UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE PSICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOBIOLOGIA

A diminuição de atividades de receptores μ no hipotálamo medial causa efeito panicolítico em presas ameaçadas por serpentes cascaveis

Guilherme Bazaglia de Sousa

Ribeirão Preto
2020

GUILHERME BAZAGLIA DE SOUSA

A diminuição de atividades de receptores μ no hipotálamo medial causa efeito panicolítico em presas ameaçadas por serpentes cascaveis

Versão Original

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: Psicobiologia

Orientador: Prof. Dr. Norberto Cysne Coimbra

Ribeirão Preto

2020

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

FICHA CATALOGRÁFICA

BAZAGLIA-DE-SOUSA, G.

A diminuição de atividade de receptores μ no hipotálamo medial causa efeito panicolítico em presas ameaçadas por serpentes cascaveis. Ribeirão Preto, 2020.

86 f.

Dissertação de mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Psicobiologia.

Orientador: Coimbra, Norberto Cysne

1. Comportamento de defesa 2. Antagonista opioide. 3. Transtorno de pânico 4. Receptor μ .

Nome: Bazaglia-de-Sousa, G

Título: A diminuição de atividades de receptores μ no hipotálamo medial causa efeito panicolítico em presas ameaçadas por serpentes cascaveis

Dissertação apresentada ao Departamento de Psicologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências, área de concentração em Psicobiologia.

Aprovado em: _____

Banca examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Este trabalho é dedicado a todas as pessoas que sofrem de Transtorno de Ansiedade e Transtorno de Pânico, almejo que, um dia, este estudo possa vir a ser luz para novas abordagens psicofarmacológicas, psicoterapêuticas e para as próximas produções acadêmicas. De coração e infinito agradecimento, também dedico este trabalho à grande mulher de minha vida, a qual enfrentou o medo e as intempéries da vida para nos criar, à senhora minha mãe, Irene Bazaglia.

AGRADECIMENTO E HOMENAGEM AOS ANIMAIS

Agradeço e homenageio aquelas vidas que não tiveram chances de escolha.

Este trabalho só é possível devido a seu sacrifício, pois em suas dores, sofrimentos e medo intenso foi possível a concretização deste estudo psicobiológico, por meio do qual se propõe uma nova abordagem farmacológica para o tratamento dos ataques de pânico na espécie humana. Que não seja em vão a vida, a qual lhes foi tirada. Que este trabalho possa vir a ser inspiração para o uso dos antagonistas opioides para o tratamento coadjuvante da síndrome do pânico.

Respeitá-los neste momento, é respeitar a vida!

Mesmo que não compartilhemos de uma mesma comunidade verbal, espero que, de alguma forma, sintam meu agradecimento. Sem vocês, nenhuma tecnologia que temos neste e em muitos outros laboratórios, serviriam.

Meus profundos e sinceros agradecimentos!

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Norberto Cysne Coimbra, por dedicar-se à árdua tarefa de ensinar, conduzir seus alunos pelas sendas do conhecimento e propiciar um ambiente acolhedor, dinâmico e com um alto padrão de inovação, ciência e tecnologia.

Durante todos esses anos, ele me ensinou muito mais do que a ler e a escrever artigos científicos, ensinou-me a produzir conhecimentos novos, a compreender os fenômenos como eles se apresentam. De forma competente e afetuosa, captou minhas necessidades e corrigiu da primeira palavra até a última em qualquer documento que me fora solicitado.

Sua eloquência e erudição são inspiração para que um dia eu possa vir a ser um pouco dele, pois no cerne do discípulo, sempre viverá o seu mestre.

Obrigado por sempre estar ao meu lado nos experimentos, mesmo que isso significasse, em vários momentos, ficar até o final da noite no laboratório, por sempre me incentivar a superar meus limites, buscar o conhecimento e não contentar com o pouco e, principalmente, por me ter ensinado a não desistir mediante os obstáculos que surgem diante de nossos propósitos. Obrigado, por toda orientação, ajuda, carinho, conselhos e afeto.

À minha querida e amada mãe que, em todos os momentos de minha vida, mesmo que distante fisicamente nos últimos anos, esteve ao meu lado com seu amor incondicional, nunca deixando de rezar por meu êxito e de acreditar em mim. Sua doçura e sabedoria sempre me levaram aos caminhos corretos em nossa sociedade. Irene Bazaglia, do fundo do meu coração, amo você.

Agradeço ao homem que me motivou a estudar e sempre esteve presente em minha caminhada rumo ao desconhecido, em memória póstuma ao meu pai, Roberto de Sousa.

Ao meu maravilhoso namorado e futuro marido, Henrique Mascioli Fiorillo, por toda ajuda, paciência, dedicação, sabedoria e amor, tornando os anos ao seu lado um caminho muito mais feliz. Obrigado por fazer parte desta trajetória e por fazer parte de minha vida. Amo você!

Às minhas irmãs Alexia, Suzi e Patrícia, por sempre se desdobrarem para cuidar de mim. Vocês sempre foram anjos que estiveram do meu lado. Amo vocês demais!

A toda a minha família, que acreditou em mim e que esteve ao meu lado nesse tempo todo, educando-me, acolhendo-me e me dando o amor que eu sempre precisei e,

sem dúvida, entendendo as minhas ausências. Vocês são o bem mais precioso que eu tenho em minha vida!

A Paula Moura de Oliveira, por me acolher em uma fase muito difícil de minha vida. Se estou concluindo meu mestrado é devido ao seu excelente trabalho. Muito obrigado por tudo!

A Patrícia do Socorro Magalhães Franco do Espírito Santo, por ser uma pessoa maravilhosa e quem, mesmo sem saber, fez eu tomar caminhos melhores em minha profissão e tornar-me uma pessoa melhor.

Ao Doutor Marcos Lira Brandão, por ser uma inspiração de professor, pesquisador e um exemplo de humildade, abrindo muitas portas quando elas pareciam estar fechadas.

Ao Dr. Manoel Nobre Jorge do Espírito Santo, por ser inspiração de pessoa, psicólogo, e pesquisador. Os momentos vividos em seu laboratório foram fundamentais para que eu me apaixonasse ainda mais pela psicologia experimental.

Aos meus queridos amigos (velhos e chatos), LuiZ Luciano Falconi Sobrinho e Tayllon dos Anjos Garcia, pela parceria, amizade, conselhos e ensinamentos. Por estarem ao meu lado na minha iniciação científica e durante a jornada na pós-graduação.

À minha querida amiga Yara Bezerra Paiva, por sempre, nos momentos que muito precisei, ter utilizado palavras revigorantes e confortantes. Suas belas palavras e empatia sempre estiveram presentes na hora e no lugar certo.

A Priscila de Medeiros, que me sacudia nos momentos que eu entrava no automático. A pós-graduação tornou-se muito mais leve com sua presença.

A Maria de Fátima Sampaio, por ter sido um exemplo de resiliência e por me ensinar que a felicidade é a bússola que nos aponta onde devemos estar.

A todos os meus amigos de laboratório, que tornaram meu dia-a-dia mais feliz. A trajetória ao lado de vocês está sendo uma honra.

À Prof.^a Dra. Christie Ramos Leite Panissi, por ser uma pessoa incrível e me assessorar durante todo o mestrado e por me ensinar tanto no PAE. Os seus ensinamentos estão sendo muito importantes para mim e, com certeza, você é um dos modelos de professor que um dia vou querer ser.

A Renata Beatriz Vicentini (a mulher mais austera da Psicobiologia), por ser um exemplo de funcionária pública, a sua competência na secretaria da Psicobiologia torna nossa vida de pós-graduando muito mais fácil. Deus não lhe deu tamanho e Ele sabe o porquê... Você bateria em todo mundo! Mulher maravilhosa!

Às técnicas de laboratório, Ieda, Kátia e Vani, por toda a paciência, apoio e carinho durante todo o decorrer do meu mestrado.

Aos colegas do programa de Psicobiologia por sempre ensinarem que o conhecimento que produzimos é de altíssima qualidade.

Ao Departamento de Psicologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto e ao Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia, por serem alicerçados por princípios edificantes e funcionarem com pessoas incríveis e sapientíssimas.

À Universidade de São Paulo, por ser um espaço didático e cultural que, sem dúvida, é excelência no país. Tenho muito orgulho e estou feliz de estar aqui.

A Ângela Pontes, por me ter ensinado muito neuropsicologia e ter sido uma chefe e orientadora incrível, além de ser uma amiga que quero levar pra vida.

A Patricia Zuanetti, por todos os óleos místicos, auriculoterapia, acolhimento e palavras de amizade.

A Marina Estima, por ser uma grande amiga que a USP me deu e por mostrar que conseguimos ser melhores, SEMPRE, com nossos pacientes, e com pequenas atitudes sermos capazes de levar conforto aqueles que mais precisam.

A Marita Ferretti, pelos compartilhamentos de bons e maus momentos. Trabalhar no Ambulatório fica muito mais gostoso ao seu lado.

A todos do ambulatório de Distúrbios do Comportamento e da Aprendizagem da neurologia pediátrica por me terem acolhido e me ensinarem muito durante todo o tempo que eu compartilhei com vocês. Vocês estão no meu coração!

Agradeço a todos que, direta ou indiretamente, participaram dessa minha trajetória, mostrando-me que as relações pessoais são, sem dúvida, uma inesgotável fonte de magia e sabedoria.

A Deus, por sempre estar presente em minha vida e ser a figura de apego nas tortuosas penumbras da existência, bem como nos momentos mais felizes.

Eu poderia discorrer meus agradecimentos por páginas a fio. Entretanto, nunca me esquecerei daqueles que, embora não tenham sido citados, tiveram grande importância na minha vida e na minha formação. A gratidão que parte de minha pessoa é a mais pura e singela. Por tudo, sou eternamente grato!

LISTA DE ABREVIATURAS, ACRÔNIMO E SIGLAS

μ	<i>Mu</i>
δ	Delta
μL	Microlitro
CEUA	Comissão de Ética em Pesquisa Animal
CI	Colículo Inferior
Cm	Centímetro
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
cpCS	Camadas profundas do colículo inferior
CS	Colículo Superior
DMSO	sulfóxido de dimetilo
DSM	<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders</i>
EM-1	Endomorfina-1
EUA	Estados Unidos
FMRP- USP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
GABA	Ácido gama-aminobutírico
HA	Hipotálamo anterior
HM	Hipotálamo medial
HVM	Hipotálamo Ventromedial
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
INeC	Instituto de Neurociências e Comportamento
ISRS	Inibidores seletivos de recaptação de serotonina
k	<i>Kappa</i>
kg	Kilograma
LNN	Laboratório de Neuroanatomia e Neuropsicobiologia
mg	Miligrama

mL	Mililitro
mm	Milímetros
NAcc	<i>Nucleus accumbens</i>
Nmol	Nanomolar
SCP	Substância Cinzenta Periaquedutal
SCPd	Substância Cinzenta Periaquedutal Dorsal
SCPV	Substância Cinzenta Periaquedutal ventral
SNpl	Substância negra, parte lateral
SNpr	Substância negra, parte reticulada
TAG	Transtorno de ansiedade generalizada
TM	Teto mesencefálico
USP	Universidade de São Paulo

Lista de Figuras

Figura 1: Desenho representativo da arena poligonal enriquecida com toca e plataformas de escape..... 53

Figura 2: Representação esquemática em diagramas do Atlas de Paxinos e Watson (2005) de cortes coronais do diencéfalo de Rattus norvegicus, mostrando os sítios de microinjeções de DMSO e CTOP, este sendo representado segundo as diferentes doses como segue: veículo e camundongos expostos à serpente de brinquedo (▲), veículo e camundongos expostos à serpente verdadeira (●), CTOP na dose de 0,1 nmol (○), CTOP na dose de 1nmol (■), CTOP na dose de 10nmol (◆)..... 56

Figura 3: Efeito da administração intradiencefálica de veículo (DMSO) ou de CTOP nas doses de 0,1, 1 e 10 nmol no hipotálamo ventromedial (HVM) na incidência (A) e duração (B) do comportamento de Alerta, na incidência (C) do comportamento de aproximação cautelosa, e na (D) incidência do comportamento de Interação com a serpente, eliciados em Mus musculus (cepa C57) pela serpente Crotalus durissus terrificus. As colunas representam a média e as barras representam o erro padrão da média; * $p<0.05$ comparado ao grupo tratado com veículo no HVM e exposto à serpente de brinquedo; # $p<0.05$ comparado ao grupo tratado com veículo no HVM e exposto à cascavel; + $p<0.05$ comparado ao grupo tratado com 0,1 nmol no HVM e exposto à cascavel; ° $p<0.05$ comparado ao grupo tratado com 1 nmol no HVM e exposto à cascavel de acordo com a One-Way ANOVA, seguida pelo teste post hoc de Newman-Keuls..... 59

Figura 4: Efeito da administração intradiencefálica de veículo ou de CTOP nas doses de 0,1, 1, 10 nmol no hipotálamo ventromedial (HVM) na incidência (A e C) e duração (B e D) do comportamento de fuga orientada (A e B) e de fuga não orientada (C e D) eliciados em Mus musculus (cepa C57) pela serpente Crotalus durissus terrificus. As colunas representam a média e as barras representam o erro padrão da média; * $p<0.05$ comparado ao grupo tratado com veículo no HVM e exposto à serpente de brinquedo; # $p<0.05$ comparado ao grupo tratado com veículo no HVM e exposto à cascavel; + $p<0.05$ comparado ao grupo tratado com 0,1 nmol no HVM e exposto à cascavel; ° $p<0.05$ comparado ao grupo tratado com 1 nmol no HVM e exposto à cascavel de acordo com a One-Way ANOVA, seguida pelo teste post hoc de Newman-Keuls..... 60

Figura 5: Efeito da administração intradiencefálica de veículo ou de CTOP nas doses de 0,1, 1 e 10 nmol no hipotálamo ventromedial (HVM) na incidência (A) do comportamento de Levantamento, (B) do comportamento Cruzamento Total (C) incidência de Lugar Seguro (D) tempo no lugar seguro eliciados em Mus musculus (cepa C57) pela serpente Crotalus durissus terrificus. As colunas representam a média e as barras representam o erro padrão da média; * $p<0.05$ comparado ao grupo tratado com veículo no HVM e exposto à serpente de brinquedo; # $p<0.05$ comparado ao grupo tratado com veículo no HVM e exposto à cascavel; + $p<0.05$ comparado ao grupo tratado com 0,1 nmol no

HVM e exposto à cascavel; ° $p < 0.05$ comparado ao grupo tratado com 1 nmol no HVM e exposto à cascavel de acordo com a *One-Way ANOVA*, seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls..... **61**

Lista de Tabelas

Tabela 1: Incidência (em média) de respostas comportamentais do predador durante o confronto com a presa durante sessão experimental de duração de cinco minutos na arena poligonal enriquecida.....	62
Tabela 2: Taxa de sobrevivência (em porcentagem) dos animais expostos à <i>Crotalus durissus terrificus</i>	62

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
1.1 A tematização das emoções como questão relativa ao conhecimento.....	19
1.2 Considerações gerais sobre a elaboração do medo e do pânico, da ansiedade, e do comportamento de defesa evocado frente a predadores.....	22
1.3 Interação entre estímulos que eliciam comportamentos respondentes e operantes envolvendo os mecanismos de defesa em um paradigma de presa <i>versus</i> predador.....	31
1.4 Substratos neurais que organizam o comportamento de defesa.....	33
1.5 Os transtornos de ansiedade e transtornos do pânico.....	34
1.6 Propriedades opioides que alteram o humor e propiciam recompensa.....	38
1.7 O Sistema Opioidérgico na modulação do comportamento defensivo.....	40
2 HIPÓTESE E OBJETIVOS.....	45
2.1 Hipótese.....	46
2.2 Objetivo Geral.....	46
2.3 Objetivo específico.....	46
3 MATERIAL E MÉTODO.....	47
3.1 Aprovação ética.....	48
3.2 Animais.....	48
3.3 Cirurgia.....	49
3.4 Drogas.....	50
3.5 Equipamentos.....	50
3.6 Estudo Neuroetológico.....	51
3.7 Histologia.....	53
3.8 Estatística.....	54
4 RESULTADOS.....	55
4.1 Esquematização dos sítios de microinjeção de CTOP.....	56
4.2 Efeito das doses crescentes de um antagonista opioide (CTOP) seletivo para o receptor opioide do tipo μ , microinjetado no hipotálamo ventromedial frente ao medo inato eliciado pela <i>Crotalus durissus terrificus</i>	56

4.3 Comportamentos relativos a <i>Crotalus durissus terrificus</i> frente a <i>Mus musculus</i> em um modelo de confronto presa versus predador.....	62
5 DISCUSSÃO.....	63
6 CONCLUSÃO.....	73
REFERÊNCIAS.....	76

“Quero dizer que os religiosos, em paz e calmamente, pedem ao céu o bem da terra, mas nós, os soldados e os cavaleiros, pomos em execução o que eles pedem, defendendo-a com o valor de nossos braços e o fio de nossas espadas, não debaixo de teto mas a céu aberto, postos como alvos aos insuportáveis raios de sol no verão e para os arrepiantes gelos do inverno. Enfim, somos ministros de Deus na terra e os braços que executam a justiça. E como as coisas da guerra e as concernentes a ela não podem ser executadas senão suando, trabalhando e se esfalfando, conclui-se que aqueles que professam têm sem dúvida maior trabalho do que aqueles que em sossegada paz e repouso estão rogando a Deus que favoreça os desvalidos.”

