de receptores canabinoides CB₁/CB₂, AM-251, antagonista seletivo de receptores canabinoides CB₁/agonista inverso, ou AM-630, antagonista seletivo de receptores CB₂/agonista inverso na SNpr, sobre as diversas respostas comportamentais evocadas pela microinjeção de bicuculina no *continuum* compreendido pelas cpCS e SCPdl;
- ✓ Estudar o efeito da microinjeção de morfina seguida de canabidiol; morfina seguida de anandamida; morfina seguida de AM-251; morfina seguida de AM-630; naloxonazine seguido de canabidiol, naloxonazine seguido de anandamida; naloxonazine seguido de AM-251; naloxonazine seguido de AM-630; nor-binaltorfimina seguida de canabidiol; nor-binaltorfimina seguida de anandamida; nor-binaltorfimina seguida de AM-251; nor-binaltorfimina seguida de AM-630 na SNpr, sobre as diversas respostas comportamentais, evocadas pela microinjeção de bicuculina no *continuum* compreendido pelas cpCS e SCPdl;

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados, no presente trabalho, ratos albinos (*Rattus norvegicus*, *Rodentia*, *Muridae*), de linhagem “Wistar”, pesando entre 220-250 g. Esses animais foram alojados em caixas com dois exemplares, e ficaram acondicionados sob ciclo claro/escuro de 12/12h (luzes ligadas às 7h), e com temperatura entre 22-23°C, sendo-lhes permitido livre acesso à comida e água, durante todo o experimento, a não ser durante os registros comportamentais. Os experimentos foram realizados segundo os princípios éticos elaborados segundo as normas que regulamentam aspectos éticos da utilização de animais de laboratório, elaboradas pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da FMRP-USP (processo 204/2008), que estão em conformidade com os princípios éticos da Sociedade Brasileira de Neurociência e Comportamento (SBNeC).

Equipamentos

As cirurgias estereotáxicas foram realizadas por meio de um estereotáxico ultrapreciso, desenvolvido para pequenos animais (David Kopf, 902, EUA).

As microinjeções dos fármacos foram realizadas através de uma bomba de microinjeção de drogas (Stoelting).

A estimulação intramesencefálica foi realizada em uma arena circular (teste do “open field”), de acrílico transparente, medindo 60 cm de altura x 50 cm de largura, cujo assoalho era dividido em doze seções iguais.

Os comportamentos de defesa foram filmados de minuto a minuto por 20 min por uma filmadora (Sonny) e foram analisados pelo sistema de TV 29’/DVD.

Os testes nociceptivos de latência retirada de cauda foram feitos através do aparelho “Tail-Flick Instrument; Stoelting”.

Os animais foram perfundidos, utilizando-se para isso, uma bomba de perfusão (“Master Flex®” L/S TM).

A análise histológica foi feita através de um micrótomo de congelamento (HM 505 E, Zeiss, Alemanha), e os resultados foram avaliados através de um fotomicroscópio (AxioImager Z1; Zeiss).

Cirurgia

Este estudo foi realizado, utilizando grupos independentes de animais, que foram anestesiados com uma solução na proporção de 0,1ml de cetamina a 10% (Agener, na dose de 25mg/kg, i.p.) para 0,2ml de xilasina a 4% (Dopaser, na dose de 10mg/kg, i.p.), e levados a um aparelho estereotático (David Kopf, EUA), onde suas cabeças foram fixadas pelo rochedo temporal e incisivos superiores. Antes da exposição da calota craniana, a pele e o tecido subcutâneo foram anestesiados com solução de lidocaína a 2% (0,1ml, s.c.), em seguida iniciou-se o procedimento estereotático para a implantação de uma cânula-guia no TM direcionada às cpCS e de uma cânula-guia na SNpr, segundo coordenadas: ântero-posterior: -6,36mm para cpCS e SNpr; médio-lateral: 1,2 mm para cpCS, e 2,2 mm para SNpr e dorso-ventral: 3,6 mm para cpCS, e 6,3 mm para SNpr, tomando-se o bregma como referência, e estando as suturas lambdoide e bregmática em um mesmo plano horizontal. Depois de implantadas, as cânulas-guia foram fixadas na calvária por uma prótese de acrílico autopolimerizável que, por sua vez, foi ancorada por dois parafusos de forniture de aço inoxidável. Após a cirurgia, 60.000 U.I. de penicilina G benzatina foram aplicadas, por via intramuscular, em cada animal.

Drogas

As drogas utilizadas no presente estudo foram morfina (Sigma), canabidiol (Tocris), naloxonazina (Sigma), nor-binaltorfimina (Sigma), anandamida (Tocris), AM-251 (Tocris), AM-630 (Tocris) e metiliodeto de bicuculina (Sigma). Os agonistas e antagonistas opioides e endocanabinoides foram microinjetados na concentração de 5µg/0,2µL na SNpr, e o antagonista GABAérgico foi microinjetado na concentração de 40ng/0,2µL no teto mesencefálico. Soluções de NaCl a 0,9% ou de DMSO (Tocris) foram utilizadas como controle. A “estimulação química”, que foi feita por meio de microinjeção intra-tectal (nas SCPdl/cpCS) de bicuculina (40ng/0,2µL), após o pré-tratamento com um dos bloqueadores farmacológicos ou de seu veículo, e foi realizada 5 minutos após a administração do agonista opioide ou canabinoide não-seletivos, 24h após o pré-tratamento da SNpr com naloxonazina e 2h após o pré-tratamento da SNpr com nor-binaltorfimina, de acordo com a literatura concernente (HAHN & PASTERNAK, 1982; LING e cols., 1986; OSAKI e cols., 2003; FREITAS e cols., 2005).

Procedimento Experimental

Este estudo foi realizado, em grupos independentes de animais ($N=8$), que foram anestesiados e submetidos à cirurgia estereotáxica para a introdução de uma cânula-guia (diâmetro externo 0,6mm; diâmetro interno 0,4mm) cpCS ou na SCPd e na SNpr, segundo coordenadas descritas acima. Após um período pós-operatório de cinco dias, os animais tiveram seus limiares nociceptivos aferidos para a linha de base. Esse procedimento foi realizado após a microinjeção de bicuculina (40ng/0,2μL) nas cpCS, precedida pela: 1) microinjeção de salina fisiológica + salina fisiológica (ou DMSO); 2) morfina + salina fisiológica; 3) naloxonazine + salina fisiológica; nor-binaltorfimina + salina fisiológica; 4) salina fisiológica + canabidiol (canabinoide natural); 5) salina fisiológica + anandamida (agonista canabinoide não seletivo); 6) salina fisiológica + AM-251 (antagonista canabinoide CB1); 7) salina fisiológica + AM-630 (antagonista canabinoide CB2); 8) morfina + canabidiol; 9) morfina + anandamida; 10) morfina + AM-251; 11) morfina + AM-630; 12) naloxonazine + canabidiol; 13) naloxonazine + O-2545; 14) naloxonazine + AM-251; 15) naloxonazine + AM-630; 16) nor-binaltorfimina + canabidiol; + 17) nor-binaltorfimina + anandamida; 18) nor-binaltorfimina + AM-251; 19) nor-binaltorfimina + AM-630 nas redes neurais da SNpr, seguidas pela microinjeção de bicuculina (antagonista de receptor GABA_A) nas cpCS/SCPd em grupos independentes de animais e randomicamente.

Após esse procedimento os animais pré-tratados foram submetidos à análise quantitativa do comportamento de defesa em uma arena de paredes transparentes, com o assoalho dividido em 12 seções iguais. Foram registrados o número e a duração da atenção defensiva (alerta), da imobilidade defensiva (congelamento), além de latência e duração do comportamento de fuga, número de cruzamentos (quatro patas em um dos compartimentos do assoalho da arena), saltos (levantamento concomitante das quatro patas), rotações (giros de 360 graus) e levantamentos (apoio das patas anteriores nas amuradas da arena). Essa análise comportamental foi feita de 1 em 1 min, durante 20 min por meio de filmagem com uma câmera filmadora digital da Sony.

O congelamento foi operacionalmente definido por uma imobilidade com duração de pelo menos 5 segundos durante o período de estimulação química do TM, acompanhando-se, no mínimo, duas das seguintes reações autonômicas: micção, defecação, piloereção ou exoftalmia. A evocação de corrida ou saltos foi considerada como comportamento de fuga explosiva. Animais que não apresentaram comportamento

de fuga explosiva após a microinjeção de bicuculina foram descartados do experimento, considerando que o sítio estimulado poderia estar fora das áreas visadas no presente trabalho.

Teste Nociceptivo

Todos os ratos tiveram seus limiares nociceptivos aferidos, utilizando-se para isso o teste de retirada de cauda. Cada animal foi colocado em uma cela de contenção com paredes de acrílico, e teve sua cauda colocada sobre o sensor de uma fonte de calor (Tail-Flick Instrument; Stoelting) cuja elevação progressiva de calorimetria foi automaticamente interrompida, tão logo o animal retirasse a cauda do dispositivo. Um pequeno ajuste da intensidade e corrente era realizado, se necessário, no início do experimento, com o propósito de se obterem três latências consecutivas de retirada de cauda (LRC), entre 2,5 e 3,5 s. Caso o animal não removesse a cauda da fonte de calor dentro de 6 s, o dispositivo era desligado para prevenir danos teciduais.

A linha de base foi formada pela média de três LRC, tomadas em intervalos de 5 min. O limiar nociceptivo foi igualmente aferido em sequência à estimulação química das cpCS, tão logo a ativação comportamental induzida pelo bloqueio GABAérgico no “*tectum*” chegasse a seu fim (tempo zero) e 10, 20, 30, 40, 50, 60 min após a evocação do comportamento de fuga.

Histologia

Os animais foram anestesiados com uma solução na proporção de 0,1ml de cetamina (Cetamina, frasco de 10ml) para 0,2ml de xilasina (Dopaser, frasco de 10ml) e perfundidos através do ventrículo esquerdo com solução de NaCl a 0,9%, em volume suficiente para retirar todo o sangue do animal, seguida de solução tamponada de paraformaldeído a 4%, em volume suficiente para fixar os tecidos. Os encéfalos foram retirados e mantidos no fixador por no mínimo 4h, e em seguida congelados e cortados com o auxílio de um micrótomo em secções coronais de 40 µm de espessura. Os cortes foram montados em lâminas de vidro, gelatinizados, secos ao ar ambiente e corados com azul de metileno. Posteriormente, os cortes foram analisados com o auxílio de microscopia de luz (AxioImager Z1; Zeiss), e a posição das pontas das agulhas de

microinjeção de drogas no neuroeixo foram assinalados em anagramas do atlas de Paxinos e Watson (2005).

Somente animais com sinais de presença da extremidade final da microagulha dentro das cpCS e na SNpr foram incluídos na análise estatística.

Análise Estatística

Os dados foram submetidos a uma análise de normalidade, definido pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e, em seguida, foram submetidos ao teste de *one-way ANOVA*, seguido, quando apropriado, pelo teste *post hoc* de Tukey. Para a análise dos dados referentes à oscilação do limiar nociceptivo, foi feito o teste ANOVA para medidas repetidas, considerando-se o tratamento como fator independente e a latência de retirada de cauda como fator dependente. No caso de ter havido interação tratamento versus tempo estatisticamente significativa, foi aplicado o teste *post hoc* de Duncan. Diferenças menores do que 5% foram consideradas estatisticamente significativas.

RESULTADOS

Efeito do pré-tratamento da divisão reticulada da substância negra com agonistas e antagonistas de receptores canabinoides sobre as diversas respostas comportamentais induzidas bloqueio dos receptores GABA_A nas cpCS

A microinjeção de bicuculina nas cpCS evocou comportamentos sugestivos de medo inato, tais como atenção defensiva e imobilidade defensiva (“congelamento”), seguido por uma vigorosa reação motora, caracterizada por corridas e saltos, o que foi considerado como comportamento explosivo de fuga (figuras 1,2, 5, 6, 9, 10, 13, 14).

A análise de variância de uma via mostrou efeito estatisticamente significativo do tratamento sobre a frequência [$F(5,42)=15,40$; $P<0,001$] e na duração [$F(5,42)=4,343$; $P<0,01$] do comportamento de atenção defensiva. O teste *post hoc* de Tukey mostrou que o bloqueio de receptores GABA_A no mesencéfalo dorsal aumentou a frequência ($p<0,01$) (figura 1A) e o tempo ($p<0,05$) (figura 1B) do alerta defensivo, quando comparado com o controle. A microinjeção seja de anandamida, seja de canabidiol, na SNpr, seguida do bloqueio de receptores GABA_A no *tectum* também causou um expressivo aumento da frequência de alerta ($p<0,001$; fig.1A), tendo havido uma tendência não estatisticamente significativa de exacerbação do efeito da bicuculina de expressão do alerta defensivo, respostas antagonizadas pelo bloqueio de receptores CB₁ e CB₂ na SNpr ($p<0,001$), como mostrado na figura 1A. O tratamento da SNpr com anandamina ($p<0,01$), mas não com canabidiol também aumentou a duração do alerta causado pela administração de bicuculina nas cpCS (efeito não antagonizado pelo antagonismo de receptores endocanabinoides na SNpr).

A análise de variância de uma via (*one-way ANOVA*) mostrou diferenças estatisticamente significativas do tratamento na frequência [$F(5,41)=8,315$; $P<0,001$] e no tempo [$F(5,935)=8,714$; $P<0,001$] de imobilidade defensiva. O teste *post hoc* de Tukey mostrou um aumento tanto na frequência ($p<0,001$; Fig. 1C) como na duração ($p<0,05$; Fig 1D) de imobilidade defensiva após o bloqueio de receptores GABA_A nas cpCS. O efeito pró-aversivo da bicuculina nas cpCS, no que se refere ao comportamento de imobilidade defensiva manteve-se inalterado após o tratamento da SNpr com agonistas canabinoides, o que também foi seguido por uma aumento tanto na frequência ($p<0,05$, no que se refere à anandamida; $p<0,001$, em relação ao canabidiol) como na duração ($p<0,01$ e $p<0,001$, respectivamente) da imobilidade defensiva (Figura 1C e D). Muito embora nem antagonismo de receptores CB₁ nem de CB₂ na SNpr, não tenha

antagonizado o efeito dos agonistas canabinoides, o tratamento da SNpr com AM251 e AM630 causou uma diminuição estatisticamente significativa ($p < 0,05$) no aumento da frequência de imobilidade defensiva causado pelo bloqueio de receptores GABA_A nas cpCS (Figura 1C). Contudo, tanto o tratamento da SNpr com agonistas ($p < 0,01$) canabinoides, como com antagonistas de receptores CB₁ ($p < 0,01$) e CB₂ ($p < 0,05$) causaram aumento da duração do comportamento de imobilidade defensiva, quando comparado com os respectivos controles, e mostrado na figura 1D.

No que se refere ao comportamento de fuga a ANOVA também mostrou que houve diferenças estatisticamente significativas do tratamento na frequência [$F(5,42)=34,64$; $P < 0,001$] e no tempo [$F(5,42)=18,02$; $P < 0,001$] de fuga. O teste *post hoc* de Tukey mostrou um aumento tanto na frequência ($p < 0,001$) como na duração ($p < 0,01$) do comportamento de fuga, expresso por corridas direcionadas para a frente, após o bloqueio de receptores GABA_A nas cpCS, como mostrado na figura 2A e B. O tratamento da SNpr com anandamida exacerbou o efeito da bicuculina no mesencéfalo dorsal, causando um efeito somatório ao da bicuculina no aumento tanto da frequência ($p < 0,001$) como da duração ($p < 0,001$) da fuga causada pelo bloqueio de receptores GABA_A nas cpCS. O efeito facilitatório do tratamento da SNpr com anandamida sobre a ativação comportamental causada pelo bloqueio de receptores GABA_A no *tectum*, no que se refere à incidência do comportamento de fuga, foi antagonizado pelo bloqueio tanto de receptores CB₁ ($p < 0,001$) como de receptores CB₂ ($p < 0,001$) da SNpr, como mostrado na figura 2A e B. Curiosamente, o tratamento da SNpr com canabidiol causou um efeito contrário ao da anandamida sobre a explosão comportamental desencadeada pelo bloqueio de receptores GABA_A no *tectum*. Com efeito, o canabidiol diminuiu o aumento tanto da frequência ($p < 0,05$), como do tempo ($p < 0,05$) de expressão das respostas de fuga em corridas explosivas causadas pelo tratamento das cpCS com bicuculina, como mostrado na figura 2A e B. O efeito do canabidiol sobre a frequência do comportamento de fuga expresso na forma de corridas foi antagonizado pelo tratamento da SNpr com o antagonista de receptores CB₁ ($p < 0,01$), mas não com o antagonista de receptores CB₂ ($p > 0,05$).

A análise de variância de uma via (ANOVA) mostrou também diferenças estatisticamente significativas do tratamento na frequência [$F(5,42)=24,17$; $P < 0,001$] e na duração [$F(5,42)=24,38$; $P < 0,001$] do comportamento de saltos. O teste *post hoc* de Tukey mostrou um aumento tanto na frequência ($p < 0,001$) como na duração ($p < 0,001$) do comportamento de fuga, expresso saltos não direcionados, após o bloqueio de

receptores GABA_A nas cpCS, como mostrado na figura 2C e D. O tratamento da SNpr com anandamida exacerbou o efeito da bicuculina no mesencéfalo dorsal, causando um efeito somatório ao da bicuculina no que se refere ao aumento da frequência ($p < 0,05$) mas não da duração ($p > 0,05$) de saltos causado pelo bloqueio de receptores GABA_A nas cpCS, muito embora o efeito do tratamento da SNpr com anandamida tenha sido estatisticamente diferente (denotando aumento) do controle, em relação à duração do comportamento de fuga expresso por saltos (Figura 2D). O efeito facilitatório do tratamento da SNpr com anandamida sobre a ativação comportamental causada pelo bloqueio de receptores GABA_A no *tectum*, no que se refere à incidência do comportamento de fuga expressa por saltos, foi antagonizado pelo bloqueio tanto de receptores CB₁ ($p < 0,001$) como de receptores CB₂ ($p < 0,001$) da SNpr, como mostrado na figura 2C e D. O tratamento da SNpr com canabidiol também causou um efeito contrário ao da anandamida sobre a explosão comportamental desencadeada pelo bloqueio de receptores GABA_A no *tectum*, considerando que o canabidiol diminuiu o aumento tanto da frequência ($p < 0,001$), como do tempo ($p < 0,001$) de expressão das respostas de fuga em saltos causadas pelo tratamento das cpCS com bicuculina, como mostrado na figura 2C e D. O efeito do canabidiol sobre a frequência do comportamento de fuga expresso na forma de saltos não foi antagonizado pelo tratamento da SNpr nem com o antagonista de receptores CB₁ ($p > 0,05$), mas não com o antagonista de receptores CB₂ ($p > 0,05$).

Tais respostas explosivas de comportamento de defesa naturalmente refletiram na frequência das respostas de cruzamentos. A análise de variância de uma via (*One way Anova*) mostrou diferenças estatisticamente significativas do tratamento no número de cruzamentos [$F(5,42) = 62,00$; $P < 0,001$]. O teste *post hoc* de Tukey mostrou um aumento estatisticamente significativo na frequência das respostas de cruzamento de animais tratados com bicuculina nas cpCS ($p < 0,001$), e naqueles pré-tratados na SNpr com anandamida ($p < 0,001$) ou com canabidiol ($p < 0,01$) e submetidos ao bloqueio de receptores GABA_A nas cpCS. Contudo, o tratamento da SNpr com canabidiol também causou um efeito contrário ao da anandamida sobre a explosão comportamental desencadeada pelo bloqueio de receptores GABA_A no *tectum*, considerando que o canabidiol diminuiu ($p < 0,001$) o aumento da frequência de cruzamentos causados pelo tratamento do tectum com bicuculina. O bloqueio de receptores CB₁ e CB₂ na SNpr antagonizou o efeito do tratamento dessa mesma estrutura com anandamida ($p < 0,001$),

mas não com canabidiol, sobre as respostas motoras causadas pela microinjeção de bicuculina nas cpCS. Esses dados são mostrados na figura 3A.

No que se refere à resposta de rotação, a análise de variância mostrou, diferenças estatisticamente significativas do tratamento na frequência [$F(5,42)=16,10$; $P<0,001$] e no tempo [$F(5,42)=34,91$; $P<0,001$] de respostas de rotação. Muito embora o teste *post hoc* de Tukey não tenha mostrado diferenças estatisticamente significantes na frequência de rotações ($p>0,05$; Fig. 3B) evocadas pelo bloqueio de receptores GABA_A no tectum, houve um aumento estatisticamente significativo na duração de tais respostas em animais submetidos ao bloqueio de receptores GABA_A nas cpCS, quando comparado ao grupo controle ($p<0,001$; Fig. 3C). O pré-tratamento da SNpr com anandamida reduziu o aumento da duração das respostas de rotações causado pelo tratamento das spCS com bicuculina ($p<0,001$; fig. 3C). Contudo, o pré-tratamento da SNpr com canabidiol, seguido pelo tratamento das cpCS com bicuculina, causou um aumento na frequência das respostas de rotações ($p<0,001$; fig. 3B). O efeito do tratamento da SNpr com anandamida foi reduzido pelo bloqueio tanto de receptores CB₁ como de receptores CB₂ da SNpr ($p<0,001$, em ambos os casos), como mostrado na figura 3C. No entanto, o efeito do tratamento da SNpr com canabidiol foi reduzido pelo bloqueio de receptores CB₁ ($p<0,001$), mas não de receptores CB₂ ($p>0,05$) da SNpr, como mostrado na figura 3B.

A análise estatística de uma via (*One Way Anova*) mostrou efeito estatisticamente significativo do tratamento na frequência [$F(5,42) = 5,033$; $P<0,01$] e também no tempo da expressão do comportamento exploratório (levantamentos) [$F(5,42) = 13,93$; $P<0,001$]. O teste *post hoc* de Tukey mostrou uma diminuição estatisticamente significativa na duração do comportamento de levantamentos em animais submetidos ao bloqueio de receptores GABAérgicos do tipo A nas cpCS ($p<0,01$), quando comparado ao grupo controle (Fig. 3E). O pré-tratamento da SNpr com anandamida, seguido do bloqueio de receptores GABA_A na cpCS causou um aumento estatisticamente significativo tanto da frequência ($p<0,01$), como da duração das respostas de levantamentos ($p<0,05$), quando comparado com o controle (Fig. 3D e E). O efeito do tratamento da SNpr com anandamida, seguido pelo bloqueio de receptores GABAérgicos do tipo A nas cpCS foi reduzido pelo bloqueio tanto de receptores CB₁ como de receptores CB₂ da SNpr ($p<0,01$, em ambos os casos), como mostrado na figura 3D e E.

