UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE NEUROCIÊNCIAS E CIÊNCIAS DO COMPORTAMENTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROLOGIA

Evidências farmacológicas de uma interação entre vias opioides e GABAérgicas recíprocas entre o colículo inferior e a substância cinzenta periaquedutal dorsal: papel do receptor opioide do tipo κ na modulação do comportamento de defesa

Yara Bezerra de Paiva

Ribeirão Preto
2020

YARA BEZERRA DE PAIVA

Evidências farmacológicas de uma interação entre vias opioides e GABAérgicas recíprocas entre o colículo inferior e a substância cinzenta periaquedutal dorsal: papel do receptor opioide do tipo κ na modulação do comportamento de defesa

"Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)"

Tese apresentada ao Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como requisito para a obtenção do Título de Doutora em Ciências, Área: Neurologia, Opção: Neurociências.

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

DE PAIVA, Y.B.

Evidências farmacológicas de uma interação entre vias opioides e GABA-érgicas recíprocas entre o colículo inferior e a substância cinzenta periaquedutal dorsal: papel do receptor opioide do tipo κ na modulação do comportamento de defesa. Ribeirão Preto, 2020.

102 p.

Tese de doutorado, apresentada ao Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Neurologia. Opção: Neurociências.

Orientador: Coimbra, Norberto Cysne

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

Trabalho realizado no Laboratório de Neuroanatomia e Neuropsicobiologia, Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina – Universidade de São Paulo, com auxílio financeiro da CAPES

Nome: de Paiva, Y. B.

Título**: Evidências farmacológicas de uma interação entre vias opioides e GABAérgicas recíprocas entre o colículo inferior e a substância cinzenta periaquedutal dorsal: papel do receptor opioide do tipo κ na modulação do comportamento de defesa.**

Tese apresentada ao Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de concentração em Neurologia. Opção: Neurociências.

Aprovado em: _____

Banca examinadora

Prof. Dr. Norberto Cysne Coimbra

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dra. Valeria Paula Sassoli Fazan

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dra. Renata Ferreira Sgobbi

Instituição: Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dra. Lanny Cristina Burlandy Soares

Instituição: Centro Universitário Adventista de São Paulo - UNASP

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho à minha mãe, Maria José Bezerra de Paiva, e irmãos, Sarah Bezerra de Paiva e Isaac Bezerra de Paiva. Vocês são a minha luz e maior amor.

Os experimentos deste trabalho foram interrompidos devido ao duro cenário que a pandemia causada pelo novo conoravírus (SARS-CoV2) acarretou. O Brasil chegou a registrar 150 mil mortes. Este trabalho foi escrito sob o peso cruel desta realidade. Cento e cinquenta mil vidas interrompidas e, no concernente às vidas restantes, a estimativa é de que cresça de forma assombrosa os transtornos de ansiedade. Dedico este trabalho àqueles que, assim como eu, anelam por contribuir para o avanço da ciência, para a melhoria da saúde e, quem sabe, contribuir para a cura de transtornos psiquiátricos. Dedico-o também aos que padecem de quaisquer Transtornos de Ansiedade, vocês são a razão desta pesquisa.

AGRADECIMENTO E HOMENAGEM AOS ANIMAIS

Cobaia. Substantivo feminino: 1.Mastozoologia. Mamífero. Roedor sul-americano da família dos cavídeos (Cavia porcellus), encontrado atualmente como animal doméstico, e que, desde o século XIX vem sendo usando em todo o mundo em experimentos laboratoriais; porquinho-da-índia, preá, preá-da-índia. 2. Por extensão. Qualquer animal ou pessoa que se usa em experimentos científicos.

É fato que num mundo ideal, não seria mais necessário utilizar animais em pesquisa. Utilizamos ainda hoje pela proximidade de resposta do homem, facilidade de manejo, mas, principalmente, por não termos ainda uma outra opção suficientemente adequada.

Agradeço e homenageio cada animal que foi sacrificado para a realização deste estudo. Que este sacrifício jamais seja em vão. Almejo que este trabalho possa agregar ao que se tem construído a respeito do uso de antagonista opioide, como um possível aliado ao tratamento da síndrome do pânico.

AGRADECIMENTOS

A **DEUS**, por me permitir viver e batalhar pelos meus sonhos, por me suster e conceder muito mais do que mereço. Pela sabedoria e direcionamento.

À minha **família**, pelo amor incondicional, cumplicidade e suporte. Por acreditarem em mim e me incentivarem sempre.

Ao **Prof. Norberto Cysne Coimbra** por me ensinar muito além da pós-graduação. Sou profundamente grata pela sua orientação, disposição, confiança. Seu jeito espontâneo e brincalhão (por muitas vezes mal compreendido), sua humildade e simplicidade, suas aulas e cursos, sempre me fizeram pensar "espero ser assim também como docente e pesquisadora". Alguém que jamais deixou pesar sobre seus alunos o que quer que estivesse passando em sua vida, e ao mesmo tempo soube estender a mão e ajudar a cada vez a qualquer aluno seu que tenha passado por momentos difíceis. Alguém que sabe exigir tão bem quanto oferecer ajuda, que incentiva seus alunos a crescer, abraça os planos, que se empolga com a ciência e sempre quer saber se estamos empolgados também. Espelhar-me-ei sempre na sua forma de tratar a todos com tanta humanidade e compaixão.

A **Christiane de Sá Martins**, por não ter medido esforços para lutar por mim. Não terei jamais palavras suficientes para demonstrar o quanto lhe sou grata.

A **Guilherme Bazaglia**, pela sua amizade incondicional. Amigo para momentos bons e ruins. Por jamais negar auxílio, por me ouvir sempre que precisei, por dividir comigo as minhas dores e me dar esperança. Pelos cafés e risadas, por tornar tudo mais leve.

A **Gustavo Henrique de Mello Rosa**, pelo seu coração enorme! Obrigada por estar ao meu lado sempre, para o que for. Serei sempre profundamente grata a você.

A **Maria de Fátima dos Santos Sampaio**. Que felicidade ter você como amiga! Admiro a sua garra, competência e resiliência. Gratidão por acreditar em mim e me incentivar a buscar os meus sonhos.

A **Rebeca Machado de Figueiredo**. Por dividir essa intensa jornada cheia de aprendizados para a vida!

A **Renata Ferreira Sggobi**. Você me inspira a ser rápida, produtiva e eficaz. Obrigada por poder contar sempre com a sua generosidade, disponibilidade e sabedoria.

Aos amigos que tive a felicidade de conviver e aprender com eles nesses longos anos no **Laboratório de Neuroanatomia e Neuropsicobiologia**. Obrigada, Priscila, Juliana, Tayllon e Luiz, aos projetos desenvolvidos juntos, às risadas e cafés.

A **Tadeu** (*in memoriam)*, por ter me ajudado prontamente quando precisei. Por ter sido sempre tão solidário e ter feito seu trabalho com excelência. Por nunca ter medido esforços para ajudar a todos.

A **Daoud Hibrahim Elias Filho** pelo apoio técnico e disponibilidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (**CAPES**) – por ter apoiado a realização deste trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS, ACRÔNIMO E SIGLAS

μ	*Mu*
κ	*Kappa*
μL	Microlitro
μg	Micrograma
AP	Ântero-posterior
AMPc	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
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 Superior
CS	Colículo Superior
DV	Dorsoventral
DSM	*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*
FMRP USP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GABA-T	GABA-transaminase
GAD	Glutamato-descarboxilase
IP	Intraperitoneal
kg	Kilograma
mg	Miligrama
mL	Mililitro
ML	Médio-lateral
mm	Milímetros
ng	Nanograma

NCCI	Núcleo Central do Colículo Inferior
Nmol	Nanomolar
NorB	Nor-binaltorfimina
NMDA	N-metil D-Aspartato
SCP	Substância Cinzenta Periaquedutal
SCPd	Substância Cinzenta Periaquedutal dorsal
SCPdm	Substância Cinzenta Periaquedutal dorsomedial
SCPdl	Substância Cinzenta Periaquedutal dorsolateral
SCPv	Substância Cinzenta Periaquedutal ventral
SCPvl	Substância Cinzenta Periaquedutal ventrolateral
SCPl	Substância Cinzenta Periaquedutal lateral
SNpr	Substância negra, parte reticulada
SNC	Sistema nervoso central
SNS	Sistema nervoso simpático
USP	Universidade de São Paulo

Lista de Figuras

Figura 1: Substância cinzenta periaquedutal de diferentes vertebrados..... **39**

Figura 2: Divisão das colunas da SCP no eixo anterior-posterior (SILVA & MCNAUGHTON, 2019). Coordenadas aproximadas segundo o Bregma de ratos retiradas do atlas de Paxinos e Watson (PAXINOS & WATSON, 1998). DM: dorsomedial SCP; DL: dorsolateral SCP; L: lateral SCP; VL: ventrolateral SCP; DR: núcleo dorsal da rafe; CB: vermis cerebelar..... **39**

Figura 3: Dissecção superficial do tronco cerebral; Vista lateral, cápsula externa, hipocampo, colículo superior, **colículo inferior** (em amarelo), fascículo espinocerebelar ventral (Contribuição de Gray's Anatomy Plates) **42**

Figura 4: Dissecção do tronco cerebral; Vista dorsal, estria terminal, radiação auditiva, geniculado medial, **colículo inferior** (em destaque; Contribuição de Gray's Anatomy Plates) **43**

Figura 5: Lei de Yerkes-Dodson e a relação entre os níveis de ansiedade e a capacidade de desempenho..... **44**

Figura 6: Relação entre as estratégias de defesa, emoções e o respectivo substrato neural. Nos quadros de 1-3, temos que, em (1) a ansiedade é a emoção predominante quando o contexto trata-se de um perigo potencial; em (2) predomina o medo, uma vez que o perigo é distal; em (3) a emoção predominante é o pânico, pois o perigo encontra-se proximal. As estratégias de defesa para cada situação estão nos respectivos quadros. Ao centro, estão esquematizadas o principal substrato neural das emoções em geral, e que participam no reconhecimento e elaboração das reações defensivas..... **47**

Figura 7: Resumo ilustrado da metodologia utilizada. (1) Acima, representa-se o período em que o animal permanece no biotério. Ao centro, está representado o crânio do roedor, com destaque para as suturas Bregma e Lambda, utilizadas como ponto de referência para a cirurgia estereotáxica, representada no campo inferior; (2) bomba de microinjeção para infusão de drogas e, ao lado, representação do open field onde os comportamentos são registrados por meio

de câmera filmadora; (3) (a) perfusão, (b, c) retirada do encéfalo e (d) conservação até a realização da (4) histologia..... **59**