(Cervantes, Dom Quixote de La Mancha, p. 152)

1 INTRODUÇÃO

1.1 A tematização das emoções como questão relativa ao conhecimento

Estudar as emoções de forma analítica é uma perspectiva bastante antiga na cultura ocidental, de modo que os gregos antigos já discutiam os conceitos de *pathós* no qual é a ideia de paixão que era entendida no âmbito da filosofia helênica como raiz dos males e da infelicidade, devendo ao homem, ele mesmo controlar e dominar a paixão vista como catástrofe (REALE, 1999). Deslumbrando o horizonte da filosofia, a concepção platônica de alma tripartida, transcendente e diz ser mortais as duas partes que correspondem às emoções (concupiscente e irascível) a alma divina (imortal) e a alma racional (SIQUEIRA-BATISTA, 2004).

A complexa relação de emoção e razão tornou-se objeto de discussão de diversos filósofos, os quais discorreram reflexões variadas para explicar a origem e o papel das emoções na condição humana. O francês René Descartes, quem, em suas diversas reflexões, determina uma concepção de substância pensante (*res cogitans*) que é completamente separada da substância do mundo (*res extensa*) de modo que cria uma cisão entre o corpo e a mente (DESCARTES, 2000). Ainda para o autor, a *res cogitans* pertence a razão e o pensamento, enquanto ao corpo, *res extensa*, pertence a classe das emoções, as quais, geralmente, são caracterizadas como confusas e não fidedignas quanto aos conteúdos de verdade.

De sua origem genuinamente filosófica, as relações entre corpo e mente passaram também a ser investigadas no âmbito teórico e empírico de outras áreas do conhecimento como a biologia, psicologia, medicina e ciências sociais em geral.

As perguntas que sempre recaem aos estudiosos do comportamento, principalmente psicólogos são: Por que estudar as emoções? No que se caracteriza a psicologia, estudar o comportamento humano é, de longe, o maior objetivo dessa ciência, bem como entender de que forma as emoções interferem na manutenção de determinadas classes de comportamentos (CASANOVA, 2009).

Anterior aos grandes filósofos da psicologia tradicional conhecida hoje, Darwin, ao publicar, em 1859, a “Origem das Espécies”, trazia ao mundo sua arrojada teoria da evolução pela seleção natural, construindo uma linha de pensamento que se contrapunha ao criacionismo. Publicou, nos anos seguintes, obras a fim de sustentar sua teoria, estando entre elas a “Expressão das Emoções no Homem e nos Animais” na qual discorreu Darwin (1872) que o Homem, assim como os demais animais, sente raiva, medo, ciúme (que são manifestados por meio de expressões observáveis, principalmente, em mamíferos), ou seja emoções observadas e descritas verbalmente pela comunidade humana.

Em 1945, B. F. Skinner publica o livro “*The Operational Analysis of Psychological Terms*” como tentativa de responder as correntes filosóficas internalistas. A partir dessa época, foi marcada a origem do *behaviourismo* radical, que foi desenvolvido não como uma área de pesquisa experimental, mas como uma área de reflexão sobre o comportamento humano. A realização de pesquisas empíricas constitui o campo da análise experimental do comportamento, enquanto a implementação prática faz parte da análise aplicada do comportamento. Nesse sentido, o *behaviourismo* radical é uma filosofia da ciência do comportamento. Skinner era radicalmente antimentalista, uma vez que considerava não pragmáticas as noções internalistas (elementos mentais como origem do comportamento) que compõem as variadas teorias psicológicas existentes (CATANIA, 1999).

Ainda segundo o autor, o comportamento é entendido como a relação entre o organismo e o ambiente e é selecionado seguindo os pressupostos do modelo evolucionista de Darwin, quem descreveu três níveis de seleção: o filogenético (que abarca comportamentos adquiridos na linha hereditária da espécie), o ontogenético (que abarca comportamentos adquiridos pela história de vida do organismo) e o cultural (que abarca comportamentos controlados por regras, estímulos verbais ou simbólicos, e é transmitido ao longo das gerações por meio da linguagem).

Não obstante, o desenvolvimento da psicobiologia, bem como das neurociências como um todo, requer que, assim como a percepção e a ação, as emoções são relacionadas a circuitos encefálicos distintos, nos quais as emoções estão pareadas com respostas autonômicas, endócrinas e motoras que dependem de áreas subcorticais do sistema nervoso central (ESPERIDIÃO-ANTONIO, 2007).

A evolução dos transtornos ansiosos e do transtorno de pânico tiveram mudança ao longo de sua história. Voltando no tempo, é possível identificar que, já na Idade Média, falava-se de ansiedade (não patológica). Hipócrates descreveu casos que eram sugestivos de fobias. A ansiedade adquiriu proeminência como escopo estudo a partir de Sigmund Freud, quem estudava pacientes em ambulatórios, fato este que se contrapunha à psiquiatria da época, em cujo exercício os pacientes eram atendidos em leitos de hospitais psiquiátricos e suas causas eram atribuídas principalmente a mecanismos psicológicos e que eram remissíveis por análise. Enquanto isso, os ataques de pânico ganhavam conotações de origem de processos sexuais perturbadores. Através da análise experimental do comportamento e das neurociências, é possível a compreensão de variáveis dependentes e independentes da expressão do comportamento, bem como observar fatores biológicos, psicológicos e culturais.

Para tanto, compreender os fenômenos que estão circunscritos aos transtornos que compartilham o medo como sentimento comum é um desafio para a ciência, principalmente pela dificuldade de sistematizar todas as contingências envolvidas em tais transtornos estudados em modelos experimentais usando animais de laboratório. De fato, os desafios são grandes para compreender a gênese e transpor os dados pela singularidade de sujeitos humanos, compreendidos pelas ciências da saúde como biopsicossociais em toda sua complexidade. No tópico abaixo, serão mostrados aspectos gerais sobre a elaboração do medo e dos transtornos que compartilham o medo.

1.2 Considerações gerais sobre a elaboração do medo e do pânico, da ansiedade, e do comportamento de defesa evocado frente a predadores

Muitos autores têm considerado as desordens de ansiedade como o resultado de doenças associadas ao sistema neural que organiza o comportamento de defesa (STEIN; BOUWER, 1997; BLANCHARD et al., 2001; GRAEFF, 1994; GRAY; McNAUGHTON, 2000). Dessa forma, associações entre as respostas defensivas e os ataques predatórios têm sido atualmente propostas para estudar algumas doenças, como o distúrbio de ansiedade generalizada e a síndrome do pânico (BLANCHARD et al., 1997, 2001; GUIMARÃES-COSTA et al., 2007). Tais associações fundamentam-se em trabalhos experimentais, como os realizados por Blanchard e Blanchard (1988), sobre as reações de roedores frente a um predador, como o gato e o Homem, ou entre roedores e serpentes, como o paradigma recentemente validado por Paschoalin-Maurin et al. (2018). Esses relatos utilizam esse modelo experimental para avaliar o efeito de drogas que modulam a ansiedade humana, como os benzodiazepínicos (diazepam, alprazolam e clordiazepóxido), e drogas que interferem no sistema serotoninérgico (como a gepirona, a paroxetina e a fluoxetina), em comportamentos de ansiedade/defesa e medo/defesa, validando o modelo e apresentando promissores resultados sobre as respostas defensivas evocadas em presença de predadores (BLANCHARD et al., 1993; PASCHOALIN-MAURIN et al., 2018). Considerando os efeitos terapêuticos dos antidepressivos na síndrome do pânico, e a atenuação, pela administração crônica de fluoxetina ou de paroxetina, das respostas comportamentais defensivas evocadas pela estimulação da substância cinzenta periaquedutal dorsal e ventral, o comportamento de fuga e de imobilidade defensiva têm sido associados a esse distúrbio (BORELLI et al., 2004; PASCHOALIN-MAURIN et al., 2018). Com efeito, em seres humanos, a estimulação elétrica da substância cinzenta periaquedutal (SCP), uma estrutura mesencefálica, cuja estimulação em animais evoca comportamento explosivo de fuga (BRANDÃO; MELO; CARDOSO,

1993; EICHENBERGER et al., 2002; SCHENBERG, 1997), produz ansiedade intensa, pânico, terror e sensação de morte iminente (NASHOLD et al., 1969).

O comportamento defensivo tem sido estudado há anos por diversos pesquisadores em modelos experimentais de doença mental que contemplam o recrutamento de estruturas que elaboram o medo real ou potencial, com inferências sobre os transtornos ansiosos e transtorno do pânico que, por meio do paradigma de confronto entre presa *versus* predador, ou por estimulação química com antagonistas dos receptores GABA_A ou de inibidores da enzima ácido glutâmico Descarboxilase em sítios mesencefálicos, eliciam-se reações tanto fisiológicas como comportamentais sugestivas de medo intenso (BRANDÃO et al., 1982, 1986, 1988; PASCHON-ALIN-MAURIN et al., 2018). Vigorosas reações defensivas caracterizadas por imobilidade defensiva, fuga, avaliação de risco também podem ser evocadas por administrações de aminoácidos excitatórios ou drogas opióides no colículo inferior (CI) (CARDOSO et al., 1992, 1994). Partindo desse pressuposto, o estudo de vias GABAérgicas e de projeções peptidérgicas opióides 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 desencadeadas por estímulos ambientais inatos ou aprendidos que sinalizem perigo: ambientes desconhecidos, a silhueta de predadores, expressões emocionais que indiquem raiva e ameaça de ataque, odor ou ruídos de um predador, vocalizações ameaçadoras de animais de uma mesma espécie na ocorrência de conflitos sociais ou qualquer outro fator que tenha adquirido significado de advertência por precederem consistentemente a ocorrência de estímulos nocivos ou dolorosos.

Alguns espécimes de predador, tais como a *Crotalus durissus terrificus* (cascavel) utilizam dicas sonoras específicas para sinalizar agressividade, ou como aviso de ataque iminente, ao passo que outras espécies imitam os sons do guizo de cascadeis para afastarem prováveis predadores de mamíferos das redondezas (OWINGS et al., 2002; COIMBRA et al., 2017a). Alguns roedores assumem postura bípede, hesitação na evocação de comportamento

exploratório e constantes reaproximações da área onde eventualmente identificaram cascaveis, após detectarem sinais sonoros de guizos de tais serpentes (SWAISGOOD et al., 1999). Presas habituais de serpentes ainda discriminam entre tamanhos diferentes de serpentes cascaveis e eliciam comportamentos defensivos de acordo com a gravidade do risco de vida (em razão das dimensões do predador) e do contexto (em razão da distância que as serpentes guardam dos abrigos das presas e segundo a categoria reprodutiva das presas) (SWAISGOOD et al., 1999). Dessa forma, um estímulo inato ou condicionado que sinalize perigo e dano corporal iminente ativa circuitos neurais encefálicos responsáveis pela gênese e elaboração de estados aversivos (ADAMS, 1979; FANSELOW, 1991; PANKSEPP, 1990), 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 (COIMBRA; BRANDÃO, 1993; GRAY, 1982; COIMBRA et al., 2017a; PASCHOALIN-MAURIN et al., 2018), imobilidade defensiva ou congelamento” (ZHANG et al., 1990; COIMBRA et al., 2017a; PASCHOALIN-MAURIN et al., 2018), fuga (COIMBRA; BRANDÃO, 1993; PANKSEPP, 1990; COIMBRA et al., 2017a; PASCHOALIN-MAURIN et al., 2018), ou por imobilidade tônica (MENESCAL-DE-OLIVEIRA; HOFFMANN, 1993), e por um conjunto de posturas ameaçadoras e vocalização seguidos 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 (ADAMS, 1979; MICZEK; THOMPSON, 1984). A expressão do comportamento de defesa acompanha-se de acentuadas alterações neurovegetativas e endócrinas, largamente estudadas (HILTON, 1982; LEÃO-BORGES; COIMBRA; BRANDÃO, 1988; MANCIA; ZANCHETTI, 1981).

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 eliciaria reações de ira ou de medo, extensas investigações têm sido feitas com a utilização de neurotraçadores, de técnicas imunoistoquímicas, psicofarmacológicas e até mesmo utilização de clássicos métodos de estudo em neurofisiologia (BRANDÃO; MELO; CARDOSO, 1993; CARRIVE, 1993; COIMBRA; BRANDÃO, 1993; COIMBRA et al., 2006; EICHENBERGER et al., 2002; FUCHS; SIEGEL, 1984; FUCHS et al., 1985; STEINBUSH, 1981). Somente para citar alguns resultados de pesquisa básica, verificou-se a existência de fibras ascendentes, via hipotálamo anterior (HA), para o complexo amigdalóide e núcleo do leito da estria terminal, assim como de fibras descendentes, através do hipotálamo medial (HM), para o complexo mediano parafascicular do tálamo e substância cinzenta periaquedutal, sugerindo um complexo substrato neural relacionado com resposta comportamentais envolvendo o medo e a ansiedade (FUCHS; SIEGEL, 1983; FUCHS et al., 1985). Com efeito, não somente a substância cinzenta periaquedutal (COMOLI et al., 2003), mas também o núcleo pré-mamilar dorsal do hipotálamo (CANTERAS et al., 1997) apresentam ativação neural mostrando um envolvimento do hipotálamo na modulação dos comportamentos de defesa em animais expostos a seus predadores naturais ao passo que, em ratos, durante a evocação do ataque predatório, tem sido descrita uma ativação neuronal em aspectos ventrolaterais do neocórtex (área provavelmente envolvida com padrões estereotipados do comportamento de caça predatória), em redes neurais do complexo amigdalóide (área de transição pós-piriforme, região anterior do núcleo cortical, divisão anterior do núcleo baso-medial, parte posterior do núcleo baso-lateral e divisão medial do núcleo central), em redes neurais do núcleo do leito da estria terminal (núcleo romboide) e no hipotálamo (núcleo parassubtalâmico) (COMOLI et al., 2005). Acrescente-se que o hipotálamo se encontra diretamente envolvido nos mecanismos neurais que controlam as funções hipofisárias, comandando, dessa forma, as alterações endócrinas que acompanham o comportamento emocional (LEDoux, 1991; MARTIN,

1998; NAUTA, 1958; KUPFERMAN, 1991). As redes neurais hipotalâmicas podem ainda elaborar respostas motivacionais que embasam o comportamento das presas, tais como odor e paladar, e influenciar o controle de respostas neurovegetativas e motoras que acompanham o comportamento predatório (COMOLI et al., 2005), além de elaborar o comportamento de defesa em situações de risco iminente de vida. Lesões químicas do núcleo pré-mamilar dorsal do hipotálamo com ácido ibotênico deprimem o comportamento de imobilidade defensiva (*freezing*) e de fuga em ratos expostos a seus predadores naturais, aumentando a incidência de comportamento exploratório (CANTERAS et al., 1997).

Ao 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 periaquedutal dorsal (SCPd), hipotálamo medial, complexo amigdalóide e área septal (BEN-ARI, 1981; GRAEFF, 1990; SIEGEL; POTT, 1988), o que permite situar as redes neurais que circundam o aqueduto cerebral no cerne do sistema encefálico de aversão, que coordenaria a geração e elaboração do medo, ao lado de outras estruturas, como as camadas profundas do colículo superior (COIMBRA; BRANDÃO, 1993) e núcleos pericentrais e central do colículo inferior (BRANDÃO et al., 1988, 1993; CARDOSO et al., 1994). Efetivamente, danos realizados na SCPd prejudicam a defesa afetiva induzida por estímulos ambientais ou pela estimulação elétrica do hipotálamo dorso-medial e complexo amigdalóide, muito embora a destruição dessas últimas estruturas não seja suficiente para afetar a reação de defesa evocada por estimulação da SCPd (MOLINA; HUNSPERGER, 1959). A fuga e outros comportamentos defensivos, como as reações de esquiva, são reduzidas por lesões no complexo amigdalóide e SCPd (BLANCHARD; BLANCHARD, 1972; BLANCHARD et al., 1979; ISAACSON, 1982; PELLEGRINO, 1968). As lesões no núcleo central do complexo amigdalóide amenizam as respostas defensivas evocadas por estimulação elétrica do núcleo

central do colículo inferior (MAISONNETTE et al., 1996) e tem sido sugerido que o processamento emocional depende da informação aferente vinda do núcleo do corpo geniculado medial para o complexo amigdalóide (IWATA et al., 1987). Animais lesados na SCPd, caracteristicamente, além de exibirem poucas reações de medo, também não fugiam de estímulos dolorosos (MELZACK et al., 1982) e, na presença de ruídos (LYON, 1964), mostraram resposta reduzida de fuga e esquivas ao choque nas patas (HALPERN, 1968).