Fig. 1. Efeito de microinjeções de DMSO, Anandamida, Canabidiol, AM251 e AM630 (5,0 μ g/0,2 μ L) na substância negra, parte reticulada (SNpr), sobre a frequência de alerta (A), duração de alerta (B), frequência de congelamento (C) e tempo de congelamento (D) evocados pelo bloqueio de receptores GABAérgicos nas camadas profundas do colículo superior (CPCS) com microinjeções locais de bicuculina (a 40ng/0,2 μ L). Os dados são apresentados como média e erro padrão da média. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ quando comparado com o grupo DMSO (SNpr) + salina (CS), + $p < 0,05$ quando comparado com o grupo DMSO (SNpr) + bicuculina (CS), # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,01$ quando comparado com o grupo anandamida (SNpr) + bicuculina (CS), + + + $p < 0,001$ quando comparado com o grupo canabidiol (SNpr) + bicuculina (CS), segundo a análise de variância de uma via, seguida pelo teste *post-hoc* de Tukey.

Fig. 2. Efeito de microinjeções de DMSO, Anandamida, Canabidiol, AM251 e AM630 (5,0 µg/0,2µL) na substância negra, parte reticulada (SNpr), sobre a frequência de fuga (A), duração de fuga, frequência de saltos (C) e tempo de saltos (D) evocados pelo bloqueio de receptores GABAérgicos nas camadas profundas do colículo superior (CPCS) com microinjeções locais de bicuculina (a 40ng/0,2µL). Os dados são apresentados como média e erro padrão da média. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ quando comparado com o grupo DMSO (SNpr) + salina (CS), + $p<0,05$, ++ $p<0,01$, +++ $p<0,001$ quando comparado com o grupo DMSO (SNpr) + bicuculina (CS), # $p<0,05$, ## $p<0,01$, ### $p<0,001$ quando comparado com o grupo Anandamida (SNpr) + bicuculina (CS), *+ $p<0,01$, quando comparado com o grupo canabidiol (SNpr) + bicuculina (CS), segundo a análise de variância de uma via, seguida pelo teste *post-hoc* de Tukey.

Fig. 3. Efeito de microinjeções de Salina, DMSO, Anandamida, Canabidiol, AM251 e AM630 (5,0 µg/0,2µL) na substância negra, parte reticulada (SNpr), sobre a frequência de cruzamentos (A), frequência de rotação (A), duração de rotação, frequência de levantamentos (C) e tempo de levantamentos (D) evocados pelo bloqueio de receptores GABAérgicos nas camadas profundas do colículo superior (CPCS) com microinjeções locais de bicuculina (a 40ng/0,2µL). Os dados são apresentados como média e erro padrão da média. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ quando comparado com o grupo DMSO (SNpr) + salina (CS), + $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$, +++ $p < 0,001$ quando comparado com o grupo DMSO (SNpr) + bicuculina (CS), # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ quando comparado com o grupo anandamida (SNpr) + bicuculina (CS), + + + $p < 0,001$ quando comparado com o grupo canabidiol (SNpr) + bicuculina (CS), segundo a análise de variância de uma via, seguida pelo teste *post-hoc* de Tukey.

Estudo do Limiar Nociceptivo

Com o objetivo de investigar o efeito dos diversos pré-tratamentos da SNpr, seguidos do tratamento das spCS com bicuculina sobre a oscilação dos limiares nociceptivos os mesmos animais foram também submetidos ao teste de retirada de cauda.

A análise de variância de medidas repetidas mostrou ter havido um efeito estatisticamente significativo do tratamento [$F_{(5,42)} = 13,47$; $P < 0,001$], do tempo [$F_{(9,34)} = 129,11$; $P < 0,001$] e interação entre tratamento *versus* tempo [$F_{(43,162)} = 6,021$; $P < 0,001$]. A oscilação do limiar nociceptivo após a elaboração do comportamento de defesa perdurou por 50 min [$F_{(5,42)}$ variando de 3,95 a 46,09; $p < 0,05$].

Análises *post-hoc* de Duncan mostraram que o bloqueio de receptores GABA_A no *tectum* induziu comportamento explosivo de fuga, avaliado durante 20min no teste de campo aberto, seguido de uma elevação estatisticamente significativa do limiar nociceptivo que perdurou de 20 a 30 min após o arrefecimento das respostas de fuga, tendo havido elevação estatisticamente significativa da latência de retirada de cauda registrada imediatamente após a interrupção com comportamento de fuga explosiva e nos tempos subsequentes de 10, 20 e 30min no grupo pré-tratado na SNpr com salina e tratado nas cpCS com bicuculina, e também imediatamente após o fim das respostas de fuga explosiva e nos tempos subsequentes de 10, e 20min, nos animais pré-tratados na SNpr com DMSO e tratados nas cpCS com bicuculina. O tratamento da SNpr com anandamida exacerbou o efeito da bicuculina no mesencéfalo dorsal, causando um efeito somatório ao da bicuculina no que se refere à expressão da antinocicepção induzida pelo medo inato, tendo esta perdurado por um tempo maior, de 50min, após a interrupção do comportamento explosivo de fuga, sendo detectada imediatamente após a fuga explosiva e também após 10, 20, 30, 40 e 50 min após a expressão do comportamento de fuga. O efeito facilitatório do tratamento da SNpr com anandamida sobre a antinocicepção induzida pelo medo causado pelo bloqueio de receptores GABA_A no *tectum*, foi reduzido aos 20 min, 30min, 40min, 50min após a fuga pelo bloqueio de receptores CB₁ ($p < 0,05$ em todos os casos) e aos 10min, 20min, 30min, 40min e 50min após a expressão do comportamento explosivo de fuga, pelo bloqueio de receptores CB₂ ($p < 0,001$) da SNpr. O tratamento da SNpr com canabidiol, seguido pelo bloqueio de receptores GABA_A nas cpCS também foi seguido de elevação dos limiares nociceptivos registrados imediatamente após o comportamento de fuga explosiva, e nos

tempos subsequentes de 10min e de 20min ($p<0,05$, em ambos os casos). O efeito do pré-tratamento da SNpr com canabidiol, seguido do tratamento das cpCS com bicuculina sobre os limiares nociceptivos não foi antagonizado pelo bloqueio de receptores CB_1 e ou de receptores CB_2 da SNpr. Esses dados são mostrados na figura 4.

Fig. 4. Efeito da microinjeção central de canabinoides ou salina nas doses de $5\mu\text{g}/0,2\mu\text{L}$ na SNpr, seguida pela administração de bicuculina na concentração de $40\text{ng}/0,2\mu\text{L}$ ou salina no teto mesencefálico nos limiares nociceptivos. $N=8$; * ($P<0,05$) quando comparado com o grupo controle DMSO intra-SNpr / Salina intra CPCS; + ($P<0,05$) quando comparado com o grupo controle DMSO intra-SNpr / Bicuculina intra CPCS; † ($P<0,05$) quando comparado com o grupo Canabidiol intra-SNpr / Bicuculina intra CPCS; ‡ ($P<0,05$) quando comparado com o grupo AM251 intra-SNpr / Bicuculina intra CPCS; ● ($P<0,05$) quando comparado com o grupo AM630 intra-SNpr / Bicuculina intra CPCS; segundo a análise de variância de medidas repetidas, seguida pelo teste *post hoc* de Duncan. LB: Linha de base, medida antes do procedimento experimental. A primeira seta indica a administração de canabinoides ou de seu veículo ambas na SNpr e a terceira seta indica a administração de bicuculina ou salina nas cpCS. Eixo x: tempo (em minutos) em que medidas consecutivas da latência de retirada de cauda foram tomadas. Eixo y: Limiar Nociceptivo (aferido em segundos) medido pelo teste de latência de retirada da cauda. Aumentos nos limiares nociceptivos foram representados como médias $\pm$ EPM.

O efeito da interação entre o sistema opioide e canabinoide na divisão reticulada da substância negra nas respostas defensivas induzidas pelo bloqueio do receptor GABA_A nas camadas profundas do colículo superior: Ação da morfina na SNpr

A microinjeção de morfina na divisão reticulada da substância negra, seguida pelo bloqueio de receptores GABAérgicos do tipo A nas cpCS evocou comportamentos sugestivos de medo inato, tais como atenção defensiva e imobilidade defensiva, seguido comportamento explosivo de fuga (figuras 5, 6, 7.).

A análise de variância de uma via mostrou efeito estatisticamente significativo do tratamento sobre a frequência [$F(6,49)=17,50$; $P<0,001$] e na duração [$F(6,49)=15,80$; $P<0,001$] do comportamento de atenção defensiva. O teste *post hoc* de Tukey mostrou que a ativação de receptores opioides na SNpr com morfina, seguida pelo bloqueio de receptores GABA_A no mesencéfalo dorsal aumentou a frequência ($p<0,001$) (figura 5A) e o tempo ($p<0,001$) (figura 5B) do alerta defensivo, quando comparado com o controle. A microinjeção de anandamida na SNpr, precedida pelo pré-tratamento dessa estrutura com morfina, seguida do bloqueio de receptores GABA_A no *tectum* também causou um expressivo aumento da frequência ($p<0,001$; fig.5A) e na duração do comportamento de alerta ($p<0,001$; Fig. 5B), tendo havido uma tendência não estatisticamente significativa de exacerbação do efeito da morfina na SNpr seguido pela administração de bicuculina no *tectum* sobre a expressão do alerta defensivo. Tais efeitos sobre a frequência de alerta defensivo foram antagonizados pelo bloqueio de receptores CB₁ e CB₂ na SNpr ($p<0,01$), como mostrado na figura 5A. Tanto o efeito pró-aversivo do tratamento da SNpr com morfina, como o efeito do tratamento da SNpr com morfina seguida de anandamida, causando aumento na duração do alerta evocado pela administração de bicuculina nas cpCS foram menores quando o pré-tratamento da SNpr morfina fora seguido pelo bloqueio de receptores CB₁ ($p<0,01$) ou CB₂ ($p<0,001$).

A análise de variância de uma via (*one-way ANOVA*) mostrou diferenças estatisticamente significativas do tratamento na frequência [$F(6,49)=8,957$; $P<0,001$] e no tempo [$F(6,49)=5,701$; $P<0,001$] de imobilidade defensiva (“congelamento”). O teste *post hoc* de Tukey mostrou um aumento tanto na frequência ($p<0,001$; Fig. 5C) como na duração ($p<0,01$; Fig 5D) de imobilidade defensiva após o pré-tratamento da SNpr com morfina seguido pelo bloqueio de receptores GABA_A nas cpCS. O efeito pró-aversivo da ativação de receptores opioides com morfina na SNpr seguido da administração de bicuculina nas cpCS, no que se refere à frequência do comportamento de imobilidade defensiva foi menor ($p<0,05$) após o tratamento da SNpr com

anandamida, muito embora tenha sido ainda registrado um aumento da incidência de imobilidade defensiva, quando comparado com o controle ($p < 0,05$) (Figura 5C). O pré-tratamento da SNpr com canabidiol, também diminuiu o efeito pró-aversivo da administração de morfina na SNpr, seguida pelo bloqueio de receptores GABA_A nas cpCS, no que se refere à frequência do comportamento de imobilidade defensiva ($p < 0,05$; Fig. 5C). O pré-tratamento da SNpr com morfina seguido da administração local de antagonista de receptores CB₁ causou uma diminuição estatisticamente significativa ($p < 0,05$) no aumento da frequência de imobilidade defensiva causado pelo bloqueio de receptores GABA_A nas cpCS precedido pelo pré-tratamento da SNpr com salina ($p < 0,01$). O pré-tratamento da SNpr com morfina seguido da administração local de antagonista de receptores CB₁ ou CB₂ causou uma diminuição estatisticamente significativa ($p < 0,05$) no aumento da frequência de imobilidade defensiva causado pelo bloqueio de receptores GABA_A nas cpCS precedido pelo pré-tratamento da SNpr com morfina ($p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente) (Figura 5C).

No que se refere ao comportamento de fuga a ANOVA também mostrou que houve diferenças estatisticamente significativas do tratamento na frequência [$F(6,49)=8,399$; $P < 0,001$] e no tempo [$F(6,49)=40,83$; $P < 0,001$] de fuga. O teste *post hoc* de Tukey mostrou um aumento tanto na frequência ($p < 0,01$) como na duração ($p < 0,01$) do comportamento de fuga, expresso por corridas direcionadas para frente, após o bloqueio de receptores GABA_A nas cpCS, precedido pelo pré-tratamento da SNpr com salina ou com morfina, como mostrado na figura 6A e B. O pré-tratamento da SNpr com morfina seguida de anandamida também causou aumento estatisticamente significativo da frequência ($p < 0,001$) e duração do comportamento de fuga ($p < 0,001$), e exacerbou o efeito da morfina na SNpr seguida de bucuculina no mesencéfalo dorsal, causando um efeito somatório aumentando a duração ($p < 0,001$) da fuga causada pelo bloqueio de receptores GABA_A nas cpCS. O efeito pró-aversivo da administração de morfina seguida de anandamida na SNpr sobre a frequência de reações de fuga foi menor quando a SNpr era tratada com morfina e AM251 ($p < 0,05$) ou AM630 ($p < 0,01$) (Fig. 6A). O efeito facilitatório do tratamento da SNpr com morfina seguida de anandamida sobre a ativação comportamental causada pelo bloqueio de receptores GABA_A no *tectum*, no que se refere à duração do comportamento de fuga, foi antagonizado pelo bloqueio tanto de receptores CB₁ ($p < 0,001$) como de receptores CB₂ ($p < 0,001$) na SNpr, como mostrado na figura 6B. O tratamento da SNpr com morfina, seguida de canabidiol aumentou a duração da expressão do comportamento de fuga

causado pelo bloqueio de receptores GABA_A no *tectum*, o que foi revertido quando a SNpr era pré-tratada com morfina, seguida de um antagonista de receptor CB₁ ($p<0,01$) ou de um antagonista de receptor CB₂ ($p<0,001$) (Fig. 6B).

A análise de variância de uma via (*ANOVA*) mostrou também diferenças estatisticamente significativas do tratamento na frequência [$F(6,49)=6,646$; $P<0,001$] e na duração [$F(6,49)=16,38$; $P<0,001$] do comportamento de saltos. O teste *post hoc* de Tukey mostrou uma tendência não estatisticamente significante de aumento na frequência e duração ($p>0,05$) de saltos e uma diferença estatisticamente significante de aumento na duração ($p<0,01$) do comportamento de fuga, expresso por saltos, após o bloqueio de receptores GABA_A nas cpCS, precedido pelo pré-tratamento da SNpr com salina ou com morfina, respectivamente, como mostrado na figura 6C e D. O pré-tratamento da SNpr com morfina seguida de anandamida ou de canabidiol também causou aumento estatisticamente significativo da frequência ($p<0,001$) do comportamento de saltos ($p<0,001$), mas somente o pré-tratamento da SNpr com morfina e anandamida aumentou a duração do comportamento de fuga expresso por saltos ($p<0,001$), como mostrado na figura 6C e D. O efeito pró-aversivo da administração de morfina seguida de anandamida na SNpr sobre a duração das respostas de saltos foi menor quando a SNpr era tratada com morfina e AM251 ($p<0,01$) ou AM630 ($p<0,001$) (Fig. 6D). O comportamento de fuga, expresso por saltos de animais pré-tratados na SNpr com morfina seguida de um antagonista de receptores CB₁ ou de receptores CB₂ na mesma estrutura e tratados com bicuculina nas cpCS foi menor do que a resposta de saltos expressa pelo grupo pré-tratado na SNpr com morfina seguida de anandamida ($p<0,001$, em ambos os casos), como mostrado na figura 6D. O tratamento da SNpr com morfina, seguida de canabidiol, diminuiu a duração da expressão do comportamento de saltos causado pelo bloqueio de receptores GABA_A no *tectum*, quando comparado ao grupo pré-tratado na SNpr apenas com morfina, seguindo-se o bloqueio de receptores GABA_A nas cpCS ($p<0,001$) (Fig. 6D).

Tais respostas explosivas de comportamento de defesa também refletiram na frequência das respostas de cruzamentos. A análise de variância de uma via (*One way Anova*) mostrou diferenças estatisticamente significativas do tratamento no número de cruzamentos [$F(6,49)=73,53$; $P<0,001$]. O teste *post hoc* de Tukey mostrou um aumento estatisticamente significante na frequência das respostas de cruzamento de animais tratados com bicuculina nas cpCS ($p<0,001$), e naqueles pré-tratados na SNpr com morfina, seguida de DMSO ($p<0,001$), de anandamida ($p<0,01$) ou com canabidiol

($p < 0,01$) e submetidos ao bloqueio de receptores GABA_A nas cpCS. Contudo, o pré-tratamento da SNpr com morfina, seguida de anandamida ou canabidiol causou um efeito bem menor do que o do tratamento da SNpr apenas com morfina sobre a explosão comportamental desencadeada pelo bloqueio de receptores GABA_A no *tectum*. O pré-tratamento da SNpr com morfina, seguida de anandamida ou de canabidiol, reduziu o efeito pró-aversivo do pré-tratamento da SNpr com morfina, seguida do bloqueio de receptores GABA_A nas cpCS ($p < 0,001$, em ambos os casos). Curiosamente, esse feito não foi revertido pelo pré-tratamento da SNpr com morfina seguida de AM251, nem com morfina seguida de AM630, considerando que ambos os grupos também apresentaram uma redução estatisticamente significante no número de cruzamentos ($p < 0,001$, em ambos os casos), quando comparados com o grupo pré-tratado na SNpr com morfina e com bicuculina nas cpCS. Dados mostrados na figura 7A.

No que se refere à resposta de rotação, a análise de variância mostrou efeito estatisticamente significativo do tratamento na frequência [$F(6,49)=12,82$; $P < 0,001$] e no tempo [$F(6,49)=19,57$; $P < 0,001$] de respostas de rotação. Muito embora o teste *post hoc* de Tukey não tenha mostrado diferenças estatisticamente significantes na frequência de rotações ($p > 0,05$; Fig. 7B) causadas pela microinjeção de bicuculina no *tectum*, houve um aumento estatisticamente significante na duração de tais respostas em animais submetidos ao bloqueio de receptores GABA_A nas cpCS, quando comparado ao grupo controle ($p < 0,001$), como mostrado na Fig. 7C. O pré-tratamento da SNpr com morfina, seguido da administração de bicuculina nas cpCS também só aumentou a duração do comportamento rotatório ($p < 0,001$), mas não interferiu em sua frequência ($p > 0,05$). O pré-tratamento da SNpr com morfina seguida de anandamida ou canabidiol aumentou tanto a frequência ($p < 0,001$ e $p < 0,01$, respectivamente) como a duração ($p < 0,05$, em ambos os casos) do comportamento rotatório evocado pelo bloqueio de receptores GABA_A nas cpCS (Fig. 7B e C). O aumento da frequência do comportamento rotatório causado pelo pré-tratamento da SNpr com morfina e anandamida parece depender do envolvimento de receptores CB₁ e CB₂, pois foi menor nos grupos pré-tratados na SNpr com morfina e AM630 ($p < 0,01$) (Fig. 7B). Houve um efeito facilitatório no aumento da duração do comportamento rotatório causado pelo pré-tratamento da SNpr com morfina e das cpCS com bicuculina, após a microinjeção na SNpr de morfina e canabidiol, seguido pelo tratamento das cpCS com bicuculina ($p < 0,05$), efeito que foi reduzido após o pré-tratamento da SNpr com morfina e AM251 ou AM630 ($p > 0,001$, em ambos os casos). Os grupos pré-tratados com morfina e

antagonistas canabinoides na SNpr também mostraram redução estatisticamente significativa no aumento da duração do comportamento rotatório quando comparados ao grupo pré-tratado na SNpr com morfina ou com morfina e anandamida, seguindo-se a microinjeção de bicuculina nas cpCS ($p < 0,001$ em todos os casos) (Fig. 7C).

A análise estatística de uma via (*One Way Anova*) mostrou efeito estatisticamente significativo do tratamento na frequência [$F(6,49) = 71,84$; $P < 0,001$] e também no tempo da expressão do comportamento exploratório (levantamentos) [$F(6,49) = 80,86$; $P < 0,001$]. O teste *post hoc* de Tukey mostrou um aumento estatisticamente significativo na frequência ($p < 0,01$, em ambos os casos) na duração ($p < 0,001$, em ambos os casos) do comportamento de levantamentos em animais submetidos ao bloqueio de receptores GABAérgicos do tipo A nas cpCS, quando comparado ao grupo controle (Fig. 7D e E). O pré-tratamento da SNpr com morfina, ou com morfina e anandamida, mas não com morfina e canabidiol, seguido do bloqueio de receptores GABA_A na cpCS causou um aumento estatisticamente significativo tanto da frequência ($p < 0,001$), como da duração ($p < 0,001$) das respostas de levantamentos, quando comparado com o controle (Fig. 7D e E). O pré-tratamento da SNpr com morfina e canabidiol, seguido pelo tratamento das cpCS com bicuculina, causou uma diminuição estatisticamente significativa na frequência do comportamento de levantamento, quando comparado ao efeito do pré-tratamento da SNpr com veículo ou com morfina, seguido do tratamento das cpCS com bicuculina ($p < 0,001$), e na duração das respostas de levantamentos, quando comparado ao grupo pré-tratado com morfina na SNpr e com bicuculina nas cpCS ($p < 0,001$). O efeito do pré-tratamento da SNpr com morfina e AM251 ou com morfina e AM630, seguido pelo bloqueio de receptores GABAérgicos do tipo A nas cpCS sobre a frequência comportamento de levantamento mostrou-se estatisticamente menor, quando comparado aos grupos pré-tratados na SNpr com morfina, morfina e anandamida ou com morfina e canabidiol ($p < 0,001$), como mostrado na figura 7D. O efeito do pré-tratamento da SNpr com morfina e AM251 ou com morfina e AM630, seguido pelo bloqueio de receptores GABAérgicos do tipo A nas cpCS sobre a e duração do comportamento de levantamento mostrou-se estatisticamente menor, quando comparado aos grupos pré-tratados na SNpr com morfina, ou com morfina e anandamida ($p < 0,001$, em todos os casos), como mostrado na figura 7E.

Fig. 5. Efeito de microinjeções de Salina, DMSO, Morfina, Anandamida, Canabidiol, AM251 e AM630 (5,0 µg/0,2µL) na substância negra, parte reticulada (SNpr), sobre a frequência de alerta (A), duração de alerta (B), frequência de congelamento (C) e tempo de congelamento (D) evocados pelo bloqueio de receptores GABAérgicos nas camadas profundas do colículo superior (CPCS) com microinjeções locais de bicuculina (a 40ng/0,2µL). Os dados são apresentados como média e erro padrão da média. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ quando comparado com o grupo salina + DMSO (SNpr) + salina (CS), +++ $p < 0,001$ quando comparado com o grupo salina + DMSO (SNpr) + bicuculina (CS), # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ quando comparado com o grupo morfina + DMSO (SNpr) + bicuculina (CS), ++++ $p < 0,0001$ quando comparado com o grupo morfina + anandamida (SNpr) + bicuculina (CS), segundo a análise de variância de uma via, seguida pelo teste *post-hoc* de Tukey.