Figura 8. Esquema resumido da metodologia utilizada em cada experimento (1 e 2). Os diagramas esquemáticos foram adaptados do Atlas de Paxinos e Watson (2005), em destaque o CI (amarelo) e a SCPd (cinza), onde foram realizadas as microinjeções em diferentes grupos, segundo as coordenadas estereotaxicas descritas no item 3.3..... **60**

Figura 9: Representação esquemática em diagramas do Atlas de Paxinos e Watson (2005) de cortes coronais do mesencéfalo de Rattus norvegicus, mostrando os sítios de microinjeções. Em (A) Nor-binaltorfimina (NorB) no colículo inferior, este sendo representado segundo as diferentes doses como segue: NorB na dose de 0.05 (+), NorB na dose de 0.5 (★), NorB na dose de 5 (♦); Em (B) bicuculina (•) ou salina (○) na SCPd..... **63**

Figura 10: Efeito de microinjeções de salina, Nor-binaltorfimina (NorB) ou veículo no colículo inferior (CI), sobre o tempo de alerta (A), número de alerta (B), tempo de congelamento (C) e número de congelamento (D) evocados pelo bloqueio de receptores GABAérgicos na coluna dorsal da substância cinzenta periaquedutal (SCPd) com microinjeção local de bicuculina (bic; 40 ng/0,2 µL). Os dados são apresentados como média e erro padrão da média. p<0,001 quando comparado com o grupo tratado com salina; # p<0,05, ## p<0,01, ### p<0,001, quando comparado com o grupo tratado com veículo + bicuculina, de acordo a ANOVA de uma via, seguida do teste de *post-hoc* de Newman-Keuls. **64**

Figura 11: Efeito de microinjeções de salina, Nor-binaltorfimina (NorB) ou veículo no colículo inferior (CI), sobre o tempo de fuga (A), número de fuga (B), tempo de salto (C) e número de salto (D) evocados pelo bloqueio de receptores GABAérgicos na coluna dorsal da substância cinzenta periaquedutal (SCPd) com microinjeção local de bicuculina (bic; 40 ng/0.2 µL). Os dados são apresentados como média e erro padrão da média. ***p<0,001, ****p<0,0001, em relação ao grupo tratado com salina fisiológica; p<0,01, p<0,001, p<0,0001, quando comparado ao grupo tratado com veículo e bicuculina, segundo a ANOVA de uma via, seguida do teste de *post-hoc* de Newman-Keuls..... **65**

Figura 12: Efeito de microinjeções de salina, Nor-binaltorfimina (NorB) ou veículo no colículo inferior (CI), sobre o número de cruzamento (A), tempo de rotação (B), número de rotação (C), tempo de levantamento (D) e número de levantamento (E) evocados pelo bloqueio de receptores GABAérgicos na coluna dorsal da substância cinzenta periaquedutal (SCPd) com microinjeção local de bicuculina (bic; 40 ng/0.2 µL). Os dados são apresentados como média e erro padrão da média. *** p<0,001, **** p<0,0001, quando comparado como grupo tratado com veículo; # p<0,05, ## p<0,01, ### p<0,001, quando

comparado ao grupo tratado com veículo e bicuculina, de acordo com a ANOVA de uma via, seguida do teste de *post-hoc* de Newman-Keuls..... **66**

Figura 13: Representação esquemática em diagramas do Atlas de Paxinos e Watson (2005) de cortes coronais do mesencéfalo de Rattus norvegicus, mostrando os sítios de microinjeções. Em (A) Nor-binaltorfimina (NorB) na SCPd, este sendo representado segundo as diferentes doses como segue: NorB na dose de 0.05 (+), NorB na dose de 0.5 (★), NorB na dose de 5 (♦); Em (B) bicuculina (•) ou salina (○) no colículo inferior..... **69**

Figura 14: Efeito de microinjeções de salina, Nor-binaltorfimina (NorB) ou veículo na coluna dorsal da substância cinzenta periaquedutal (SCPd), sobre o tempo de alerta (A), número de alerta (B), tempo de congelamento (C) e número de congelamento (D) evocados pelo bloqueio de receptores GABAérgicos no colículo inferior (CI) com microinjeção local de bicuculina (bic; 40 ng/0.2 µL). Os dados são apresentados como média e erro padrão da média. * p<0,05, *** p<0,001, quando comparado com o grupo tratado com salina; # p<0,05, ## p<0,01, quando comparado com o grupo tratado com veículo + bicuculina, de acordo com a ANOVA de uma via, seguida do teste de post-hoc de Newman-Keuls. Efeito de microinjeções de salina, Nor-binaltorfimina (NorB) ou veículo na coluna dorsal da substância cinzenta periaquedutal (SCPd), sobre o tempo de alerta (A), número de alerta (B), tempo de congelamento (C) e número de congelamento (D) evocados pelo bloqueio de receptores GABAérgicos no colículo inferior (CI) com microinjeção local de bicuculina (bic; 40 ng/0.2 µL). Os dados são apresentados como média e erro padrão da média. * p<0,05, *** p<0,001, quando comparado com o grupo tratado com salina; # p<0,05, ## p<0,01, quando comparado com o grupo tratado com veículo + bicuculina, de acordo com a ANOVA de uma via, seguida do teste de post-hoc de Newman-Keuls..... **70**

Figura 15: Efeito de microinjeções de salina, Nor-binaltorfimina (NorB) ou veículo na coluna dorsal da substância cinzenta periaquedutal (SCPd), sobre o tempo de fuga (A), número de fuga (B), tempo de salto (C) e número de salto (D) evocados pelo bloqueio de receptores GABAérgicos no colículo inferior (CI) com microinjeção local de bicuculina (bic; 40 ng/0.2 µL). Os dados são apresentados como média e erro padrão da média. * p<0,05, ** p<0,01 *** p<0,001, quando comparado ao grupo tratado com salina; # p<0,05, ## p<0,01, ### p<0,001, quando comparado com o grupo tratado com veículo + bicuculina, de acordo com a ANOVA de uma via, seguida do teste de *post-hoc* de Newman-Keuls..... **71**

Figura 16: Efeito de microinjeções de salina, Nor-binaltorfimina (NorB) ou veículo na coluna dorsal da substância cinzenta periaquedutal (SCPd), sobre o tempo de rotação (A), número de rotação (B), número de levantamento (C) e número de cruzamento (D) evocados pelo bloqueio de receptores GABAérgicos no colículo inferior (CI) com microinjeção local de bicuculina (bic; 40 ng/0.2 µL). Os dados são apresentados como média e erro padrão da média. *

p<0,05, **p<0,01; # p<0,05 quando comparado com o grupo tratado com veículo + bicuculina, de acordo com a ANOVA de uma via, seguida do teste de *post-hoc* de Newman-Keuls..... **72**

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO..... 18
1.1 Neuroanatomia – revisitando a história..... 19
1.2 O estudo da emoção sob a perspectiva neurocientífica..... 28
1.3 Estratégias de defesa..... 34
1.4 Substrato neural do comportamento defensivo..... 37
1.5 Substância cinzenta periaquedutal..... 37
1.6 Núcleo central do colículo inferior..... 40
1.7 Ansiedade sob as perspectivas fisiológica, clínica e experimental..... 43
1.8 Sistemas opioidérgicos e GABAérgicos na modulação das respostas defensivas..... 48
2 HIPÓTESE E OBJETIVOS..... 51
2.1 Hipótese..... 52
2.2 Objetivo geral..... 52
2.3 Objetivo específico..... 52
3 MATERIAL E MÉTODO..... 53
3.1 Aprovação ética..... 54
3.2 Animais..... 54
3.3 Cirurgia..... 54
3.4 Drogas..... 55
3.5 Equipamentos..... 56
3.6 Procedimento experimental..... 56
3.7 Perfusão e histologia..... 57
3.8 Estatística..... 58
4 RESULTADOS..... 60
4.1 Efeito da administração intracolicular de um antagonista opioide seletivo para receptor do tipo kappa, sobre as respostas defensivas induzidas pela microinjeção de bicuculina na Substância Cinzenta Periaquedutal dorsal..... 61
4.2 Esquematização dos sítios de microinjeção de Nor-binaltorfimina no Colículo Inferior e bicuculina ou veículo na coluna dorsal da Substância Cinzenta Periaquedutal..... 63
4.3 Efeito da administração intra-SCPd de um antagonista opioide seletivo para receptor do tipo kappa, sobre as reações defensivas induzidas pela microinjeção de bicuculina no Colículo Inferior..... 67
4.4 Esquematização dos sítios de microinjeção de Nor-binaltorfimina na coluna dorsal da Substância Cinzenta Periaquedutal e bicuculina ou veículo no Colículo Inferior..... 69
5 DISCUSSÃO..... 73
6 CONCLUSÃO..... 79
7 REFERÊNCIAS..... 81
8 ANEXOS..... 96

“O visionário cientista tinha montado seu equipamento no prédio de pesquisa amplo e aberto em sua propriedade. Jor-El não tinha assistentes porque ninguém mais em Krypton entendia exatamente o que ele estava fazendo; na verdade, alguns outros pareciam se preocupar. As pessoas de seu planeta estavam satisfeitas. Muito satisfeitas. Por outro lado, Jor-El raramente se deixava sentir complacente ou satisfeito. Como poderia, quando ele podia imaginar facilmente tantas maneiras de melhorar o mundo? Ele era uma verdadeira anomalia na ‘sociedade perfeita’.

(...) Jor-El deu um passo à frente. Ele já havia sentido muitas vezes a deliciosa emoção da descoberta, a onda do sucesso que vinha quando a experiência dava os resultados que estavam previstos ou, melhor ainda, quando algo maravilhosamente inesperado acontecia. Esse portal tinha o potencial de gerar ambas as situações.

Maravilhado, Jor-El se aproximou do portal vazio. Ele não via nada - *absolutamente nada* -, um vácuo insondável no ar. (...) O portal continuou em silêncio, um vácuo que drenava toda luz e som. Para o próximo teste, Jor-El prendeu uma lente teleobjetiva de cristal a um telescópio que retirou de um equipamento ocioso numa das paredes do prédio de pesquisa. Cuidadosamente ele estenderia a haste com a lente através da barreira, permitiria que ela fotografasse o ambiente do outro lado e depois retiraria a ferramenta. Examinaria as imagens e determinaria qual seria o próximo passo. E testaria o ar, a temperatura e o ambiente daquele outro universo.

Mais cedo ou mais tarde, contudo, sabia que estava destinado a explorá-lo. ”

(Kevin J. Anderson, Os últimos dias de Krypton, págs. 13-17.)

RESUMO

DE PAIVA, Y. B. **Evidências farmacológicas de uma interação entre vias opioides e GABAérgicas recíprocas entre o colículo inferior e a substância cinzenta periaquedutal dorsal: papel do receptor opioide do tipo κ na modulação do comportamento de defesa.** 2020. 102 p. Tese de doutorado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP. Ribeirão Preto, 2020.