Estudos usando imunorreatividade à proteína Fos corroboraram os estudos neurofisiológicos, mostrando evidências que sugerem que o complexo amigdalóide, o hipotálamo medial, a substância cinzenta periaquedutal dorsal, as camadas profundas do colículo superior (CS) e o colículo inferior constituem parte do sistema encefálico de aversão, pois essas áreas foram marcadas após a estimulação tanto elétrica quanto química da substância cinzenta periaquedutal dorsal ou seguida à exposição dos animais a estímulos ambientais aversivos e a predadores (SILVEIRA et al., 1993; PASCHOALIN-MAURIN et al., 2018). Marcações imunoistoquímicas da proteína Fos na substância cinzenta periaquedutal também têm sido descritas em animais submetidos a seus predadores naturais, principalmente considerando os aspectos dorsais da SCP (CANTERAS; GOTO, 1999; PASCHOALIN-MAURIN et al., 2018), muito embora haja evidências de que também as camadas profundas do colículo superior (cpCS), o colículo inferior e o núcleo dorsal da rafe (CANTERAS; GOTO, 1999; WELTSON et al., 2003) apresentam-se igualmente ativados em situações de perigo iminente de vida como aquelas em que roedores são expostos a seus predadores naturais (CANTERAS; GOTO, 1999; COMOLI et al., 2003) ou a serpentes corais peçonhentas (WELTSON et al., 2002; 2003; PASCHOALIN-MAURIN et al., 2018).

A estimulação elétrica ou a microinjeção de antagonistas de receptores GABA-A no colículo inferior também eliciam um conjunto de respostas comportamentais caracterizadas por corridas, saltos e rotações, a que se denomina comportamento explosivo ou não orientado de

fuga. A imobilidade que antecede essas reações motoras e que se faz acompanhar de algumas alterações autonômicas é conhecida como imobilidade defensiva, termo este que também é descrito na literatura como “*freezing*” ou “congelamento”. O colículo inferior tem sido recentemente considerado como parte integrante do sistema encefálico de aversão, constituído, pelo que foi exposto acima, por estruturas como a substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPd), o colículo superior em seu *stratum griseum profundum*, o hipotálamo dorso-medial e o complexo amigdalóide (BRANDÃO et al, 1988; 1993).

Estudos vários evidenciaram, também, a implicação de mecanismos GABAérgicos e opioides no controle dos substratos neurais que comandam o comportamento defensivo no sistema encefálico de aversão (COIMBRA; TOMAZ; BRANDÃO., 1992; COIMBRA; BRANDÃO, 1993, 1997; GRAEFF, 1990; CARDOSO et al., 1992). Evidências encontradas em experimentos farmacológicos têm sugerido que mecanismos opioides podem estar envolvidos no controle de reações defensivas, uma vez que a administração de antagonistas opioides aumentou os limiares do comportamento de defesa eliciado por estimulação elétrica de algumas estruturas do mesencéfalo dorsal, como a substância cinzenta periaquedutal dorsal e o colículo superior (COIMBRA et al., 1996). Outros autores sugerem, ainda, que os substratos neurais que controlam o comportamento defensivo no colículo inferior estão sob o controle inibitório opioide (BRANDÃO et al., 1993, 1994; CARDOSO et al., 1992; COIMRA et al., 2000).

Projeções nigro-tectais têm sido consistentemente demonstradas na literatura, descrevendo-se, principalmente, aferências às camadas profundas (COIMBRA et al., 1998; EICHENBERGER et al., 2002) intermediárias e superficiais do colículo superior (REDGRAVE et al., 1992), provenientes da substância negra, parte reticulada (SNpr), e ao núcleo pericentral do colículo inferior (OLAZÁBAL; MOORE, 1989), provenientes da substância negra, parte lateral (SNpl). Ainda, um estudo multidisciplinar, integrando técnicas morfológicas e psicofarmac-

lógicas, demonstrou a relevância das projeções nigro-coliculares no controle das respostas induzidas pelo medo e pelo pânico elaboradas tanto em aspectos craniais como caudais do teto mesencefálico de pequenos animais (CASTELLAN-BALDAN et al., 2006).

O aumento do comportamento de rotação após a lesão da SNpr também já foi sugerido por outros estudos (COIMBRA et al., 1989; IMPERATO et al., 1981) como sendo resultado da diminuição na transmissão GABAérgica por meio da via nigro-colicular. Logo, o aumento da manifestação do comportamento de fuga após a lesão da SNpr pode ter sido devido à remoção do controle inibitório exercido pelas fibras GABAérgicas no substrato neural do comportamento defensivo induzido por estimulação do mesencéfalo dorsal (COIMBRA; BRANDÃO, 1993; RIBEIRO et al., 2005; CASTELLAN-BALDAN et al., 2006).

A mediação de mecanismos opioides tem sido um dos principais focos de atenção das pesquisas sobre a modulação dos substratos neurais que elaboram a aversão no teto mesencefálico. É sabido que pequenas doses de morfina microinjetadas na SCPd atenuam, de forma dose-dependente, as respostas defensivas eliciadas através de estimulação elétrica dessa estrutura (BRANDÃO et al., 1985; BRANDÃO et al., 1990; JENCK et al., 1983; JENCK et al., 1986). Entretanto, altas doses de morfina, quando injetadas localmente nessa estrutura, causam ativação comportamental caracterizada por saltos e corridas, mostrando grande similaridade com as reações observadas quando se faz a estimulação elétrica, ou microinjeções de bloqueadores GABAérgicos nessa estrutura (CARDOSO et al., 1992). Mecanismos opioides parecem estar crucialmente envolvidos no controle das reações de defesa, considerando que, muito embora haja relatos de que microinjeções de morfina na SCPd atenuam tanto as respostas comportamentais como alterações autonômicas eliciadas por estimulação elétrica do mesencéfalo dorsal (JENCK et al., 1983, 1988), outros trabalhos sugerem uma ação antiaversiva da morfina microinjetada no colículo inferior de roedores (CALVO; COIMBRA, 2006). Com efeito, microinjeções de antagonistas de receptores opioides, como o naloxone, na substância cinzenta

periaquedutal ventral, possuem a propriedade de atenuar o medo eliciado por estímulos nocivos externos (FANZELOW; BOLLES, 1979) ou durante a estimulação aversiva do teto mesencefálico (COIMBRA et al., 1996; COIMBRA et al., 2000; CALVO; COIMBRA, 2006). Esses dados conflitantes têm despertado a atenção dos pesquisadores e sugerem que o substrato neural que organiza as respostas eliciadas pelo medo no mesencéfalo dorsal é finamente organizado, e a natureza neuroquímica de suas redes neurais não é uniforme.

Embora algumas estruturas do teto mesencefálico (TM), com a SCPd, o colículo inferior (CI) e as cpCS estejam associadas com manifestações comportamentais induzidas por estímulos aversivos, não está claro se o substrato neural responsável pelos aspectos motivacionais do medo no TM pode estar implicado em padrões defensivos que acompanham a sensação de dor, ou da antecipação de tais sensações na presença de predadores. Também não está claro se os opioides endógenos estão apenas envolvidos em respostas antinociceptivas induzidas por estimulação da SCPv, ou se também regulam a reação de defesa eliciada por estimulação da SCPd/cpCS e dos substratos neurais do CI envolvidos com reações de defesa afetiva. A precisa localização de mecanismos opioides pró-aversivos ou antiaversivos necessita ser mais bem estabelecida tanto farmacologicamente como morfológicamente, considerando os substratos neurais do tronco encefálico responsáveis pela elaboração e neuromodulação do comportamento de defesa.

Considerando que (a) há evidências de aumento da expressão da proteína Fos em estruturas diencefálicas, como o hipotálamo anterior, medial e posterior, além do núcleo pré-mamilar dorsal de roedores expostos a seus predadores naturais (CANTERAS; GOTO, 1999; COMOLI et al., 2003; PASCHOALIN-MAURIN et al., 2018), (b) a modulação opioide do comportamento de defesa parece envolver os substratos neurais representados pelas cpCS (COIMBRA et al., 1996; RIBEIRO et al., 2005), SCPd (COIMBRA et al., 1996, EICHENBERGER et

al., 2002) e CI (COIMBRA et al., 2000; OSAKI et al., 2003), que recebem conexões provenientes e estruturas hipotalâmicas que elaboram parte do comportamento de defesa (ULLAH et al., 2015, 2017) e (c) que há evidências do controle pré-sináptico exercido por vias opioides inibitórias sobre terminais GABAérgicos de projeção nigro-tectal (CASTELLAN-BALDAN et al., 2006; EICHENBERGER et al., 2002; RIBEIRO et al., 2005), que modulam os mesmos sítios considerados vias de saída do sistema encefálico de aversão, e que também são recrutados por estruturas hipotalâmicas durante reações de ataques de pânico (ULLAH et al., 2017), objetivo do presente projeto consiste em dar prosseguimento a esse estudo, visando investigar se a interação entre mecanismos opioides e GABAérgicos diencefálicos têm a propriedade de modular a expressão do medo em situações de risco iminente de vida, onde o sistema límbico é ativado como um todo, utilizando-se para tanto um modelo experimental de confronto entre presa e predador.

1.3 Interação entre estímulos que eliciam comportamentos respondentes e operantes envolvendo os mecanismos de defesa em um paradigma de presa *versus* predador

Todo o constructo empírico realizado até os dias atuais sobre a neuropsicobiologia do medo é devido a trabalhos prévios idealizados por Cannon, Bard e Papez feitos no início do século passado quando começaram a investigar os mecanismos neurais que eram responsáveis pelas emoções, principalmente para os sentimentos de medo. Estudos pioneiros de Hess e Brugger (1943) mostraram que a estimulação elétrica feita no hipotálamo de gatos causava comportamentos caracterizados como aversivos, uma vez que esses animais com eletrodos instalados nesses núcleos apresentavam comportamentos operantes de desligar a estimulação (BRANDÃO, 2012).

No início da década de 1980, muitos avanços científicos foram realizados sobre a organização do medo incondicionado em resposta ao perigo iminente que leva o animal a eliciar comportamentos de fuga ou de luta, indicando de forma empírica que existe uma integração de sistemas encefálicos responsáveis pela aversão no sistema nervoso central (SNC) que pode ser acionado por estímulos ameaçadores ao organismo, tais como choques, sons intensos (potencial evocado) ou estímulos ameaçadores para pequenos mamíferos como a presença da mão do homem, a presença de um predador natural (BLANCHARD; BLANCHARD, 1993; PASCHOALIN-MAURIN et al., 2018).

Os mecanismos relacionados à resposta de defesa incondicionada estão associados ao sistema de fuga ou luta mediados pelo sistema cerebral de aversão que é representado pelo hipotálamo medial, pela SCPd e pelo complexo amigdalóide. A relação de estímulos ameaçadores produz como resposta aos estímulos prévios respostas motoras, neurovegetativas e emocionais.

É de suma importância sistematizar a relação de estímulos antecedentes juntamente com a resposta produzida pelo organismo. Segundo Catania (1999), na análise do comportamento, as operações são o que o experimentador faz, arranja ou programa, e os processos são as mudanças que resultam no comportamento. Pode-se programar coisas de um jeito que os estímulos sinalizem a apresentação de outros estímulos ou que o estímulo sinalize a oportunidade de produzir consequências ao organismo.

Os estímulos efetivos como sinais são denominados de estímulos discriminativos, e as operações que envolvem sinais são chamadas de operações sinalizadoras ou operações de controle de estímulos. Uma apresentação de estímulos e a programação de consequências dificilmente ocorrem isoladamente, geralmente elas são sinalizadas por outros eventos. Um relâmpago, precede, quase sempre, o barulho de um trovão. Um semáforo alerta o motorista sobre possíveis consequências de seguir em frente ou de parar frente a um cruzamento (CATANIA,

1999), bem como o balançar do guizo da cascavel precede comportamentos respondentes ou operantes por parte do predador (COIMBRA et al., 2017a).

Muitas vezes, ao invés de somente sinalizar a apresentação de estímulos como Pavlov (1927) fez, um estímulo pode sinalizar as ocasiões em que as respostas terão consequências. Em uma análise do caso do cavalo Claver Hans, que parecia ter aprendido a resolver questões aritméticas com suas patas, o animal aparentemente resolvia problemas de adição, multiplicação e raiz quadrada e suas respostas eram emitidas no bater de suas patas. Seu desempenho foi investigado e descobriu-se que Claver Hans somente resolvia os problemas matemáticos na presença do dono e quando o dono sabia da resposta, neste caso notou-se que os movimentos sutis do treinador forneciam estímulos para quantificar a batida das patas. Este caso fornece informações de que mesmo os comportamentos mais sutis do estímulo sinalizam as consequências do responder (CATANIA, 1999).

1.4 Substratos neurais que organizam o comportamento de defesa

Hess e Brugher (1943) demonstram o papel de estruturas límbicas no envolvimento de possíveis emoções consideradas como defensivas. Os experimentadores, ao fazerem estimulação elétrica do hipotálamo medial de gatos, observaram respostas comportamentais semelhantes às aquelas evocadas pela presença de um predador. Houve piloereção, midríase, achatamento das orelhas, exposição das presas, um enrijecimento muscular, bufos e sibilos.

É importante ressaltar que, devido ao fato de os animais de laboratório não compartilharem da mesma capacidade de comunicação verbal que os seres humanos, os comportamentos/ sentimentos descritos partem de interpretações (através de etogramas) dos pesquisadores

ao longo dos anos. Quando se fala de respostas de pânico e de ansiedade, por exemplo subentendem-se respostas de medo inato similares aos sintomas das doenças mentais mencionadas, para caracterizar os comportamentos que refletem parte desses transtornos afetivos.

Evidências mais recentes, publicadas por Wilent et al. (2010), mostraram os efeitos da estimulação elétrica no hipotálamo ventromedial em paciente humano. Neste estudo clínico de uma paciente que fazia tratamento para obesidade, observou-se que a estimulação encefálica, mais especificamente do HVM, eliciava fortes emoções na paciente.

1.5 Os transtornos de ansiedade e transtornos do pânico

Os transtornos de ansiedade abrangem e incluem os transtornos que compartilham características de respostas emocionais de medo e ansiedade excessivas. Visando fazer uma breve definição dessas emoções, medo é definido como uma resposta emocional à ameaça iminente real ou percebida, enquanto ansiedade é definida como preocupação excessiva acerca de ameaça futura ou potencial (DSM-V, 2013). Devido ao fato de haver uma linha tênue entre esses conceitos etológicos, os estados emocionais são parcialmente sobrepostos, mas se diferenciam principalmente pelo medo estar, com mais frequência, associado a períodos de excitabilidade autonômica aumentada que são necessários para a emissão de comportamentos de luta ou fuga e a ansiedade estar mais associada frequentemente à tensão muscular, vigilância e preparação para eventos futuros, onde comportamentos mais evidentes nesse caso são comportamentos de cautela e de esquiva inibitória, este último caracterizado principalmente pelo comportamento de evitação de determinada situação (DSM-V, 2013). É possível dividir a esquiva em duas modalidades comportamentais, sendo elas, segundo Catania (1999), a esquiva ativa e a esquiva passiva, onde a esquiva ativa surge quando o organismo se organiza para evitar a situação que

lhe cause algum incomodo, ou como descrito aqui em um caso de ansiedade, onde geralmente o sujeito não quer se defrontar com o evento aversivo, evadindo-se do ambiente potencialmente hostil. Pode-se usar como exemplo de esquiva ativa, um sujeito com medo de elevador que, ao precisar subir para os andares superiores desvia seu caminho e sobe pelas escadas. No que se refere à esquiva passiva, é possível ter como exemplo o mesmo sujeito com medo de elevador, entretanto, ao invés de se desviar do elevador e subir pelas escadas ele nem sai de casa, havendo uma inibição comportamental e agorafobia. Esse comportamento é mantido pelo valor reforçador negativo da esquiva.

Segundo Brandão (2019), o transtorno de ansiedade se diferencia do medo e da ansiedade adaptativos devido a sua intensidade, e por durar longos períodos, ao contrário da ansiedade adaptativa que, com frequência, é induzida por estresse.

Abaixo, serão listados os principais tipos de transtornos de ansiedade, menção a sua maior prevalência no sexo feminino, tendo prevalência de 2:1, sendo que para esse diagnóstico a condição do indivíduo não pode estar associada ao uso de substâncias que alteram sua fisiologia normal e não pode estar associada a outra condição médica ou não sendo bem mais explicado por outro transtorno mental.

Segundo o DSM-V (2013), há uma classificação específica para o transtorno de ansiedade de separação, que consiste em um quadro de ansiedade e apreensão quando a figura de apego emocional se distância e sai do contexto (por determinado tempo), comumente visto em crianças que sentem que pode haver dano a figuras de apego; os sintomas são variados, podendo ser comportamentais, como birras, choro, além de pesadelos recorrentes e sintomas físicos de sofrimento. Não se limita à infância.