Fig. 6. Efeito de microinjeções de Salina, DMSO, Morfina, Anandamida, Canabidiol, AM251 e AM630 (5,0 µg/0,2µL) na substância negra, parte reticulada (SNpr), sobre a frequência de fuga (A), duração de fuga (B), frequência de saltos (C) e tempo de saltos (D) evocados pelo bloqueio de receptores GABAérgicos nas camadas profundas do colículo superior (CPCS) com microinjeções locais de bicuculina (a 40ng/0,2µL). Os dados são apresentados como média e erro padrão da média. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ quando comparado com o grupo salina + DMSO (SNpr) + salina (CS), + $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$, +++ $p < 0,001$ quando comparado com o grupo salina + DMSO (SNpr) + bicuculina (CS), # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ quando comparado com o grupo morfina + DMSO (SNpr) + bicuculina (CS), + $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$, +++ $p < 0,001$ quando comparado com o grupo anandamida + DMSO (SNpr) + bicuculina (CS), + $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$, +++ $p < 0,001$ quando comparado com o grupo morfina canabidiol (SNpr) + bicuculina (CS), segundo a análise de variância de uma via, seguida pelo teste *post-hoc* de Tukey.

Fig. 7. Efeito de microinjeções de Salina, DMSO, Morfina, Anandamida, Canabidiol, AM251 e AM630 (5,0 $\mu\text{g}/0,2\mu\text{L}$) na substância negra, parte reticulada (SNpr), sobre a frequência de cruzamentos (A), frequência de rotação (B), duração de rotação (C), frequência de levantamentos (D) e tempo de levantamentos (E) evocados pelo bloqueio de receptores GABAérgicos nas camadas profundas do colículo superior (CPCS) com microinjeções locais de bicuculina (a 40ng/0,2 μL). Os dados são apresentados como média e erro padrão da média. * $p<0,05$, ** $p<0,01$ *** $p<0,001$ quando comparado com o grupo salina + DMSO (SNpr) + salina (CS), + $p<0,05$, ++ $p<0,01$, +++ $p<0,001$ quando comparado com o grupo salina + DMSO (SNpr) + bicuculina (CS), # $p<0,05$, ## $p<0,01$, ### $p<0,001$ quando comparado com o grupo morfina + DMSO (SNpr) + bicuculina (CS), † $p<0,05$, †† $p<0,01$, ††† $p<0,001$ quando comparado com o grupo morfina + anandamida (SNpr) + bicuculina (CS), ‡ $p<0,01$, ‡‡‡ $p<0,001$ quando comparado com o grupo morfina + canabidiol (SNpr) + bicuculina (CS), segundo a análise de variância de uma via, seguida pelo teste *post-hoc* de Tukey.

Estudo do Limiar Nociceptivo

Com o objetivo de investigar o efeito dos diversos pré-tratamentos da SNpr, seguidos do tratamento das spCS com bicuculina sobre a oscilação dos limiares nociceptivos os mesmos animais foram também submetidos ao teste de retirada de cauda.

A análise de variância de medidas repetidas mostrou ter havido um efeito estatisticamente significativo do tratamento [$F_{(6,46)} = 43,77$; $P < 0,001$], do tempo [$F_{(9,38)} = 320,43$; $P < 0,001$] e interação entre tratamento *versus* tempo [$F_{(54,218)} = 13,23$; $P < 0,001$]. A oscilação do limiar nociceptivo após a elaboração do comportamento de defesa perdurou por 50 min [$F_{(6,48)}$ variando de 4,00 a 84,31; $p < 0,001$].

Análises *post-hoc* de Duncan mostraram que o bloqueio de receptores GABA_A no *tectum* induziu comportamento explosivo de fuga, avaliado durante 20min no teste de campo aberto, seguido de uma elevação estatisticamente significativa do limiar nociceptivo que perdurou de 20 a 30 min após o arrefecimento das respostas de fuga, tendo havido elevação estatisticamente significativa da latência de retirada de cauda registrada imediatamente após a interrupção com comportamento de fuga explosiva e nos tempos subsequentes de 10, 20 e 30min no grupo pré-tratado na SNpr com salina e tratado nas cpCS com bicuculina, e também imediatamente após o fim das respostas de fuga explosiva e nos tempos subsequentes de 10 e 20min, nos animais pré-tratados na SNpr com DMSO e tratados nas cpCS com bicuculina. O tratamento da SNpr com morfina exacerbou o efeito da bicuculina no mesencéfalo dorsal, causando um efeito somatório ao da bicuculina no que se refere à expressão da antinocicepção induzida pelo medo inato, tendo esta perdurado por um tempo maior, de 50min, após a interrupção do comportamento explosivo de fuga, sendo detectada imediatamente após a fuga explosiva e também após 10, 20, 30, 40 e 50 min após a expressão do comportamento de fuga. O tratamento da SNpr com morfina e anadamida ou com morfina e canabidiol exacerbou o efeito da bicuculina no mesencéfalo dorsal, que se refere à expressão da antinocicepção induzida pelo medo inato, tendo aquela perdurado por um tempo maior do que esta, até 50min após a interrupção do comportamento explosivo de fuga, e tendo sido significativamente mais intensa transcorridos 10, 20, 30, 40 e 50 min após a expressão do comportamento de fuga. O efeito facilitatório do tratamento da SNpr com morfina e anadamida ou com morfina e canabidiol sobre a antinocicepção induzida pelo medo causado pelo bloqueio de receptores GABA_A no *tectum*, foi reduzido

imediatamente após a expressão do comportamento de fuga, aos 10min, 20 min e aos 30min, após a fuga pelo bloqueio de receptores CB₁ ($p<0,05$ em todos os casos) mas não pelo bloqueio de receptores CB₂ da SNpr. Esses dados são mostrados na figura 8.

Fig. 8. Efeito da microinjeção central de canabinoides, morfina ou salina nas doses de 5µg/0,2µL na SNpr, seguida pela administração de bicuculina na concentração de 40ng/0,2µL ou salina no teto mesencefálico nos limiares nociceptivos. N=8; * ($P<0,05$) quando comparado com o grupo controle Salina + DMSO intra-SNpr / Salina intra CPCS; + ($P<0,05$) quando comparado com o grupo controle Salina + DMSO intra-SNpr / Bicuculina intra CPCS; # ($P<0,05$) quando comparado com o grupo controle Morfina + DMSO intra-SNpr / DMSO intra CPCS; † ($P<0,05$) quando comparado com o grupo controle Salina + DMSO intra-SNpr / Bicuculina intra CPCS; ‡ ($P<0,05$) quando comparado com o grupo Morfina + Anandamida intra-SNpr / Bicuculina intra CPCS; ● ($P<0,05$) quando comparado com o grupo Morfina + AM251 intra-SNpr / Bicuculina intra CPCS; ◆ ($P<0,05$) quando comparado com o grupo Morfina + AM630 intra-SNpr / Bicuculina intra CPCS. Segundo a análise de variância de medidas repetidas, seguida pelo teste *post hoc* de Duncan. LB: Linha de base, medida antes do procedimento experimental. A primeira seta indica a administração de salina ou morfina, a segunda seta indica a administração de canabinoides ou de seu veículo ambas na SNpr e a terceira seta indica a administração de bicuculina ou salina nas cpCS. Eixo x: tempo (em minutos) em que medidas consecutivas da latência de retirada de cauda foram tomadas. Eixo y: Limiar Nociceptivo (aferido em segundos) medido pelo teste de latência de retirada da cauda. Aumentos nos limiares nociceptivos foram representados como médias ± EPM.

O efeito da interação entre o sistema opioide e canabinoide na divisão reticulada da substância negra nas respostas de comportamentos defensivos induzidas pelo bloqueio do receptor GABA_A nas camadas profundas do colículo superior: Ação do Naloxonazina na SNpr

A microinjeção de bicuculina na divisão reticulada da substância negra, seguida pelo bloqueio de receptores GABAérgicos do tipo A nas cpCS evocou comportamentos sugestivos de medo inato, tais como atenção defensiva e imobilidade defensiva, seguido comportamento explosivo de fuga (figuras 9 e 10). O pré-tratamento da SNpr com naloxonazina causou um efeito antiaversivo ao diminuir a duração do comportamento de fuga explosiva causada pelo bloqueio de receptores GABA_A nas cpCS.

A análise de variância de uma via mostrou efeito estatisticamente significativo do tratamento sobre a frequência [$F(6,49) = 7,99$; $P < 0,001$] e na duração [$F(6,49) = 11,10$; $P < 0,001$] do comportamento de atenção defensiva. O teste *post hoc* de Tukey mostrou que o antagonismo de receptores GABA_A nas cpCS causou uma elevação estatisticamente significativa da frequência ($p < 0,05$, em ambos os casos) e da duração ($p < 0,001$, em ambos os casos) do comportamento de atenção defensiva, o que não foi alterado pelo bloqueio de receptores opióides μ_1 , com administração central de naloxonazina, na SNpr, seguida pelo bloqueio de receptores GABA_A no mesencéfalo dorsal, o que igualmente foi seguido de aumento da frequência ($p < 0,05$) (figura 9A) e o tempo ($p < 0,01$) (figura 9B) do alerta defensivo, quando comparado com os respectivos controles. A microinjeção de anandamida na SNpr, precedida pelo pré-tratamento dessa estrutura com naloxonazina, seguida do bloqueio de receptores GABA_A no *tectum* também causou uma redução estatisticamente significativa no aumento da duração ($p < 0,01$; fig.9B) do comportamento de alerta, o que não foi corroborado pelo pré-tratamento da SNpr com canabidiol, precedido pela administração local de naloxonazina, seguido do bloqueio de receptores GABA_A nas cpCS. O pré-tratamento da SNpr com naloxonazina e AM630, mas não com AM251, seguido pela administração de bicuculina nas cpCS, causou um efeito antiaversivo, quando comparado ao comportamento dos grupos pré-tratados na SNpr com salina fisiológica, naloxonazina, ou naloxonazina seguido de canabidiol, e com bicuculina nas cpCS, reduzindo o aumento na frequência do alerta defensivo ($p < 0,05$; $p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente), como mostrado na figura 9A. Contudo, os pré-tratamentos da SNpr com naloxonazina seguido da administração local de AM251 ou de AM630, seguidos pela administração de bicuculina nas cpCS, causaram um claro efeito antiaversivo, quando comparado ao comportamento dos grupos pré-tratados na SNpr com salina fisiológica, naloxonazina, ou naloxonazina seguido de canabidiol, e com bicuculina nas cpCS, reduzindo o aumento na duração do

alerta defensivo ($p < 0,001$; $p < 0,01$ e $p < 0,01$, respectivamente, em ambos os casos), como mostrado na figura 9B.

A análise de variância de uma via (*one-way ANOVA*) mostrou diferenças estatisticamente significativas do tratamento na frequência [$F(6,49)=14,71$; $P < 0,001$] e no tempo [$F(6,49)=12,68$; $P < 0,001$] de imobilidade defensiva (“congelamento”). O teste *post hoc* de Tukey mostrou que o antagonismo de receptores GABA_A nas cpCS causou uma elevação estatisticamente significativa da frequência ($p < 0,001$, em ambos os casos) e da duração ($p < 0,001$, em ambos os casos) do comportamento de imobilidade defensiva, tendo havido uma tendência não estatisticamente significativa de redução do aumento na frequência de imobilidade defensiva causado pelo bloqueio de receptores opioides μ_1 , com administração central de naloxonazina, na SNpr, seguido pelo bloqueio de receptores GABA_A no mesencéfalo dorsal, mas esse último tratamento também causou aumento da frequência ($p < 0,001$) (figura 9C) e da duração ($p < 0,001$) (figura 9D) da imobilidade defensiva, quando comparado com os respectivos controles. A microinjeção de anandamida na SNpr, precedida pelo pré-tratamento dessa estrutura com naloxonazina, seguida do bloqueio de receptores GABA_A no *tectum* causou uma redução estatisticamente significativa no aumento da frequência ($p < 0,01$; fig.9C) do comportamento de imobilidade defensiva, o que não foi corroborado pelo pré-tratamento da SNpr com canabidiol, precedido pela administração local de naloxonazina, seguido do bloqueio de receptores GABA_A nas cpCS. O pré-tratamento da SNpr com naloxonazina e AM630, mas não com AM251, seguido pela administração de bicuculina nas cpCS, causou um efeito antiaversivo, quando comparado ao comportamento dos grupos pré-tratados na SNpr com salina fisiológica, naloxonazina, ou naloxonazina seguido de canabidiol, e com bicuculina nas cpCS, reduzindo o aumento na frequência ($p < 0,001$, em ambos os casos) e duração ($p < 0,001$ e $p < 0,01$, respectivamente) da imobilidade defensiva, como mostrado na figura 9C e D.

No que se refere ao comportamento de fuga a ANOVA também mostrou que houve diferenças estatisticamente significativas do tratamento na frequência [$F(6,49)=10,67$; $P < 0,001$] e no tempo [$F(6,49)=11,50$; $P < 0,001$] de fuga. O teste *post hoc* de Tukey mostrou um aumento tanto na frequência ($p < 0,001$) como na duração ($p < 0,001$) do comportamento de fuga, expresso por corridas direcionadas para a frente, após o bloqueio de receptores GABA_A nas cpCS. O pré-tratamento da SNpr com naloxonazina seguido pelo bloqueio de receptores GABA_A nas cpCS causou um claro efeito antiaversivo, tendo havido uma tendência não estatisticamente significativa de redução do aumento da frequência do comportamento de fuga, causado pelo bloqueio de receptores GABA_A nas cpCS, como mostrado na figura 10A, e uma redução estatisticamente significante ($p < 0,001$) no aumento

da duração do comportamento de fuga evocado pelo bloqueio de receptores GABA_A nas cpCS, como mostrado na figura 10B. O pré-tratamento da SNpr com naloxonazina, seguido de anandamida, canabidiol, AM251, ou AM630 reduziu o efeito pró-aversivo do tratamento das cpCS com bicuculina, no que se refere ao aumento da duração do comportamento explosivo de fuga, sugerindo um efeito antiaversivo de todos os mencionados pré-tratamentos realizados no mesencéfalo ventral (figura 10B).

A análise de variância de uma via (*ANOVA*) mostrou também diferenças estatisticamente significativas do tratamento na frequência [$F(6,49)=12,18$; $P<0,001$] e na duração [$F(6,49)=15,57$; $P<0,001$] do comportamento de saltos. O teste *post hoc* de Tukey mostrou uma tendência não estatisticamente significativa de aumento na frequência e duração ($p>0,05$ em todos os casos) de fuga expresso por saltos, após o bloqueio de receptores GABA_A nas cpCS, precedido pelo pré-tratamento da SNpr com salina, como mostrado na figura 10C e D. O pré-tratamento da SNpr com naloxonazina seguido de anandamida ou de canabidiol também não causou aumento estatisticamente significativo nem da frequência nem na duração do comportamento de fuga expresso por saltos ($p>0,05$ em todos os casos). Paradoxalmente, o pré-tratamento da SNpr com naloxonazina, seguido da administração intra-nigral de AM251 ou de AM 630, causou um efeito claramente pró-aversivo, no que se refere ao comportamento de fuga expresso por saltos, cuja incidência e duração foram sensivelmente aumentados ($p<0,001$) após o antagonismo de receptores GABA_A nas cpCS, como mostrado na figura 10C e D.

No que se refere às respostas de cruzamentos, a análise de variância de uma via (*One way Anova*) mostrou diferenças estatisticamente significativas do tratamento [$F(6,49)=30,65$; $P<0,001$]. O teste *post hoc* de Tukey mostrou um aumento estatisticamente significativo na frequência das respostas de cruzamento de animais tratados com bicuculina nas cpCS ($p<0,001$, em ambos os casos), e nos demais grupos submetidos aos diversos pré-tratamentos da SNpr, seguidos pelo bloqueio de receptores GABA_A nas cpCS ($p<0,01$ em todos os casos), como mostrado na figura 11A. Contudo o aumento na incidência de cruzamento expresso pelos animais de cada um desses demais grupos foi estatisticamente menor do que o aumento do número de cruzamentos expresso pelos animais submetidos ao procedimento controle na SNpr e a microinjeções de bicuculina nas cpCS (figura 11A).

No que se refere à resposta de rotação, a análise de variância mostrou efeito estatisticamente significativo do tratamento na frequência [$F(6,49)=30,16$; $P<0,001$] e no tempo [$F(6,49)=35,06$; $P<0,001$] de respostas de rotação. O teste *post hoc* de Tukey mostrou um aumento estatisticamente significativo na frequência e na duração do

comportamento rotatório em animais submetidos ao bloqueio de receptores GABA_A nas cpCS, quando comparado ao grupo controle ($p < 0,001$) (Fig. 11B e C). O pré-tratamento da SNpr com naloxonazina, seguido da administração de bicuculina nas cpCS o aumento da duração do comportamento rotatório, quando comparado ao efeito da microinjeção de bicuculina nas cpCS ($p < 0,001$). Fenômeno similar foi observado nos grupos pré-tratados na SNpr com naloxonazina, seguido anandamida ou de canabidiol ($p < 0,001$, em ambos os casos), o que foi revertido pelo pré-tratamento da SNpr com naloxonazina e o antagonista de receptores CB₁ ($p < 0,01$, em ambos os casos), mas não com naloxonazina e o antagonista de receptores CB₂, como mostrado na figura 11C. No que se refere à frequência do comportamento rotatório, o pré-tratamento da SNpr com naloxonazina, ou com naloxonazina seguido de anandamida ou de canabidiol, seguido pelo tratamento das cpCS com bicuculina, foi observado aumento da incidência de rotações, quando comparado com o grupo submetido apenas a microinjeções de bicuculina no mesencéfalo dorsal ($p < 0,001$, em todos os casos). O pré-tratamento da SNpr com naloxonazina e com AM630, seguido pelo bloqueio de receptores GABA_A nas cpCS causou uma redução estatisticamente significativa no aumento da frequência do comportamento rotatório observado nos mencionados grupos ($p < 0,001$, em todos os casos), inclusive naquele pré-tratado na SNpr com DMSO e tratado nas cpCS com bicuculina ($p < 0,001$), como mostrado na figura 11B.

A análise estatística de uma via (*One Way Anova*) mostrou efeito estatisticamente significativo do tratamento na frequência [$F(6,49) = 34,53$; $P < 0,001$] e também no tempo da expressão do comportamento exploratório (levantamentos) [$F(6,49) = 14,90$; $P < 0,001$]. O teste *post hoc* de Tukey mostrou uma diminuição estatisticamente significativa na duração ($p < 0,001$) do comportamento de levantamentos em animais submetidos ao bloqueio de receptores GABAérgicos do tipo A nas cpCS, quando comparado ao grupo controle (Fig. 11E). O pré-tratamento da SNpr com naloxonazina e DMSO, anandamida, canabidiol, AM251, ou AM630 reduziu a frequência do comportamento exploratório ($p < 0,01$ em todos os casos), como mostrado na figura 11D. O pré-tratamento da SNpr com naloxonazina e com canabidiol seguido da administração de bicuculina nas cpCS aumentou a duração do comportamento exploratório em comparação com o grupo pré-tratado com naloxonazina na SNpr, e com bicuculina nas cpCS, o que foi antagonizado tanto pelo pré-tratamento da SNpr com naloxonazina e AM251 ou AM630, e do tratamento das cpCs com bicuculina ($p < 0,001$, em ambos os casos), como mostrado na figura 11E.

Fig. 9. Efeito de microinjeções de Salina, DMSO, Naloxonazina, Anandamida, Canabidiol, AM251 e AM630 (5,0 µg/0,2µL) na substância negra, parte reticulada (SNpr), sobre a frequência de alerta (A), duração de alerta (B), frequência de congelamento (C) e tempo de congelamento (D) evocados pelo bloqueio de receptores GABAérgicos nas camadas profundas do colículo superior (CPCS) com microinjeções locais de bicuculina (a 40ng/0,2µL). Os dados são apresentados como média e erro padrão da média. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ quando comparado com o grupo salina + DMSO (SNpr) + salina (CS), + $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$, +++ $p < 0,001$ quando comparado com o grupo salina + DMSO (SNpr) + bicuculina (CS), # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,01$ quando comparado com o grupo naloxonazina + DMSO (SNpr) + bicuculina (CS), + $p < 0,05$, quando comparado com o grupo naloxonazina + anandamida (SNpr) + bicuculina (CS), ▲▲ $p < 0,01$, ▲▲▲ $p < 0,001$ quando comparado com o grupo naloxonazina + canabidiol (SNpr) + bicuculina (CS), segundo a análise de variância de uma via, seguida pelo teste *post-hoc* de Tukey.

Fig. 10. Efeito de microinjeções de salina, DMSO, Naloxonazina, Anandamida, Canabidiol, AM251 e AM630 (5,0 µg/0,2µL) na substância negra, parte reticulada (SNpr), sobre a frequência de fuga (A), duração de fuga (B) frequência de saltos (C), duração de saltos (D) evocados pelo bloqueio de receptores GABAérgicos nas camadas profundas do colículo superior (CPCS) com microinjeções locais de bicuculina (a 40ng/0,2µL). Os dados são apresentados como média e erro padrão da média. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$ quando comparado com o grupo salina + DMSO (SNpr) + salina (CS), + $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$, +++ $p < 0,0001$ quando comparado com o grupo salina + DMSO (SNpr) + bicuculina (CS), ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$, comparado com o grupo naloxonazina + DMSO (SNpr) + bicuculina (CS), +++ $p < 0,001$ quando quando comparado com o grupo naloxonazina + anandamida (SNpr) + bicuculina (CS), ▲ $p < 0,05$, ▲▲▲ $p < 0,001$, quando comparado com o grupo naloxonazina + canabidiol (SNpr) + bicuculina (CS), segundo a análise de variância de uma via, seguida pelo teste *post-hoc* de Tukey.