A indução de comportamentos defensivos em animais de laboratório constitui um potencial modelo de medo inato para o entendimento de transtornos emocionais humanos. A microinjeção de um antagonista de receptores GABA-A (bicuculina) em animais de laboratório provoca respostas defensivas associadas a ataques de pânico. Alguns estudos convergentes têm demonstrado a existência de uma complexa interação entre conexões mediadas por peptídeos opioides endógenos e vias neurais mediadas por GABA. Nosso grupo mostrou a presença de um duplo elo conectivo opioide entre neurônios do colículo inferior e a substância cinzenta periaquedutal dorsal. Tem sido proposto que os neurônios opioides exercem uma influência sobre os interneurônios GABAérgicos, os quais, por sua vez, exercem um controle inibitório tônico sobre estruturas mesencefálicas que elaboram o medo. Assim, em nível mesencefálico, os peptídeos opioides podem atuar na desinibição dos neurônios tonicamente inibidos pelo GABA, contribuindo, portanto, para a expressão dos comportamentos defensivos. No presente trabalho, utilizamos técnicas de estimulação química (com administração central de bicuculina) da coluna dorsal da substância cinzenta periaquedutal (SCPd) com o objetivo de avaliar o efeito da microinjeção de antagonistas opioides por via intracolicular ou intra-SCPd na elaboração de respostas defensivas organizadas pela SCPd ou CI, respectivamente. Nossa hipótese considera que a neurotransmissão opioide deprime a atividade de vias GABAérgicas que se projetam tanto ao colículo inferior quando às colunas dorsais da SCP, facilitando a elaboração das respostas defensivas induzidas pelo bloqueio de receptores GABAérgicos do tipo A em cada uma das estruturas abordadas neste estudo. Efetivamente, o bloqueio de receptores opioides kappa seja no CI, seja na SCPd causou um significante efeito panicolítico, reduzindo a intensidade de respostas de alerta defensivo, de imobilidade defensiva e de fuga. Esses dados sugerem uma modulação opioide recíproca entre as estruturas do *tectum* envolvidas com a elaboração do medo e do pânico.

Palavras-chave: comportamento defensivo; antagonista opioide; transtorno de pânico; receptor k.

ABSTRACT

DE PAIVA, Y. B. **Pharmacological evidence for opioid disinhibitory and GABAergic inhibitory links between the inferior colliculus and the dorsal periaqueductal grey matter: the role of κ-opioid receptor in the modulation of defensive behaviour.** 2020. 102 p. Ph Thesis. Ribeirao Preto Medical School of the University of São Paulo. Ribeirão Preto-SP, 2020.

The induction of defensive behaviours in laboratory animals is a potential model of innate fear for understanding human emotional disorders. Microinjection of a GABA-A receptor antagonist (bicuculline) in laboratory animals elicits defensive responses associated with panic attacks. Some convergent studies have demonstrated the existence of a complex interaction between connections mediated by endogenous opioid peptides and neural pathways mediated by GABA. Our group showed the presence of a disinhibitory opioid connective link between inferior colliculus and dorsal periaqueductal grey matter neurons. It has been proposed that opioid neurons exert a modulatory influence on GABAergic interneurons, which, in turn, exert a tonic inhibitory control over mesencephalic structures that organizes fear-induced behaviours. Thus, at the mesencephalic level, opioid peptides can exert a disinhibitory actions on GABAergic inhibitory projections to mesencephalic tectum, thus contributing to the expression of defensive behaviours. In the present work, we used a selective GABA-A receptor antagonist (bicuculline) microinjected either in the dorsal column of the periaqueductal grey matter (dPAG) or in the inferior colliculus (IC), respectively, to elicit innate fear-related behavioural responses. Our hypothesis considers that opioid neurotransmission depresses the activity of GABAergic pathways that project both to the IC and to the dPAG, facilitating the elaboration of the defensive responses induced by intratectal blockade GABAergic receptors in each of the structures addressed in this study. Effectively, the blockade of kappa opioid receptors in both IC and dPAG caused a significant panicolytic-like effect, reducing the intensity of defensive alert, defensive immobility and escape responses. These data suggest a reciprocal opioid modulation between the structures of the tectum involved in the elaboration of fear and panic.

Keywords: Defensive behaviour; panic attacks; GABA-A receptor; κ-opioid receptor; inferior colliculus; dorsal columns of the periaqueductal grey matter.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Neuroanatomia – revisitando a história

Este trabalho não poderia começar de outra forma senão retomando o desenrolar das descobertas do nosso objeto de estudo: o encéfalo. A curiosidade e a necessidade de desvendar sua estrutura e mecanismos de ação, moveu o Homem desde a antiguidade e nos move ainda hoje. Afinal, cada descoberta ao longo dos séculos abriu espaço para novas perguntas, e descobrir a etiologia e tratamento de algumas doenças inerentes a esta estrutura ainda requer trabalho árduo.

Antes que soubessem com maior acurácia sobre a atividade encefálica, os seres humanos de civilizações pré-históricas já relacionavam a cabeça e seu conteúdo com algo místico e alvo terapêutico e, neste campo, a trepanação era uma prática constante. A trepanação trata-se do ato de perfurar o crânio e sua principal indicação possivelmente eram dores fortes na cabeça, convulsões, alterações mentais, além das razões que envolviam as crenças místicas dessas culturas. Os crânios encontrados com esta perfuração continham alguma regeneração óssea nas bordas, mostrando que muitos sobreviveram por muito tempo após o procedimento. Esses crânios datam a partir do período neolítico (até 10.000 anos) e, dentre as civilizações praticantes da trepanação, observa-se que as andinas pré-colombianas foram as que a fizeram esse procedimento com maior frequência, e datam de 2 a 3 mil anos (RIBAS, 2006).

A palavra “cérebro” e as suas características circunvoluções surgem pela primeira vez, no que se conhece como o registro mais antigo encontrado: um papiro egípcio transcrito por volta de 2000 a.C.; nele se encontram também várias anotações sobre diagnósticos e tratamentos que eram utilizados pelo sumo sacerdote Imhotep. Um dos diversos casos descritos nesse hieróglifo descreve um paciente que teve uma fratura na cabeça e, ao palpar o cérebro nesta região, ocorria a perda da fala. Este relato parece ser a primeira correlação entre *função* da fala e região cerebral, muito embora esta relação entre morfologia e função ainda não tivesse sido estabelecida, e os egípcios acreditassem que o coração era a fonte do espírito, sensações e controle motor (BLITS, 1999; GEORGETO et al., 2014).

O Império Persa, também conhecido como Império Aquemênida (550-330 a.C.), proporcionou um grande avanço em seu apogeu, permitindo a dissecção de cadáveres e estudos anatômicos. Rhazes (nome abreviado de Abu Bakr Muhammad ibn Zakariyá ar-Razi) viveu entre 860 e 930, era seguidor de Hipócrates e Galeno; foi o maior clínico do mundo árabe, e ganhou grande destaque por seu livro de anatomia, que foi referência por séculos. Sua obra médica mais importante foi o *Almansor* (REZENDE et al., 2018, pg.131), e foi o primeiro a

utilizar o termo “neuroanatomia” (SHOJA & TUBBS, 2007). Os centros médicos começaram a surgir na Grécia por volta de 500-400 a.C., nas regiões de Crotona, Arigentum e Cós. Em Crotona, Alcméon correlacionou o cérebro com as sensações e a cognição. Em virtude da dissecção de cadáveres, foi possível observar a complexidade das circunvoluções no cérebro humano, o que, para ele, seria um indicativo de inteligência mais aguçada e superior do Homem quando comparado a outras espécies (BAZOU, 2008). Consta, ainda, em suas reflexões a respeito dos sentidos, a ideia de que as sensações chegariam ao cérebro através de canais sensoriais, chamados por ele de “*poroi*”: haveriam dois *poroi* responsáveis pela conexão entre os olhos e o cérebro. Outro legado importante deixado por Alcméon foi a relação entre saúde e doença (saúde seria o equilíbrio, chamada de “*isonomia*”) que, segundo ele, funcionaria como o balanço entre os pares opostos (“*dýnamis*”): o úmido e seco, o frio e quente, o amargo e doce.

Aristóteles (384-322 a.C.) foi um importante filósofo grego que deixou diversas contribuições em diferentes áreas do conhecimento. Foi considerado precursor do estudo das ciências como uma disciplina; considerava o coração como o local onde residia a “*psychê*” (“alma”), as emoções e o intelecto. Acreditava que o homem se diferenciava dos animais pelo intelecto, que ele caracterizava como a vontade de conhecer e pensar. Além de embriologista e taxonomista, introduziu o conceito de anatomia comparativa (CASTRO & LANDEIRA-FERNANDEZ, 2011).

O desenvolvimento do estudo da neuroanatomia teve um grande salto através do médico grego Herophilus (335-255 a.C.), quem desenvolveu uma metodologia criteriosa na dissecção de cadáveres, que o permitiu registrar mais de 600 dissecações. Acreditava que era a emoção, a inteligência e consciência que residia no cérebro. Descreveu meninges, ventrículos, a membrana aracnoide, diferenciou tendões de nervos e, também, a protuberância da confluência dos seios venosos na região occipital (homenageada como “tórcula de Herophilus”) (BAY & BAY, 2010).

Com a consagração do Cristianismo e crescimento do Império Romano (200 d.C. e 300 d.C.), houve um declínio considerável da prática de dissecção humana, que só voltou a ser expressiva novamente com a chegada do Renascimento. Na Idade Média, apesar da criação de universidades prestigiadas até hoje, a influência da igreja foi determinante no declínio do desenvolvimento científico, pois era considerado pecado e desrespeito ao Homem. A Universidade de Pádua, na Itália, utilizou cadáveres de pessoas executadas pela justiça ou de indigentes, tornando-se pioneira no ensino da anatomia humana (REZENDE et al., 2018, pg.126). Claudius Galeno (131-192 d.C.), filósofo e médico do imperador romano Marcus Aurelius Antoninus

(121-180 d.C.), fundamentou a teoria ventricular e sugeriu a ocorrência de funções corticais por área (GEORGETO et al., 2014).

Com o fim da Idade Média e surgimento do período Renascentista, um maciço progresso no desenvolvimento científico passou a se desenvolver, com estudos sobre astronomia, matemática, física, anatomia, etc., e esse avanço em diversos âmbitos do conhecimento inaugurou mais tarde a Ciência Moderna. Na Renascença, o cerne dos interesses eram o Homem, as ciências e as artes, sendo o século XVI considerado como século da anatomia. A reintrodução da dissecção humana pelo cirurgião e anatomista Remondino de Luzzi (1270-1326 d.C.) reflete o interesse cada vez maior em conhecer o corpo humano. Ele sistematizou a dissecção de cadáveres, elaborou o manual de dissecção e o primeiro texto anatômico: *Anathomia Corporis Humani* (1316), considerado referência pelos 250 anos seguintes (PILCHER, 1906).