O mutismo seletivo é caracterizado pelo fracasso em falar em contextos onde se encontram mais pessoas, nos quais existam pressão social e a expectativa de que se fale, como,

por exemplo, no contexto escolar, onde os prejuízos funcionais são grandes, pois interferem nas conquistas acadêmicas, profissionais e sociais (DSM-V, 2013).

O transtorno de ansiedade social é caracterizado predominantemente por comportamentos de esquiva, pois o indivíduo torna-se temeroso e ansioso quando pode estar em situações sociais que envolvam a possibilidade de ser avaliado, como encontrar pessoas que não são de seu círculo íntimo, contextos em que o indivíduo pode estar sendo observado comendo ou bebendo, ou contextos de exijam algum desempenho (DSM-V, 2013).

No transtorno do pânico, o indivíduo vivencia ataques de pânico inesperados e recorrentes; é muito característico o indivíduo sentir-se temeroso com a possibilidade de sofrer novos ataques. Os ataques de pânico são acompanhados de sintomas físicos, cognitivos, e podem ser devido a fatores esperados e inesperados, o que funciona como um marcador prognóstico para a gravidade do diagnóstico, curso e comorbidades com uma gama de transtornos, incluindo, mas não limitando-se a ele, o transtorno de ansiedade (DSM-V, 2013). Os distúrbios do pânico vêm acompanhados de respostas cardiovasculares, tremores e tonturas que são bastante acentuados. Curiosamente, os sintomas podem desaparecer rapidamente ou de forma gradual, fazendo com que os pacientes desenvolvam ansiedade antecipatória pareada com os ataques de pânico, sendo possível observar nesses casos clássicos comportamentos operantes de esquiva (BRANDÃO, 2019).

A agorafobia, que se caracteriza por indivíduos apreensivos e ansiosos em situações específicas, tais como andar de transporte público, estar em ambientes abertos, estar em lugares fechados, estar em filas, estar no meio de uma multidão, etc. O indivíduo sente aversão a tais situações, pois tem a crença de que, se houver um ataque de pânico, ele não terá o auxílio necessário ou que pode ser difícil escapar em alguma situação inesperada, e é comumente observado comportamentos de esquiva ativa do ambiente que lhe é hostil ou de esquiva inibitória, não se expondo a tais situações ou ambientes (BRANDÃO; GRAEFF, 2014).

Ainda segundo o DSM-V (2013), as características dos transtornos de ansiedade generalizada são ansiedade e preocupação excessivas e persistentes acerca de várias coisas, como o desempenho no trabalho e desempenho escolar. Muito comumente são observados sintomas físicos, tais como inquietação e ansiedade, fadiga, dificuldade de concentração ou ter lapsos na memória, tensão muscular e perturbações no sono.

Na prática clínica psiquiátrica, os inibidores seletivos de recaptação de serotonina (ISRS) são as primeiras alternativas terapêuticas para o tratamento do transtorno de ansiedade generalizada (TAG). Em um estudo dirigido por Pollack et al. (2001), foram estudados pacientes do sexo masculino e feminino com idade igual ou superior a 18 anos que preenchiam os critérios diagnósticos do DSM-IV para o TAG, em um ambulatório da psiquiatria. Esses pacientes foram avaliados com a escala psicométrica de ansiedade de Hamilton para classificação dos níveis de ansiedade e, após o seu preenchimento, eles foram aleatoriamente designados para o tratamento farmacológico com paroxetina (20-50 mg/ dia) ou placebo durante 8 semanas. Observou-se que, com o grupo tratado com paroxetina, obteve-se uma redução significativamente maior nos níveis de ansiedade comparados com o grupo tratado com placebo. A paroxetina nas doses de 20 a 50 mg uma vez ao dia mostrou-se eficaz no tratamento de pacientes com TAG.

Além das abordagens farmacológicas amplamente estudadas, a clínica psicológica vem trabalhando com sucesso nos transtornos de ansiedade, transtorno do pânico e agorafobia.

Com efeito, a análise sugerida e proposta por Zamignani e Banaco (2005) vem mostrando grandes resultados em melhoras nos quadros de ansiedade, transtorno do pânico e agorafobia (PEZZATO; BRANDÃO e OSHIRO, 2012), sendo essa abordagem consistindo em uma análise funcional das operações estabelecedoras da ansiedade (condições de privação e estimulação aversiva do indivíduo), estímulos discriminativos pré-aversivos e respostas encobertas que são composto pelo contexto antecedente para ocorrência de respostas, respostas de

ansiedade (compulsão, verificação, fuga e esquiva) que são seguidas por consequências reforçadoras negativas, como a eliciação ou adiamento de estimulação aversiva, e consequências reforçadoras positivas. Nessa análise, é possível fazer com que o paciente discrimine as situações de esquiva e fuga e consiga refletir e mudar comportamentos que o mantêm em quadros de ansiedade e de medo intenso; os estímulos e respostas presentes são passíveis de estabelecer relações de generalização, capazes de eliciar ou evocar respostas de ansiedade e, através da psicoterapia, é possível cessar sintomas de transtornos de pânico, ansiedade, e fobias de modo que o paciente tenha uma melhor qualidade de vida.

1.6 Propriedades opioides que alteram o humor e propiciam recompensa

O termo opioide refere-se a uma forma geral a todos os compostos relacionados ao ópio. Em sua origem, a palavra ópio deriva de *opos* que vem do grego que significa “suco” sendo um fármaco derivado do suco da papoula *Papavers somniferum*, a flor de onde se extrai o ópio.

A primeira referência ao ópio ao longo da história encontra-se em escritos de Teofrastos no século III A. C, quem dizia que sua principal utilização era para a disenterias. Em meados de 1680, Sydenham escreveu “dentre todos os remédios que Deus todo poderoso houve por bem dar aos homens para aliviar-lhes os sofrimentos, nenhum é tão universal e tão eficaz quanto o ópio”.

Os mecanismos pelos quais os opioides produzem alteração no humor, como euforia, tranquilidade não são inteiramente claros; entretanto, os sistemas neurais que medeiam o reforço do comportamento pelos opioides são distintos dos envolvidos na dependência física e na analgesia (Koob e Bloom, 1988).

Evidências farmacológicas e comportamentais indicam recrutamento de neurônios dopaminérgicos que envolvem o núcleo *accumbens* (NAcc) na recompensa induzida pelos fármacos. O NAcc, que consiste na fusão entre a cabeça do núcleo caudado e o *putamen* rostralmente, constitui uma área referida como estriado ventral (Heimer et al., 1982). O estriado ventral media comportamentos de motivação e afeto, funções límbicas, ao passo que o estriado dorsal está envolvido em funções sensoriais e cognitivas.

Os peptídeos opioides derivados da pró-dinorfina e da pró-encefalina são liberados principalmente por neurônios de saída do neostriado e, principalmente, do NAcc. Agonistas seletivos do receptor μ e δ promovem recompensas quando definidos por paradigmas de preferência por lugar (*place preference*). Os efeitos positivos dos opioides sobre a motivação são parcialmente mediados pela liberação de dopamina em nível de NAcc. Assim, a ativação do receptor κ nesses circuitos inibe a liberação de dopamina, ao passo que a ativação dos receptores μ e δ aumenta a liberação de dopamina no neostriado ventral.

A *substantia ferruginea* (WILSON, 1858), local vizinho ao sulco *limitans* no assoalho do IV ventrículo, que corresponde ao *locus coeruleus*, contém neurônios noradrenérgicos e altas concentrações de receptores opioides que se postula terem um papel fundamental nas sensações de alarme, pânico, medo e ansiedade, tem sua atividade neural inibida por opiáceos e por peptídeos opioides endógenos (BEAUDET et al., 1979; STRAHLENDORF et al., 1980).

Através de um levantamento histórico, sítios específicos para ligação no encéfalo só foram descritos em 1973. Atualmente, existem evidências de pelo menos três tipos de receptores opioides que se enumeram a seguir: receptor do tipo μ (Mu), do tipo κ (Kappa) e do tipo δ (Delta) (COLASANTI et al., 2010). Recentemente foi descrito um quarto tipo, o receptor de nociceptina/ orfanina que, de forma estrutural, é muito semelhante aos receptores opiodes, mas, no entanto, os ligantes endógenos opioides não interagem com esses receptores (MOGIL; PASTERNAK, 2001).

Existem três grupos de peptídeos opioides endógenos que são chamados de metionina, leucina e encefalina, que são derivados da pró-encefalina, dinorfinas A e B e neoendorfina, derivados da pró-dinorfina, e a β -endorfina, derivada da pró-opiomelanocortina. As encefalinas têm maior afinidade pelos receptores δ e μ ; em contra partida, as dinorfinas ligam-se as receptores do tipo delta, enquanto as endorfinas ligam-se com maior afinidade pelos receptores μ e κ (LORD et al., 1977; RAYNOR et al., 1994).

1.7 O Sistema Opioidérgico na modulação do comportamento defensivo

A investigação da modulação exercida por mecanismos opioides tem sido foco de diversas pesquisas com o objetivo de esclarecer a organização das redes neurais e das neurotransmissões que modulam os comportamentos defensivos no *tectum* (EICHENBERGER et al., 2002). Foi demonstrado sistematicamente que pequenas doses de morfina injetadas na SCPd freiam, de uma forma dose-dependente, as respostas defensivas obtidas através de estimulação elétrica.

Brandão, Coimbra e Borges (1990) mostraram os efeitos da microinjeção de morfina SCPd, sendo que os efeitos da dose mais alta utilizada, de 10 nmol, aumentaram os limiares dos comportamentos defensivos de fuga e saltos.

Mais recentemente, da Silva et al. (2017) demonstraram que a administração de endomorfina-1 (EM-1) em diferentes doses causou efeitos paradoxais, nas respostas de defesa eliciadas pelo antagonismo dos receptores GABA_A nas cpCS. O pré-tratamento do SNpr com as doses mais altas de EM-1 (de 20 e 200 nmol) causou um aumento significativo no número de alerta defensivo, o que foi significativamente diferente em comparação com o pré-tratamento da SNpr com EM-1 na dose mais baixa, de 2 nmol. O pré-tratamento da SNpr com EM-1 na

dose mais alta (200 nmol) causou um aumento significativo no número de imobilidade defensiva causada pela administração de bicuculina no mesencéfalo dorsal. Esse efeito foi estatisticamente diferente em comparação ao tratamento da SNpr com EM-1 nas doses mais baixas.

Através dessas evidências, mecanismos opioides parecem estar envolvidos na eliciação de comportamentos defensivos. Em um estudo de Fanzellow e Bolles (1979), mostrou-se que os antagonistas de receptores opioides, como a naloxona, administrada na SCPv, possuem o efeito de diminuir o medo eliciado por estímulos nocivos externos.

Muito embora estruturas mesencefálicas, tais como a SCPd e os corpos quadrigêmeos, compreendidos pelos colículos superiores e inferiores, entejam envolvidos com a organização de pelo menos parte do comportamento induzido por estímulos aversivos, sendo modulados por projeções opioides (COIMBRA et al., 2000; EICHENBERGER et al., 2002), ainda não está definido se estes substratos neurais possam vir a ser modulados unicamente pelo *tectum*, ou se estruturas que também se estendem ao diencéfalo estão sendo recrutados para que a emissão comportamental ocorra sob neuromodulação opioide.

Os antagonistas opioides agem de forma diversas na eliciação de estados emocionais, dependendo do receptor com que o antagonista se acopla, pois tem sido mostrado que há diferenças comportamentais quando o antagonista age no receptor μ ou no receptor κ , durante a eliciação de comportamentos defensivos como aqueles decorrentes de estímulos aversivos, e como a EM-1 tem alta afinidade pelo receptor μ é possível que efeitos paradoxais de doses diferentes sejam observadas quando a EM-1 é administrada no mesencéfalo dorsal, considerando seja o colículo inferior (CARDOSO et al., 1992) ou nas cpCS (da SILVA et al., 2017).

Não obstante, a ação antiaversiva do bloqueio farmacológico dos receptores μ vem sendo consistentemente demonstrada por nosso grupo. Segundo Calvo et al. (2019), em experimentos usando o paradigma presa *versus* predador, respostas defensivas evocadas frente a um po-

tencial predador, como a cascavel, diminuíram significativamente com o tratamento intracolicular com naloxone em doses mais altas, de 3 e 5µg, tendo havido diminuição significativa da avaliação de risco, da imobilidade defensiva e do comportamento de fuga em relação à serpente (CALVO e tal., 2019a). Esses dados corroboram evidências recentemente publicadas pela mesma equipe, na ocasião em que da Silva et al. (2017) utilizaram um antagonista altamente seletivo para o receptor μ , mas administrado na substância negra, parte reticulada, como mencionado acima. Coimbra et al., (2017a) e Calvo et al. (2019b) ainda demonstraram que a cascavel elicia exuberante reações de natureza aversiva para os redores, como postura ameaçadora, acionamento do guizo e ataques defensivos e ofensivos, sendo uma fonte de estímulos aversivos suficiente mente salientes para a indução de respostas de defesa relacionadas ao medo inato, mas tais respostas foram atenuadas pelo bloqueio intracolicular de receptores opioides.

Em um outro estudo, foi mostrado que ratos Wistar expostos ao teste de labirinto em cruz elevado, e pré-tratados com microinjeção de morfina na SCPd evitavam os braços abertos quando tratados com morfina na dose de 30 nmol, ao passo que o tratamento intramesencefálico com morfina na dose de 10 nmol causou efeitos antiaversivos, havendo diminuição de entradas do sujeito experimental nos braços abertos do labirinto em cruz elevado (MOTTA; BRANDÃO, 1993). Com efeito, a administração de naloxona por via intraperitoneal causa um aumento nos limiares dos comportamentos defensivos eliciados por estimulação elétrica da SCPd e das cpCS (COIMBRA et al., 1996).

Com o constructo do estudo dos mecanismos defensivos, há evidências que sugerem um papel modulatório exercido pelos opioides no sistema encefálico de aversão. Alguns estudos têm revelado que o colículo inferior possui altas concentrações de receptores do tipo μ e moderada concentração de receptores tipo k (MANSOUR et al., 1994). Não obstante, nosso grupo vem demonstrando consistentemente o envolvimento tanto dos receptores μ , quanto dos receptores k na modulação dos comportamentos defensivos, pois o antagonismo desses receptores,

seja por via periférica, seja por via central, eleva de forma significativa os limiares dos comportamentos defensivos que têm sido relacionados a reações de medo intenso (CALVO et al., 2019; COIMBRA et al., 1996, 2000; ENCHENBERGER et al., 2002; COIMBRA et al., 2017).

Quando atentamos para estruturas encefálicas relacionadas à ansiedade, células expressando receptores μ são altamente concentradas no neocórtex, no hipocampo, no tálamo, no hipocampo, no complexo amigdalóide (PADEN et al., 1987; PILAPIL., 1987), no núcleo *accumbens*, no núcleo caudado do neostriado e na SCP (PECKYS; LANDWEHR-MEYER, 1999). Outros estudos mostram, também, grande quantidade de receptores μ nos corpos quadrigêmeos (MANSOUR et al., 1995).

Vias opioides modulatórias estabelecem conexão recíproca entre colículo inferior e a SCP (OSAKI et al., 2003) e entre vias eferentes intratectais com terminais GABAérgicos de projeção nigro-tectal (EICHENBERGER et al., 2002), sendo que a integração dessas vias influencia a elaboração de reações defensivas que são associados aos comportamentos do tipo pânico.

Por outro lado, há evidências de que os peptídeos opioides suprimem de forma consistente os comportamentos defensivos de felinos quando são estimulados eletricamente em nível mesencefálico (SHAIKH., 1991), sendo que microinjeções de morfina SCP são capazes de diminuir a intensidade de comportamentos de fuga e aumentar a latência desses comportamentos induzidos por estímulos elétricos (JENCK et al., 1986). Essas asserções mostram como a literatura ainda é controversa no que concerne aos efeitos de agonistas e de antagonists opioides administrados por via periférica ou central.

Em relação à organização de respostas associadas ao pânico, tem sido proposto que os opioides exercem uma influência sobre os interneurônios GABAérgicos, os quais, por sua vez, exercem um controle tônico, inibitório, sobre as vias excitatórias mesencefálicas envolvidas com a elaboração das respostas que têm sido relacionadas ao medo inato. Assim, os opioides

endógenos podem, em nível mesencefálico, dependendo da localização de seus receptores, modular as conexões GABAérgicas intramesencefálicas, resultando, seja na desinibição ou na inibição desses neurônios tonicamente inibidos pelo GABA, de modo que contribuem para a modulação da expressão dos comportamentos defensivos.

Em resumo, o exato mecanismo dos peptídeos opioides endógenos na modulação das respostas defensivas parece ser complexo, e pode estar na dependência da participação de diferentes estruturas do neuroeixo, envolvendo interação entre diversos sistemas neurais, com diferentes neurotransmissores. A microinjeção de opioides em regiões encefálicas, indica que o agonismo opioide tem efeitos distintos, dependendo da dose da droga opioide utilizada, do tipo de receptor opioide envolvido e da estrutura abordada.