Fig. 11. Efeito de microinjeções de salina, DMSO, Naloxonazina, Anandamida, Canabidiol, AM251 e AM630 (5,0 µg/0,2µL) na substância negra, parte reticulada (SNpr), sobre a frequência de cruzamentos (A), frequência de rotação (B), duração de rotação (C), frequência de levantamentos (D) e duração de levantamentos (E), evocados pelo bloqueio de receptores GABAérgicos nas camadas profundas do colículo superior (CPCS) com microinjeções locais de bicuculina (a 40ng/0,2µL). Os dados são apresentados como média e erro padrão da média. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ quando comparado com o grupo salina + DMSO (SNpr) + salina (CS), + $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$, +++ $p < 0,001$ quando comparado com o grupo salina + DMSO (SNpr) + bicuculina (CS), # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,01$ quando comparado com o grupo naloxonazina + DMSO (SNpr) + bicuculina (CS), ++ $p < 0,01$, +++ $p < 0,001$ quando comparado com o grupo naloxonazina + anandamida (SNpr) + bicuculina (CS), ▲ $p < 0,05$, ▲▲ $p < 0,01$, ▲▲▲ $p < 0,001$, quando comparado com o grupo naloxonazina + canabidiol (SNpr) + bicuculina (CS), segundo a análise de variância de uma via, seguida pelo teste *post-hoc* de Tukey.

Estudo do Limiar Nociceptivo

Com o objetivo de investigar o efeito dos diversos pré-tratamentos da SNpr, seguidos do tratamento das spCS com bicuculina sobre a oscilação dos limiares nociceptivos os mesmos animais foram também submetidos a teste de retirada de cauda.

A análise de variância de medidas repetidas mostrou ter havido um efeito estatisticamente significativo do tratamento [$F_{(6,48)} = 14,65$; $P < 0,001$], do tempo [$F_{(9,40)} = 170,94$; $P < 0,001$] e interação entre tratamento *versus* tempo [$F_{(54,230)} = 14,65$; $P < 0,001$]. A oscilação do limiar nociceptivo após a elaboração do comportamento de defesa perdurou por 50 min [$F(8,63)$ variando de 6,18 a 43,37; $p < 0,001$].

Análises *post-hoc* de Duncan mostraram que o bloqueio de receptores GABA_A no *tectum* induziu comportamento explosivo de fuga, avaliado durante 20min no teste de campo aberto, seguido de uma elevação estatisticamente significativa do limiar nociceptivo que perdurou 30 min após o arrefecimento das respostas de fuga, tendo havido elevação estatisticamente significativa da latência de retirada de cauda registrada imediatamente após a interrupção com comportamento de fuga explosiva e nos tempos subsequentes de 10, 20 e 30min nos grupo pré-tratados na SNpr com salina ou DMSO e tratados nas cpCS com bicuculina. O tratamento da SNpr com naloxonazina deprimiu o efeito da bicuculina no mesencéfalo dorsal, causando uma redução na antinocicepção induzida pelo medo inato aos 10 e aos 30min após o comportamento de fuga causado pelo bloqueio de receptores GABAérgicos do tipo A nas cpCS. Os demais tratamentos foram seguidos de antinocicepção imediatamente após o comportamento de fuga, estendendo-se até os 20min subsequentes, em relação aos respectivos controles. Esses dados são mostrados na figura 12.

Fig. 12. Efeito da microinjeção central de canabinoides, naloxonazina ou salina nas doses de $5\mu\text{g}/0,2\mu\text{L}$ na SNpr, seguida pela administração de bicuculina na concentração de $40\text{ng}/0,2\mu\text{L}$ ou salina no teto mesencefálico nos limiares nociceptivos. $N=8$; * ($P<0,05$) quando comparado com o grupo controle Salina + DMSO intra-SNpr / Salina intra CPCS; + ($P<0,05$) quando comparado com o grupo controle Salina + DMSO intra-SNpr / Bicuculina intra CPCS; # ($P<0,05$) quando comparado com o grupo controle Naloxonazina + DMSO intra-SNpr / Bicuculina intra CPCS; ♦ ($P<0,05$) quando comparado com o grupo controle Naloxonazina + Anandamida intra-SNpr / Bicuculina intra CPCS; ▲ ($P<0,05$) quando comparado com o grupo controle Naloxonazina + Canabidiol intra-SNpr / Bicuculina intra CPCS; ● ($P<0,05$) quando comparado com o grupo Naloxonazina + AM251 intra-SNpr / Bicuculina intra CPCS; ◆ ($P<0,05$) quando comparado com o grupo naloxonazina + AM630 intra-SNpr / Bicuculina intra CPCS. Segundo a análise de variância de medidas repetidas, seguida pelo teste *post hoc* de Duncan. LB: Linha de base, medida antes do procedimento experimental. A primeira seta indica a administração de naloxonazina ou salina, a segunda seta indica a administração de canabinoides ou de seu veículo ambas na SNpr e a terceira seta indica a administração de bicuculina ou salina nas cpCS. Eixo x: tempo (em minutos) em que medidas consecutivas da latência de retirada de cauda foram tomadas. Eixo y: Limiar Nociceptivo (aferido em segundos) medido pelo teste de latência de retirada da cauda. Aumentos nos limiares nociceptivos foram representados como médias $\pm$ EPM.

O efeito da interação entre o sistema opioide e canabinoide na divisão reticulada da substância negra nas respostas de comportamentos defensivos induzidas pelo bloqueio do receptor GABA_A nas camadas profundas do colículo superior: Ação da Nor-binaltorfimina na SNpr

A microinjeção de bicuculina na divisão reticulada da substância negra, seguida pelo bloqueio de receptores GABAérgicos do tipo A nas cpCS evocou comportamentos sugestivos de medo inato, tais como atenção defensiva e imobilidade defensiva, seguido comportamento explosivo de fuga (figuras 13 e 14). O pré-tratamento da SNpr com nor-binaltorfimina causou um efeito antiaversivo ao diminuir os comportamentos de alerta e de imobilidade defensivos, assim como a intensidade do comportamento de fuga explosiva causados pelo bloqueio de receptores GABA_A nas cpCS.

A análise de variância de uma via mostrou efeito estatisticamente significativo do tratamento sobre a frequência [$F(6,49) = 6,576$; $P < 0,001$] e na duração [$F(6,49) = 9,471$; $P < 0,001$] do comportamento de atenção defensiva. O teste *post hoc* de Tukey mostrou que o antagonismo de receptores GABA_A nas cpCS causou uma elevação estatisticamente significativa da frequência ($p < 0,01$) e da duração ($p < 0,001$) do comportamento de atenção defensiva, o que foi antagonizado pelo bloqueio de receptores opióides do tipo k da SNpr, com administração de nor-binaltorfimina na divisão reticulada da substância negra, seguida pelo bloqueio de receptores GABA_A no mesencéfalo dorsal. O pré-tratamento da SNpr com nor-binaltorfimina foi seguido por uma tendência não estatisticamente significativa de diminuição da frequência de alerta defensivo (Fig. 13A) e de uma diminuição estatisticamente significativa da duração ($p < 0,01$) (figura 13B) do alerta defensivo, quando comparado com o tratamento da SNpr com DMSO e das cpCS com bicuculina. A microinjeção de anandamida na SNpr, precedida pelo pré-tratamento dessa estrutura com nor-binaltorfimina, seguida do bloqueio de receptores GABA_A no *tectum* também causou uma redução estatisticamente significativa no aumento da frequência ($p < 0,01$; fig. 13A) e da duração ($p < 0,001$; fig. 13B) do comportamento de alerta, o que não foi corroborado pelo pré-tratamento da SNpr com canabidiol, precedido pela administração local de nor-binaltorfimina, seguido do bloqueio de receptores GABA_A nas cpCS. O pré-tratamento da SNpr com nor-binaltorfimina e AM630, mas não com AM251, seguido pela administração de bicuculina nas cpCS, também causou um efeito antiaversivo, quando comparado ao comportamento dos grupos pré-tratados na SNpr com DMSO, ou nor-binaltorfimina seguido de canabidiol, e com bicuculina nas cpCS, reduzindo o aumento na frequência

do alerta defensivo ($p < 0,05$, em ambos os casos), como mostrado na figura 13A. Contudo, os pré-tratamentos da SNpr com nor-binaltorfimina seguido da administração local de AM251 ou de AM630, seguidos pela administração de bicuculina nas cpCS, causaram um claro efeito antiaversivo, quando comparado ao comportamento dos grupos pré-tratados na SNpr com DMSO, seguido de bicuculina nas cpCS, reduzindo o aumento na duração do alerta defensivo ($p < 0,001$, em ambos os casos), como mostrado na figura 13B.

A análise de variância de uma via (*one-way ANOVA*) mostrou diferenças estatisticamente significativas do tratamento na frequência [$F(6,49)=11,71$; $P < 0,001$] e no tempo [$F(6,49)=12,51$; $P < 0,001$] de imobilidade defensiva (“congelamento”). O teste *post hoc* de Tukey mostrou que o antagonismo de receptores GABA_A nas cpCS causou uma elevação estatisticamente significativa da frequência ($p < 0,001$) e da duração ($p < 0,001$) do comportamento de imobilidade defensiva, tendo havido redução estatisticamente significativa ($p < 0,01$) do aumento na frequência de imobilidade defensiva causado pelo bloqueio de receptores opioides k , com administração de nor-binaltorfimina na SNpr, seguido pelo bloqueio de receptores GABA_A no mesencéfalo dorsal da imobilidade defensiva, quando comparado com o pré-tratamento da SNpr com DMSO, seguido de microinjeção de bicuculina nas cpCS (figura 13C). Microinjeções de anandamida ou de canabidiol na SNpr, precedidas pelo pré-tratamento dessa estrutura com nor-binaltorfimina, seguido do bloqueio de receptores GABA_A no *tectum* causou também uma redução estatisticamente significativa no aumento da frequência ($p < 0,01$; fig.13C) do comportamento de imobilidade defensiva causado pelo bloqueio de receptores GABAérgicos do tipo A nas cpCS. O pré-tratamento da SNpr com nor-binaltorfimina e AM630, seguido pela administração de bicuculina nas cpCS, causou um efeito antiaversivo, quando comparado ao comportamento dos grupos pré-tratados na SNpr com DMSO, e com bicuculina nas cpCS, reduzindo o aumento da frequência ($p < 0,05$) da imobilidade defensiva, como mostrado na figura 13D. O pré-tratamento da SNpr com nor-binaltorfimina e AM251 ou AM630, seguido pela administração de bicuculina nas cpCS, causou um claro efeito antiaversivo, quando comparado ao comportamento dos grupos pré-tratados na SNpr com DMSO, e com bicuculina nas cpCS, reduzindo o aumento da duração da imobilidade defensiva ($p < 0,001$, em ambos os casos), como mostrado na figura 13D.

No que se refere ao comportamento de fuga a ANOVA também mostrou que houve diferenças estatisticamente significativas do tratamento na frequência

[$F(6,49)=12,97$; $P<0,001$] e no tempo [$F(6,49)=8,695$; $P<0,001$] de fuga. O teste *post hoc* de Tukey mostrou um aumento tanto na frequência ($p<0,001$) como na duração ($p<0,001$) do comportamento de fuga, expresso por corridas direcionadas para a frente, após o bloqueio de receptores GABA_A nas cpCS. O pré-tratamento da SNpr com nor-binaltorfimina seguido pelo bloqueio de receptores GABA_A nas cpCS causou um claro efeito antiaversivo, tendo havido uma redução estatisticamente significativa do aumento da frequência do comportamento de fuga, causado pelo bloqueio de receptores GABA_A nas cpCS, como mostrado na figura 14A e uma tendência não estatisticamente significativa de redução ($p>0,05$) no aumento da duração do comportamento de fuga evocado pelo bloqueio de receptores GABA_A nas cpCS, como mostrado na figura 14B. O pré-tratamento da SNpr com nor-binaltorfimina e canabidiol, seguido pela microinjeção de bicuculina nas cpCS, reverteu o efeito antiaversivo do pré-tratamento da SNpr com nor-binaltorfimina, seguido do tratamento das cpCS com bicuculina ($p<0,01$), como mostrado na figura 14A. O pré-tratamento da SNpr com nor-binaltorfimina e AM630, seguido pelo tratamento das cpCS com bicuculina, antagonizou o aumento da frequência do comportamento de fuga apresentado pelos grupos pré-tratados na SNpr com DMSO ou com norbinaltorfimina, seguido pelo bloqueio de receptores GABA_A nas cpsCS ($p<0,001$) (Fig. 14A). O pré-tratamento da SNpr com nor-binaltorfimina e AM251 ou com AM630, seguido pelo tratamento das cpCS com bicuculina, também antagonizou o aumento da duração do comportamento de fuga apresentado pelo grupo pré-tratado na SNpr com DMSO, seguido pelo bloqueio de receptores GABA_A nas cpsCS ($p<0,01$ e $p<0,001$, respectivamente) (Fig. 14B).

A análise de variância de uma via (*ANOVA*) mostrou também diferenças estatisticamente significativas do tratamento na frequência [$F(6,49)=9,729$; $P<0,001$] e na duração [$F(6,49)=9,906$; $P<0,001$] do comportamento de saltos. O teste *post hoc* de Tukey mostrou ter havido um aumento estatisticamente significativo na frequência ($p<0,001$) e na duração ($p<0,05$) de fuga expressa por saltos, após o bloqueio de receptores GABA_A nas cpCS, precedido pelo pré-tratamento da SNpr com salina fisiológica ou com DMSO, como mostrado na figura 14C e D. O pré-tratamento da SNpr com nor-binaltorfimina, e das cpCS com bicuculina causou um claro efeito antiaversivo, na medida em que reduziu tanto o aumento da frequência ($p<0,01$) do comportamento de fuga expresso por saltos, como mostrado na figura 14C e D. O pré-tratamento da SNpr com norbinaltorfimina e com anandamida, mas não com canabidiol, seguido pelo bloqueio de receptores GABA_A nas cpCS também reduziu tanto o aumento

da frequência ($p<0,01$) como o aumento da duração ($p<0,05$) do comportamento de fuga expresso por saltos, como mostrado na figura 14C. O pré-tratamento da SNpr com nor-binaltorfimina e canabidiol, e das cpCS com bicuculina causou um claro efeito pró-aversivo, na medida em que facilitou ($p<0,001$) o aumento da duração do comportamento de fuga expresso por saltos, causado pelo tratamento das cpCS com bicuculina, como mostrado na figura 14D, o que foi antagonizado pelo tratamento da SNpr com nor-binaltorfimina e ou AM251 ($p<0,05$) ou AM630 ($p<0,01$), seguido pelo bloqueio de receptores GABA_A nas cpCS, como mostrado na figura 14D.

No que se refere às respostas de cruzamentos, a análise de variância de uma via (*One way Anova*) mostrou diferenças estatisticamente significativas do tratamento [$F(6,49)=30,65$; $P<0,001$]. O teste *post hoc* de Tukey mostrou um aumento estatisticamente significativo na frequência das respostas de cruzamento de animais tratados com bicuculina nas cpCS ($p<0,001$), e nos demais grupos submetidos aos diversos pré-tratamentos da SNpr, seguidos pelo bloqueio de receptores GABA_A nas cpCS ($p<0,001$ em todos os casos), como mostrado na figura 15A. Contudo, o aumento na incidência de cruzamento expresso pelos animais de cada um desses demais grupos foi estatisticamente menor ($p<0,05$ em todos os casos) do que o aumento do número de cruzamentos expresso pelos animais submetidos ao procedimento controle na SNpr e a microinjeções de bicuculina nas cpCS (figura 15A).

No que se refere à resposta de rotação, a análise de variância mostrou efeito estatisticamente significativo do tratamento na frequência [$F(6,49)=8,102$; $P<0,001$] e no tempo [$F(6,49)=15,08$; $P<0,001$] de respostas de rotação. O teste *post hoc* de Tukey mostrou um aumento estatisticamente significativo na duração do comportamento rotatório em animais submetidos ao bloqueio de receptores GABA_A nas cpCS, quando comparado ao grupo controle ($p<0,001$) (Fig. 15C). O pré-tratamento da SNpr com nor-binaltorfimina, seguido da administração de bicuculina nas cpCS reduziu o aumento da duração do comportamento rotatório, quando comparado ao efeito da microinjeção de bicuculina nas cpCS ($p<0,01$). Fenômeno similar foi observado nos grupos pré-tratados na SNpr com nor-binaltorfimina, seguido anandamida ($p<0,001$), mas não de canabidiol. O pré-tratamento da SNpr com nor-binaltorfimina e canabidiol causou um efeito oposto ao da associação entre a nor-binaltorfimina e anandamida, tendo havido um aumento estatisticamente significativo tanto na frequência como na duração do comportamento rotatório ($p<0,001$, em ambos os casos) que foi revertido pelo pré-

tratamento da SNpr com nor-binaltorfimina e AM251 ou AM630 ($p < 0,01$, em ambos os casos), como mostrado na figura 11B e C.

A análise estatística de uma via (*One Way Anova*) mostrou efeito estatisticamente significativo do tratamento na frequência [$F(6,49) = 23,72$; $P < 0,001$] e também no tempo da expressão do comportamento exploratório (levantamentos) [$F(6,49) = 12,73$; $P < 0,001$]. O teste *post hoc* de Tukey mostrou uma diminuição estatisticamente significativa na duração ($p < 0,001$) do comportamento de levantamentos em animais submetidos ao bloqueio de receptores GABAérgicos do tipo A nas cpCS, quando comparado ao grupo controle (Fig. 15 E). O pré-tratamento da SNpr com nor-binaltorfimina e DMSO, anandamida, canabidiol, AM251, ou AM630 também reduziu a frequência e duração do comportamento exploratório ($p < 0,01$ em todos os casos), como mostrado na figura 15D e E.

Fig. 13. Efeito de microinjeções de salina, DMSO, Nor-binaltorfimina, Anandamida, Canabidiol, AM251 e AM630 (5,0 µg/0,2µL) na substância negra, parte reticulada (SNpr), sobre a frequência de alerta (A), duração de alerta (B), frequência de congelamento (C) e duração de congelamento (D) evocados pelo bloqueio de receptores GABAérgicos nas camadas profundas do colículo superior (CPCS) com microinjeções locais de bicuculina (a 40ng/0,2µL). Os dados são apresentados como média e erro padrão da média. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ quando comparado com o grupo salina + DMSO (SNpr) + salina (CS), + $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$ +++ $p < 0,001$ quando comparado com o grupo salina + DMSO (SNpr) + bicuculina (CS), Δ $p < 0,001$ quando comparado com o grupo nor-binaltorfimina + canabidiol (SNpr) + salina (CS), segundo a análise de variância de uma via, seguida pelo teste *post-hoc* de Tukey.

Fig. 14. Efeito de microinjeções de salina, DMSO, Nor-binaltorfimina, Anandamida, Canabidiol, AM251 e AM630 (5,0 µg/0,2µL) na substância negra, parte reticulada (SNpr), sobre a frequência de fuga (A), duração de fuga (B) evocados pelo bloqueio de receptores GABAérgicos nas camadas profundas do colículo superior (CPCS) com microinjeções locais de bicuculina (a 40ng/0,2µL). Os dados são apresentados como média e erro padrão da média. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ quando comparado com o grupo salina + DMSO (SNpr) + salina (CS), + $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$, +++ $p < 0,001$ quando comparado com o grupo salina + DMSO (SNpr) + bicuculina (CS), # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ quando comparado com o grupo nor-binaltorfimina + DMSO(SNpr) + salina (CS), ▲ $p < 0,05$, ▲▲ $p < 0,01$, ▲▲▲ $p < 0,001$, quando comparado com o grupo nor-binaltorfimina + canabidiol (SNpr) + bicuculina (CS), segundo a análise de variância de uma via, seguida pelo teste *post-hoc* de Tukey.

Fig. 15. Efeito de microinjeções de salina, DMSO, Nor-binaltorfimina, Anandamida, Canabidiol, AM251 e AM630 (5,0 μ g/0,2 μ L) na substância negra, parte reticulada (SNpr), sobre a frequência de cruzamentos (A), frequência de rotação (B), duração de rotação (C), frequência de levantamentos (D) e duração de levantamentos (E) evocados pelo bloqueio de receptores GABAérgicos nas camadas profundas do colículo superior (CPCS) com microinjeções locais de bicuculina (a 40ng/0,2 μ L). Os dados são apresentados como média e erro padrão da média. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ quando comparado com o grupo salina + DMSO (SNpr) + salina (CS), + $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$, +++ $p < 0,001$ quando comparado com o grupo salina + DMSO (SNpr) + bicuculina (CS), ### $p < 0,01$, #### $p < 0,01$ quando comparado com o grupo nor-binaltorfimina + DMSO (SNpr) + bicuculina (CS), ▲▲ $p < 0,01$, ▲▲▲ $p < 0,001$, quando comparado com o grupo nor-binaltorfimina + canabidiol (SNpr) + bicuculina (CS), segundo a análise de variância de uma via, seguida pelo teste *post-hoc* de Tukey.

Estudo do Limiar Nociceptivo

Com o objetivo de investigar o efeito dos diversos pré-tratamentos da SNpr, seguidos do tratamento das cpCS com bicuculina sobre a oscilação dos limiares nociceptivos os mesmos animais foram também submetidos a teste de retirada de cauda.

A análise de variância de medidas repetidas mostrou ter havido um efeito estatisticamente significativo do tratamento [$F_{(6,48)} = 13,79$; $P < 0,001$], do tempo [$F_{(9,40)} = 500,04$; $P < 0,001$] e interação entre tratamento *versus* tempo [$F_{(54,230)} = 12,59$; $P < 0,001$]. A oscilação do limiar nociceptivo após a elaboração do comportamento de defesa perdurou por 50 min [$F_{(8,63)}$ variando de 6,98 a 49,46; $p < 0,001$].

Análises *post-hoc* de Duncan mostraram que o bloqueio de receptores GABA_A no *tectum* induziu comportamento explosivo de fuga, avaliado durante 20min no teste de campo aberto, seguido de uma elevação estatisticamente significativa do limiar nociceptivo que perdurou 30 min após o arrefecimento das respostas de fuga, tendo havido elevação estatisticamente significativa da latência de retirada de cauda registrada imediatamente após a interrupção com comportamento de fuga explosiva e nos tempos subsequentes de 10, 20 e 30min nos grupos pré-tratados na SNpr com salina ou DMSO e tratados nas cpCS com bicuculina. O tratamento da SNpr com nor-binaltorfimina deprimiu o efeito da bicuculina no mesencéfalo dorsal, causando uma redução na antinocicepção induzida pelo medo inato aos 30min após o comportamento de fuga causado pelo bloqueio de receptores GABAérgicos do tipo A nas cpCS. Os demais tratamentos foram seguidos de antinocicepção imediatamente após o comportamento de fuga, estendendo-se até os 30min subsequentes, em relação aos respectivos controles. Esses dados são mostrados na figura 16.