A arte renascentista trouxe mais realidade em suas obras, e o conhecimento anatômico foi imprescindível para criar esse efeito. Leonardo da Vinci (1472-1519) destacou a conexão direta de nervos com o cérebro, omitindo o sistema ventricular na interpretação dos sentidos (del MAESTRO, 1998). Seu interesse pela medicina começou através da leitura das obras de autores, como Galeno de Pergamo, Remondino de Luzzi e Avicena. Por um período de 15 anos, Leonardo retratou com detalhes órgãos e elementos dos sistemas anatômicos do corpo humano, além de participar de diversas dissecações do corpo humano e de outros animais.

Os maiores avanços no que tange ao conceito e ao modo de ensino da anatomia foram feitos por Andreas Vesalius (1514-1564). Seus métodos de dissecção eram inovadores e dispensava a participação de cirurgiões. O ensino de anatomia na universidade entre o século XIV e metade do século XVI era feito baseado na leitura de um texto (*Anathomia* de Mondino dei Liucci e, no século XVI, por textos de Galeno), com um cirurgião assistente apontando as estruturas descritas em um cadáver. Vesalius inovou o ensino de anatomia ao fazer ele mesmo as dissecações e demonstrações no cadáver. Além disso, a ampla utilização de ilustrações em seu livro "*De Humani Corporis Fabrica"* (1543) conferiu uma compreensão melhor dos próprios textos anatômicos e uma marca incontestável no ensino da anatomia. Sem qualquer sombra de dúvidas, na Renascença, a arte tornou-se científica (KICKHOFEL, 2003).

Costanzo Varolio (1543-1575), filósofo e médico, exteriorizou por completo o cérebro, e foi o primeiro a mostrar a ligação do cérebro com a medula espinal, designada posteriormente de ponte de Varollo (ZAGO & MERAVIGLIA, 2009). Em uma de suas publicações, ele também fez comentários sobre o hipocampo, pedúnculos cerebrais e válvula ileocecal. Pela sua abordagem de dissecação valorizar a base do crânio – nunca feita antes – Varolio também descreveu os tratos da medula espinhal e o caminho dos nervos cranianos. Sugeriu que a medula

espinhal tinha quatro tratos: dois anteriores relacionados com a sensação e dois posteriores que carregavam fibras do cerebelo. Sem dúvida, nosso atual entendimento da neuroanatomia se deve muito ao seu trabalho (TUBBS et al., 2008). Esta técnica revolucionária de dissecção – um corte paralelo em nível da base do crânio – permitiu a Thomas Willis (1621-1675) fazer um estudo mais acurado sobre a circulação da base do crânio. Ele demonstrou a conexão entre a circulação carotídea e a vertebral (posteriormente conhecida como polígono de Willis). Esta nova informação foi imprescindível para entender esta sobreposição de sistemas arteriais na irrigação cerebral, podendo, então, compreender e esclarecer melhor algumas manifestações clínicas oriundas de déficits de irrigação. Willis foi o primeiro a utilizar o termo neurologia, em seu livro "A anatomia do cérebro e nervos" (FEINDEL, 1962; CAPLAN, 2000). Como médico e anatomista em Oxford, realizou dissecções e experimentos em peixes, anfíbios, répteis, aves, mamíferos e em seres humanos, e reuniu todas essas observações sobre anatomia e fisiologia, e sua contribuição foi notável ao dar a noção de sistema, nesse caso, sistema nervoso (BATES, 1965).

Contemporâneo de Willis, o médico e anatomista Franciscus Sylvius (1614-1672) descreveu o aqueduto cerebral (aqueduto de Sylvius), a cavidade do septo pelúcido e o sulco lateral do cérebro (sulco de Sylvius Félix Vicq d'Azyr (1748-1794) foi um expoente da sua época: médico e historiador, reformador social e anatomista. Em sua obra, ele enfatizou a importância das correlações anátomo-funcionais, pois era necessário integrar a função para estudar a forma, e vice-versa. Além disso, ele produziu um livro sobre a anatomia do cérebro, o qual continha ilustrações coloridas e descrições sobre diferentes seções cerebrais (em sua maioria no plano axial) (VAN GIJN, 2009). Sua principal contribuição foi a descrição anatômica da face medial do cérebro. Acompanhando essa mesma linha de abordagem, combinando anatomia e fisiologia, Luigio Rolando (1773-1831) foi pioneiro ao descrever a chamada Fissura de Rolando, um sulco localizado ao longo da região frontal e parietal (CAPUTI et al., 1995; PARENT, 2007).

Chegando à fase contemporânea, que marca o início do século XIX até os dias atuais, predomina a busca pela compreensão da capacidade cognitiva do cérebro. Franz Joseph Gall (1756-1828) afirmava que não existia uma função específica para uma área determinada, como afirmava Rolando. Franz defendia que a organização do comportamento podia ser observada através de características faciais externas. Ele acreditava que cada sentido correspondia a uma parte do cérebro e, ademais, o tamanho do osso subjacente era diretamente proporcional a importância desta função, bem como a personalidade do indivíduo (KARENBERG, 2009).

Apesar de muito lembrado pela frenologia, Franz Gall foi também um anatomista e descobridor renomado. Ele e seu aluno, Johann Gaspar Spurzheim, contribuíram com o avanço no

conhecimento de tratos nervosos, núcleos cranianos, decussação do trato piramidal e significado das comissuras. Além disso, considerava que o comportamento e a aptidão inatos estavam relacionados a regiões específicas, que poderiam ser grandes (hiperativas) ou pequenas (menos ativas ou ausentes). Ademais, Gall listou 27 traços de personalidade que, segundo ele, se referiam a áreas específicas do cérebro (WIJDICKS, 2019). A comunidade científica criticava essas ideias, que foram disseminadas até os experimentos do neurologista Jean Baptiste Bouillaud (1824-1880). Jean criou e apresentou uma de suas teorias a respeito da localização da fala na Sociedade de Antropologia Francesa, na qual Paul Broca (1824-1880) estava presente (ZOLA-MORGAN, 1995). Paul era antropologista, médico, cirurgião e anatomista, e em 1861 foi lembrado pelo seu relato de um dos casos mais famosos na neurociência: o do paciente Monsieur Leborgne (conhecido com Monsieur Tan), que estava sofrendo de diversos problemas neurológicos devido a um trauma frontal esquerdo. Ele não conseguia se comunicar; tudo o que conseguia dizer era “tan tan” (esse déficit hoje conhecido como afasia de Broca), daí como era conhecido no hospital onde esteve internado por pelo menos 21 anos. Apesar de não conseguir controlar sua fala, a expressão e inflexão da voz eram mantidas. Após a morte de Leborgne, Broca realizou autopsia, na qual observou uma expressiva deformação no lobo frontal, criando então a hipótese de que esta área teria grande relevância com a fala (GEORGETO et al., 2014).

Com a autópsia de um segundo paciente (Lazare Lelong, 84 anos) que não conseguia dizer mais que 5 palavras, Broca teve a confirmação ao ver a lesão numa localização semelhante à encontrada em Leborgne. No entanto, Broca só publicou sua descoberta em 1865, com base em mais de 25 casos estudados. Estes dois casos famosos dos senhores Leborgne e Lelong se tornaram a referência desta correlação entre a linguagem verbal expressa e o giro frontal inferior esquerdo, além de terem sido essenciais na fundamentação da neurofisiologia e neurociência cognitiva (DRONKERS et al., 2007). Os trabalhos de Broca inspiraram Charcot e Gower. Jean-Martin Charcot (1825-1893) era médico e cientista, e foi considerado um dos pais da neurologia moderna, além de precursor da psicanálise.

Em meados de 1870, os fisiologistas Gustav Fritsch e Eduard Hitzig estimularam eletricamente pequenas regiões cerebrais de cães acordados; detectaram a localização do córtex motor ao estimular regiões cerebrais distintas que acarretavam em contrações musculares na cabeça, pescoço, pernas anteriores ou posteriores destes animais. O impacto positivo desta descoberta inspirou o neurologista inglês, David Ferrier (1843-1928) à realização de novos experimentos utilizando a técnica de estimulação elétrica nos giros corticais expostos de cães e macacos. Seus trabalhos proporcionaram uma nova fase da neurociência (GUSMÃO; SILVEIRA; FILHO, 2000).

Os trabalhos que se seguiram tomaram por objeto de estudo a pesquisa pelas conexões entre as áreas cerebrais, em virtude de a topografia funcional não ser capaz de explicar incontáveis dados clínicos relatados. Alfred Campbel (1868-1937) elaborou um mapa com 17 campos citoarquitetônicos, associando-os com anatomia, patologia e fisiologia. Dessa maneira, nascia o pensamento hodológico, no qual Oskar (1870-1959) e Cecile Vogt (1875-1962) iniciaram um amplo trabalho, no que se refere às variações corticais mieloarquitetônicas das 43 áreas de Brodmann. Posteriormente, Georg Koskinas (1885-1975) e Costantin von Economo (1876-1931) retomaram o trabalho inacabado do casal Oskar, e reconstruíram um mapa com 107 áreas corticais (GEORGETO et al., 2016).

Karl Friedrich Burdach (1776-1847) foi o responsável pelo conceito de pluralidade funcional dada ao encéfalo, além de ter sido ele a padronizar a nomenclatura das descobertas anatômicas em latim. Esta modificação se tornou norma e, desde 1989, passou a ser usada pelo Comitê Internacional de Nomenclatura (MEYER, 1970).

Em 1956, Josef Klinger (1888-1963), que era técnico de anatomia em Basel, desenvolveu o método de fixação encefálica e técnica de dissecção que possibilitou a demonstração de diversas conexões encefálicas complexas por meio de feixes de fibras. Graças à nova técnica de extração dos encéfalos, poucas horas após a morte, ele introduziu o congelamento logo após a fixação pela formalina, permitindo, assim, o refinamento da dissecção de fibras, resultando em preparações anatômicas que trouxeram grandes possibilidades no estudo neuroanatômico. As contribuições de Klinger na identificação de fibras encefálicas foram significativas, principalmente a respeito do sistema límbico. Não obstante, através do conhecimento que fora adquirido por seu método, houve o desenvolvimento da cirurgia estereotáxica (HENSCHEN; KLINGER; RIECHERT, 1953), cirurgias para tratamento de epilepsia (KLINGER; GLOOR, 1960; GLOOR; FEINDEL, 1963), bem como novas estratégias neurocirúrgicas que revolucionaram o tratamento de lesões no parênquima cerebral (YASARGIL, 1994, 1999).