2 HIPÓTESE E OBJETIVOS

2.1 Hipótese

Considerando o exposto, a hipótese do presente trabalho é que a exposição de roedores a cascaveis eliciará respostas defensivas relacionadas a ataques de pânico, as quais poderão ser arrefecidas por doses de CTOP, um antagonista farmacológico seletivo para receptores opioides do tipo μ , quando administrado no hipotálamo medial.

2.2 Objetivo Geral

– Estudar o envolvimento do sistema opioide hipotalâmico na modulação do comportamento de defesa por roedores na presença de serpentes peçonhentas selvagens em livre movimentação em uma arena quadrangular para estudo de ataques de pânico e agorafobia.

2.3 Objetivo específico

– Estudar o efeito da administração aguda, por via intra-hipotalâmica, de CTOP, um antagonista seletivo de receptores μ -opioides, em diferentes doses (0.1 nmol, 1 nmol, e 10 nmol), sobre as respostas comportamentais induzidas pelo medo inato, evocado na presença de um predador natural (*Crotalus durissus terrificus*).

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 Aprovação ética

Todas as sessões experimentais foram conduzidas de acordo com normas da Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP sob o processo 044/2018. Os princípios éticos adotados nestes experimentos seguem diretrizes rígidas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foram avaliados e aprovados pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEUA-FMRP-USP).

3.2 Animais

Foram utilizados camundongos machos (Mus musculus, *Rodentia*, *Muridae*), da linhagem C57BL6, pesando entre 30-35g. Esses animais foram alojados em caixas com cinco 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 alimentação e água *ad libitum*, durante todo o experimento, a não ser durante os registros comportamentais. Como predadores, foram utilizadas serpentes peçonhentas da espécie *Crotalus durissus terrificus*, *Reptilia*, *Viperidae* (Cascavel) autorizados pelo IBAMA sob o processo 1/35/1998/000846-1, machos e fêmeas, pesando entre 800-1500g, que tiveram livre acesso à água durante todo o experimento, recebendo comida semanalmente, e que foram, ainda, alimentadas 24h antes da exposição à presa. Quinze dias antes do início dos experimentos, elas foram transferidas ao ofidário do Laboratório de Neuroanatomia e Neuropsicobiologia do Departamento de Farmacologia da FMRP-USP (LNN-FMRP-USP)/Instituto de Neurociências e Comportamento (INeC). O ambiente para serpentes do LNN-FMRP-USP é iluminado por luz solar natural e por luz fluorescente e ultravioleta em

dias nublados e chuvosos (*reptisun*; 20 watts; 5 UVB) e possui cascatas e lagunas artificiais, rochas naturais, assim como plantas naturais e artificiais. O ambiente é mantido sob ciclo claro/escuro de 12/12h (luzes acesas das 7 às 19h) e a uma temperatura constante de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ (40-70 % de umidade). As serpentes foram alimentadas de 15 em 15 dias, 24 horas e imediatamente antes do início de cada sessão experimental, utilizando-se exemplares da mesma espécie de roedor que foi utilizada no presente trabalho (*Mus musculus*). Os camundongos foram adaptados, em grupos de oito animais, no ambiente experimental, munido com uma toca artificial, durante pelo menos quatro dias antes do início dos experimentos. Os experimentos foram realizados segundo os princípios éticos elaborados a partir das diretrizes que regulamentam aspectos éticos da utilização de animais de laboratório, elaboradas pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da FMRP-USP.

Este projeto, em sua integralidade, foi aprovado pela CEUA FMRP-USP sob o protocolo 44/2018, em anexo.

3.3 Cirurgia

Este estudo foi realizado, utilizando grupos independentes de animais, que eram anestesiados com uma associação de 0,1ml de cetamina a 10% (Agener, na dose de 100 mg/kg, i.p.) para 0,2ml de xilasina a 4% (Dopaser, na dose de 10mg/kg, i.p.), e levados a um aparelho estereotáxico (David Kopf, EUA), onde suas cabeças eram fixadas pelo rochedo temporal e incisivos superiores. Antes da exposição da calota craniana, a pele e o tecido subcutâneo eram anestesiados com solução de lidocaína a 2% (0,1ml, s.c.), e submetidos à cirurgia estereotáxica para a implantação de uma cânula-guia intra-hipotalâmica, seguindo as coordenadas: ântero-posterior: -1,46mm; médio-lateral: 0,2 mm; e dorso-ventral: 4,2 mm, considerando o hipotálamo

ventromedial, tomando-se o bregma como referência, e estando a sutura lambdoide e bregmática em um mesmo plano horizontal. Depois de implantadas, as cânulas-guia eram fixadas na calvária por uma prótese de acrílico autopolimerizável. Após a cirurgia, 60.000 U.I. de penicilina G benzatina, e um analgésico e anti-inflamatório não esteroidal (flunixin meglumine; 2,5mg/kg) foram aplicados, por via intramuscular, em cada animal. Os procedimentos experimentais foram iniciados após cinco dias de recuperação pós-operatória.

3.4 Drogas

Os animais foram divididos em grupos independentes, gentilmente envolvidos em uma flanela, e receberam administrações intradiencefálicas de DMSO a 10%, diluído em salina fisiológica (veículo) ou de CTOP (TOCRIS) no núcleo ventromedial do hipotálamo. As drogas foram dissolvidas em salina fisiológica imediatamente antes do uso. O confronto defensivo entre presa e predador foi realizado 5 minutos após a administração central de veículo ou do antagonista de receptores μ -opioides por um período de 5 minutos. As administrações centrais de veículo ou do antagonista farmacológico em diferentes doses (0,1 μ L, em caso de administrações centrais de DMSO), foram feitas randomicamente.

3.5 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). Os comportamentos foram filmados por uma filmadora (Sony) e então analisados pelo sistema de TV

29” /DVD. Após os testes, cada animal era perfundido, utilizando-se para isso, uma bomba de perfusão (Master Flex® L/S TM). A análise histológica dos experimentos neurofarmacológicos foi feita através de um micrótomo de congelação (Leica CM 1950), e as lâminas foram avaliadas através de um microscópio de luz motorizado (AxioImager Z1; Zeiss), após coloração dos cortes histológicos com a técnica de Nissl em uma máquina robotizada de coloração (CV5030 Leica Autostainer XL).

3.6 Estudo Neuroetológico

As reações de defesa foram registradas em uma arena de acrílico, em forma de paralelepípedo, quadrangular, medindo 140cmX62cmX50cm, com o assoalho dividido em vinte seções iguais (COIMBRA et al., 2017b), sendo enriquecida com uma toca artificial e com duas plataformas elevadas de escape como descrito alhures (dos ANJOS-GARCIA & COIMBRA, 2019) e ilustrado na figura 1. Após tratamento agudo, com salina fisiológica ou CTOP, os animais (grupos independentes) eram colocados delicadamente, com o auxílio de uma rede, em um dos quadrantes em situação oposta ao local em que se situasse a serpente, sem qualquer grade de proteção entre a presa e o predador, segundo metodologia previamente publicada (GUIMARÃES-COSTA et al., 2007; LOBÃO-SOARES et al., 2008; COIMBRA et al., 2017a,c; CALVO et al., 2019a,b; dos ANJOS-GARCIA et al., 2019). Em seguida, os animais eram observados durante 5 minutos, tempo em que o comportamento do ofídio e do roedor eram avaliados de minuto a minuto. Durante esse tempo, as respostas comportamentais de cruzamento (quatro patas em um dos compartimentos do assoalho da arena), levantamento (apoio das patas anteriores nas amuradas da arena), saltos (levantamento concomitante das quatro patas) e rotações (giros de 360 graus), número e tempo de atenção defensiva (alerta; tempo em

que o animal interrompe seu comportamento em curso e volta-se para o predador, podendo haver imobilidade com duração menor do que 6s) ou de imobilidade defensiva imobilidade com duração de pelo menos 6 s, associando-se alterações neurovegetativas, tais como piloereção, exolftalmia, defecação e/ou micção), de fuga orientada (comportamento expresso por corridas direcionadas para a região da arena oposta ao do predador, em direção à toca ou às plataformas de escape, e intercaladas por interrupção brusca e elaboração de comportamento exploratório intenso), ou explosiva (corridas tresloucadas, sem qualquer direcionamento, mas preferencialmente na direção contrária à do predador, e com ausência de expressão de comportamento exploratório), de interações com a cobra (farejos, toques com as patas dianteiras, e eventualmente, mordidas de exploração tátil), de avaliação de risco (aproximações cautelosas, com o ventre rente ao assoalho da arena) e sustos (pequenas sacudidelas e breves saltos, durante o comportamento de avaliação de risco), foram registrados de minuto a minuto, considerando o roedor.

Quanto à serpente, foram registrados, também de minuto a minuto, o deslocamento pela arena (número e tempo de movimentação do corpo e da cabeça), tempo de bote armado (postura defensiva), número de botes com picada (ataques ofensivos), número de bote sem picada (ataque defensivo), tempo e número de vezes de acionamento de chocalho, esquiva ativa (movimentos da cabeça, da cauda ou do restante do corpo para longe do roedor, em caso de interações destemidas), empilhamento de anéis (voltas consecutivas do corpo, formando anéis sobrepostos), tempo e número de postura defensiva (elevação do terço superior do corpo, com bote armado e direcionado para a presa). Fezes e urina eram removidos após cada confronto. Cada serpente foi exposta até 6 roedores, depois do que era trasladada para o ofidiário, para minimização do estresse oferecido pelo confronto. O ambiente era iluminado durante todo o experimento (reptisun; 20watts; 5UVB; 350 LUX). Vinte e quatro horas depois do confronto, os animais eram expostos ao contexto experimental, sem a presença do predador, e seu com-

portamento foi analisado durante os dez minutos subsequentes. Caso os roedores fossem atacados, com inoculação de veneno, eles eram imediatamente removidos da arena de confronto e anestesiados com dose letal de barbitúrico (tionembutal na dose de 90 mg/kg).

Figura 1: Desenho representativo da arena poligonal enriquecida com toca e plataformas de escape.

3.7 Histologia

Depois de completado o experimento, os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (100mg/kg) e xilasina (10mg/kg) e seus encéfalos eram perfundidos via ventrículo cardíaco esquerdo. O sangue era lavado com solução salina tamponada (PH=7,3), resfriada a 4° C, enriquecida com oxigênio, seguida por uma solução resfriada (4° C) de paraformaldeído a 4%, durante 15min, com pressão hidrostática de 50 mmHg. Os encéfalos eram rapidamente removidos e colocados em solução fixadora por 4 horas, a 4° C. Após a fixação, os encéfalos eram seccionados e o diencéfalo era preparado para a crioproteção. O tecido nervoso era colocado em solução glicosada a 10 e a 20% em tampão fosfato (PH=7,3) a 4° C, durante 12h (em cada solução). Os fragmentos de tecido obtidos eram imersos em 2-metil-butano (Sigma) e congelados em gelo seco (carbônico) durante 30 segundos e cortados no criostato, em série, a -22° C. Subsequentemente, os cortes eram montados em lâminas de vidro e observados sob mi-

croscopia de luz. Dados obtidos em animais, nos quais a extremidade final da agulha de micro-injeção de drogas estivesse localizado fora da estrutura diencefálica estudada não foram incluídos na análise estatística, mas poderão ser analisados com um controle adicional da ação das drogas administrada fora da estrutura de interesse.

3.8 Estatística

Os dados dos experimentos psicofarmacológicos foram submetidos a um teste de normalidade (Shapiro-Wilk). Como seguiram a curva de Gauss, eles foram analisados por meio de uma análise de variância de uma via (*one-way ANOVA*), seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls. $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Os resultados foram apresentados como média e erro padrão da média e na forma de *scatter dot plot*.

Os cálculos estatísticos foram feitos mediante ao Index comportamental, no qual foi obtido através da fórmula matemática que se segue: $100 * (\text{frequência bruta dos comportamentos}) / (\text{tempo fora do lugar seguro})$. Através do index é possível analisar o comportamentos dos roedores somente quando eles estiveram fora do lugar seguro, no qual é representado pelas plataformas elevadas para escape ou pela toca.

4 RESULTADOS

4.1 Esquematização dos sítios de microinjeção de CTOP

A figura 2 é um diagrama representativo dos sítios de microinjeção de DMSO utilizado como controle e veículo para as drogas e CTOP em diferentes doses no hipotálamo ventromedial dos camundongos submetidos a sessão experimental.

Figura 2: Representação esquemática em diagramas do Atlas de Paxinos e Watson (2005) de cortes coronais do diencefalo de *Rattus norvegicus*, mostrando os sítios de microinjeções de DMSO e CTOP, este sendo representado segundo as diferentes doses como segue: veículo e camundongos expostos à serpente de brinquedo (▲), veículo e camundongos expostos à serpente verdadeira (●), CTOP na dose de 0,1 nmol (○), CTOP na dose de 1nmol (■), CTOP na dose de 10nmol (◆).

4.2 Efeito das doses crescentes de um antagonista opioide (CTOP) seletivo para o receptor opioide do tipo μ , microinjetado no hipotálamo ventromedial frente ao medo inato eliciado pela *Crotalus durissus terrificus*

As presas confrontadas com a serpente apresentaram um exuberante repertório de reações comportamentais sugestivas de ansiedade, como alerta e aproximação cautelosa (figura 3). De acordo com a *one-way ANOVA*, houve uma diminuição significativa ($F_{4,35} = 26.01$;

$p < 0.0001$) no index de alerta (teste *post hoc* de Newman-Keuls; $p < 0.05$) e no tempo de Alerta ($F_{4,35} = 9.68$; $p < 0.0001$), como mostrado na figura 3A e B.

Quanto ao comportamento de aproximação cautelosa, o confronto com a serpente aumentou significativamente a incidência desse tipo de avaliação de risco ($F_{4,35} = 13.45$; $p < 0.0001$), quando comparado com o controle (serpente de brinquedo), como mostrado na figura 3C. O tratamento do HVM com CTOP (0,1, 1 e 10 nmol) causou uma diminuição significativa (teste *post hoc* de Newman-Keuls; $p < 0.05$) do comportamento de aproximação cautelosa, em comparação com o animais tratados no HVM com veículo e ameaçados pela serpente verdadeira, como mostrado na figura 3C.

O comportamento de interação com a serpente mostrou-se alto quando os camundongos eram expostos à serpente de brinquedo. Entretanto, houve uma diminuição significativa ($F_{4,35} = 13.43$; $p < 0.0001$) da interação com o predador, quando os roedores eram confrontados a serpente verdadeira, tanto considerando animais tratados com o veículo, como aqueles tratados com o CTOP, como mostrado na figura 3D.

Camundongos submetidos ao confronto com a serpente verdadeira na arena poligonal, apresentaram, também, um clássico espectro de comportamentos defensivos sugestivos de ataques do tipo pânico, em comparação ao controle (exposição à serpente de brinquedo). De acordo com a *one-way ANOVA*, houve um aumento significativo ($F_{4,34} = 16.27$; $p < 0.001$) no índice de fuga orientada (figura 4A) e no tempo de fuga orientada ($F_{4,34} = 30.26$; $p < 0.001$) (figura 4B), bem como uma tendência a aumento na incidência e no tempo da fuga não orientada (figura 4C e D) quando comparado com o grupo submetido à presença da serpente de brinquedo. O tratamento do HVM com CTOP na dose de 1nmol causou diminuição estatisticamente significativa sobre o índice do comportamento de fuga orientada e diminuição significativa no tempo da fuga orientada nas doses crescentes de CTOP administrada no HVM quando comparadas ao controle (Figura 4A e B) (teste *post hoc* de Newman-Keuls; $p < 0.05$) que foi evocado pelos roedores

ameaçados pela serpente verdadeira. Contudo microinjeções de CTOP no hipotálamo medial não causou diferença significativa nem na incidência ($F_{4,35} = 4.308$; $p > 0,05$), nem no tempo ($F_{4,35} = 4.098$; $p > 0,05$) da fuga não orientada, como mostrado na figura 4 C e D.

No que se refere ao comportamento de Levantamento (figura 5A), de acordo com o one-way ANOVA, houve diminuição significativa de sua frequência ($F_{4,35} = 4,185$; $p < 0,0071$), quando comparado ao controle da serpente de brinquedo. Quando somados os cruzamentos realizados durante na fuga dos animais, houve diferença significante em relação aos respectivos controles como mostrado na figura 5B, e os animais tratados com CTOP nas doses de 0,1 e de 1 nmol mostraram uma diminuição significativa ($F_{4,35} = 26,38$; $p < 0,0001$) de cruzamentos. No que se refere os comportamentos dos animais direcionados aos lugares seguros (fuga orientada para as plataformas de escape ou para a toca artificial) de acordo com o *one-way* ANOVA, houve aumento significativo apenas da frequência de respostas de procura de abrigo ($F_{4,35} = 6,67$; $p < 0,0004$) nos animais que receberam administração de veículo no HVM quando comparado ao controle da serpente de borracha, como mostrado na figura 5C. O tratamento do HVM com CTOP (0,1 e 1nmol) causou diminuição significativa (teste *post hoc* de Newman-Keuls; $p < 0.05$) na incidência do comportamento de procurar um lugar seguro, em comparação com o animais tratados no HVM com veículo e confrontados com a serpente verdadeira (5C), mas não no tempo de permanência na toca ou nas plataformas elevadas (figura 5D).