Fig.16. Efeito da microinjeção central de canabinoides, nor-binaltorfimina ou salina nas doses de $5\mu\text{g}/0,2\mu\text{L}$ na SNpr, seguida pela administração de bicuculina na concentração de $40\text{ng}/0,2\mu\text{L}$ ou salina no teto mesencefálico nos limiares nociceptivos. $N=8$; * ($P<0,05$) quando comparado com o grupo controle DMSO + Salina intra-SNpr / Salina intra CPCS; # ($P<0,05$) quando comparado com o grupo controle Nor-binaltorfimina + DMSO intra-SNpr / Bicuculina intra CPCS; † ($P<0,05$) quando comparado com o grupo controle Nor-binaltorfimina + Anandamida intra-SNpr / Bicuculina intra CPCS; ‡ ($P<0,05$) quando comparado com o grupo controle Nor-binaltorfimina + Canabidiol intra-SNpr / Bicuculina intra CPCS; • ($P<0,05$) quando comparado com o grupo Nor-binaltorfimina + AM251 intra-SNpr / Bicuculina intra CPCS; ♦ ($P<0,05$) quando comparado com o grupo Nor-binaltorfimina + AM630 intra-SNpr / Bicuculina intra CPCS. Segundo a análise de variância de medidas repetidas, seguida pelo teste *post hoc* de Duncan. LB: Linha de base, medida antes do procedimento experimental. A primeira seta indica a administração de nor-binaltorfimina ou salina, a segunda seta indica a administração de canabinoides ou de seu veículo ambas na SNpr e a terceira seta indica a administração de bicuculina ou salina nas cpCS. Eixo x: tempo (em minutos) em que medidas consecutivas da latência de retirada de cauda foram tomadas. Eixo y: Limiar Nociceptivo (aferido em segundos) medido pelo teste de latência de retirada da cauda. Aumentos nos limiares nociceptivos foram representados como médias $\pm$ EPM.

Fig. 17- Fotomicrografia de corte transversal do teto mesencefálico de rato Wistar, passando pelo colículo superior (CS), mostrando um sítio (seta) de microinjeção de bicuculina nas camadas profundas do CS. PAG: “periaqueductal grey matter” (substância cinzenta periaqueductal); dlSC: “deep layers of the superior colliculus” (camadas profundas do colículo superior).

Fig. 18- Fotomicrografia de corte transversal do tegmento mesencefálico de rato Wistar, passando pela substância negra parte reticulada (SNpr), mostrando um sítio (seta) de microinjeção de drogas. PAG: “periaqueductal grey matter” (substância cinzenta periaquedutal).

Fig. 19- Representação esquemática de sítios de microinjeção de salina + salina intra SNpr + salina intra CS (○); salina + DMSO intra SNpr + salina intra CS (●); salina + salina intra SNpr + bicuculina intra CS (□); salina + DMSO intra SNpr + bicuculina intra CS (■) em anagramas do Atlas de Paxinos e Watson (1997).

Fig. 20- Representação esquemática de sítios de microinjeção de salina + anandamida intra SNpr + bicuculina intra CS (○); salina + cannabidiol intra SNpr + bicuculina intra CS (●); salina + AM251 intra SNpr + bicuculina intra CS (□); salina + AM630 intra SNpr + bicuculina intra CS (■) em anagramas do Atlas de Paxinos e Watson (1997).

Fig. 21- Representação esquemática de sítios de microinjeção de morfina + DMSO intra SNpr + bicuculina intra CS (◇); morfina + anandamida intra SNpr + bicuculina intra CS (○); morfina + canabidiol intra SNpr + bicuculina intra CS (●); morfina + AM251 intra SNpr + bicuculina intra CS (□); morfina + AM630 intra SNpr + bicuculina intra CS (■) em anagramas do Atlas de Paxinos e Watson (1997).

Fig. 22- Representação esquemática de sítios de microinjeção de naloxonazina + DMSO intra SNpr + bicuculina intra CS (◇); naloxonazina + anandamida intra SNpr + bicuculina intra CS (○); naloxonazina + canabidiol intra SNpr + bicuculina intra CS (●); naloxonazina + AM251 intra SNpr + bicuculina intra CS (□); naloxonazina + AM630 intra SNpr + bicuculina intra CS (■) em anagramas do Atlas de Paxinos e Watson (1997).

Fig. 23- Representação esquemática de sítios de microinjeção de nor-binaltorfimina + DMSO intra SNpr + bicuculina intra CS (◇); nor-binaltorfimina + anandamida intra SNpr + bicuculina intra CS (○); nor-binaltorfimina + canabidiol intra SNpr + bicuculina intra CS (●); nor-binaltorfimina + AM251 intra SNpr + bicuculina intra CS (□); nor-binaltorfimina + AM630 intra SNpr + bicuculina intra CS (■) em anagramas do Atlas de Paxinos e Watson (1997).

DISCUSSÃO

O bloqueio de receptores GABAérgicos no mesencéfalo dorsal foi seguido de uma exuberante ativação comportamental, caracterizada por alerta defensivo, imobilidade defensiva ou “congelamento”, e por vigorosas corridas e saltos, interpretadas como comportamento explosivo de fuga em todos os animais submetidos ao presente experimento. Recentemente, especialistas no estudo do comportamento de defesa e das bases neurais dos transtornos mentais têm sugerido que tais respostas defensivas, sejam elas desencadeadas por estimulação do mesencéfalo dorsal (RIBEIRO e col., 2005; CASTELLAN-BALDAN e col., 2006), sejam desencadeadas por estimulação do hipotálamo medial (SHEKHAR e col., 1994 FREITAS e col., 2009; WILENT e col., 2010), são um bom padrão para o estudo experimental da neurofarmacologia da síndrome do pânico.

Efetivamente, a estimulação elétrica e química de algumas estruturas mesencefálicas, tais como a substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPd), as camadas profundas do colículo superior (cpCS) e o colículo inferior (CI) eliciam respostas defensivas associadas ao medo (COIMBRA & BRANDÃO, 1993; OSAKI e col., 2003). A substância negra, rica em neurônios GABAérgicos, recebe aferências também GABAérgicas provenientes do corpo estriado e se projeta para o mesencéfalo dorsal, mais cranialmente, modulando o substrato neural responsável pelo processamento dos comportamentos defensivos e do medo no colículo superior (COIMBRA & BRANDÃO, 1993; EICHENBERGER e col., 2002).

Por conseguinte, o congelamento pode expressar uma resposta de inibição comportamental quando o animal está diante de um ataque em potencial, e a fuga pode ser resultado de uma ameaça direta, ou de um perigo proximal (BLANCHARD & BLANCHARD, 1989; BRANDÃO e col., 1994; PANDÓSSIO & BRANDÃO, 1999; BRANDÃO e cols., 2003). Os comportamentos defensivos também podem se expressar sob a forma de avaliação de risco e vigilância (GRAY, 1982; COIMBRA & BRANDÃO, 1993) e por imobilidade tônica (MENESCAL-DE-OLIVEIRA & HOFFMANN, 1993).

O presente trabalho mostrou evidências de que o bloqueio de receptores GABAérgicos, com microinjeções de bicuculina no colículo superior e nas colunas dorsais da substância cinzenta periaquedutal, induziu uma vigorosa resposta defensiva expressa por corridas e saltos, as quais parecem resultar da diminuição da

neurotransmissão GABAérgica no mesencéfalo dorsal e consequente interrupção momentânea do controle inibitório tônico exercido pelo GABA nos substratos neurais que processam estímulos aversão no colículo superior e na SCP (COIMBRA & BRANDÃO, 1993).

No entanto, assim como ocorre com a estimulação elétrica, as respostas defensivas observadas após a estimulação química de estruturas mesencefálicas apresentam algumas diferenças dependendo da estrutura estimulada. Dessa forma, o comportamento rotacional é a resposta que acompanha o comportamento de fuga após a estimulação do colículo superior, e a fuga induzida pela estimulação da substância cinzenta periaquedutal dorsal é mais explosiva do que a observada após a estimulação do colículo inferior, muito embora a resposta de fuga organizada pelo colículo inferior seja mais duradoura (BRANDÃO e col., 1993; COIMBRA & BRANDÃO, 1993; BRANDÃO e col., 1999).

Com relação ao sistema GABAérgico, os pesquisadores sugerem o seu envolvimento na modulação da passagem de informações sensoriais distintas de natureza aversiva para cada estrutura mesencefálica, sendo que o processamento de respostas desencadeadas pelo medo nestas estruturas está relacionado com diferentes aspectos da reação defensiva. Assim sendo, a informação visual de natureza aversiva seria em parte processada no colículo superior, a informação nociceptiva na substância cinzenta periaquedutal dorsal e a auditiva no colículo inferior (BRANDÃO e col., 1994; BRANDÃO e col., 1999).

Pesquisas anteriores verificaram que neurônios GABAérgicos estriado-nigrais têm uma forte influência inibitória nas células da substância negra, parte reticulada (FALLON & LAUGHLIN, 1995; BOLAM e cols., 2000). Esta inibição afeta neurônios de projeção nigro-tectal, os quais também são inibitórios (CHEVALIER e cols., 1981; COIMBRA e col., 1989; COIMBRA & BRANDÃO, 1993; EICHENBERGER e cols., 2002). Outros trabalhos também demonstram que há um número maior de receptores GABA_A nos corpos celulares da substância negra, parte reticulada, comparado com o de receptores GABA_B (BOWERY e cols., 1987; NG & YUNG, 2000). Tem sido postulado que sobre tais receptores GABA_A da SNpr, agem vias GABAérgicas estriado-nigrais, modulando projeções também GABAérgicas nigro-tectais que culminam na modulação de respostas defensivas relacionadas a ataques de pânico (CASTELLAN-BALDAN e col., 2006).

Trabalhos prévios (FARDIN e cols. 1984a,b; BANDLER & DEPAULIS, 1988; LOVICK, 1993; DEPAULIS e cols, 1992) demonstraram que a estimulação das colunas dorso-lateral e ventro-lateral (SCPvl) da SCP poderia produzir efeito antinociceptivo, sendo a analgesia que segue a ativação dos aspectos dorsais da SCP precedida por reações motoras explosivas (comportamento de fuga).

Com efeito, há relatos sugerindo que comportamentos eliciados por estimulação de estruturas, como o complexo amigdalóide, a SCPvl, a SCPd, as cpCS e o núcleo central do CI (NCCI) podem estar sendo moduladas por um circuito opioide e não-opioide (GRAEFF, 1981; BRANDÃO e cols., 1988, 1993; COIMBRA & BRANDÃO, 1993; CARDOSO e cols., 1994; SCHWEIMER e cols., 2005; COIMBRA e cols., 2006), e a antinocicepção que segue tais reações defensivas pode ter parte de seus mecanismos sediada nos núcleos do sistema endógeno de inibição de dor (FREITAS e cols., 2005; COIMBRA e cols., 2006).

Conexões anatômicas têm sido demonstradas entre o CI, o colículo superior (CS) e SCPd (KUDO & NIIMI 1980; MEININGER e cols., 1986; HERRERA e cols., 1988; HUFFMAN & HENSON, 1990; COIMBRA e cols., 1998; BRANDÃO e cols., 1999; FREITAS e cols., 2005), e entre os aspectos ventrais da SCP e o hipotálamo (LEITE-PANISSI e cols., 2003), estruturas essas que, ao serem eletricamente estimuladas, evocam processos antinociceptivos (COIMBRA e cols., 1992; COIMBRA & BRANDÃO, 1997; LI e cols., 2004; COIMBRA e col., 2006). Tem sido postulado que os núcleos opioides, noradrenérgicos e serotoninérgicos do sistema endógeno de inibição de dor possam se apresentar como estruturas-chave em fenômenos antinociceptivos diversos (FREITAS e cols., 2005; MIYASE e cols., 2005).

Os presentes resultados demonstraram também que o pré-tratamento da substância negra, parte reticulada com morfina, uma droga opiácea com maior afinidade por receptores opioides do tipo μ , causou um efeito facilitador da ação pró-aversiva do bloqueio de receptores GABA_A no teto mesencefálico, tendo sido aumentadas a incidência e duração do comportamento de alerta defensivo, o que foi estatisticamente diferente do efeito do pré-tratamento da SNpr com o antagonista de receptores opioides do tipo κ , mas não do tipo μ . O pré-tratamento da SNpr com morfina ainda causou uma tendência não estatisticamente significativa de exacerbar o efeito da microinjeção de bicuculina no *tectum* sobre as respostas de imobilidade defensiva, fuga, saltos e aumento do número de cruzamentos, quando comparado com o grupo submetido apenas ao bloqueio GABAérgico no mesencéfalo dorsal, sem nenhum tratamento da SNpr com

agonistas opióides. Não obstante, o pré-tratamento da SNpr com morfina foi tão ou mais eficaz em induzir essas últimas respostas quanto ao tratamento do teto mesencefálico apenas com bicuculina, não precedido pela desinibição das vias nigro-tectais inibitórias.

Corroborando esses achados, o pré-tratamento da SNpr com naloxonazina ou com nor-binaltorfimina tende a deprimir a ação pró-aversiva da bicuculina administrada no teto mesencefálico, pelo menos no que se refere à expressão do comportamento de congelamento e de fuga explosiva, reações comportamentais que têm sido sugeridas como modelos experimentais de ataques de pânico (BORELLI e col., 2004; RIBEIRO e col., 2005).

O pré-tratamento da divisão reticulada da substância negra com agonistas de receptores endocanabinoides, seguido do bloqueio de receptores GABAérgicos do tipo A no teto mesencefálico causou um claro efeito pró-aversivo, principalmente, no que se refere à anandamida; efeito que foi antagonizado na maioria dos casos tanto com o bloqueio de receptores canabinoides CB₁ quanto CB₂. Houve um aumento nos comportamentos de cruzamentos, de frequência e tempo de alerta, na frequência e tempo de congelamento, na frequência e no tempo de fuga, na frequência e tempo de rotação e também na frequência e tempo de saltos. Observou-se que os antagonistas canabinoides CB₁ e CB₂ antagonizaram esses efeitos pró-aversivos dos agonistas canabinoides em relação comportamentos de cruzamentos, frequência e tempo de rotação, frequência e tempo de saltos, frequência e tempo de alerta, frequência e tempo de congelamento e também na frequência e no tempo de fuga. Curiosamente, evidência de efeito antiaversivo do canabidiol sobre o medo condicionado foi demonstrada recentemente (LEMOS e cols., 2010). Contudo, tais achados se referem ao medo organizado no córtex pré-frontal. Não obstante, mesmo considerando a SCP, encontra-se na literatura evidências de que o canabidiol também causa efeitos antiaversivos (MOREIRA e col., 2009). Uma possibilidade de explicar esse aparente paradoxo entre os presentes resultados e aqueles obtidos por outros grupos, é a possibilidade de que a microinjeção de agonistas de receptores endocanabinoides na divisão reticulada da substância negra, rica em neurônios GABAérgicos que se projetam para o mesencéfalo dorsal, promoverem uma diminuição de atividade de tais vias inibitórias que deprimem a resposta de neurônios do teto mesencefálico à estimulação aversiva, culminando em um efeito final pró-aversivo do canabidiol e da anandamida administrados na SNpr. Evidências de desinibição da via GABAérgica nigro-tectal por meio de vias intra mesencefálicas inibitórias já foram descritas na literatura (RIBEIRO e col., 2005;

CASTELLAN-BALDAN e col., 2006), muito embora relacionadas a potenciais pós-sinápticos inibitórios de interneurônios opioides. O pré-tratamento da substância negra, parte reticulada com morfina, seguida de microinjeção de anandamida causou um aumento nos comportamentos de frequência e tempo de alerta, frequência e no tempo de fuga, frequência e no tempo de rotação e também na frequência e no tempo de saltos, quando administrados morfina seguida de antagonistas endocanabinoides observamos que os antagonistas tanto CB₁ e CB₂ antagonizaram esses efeitos. Evidências de efeito pró-aversivo da morfina em respostas de defesa foram recentemente demonstradas no mesencéfalo dorsal (CALVO & COIMBRA, 2006).

Já o pré-tratamento da substância negra, parte reticulada com antagonistas de receptores opioides do tipo μ_1 e κ seguidos da microinjeção de anandamida ou canabidiol na mesma estrutura causou diminuição dos comportamentos de cruzamentos, da frequência e tempo de rotação, frequência e tempo de saltos, frequência e tempo de alerta, frequência e tempo de congelamento e também na frequência e no tempo de fuga, ou seja, um claro efeito antipânico, mas que não foi antagonizado pelo antagonista de receptores CB₁ nem de CB₂. Efeitos antipânico de antagonistas opioides já foram demonstrados no teto mesencefálico (COIMBRA e col. 1996; 2000; EICHENBERGER e col., 2002). Também há evidências de que o pré-tratamento da divisão reticulada da substância negra com antagonista seletivo de receptores opioides do tipo μ eleva os limiares do comportamento de fuga eliciado pela estimulação elétrica da SCPd e das cpCS (RIBEIRO e col., 2005). Interação entre vias opioides e canabinoides já foram também demonstradas (MANZANARES e col., 1999).

Recentemente, foram demonstradas evidências morfológicas e neurofarmacológicas da presença de uma via opioide de alça curta intramesencefálica, e de uma via opioide de alça longa de projeção tecto-nigral, que modulam a atividade da via GABAérgica nigro-tectal por meio de inibição pré-sináptica intratectal e por meio de sinapses axo-somáticas intra-nigrais, respectivamente (EICHENBERGER e col., 2002; RIBEIRO e col., 2005; CASTELLAN-BALDAN e col., 2006).

É possível que a modulação da sensibilidade do teto mesencefálico ao bloqueio de receptores GABAérgicos, através do pré-tratamento da SNpr com morfina, ou com antagonistas seletivos de receptores opioides possa dever-se à facilitação ou inibição da atividade da via opioide tecto-nigral, cuja atividade final seria, respectivamente, a inibição ou liberação da atividade da via GABAérgica nigro-tectal.

Evidências recentes sugerem que a manipulação de neurotransmissão de canabinóides pode ter efeitos sobre a aquisição e expressão de condicionamento de medo contextual. Estudos demonstraram que a redução da ativação de receptores CB₁ com a administração do antagonista CB₁ leva a uma diminuição na expressão do medo condicionado, enquanto que a administração de agonista CB₁ levou a um aumento da expressão do medo (HALLER e cols., 2002). Além disso, outro estudo recente observou que a administração do antagonista CB₁ AM251 também diminuiu a aquisição do medo contextual (ARENOS e cols., 2006). No entanto, estudos sugerem que o aumento da ativação do receptor CB₁ leva a um aumento na aquisição do medo (PAMPLONA e cols., 2006).

Estudos mostraram que uma dose alta de $\Delta^9\text{-THC}$, principal componente da *Cannabis sativa*, induziu a ansiedade e sintomas psicóticos. Estes efeitos do $\Delta^9\text{-THC}$ são significativamente reduzidos pelo Canabidiol (CBD), esta observação levou a suspeitar que o CBD possa ter ações ansiolíticas e/ou antipsicóticos em modelos animais e humanos (ZUARDI e cols., 2006).

O CBD tem uma baixa afinidade para os receptores canabinóides (PETITET e col., 1998; THOMAS e col., 1998), o que poderia explicar sua menor ação farmacológica em relação ao efeito da anandamida, observado no presente trabalho, mas pode aumentar as ações mediadas pelos endocanabinóides através da sua capacidade de inibir a hidrólise e/ou recaptção do endocanabinóide anandamida (BISOGNO e col., 2001).

Além das alterações observadas nos comportamentos relacionados ao medo e pânico, após microinjeção de bicuculina nas cpCS, investigamos se processos antinociceptivos são evocados após os comportamentos defensivos de medo, e se a neurotransmissão opioide/canabinoide da SNpr possui algum papel na modulação da analgesia decorrente do comportamento defensivo.

O bloqueio de receptores GABAérgicos do tipo A nas camadas profundas do colículo superior, com administrações locais de bicuculina foi seguido de um exuberante comportamento de defesa, seguido de elevação dos limiares nociceptivos, o que tem sido chamado de antinocicepção induzida pelo medo (COIMBRA e col., 1992; COIMBRA & BRANDÃO, 1997; COIMBRA e col., 2006). O pré-tratamento da SNpr com morfina, seguido do tratamento das cpCS com bicuculina aumentou os limiares nociceptivos por 50min, quando comparado com o grupo controle, o que corrobora o efeito pró-aversivo do pré-tratamento da SNpr com morfina. Efeito contrário foi obtido

com o pré-tratamento da SNpr com antagonistas seletivos de receptores opioides do tipo μ ou κ , como ao naloxonazina e a nor-binaltorfimina, respectivamente.

A ativação de vias endocanabinoides com anandamida, precedido pela ativação de vias opioides com morfina, na divisão reticulada da substância negra facilitou a elaboração da antinocicepção induzida pelo medo. O pré-tratamento da SNpr com os antagonistas seletivos de receptores opioides, naloxonazina ou nor-binaltorfimina seguido da microinjeção de anandamida na SNpr e de bicuculina nas cpCS, diminuiu os limiares nociceptivos, quando comparado com seus respectivos grupos controles. Os antagonistas canabinoides não afetaram os efeitos antinociceptivos dos antagonistas opioides.

O presente trabalho mostrou que os canabinoides aumentaram significativamente a potência da morfina no teste de retirada de cauda (SMITH e cols., 1998). O AM251, uma droga antagonista seletiva de receptores CB₁, quando administrada na SNpr, reduziu a facilitação causada pelo pré-tratamento da SNpr com morfina sobre a analgesia induzida pelo medo, o que não foi corroborado pelo pré-tratamento da SNpr com o AM630, um antagonista seletivo de receptores CB₂. Isso sugere que o efeito facilitatório sobre a antinocicepção da morfina na SNpr, depende, pelo menos em parte, da ativação de vias endocanabinoides, recrutando receptores CB₁ e não CB₂. Com efeito, achados prévios sugerem que a potencialização causada pela morfina da analgesia induzida por Δ^9 -tetra-hidrocanabinoide recruta receptores opioides do tipo μ e κ (RECHE e cols., 1996). Um recente estudo demonstrou ainda que agonistas com maior afinidade por receptores opioides μ , como a morfina, mas não agonistas de receptores κ ou δ , induzem antinocicepção mediada por receptores canabinoides (PACHECO e cols., 2009). Além disso, estudos mostraram que antagonistas de receptores opioides κ , bloquearam apenas o efeito antinociceptivo da THC com nenhum efeito sobre a hipoatividade, a hipotermia, ou a catalepsia (SMITH et al., 1994; WELCH e cols., 1999).

Em conclusão, o presente trabalho mostra uma clara interação entre vias opioides e aquelas mediadas por neurotransmissores endocanabinoides da substância negra, parte reticulada, na modulação do comportamento que tem sido relacionado ao medo inato e a ataques de pânico, sendo recrutados receptores endocanabinoides do tipo CB₁ e CB₂ do mesencéfalo ventral, ao lado de receptores opioides do tipo μ e κ na modulação de vias GABAérgicas de projeção nigro-tectal.