O início da fase conectiva funcional representou a necessidade de se estabelecer o elo entre hodologia, função e clínica. Com o tempo, apesar dos inúmeros avanços, as descrições anatômicas macroscópicas ainda deixavam lacunas no entendimento de disfunções neurológicas. Nesse contexto, no início do século XX, a abordagem neuropsicológica começou a ganhar espaço no meio científico. John Hughlings Jackson (1835-1911) foi um grande destaque dessa fase, e teve particular interesse na localização das epilepsias. Na época, acreditava-se que as crises parciais (chamadas até hoje de crises “jacksonianas”) se davam por um espasmo sanguí-

neo “reflexo”, ou seja, fibras nervosas que inervam os vasos sanguíneos, por ação reflexa, causariam o espasmo de vasos sanguíneos e, assim, a crise epiléptica (KURCGANT & PEREIRA, 2003).

Jackson associou preceitos evolucionários de Charles Robert Darwin (1809-1882) e fez uma observação inovadora sugerindo que, possivelmente, a causa seria por alguma região do cérebro que poderia estar “doente” (GEORGETO et al., 2016). Ele cria numa espécie de hierarquia do sistema nervoso, dividindo-o em centros nervosos superiores, médios e inferiores, que funcionariam como “máquinas sensório-motoras”. Sigmund Freud foi o primeiro a assumir a importância do pensamento de Jackson, ao utilizar em seu livro sobre a neurologia da afasia, a teoria sobre a hierarquia do sistema nervoso. Esse modelo proposto permitiu a muitos outros pesquisadores da época, como T. Ribot, P. Janet, T. Meynert, G. de Clérambault, H. Ey, além do já mencionado Freud. Esta abordagem teve grande importância pois permitiu maior liberdade para explorar e investigar não só o funcionamento cerebral, mas também a consciência e a memória (KURCGANT & PEREIRA, 2003).

Após a descoberta da radiação X através dos estudos de Wilhelm Konrad Roentgen (1845-1923; ANDERSON, 1999), em 1895, buscou-se investigar coordenadas para que identificassem estruturas encefálicas sobre as imagens radiológicas de crânio que passaram a ser obtidas. P. Marie, Foix e Bertrand, em 1915, durante a I Guerra Mundial, destacaram-se pelo estudo que fizeram em cadáveres, introduzindo hastes metálicas em perfurações cranianas nas áreas pretendidas e obtiveram imagens radiológicas. Após a aquisição das imagens, removeram os cérebros e estudaram os locais atingidos pelas hastes. Isto resultou no estudo chamado *“Relações radiográficas existentes entre os sulcos e giros cerebrais e suturas cranianas”* (RIBAS, 2006).

Diversos tratados e atlas clássicos se seguiram contendo ilustrações minuciosas relacionando as suturas cranianas com sulcos e giros cerebrais, tal como fizeram naquele trabalho de 1915. Algumas obras de destaque: O *Tratado de Anatomia Regional de Medicina e Cirurgia do Cérebro e da Medula Espinal* de Krause (1912), o *Tratado de Anatomia Topográfica* de Testut e Jacob (1932) e o *Atlas de Anatomia Humana Topográfica e Aplicada* de Pernkoff (1980), que foi publicado pela primeira vez em 1963. O cirurgião Victor Horsley (1857-1916), considerado o “Pai da Neurocirurgia”, realizou diversos trabalhos experimentais em animais de laboratório, destacando-se no desenvolvimento do método estereotáxico (1908), como pioneiro na estimulação cortical transoperatória dos giros pré e pós-central em seres humanos, bem como descreveu a localização do córtex motor anteriormente ao sulco central, em 1885 (RIBAS, 2006).

O termo estereotaxia (do grego *estereo*: espaço, e *taxia*: disposição, arranjo) foi pensado por ele juntamente com o matemático e engenheiro R. H. Clark, que trabalharam mutuamente para elaborar o método que possibilitaria a localização com base em coordenadas tridimensionais relacionadas com referências cranianas externas. O primeiro atlas sobre o assunto abordou temas referentes a crânios de macacos *Rhesus*. Com o desenvolvimento da pneumoencefalografia por Walter Dandy (1918), os conceitos e técnicas estereotáxicas foram mais bem elaborados para aplicação em seres humanos. E.A. Spiegel e H. T. Wycis desenvolveram o primeiro sistema de estereotaxia para seres humanos, em 1947. Anos mais tarde, eles publicaram o primeiro atlas de coordenadas estereotáxicas do encéfalo humano, utilizando seu próprio método para tratar epilepsia, dores crônicas, distúrbios do movimento e afecções psiquiátricas (RIBAS, 2006).

O norte-americano Harvey Cushing (1869-1939) foi o responsável por desenvolver os pilares da prática neurocirúrgica nos Estados Unidos, e suas observações sobre a anatomia topográfica e funcional do cérebro foram mais tarde confirmadas por Wilder Penfield (1891-1976) em seus estudos, que culminaram no conhecido mapeamento dos córtices motor e sensitivo em 1937 (RIBAS, 2006).

O estudo do neurônio, bem como a investigação de sua estrutura e função, foram dando origem, paulatinamente, à neurociência contemporânea, especialmente pelo advento dos exames de imagem. A neurociência moderna reúne todas as ferramentas e conhecimentos já disponíveis em diversas áreas do conhecimento, como física, biofísica, matemática e sistemas de informação. Os modelos neurofisiológicos e neuropsicológicos, embora fundamentais, ainda careciam de mais dados para formulação das hipóteses, e o avanço na metodologia de aquisição de imagens é, sem dúvida, um grande marco.

A partir da descoberta da tomografia computadorizada por G. Hounsfield e posterior desenvolvimento por volta dos anos 1975 (HOUNSFIELD, 1973), foi possível observar diretamente as estruturas encefálicas das lesões intracranianas, e isso proporcionou grande avanço na prática neurológica e neurocirúrgica. Aos cientistas Felix Bloch e Edward Purcell é atribuída a descoberta da ressonância magnética. Com o desenvolvimento dessa técnica, as imagens obtidas ofereciam uma riqueza no que se refere à definição anatômica superior às imagens de tomografia. Além dessa vantagem, a ressonância magnética proporcionou um método de estudo sobre fisiologia e fisiopatologia, estudos de difusão, de constituição bioquímica de lesões e, mais recentemente, o estudo de funções corticais (ressonância magnética funcional) e dos tratos encefálicos (neurotractografia por tensão de difusão).

Embora a tecnologia continue a favorecer a investigação neuroanatômica e neurofuncional, é nítida a riqueza que as imagens e ilustrações trouxeram ao estudo e ensino da anatomia. Nesse campo, Frank Henry Netter, artista e médico, largamente conhecido de médicos e outros profissionais da área médica de todo o mundo, teve grande destaque no século XX. Suas ilustrações eram distribuídas através de folderes ou cartões para os médicos, quando, em 1989, foi publicado seu *Atlas de Anatomia Humana* (NETTER, 2011). Suas ilustrações constituem um dos melhores exemplos de uso desta "ferramenta" para o ensino de conceitos, como o próprio Frank escreveu em 1949, "...o esclarecimento de um assunto é o objetivo de uma ilustração. Não importa o quanto é bela a ilustração, o quão delicado e sutil um assunto possa ser, mas tem pouco valor como *ilustração médica* se não se presta a esclarecer algum assunto médico" (MISULIS & HEAD, 2008). Cada vez mais contando com recursos como arte, fotografia, exames de imagem, a obra *Microneurosurgery*, de M. Gazi Yazargil recebeu grande destaque pela riqueza com a qual ilustra várias estruturas anatômicas voltadas à neurocirurgia (MOON; FILIS; COHEN, 2010). Também no século XX, tivemos o advento dos exames de imagem que possibilitaram a correlação entre anatomia topográfica e atividade em determinada função. Esta nova possibilidade de combinar diversas abordagens de análises estruturais, com análises funcionais, trouxe uma dimensão multimodal, conferindo mais possibilidades de interpretações sobre fisiopatologias.

Recentemente, em um vídeo publicado no canal oficial de sua equipe – *Neuroscience Research Australia* (NeuRA) – na plataforma YouTube, o neurocientista George Paxinos discute o mapeamento encefálico em 3D e revela a descoberta de uma nova estrutura: o "núcleo endorestiforme", localizado dentro do pedúnculo cerebelar inferior (também conhecido como corpo restiforme). Essa estrutura não foi encontrada nem em macacos *Rhesus*, nem em saguis analisados, sugerindo que esse núcleo possa contribuir para um controle motor fino. Paxinos confirmou a existência desta estrutura enquanto usava uma técnica de coloração cerebral que desenvolveu para tornar imagens dos tecidos cerebrais mais claras, o que tornou esse núcleo mais evidente por sua densa coloração e também porque as áreas circundantes são negativas (PAXINOS, 2018).

Por fim, o famoso trecho da carta de Isaac Newton para Robert Hooke, em 5 de fevereiro de 1676, dizia que "Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes". Este breve histórico é uma inspiração e também uma homenagem ao trabalho incansável e instigante de todos os estudiosos – da Antiguidade aos dias atuais – que buscaram/buscam desvendar a neuroanatomia e neurofisiologia, que são as bases para compreender os mecanismos de funcionamento encefálico, bem como as patologias a ele inerentes.

1.2 O estudo da emoção sob a perspectiva neurocientífica

Emoções e sentimentos são conceitos diferentes: enquanto o primeiro refere-se a ações orquestradas pelo cérebro, que atuam gerenciando alterações em todo o corpo, sentimentos são, por definição, a experiência mental daquele conjunto de alterações que está ocorrendo internamente. Não temos controle volitivo das emoções: diante de um estímulo externo ou interno, a emoção surge automaticamente e vem associada a uma escala de valência, na qual um estímulo positivo gera um comportamento de aproximação, enquanto o estímulo negativo gera um comportamento de afastamento. Sentimentos são, portanto, a percepção consciente e parcial de emoções, e esta diferença é neuroanatômica e fisiológica, já que se consideram circuitos cerebrais distintos para cada uma dessas funções (DAMÁSIO et al., 2000).

Muito embora o tema tenha sido explanado sob diferentes aspectos desde a Antiguidade, aqui foi dedicado como ponto inicial da história, o caso de Phineas Gage, pois dada a descrição do que lhe ocorreu há quase 172 anos, é que foi impulsionada a elucidação das bases neurais das emoções.

"*Gage já não era Gage*", diziam seus amigos após o acidente em 13 de setembro de 1848, que se tornou um caso clássico dos livros-texto de neurologia. A barra de ferro com 3 cm de diâmetro e 109 cm de comprimento, entrou pela bochecha esquerda de Phineas P. Gage, atravessou a parte frontal do cérebro e saiu pela parte superior do crânio, do lado oposto. Após perder a consciência momentaneamente, teve crises convulsivas e foi atendido pelo médico John Harlow. Indo além de todas as expectativas, Gage sobreviveu: com funções cognitivas preservadas, estava apto a novos aprendizados, com memória intacta, fala e movimento mantidos; porém, os sinais de uma drástica mudança em sua personalidade começaram a surgir ainda em sua convalescença (DAMÁSIO et al., 1994).