Figura 3: Efeito da administração intradiencefálica de veículo (DMSO) ou de CTOP na doses de 0,1, 1 e 10 nmol no hipotálamo ventromedial (HVM) na incidência (A) e duração (B) do comportamento de Alerta, na incidência (C) do comportamento de aproximação cautelosa, e na (D) incidência do comportamento de Interação com a serpente, eliciados em *Mus musculus* (cepa C57) pela serpente *Crotalus durissus terrificus*. As colunas representam a média e as barras representam o erro padrão da média; * $p < 0.05$ comparado ao grupo tratado com veículo no HVM e exposto à serpente de brinquedo; # $p < 0.05$ comparado ao grupo tratado com veículo no HVM e exposto à cascavel; + $p < 0.05$ comparado ao grupo tratado com 0,1 nmol no HVM e exposto à cascavel; ° $p < 0.05$ comparado ao grupo tratado com 1 nmol no HVM e exposto à cascavel de acordo com a *One-Way ANOVA*, seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls.

Figura 4: Efeito da administração intradiencefálica de veículo ou de CTOP nas doses de 0,1, 1, 10 nmol no hipotálamo ventromedial (HVM) na incidência (A e C) e duração (B e D) do comportamento de fuga orientada (A e B) e de fuga não orientada (C e D) eliciados em *Mus musculus* (cepa C57) pela serpente *Crotalus durissus terrificus*. As colunas representam a média e as barras representam o erro padrão da média; * $p < 0.05$ comparado ao grupo tratado com veículo no HVM e exposto à serpente de brinquedo; # $p < 0.05$ comparado ao grupo tratado com veículo no HVM e exposto à cascavel; + $p < 0.05$ comparado ao grupo tratado com 0,1 nmol no HVM e exposto à cascavel; ° $p < 0.05$ comparado ao grupo tratado com 1 nmol no HVM e exposto à cascavel de acordo com a *One-Way ANOVA*, seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls.

Figura 5: Efeito da administração intradiencefálica de veículo ou de CTOP nas doses de 0,1, 1 e 10 nmol no hipotálamo ventromedial (HVM) na incidência (A) do comportamento de Levantamento, (B) do comportamento Cruzamento Total (C) incidência de Lugar Seguro (D) tempo no lugar seguro eliciados em *Mus musculus* (cepa C57) pela serpente *Crotalus durissus terrificus*. As colunas representam a média e as barras representam o erro padrão da média; * $p < 0.05$ comparado ao grupo tratado com veículo no HVM e exposto à serpente de brinquedo; # $p < 0.05$ comparado ao grupo tratado com veículo no HVM e exposto à cascavel; + $p < 0.05$ comparado ao grupo tratado com 0,1 nmol no HVM e exposto à cascavel; ° $p < 0.05$ comparado ao grupo tratado com 1 nmol no HVM e exposto à cascavel de acordo com a *One-Way ANOVA*, seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls.

4.3 Comportamentos relativos a *Crotalus durissus terrificus* frente a Mus musculus em um modelo de confronto presa versus predador

No que se refere a comportamentos emitidos pelo predador *Crotalus durissus terrificus* quando confrontados com os roedores, os comportamentos mais frequentemente apresentados pelas cascaveis foram o acionamento do guizo e postura defensiva com atenção voltada para as presas. Não houve deslocamento das serpentes pela arena, nem ataques (bote), seja predatório, seja ofensivo ou seja defensivo (Tabela 1), culminando em 100 % de sobrevivência dos animais de laboratório, como mostrado na Tabela 2.

Tabela 1: Incidência (em média) de respostas comportamentais do predador durante o confronto com a presa durante sessão experimental de duração de cinco minutos na arena poligonal enriquecida.

Comportamento	Descrição	Média
Deslocamento pela arena	Movimento da serpente pela arena medida em quadrantes	0
Ataque Defensivo (incidência)	Bote sem mordida ou inoculação de veneno	0
Acionamento do Guizo (incidência)	Quantidade de vezes em que a serpente acionou o guizo	0,62
Acionamento do Guizo (t/s)	Duração dos movimentos com o guizo	30,35
Ataque ofensivo	Ataque com mordida e inoculação de veneno	0
Postura defensiva	Imobilidade com o corpo em postura de ataque com elevação do terço rostral do corpo	0,53
Atenção voltada para a presa (incidência)	Número de vezes em que houve mobilidade da cabeça direcionada à presa	3,41
Atenção voltada para a presa (t/s)	Tempo que a cabeça da serpente ficou direcionada para a presa	179,89

Tabela 2: Taxa de sobrevivência (em porcentagem) dos animais expostos à *Crotalus durissus terrificus*

Taxa de sobrevivência	Descrição	(%)
Sobrevivência da presa	Taxa de sobrevivência dos animais quando expostos aos predadores	100

5 Discussão

4 DISCUSSÃO

Os modelos experimentais de confronto entre presa e predador, como aquele adotado neste estudo, constituem-se em uma metodologia validada etologicamente (GUIMARÃES-COSTA et al., 2007; LOBÃO-SOARES et al., 2008; PASCHOALIN-MAURIN et al., 2018) e farmacologicamente (PASCHOALIN-MAURIN et al., 2018), revestindo-se de grande potencialidade para estudar sistematicamente comportamentos induzidos pelo medo inato ou condicionado (COIMBRA et al., 2017a,c), a ação de novos fármacos com propriedades panicolíticas (URIBE-MARIÑO et al., 2012; TWARDOWSCHY et al., 2013; COIMBRA et al., 2017b), vêm permitindo a proposta de tratamentos panicolíticos coadjuvantes ao uso de inibidores de recaptação de monoaminas (COIMBRA et al., 2017a; CALVO et al., 2019a,b), e permitem a análise do substrato neural límbico e paralímbico ativados durante a organização de respostas inatas de defesa que, por sua vez, respondem ao tratamento crônico com drogas panicolíticas (PASCHOALIN-MAURIN et al., 2018).

De modo geral, ainda se fazem muitos questionamentos acerca das bases neurais e neuroquímicas de algumas das desordens psiquiátricas mais conhecidas como a esquizofrenia, depressão e a síndrome do pânico. As respostas autonômicas e comportamentais eliciadas por estimulação química, elétrica ou por algum estímulo inato de perigo recrutam estruturas do teto mesencefálico ou do diencéfalo que geram respostas comportamentais semelhantes, por exemplo, dos espectros comportamentais da síndrome do pânico. Os estudos das bases neurais envolvidos na eliciação e na elaboração dos estados aversivos que seguem as reações comportamentais podem abrir possibilidade de virmos a compreender mais claramente a neuroanatomia e a neuroquímica dos transtornos ansiosos.

No presente estudo, a exposição de camundongos a serpentes na arena poligonal, além de possibilitar um confronto direto entre presa e predador ativando áreas límbicas e paralímbicas como um todo, permite-nos avaliar com mais fidedignidade e de modo mais etológico respostas comportamentais exibidas pelos roedores frente a um de seus predadores naturais, em um modelo que permite, ainda, a discriminação entre respostas de fuga orientada e não orientada, elaboradas por substratos neurais diferentes (ULLAH et al., 2015, 2017), devido ao fato de que a arena é munida com duas plataformas elevadas com acesso por meio de escadas e uma toca artificial, que se caracterizam como locais seguros e simulam características do meio ambiente natural.

Devido à semelhança do nosso aparato experimental com o teste de *open-field* consegue-se constatar um amplo repertório comportamental previamente validados e compilados por Walsh e Cummins (1976), como tempo gasto na deambulação, fugas, esquivas e levantamentos, tendo sido a arena poligonal para confronto com serpentes validada tanto etologicamente quanto farmacologicamente, com correlatos morfológicos e funcionais (PASCHOALIN-MAURIN et al., 2018). O presente modelo experimental ainda permite a frequência e o tempo em que o animal de experimentação ficou na toca ou abrigado nas plataformas escape, fortalecendo aspectos mais éticos do presente modelo experimental, com comparação àquele em confrontos entre presa e predadores foram realizados em arenas poligonais simples (COIMBRA et al., 2017a,c; CALVO et al., 2019a,b). Considerando os animais que ficaram na presença da serpente de brinquedo observou-se que estes entraram muito menos na toca, dando margens para interpretação que os níveis do comportamento do tipo ansioso estavam baixos. Os animais que foram expostos à serpente cascavel, no entanto buscaram mais vezes os lugares seguros, de modo que podemos considerar que quanto mais medo ou mais comportamentos do tipo pânico, mais os animais se escondem e procuram abrigo em lugares seguros como a toca ou a plataforma de escape.

Camundongos que foram confrontados com a Crotalus durissus terrificus eliciaram comportamentos do tipo ansiedade, caracterizados por atenção defensiva e aproximação cautelosa, assim como respostas comportamentais similares a ataques de pânico, identificados por fuga orientada e fuga não orientada. Quando analisado o comportamento motor dos animais, observa-se que o cruzamento na fuga aumenta substancialmente no grupo controle, referente a animais tratados com DMSO e expostos à serpente cascavel. Observou-se também maior comportamento exploratório eliciado pelos roedores que não foram expostos à serpente verdadeira, como era de se esperar.

Partindo do pressuposto evolucionista, as respostas de defesa relacionadas ao medo inato, apresentadas por camundongos confrontados com as serpentes parecem ter sido filogeneticamente selecionadas e possuem características ontogenéticas, quando comparadas as observações que foram descritas pioneiramente por Darwin (1872) e organizado por Alcock (2011), os quais descrevem que o comportamento (mesmo emocional) pode ser selecionado em dois níveis: filogenético ou ontogenético. Segundo esses autores, considerando a história filogenética de cada espécie, o predador é reconhecido pela presa através de diversas características fenotípicas, e mesmo não havendo uma aprendizagem prévia, como é o caso dos animais utilizados neste experimento, o organismo é capaz de reconhecer um potencial predador, ou emitir comportamentos defensivos em virtude de características que são generalizadas como tamanho, odores diferentes, posturas ofensivas, sons ameaçadores, como aqueles resultantes do acionamento do guizo por parte das cascaveis (OWINGS et al., 2002; SWAISGOOD et al., 1999).

Um fator importante a se considerar é que, de fato, a experiência emocional é multifatorial e multifacetada considerando cada espécie. A evolução dotou cada organismo com mecanismos para que a sobrevivência prevaleça e seus genes sejam passados adiante. Podemos citar, como exemplo, comportamentos defensivos expressos por outras espécies, como a imo-

bilidade tônica apresentada por roedores, répteis e aves, odores aversivos liberados por marsupiais, o *Amphiprioninae* ou peixe palhaço que se mostra imune ao veneno dos nematocistos de anêmonas e se abrigam em meio a seus tentáculos (inquilinismo e protocooperação), e o *Chilomycterus spinosus* que se infla para se mostrar mais ameaçador ou como uma estratégia de fuga. Cada presa, dessa forma, adquire suas estratégias comportamentais de defesa selecionadas ao longo da cadeia evolutiva.

No reino animal, presa e predador sempre estão evoluindo e se aperfeiçoando de modo a melhorar suas estratégias biológicas e comportamentais para estarem um passo à frente um do outro, mas o que se nota é a “corrida da rainha vermelha” metáfora essa advindo do livro de Lewis Carroll (1865) e adotado pela Biologia para caracterizar diversos comportamentos selecionados filogeneticamente e ontogeneticamente, que diz: "*It takes all the running you can do, to keep in the same place*" (é preciso correr o máximo possível, para permanecermos no mesmo lugar), uma referência a ambos os indivíduos (presa e predador) que estão em constante evolução para modificar suas estratégias de caça ou de defesa. O predador aperfeiçoa suas estratégias de caça, como exemplo a cascavel sendo capaz de matar com um único bote roedores devido a sua neurotoxina extremamente forte, as suas cores que facilitam a ocultação no ambiente. As presas, tais como os camundongos, por exemplo, ao desenvolveram a capacidade de faro aguçado, capacidade de corrida aperfeiçoada e estratégias de fuga mais sofisticadas, como escaladas, corridas direcionadas para tocas, munidas com saídas estratégicas, pele mais flexível e pelos que se soltam com facilidade para o caso de serem agarrados.

Predador e presa desenvolvem seus mecanismos de defesa frente a estímulos distais e proximais para que o organismo mantenha sua integridade. A evocação de comportamentos induzidos pelo medo em camundongos ameaçados por cascaveis no presente modelo comportamental de ataques de pânico, como validado também para ratos (COIMBRA et al., 2017c), é uma evidência de que os comportamentos como alerta e fuga são clássicos comportamentos

respondentes que diferem de comportamentos operantes, como aqueles relacionados à avaliação de risco, que parece ser selecionado ontogeneticamente, dependendo, assim, de diferentes níveis de aprendizagem vivenciados pelo organismo. Com o uso do presente modelo experimental, foi possível observar que o confronto de camundongos *naïve*, criados em laboratório, com um potencial predador, induziu a elaboração por parte das presas de um conjunto de respostas comportamentais de defesa, ou seja, comportamentos respondentes e comportamentos operantes, que relacionamos ao medo inato.

Através de estudos prévios, parece que os comportamentos respondentes estão sendo mediados por estruturas mesencefálicas, como os corpos quadrigêneos, representados pelos CI e CS (da SILVA et al. 2017), enquanto os comportamentos operantes parecem estar sendo mediados por estruturas diencefálicas, tais qual o hipotálamo (ULLAH et al., 2017). Por mais que esse trabalho não abarcou os corpos quadrigêneos, trabalhos morfológicos, psicofarmacológicos e comportamentais vêm mostrando a importância desses núcleos na organização do comportamento defensivo, principalmente os respondentes eliciados pelo medo inato como fuga e imobilidade defensiva (CARDOSO et al 1994; COIMBRA et al., 2000, 2001). Tais estruturas também mostraram-se ativadas em *Mesocricetus auratus* confrontados com serpentes corais (PASCHOALIN-MAURIN et al., 2018).

Nos primeiros dados apresentados, mostramos que as respostas de fuga evocadas em roedores pela serpente foram precedidas por respostas de avaliação de risco, como atenção defensiva e aproximação cautelosa, seguindo-se reações comportamentais mais enérgicas, como comportamento de fuga, orientadas para um local seguro (compreendido tanto pelas plataformas elevadas, quando pela toca) ou mesmo para um sentido que se opõe à posição ocupada pelo predador em potencial. Essas respostas comportamentais são características dos comportamentos mediados pelos núcleos hipotalâmicos, como demonstrado por ULLAH e seus colaborado-

res (2017). Estudos prévios desenvolvidos por nosso grupo vêm demonstrando que o hipotálamo organiza comportamentos mais bem elaborados e direcionados para locais seguros, o que caracteriza a fuga orientada, ao passo que estruturas mesencefálicas, tais como a SCP, o CS e o CI, organizam a fuga não orientada, ou explosiva, a luta, e a imobilidade defensiva (BIAGIONI et al., 2016; ULLAH et al., 2017). A observação de que camundongos confrontados com serpentes apresentam respostas de fuga orientada e não orientada, no entanto, é uma evidência de que o modelo experimental aqui utilizado, é capaz de recrutar tanto estruturas límbicas, como os núcleos hipotalâmicos, como paralímbicas, como aquelas situadas no *tectum*, mas funcionalmente relacionadas com o sistema límbico, como já foi demonstrado por nosso grupo (PASCHOALIN-MAURIN et al., 2018).

O presente trabalho mostrou, ainda, que a administração intradiencefálica de um antagonista opioide seletivo para o receptor μ , o CTOP, casou uma diminuição na incidência e duração de eliciação de alerta defensivo nas doses de 0,1 e de 1 nmol, na incidência comportamento de aproximação cautelosa, nas três doses utilizadas no presente estudo, o que sugere um efeito ansiolítico nos camundongos ameaçador pela cascavel. O tratamento intra-hipotalâmico com CTOP também diminuiu a incidência (na dose de 1 nmol) e na duração de eliciação de fuga orientada (nas doses de 0,1, 1 e 10 nmol), assim como na incidência de fuga não orientada (nas doses de 0,1, 1 e de 10 nmol), o que sugere um claro efeito panicolítico. Um efeito similar foi obtido em ratos tratados com microinjeções ou de naloxonazine, um antagonista seletivo de receptores μ_1 -opioide, ou com nor-binaltorfimina, um antagonista seletivo de receptores opioides do tipo kappa, em concentrações elevadas (5 μ g/0,2 μ L) no colículo inferior, o qual foi ativado com administrações *in situ* de bicuculina, um antagonista seletivo de receptores GABAérgicos do tipo A, sendo que ambos os antagonistas opioides causaram um efeito panicolítico (Calvo et al., 2019a). Ratos tratados no colículo inferior com naloxone ou naloxonazine e

confrontados com cascaveis também apresentaram um comportamento de defesa arrefecido, reforçando o efeito panicolítico desse tratamento farmacológico (CALVO et al., 2019b,c).