CONCLUSÃO

- ✓ O bloqueio dos receptores GABA_A nas camadas profundas do colículo superior induz um conjunto de respostas comportamentais quem têm sido associadas ao medo inato e ao pânico, que foram seguidas por antinocicepção subsequente ao medo inato, pois a microinjeção de antagonista de receptores GABA_A (bicuculina) nas camadas profundas do colículo superior induziram comportamentos defensivos, seguidos pela elevação nos limiares nociceptivos.
- ✓ O pré-tratamento na substância negra, parte reticulada, com agonistas opioides e canabinoides aumentou significativamente a expressão dos comportamentos defensivos e, conseqüentemente, a antinocicepção induzida por reações de defesa. Um resultado oposto foi obtido com o pré-tratamento da divisão reticulada da substância negra com antagonistas opioides e canabinoides, o que sugere que esse fenômeno recruta receptores opioides do tipo μ e κ , e, eminentemente, receptores canabinoides do tipo CB₁.
- ✓ A interação de um agonista opioide (morfina) e de um antagonista canabinoide seletivo para receptores do tipo CB₁ na substância negra, parte reticulada, diminuiu significativamente os comportamentos defensivos e a antinocicepção induzida por reações de defesa, o que sugere que o receptor CB₁ encontra-se envolvido tanto no efeito pró-aversivo da morfina como na elaboração da antinocicepção induzida pelo medo.
- ✓ A interação entre um agonista opioide (morfina) e um antagonista de receptores canabinoides do tipo CB₂ na substância negra, parte reticulada, diminuiu significativamente os comportamentos defensivos, mas aumentou a antinocicepção induzida por reações de defesa, o que sugere uma dissociação entre respostas de defesa e antinocicepção, envolvendo receptores opioides e endocanabinoides do tipo CB₂ da SNpr.
- ✓ Pelo menos parte do efeito pró-aversivo da morfina tem suas bases neurais no mesencéfalo ventral e depende da interação entre vias opioide e endocanabinoides.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACETO MD, SCATES SM, LOWE JA, MARTIN BR. *Dependence on delta9-tetrahydrocannabinol: studies on precipitated and abrupt withdrawal.* **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 1996;278:1290–5.

ACETO MD, SCATES SM, LOWE JA, MARTIN BR. *Spontaneous and precipitated withdrawal with a synthetic cannabinoid, WIN 55,212-2.* **Eur. J. Pharmacol.** 2001;416:75-81.

ACETO MD, SCATES SM, RAZDAN RK, MARTIN BR. *Anandamide, an endogenous cannabinoid, has a very low physical dependence potential.* **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 1998; 287:598- 605.

ADAMS JC & WENTHOLD. *Distribution of putative amino acid transmitters, choline acetyltransferase and glutamate decarboxylase in the inferior colliculus.* **Neurosci.** 1979; 4: 1947-1951.

ADAMS DB. *Brain mechanisms for offense and submission.* **Behav. Brain. Sci.** 1979; 2: 201-241.

ARENOS JD, MUSTY RE, BUCCI DJ. *Blockade of cannabinoid CB(1) receptors alters contextual learning.* **Eur. J. Pharmacol.** 2006 Jun 13;539(3):177-83. Epub 2006 Apr 27.

AUDI EA, SNYDER RL, MERZENICH MM. *The topographic organization of corticocollicular projections from physiologically identified loci in the AI, AII, and anterior auditory cortical fields of the cat.* **Eur. J. Pharmacol.** 1987; 135: 225-229.

AYHAN IH, KAYMAKCALAN S, TULUNAY FC. *Interaction between delta 9-tetrahydrocannabinol and morphine on the motor activity of mice.* **Psychopharmacology** 1979; 63:169–72.

BALS-KUBIK R, HERZ A, SHIPPENBERG TS. *Evidence that the aversive effects of opioid antagonists and kappa-agonists are centrally mediated.* **Psychopharmacol. (Berl)** 1989; 98: 203-206

BANDLER, R. & DEPAULIS, A. *Elicitation of intraspecific defence reactions in the rat from midbrain periaqueductal grey by microinjection of kainic acid, without neurotoxic effects.* **Neurosci. Lett.** 1988; 3: 291-6,

BANDLER, R., CARRIVE, P. *Integrated defense reaction by excitatory amino acid microinjection in the midbrain periaqueductal grey region of the unrestrained cat.* **Brain Res.** 1988; 439 (1-2): 106,

BASBAUM AI, MARLEY NJ, O'KEEFE J, CLANTON CH. *Reversal of morphine and stimulus-produced analgesia by subtotal spinal cord lesions.* **Pain.** 1977; Feb;3(1):43-56.

BASILICO L, PAROLARO D, COLLEONI M, COSTA B, GIAGNONI G. *Cross-tolerance and convergent dependence between morphine and cannabimimetic agent WIN 55,212-2 in the guinea-pig ileum myenteric plexus.* **Eur. J. Pharmacol.** 1999; 376:265– 71.

BECHARA A, VAN DER KD. *Opposite motivational effects of endogenous opioids in brain and periphery.* (1985) **Nature** 314: 533-534.

BEITZ, AJ. et al. *Differential origin of brainstem serotonergic projections to the midbrain periaqueductal gray and superior colliculus of the rat.* **The Journal of Comparative Neurology.** 1986; v. 250, p. 498-509.

BELTRAMO, M.; BERNARDINI, N.; BERTORELLI, R.; CAMPANELLA, M.; NICOLUSSI, E.; FREDDUZZI, S.; REGGIANI, A. *CB2 receptor-mediated antihyperalgesia: possible direct involvement of neural mechanisms.* **Eur. J. Neurosci.** 2006; v. 23, n. 6, p.1530-8, mar.

BEN-ARI, Y. **The Amygdaloid Complex**, Y. Ben-Ari (ed.), Elsevier, Amsterdam, 1981.

BERRENDERO F, MALDONADO R. *Involvement of the opioid system in the anxiolytic-like effects induced by Delta (9)-tetrahydrocannabinol.* **Psychopharmacology** 2002;163:111-7.

BHARGAVA HN, MATWYSHYN GA. *Influence of thyrotropin releasing hormone and histidyl-proline diketopiperazine on spontaneous locomotor activity and analgesia induced by delta9-tetrahydrocannabinol in the mouse.* **Eur. J. Pharmacol.** 1980; 68:147– 54.

BHARGAVA, HN. *Multiple opiate receptors of brain and spinal cord in opiate addiction.* **Gen. Pharmacol.** 1991; 22:767– 72.

BISOGNO T, HANUS L, DE PETROCELLIS L, TCHILIBON S, PONDE DE, BRANDI I, MORIELLO AS, DAVIS JB, MECHOULAM R, DI MARZO V. *Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide.* **Br. J. Pharmacol.** 2001 Oct;134(4):845-52.

BLANCHARD, DC. & BLANCHARD, RJ. *Innate and conditioned reactions to threat in rats with amygdaloid lesions*. **J. Comp. Physiol. Psychol.** 1972; 81: 281-293.

BLANCHARD, DC, BLANCHARD, RJ, LEE, E.M.C. & NAKAMURA, S.. *Defensive behaviours in rats following septal and septal-amygdala lesions*. **J. Comp. Physiol. Psychol.** 1979; 93: 378-390,

BLOOM AS, DEWEY WL. *A comparison of some pharmacological actions of morphine and delta9-tetrahydrocannabinol in the mouse*. **Psychopharmacology (Berl)**. 1978 May 31;57(3):243-8.

BODNAR RJ. *Supraspinal circuitry mediating opioid antinociception: antagonist and synergy studies in multiple sites*. **J. Biomed. Sci.** 2000; May-Jun;7(3):181-94. Review.

BOLAM, JP.; HANLEY, JJ.; BOOTH, PA. & BEVAN, MD. *Synaptic organization of the basal ganglia*. **J. Anat.**, 2000; 196: 527-542.

BOLAM, JP.; SOMOGYI, P.; TOTTERDELL, S. & SMITH, AD. *A second type of striatonigral neuron: a comparison between retrogradely labelled and Golgi-stained neurons at the light and electron microscopic levels*. **Neurosci.**, 1981; 6: 2141-2157.

BORELLI, KG.; NOBRE, NJ.; BRANDÃO, ML. & COIMBRA, NC. *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: 557–566, 2004.

BORGES PC., COIMBRA NC.; BRANDÃO ML. *Independence of aversive and pain mechanisms in the dorsal periaqueductal gray matter of the rat*. (1988) **Braz. J. Med. Biol. Res.** 21: 1027-1031

BOVIER P, BROEKKAMP CL, LLOYD KG. *Enhancing GABAergic transmission reverses the aversive state in rats induced by electrical stimulation of the periaqueductal grey region*. **Brain. Res.** 1982; 248: 313-320.

BOWERY, NG.; HUDSON, AL. & PRICE, GW. *GABA-A and GABA-B receptors site distribution in the rat central nervous system*. **Neuroscience** 1987; 20: 365-383.

BRANDÃO, ML. & TOMAZ, C.; LEÃO-BORGES, P. C.; COIMBRA, N. C. & BAGRI, A. *Defense reaction induced by microinjections of bicuculine into inferior colliculus*. **Physiol. Behav.** 1988; 44: 361-365.

BRANDÃO, ML.; AGUIAR, JC. & GRAEFF, FG. – *GABA mediation of the antiaversive action of the minor tranquilizers*. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 1982; 16: 397-402.

BRANDÃO, ML.; ANSELONI, VZ.; PANDÓSSIO, JE.; DE ARAÚJO, JE. & CASTILHO, VM. *Neurochemical mechanisms of the defensive behavior in the dorsal midbrain*. **Neurosci. Biobehav. Rev.** 1999; 23: 863-875.

BRANDÃO, ML.; CARDOSO, SH.; MELO, LL.; MOTTA, V. & COIMBRA, NC. *The neural substrate of defensive behavior in the midbrain tectum*. **Neurosci. Biobehav. Rev.** 1994; 18: 339-346.

BRANDÃO, ML., CABRAL, AM., VASQUEZ, EC. AND SCHIMITT, P. *Chlordiazepoxide and mophine reduce pressor response to brain stimulation in awake rats*. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 1985 23: 1069-1071.

BRANDÃO, ML.; COIMBRA, NC. & LEÃO-BORGES, PC. *Effects of morphine and midazolam on reactivity to peripheral noxious and central aversive stimuli*. **Neurosci. Biobehav. Rev.** 1990; 14: 495-499.

BRANDÃO, ML.; LOPEZ-GARCIA, JA.; GRAEFF, FG. & ROBERTS, MHT. *Electrophysiological evidence for excitatory 5-HT₂ and depressant 5-HT_{1A} receptors on neurones of the rat midbrain tectum*. **Brain Res.**, 1991; 556: 259-266.

BRANDÃO, ML.; MELO, LL. & CARDOSO, SH. *Mechanisms of defense in the inferior colliculus*. **Behav. Brain Res.** 1993; 58: 49-55.

BRANDÃO, ML.; TOMAZ, C.; LEÃO-BORGES, PC.; COIMBRA, NC. & BAGRI, A. *Defence reaction induced by microinjections of bicuculline into the inferior colliculus*, **Physiol. Behav.**, 44: 361-365, 1988.

BRANDÃO, ML.; TRONCOSO, AC.; SILVA, MAS. & HUSTON, JP. - *The relevance of neuronal substrates of defense in the midbrain tectum to anxiety and stress: empirical and conceptual considerations*. **European Journal of Pharmacology**. 2003b; 463:225–233.

BRANDÃO, ML; COIMBRA, NC.; Osaki, MY. *Changes in the evoked-potentials by fear-evoking stimulations*. **Physiol. Behav.** 2001;72 (3): 365-372.

BRODAL, P. *The central nervous system: Structure and fuction*. New York: Oxford University Press; 1992.

BUCKLEY NE, MCCOY KL, MEZEY E, BONNER T, ZIMMER A, FELDER CC, GLASS M, ZIMMER A. *Immunomodulation by cannabinoids is absent in mice deficient for the cannabinoid CB(2) receptor*. **Eur. J. Pharmacol.** 2000;396:141–149.

BURROWS; M. ROTH e R. NOYERS Jr. (eds.), vol. 3, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp. 3-58, 1990.

BUTTARELLI FR, PONTIERI FE, MARGOTTA V, PALLADINI G. *Cannabinoid-induced stimulation of motor activity in planaria through an opioid receptormediated mechanism*. **Prog. Neuropsychopharmacol Biol. Psychiatry**. 2002; 26:65–8.

CALVO, F & COIMBRA, NC. *Interactions between opioid-peptides-containing pathways and GABA_A –receptors-mediated systems modulate panic-like-induced behaviors elicited by electric and chemical stimulation of the inferior colliculus*. **Brain Research**. 2006; 1104: 92-102.

CARDOSO, SH.; MELO, LL.; COIMBRA, N C. & BRANDÃO, ML. *Opposite effects of low and high doses of morphine on neuronal substrates of aversion in the inferior colliculus*. **Behav. Pharmacology**, 1992; 3: 489-495.

CARDOSO, SH.; COIMBRA, NC. & BRANDÃO, ML. *Defensive reactions evoked by activation of NMDA receptors in distinct sites of the inferior colliculus*. **Behav. Brain Res.**, 1994; 63: 17-24.

CARPENTER, MC. **Neuroanatomia Humana**. Tradução Renê Dottori Leibinger & Raphael Korn-Adler. 7. Ed. Rio de Janeiro: Interamericana. 1978.

CARPENTER, MC. *Core texto of neuroanatomy*. 4. Ed. Baltimore: Williams & Wilkins. 1991.

CARRIVE, P. *The periaqueductal gray and defensive behavior: functional representation and neuronal organization*. **Behav. Brain Res**. 1993; 58: 27-47.

CASTELLAN-BALDAN L, DA COSTA KAWASAKI M, RIBEIRO SJ, CALVO F, CORRÊA VM, COIMBRA NC. *Topographic and functional neuroanatomical study of GABAergic disinhibitory striatum-nigral inputs and inhibitory nigrocollicular pathways: neural hodology recruiting the substantia nigra, pars reticulata, for the modulation of the neural activity in the inferior colliculus involved with panic-like emotions*. **J. Chem. Neuroanat.** 2006; 32(1):1-27.

CHAPMAN V. *The cannabinoid CB1 receptor antagonist, SR141716A, selectively facilitates nociceptive responses of dorsal horn neurones in the rat*. **Br. J. Pharmacol.** 1999;127:1765–1767.

CHEBIB, M. & JOHNSTON, GAR. - *The “ABC” of GABA receptors: A Brief review. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 1999; 26: 937–940.

CHEVALIER, G.; THIERRY, AM.; SHIBASAKI, T. & FEGER, J. *Evidence for a GABAergic inhibitory nigro-collicular pathway in the rat. Neurosci. Lett.* 1981; 21: 67-70.

CHILDERS, SR. *Opioid receptor-coupled second messenger systems. Life Sci.*, 1991; 48: 1991-2003.

CHILDERS, SR.; FLEMING, L.; KONKOY, C.; MARCKEL, D.; PACHECO, M.; SEXTON, T.; et al. *Opioid and cannabinoid receptor inhibition of adenylyl cyclase in brain. Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1992; 654: 33-51.

CICHEWICZ, DL. *Synergistic interactions between cannabinoid and opioid analgesics. Life Sci* 2004; 74: 1317– 24.

COHEN C, PERRAULT G, VOLTZ C, STEINBERG R, SOUBRIE P. *SR141716, a central cannabinoid (CB1) receptor antagonist, blocks the motivational and dopamine-releasing effects of nicotine in rats. Behav Pharmacol* 2002; 13: 451– 63.

COIMBRA, NC. & BRANDÃO, ML. – *Effects of 5 HT2 receptors blockade on fear-induced analgesia elicited by electrical stimulation of the deep layers of the superior colliculus and dorsal periaqueductal gray. Behav. Brain Res.* 1997; 87: 97-103.

COIMBRA, NC.; DE OLIVEIRA, R.; FREITAS, RL.; RIBEIRO, SJ.; BORELLI, K. G.; PACAGNELLA, RC.; MOREIRA, J. E.; DA SILVA, L. A.; MELO, L. L.; LUNARDI, L. O. & BRANDÃO, M. L. *Neuroanatomical approaches of the tectum-reticular pathways and immunohistochemical evidence for serotonin-positive perikarya on neuronal substrates of the superior colliculus and periaqueductal gray matter involved in the elaboration of the defensive behavior and fear-induced analgesia. Exp. Neurol.*, 2006; 197: 93–112.

COIMBRA, NC.; KAWASAKI, MC.; CISCATO, JR., JG.; CARDOSO, SH. & CORRÊA SAL. – *Nigro-tectal pathway: neuroanatomy and role on defensive behaviour elicited by midbrain tectum stimulation. Soc. Neurosci. Abstr.* 1998; 24: 1930.

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

COIMBRA, NC. & BRANDÃO, ML. *GABAergic nigro-collicular pathways modulate the defensive behaviour elicited by midbrain tectum stimulation.* **Behav. Brain. Res.**, 1993; 59: 131-139.

COIMBRA, NC.; EICHENBERGER, GCD.; GORCHINSKI, RT. & MAISONNETTE, S. *Effects of opioid receptor blockade on defensive reactions elicited by electrical stimulation within the deep layers of the superior colliculus and DPAG.* **Brain Res.**, 1996; 736: 348-352.

COIMBRA, NC.; EICHENBERGER, GCD.; OSAKI, MY.; CISCATO Jr., JG.; BIOJONE, CR. & JUCÁ, CEB.. *Effects of opioid receptor blockade on defensive behaviour elicited by electrical stimulation of the inferior colliculus in Rattus norvegicus (Rodentia, Muridae).* **Psychopharmacology**, 2000;152: 422-430.

COIMBRA, NC.; LEÃO-BORGES, PC. & BRANDÃO, ML. *GABAergic fibers from substantia nigra, pars reticulata, modulate escape behaviour induced by midbrain central gray stimulation,* **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, 1989; 22: 111-114.

COMPTON DR, JOHNSON MR, MELVIN LS, MARTIN BR. *Pharmacological profile of a series of bicyclic cannabinoid analogs: classification as cannabimimetic agents.* **J. Pharmacol. Exp. Ther** 1992;260:201-9.

COMPTON DR, ACETO MD, LOWE J, MARTIN BR. *In vivo characterization of a specific cannabinoid receptor antagonist (SR141716A), inhibition of delta 9-tetrahydrocannabinol-induced responses and apparent agonist activity.* **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 1996; 277:586-594.

CONTRERAS NE. & BACHELARD HS. *Some neurochemical studies on auditory regions of mouse brain.* **Exp. Brain Res.** 1979 36: 573-584.

CORCHERO J, AVILA MA, FUENTES JA, MANZANARES J. *Delta 9-tetrahydrocannabinol increases prodynorphin and proenkephalin gene expression in the spinal cord of the rat.* **Life Sci.** 1997; 61 :L39-L43.

CORCHERO J, MANZANARES J, FUENTES JA. *Cannabinoid/opioid crosstalk in the central nervous system.* **Crit Rev Neurobiol.** 2004; 16 :159-172.

CRAVATT BF, DEMAREST K, PATRICELLI MP, BRACEY MH, GIANG DK, MARTIN BR, LICHTMAN AH. *Supersensitivity to anandamide and enhanced endogenous cannabinoid signaling in mice lacking fatty acid amide hydrolase.* **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 2001; 98:9371-9376.

CZLONKOWSKI, A.; STEIN, C.; HERTZ, A. *Peripheral mechanisms of opioid antinociception in inflammation: involvement of cytokines.* **Eur. J. Pharmacol.**, 1993;110: 193-198.

DANNER H, PFISTER C. *7 types of neurons in the substantia nigra of the rat. Golgi rapid-impregnation study.* **J. Hirnforsch.** 1982; 23(5):553-6. German.

DENIAU, JM. & CHEVALIER, G. *The lamellar organization of the rat substantia nigra pars reticulata: distribution of projection neurons.* **Neuroscience**, 1992; 46: 361-377.

DE PAULIS A, PECHNICK RN, LIEBESKIND JC. *Relationship between analgesia and cardiovascular changes induced by electrical stimulation of the mesencephalic periaqueductal gray matter in the rat.* **Brain Res.** 1988; Jun 7;451(1-2):326-32.

DE PAULIS, A; KEAY, K A & BANDLER, R. *Longitudinal neuronal organization of defensive reactions in the midbrain periaqueductal gray region of the rat.* **Exp. Brain. Res.**, 1992; 2: 307-18.

DEVANE WA, DYSARZ FA 3RD, JOHNSON MR, MELVIN LS, HOWLETT AC. *Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain.* **Mol Pharmacol.** 1988;34:605–613.

DEVANE WA, HANUS L, BREUER A, PERTWEE RG, STEVENSON LA, GRIFFIN G, GIBSON D, MANDELBAUM A, ETINGER A, MECHOU-LAM R. *Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor.* **Science.** 1992; 258:1946–1949.

DEWEY WL. *Cannabinoid pharmacology.* **Pharmacol. Rev.** 1986;38:151–78.

DI CHIARA, G.; PORCEDDU, ML.; MORELI, M.; MULAS, ML. & GESSA, GL. *Evidence for a GABAergic projection from the substantia nigra to the ventro-medial thalamus and to the superior colliculus of the rat.* **Brain. Res.**, 1979; 176: 273-284.

DI MARZO V, FONTANA A, CADAS H, SCHINELLI S, CIMINO G, SCHWARTZ JC, PIOMELLI D. *Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons.* **Nature.** 1994;372:686–691.

DI MARZO V, BREIVOGEL CS, TAO Q, BRIDGEN DT, RAZDAN RK, ZIMMER AM, ZIMMER A, MARTIN BR. *Levels, metabolism, and pharmacological activity of anandamide in CB(1) cannabinoid receptor knockout mice: evidence for non-CB(1), non-CB(2) receptor-mediated actions of anandamide in mouse brain.* **J. Neurochem.** 2000 Dec;75(6):2434-44.

DI SCALA, G.; SCHMITT, P & KARLI, P – *Flight induced by infusion of bicuculine methiodide into periventricular structures.* **Brain Res.** 1984; 309: 199.

DOTY P, DYKSTRA LA, PICKER MJ. *Discriminative stimulus effects of phencyclidine: pharmacologically specific interactions with delta 9- and delta 8-tetrahydrocannabinol.* **Drug. Alcohol Depend.** 1994; 35: 151– 8.

EICHENBERGER, GCD. et al, *Neuroanatomical and psychopharmacological evidence for interaction between opioid and GABAergic neuronal pathways in the modulation of fear and defense elicited by electrical and chemical stimulation of deep layers of the superior colliculus and dorsal periaqueductal gray matter.* **Neuropharmacology.**, 2002;42: 48-59.