Quem era Phineas Gage antes do acidente, e qual a importância do seu caso no estudo das emoções? Os relatos falam sobre um homem responsável, inteligente, querido por colegas e idosos. Passados alguns meses do seu acidente, ele se tornou uma pessoa desrespeitosa e grosseira, sem demonstrar qualquer respeito pelas convenções sociais e bastante irresponsável –morreu em 1861, sem dinheiro e epiléptico. Após 20 anos do seu acidente, os recursos da neuropsicologia experimental ainda eram limitados, então Harlow correlacionou as evidências

perceptíveis da mudança comportamental de Gage com a lesão na região frontal, e seu caso foi tão extraordinário por levar a hipótese de que algumas estruturas no cérebro poderiam ser responsáveis pelo raciocínio moral e comportamento social, mas pela falta de autópsia e mais evidências anatômicas sobre a área da lesão, na época o caso não recebeu a mesma relevância científica como os contemporâneos Broca e Wernicke (DAMÁSIO et al., 1994).

Harlow soube da morte de Gage decorridos 5 anos, então insistiu junto à família para que fizessem a exumação do corpo, assim o crânio poderia ser mantido como um registro médico. Pelo empenho de John Harlow, que coletou informações com parentes e amigos de Gage, esse caso histórico foi registrado em dois artigos: "*Passagem de uma Barra de Ferro Pela Cabeça*" (1948) e "*Recuperação da Passagem de uma Barra de Ferro Pela Cabeça*" (1868). O crânio e a barra de ferro (que havia sido enterrado ao lado de Gage) hoje se encontram no Museu Médico Anatômico Warren da Universidade de Harvard e representa o marco histórico da investigação a respeito das bases biológicas do comportamento (DAMÁSIO et al., 1994; SABBATINI, 1997).

Várias teorias foram propostas desde então, buscando qual região do cérebro estaria envolvida na elaboração das emoções, e também compreender qual sua importância biológica. Charles Robert Darwin (1809-1882), em sua obra "*The Expression of the Emotion in Man and Animals*" (1872), abordou princípios gerais da expressão, como os meios de expressão nos animais, expressões especiais de animais e do Homem (choro e sofrimento; desânimo, ansiedade, tristeza, abatimento, desespero; alegria, bom humor, amor, ternura, devoção; reflexão, meditação, mau humor, determinação; ódio e raiva; desprezo, nojo, culpa, orgulho, desamparo, paciência, afirmação, negação; surpresa, espanto, medo, horror; preocupação, vergonha, timidez, modéstia) (CASTILHO, 2010). Segundo Darwin, a expressão das emoções tanto em animais quanto em seres humanos decorria de mecanismos evolutivos – seleção natural. Outro grande pensador da época foi William James (1869-1910); filósofo e psicólogo americano, foi considerado o "pai da psicologia" na América. James trabalhou independentemente com o neurologista e psicólogo dinamarquês Carl Lange (1834-1900) em uma teoria que explicasse a origem das emoções, que ficou conhecida como a teoria James-Lange.

O artigo *"What is an Emotion?"* (1884), marca a busca por trazer a psicologia ao campo das discussões científicas da época. James defendeu a hipótese de que "*as mudanças corporais seguem diretamente a PERCEPÇÃO do fato excitante, e que a nossa percepção dessas mesmas mudanças assim que elas ocorrem É a emoção"*, e trouxe para o cerne dos avanços da época sobre neuroanatomia e fisiologia que,

> É claro que a questão fisiológica surge: como as mudanças são sentidas? **Depois** de produzidas, através dos nervos sensoriais dos órgãos trazendo para o cérebro um relatório das alterações que ocorreram? Ou **antes** de serem produzidas, através de nossa consciência das correntes nervosas que saem em seu caminho descendente para as partes que estão para excitar? (JAMES, 1884)

Algumas limitações sobre esta perspectiva de James decorrem do fato de que ele tratou o processo da emoção como algo mais inerente ao corpo e trouxe menos questionamentos sobre o possível papel da emoção no âmbito da cognição e comportamento (JAMES, 1884).

Em discordância com a teoria de James-Lange, a Teoria da Emoção de Cannon-Bard (1927), desenvolvida pelos fisiologistas Walter Cannon (1871-1945) e Phillip Bard (1898-1977), propôs que a informação sobre o estímulo emocional entra no cérebro através do tálamo e dele seguiria por duas vias: córtex cerebral (cognição) ou para a amígdala e hipotálamo, que causariam as reações no corpo (RATEY, 2002). Cannon pesquisava sobre a resposta fisiológica do corpo mediante a uma situação que precisasse de grande energia, a "reação de emergência", sendo essa resposta adaptativa e mediada pelo sistema nervoso simpático (SNS). Para Cannon, a resposta para o mecanismo da emoção estava unicamente no cérebro e seria um processo independente da interpretação da mente a respeito do que estava acontecendo no corpo, conforme James acreditava (LEDOUX, 1996).

Na década de 60, Stanley Schacter e Jerome Singer conduziram uma série de experimentos com grupos de pessoas para elucidar como elas explicariam as mudanças fisiológicas sentidas. Os participantes eram informados que receberiam uma nova droga para testar a visão; porém, sem que soubessem, recebiam injeção de adrenalina ou placebo. Eles deveriam ficar numa sala com o assistente de laboratório que, como parte do protocolo, estaria eufórico ou irritado. As pessoas submetidas ao teste relataram que se sentiram felizes ou com raiva, dependendo do ambiente criado pelo assistente. Mediante os resultados, observaram que quando uma emoção é sentida, a pessoa busca as respostas no contexto ambiental imediato. A teoria Schater-Singer sugeria que, mediante um estímulo do ambiente, o cérebro receberia esse feedback por meio da excitação fisiológica do corpo e passaria então a avaliar/interpretar/decidir qual emoção estaria ocorrendo (RATEY, 2001).

Em 1937, Heinrich Kluver e Paul Bucy descobriram e descreveram as alterações importantes que ocorreram no comportamento de macacos após seus experimentos de lobectomia bilateral. O comportamento resultante foi denominado como síndrome de "Kluver-Bucy", caracterizada por "agnosia" visual, exacerbação de comportamento oral, hiperfagia, hipermetamorfose, comportamento sexual sobreabundante e perda da agressividade e medo (SANVITO

et al., 1982). Dessa forma, consideraram o complexo amigdaloide como centro da emoção. James Wenceslaus Papez (1883-1958) propôs, no mesmo ano, que o tálamo divide a informação através de dois circuitos: um responsável pela resposta cognitiva e outro pelas reações excitatórias fisiológicas (RATEY, 2001). O circuito de James Papez fazia a interligação do hipocampo, núcleos mamilares, núcleos talâmicos anteriores e giro do cíngulo, e propunha o hipotálamo como estrutura-chave da expressão emocional.

O neurocientista canadense Haldor Enger Rosvold (1916-1997) descobriu, junto com seus colaboradores (1954), que o comportamento social de macacos *Rhesus* (dominância social) era reduzido com a remoção dos complexos amigdaloides. Pierre Paul Broca, neurologista francês (já citado), foi pioneiro no mapeamento das funções cerebrais com base nas observações de seus pacientes com dano na região medial, e deu o nome desta área de "*grand lobe limbique*", devido ao formato semelhante a uma borda (*limbus* em latim; PESSOA & HOF, 2015).

Dessa maneira, a retomada do termo criado por Broca para descrever esta área, somada às evidências experimentais sobre as estruturas propostas no circuito de Papez, o conceito de sistema límbico foi surgindo. Trata-se, então, de um circuito neuronal formado pelo hipotálamo, complexo amigdaloide, núcleos da base, área rostral do lobo frontal, cerebelo e septo (o hipocampo se insere por seu papel na consolidação da memória relacionada à emoção) que atua na organização das respostas emocionais e impulsos motivacionais (PAPEZ, 1937; COSENZA, 1990; DROR, 2001; PERGUER et al., 2006). Ressalta-se ao leitor, no entanto, que não há um consenso definitivo sobre todas as estruturas que participam deste sistema, visto que há outras aqui não mencionadas que possuem comunicação direta com os processos emocionais e respostas autonômicas. Neste ponto, farei uma pausa sobre este assunto para retomá-lo mais adiante, abrangendo mais especificamente as bases neurais aqui mencionadas, após a apresentação das principais teorias subsequentes, de acordo com a linha cronológica.

Paul MacLean (1913-2007), médico e neurocientista norte-americano, desenvolveu a teoria do "*cérebro trino*", que propõe que as três unidades distintas do cérebro se desenvolveriam em tempos evolutivos diferentes também. O cérebro reptiliano, mais primitivo, inicia o desenvolvimento ainda no útero e desempenha as funções mais básicas (como o controle da homeostase, respiração, ciclo de sono, etc.). A segunda parte é o cérebro emocional ou límbico: localizado no centro do Sistema Nervoso Central (SNC), engloba o controle de todas as emoções e inicia seu desenvolvimento a partir do nascimento do bebê. A terceira parte do chamado cérebro trino é a mais jovem: o cérebro racional ou neocortex. Abrangendo a maior parte de nosso córtex cerebral, coordena o planejamento, percebe tempo e contexto, antecipa ações, além

de ser capaz de inibir comportamentos inadequados: pondera e limita impulsos e comportamentos (VAN DER KOLK, 1994) no que se refere à região rostral do lobo frontal.

Para o neurocientista britânico Raymond Joseph Dolan, as emoções contribuem para a fixação de crenças pois, segundo ele, elas influenciam a cognição. Por meio da neuroimagem da atividade cerebral em tempo real, ele observou que as emoções funcionam como um sistema que sinaliza situações, contexto ou contingências, independentemente se são boas ou não. Através dessa sinalização, uma representação de valor é dada (emoções), culminando numa resposta (agir ou não) de acordo com o contexto. O contexto por sua vez, também pode influenciar a resposta, o pensamento e a capacidade de decisão (DOLAN, 2002).

A abordagem comportamental constitui um outro braço do estudo das emoções. Edmund Rolls (2014), psicólogo e neurocientista britânico da *University of Oxford*, investigou as emoções observáveis na recompensa e punição, de forma que, segundo este pesquisador, o reforço primário, que é capaz de potencializar o desempenho, foi geneticamente moldado mediante a seleção natural, para estimular a codificação de recompensas e punições primárias. Para Rolls, as emoções são estados extraídos e detectados; porém, não constituem resposta. Para ele, as estratégias comportamentais visam o alcance de objetivos, como a sobrevivência e a reprodução (ROLLS, 2014).