De fato, o bloqueio dos receptores opioides, pela administração sistêmica de naloxone em diferentes doses causou uma diminuição expressiva dos comportamentos defensivos relacionados aos comportamentos do tipo ansioso (aumento de entradas e tempo de permanência nos braços abertos do teste de labirinto em cruz elevado e diminuição dos comportamentos de atenção defensiva e de avaliação de risco em ratos confrontados com cascaveis) e do tipo pânico (diminuição dos comportamentos de imobilidade defensiva e de fuga em ratos ameaçados por serpentes cascaveis) (COIMBRA et al., 2017a). Não obstante, essa é a primeira vez em que demonstrou-se o efeito panicolítico e ansiolítico do bloqueio de receptores opioides do tipo μ no núcleo ventromedial do hipotálamo, uma estrutura ativada em hamsters dourados ameaçados por serpentes corais peçonhentas da espécie Micrurus frontalis (PASCHOALIN-MAURIN et al., 2018). O hipotálamo medial mostrou-se, efetivamente, ser uma estrutura relevante na elaboração do comportamento antipredatório também em camundongos que foram confrontados com serpentes constritoras da espécie Epicrates cenchria assisi (dos ANJOS- GARCIA & COIMBRA, 2019).

O efeito antiaversivo do CTOP observado após sua microinjeção no núcleo hipotalâmico ventromedial de camundongos ameaçados por serpentes cascaveis sugere que os polipeptídeos opioides endógenos agem nessa estrutura promovendo um efeito panicogênico, o que parece ser um paradoxo, considerando que tais neurotransmissores causam potenciais pós-sinápticos inibitórios na membrana pós-sináptica. Não obstante, como o hipotálamo medial é também rico em interneurônios GABAérgicos (Kitahama et al., 1989; Reguero et al., 2011), devemos considerar que a ação opioide endógena em neurônios do hipotálamo ventromedial pode se efetuar indiretamente, por meio de uma inibição pre-sináptica em terminais GABAér-

gicos para ali se projetem, ou sobre *perikarya* de interneurônios GABAérgicos, os quais modulam, por sua vez, a saída de vias excitatórias para as estruturas paralímbicas mais caudais, tais como os corpos quadrigêmeos e a substância cinzenta periaquedutal. Vias que se projetam da divisão dorsomedial do hipotálamo ventromedial para a substância cinzenta periaquedutal já foram demonstradas por nosso grupo (ULLAH et al., 2017). Pelo menos no *tectum* (EICHENBERGER et al., 2002; OSAKI et al., 2003; RIBEIRO et al., 2005) e no mesencéfalo ventral (da SILVA et al., 2013), interações entre interneurônicos opioides, seja β -endorfinérgico, seja leu-enkefalinérgico, com vias inibitórias de projeção nigro-tectal já foram demonstradas morfológicamente. Muito embora a interação entre vias opioides e terminais ou corpos celulares GABAérgicos inibitórios no hipotálamo medial que possa embasar nossa hipótese, não tenha sido ainda claramente demonstrada na literatura, há evidências ultraestruturais de desinibição promovida pela encefalina no núcleo ventromedial do hipotálamo (COMMONS & PFAFF, 2001), o que pode corroborar nosso ponto de vista.

Outra possibilidade seria a interação entre vias opioides e GABAérgicas e neuromoduladores endocanabinoides no núcleo hipotalâmico ventromedial que pudesse explicar o efeito panicolítico da administração local de antagonistas de receptores opioides do tipo μ . Com efeito, há evidências de que na região septo-hipotalâmicas há coexpressão de receptores canabinoides do tipo CB1 e neurônicos GABAérgicos (HRABOVSKY et al., 2012), assim como já foi demonstrado por nosso grupo tanto a presença de receptores canabinoides do tipo CB1 no hipotálamo ventromedial (KHAN et al., 2020), como o efeito panicolítico da administração de anandamida, mediado pelo receptor CB1 no hipotálamo ventromedial (dos ANJOS-GARCIA et al., 2019; KHAN et al., 2020).

Vale ressaltar, ainda, que o comportamento da serpente *Crotalus durissus terrificus* foi praticamente padronizado, mantendo-se imóvel na arena, o que aumentou a sobrevivência dos roedores. Este evento reforça a visão de que o paradigma de confronto de presa *versus* predador,

utilizando uma arena poligonal enriquecida com plataformas de abrigo e toca artificial apresenta características mais eticamente aceitáveis, não causando sofrimento desnecessário para o animal, e parece ativar de forma abrangente estruturas límbicas como recentemente demonstrado (PASCHOALIN-MAURIN et al., 2018). É, ainda, pertinente que, mesmo a serpente não emitindo comportamentos ameaçadores explícitos aos olhos do experimentador, o conjunto de estímulos visuais, olfatórios e sonoros que elas emitem permite a eliciação de medo inato em camundongos da cepa C57, assim como foi recentemente demonstrado ocorrer com ratos Wistar (COIMBRA et al., 2017a,c; CALVO et al., 2019a,b). Tais evidências corroboram os dados compilados de Catania (1999), quem descreve que mesmo estímulos aversivos mais modestos são capazes de induzir comportamentos defensivos em animais de laboratório. Assim, reações comportamentais mais sutis por parte das serpentes, como postura ameaçadora, atenção voltada para as presas e acionamento de guizo, podem se mostrar suficientemente aversivas.

O presente modelo experimental mostrou-se bastante adequado para o estudo de respostas defensivas induzidas principalmente pelo medo inato e se enquadra dentro dos três pilares da farmacologia, segundo os quais, um modelo experimental deve ter constructo de face, constructo teórico e previsibilidade farmacológica. Dentro desses princípios, foi possível estudar comportamentos que são similares àqueles observados em pacientes com doenças que são produtos do medo inato exacerbado e ataques de pânico, onde o perigo é real ou potencial.

O presente trabalho abre novos horizontes para o estudo de promissores fármacos com ação antiaversiva/panicolítica e possibilita através de um complexo etograma já consagrado na literatura (CALVO et al., 2019b,c; COIMBRA et al., 2017a; dos ANJOS-GARCIA & COIMBRA, 2019; KHAN et al., 2020) criar estratégias psicoterapêuticas para o tratamento dos transtornos ansiosos e do transtorno de pânico.

6 Conclusão

- O confronto entre camundongos da linhagem C57 e serpentes cascavéis em livre movimentação na arena poligonal evocou um amplo repertório comportamental de comportamentos defensivos, que são claramente relacionados ao medo inato e ataque de pânico, como alerta, aproximações cautelosas, fuga orientada, quantidade de vezes e o tempo em que o animal permaneceu no lugar seguro. Esse fato demonstra que o modelo experimental baseado no confronto entre roedores e serpentes apresenta-se bastante útil para o estudo do comportamento relacionado à ansiedade e a ataques de pânico.
- O pré-tratamento do hipotálamo ventromedial com microinjeções de um antagonista seletivo para receptores opioides causou efeitos ansiolíticos e panicolíticos, sugerindo que os opioides endógenos podem modular o comportamento de defesa no hipotálamo ventromedial.
- Receptores opioides do tipo μ do hipotálamo ventromedial podem apresentar-se como um relevante alvo farmacológico para o tratamento da ansiedade generalizada e a síndrome do pânico utilizando antagonistas opioides seletivos.
- Os comportamentos da serpente aqui analisados abrem possibilidade para futuros estudos com o paradigma presa versus predador, onde a Crotalus durissus terrificus apresenta-se como um promissor predador a ser utilizado em experimentação animal devido as suas características filogenéticas e ontogenéticas, fácil manejo, conseguindo induzir de forma sistemática padrões comportamentais antipredatórios bem estabelecidos.
- A sobrevivência dos camundongos C57 ao longo do presente estudo mostra que o modelo presa *versus* predador em arenas poligonais enriquecidas, validado e largamente utilizado no Laboratório de Neuroanatomia e Neuropsicobiologia da FMRP-USP, é uma forma mais ética na experimentação animal com predadores, bem como um modelo que é capaz de ativar estruturas do sistema límbico e paralímbico de forma abrangente, consistindo, dessa forma, um

método mais natural para o estudo do comportamento de defesa organizado por estruturas do sistema límbico.

Referências

Referências

ADAMS, D. B. Brain mechanisms for offense, defense, and submission. **Behavioral and Brain Sciences, London**, v. 2, n. 2, p. 201-213, Jun. 1979.

ANSELOW, M. S. Conditional and Unconditional Components of Post-Shock Freezing. **Integrative Psychological And Behavioral Science**, New York, v. 4, n. 15, p.178-182, dez. 1980.

BEN-ARI, Y. **The amygdaloid complex**. Amsterdam: Elsevier, 1981.

BEAUDET, A. et al. Visualization of opiate receptors in the locus coeruleus of rats: high resolution radioautography after administration of a tritiated met-enkephalin analog. **C R Seances Acad Sci D**, vol. 289, n. 7, 591-594, 8 out. 1979.

BIAGIONI, A.F., et al. Neuroethological validation of an experimental apparatus to evaluate oriented and non-oriented escape behaviours: Comparison between the polygonal arena with a burrow and the circular enclosure of an open-field test. **Behavioural Brain Research**, vol.298(Pt B), p. 65-77, 1 fev. 2016.

BLANCHARD, C.; GRIEBEL, G.; BLANCHARD, R.. Mouse defensive behaviors: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, New York, v. 25, n. 3, p.205-218, maio 2001.

BLANCHARD, D. C. et al. Defensive behaviors in rats following septal and septal-amygdala lesions. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, Washington, v. 93, n. 2, p.378-390, 1979.

BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J. Ethoexperimental Approaches to the Biology of Emotion. **Annual Review of Psychology, Palo Alto**, v. 39, n. 1, p.43-68, jan. 1988.

BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J. Innate and conditioned reactions to threat in rats with amygdaloid lesions. **Journal Of Comparative And Physiological Psychology**, Washington, v. 81, n. 2, p.281-290, 1972. BLANCHARD, R. J. et al. Defense system psychopharmacology: An ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. **Behavioural Brain Research, Amsterdam**, v. 58, n. 1-2, p.155-165, dez. 1993.

BLANCHARD, R. J. et al. Differentiation of anxiolytic and panicolytic drugs by effects on rat and mouse defense test batteries. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, New York, v. 21, n. 6, p.783-789, nov. 1997.

BORELLI, K. G. et al. 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**, Phoenix , v. 77, n. 3, p. 557-566, mar. 2004.

BRANDÃO, M. L. et al. Neural substrate of defensive behavior in the midbrain tectum. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, New York, v. 18, n. 3, p.339-346, set. 1994.

BRANDÃO, M. L.; AGUIAR, J. C. de; GRAEFF, F. G. GABA mediation of the anti-aversive action of minor tranquilizers. **Pharmacology Biochemistry And Behavior**, Phoenix, v. 16, n. 3, p.397-402, mar. 1982.

BRANDAO, M. L.; COIMBRA, N. C.; BORGES, P.C.L. Effects of morphine and midazolam on reactivity to peripheral noxious and central aversive stimuli. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, New York, v. 14, n. 4, p.495-499, dez. 1990.

BRANDÃO, M. L.; MELO, L. L.; CARDOSO, S. H. Mechanisms of defense in the inferior colliculus. **Behavioural Brain Research**, Amsterdam, v. 58, n. 1-2, p.49-55, dez. 1993.

BRANDÃO, M.L. et al. Defense reaction induced by microinjections of bicuculline into the inferior colliculus. **Physiology & Behavior**, Elmsford, v. 44, n. 3, p.361-365, jan. 1988. BRANDAO, M.L. et al. Escape behavior produced by the blockade of glutamic acid decarboxylase (GAD) in mesencephalic central gray or medial hypothalamus. **Pharmacology Biochemistry And Behavior**, Phoenix, v. 24, n. 3, p.497-501, mar. 1986.

CALVO, F.; COIMBRA, N. C. Interactions between opioid-peptides-containing pathways and GABAA-receptors-mediated systems modulate panic-like-induced behaviors elicited by electric and chemical stimulation of the inferior colliculus. **Brain Research**, Amsterdam, v. 1104, n. 1, p.92-102, ago. 2006.

CALVO, F. et al. The Blockade of μ_1 - and κ -opioid Receptors in the inferior colliculus decreases the expression of panic attack-like behaviours induced by chemical stimulation of the dorsal midbrain. **Neuropsychobiology**, vol. 78, n. 4, p. 218-228, 2019a.

CALVO, F. et al. Panicolytic-like effect of μ_1 -opioid receptor blockade in the inferior colliculus of prey threatened by *Crotalus durissus terrificus* pit vipers. **Journal of Psychopharmacology**, vol. 33, n. 5, p. 577-588, 2019b.

CALVO, F. et al. The endogenous opioid system modulates defensive behavior evoked by *Crotalus durissus terrificus*: Panicolytic-like effect of intracollicular non-selective opioid receptors blockade. **Journal of Psychopharmacology**, vol. 33, n.1, p.51-61, 2019c.

CANTEIRAS, N. S.; GOTO, M. Fos-like immunoreactivity in the periaqueductal gray of rats exposed to a natural predator. **Neuroreport**, Oxford, v. 10, n. 2, p.413-418, fev. 1999.

CANTERAS, N. S et al. Severe Reduction of Rat Defensive Behavior to a Predator by Discrete Hypothalamic Chemical Lesions. **Brain Research Bulletin**, Phoenix, v. 44, n. 3, p.297-305, jan. 1997.

CARDOSO, S. H. et al. Opposite effects of low and high doses of morphine on neural substrates of aversion in the inferior colliculus. **Behavioural Pharmacology, Oxford**, v. 3, n. 5, p.489-496, out. 1992.

CARDOSO, S. H.; COIMBRA, N. C.; BRANDÃO, M. L. Defensive reactions evoked by activation of NMDA receptors in distinct sites of the inferior colliculus. **Behavioural Brain Research**, Amsterdam, v. 63, n. 1, p.17-24, jul. 1994.

CARRIVE, P. The periaqueductal gray and defensive behavior: Functional representation and neuronal organization. **Behavioural Brain Research**, Amsterdam, v. 58, n. 1-2, p.27-47, dez. 1993.

CASTELLAN-BALDAN, L. et al. 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. **Journal Of Chemical Neuroanatomy**, Amsterdam, v. 32, n. 1, p.1-27, ago. 2006.

CATANIA, Charles A.. **Aprendizagem: comportamento, linguagem e cognição**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 1999. 467 p

COIMBRA, N. C. et al. Critical neuropsychobiological analysis of panic attack- and anticipatory anxiety-like behaviors in rodents confronted with snakes in polygonal arenas and complex labyrinths: a comparison to the elevated plus- and T-maze behavioral tests. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, São Paulo, v. 39, n. 1, p. 72-83, mar. 2017c.

COIMBRA, N. C. et al. Effects of the blockade of opioid receptor on defensive reactions elicited by electrical stimulation within the deep layers of the superior colliculus and DPAG. **Brain Research, Amsterdam**, v. 736, n. 1-2, p. 348-352, out. 1996.

COIMBRA, N. C. et al. 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. **Experimental Neurology**, New York, v. 197, n. 1, p.93-112, jan. 2006.

COIMBRA, N. C.; BRANDÃO, M. L. GABAergic nigro-collicular pathways modulate the defensive behaviour elicited by midbrain tectum stimulation. **Behavioural Brain Research**, Amsterdam, v. 59, n. 1-2, p.131-139, dez. 1993.

COIMBRA, N. C.; TOMAZ, C.; BRANDÃO, M. L. Evidence for the involvement of serotonin in the antinociception induced by electrical or chemical stimulation of the mesencephalic tectum. **Behavioural Brain Research, Amsterdam**, v. 50, n. 1-2, p.77-83, set. 1992.

COIMBRA, N.C. et al. Effects of opioid receptor blockade on defensive behavior elicited by electrical stimulation of the aversive substrates of the inferior colliculus in *Rattus*

norvegicus (Rodentia , Muridae). **Psychopharmacology**, British, v. 152, n. 4, p.422-430, 17 nov. 2000.

COIMBRA, N.C. et al. Opioid neurotransmission modulates defensive behavior and fear-induced antinociception in dangerous environments. **Neuroscience**, v. 354, p. 178–195, 2017a.

COIMBRA, N.C. et al., 2017b. New Ethological and Morphological Perspectives for the Investigation of Panicolytic-Like Effect of Cannabidiol. In: The Handbook of Cannabis and Related Pathologies: Biology, Diagnosis, Treatment, and Pharmacology (Victor R. Preedy, ed.). Elsevier Science Publishers, Amsterdam, chapter e14, pp. e140-e149, ISBN 978-0-12-800827-0.