FALLON, JH. & LAUGHLIN, SE. *Substantia nigra.* In: Paxinos, G., Editor. *The rat nervous system*, Academic Press, Australia, 1985;353-374.

FALLON, JH.; HICKS, R. & LOUGHLIN, SE. *The origin of CCK terminals in the basal forebrain of the rat: evidence from immunofluorescence and retrograde tracing.* **Neurosci. Lett.**, 1983; 37: 29-35.

FANSELOW, MS. AND BOLLES, RC. *Triggering of the endorphin analgesia reaction by a cue previously associated with shock. Reversal by nalaxone.* **Bull. Psychon. Soc.**, 1979; 14: 88-90.

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

FANSELOW MS, CALCAGNETTI DJ, HELMSTETTER FJ. *Role of mu and kappa opioid receptors in conditional fear-induced analgesia: the antagonistic actions of nornalaltorphimine and the cyclic somatostatin octapeptide, Cys2Tyr3Orn5Pen7-amide.* **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 1989; Sep; 250(3):825-30.

FANSELOW, MS. *The midbrain periaqueductal gray as a coordinator of action in response to fear and anxiety.* In: **The Midbrain Periaqueductal Gray Matter: Functional, Anatomical and Immunohistochemical Organization**, A. Depaulis and R. Bandler (eds.), Plenum Publishing Corporation, New York, 1991; pp.151-173.

FARDIN, V.; OLIVERAS, JL. & BESSON, JM. - *A reinvestigation of the analgesic effects induced by stimulation of the periaqueductal gray matter in the rat. I. The production of behavioral side effects together with analgesia.* **Brain Res.** 1984a; 1-2:105-23.

FARDIN, V.; OLIVERAS, JL. & BESSON, JM. - *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 Res.**, 1984b; 1-2:125-39.

FARQUHAR-SMITH WP, EGERTOVA M, BRADBURY EJ, MCMAHON SB, RICE AS, ELPHICK MR. *Cannabinoid CB(1) receptor expression in rat spinal cord.* **Mol Cell. Neurosci.** 2000; 15 :510–521.

FATTORE L, DEIANA S, SPANO SM, COSSU G, FADDA P, SCHERMA M, FRATTA W. *Endocannabinoid system and opioid addiction: behavioural aspects.* **Pharmacol. Biochem. Behav.** 2005; Jun;81(2):343-59. Review.

FATTORE L, MARTELOTTA MC, COSSU G, MASCIA MS, FRATTAW. *CB1 cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 decreases intravenous cocaine selfadministration in rats.* **Behav. Brain. Res.** 1999;104:141– 6.

FAULL, R. L. M. & MEHLER, W. R. *The cells of origin of nigrotectal, nigrothalamic and nigrostriatal projections in the rat.* **Neuroscience**, 1978; 3: 989-1002.

FERNANDEZ de MOLINA, A. & HUNSPERGER, RW. *Central representation of affective reaction in forebrain and brain stem: electrical stimulation of amygdala, stria terminalis and adjacent structures.* **J. Physiol.**, 1959;145; 251-265.

FIELDS, HL. & BASBAUM, AJ. *Brainstem control of spinal pain-transmission neurons.* **Annu. Rev. Phys.**, 1978; 40:217-248.

FISHER SK. & DAVIES WE. *GABA and its related enzymes in the lower auditory system of the guinea pig.* **J. Neurochem.** 1976; 27: 1145-1155.

FREDERICKSON RC, HEWES CR, AIKEN JW. *Correlation between the in vivo and an in vitro expression of opiate withdrawal precipitated by naloxone: their antagonism by l-(Δ)-delta9-tetrahydrocannabinol.* **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 1976;199:375– 84.

FREITAS, RL., FERREIRA, CMR., RIBEIRO, SJ., CARVALHO, A. D., ELIAS-FILHO, D. H., GARCIA-CAIRASCO, N. & COIMBRA, N. C. *Intrinsic neural circuits between dorsal midbrain neurons that control fear-induced responses and seizure activity and nuclei of the pain inhibitory system elaborating postictal antinociceptive processes: a functional neuroanatomical and neuropharmacological study.* **Exp. Neurol.**, 191: 225-242, 2005.

FREUND TF, KATONA I, PIOMELLI D. *Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling.* **Physiol Rev.** 2003;83:1017–1066.

FRIDE E. *Endocannabinoids in the central nervous system: from neuronal networks to behavior*. **Curr. Drug Targets CNS Neuro. Disord.** 2005;4:633-642.

FUCHS, SAG. & SIEGEL, A. *Neural pathways mediating hypothalamically elicited flight behaviour in the cat*. **Brain Res.**, 1984;306: 263-281.

FUCHS, SAG.; EDINGER, HM. & SIEGEL, A. *The role of the anterior hypothalamus in affective defense behaviour elicited from the ventromedial hypothalamus of the cat*. **Brain Res.**, 1985; 330: 93-107.

FUENTES JA, RUIZ-GAYO M, MANZANARES J, VELA G, RECHE I, CORCHERO J. *Cannabinoids as potential new analgesics*. **Life Sciences**. 1999; 65 :675–685.

GAONI Y, MECHOULAM R. *Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish*. **J. Am. Chem. Soc.** 1964; 86:1646–1467.

GEBHART GF, SANDKÜHLER J, THALHAMMER JG, ZIMMERMANN M. *Inhibition of spinal nociceptive information by stimulation in midbrain of the cat is blocked by lidocaine microinjected in nucleus raphe magnus and medullary reticular formation*. **J Neurophysiol.** DEC; 1983; 50(6):1446-59.

GRACE, AA. & BUNNEY, BS. *Paradoxical GABA excitation of nigral dopaminergic cells: indirect mediation through reticulata inhibitory neurons*. **Eur. J. Pharmac.**, 1979; 59: 211-218.

GRAEFF FG.; BRANDÃO ML.; AUDI EA.; MILANI H. *Role of GABA in the antiaversive action of anxiolytics*. **Adv. Biochem. Psychopharmacol.** 1986; 42: 79-86.

GRAEFF, FG. *Ansiedade*. Em: **Neurobiologia das Doenças Mentais**, F.G.Graeff e M.L.Brandão (eds.),[2 ed.], Editora Lemos, São Paulo, pp. 109-144, 1993, a.

GRAEFF, FG. *Brain defense systems and anxiety*. Em: **Handbook of Anxiety**, M. ROTH; GD. BURROWS e R. NOYES (eds.), vol. 3, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp. 1990;307-354,.

GRAEFF, FG. *Minor tranquilizers and brain defense system*. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 1981;14: 239-265.

GRAY, JA. **Neuropharmacology of Anxiety**, Oxford University Press, New York, 1982.

GROFOVÁ, I., DENIAU, JM., KITAI, ST. & DONOGHUE, JP. *Neuronal interactions in the substantia nigra pars reticulata through axon collaterals of the projection neurons.* **Exp. Brain Res.**, 1982; 47: 105.

GROFOVÁ, I.; OTTERSEN, OP. & RINVIK, E. *Mesencephalic and diencephalic afferents to the superior colliculus and periaqueductal gray substance demonstrated by retrograde axonal transport of horseradish peroxidase in the cat.* **Brain Res.**, 1978; 146: 205-220.

GRUDT TJ, HENDERSON G. *Glycine and GABAA receptor-mediated synaptic transmission in rat substantia gelatinosa, inhibition by mu-opioid and GABAB agonists.* **J. Physiol.** 1998; 507:473–483.

GRUDT TJ, WILLIAMS JT. *mu-Opioid agonists inhibit spinal trigeminal substantia gelatinosa neurons in guinea pig and rat.* **J. Neurosci.** 1994; 14 :1646–1654.

GUIMARÃES, FS.; *Fundamentos de Psicofarmacologia*; Atheneu, 2000.

HAEFELY W. *Pharmacology of benzodiazepine antagonists.* **Pharmacopsych.** 1985;-18: 163-166

HALLER J, BAKOS N, SZIRMAY M, LEDENT C, FREUND TF. *The effects of genetic and pharmacological blockade of the CB1 cannabinoid receptor on anxiety.* **Eur. J. Neurosci.** 2002; Oct;16(7):1395-8.

HALPERN, M. *Effects of midbrain central gray matter lesions on escape avoidance behavior in rats.* **Physiol. Behav.**, 1968;3: 171-180.

HARTING, JK.; HUERTA, MF.; HASHIKAWA, R.; WEBER, JT. & VAN LIESHOUT, DP. *Neuroanatomical studies of the nigro-tectal projection in the cat.* **J. Comp. Neurol.**, 1988 ;278: 615-631.

HERKENHAM M, LYNN AB, JOHNSON MR, MELVIN LS, DE COSTA BR, RICE KC. *Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study.* **J. Neurosci.** 1991;11(2):563–583.

HERRERA, M.; SANCHEZ, DEL CAMPO, F.; RUIZ, A. & SMITH AGREDA, V. - *Neuronal relationships between the dorsal periaqueductal nucleus and the inferior colliculus (nucleus commissuralis) in the cat. A Golgi study.* **J. Anat.**, 158: 137-45,1, 1988.

HESS, W. & BRUGER, M. *Das subkortikale zentrum der affektiven abwereaktion.* **Helv. Physiol. Pharmacol. Acta.**, 1943;1: 33-52.

HILTON, SM. *The defence-arousal system and its relevance for circulatory and respiratory control.* **J. Exp. Biol.**, 1982;100: 159-174.

HILLARD, CJ.; POUNDS, JJ.; BOYER, DR.; BLOOM, AS. *Studies of the role of membrane lipid order in the effects of delta 9-tetrahydrocannabinol on adenylate cyclase activation in heart.* **J. Pharmacol. Exp. Ther.** Baltimore, v. 252, n. 3, p. 1075-1082, mar. 1990.

HOHMANN AG, BRILEY EM, HERKENHAM M. *Pre and postsynaptic distribution of cannabinoid and mu opioid receptors in rat spinal cord.* **Brain Res.** 1999; 822(1-2):17-25.

HOHMANN, AG., et al, *An endocannabinoid mechanism for stress-induced analgesia.* **Nature.**, 2005; vol 435/23.

HOWLETT AC, JOHNSON MR, MELVIN LS, MILNE GM. *Nonclassical cannabinoid analgetics inhibit adenylate cyclase: development of a cannabinoid receptor model.* **Mol Pharmacol.** 1988;33:297-302.

HOWLETT, AC. *Pharmacology of cannabinoid receptors.* **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** 1995;35:607- 34.

HOWLETT, AC.; BARTH, F.; BONNER, TI.; CABRAL, G.; CASELAS, P.; DEVANE, WA.; E COLS. International Union of Pharmacology. XXVII. *Classification of cannabinoid receptors.* **Pharmacol. Rev.**, 2002; Baltimore, v. 54, n. 2, p. 161-202, jun.

HUFFMAN RF & HENSON OW. *The descending auditory pathway and acoustic systems: connections with the inferior colliculus.* **Brain Res. Rev.** 1990; 15: 295-323.

HUFFMAN, RF. & HENSON, OW. JR. - *The descending auditory pathway and acousticomotor systems: connections with the inferior colliculus.* **Brain Res. Rev.**, 3: 295-323, 1990.

IBRAHIM MM, PORRECA F, LAI J, ALBRECHT PJ, RICE FL, KHODOROVA A, DAVAR G, MAKRIYANNIS A, VANDERAH TW, MATA HP, MALAN TP., JR *CB2 cannabinoid receptor activation produces antinociception by stimulating peripheral release of endogenous opioids.* **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 2005;102:3093-3098.

IMPERATO, A. & DI CHIARA, G. *Behavioural effects of GABA agonists infused in the mesencephalic reticular formation-deep layers of superior colliculus.* **Brain Res.**, 1981; 224: 184-194.

ISAACSON, RL.. **The Limbic System**, RL. Isaacson (ed.), 2 ed., Plenum Press, New York, 1982.

JACKSON, A. & CROSSMAN, A R. *Nucleus tegmenti pedunculopontinos: efferent connections with special reference to the basal ganglia, studied in the rat by anterograde and retrograde transport of horseradish peroxidase.* **Neuroscience**, 1983; 10: 725-765.

JENCK, F., SCHIMITT, AND KARLI, P. *Morphine injected into the periaqueductal gray attenuates brain stimulation-induced effects: An intensity discrimination study.* **Brain. Res.** 1986; 378: 274-284.

JENCK, F., SCHMITT, P. AND KARLI, P. *Morphine applied to the mesencephalic central gray suppresses brain stimulation escape.* **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 1983; 19: 301-308.

JENK, F., MOREAU JL. AND KARLI, P. *Modulation by morphine of aversive-like behavior induced by GABAergic blockade in periaqueductal gray or medial hypothalamus.* **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 1988; 331: 193-200.

JENNINGS EA, VAUGHAN CW, CHRISTIE MJ. *Cannabinoid actions on rat superficial medullary dorsal horn neurons in vitro.* **J. Physiol.** 2001;534:805–812.

KATHMANN M, FLAU K, REDMER A, TRÄNKLE C, SCHLICKER E. *Cannabidiol is an allosteric modulator at mu- and delta-opioid receptors.* *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 2006; Feb;372(5):354-61.

KATONA I, SPERLAGH B, MAGLOCZKY Z, SANTHA E, KOFALVI A, CZIRJAK S, MACKIE K, VIZI ES, FREUND TF. *GABAergic interneurons are the targets of cannabinoid actions in the human hippocampus.* **Neuroscience** 2000;100:797–804.

KIEFEL JM, COOPER ML, BODNAR RJ. *Serotonin receptor subtype antagonists in the medial ventral medulla inhibit mesencephalic opiate analgesia.* **Brain Res.** 1992; Dec 4;597(2):331-8.

KOHNO T, KUMAMOTO E, HIGASHI H, SHIMOJI K, YOSHIMURA M. *Actions of opioids on excitatory and inhibitory transmission in substantia gelatinosa of adult rat spinal cord.* **J. Physiol.** 1999; 518 :803–813.

KREITZER AC, REGEHR WG. *Cerebellar depolarization-induced suppression of inhibition is mediated by endogenous cannabinoids*. **J Neurosci**. 2001;21(RC174):1–5.

KUDO, M; NIIMI, K. *Ascending projections of the inferior colliculus in the cat: an autoradiographic study*. **The Journal of Comp. Neurol**. 1980; 191: 545-556.

LEÃO-BORGES, PC.; COIMBRA, NC. & BRANDÃO, ML. *Independence of aversive and pain mechanisms in the dorsal periaqueductal gray matter of the rat*. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 1988; 21: 1027-1031.

LEDENT C, VALVERDE O, COSSU G, PETITET F, AUBERT JF, BESLOT F, BOHME GA, IMPERATO A, PEDRAZZINI T, ROQUES BP, VASSART G, FRATTA W, PARMENTIER M. *Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice*. **Science**. 1999;283:401–404.

LEDENT C, VALVERDE O, COSSU G, PETITET F, AUBERT JF, BESLOT F. *Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice*. **Science** 1999; 283:401– 4.

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

LEMONS JI, RESSEL LB, GUIMARÃES FS. *Involvement of the prelimbic prefrontal cortex on cannabidiol-induced attenuation of contextual conditioned fear in rats*. **Behav Brain Res**. 2010 Feb 11;207(1):105-11. Epub 2009 Oct 2.

LI, N.; WEI, S. Y.; YU, L. C.; MORIYAMA, K.; MITCHELL, J. & PALMER, P. P. - *Role of nociceptin in the modulation of nociception in the arcuate nucleus of rats*. **Brain Res.**, 2004;1025: 67-74.

LICHTMAN AH, COOK SA, MARTIN BR. *Investigation of brain sites mediating cannabinoid-induced antinociception in rats, evidence supporting periaqueductal gray involvement*. **J. Pharmacol. Exp. Ther**. 1996;276:585–593.

LIEBESKIND, J.C.; GUILBAL, G.; BESSON, J.M.; OLIVERAS, J.L. *Analgesia from electrical stimulation of the periaqueductal gray matter in the cat: Behavioral observations and inhibitory effects on spinal cord interneurons*. **Brain Res.**, 1973; 50: 441-446.

LIM G, SUNG B, JI RR, MAO J. *Upregulation of spinal cannabinoid-1-receptors following nerve injury enhances the effects of Win 55,212-2 on neuropathic pain behaviors in rats.* **Pain.** 2003;105:275–283.

LOVICK, T.A. *The periaqueductal gray-rostral medulla connection in the defence reaction: efferent pathways and descending control mechanisms.* **Behav. Brain Res.** 1993; Dec 20;58(1-2):19-25. Review.

LYON, M.. *The role of central midbrain structures in conditioned responding to aversive noise in the rat.* **J. Comp. Neurol.**, 1964;122: 407-429.

MANCIA, G. & ZANCHETTI, A. *Hypothalamic control of autonomic functions.* Em: **Handbook of Hypothalamus**, P.J.MORGANI e J.PANKSEPP (eds.), 1981.

MANNING BH, MARTIN WJ, MENG ID. *The rodent amygdala contributes to the production of cannabinoid-induced antinociception.* **Neuroscience** 2003;120:1157–1170.

MANSOUR A, FOX CA, THOMPSON RC, AKIL H, WATSON SJ. *Mu opioid receptor mRNA expression in the rat CNS: comparison to mu-receptor binding.* **Brain Res.** 1994; 2: 245-65.

MANSOUR A, HOVERSTEN MT, TAYLOR LP, WATSON SJ, AKIL H. *The cloned mu, delta and kappa receptors and their endogenous ligands: evidence for two opioid peptide recognition cores.* **Brain Res.** Nov 1995; 27;700(1-2):89-98.

MANSOUR A, KHACHATURIAN H, LEWIS ME, AKIL H, WATSON SJ. *Anatomy of CNS opioid receptors.* **Trends Neurosci.** 1988;11(7):308– 314.

MANTYH, PW. *Connections of midbrain periaqueductal Gray in the monkey. II. Descending efferent projections.* **Journal of Neurophysiology**, 1983b.; v. 49, n.3. p. 582-94.

MANZANARES J, CORCHERO J, ROMERO J, FERNANDEZ-RUIZ JJ, RAMOS JA, FUENTES JA. *Pharmacological and biochemical interactions between opioids and cannabinoids.* **Trends Pharmacol. Sci.** 1999; 20 :287–294.

MANZANARES J, JULIAN M, CARRASCOSA A. *Role of the cannabinoid system in pain control and therapeutic implications for the management of acute and chronic pain episodes.* **Curr. Neuropharmacol.** 2006; Jul;4(3):239-57.

MARTIN BR, COMPTON DR, THOMAS BF, PRESCOTT WR, LITTLE PJ, RAZDAN RK, et al. *Behavioral, biochemical, and molecular modeling evaluations of cannabinoid analogs*. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 1991;40:471–8.

MARTIN WR. *Pharmacology of opioids*. **Pharmacol. Rev.** 1983; 35: 283-323

MARTIN, JH. – *Neuroanatomia*, (2 ed.) **Editora Artes Médicas**, Porto Alegre, 1998

MARTIN, WJ, et al. *Cannabinoid receptor-mediated inhibition of the rat tail-flick reflex after microinjection into the rostral ventromedial medulla*. **Neuroscience**. 1998; 242: 33-36.

MASSI P, VACCANI A, ROMORINI S, PAROLARO D. *Comparative characterization in the rat of the interaction between cannabinoids and opiates for their immunosuppressive and analgesic effects*. **J. Neuroimmunol.** 2001; 117:116– 24.

MASSI P, VACCANI A, RUBINO T, PAROLARO D. *Cannabinoids and opioids share cAMP pathway in rat splenocytes*. **J. Neuroimmunol.** 2003;145: 46–54.

MATSUDA LA, LOLAIT SJ, BROWNSTEIN MJ, YOUNG AC, BON-NER TI. *Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA*. **Nature** 1990;346:561–564.

MAY, PJ. & HALL, WC. *The sources of the nigrotectal pathway*. **Neuroscience**. 1986; 19: 159.

MAYER, DJ. & HAYES, RL. *Stimulation-produced analgesia: development of tolerance and cross-tolerance to morphine*. **Science.**, 1975;188: 941-943.

MAYER, DJ. & LIEBESKIND, JC. *Pain reduction by focal electrical stimulation of the brain: an anatomical and behavioral analisys*. **Brain Res.**, 1974; 68: 73-93.

MAYER, DJ. & PRICE, DD. *Central nervous system: mechanisms of analgesia*. **Pain**. 1976;2: 379-404.

MECHOULAM R, PARKER L. *Cannabis and alcohol—a dose friendship*. **Trends Pharmacol Sci** 2003;24:266– 8.

MECHOULAM R, BEN-SHABAT S, HANUS L, LIGUMSKY M, KAMINSKI N.E, SCHATZ AR, GOPHER A, ALMOG S, MARTIN BR, COMPTON DR. *Identification*

of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. **Biochem Pharmacol.** 1995; Jun 29;50(1):83-90.

MEHLER, W.; FEFERMAN, ME.; NAUTA, WJH., *Ascending axon degeneration following antero-lateral cordotomy. An experimental study in the monkey.* **Brain Research**, 1960;v. 83, p. 718-52.

MEININGER, V.; POL, D.; & DERER, P. *The inferior colliculus of the mouse. A Nissl and Golgi Study.* **Neuroscience**, 1986; 17: 1159-1179.

MELO LL.; CARDOSO SH.; BRANDÃO ML. *Antiaversive actions of benzodiazepines on escape behavior induced by electrical stimulation of the inferior colliculus.* **Physiol. Behav.** 1992; 51: 557-562.

MENESCAL-DE-OLIVEIRA, L. & HOFFMANN, A. *The parabrachial region as a possible region modulating simultaneously pain and tonic immobility.* **Behav. Brain Res.**, 1993;56: 127-132.

MENG ID, MANNING BH, MARTIN WJ, FIELDS HL. *An analgesia circuit activated by cannabinoids.* **Nature.** 1998;395:381–383.

MICZEK, KA. & THOMPSON, ML. *Analgesia resulting from defeat in a social confrontation: the role of endogenous opioids in brain.* Em: **Modulation of Sensorimotor Activity During Alteration in Behavioral States**, R.BANDLER (ed.), Liss, New York, pp. 431-456, 1984.

MILLAN MH.; MELDRUM BS.; FAINGOLD CL. *Induction of audiogenic seizure susceptibility of focal infusion of excitant amino acid or bicuculline onto the inferior colliculus of normal rats.* **Exp. Neurol.** 1986; 91: 634-639.

MIYASE, CI.; KISHI, R.; FREITAS, RL.; PAZ, DA. & COIMBRA, NC. - *Involvement of pre- and post-synaptic serotonergic receptors of dorsal raphe nucleus neural network in the control of the sweet-substance-induced analgesia in adult Rattus norvegicus (Rodentia, Muridae).* **Neurosci. Lett.**, 2005;379 (3): 169-73.