António Damásio (2018), neurocientista português da *University of South California*, estuda as emoções segundo a perspectiva de uma interação corpo-cérebro, por vias químicas e nervosas. A emoção seria, portanto, uma expressão mental do estado homeostático (DAMÁSIO, 2018). Joseph LeDoux (1949-), neurocientista da *New York University*, concentra sua pesquisa nos mecanismos cerebrais da memória e da emoção. Tem demonstrado o papel crucial da amígdala nas reações defensivas iniciadas por ameaças ambientais (LEDOUX, 2020).

Do que foi exposto até o momento a respeito do desenvolvimento do próprio conceito de emoção e as teorias sobre seu mecanismo, faz-se necessário a partir de agora ressaltar as bases neurais deste “sistema das emoções”, no qual cada componente interage de forma complexa e não-hierárquica, apesar de não estar completamente elucidado o seu funcionamento. Mais especificamente, darei ênfase ao que permeia o medo e a forma pela qual a resposta a esta emoção é elaborada por estas estruturas neurais, pois será o alicerce para abordar mais adiante os distúrbios deste sistema de forma mais fundamentada.

Responsável pelas funções essenciais que vão de detectar (até mesmo pelas expressões faciais), gerar e manter as emoções envolvidas com o medo, a amígdala também coordena as respostas apropriadas à ameaça e perigo. Como visto anteriormente (experimento de Kluver-

Bucy), a lesão desta estrutura causa perda da capacidade de reconhecer o medo, reduz a emocionalidade, ao passo que a estimulação produz um estado de vigilância e atenção aumentadas, bem como produz ansiedade e medo. Sabemos atualmente das projeções para o córtex que a amígdala envia, que contribuem para que haja o reconhecimento da experienciação do medo, bem como o processamento emocional a partir de processos cognitivos. No que diz respeito ao processamento das emoções, a amígdala está intimamente ligada ao hipotálamo que, desde o circuito proposto por Papez, apresenta-se como uma estrutura crucial neste processamento.

Como uma central que recebe informações de áreas distintas, a amígdala reúne todas as informações recebidas, por meio de conexões excitatórias e inibitórias, a partir de vias corticais e subcorticais, de todos os sistemas sensoriais. As vias sensoriais, visuais, auditivas, olfatórias, tátil e associadas à dor, chegam ao complexo amigdaloide por meio dos núcleos basolaterais (PHELPS & LEDOUX, 2005). Além disso, o núcleo lateral também é um importante núcleo de onde avia de saída de informações relativas às emoções inatas e respostas fisiológicas relacionadas às emoções se processa. Pela via amigdalofugal ventral, que é uma conexão eferente, é que ocorrem as manifestações das emoções percebidas pelo corpo, pela sua conexão aos núcleos do tronco encefálico relacionados com funções viscerais. A via amigdalofugal dorsal, também eferente, comunica-se com os núcleos septais, núcleo *accumbens*, núcleos hipotalâmicos e núcleos da habênula (BEAR et al., 2002; WILLIAMS et al., 2006).

Localizado acima da hipófise, no centro do diencéfalo, o hipotálamo controla a homeostase e também atua na elaboração de comportamentos, cuja finalidade primordial é a sobrevivência. Através das informações oriundas do hipocampo e do tálamo ventral, atua de forma a integrar e conduzir respostas do sistema nervoso autônomo e endócrino (CANNON & BRITTON, 1925). O hipotálamo se projeta, ainda, ao tronco encefálico, em especial para a estrutura denominada substância cinzenta periaquedutal (SCP), a qual, juntamente com o complexo amigdaloide, integram um sistema que atua em comportamentos do tipo defensivos, que promove luta, fuga, imobilidade defensiva (“congelamento”) e imobilidade tônica. Diferentemente da SCP, que mobiliza uma resposta rápida, mediante perigo imediato (como a ameaça de um predador próximo), o hipotálamo organiza estas respostas defensivas quando a ameaça está distante, e há, portanto, algum tempo para organizar a estratégia de defesa mais adequada para a situação. No segundo caso, o hipotálamo direciona o comportamento de fuga coordenado pela SCP, com a participação de outras estruturas importantes do tronco encefálico, com os colículos superiores (orientação), colículos inferiores (audição) e núcleos cuneiformes (locomoção) (BRANDÃO et al., 2003).

1.3 Estratégias de defesa

O trabalho pioneiro elaborado por Darwin a partir de suas observações sobre os comportamentos defensivos dos animais, permitiu que se estabelecesse um elo comparativo para o estudo das emoções e comportamentos humanos (DARWIN, 1872). Com relação ao comportamento de defesa, sabemos que, muito embora haja diferenças intrínsecas entre espécie e gênero animal, existe um padrão comportamental evocado, e este padrão de resposta será dependente da relação entre o nível e/ou distância da ameaça encontrada. Foi proposto por Blanchard & Blanchard (1988) que tais estratégias de defesa possuem, ainda, uma relação direta com estruturas neurais específicas que estariam envolvidas na organização destas respostas. Ainda de acordo com esses autores, os níveis de ameaça dividem-se em *potencial, distal* e *proximal*.

Quando a ameaça não se apresenta claramente no ambiente, é considerada como *potencial*. Situações que são potencialmente ameaçadoras incluem um ambiente em que não é possível identificar de forma precisa a ameaça (o ambiente pode causar este impacto caso seja desconhecido, ou com um nível de luminosidade que cause apreensão, como estar muito escuro ou muito claro). O animal então procura por vestígios que possam indicar a presença de um predador, tais como o odor, ruídos repentinos, movimento. Ora, sem que haja a identificação da fonte de ameaça, o comportamento emitido é a avaliação do risco predatório que, como o próprio nome indica, trata-se de um padrão comportamental altamente motivado em que o animal explora o ambiente com cautela, motivado a avaliar se há ou não perigo, ao mesmo tempo em que ele o evita. Uma característica importante é o fato de que, caso o animal encontre no ambiente um local de esconderijo, ou que facilite a fuga se necessário, existe a tendência de que ele fuja ou se esconda. No momento em que os sinais ou vestígios que poderiam indicar a presença de risco se findam, o animal emite um novo comportamento ao, finalmente, explorar a zona de perigo. Pelo fato de não ter certeza ainda se o local é seguro, o animal o explora com extrema lentidão e cautela, preferindo seguir pelas margens: inicialmente ele faz rápidas incursões com recuo igualmente rápidos, esticando o corpo para alcançar algum objeto que queira farejar, no intuito de verificar se é seguro. À medida em que ele prossegue explorando o ambiente, e os sinais ameaçadores continuam ausentes, as incursões são mais frequentes, enquanto que os recuos vão ficando mais esparsos, até que em dado momento o animal volta aos movimentos iniciais de quando não havia suspeita de perigo (BLANCHARD & BLANCHARD, 1988).

Agora, considerando outra possibilidade dentro do contexto mencionado anteriormente, numa situação em que não seja possível a fuga ou o esconderijo, a estratégia de defesa que pode melhor garantir a sobrevivência é a imobilidade defensiva (congelamento). Dessa forma, o animal pode ficar totalmente imóvel evitando riscos de ser identificado por um dado predador, ou fazer movimentos discretos com a cabeça, olhos e vibrissas (no intuito de avaliar minimamente o risco em seu entorno). Novamente, caso não haja mais indícios de ameaça, o animal retorna ao comportamento normal. Porém, vale ressaltar que os estímulos aversivos podem se alternar e se repetir, ou seja, podem ser de baixa predictibilidade. Portanto, cada vez que o estímulo ameaçador se repetir, o animal interromperá seu curso normal de comportamento, para dar lugar à avaliação de risco e/ou congelamento, e esse ciclo comportamental se repetirá por tempo indeterminado. Um dado importante e que será abordado com maior profundidade, posteriormente, é que este tipo de reação frente a estímulos ameaçadores com baixa predictibilidade é bastante similar à ansiedade (BLANCHARD & BLANCHARD, 1969; 1988). Se, por sua vez, o alvo ameaçador é encontrado, podem ocorrer dois tipos de comportamento: a fuga, o ataque defensivo ou ataque específico. A finalidade destes comportamentos é, sobretudo, a sobrevivência (BLANCHARD & BLANCHARD, 1987).

Uma vez que o estímulo aversivo (por exemplo, um predador) foi localizado, não faz mais sentido o repertório de comportamentos de aproximação cautelosa. Logo, o animal recorre a duas novas possibilidades: fuga ou congelamento. Não seria evolutivamente viável que, sabendo a localização de seu predador, o animal permanecesse explorando o ambiente, ou ainda, que se direcionasse até ele. Neste caso, para garantir sua sobrevivência, o animal fugirá caso tenha encontrado uma rota de fuga/esconderijo ou ficará imóvel caso a fuga não seja exequível no momento. Caso o predador esteja a uma distância considerável, ou seja, a um nível *distal*, o congelamento é uma estratégia de defesa eficaz, pois, assim, existe a possibilidade de que o indivíduo não seja visto e possa escapar assim que for mais seguro.

Por fim, o nível de ameaça *proximal* se dá, como o nome sugere, quando o predador está muito próximo ou em contato direto com sua presa. Nesta situação, a intensidade dos comportamentos de fuga é extrema ou imobilidade tônica, respectivamente, tal qual o contexto requer: não há mais tempo e distância hábeis para fugir de forma direcionada, orientada. As tentativas de fuga dar-se-ão de forma descontrolada, sem rota de fuga, com corridas e saltos intensos e não direcionados; pode haver, também, o confronto com o predador, com movimentos de luta defensiva; a postura também muda: o animal assume uma postura ameaçadora diante de seu predador e pode reagir com mordidas para defender-se. No caso da imobilidade tônica, eliciada, na maioria das vezes, pelo contado direto com o predador, o animal finge uma morte

aparente, estando atento a novas rotas de fuga, as quais , quão mais próximas se apresentem, mais curta se torna a duração da imobilidade Tônica (referências: Grupo de Leda Menescal-de-Oliveira).

A observação destes diferentes padrões comportamentais permitiu que fossem estabelecidas correlações com os comportamentos de ansiedade, medo e ataques de pânico. Ao longo de muitos anos, diversos pesquisadores vêm mostrando por meio de modelos etoexperimentais que avaliam comportamentos de defesa, tais como os de avaliação de risco, que são compatíveis com ansiedade, estimulados por situações potencialmente ameaçadoras como a percepção do odor de um predador. O conflito entre o aproximar-se ou evitar o estímulo aversivo, ocorre em estado afetivo similar ao de ansiedade. Ratos na presença de um predador real e próximo, evocam comportamentos de fuga ou de congelamento, representativos de medo ou pânico, onde a fuga passa a ser não orientada para a toca ou um local seguro, diferente do que ocorre quando a ansiedade prevalece: o animal foge de forma orientada para a toca/local seguro (BLANCHARD et al., 1993; BIAGIONI et al., 2016; COIMBRA et al., 2017; ULLAH et al., 2017; PASCHOALIN-MAURIN et al, 2018). Ademais, por meio de abordagem farmacológica, essa diferenciação também se estabelece. Trabalhos clássicos demonstraram que os comportamentos vistos em estado de medo (fuga e congelamento), relacionados com o pânico, foram sensíveis à imipramina (droga com efeito panicolítico); ao passo que os comportamentos de avaliação de risco, compatível com estado de ansiedade, foram revertidos por ansiolíticos clássicos, como os benzodiazepínicos (GRAY & MCNAUGHTON, 2000; BLANCHARD et al., 2001).