COIMBRA, N.C; BRANDÃO, M.L. Effects of 5-HT₂ receptors blockade on fear-induced analgesia elicited by electrical stimulation of the deep layers of the superior colliculus and dorsal periaqueductal gray. **Behavioural Brain Research**, Amsterdam, v. 87, n. 1, p.97-103, ago. 1997.

COMOLI, E. et al. Functional mapping of the prosencephalic systems involved in organizing predatory behavior in rats. **Neuroscience**, Washington, v. 130, n. 4, p.1055-1067, jan. 2005.

COMOLI, E.; RIBEIRO-BARBOSA, E. R; CANTERAS, N. S.. Predatory hunting and exposure to a live predator induce opposite patterns of Fos immunoreactivity in the PAG. **Behavioural Brain Research**, Amsterdam, v. 138, n. 1, p.17-28, jan. 2003.

COMMONS, K.G.; PFAFF, D.W. Ultrastructural evidence for enkephalin mediated disinhibition in the ventromedial nucleus of the hypothalamus. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, vol.21, n. 1, p. 53-62, jan. 2001.

da SILVA, J.A. et al. Chemical neuroanatomical and psychopharmacological evidence that κ receptor-mediated endogenous opioid peptide neurotransmission in the dorsal and ventral mesencephalon modulates panic-like behaviour. *European Journal of Pharmacology*, vol. 698, n. 1-3, p. 235-245, 5 jan. 2013.

DARWIN, Charles. **A expressão das emoções nos homens e nos animais**. 2. ed. São Paulo: Companhia das Letras, 2009. 343 p.

DESCARTES R. **Meditações metafísicas**. São Paulo: Martins Fontes, 2000.

Dos ANJOS-GARCIA T, COIMBRA NC. Opposing roles of dorsomedial hypothalamic CB1 and TRPV1 receptors in anandamide signaling during the panic-like response elicited in mice by Brazilian rainbow *Boidae* snakes. *Psychopharmacology (Berl)*, vol. 236, n. 6, p. 1863-1874, jun. 2019.

EICHENBERGER, G. C. D et al. Neuroanatomical and psychopharmacological evidence for interaction between opioid and GABAergic neural pathways in the modulation of fear and defense elicited by electrical and chemical stimulation of the deep layers of the superior

colliculus and dorsal periaqueductal gray matter. **Neuropharmacology, Oxford**, v. 42, n. 1, p.48-59, jan. 2002

FANSELOW, M. S. The midbrain pariaqueductal gray as a coordinator of action in response to fear and anxiety. In: DEPAULIS, A.; BLANDER, R. (Eds.). **The midbrain pariaqueductal gray matter: functional, anatomical and immunohistochemical organization**. New York: Plenum, p. 151-173, 1991.

FANSELOW, MS; BOLLES, RC. Tiggering of the endorphin analgesia reaction by cue previously associated with shock. Reversal by naloxone. **Bull. Psychon. Soc.** 1979

FUCHS, S. A. G.; EDINGER, H. M.; SIEGEL, A. The role of the anterior hypothalamus in affective defense behavior elicited from the ventromedial hypothalamus of the cat. **Brain Research**, Amsterdam, v. 330, n. 1, p. 93-107, mar. 1985.

FUCHS, S. A. G.; SIEGEL, A. Neural Pathways Mediating Hypothalamically Elicited Flight Behavior in the Cat. **Brain Research**, Amsterdam, v. 306, n. 8, p.263-281, dez. 1983.

GRAEFF, F. G. Brain defense systems and anxiety. In: ROTH, M; BURROWS, G. D; NOYES, R. (Eds.). **Handbook of Anxiety**. Amsterdam: Elsevier Science, p. 307-354, 1990.

GRAEFF, F. G. Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviors and related emotions in mammals. **Brazilian journal of medical and biological research**, Ribeirão Preto, v. 27, n. 1, p. 811-829, 1994.

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

GRAY, J. A.; MCNAUGHTON, N. **The Neuropsychology of Anxiety**, Oxford University Press, Oxford, 2000.

GUIMARÃES-COSTA, R. et al. Innate defensive behaviour and panic-like reactions evoked by rodents during aggressive encounters with Brazilian constrictor snakes in a complex labyrinth: Behavioural validation of a new model to study affective and agonistic reactions in a prey versus predator paradigm. **Journal of Neuroscience Methods**, Amsterdam, v. 165, n. 1, p.25-37, set. 2007.

HALPERN, M. Effects of midbrain central gray matter lesions on escape-avoidance behavior in rats. **Physiology & Behavior**, Elmsford, v. 3, n. 1, p.171-178, jan. 1968.

HESS, W; BRUGER, M. Das subkortikale zentrum der affektiven abwereaktion. **Helv. Physiol. Pharmacol.** Basel, v. 1, p. 33-52, 1943.

HILTON, S. M. The defence-arousal system and its relevance for circulatory and respiratory control. **Journal of Experimental Biology**, London, v. 100, n. 8, p.159-174, nov. 1982.

HRABOVSKY, E. et al. Distribution of type 1 cannabinoid receptor-expressing neurons in the septal-hypothalamic region of the mouse: colocalization with GABAergic and glutamatergic markers. **Journal of Comparative Neurology**, vol. 520, n. 5, p. 1005-1020, 1 abr. 2012.

IMPERATO, A.; CHIARA, G. Behavioural effects of GABA-agonists and antagonists infused in the mesencephalic reticular formation - deep layers of superior colliculus. **Brain Research**, Amsterdam, v. 224, n. 1, p.185-194, nov. 1981.

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

IWATA, J.; CHIDA, K.; LEDOUX, J. E. Cardiovascular responses elicited by stimulation of neurons in the central amygdaloid nucleus in awake but not anesthetized rats resemble conditioned emotional responses. **Brain Research**, Amsterdam, v. 418, n. 1, p.183-188, ago. 1987.

JENCK, F.; MOREAU, J. L.; KARLI, P. Modulation by morphine of aversive-like behavior induced by GABAergic blockade in periaqueductal gray or medial hypothalamus. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, Phoenix, v. 31, n. 1, p.193-200, set. 1988.

JENCK, F.; SCHMITT, P.; KARLI, P. Morphine applied to the mesencephalic central gray suppresses brain stimulation induced escape. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, Phoenix, v. 19, n. 2, p.301-308, ago. 1983.

JENCK, F.; SCHMITT, P.; KARLI, P. Morphine injected into the periaqueductal gray attenuates brain stimulation-induced effects: An intensity discrimination study. **Brain Research**, Amsterdam, v. 378, n. 2, p. 274-284, jul. 1986.

KANDELL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSEL, T. M. **Fundamentos da Neurociência e do Comportamento**, cap. XXIX, Editora Prentice-Hall do Brasil Ltda, Rio de Janeiro, 1995.

KHAN, A.U. et al. Cannabidiol-induced panicolytic-like effects and fear-induced antinociception impairment: the role of the CB1 receptor in the ventromedial hypothalamus. **Psychopharmacology** (Berl), jan. 2020.

KOOB, G.; BLOOM, F.. Cellular and molecular mechanisms of drug dependence. **Science**, Washington, v. 242, n. 4879, p.715-723, 4 nov. 1988.

KITAHAMA, K. et al. Cells presenting GABA immunoreactivity in the hypothalamus of the cat. **C. R. Acad. Sci. III**, vol. 308, n.19, p. 507-511, 1989.

KUPFERMAN, I. Hypothalamus and limbic system: Motivation. In Kandel, E. R., Schwartz, J.H. & Jessell, T. M. (Eds.), *Principles of Neural Science*, 3rd ed. New York: Elsevier, p.751-760, 1991.

LEÃO-BORGES, P. C.; COIMBRA, N. C.; BRANDÃO, M. L. Independence of aversive and pain mechanisms in the dorsal pariaqueductal gray matter of the rat. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v.21, 1988.

LEDOUX, J. E. Emotion and the limbic system concept. **Concepts in Neuroscience**, v.2, p.169-199, 1991.

LOBÃO-SOARES, B. et al. Cellular prion protein modulates defensive attention and innate fear-induced behaviour evoked in transgenic mice submitted to an agonistic encounter with the tropical coral snake *Oxyrhopus guibei*. **Behavioural Brain Research**, Amsterdam, v. 194, n. 2, p. 129-137, dez. 2008.

LORD, John A. H. et al. Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors. **Nature**, London, v. 267, n. 5611, p.495-499, jun. 1977.

LYON, M. The role of central midbrain structures in conditioned responding to aversive noise in the rat. **The Journal Of Comparative Neurology**, Philadelphia, v. 122, n. 3, p.407-429, jun. 1964.

MAISONNETTE, S. S. et al. Effects of lesions of amygdaloid nuclei and substantia nigra on aversive responses induced by electrical stimulation of the inferior colliculus. **Brain Research Bulletin**, Phoenix, v. 40, n. 2, p.93-98, jan. 1996.

MANCIA, G; ZANCHETTI, A. Hypothalamic control of autonomic functions. Em: *Handbook of Hypothalamus*, P. J. Morgani e J. Panksepp (Eds.), Marcel Dekker, New York, p. 147-201, 1981.

MARTIN, John H. **Neuroanatomia**, cap. VII (2 ed.) Editora Artes Médicas, Porto Alegre, 1998.

MELZACK, R.; WALL, P. D.; TY, T. C. Acute pain in an emergency clinic: Latency of onset and descriptor patterns related to different injuries. **Pain, Amsterdam**, v. 14, n. 1, p.33-43, set. 1982.

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

MICZEK, K. A; THOMPSON, M. L. 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, p. 431-456, 1984

MOLINA, A. Fernandez de; HUNSPERGER, R. W.. Central representation of affective reactions in forebrain and brain stem: electrical stimulation of amygdala, stria terminalis, and adjacent structures. **The Journal Of Physiology**, Leningrad, v. 145, n. 2, p.251-265, 3 mar. 1959.

NASHOLD, B. S.; WILSON, W. P.; SLAUGHTER, D. Graham. Sensations Evoked by Stimulation in the Midbrain of Man. **Journal of Neurosurgery**, **Baltimore**, v. 30, n. 1, p.14-24, jan. 1969.

NAUTA, W. J. H. Hippocampal projections and related neural pathways to the mid-brain in the cat. **Brain**, **London**, v. 81, n. 3, p.319-340, 1958.

OSAKI, M. Y et al. Neuroanatomical and neuropharmacological study of opioid pathways in the mesencephalic tectum: effect of μ 1- and κ -opioid receptor blockade on escape behavior induced by electrical stimulation of the inferior colliculus. **Brain Research**, Amsterdam, v. 992, n. 2, p.179-192, dez. 2003.

OWINGS, D. H.; ROWE, M. P.; RUNDUS, A. S. The rattling sound of rattlesnakes (*Crotalus viridis*) as a communicative resource for ground squirrels (*Spermophilus beecheyi*) and burrowing owls (*Athene cunicularia*). **Journal of Comparative Psychology**, **Washington**, v. 116, n. 2, p.197-205, 2002.

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

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

PEZZATO, Fernanda Augustini; BRANDÃO, Alessandra Salina; OSHIRO, Claudia Kami Bastos. Intervenção baseada na psicoterapia analítica funcional em um caso de transtorno de pânico com agorafobia. **Rev. bras. ter. comport. cogn.**, São Paulo , v. 14, n. 1, p. 74-84, abr. 2012 .

PECKYS, D; LANDWEHRMEYER, G.b. Expression of mu, kappa, and delta opioid receptor messenger RNA in the human CNS: a 33P in situ hybridization study. **Neuroscience**, Oxford, v. 88, n. 4, p.1093-1135, fev. 1999

POLLACK, Mark H. et al. Paroxetine in the Treatment of Generalized Anxiety Disorder: Results of a Placebo-Controlled, Flexible-Dosage Trial. **The Journal of Clinical Psychiatry**, Memphis, v. 62, n. 5, p.350-357, Jan. 2001.

REALE, G. **História da Filosofia Antiga**: das Origens a Sócrates. 3a ed. São Paulo: Loyola; 1999.

REGUERO, L. et al. GABAergic and cortical and subcortical glutamatergic axon terminals contain CB1 cannabinoid receptors in the ventromedial nucleus of the hypothalamus.

PLoS One, vol. 6, n.10, e26167, 2011.

RIBEIRO, S. J. et al. Functional and ultrastructural neuroanatomy of interactive intratectal/tectonigral mesencephalic opioid inhibitory links and nigrotectal GABAergic pathways: Involvement of GABA_A and μ_1 -opioid receptors in the modulation of panic-like reactions elicited by electrical stimulation of the dorsal midbrain. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, Amsterdam, v. 30, n. 4, p.184-200, dez. 2005.

SIEGEL; POTT, C. Neural substrates of aggression and flight in the cat. **Progress In Neurobiology**, Oxford, v. 31, n. 4, p.261-283, 1988.

SILVEIRA, M. C. L.; SANDNER, G.; GRAEFF, F. G. Induction of Fos immunoreactivity in the brain by exposure to the elevated plus-maze. **Behavioural Brain Research**, Amsterdam, v. 56, n. 1, p.115-118, jul. 1993.

SIQUEIRA-BATISTA, Rodrigo; SCHRAMM, Fermin Roland. Platão e a medicina. **Hist. ci-enc. saude-Manguinhos**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 3, p. 619-634, Dec. 2004

STEIN, D. J.; BOUWER, C. A neuro-evolutionary approach to the anxiety disorders. **Journal Of Anxiety Disorders**, Elmsford, v. 11, n. 4, p. 409-429, jul. 1997.

STEINBUSCH, H.W.M. Distribution of serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of the rat—Cell bodies and terminals. **Neuroscience, Baltimore**, v. 6, n. 4, p.557-618, abr. 1981.

STRAHLENDORF, H.K.; STRAHLENDORF, J.C.; BARNES, C.D. Endorphin-mediated inhibition of locus coeruleus neurons. **Brain Research**, vol. 191, n. 1, p. 284-288, 2 jun. 1980.

SWAISGOOD, R. R.; OWINGS, Donald H.; ROWE, Matthew P. Conflict and assessment in a predator–prey system: ground squirrels versus rattlesnakes. **Animal Behaviour, London**, v. 57, n. 5, p.1033-1044, maio 1999a.

SWAISGOOD, R. R.; ROWE, M. P.; OWINGS, D. H. Assessment of rattlesnake dangerousness by California ground squirrels: exploitation of cues from rattling sounds. **Animal Behaviour, London**, v. 57, n. 6, p.1301-1310, jun. 1999b.

TWARDOWSCHY, André et al. The role of 5-HT_{1A} receptors in the anti-aversive effects of cannabidiol on panic attack-like behaviors evoked in the presence of the wild snake *Epicrates cenchria crassus* (*Reptilia, Boidae*). **Journal of Psychopharmacology**, Amsterdam, v. 27, n. 12, p.1149-1159, 7 ago. 2013

ULLAH, Farhad et al. Relevance of dorsomedial hypothalamus, dorsomedial division of the ventromedial hypothalamus and the dorsal periaqueductal gray matter in the organization of freezing or oriented and non-oriented escape emotional behaviors. **Behavioural Brain Research**, Amsterdam, vol. 293, p.143-152, 15 out. 2015.

ULLAH, Farhad et al. Connexions between the dorsomedial division of the ventromedial hypothalamus and the dorsal periaqueductal grey matter are critical in the elaboration of hypothalamically mediated panic-like behaviour. **Behavioural Brain Research**, Amsterdam, vol. 319, p. 135-147, 15 fev. 2017.

URIBE-MARIÑO, Andrés et al. Anti-Aversive Effects of Cannabidiol on Innate Fear-Induced Behaviors Evoked by an Ethological Model of Panic Attacks Based on a Prey vs the Wild Snake *Epicrates cenchria crassus* Confrontation Paradigm. **Neuropsychopharmacology**, Amsterdam, v. 37, n. 2, p.412-421, 14 set. 2011

Walsh e Cummins (1976). The open-field: A critical Review. **Psychological Bulletin**, 83(3), 482-504

WELTSON, A. et al. Evidências Neuroetológicas e Morfológicas de Expressão Gênica Induzida pelo Medo Elaborado no Complexo Amigdalóide e na Substância Cinzenta Periaqueductal após Confronto entre *Mesocricetus auratus* (Rodentia, Cricetidae) e *Micrurus frontalis* (Reptilia, Elapidae). **Medicina**, v.36 (Supl. 1): 17-17, 2003.

WILSON, Sir Erasmus. **A System of Human Anatomy, General and Special**, William H. Gobrecht (Ed.), Philadelphia: Blanchard & Lea, Collin's Printer, 616 pp., 1858.

ZAMIGNANI, Denis Roberto; BANACO, Roberto Alves. Um panorama analítico-comportamental sobre os transtornos de ansiedade. **Rev. bras. ter. comport. cogn.**, São Paulo , v. 7, n. 1, p. 77-92, jun. 2005

ZHANG, Shi Ping; BANDLER, Richard; CARRIVE, Pascal. Flight and immobility evoked by excitatory amino acid microinjection within distinct parts of the subtentorial mid-brain periaqueductal gray of the cat. **Brain Research**, Amsterdam, v. 520, n. 1-2, p.73-82, jun. 1990.