MOREIRA FA, AGUIAR DC, CAMPOS AC, LISBOA SF, TERZIAN AL, RESSEL LB, GUIMARÃES FS. *Antiaversive effects of cannabinoids: is the periaqueductal gray involved?* **Neural. Plast.** 2009; 625469. Epub 2008 Dec 2.

MOREIRA, FA., et al, *Anxiolytic-like effect of cannabinoids injected into the rat dorsolateral periaqueductal gray.* **Neuropharmacology.** 2007;52: 958-965,.

MOTTA V. & BRANDÃO, ML. Aversive and antiaversive effects of morphine in the periaqueductal gray of rats submitted to the elevated plus-maze test. **Pharmacol. Biochem. and Behav.**, 1993; 44: 119-125.

MUCHA RF. & HERZ A. Motivational properties of kappa and mu opioid receptor agonist studied with place and taste preference conditioning. **Psychopharmacol. (Berl)** 1985; 86: 274-280.

MUNRO S, THOMAS KL, ABU-SHAAR M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. **Nature**. 1993;365:61-65.

MURFIN, R.; BERNNETT, T.; MAYER, DJ. The effect of dorsolateral cord (DLC) lesions on analgesia from morphine microinjected into the periaqueductal gray of the rat. **Neurosci. Abstr.**, 1976;2: 949.

NARIMATSU S, YAMAMOTO I, WATANABE K, YOSHIMURA H. Change in hypothermia and catalepsy induced by cannabinoids or morphine in mice tolerant to these substances. **Eur. J. Pharmacol.** 1987;141:437-43.

NG, TK. & YUNG, KK. Distinct cellular distribution of GABA (B) R1 and GABA (A) alpha 1 receptor immunoreactivity in the rat substantia nigra. **Neuroscience**, 2000; 99: 65-76.

OLSEN RW. Drug interaction at the GABA receptor-ionophore complex. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** 1982; 22: 245-277.

OSAKI , et al. Neuroanatomical and neuropharmacological study of opioid pathways in the mesencephalic tectum: effect of mu(1)- and kappa-opioid receptor blockade on escape behavior induced by electrical stimulation of the inferior colliculus. **Brain Res.**, 2003;5;992(2):179-92.

PACHECO DDA F, KLEIN A, PEREZ AC, PACHECO CM, DE FRANCISCHI JN, REIS GM, DUARTE ID. Central antinociception induced by mu-opioid receptor agonist morphine, but not delta- or kappa-, is mediated by cannabinoid CB1 receptor. **Br. J. Pharmacol.** 2009; Sep;158(1):225-31. Epub 2009 Jul 7.

PACHECO DF, KLEIN A, PEREZ AC, PACHECO CMF, FRANCISCHI JN, DUARTE ID. The mu-opioid receptor agonist morphine, but not agonists at delta- or kappa-opioid receptors, induces peripheral antinociception mediated by cannabinoid receptors. **Br J Pharmacol.** 2008; **154** :1143-1149.

PAMPLONA FA, TAKAHASHI RN. *WIN 55212-2 impairs contextual fear conditioning through the activation of CB1 cannabinoid receptors*. **Neurosci. Lett.** 2006 Apr 10-17;397(1-2):88-92. Epub 2006 Jan 6.

PANDOSSIO, JE. & BRANDÃO, ML. *Defensive reactions are counteracted by midazolam and muscimol and elicited by activation of glutamate receptors in the inferior colliculus of rats*. **Psychopharmacol.**, 1999; 142: 360-368.

PANKSEPP, J. *The psychoneurology of fear: evolutionary perspectives and the role of animal models in understanding human anxiety*. **Handbook of Anxiety**, G. D. Burrows; M. Roth e R. Noyers, Jr. (eds.), vol. 3, Elsevier Science Publishers, Amsterdam. 3-58. 1990.

PARENT, A. *Extrinsic connections of the basal ganglia*. **TINS**, 1990; 13: 254-259.

PASTERNAK, GW. *Pharmacological mechanisms of opioid analgesics*. **Clin. Neuropharmacol.** 1993; Feb;16(1):1-18. Review.

PAXINOS, G. & WATSON, C. - *The Rat Brain: In Estereotaxic Coordinates*. **Academic Press**, Sidney ;1997.

PETITET, F.; JEANTAUD, B.; REIBAUD, M.; IMPERATO, A.; DUBROEUCQ, M. C. *Complex pharmacology of natural cannabinoids: evidence for partial agonist activity of delta9-tetrahydrocannabinol and antagonist activity of cannabidiol on rat brain cannabinoid receptors*. **Life Sci.** 1998; v. 63, n. 1, p. PL1-6.

PELLEGRINO, L.. *Amygdaloid lesions and behavioral inhibition in the rat*. **J. Comp. Physiol. Psychol.**, 1968;56: 483-491,.

PERTWEE RG. *The central neuropharmacology of psychotropic cannabinoids*. **Pharmacol Ther** 1988;36:189– 261

PERTWEE, RG. *Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors*. **Pharmacol. Ther** 74:129–180(1997).

PONCELET M, BARNOUIN MC, BRELIERE JC, LE FUR G, SOUBRIE P. *Blockade of cannabinoid (CB1) receptors by SR141716A selectively antagonizes drug-induced reinstatement of exploratory behaviour in gerbils*. **Psychopharmacology** 1999;114:144– 50.

PONTIERI FE, MONNAZZI P, SCONTRINI A, BUTTARELLI FR, PATACCHIOLI FR. *Behavioral sensitization to heroin by cannabinoid pretreatment in the rat*. **Eur J Pharmacol**. 2001;421:R1–3.

PONTIERI FE, MONNAZZI P, SCONTRINI A, BUTTARELLI FR, Patacchioli FR. *Behavioral sensitization to WIN552122 in rats pretreated with heroin*. **Brain Res**. 2001;898:178–80.

PORTER AC, FELDER CC. *The endocannabinoid nervous system, unique opportunities for therapeutic intervention*. **Pharmacol. Ther.** 2001;90:45–60.

PRADO, WA. *Medicamentos Analgésicos de Ação Central*. In Graeff, F.G & Guimarães, FS.; **Fundamentos de Psicofarmacologia** 2000; Atheneu.

PUGH G, SMITH PB, DOMBROWSKI DS, WELCH SP. *The role of endogenous opioids in enhancing the antinociception produced by the combination of delta 9-tetrahydrocannabinol and morphine in the spinal cord*. **J Pharmacol Exp Ther**. 1996; 279:608–616.

PURVES, D.; AUGUSTINE, GJ.; FITZPATRICK, D.; KATZ, LC.; LAMANTIA, A. S.; MCNAMARA, JO.; WILLIAMS, SM. **Neuroscience chapters**. XIII, XVII, XVIII 2001; (2 ed.) Sinauer, Sunderland, MA U.S.A.,.

QUIRION, R. PAIN, *Nociception and spinal opioid receptors*. **Prog. Neuropsychopharmacol Biol. Psychiatry**. 1984; 8 (4-6):571-9. Review.

RAFFA RB, STONE DJ, HIPPI SJ. *Differential cholera-toxin sensitivity of supraspinal antinociception induced by the can-nabinoid agonists D9-THC, WIN 55,212-2 and anandamide in mice*. **Neurosci. Lett**. 1999;263:29–32.

RECHE I, FUENTES JA, RUIZ-GAIO M. *Potentiation of Δ^9 -tetrahydrocannabinol-induced analgesia by morphine in mice: involvement of μ and κ opioid receptors*. **Eur. J. Pharmacol**. 1996; 318:11–16.

REDGRAVE, P.; MARROW, L. & DEAN, P. *Topographical organization of the nigroreticular projection in rat: evidence for segregated channels*. **Neurosci.**, 1992; 50: 571-595.

RESSTEL, LBM. et al. *Activation of CB1 cannabinoid receptors in the dorsolateral periaqueductal gray reduces the expression of contextual fear conditioning in rats*. **Psychopharmacology**, 2007; 198:405–411.

RIBEIRO, et al. *Functional and ultrastructural neuroanatomy of interactive intratectal/tectonigral mesencephalic opioid inhibitory links and nigrotectal GABAergic pathways: Involvement of GABA(A) and mu(1)-opioid receptors in the modulation of panic-like reactions elicited by electrical stimulation of the dorsal midbrain.* **J. Chem. Neuroanat.**, 2005; 30(4):184-200.

RICHARD, L, et al. *Endocannabinoids at the spinal level regulate, but do not mediate, nonopioid stress-induced analgesia.* **Neuropharmacology.**, 2006; 50: 372-379.

RJ, VANDERAH TW, ROESKE WR, CONSROE P, YAMAMURA HI. *Antisense oligodeoxynucleotide treatment to the brain cannabinoid receptor inhibits antinociception.* **Neuroreport.** 1996; 7:593–596.

RODRIGUEZ JJ, MACKIE K, PICKEL VM. *Ultrastructural localization of the CB1 cannabinoid receptor in mu-opioid receptor patches of the rat caudate putamen nucleus.* **J. Neurosci.** 2001; 21 (3):823–833.

RUBINO T, TIZZONI L, VIGANO` D, MASSI P, PAROLARO D. *Modulation of rat brain cannabinoid receptors after chronic morphine treatment.* **Neuro- Report** 1997;8:3219– 23.

RUSSEL, NJW.; SCHAIBLE, HG.; SCHIMIDT, RF. *Opiates inhibit the discharges of fine afferent units from inflamed knee joint of the cat.* **Neurosci. Lett.**, 1987; 76: 107-112,.

SALIO C, FISCHER J, FRANZONI MF, MACKIE K, KANEKO T, CONRATH M. *CB1-cannabinoid and mu-opioid receptor co-localization on postsynaptic target in the rat dorsal horn.* **NeuroReport.** 2001;12(17):3689–3692.

SANUDO-PENA MC, ROMERO J, SEALE GE, FERNANDEZ-RUIZ JJ, WALKER JM. *Activational role of cannabinoids on movement.* **Eu.r J. Pharmacol.** 2000;391:269–274.

SCHLICKER E, KATHMANN M. *Modulation of transmitter release via presynaptic cannabinoid receptors.* **Trends Pharmacol. Sci.** 2001;22:565–572.

SHNEIDERMAN, A.; CHASE MB.; ROCKWOOD, JM.; BENSON, CG. & POTASHNER, SJ. *Evidence for a GABAergic projection from the dorsal nucleus of the lateral lemniscus to the inferior colliculus.* **J. Neurochem.**, 1993; 60: 72-82

SIEGEL, A. & POTT, CB. *Neural substrates of aggression and flight in the cat.* **Prog. Neurobiol.**, 1988; 31: 261-283.

SIEGLING A, HOFMANN HA, DENZER D, MAULER F, DE VRY J. *Cannabinoid CB(1) receptor upregulation in a rat model of chronic neuropathic pain.* **Eur. J. Pharmacol.** 2001;415:R5–R7.

SUGIURA, T., KONDO, S., SUKAGAWA, A., NAKANE, S., SHINODA, A., ITOH, K., YAMASHITA, A., & WAKU, K. *2-Arachidonoylglycerol: A possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain.* **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 1995; 215, 89–97.

SUPLITA RL 2ND, GUTIERREZ T, FEGLEY D, PIOMELLI D, HOHMANN AG. *Endocannabinoids at the spinal level regulate, but do not mediate, nonopioid stress-induced analgesia.* **Neuropharmacology.** 2006; Mar;50(3):372-9. Epub 2005 Nov 28.

SMITH, P.B., WELCH, S.P., MARTIN, B.R. *Interactions between D9-tetrahydrocannabinol and kappa opioids in mice.* **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** 1994; 268, 1382–1387.

SMITH FL, CICHEWIEZ D, MARTIN ZL, WELCH SP. *The enhancement of morphine antinociception in mice by delta9- tetrahydrocannabinol.* **Pharmacol. Biochem. Behav.** 1998;60: 559–566.

SMITH FL, FUJIMORI K, LOWE J, WELCH SP. *Characterization of D9-tetrahydrocannabinol and anandamide antinociception in non-arthritis and arthritis rats.* **Pharmacol. Biochem. Behav.** 1998; 60 :183–191.

STAINES, WA.; NAGY, JL.; VINCENT, SR. & FIBIGER, HC. *Neurotransmitters contained in the efferents of the striatum.* **Brain Res.**, (1980) 194: 391-402

STEIN, B. R. *Development of the superior colliculus.* **Annual Review of Neuroscience**, 1984;v. 7, p. 95-125.

STEIN, C.; COMISEL, K.; HAIMERL., E.; YASSOURIDIS, A.; LEHRBERGER, K.; HERTZ, A. & PETER, K. *Analgesic effects of intraarticular morphine after arthroscopic knee surgery.* **N. Engl. J. Med.**, 1991; 325: 1123-1126.

STEIN, C.; HASSAN, AH.; PRZEWLOCKI, R.; GRAMSCH, C.; PETER, K.; HERZ, A. *Opioids from immunocytes interact with receptors on sensory nerves to inhibit nociception in inflammation.* **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 1990; 87: 5935-5939.

STEINBSH, H.W.M.. *Distribution of serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of the rat-cell bodies and terminals.* **Neurosci.**, 1981; 6: 557-618.

SPARKS, DL.; NELSON, JS. *Sensory and motor maps in the mammalian superior colliculus*. **Trends in Neurosciences**, 1987;v.10, p. 312-7.

SURMEIER, DJ, HONDA CN, WILLIS WD. *Patterns of spontaneous discharge in primate spinothalamic neurons*. **J. Neurophysiol.** 1989; Jan;61(1):106-15.

SHEKHAR, A, KATNER JS. *Dorsomedial Hypothalamic GABA Regulates Anxiety in the Social Interaction Test*. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 1995; Vol. 50, No. 2, pp. 253-258.

SWANSON, LW. *The projections of the ventral tegmental area and adjacent regions: A combined fluorescent retrograde tracer and immunofluorescent study in the rat*. **Brain Res. Bulletin**, (1982) 9: 321-353.

TACHIBANA M.; KURIYAMA K. *Gamma-aminobutyric acid in the lower auditory pathway of the guinea pig*. **Brain Res.** 1974;69: 370-374.

TENEN, SS. *Antagonism of the analgesic effect of morphine and other drugs by pchlorophenylalanine, a serotonin depletor*. **Psychopharmacology** 1968; 12: 278-285.

THOMAS, BF.; GILLIAM, AF.; BURCH, DF.; ROCHE, MJ.; SELTZMAN, HH. *Comparative receptor binding analyses of cannabinoid agonists and antagonists* **Pharmacol. Exp. Ther.** 1998; v. 285, n. 1, p. 285-92, Apr.

THOMAS A, BAILLIE GL, PHILLIPS AM, RAZDAN RK, ROSS RA, PERTWEE RG. *Cannabidiol displays unexpectedly high potency as an antagonist of CB1 and CB2 receptor agonists in vitro*. **Br. J. Pharmacol.** 2007 Mar;150(5):613-23. Epub 2007 Jan 22.

THOMPSON GC.; CORTEZ AM.; LAM DM. *Localization of GABA immunoreactivity in the auditory brainstem of guinea pigs*. **Brain Res.** 1985; 339: 119-122

TOMAZ, C; BRANDÃO, ML.; BAGRI, A; CARRIVE, P.; SCHMITT, P. *Flight behavior induced by microinjections of GABA antagonists into periventricular structures in detelencephalated rats*. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 1988; 30 (2): 337-342.

TSOU K, PATRICK SL, WALKER JM. *Physical withdrawal in rats tolerant to delta 9-tetrahydrocannabinol precipitated by a cannabinoid receptor antagonist*. **Eur. J. Pharmacol.** 1995;280:R13 – 5.

TULUNAY FC, AYHAN IH, PORTOGHESE PS, TAKEMORI E. *Antagonism by chlornaltrexamine of some effect of D9-tetrahydrocannabinol in rats.* **Eur. J. Pharmacol.** 1981;70:219–24.

TULUNAY FC, AYHAN IH, SPARBER SB. *The effects of morphine and delta-9-tetrahydrocannabinol on motor activity in rats.* **Psychopharmacology** 1982;78:358–60.

ULKU E, AYHAN IH, TULUNAY FC, URAN B, KAYMAKCALAN S. *Effect of delta 9-tetrahydrocannabinol on the morphine-induced hyperactivity of mice.* **Psychopharmacology** 1980; 69:201–5.

VAN SICKLE MD, DUNCAN M, KINGSLEY PJ, MOUIHATE A, URBANI P, MACKIE K, STELLA N, MAKRIYANNIS A, PIOMELLI D, DAVISON JS, MARNETT LJ, DI MARZO V, PITTMAN QJ, PATEL KD, SHARKEY KA. *Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors.* **Science.** 2005; Oct 14; 310 (5746):329-32.

VAUGHAN CW, CONNOR M, BAGLEY EE, CHRISTIE MJ. *Actions of cannabinoids on membrane properties and synaptic transmission in rat periaqueductal gray neurons in vitro.* **Mol Pharmacol.** 2000;57:288–295.

VAUGHAN CW, MCGREGOR IS, CHRISTIE MJ. *Cannabinoid receptor activation inhibits GABAergic neurotransmission in rostral ventromedial medulla neurons in vitro.* **Br J Pharmacol.** 1999;127:935–940.

VIGANO, D. et al, *Molecular and cellular basis of cannabinoid and opioid interactions,* **Pharmacology Biochemistry and Behavior.**, 2005; 81: 360-368.

WALKER DL.; CASSELLA JV.; LEE Y.; DE LIMA TC.; DAVIS M. *Opposing roles of the amygdale and dorsolateral periaqueductal gray in fear-potentiated startle.* **Neurosci. Biobehav. Rev.** 1997; 21: 743-753.

WALKER JM, HUANG SM, STRANGMAN NM, TSOU K, SANUDO-PENA MC. *Pain modulation by release of the endogenous cannabinoid anandamide.* **Proc Natl. Acad. Sci. USA.** 1999;96:12198–12203. 33. Edsall SA, Knapp.

WALKER JM. *Cannabinoid modulation of wide dynamic range neurons in the lumbar dorsal horn of the rat by spinally administered WIN55,212-2.* **Neurosci. Lett.** 1998;257:119–122.

WELCH SP, DUNLOW LD, PATRICK GS, RAZDAN RK. *Characterisation of anandamide-induced antinociception and cross-tolerance to delta 9-THC after*

intrathecal administration to mice: blockade of delta 9-THC-induced antinociception. **J. Pharmacol. Exp Ther.** 1995; 273:1235–1244.

WELCH SP, EADS M. *Synergistic interactions of endogenous opioids and cannabinoid systems.* **Brain Res.** 1999; 848:183–90.

WELCH SP, STEVENS DL. *Antinociceptive activity of in-trathecally administered cannabinoids alone, and in combination with morphine, in mice.* **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 1992; 262 :10–18.

WILENT, WB.; OH, MY.; BUETEFISCH, CM.; BAILES, JE.; CANTELLA, D., ANGLE, C.; WHITING, DM. *Induction of panic attack by stimulation of the ventromedial hypothalamus.* **J. Neurosurg.** 2010; 112: 1295-1298.

WILLIAMS, MN. & FAULL, RLM. *The nigrotectal projection and tectospinal neurons in the rat. A light and electron microscopic study demonstrating a monosynaptic nigral input to identified tectospinal neurons.* **Neuroscience**, 1988; 25: 533-562.

WILLIS, WD. & WESTLUND, KN. *Neuroanatomy of the pain system and of the pathways that modulate pain.* **J. Clin. Neurophysiol.** 1997;14: 2-31,.

YEZIERSKI RP, GERHART KD, SCHROCK BJ, WILLIS WD. *A further examination of effects of cortical stimulation on primate spinothalamic tract cells.* **J. Neurophysiol.** 1983; Feb;49(2):424-41.

ZHANG, SP.; BANDLER, R. & CARRIVE, P. *Flight and immobility evoked by excitatory amino acid microinjection within distinct parts of the subtentorial midbrain periaqueductal gray of the cat.* **Brain Res.**, 1990;520: 73-82.

ZHANG, J., HOFFERT, C., VU, H.K., GROBLEWSKI, T., AHMAD, S., O'DONNELL, D. *Induction of CB2 receptor expression in the rat spinal cord of neuropathic but not inflammatory chronic pain models.* **Eur. J. Neurosci.**, 2003, 17, 2750-2754.

ZUARDI AW, CRIPPA JA, HALLAK JE, MOREIRA FA, GUIMARÃES FS. *Cannabidiol, a Cannabis sativa constituent, as an antipsychotic drug.* **Braz. J. Med. Biol. Res.** 2006 Apr;39 (4):421-9. Epub 2006 Apr 3. Review.

ANEXOS

Tabela Comportamentos	<u>Cruzamentos</u>	<u>Alerta</u> <u>Frequência e</u> <u>Duração</u>	<u>Fuga</u> <u>Frequência e</u> <u>Duração</u>	<u>Congelamentos</u> <u>Frequência e</u> <u>Duração</u>	<u>Saltos</u> <u>Frequência e</u> <u>Duração</u>	<u>Rotação</u> <u>Frequência e</u> <u>Duração</u>
Agonista Opióide Morfina (Ação Pró-Aversiva)	↑	↑	↑	↑	↑	
Antagonistas Opióides Naloxonazina (μ)/ Nor-binaltorfimina (k) (Ação Anti-Aversiva)			↓	↓		
Agonista Canabinoide (Anandamida) (Ação Pró-Aversiva)	↑	↑	↑	↑	↑	
Antagonistas Canabinóides CB ₁ /CB ₂ (Ação Anti-Aversiva)	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Morfina + Anandamida (Ação Pró-Aversiva)		↑	↑		↑	↑
Morfina + Antagonistas CB ₁ /CB ₂ (Ação Anti-Aversiva)		↓	↓		↓	↓
Antagonistas opioides (μ/k) + Anandamida (Ação Anti-Aversiva)		↓	↓		↓	↓

	<u>Analgesia</u>
Agonista Opioide Morfina (Ação Pró-Aversiva)	↑
Antagonistas Opioides Naloxonazina/ Nor-binaltorfimina (Ação Anti-Aversiva)	↓
Agonista Canabinoide (Anandamida) (Ação Pró-Aversiva)	↑
Antagonistas Canabinoides CB ₁ /CB ₂ (Ação Anti-Aversiva)	↓
Morfina + Anandamida (Ação Pró-Aversiva)	↑
Morfina + Antagonistas CB ₁ (Ação Anti-Aversiva)	↓
Morfina + Antagonistas CB ₂ (Ação Pró-Aversiva)	↑
Antagonistas opioides (μ/k) + Anandamida (Ação Anti-Aversiva)	↓