Uma parte considerável do que sabemos sobre as bases neurofuncionais das reações de defesa foi embasada em experimentos com animais de laboratório. Ranson e Magnoun (1933) fizeram a estimulação elétrica de áreas subcorticais de gatos anestesiados e observaram que isto causava salivação desses animais. Posteriormente, Hess e Brüger (1943) estimularam o hipotálamo medial de gatos, utilizando a mesma técnica; porém, com gatos acordados, e descreveram o que eles denominaram de “reação de defesa ativa”: os animais apresentaram piloereção, midríase, expunham garras e dentes, repertório este semelhante ao comportamento desencadeado em um contexto ameaçador como o encontro com um predador natural (GRAEFF & HETEM, 2004). Por volta dos anos 70-80, no Brasil, novas investigações foram feitas, e os dados obtidos sustentavam a ideia da existência de um sistema neural de aversão no sistema nervoso central, pois estímulos como choque, sons intensos ou mesmo estímulos ameaçadores, estas regiões eram acionadas e a resposta consistia em um repertório de comportamentos ligados à defesa. Assim como na estimulação do hipotálamo medial, a estimulação elétrica da substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPd) provocava a mesma reação de fuga ou de agressão defensiva.

Estas respostas incondicionadas de fuga/luta são associadas ao hipotálamo medial, e também ao complexo amigdaloide; estruturas estas que, quando estimuladas, causam esse padrão típico de resposta que consiste em atividade motora intensa que acompanha saltos, juntamente com alterações neurovegetativas, como o aumento da pressão arterial, da frequência cardíaca, da frequência respiratória, piloereção, micção, defecação e exoftalmia (BRANDÃO et al., 2003).

1.4 Substrato neural do comportamento defensivo

As evidências trazidas de estudos anatômicos e fisiológicos têm enriquecido o conhecimento sobre as estruturas que estão envolvidas no medo e na ansiedade, que são estados emocionais qualitativamente distintos. Tomados em conjunto, os dados obtidos com estudos em humanos e também em modelos animais, os autores demonstram a existência de um circuito neural único e integrado, que parte do sistema hipotalâmico e suas projeções aferentes e eferentes para outros sítios como o complexo amigdaloide, tálamo, SCP e sistema septo-hipocampal (CARVALHO-NETTO, 2009). Além dessas estruturas, há evidências que sustentam a participação do colículo superior e inferior neste sistema cerebral aversivo. O fato destas últimas serem estruturas que processam, integram e transmitem as informações do campo visual e auditivo, remete-nos às observações iniciais de Darwin ao relatar que os animais iniciavam as reações de defesa ao ver ou escutar sinais de ameaça. Ademais, o colículo inferior exerce uma estreita ligação anatômica com a SCP e com o complexo amigdaloide, bem como se mostra como uma estrutura sujeita à influência inibitória de mecanismos GABAérgicos, serotoninérgicos e opioidérgico, e influência excitatória causada pelo glutamato e aspartato (BRANDÃO, 2019).

1.5 Substância cinzenta periaquedutal

A SCP é uma região heterogênea no que se refere à constituição celular: ao longo de sua extensão, são encontrados variados tipos celulares e padrões de formas somáticas sem orientação específica (BEHBEHANI, 1995). Inicialmente, acreditava-se que sua estrutura consistia

em porções dorsal e ventral (CONTI et al., 1988) e, posteriormente, por meio de diferentes abordagens de neurotraçamento, foi possível observar com melhor distinção sua morfologia, ajudando a explicar a forma como a SCP integra suas funções. Um dado interessante é que esta estrutura aparece de forma semelhante em todos os mamíferos (Figura 1), e sua morfologia, função, densidade e volume são entre primatas, felinos e roedores, de forma geral (SILVA & MCNAUGHTON, 2019). Essas estruturas análogas à SCP mantêm padrões semelhantes de expressão de RNAm e proteína, fato que denota a importância desta estrutura que se manteve altamente conservada entre diferentes vertebrados durante a evolução (O'CONNELL & HOFMANN, 2012).

A SCP forma uma espécie de círculo de matéria cinza, junto com o núcleo dorsal da rafe, que circunda o aqueduto cerebral, como visto na figura 2, que mostra a divisão dessa estrutura em mamíferos. A maior densidade de células gliais encontradas na SCP está na porção mais rostral, que vai diminuindo de forma gradual em direção à porção mais ventral e caudal (BEITZ, 1985). A forma convencional de divisão desta região foi feita por meio de dados anatômicos, funcionais e bioquímicos, caracterizando-a em colunas dorsomedial (SCPdm), dorsolateral (SCPdl), lateral (SCPl) e ventrolateral (SCPvl), esquematizada na figura 2 (BANDLER et al., 1991). Comumente, utiliza-se a simplificação "SCP dorsal" (SCPd) para se referir às colunas dorsomedial e dorsolateral, pois estas compartilham de propriedades comuns.

Com relação às conexões aferentes da SCP, ela recebe projeções do córtex frontal, temporal (o núcleo central do complexo amigdaloide é a única região do complexo amigdaloide que se projeta para a SCP) (PETROVICH et al., 1996), hipotálamo (a fonte mais densa de projeção para a região periaquedutal provém das regiões diencefálicas e, dentre elas, as áreas hipotalâmicas são as principais contribuintes) (MARCHAND & HAGINO, 1983; ULLAH et al., 2017), e outras regiões do mesencéfalo (SILVA & MCNAUGHTON, 2019; RIBEIRO et al., 2005).

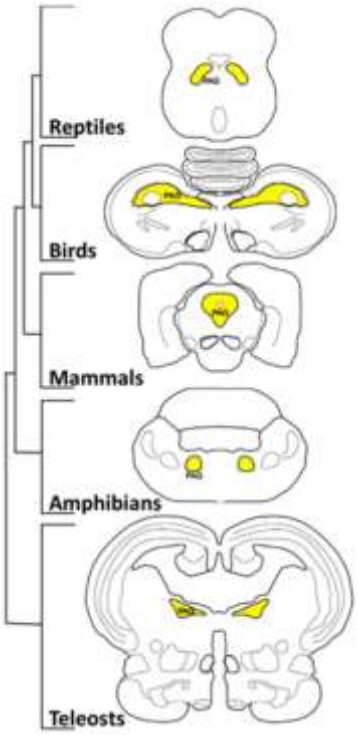

Figura 1. Substância Cinzenta Periaquedutal (amarelo) de diferentes vertebrados. SILVA & MCNAUGHTON, 2019.

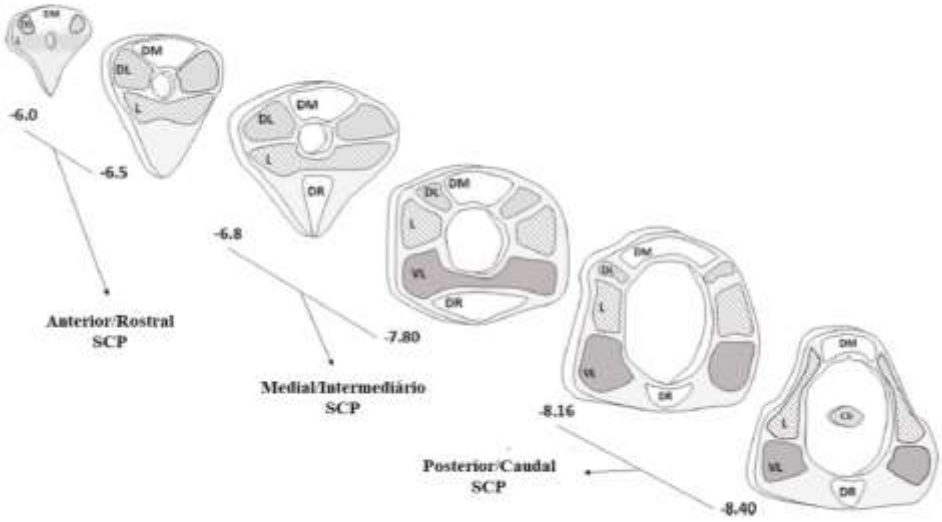

Figura 2. Divisão das colunas da SCP no eixo anterior-posterior (SILVA & MCNAUGHTON, 2019). Coordenadas aproximadas segundo o Bregma de ratos retiradas do atlas de Paxinos e Watson (PAXINOS & WATSON, 1998). DM: dorsomedial SCP; DL: dorsolateral SCP; L: lateral SCP; VL: ventrolateral SCP; DR: núcleo dorsal da rafe; CB: vermis cerebelar.

Com relação às projeções de saída, por meio do feixe periventricular, as colunas dorsais emitem projeções significativas para o tálamo, enquanto que as porções ventrais inervam o tálamo, hipotálamo, hipocampo e córtices frontais por duas vias distintas. Além disso, também envia projeções para outras estruturas do mesencéfalo, dentre as quais destaca-se o colículo inferior (CI), com o qual esta conexão ocorre reciprocamente (OSAKI et al., 2003). Por toda a região da SCP, ocorrem altas concentrações de diversos neurotransmissores, como a acetilcolina, histamina, serotonina, GABA, dopamina, aspartato, orexina, concentrações moderadas de alguns neuropeptídeos como encefalina, beta-endorfina, substância P, bombesina, angiotensina e P-lipotropina (EICHENBERGER et al., 2002; OSAKI et al., 2003; SILVA & MCNAUGHTON, 2019).

Está bem estabelecido na literatura que a principal função da SCP está relacionada com os comportamentos de fuga/luta/congelamento, o que é bastante coerente quando observamos que foi uma estrutura altamente conservada evolutivamente em diferentes espécies. Foi visto que as reações causadas quando esta estrutura foi estimulada eletricamente em seres humanos eram similares aos sintomas de pacientes que sofriam com ataques de pânico (NASHOLD et al., 1969). Ademais, verificou-se que pacientes com transtorno de pânico apresentaram anormalidades estruturais ou bioquímicas em estruturas mesencefálicas, incluindo a SCP (DEL-BEM & GRAEFF, 2009). Ainda em relação à função, há uma espécie de dicotomia entre as regiões dorsal e ventral da SCP, em que ressaltamos que a região dorsal atua mais nas respostas de comportamento social, comportamentos de medo e fuga, e ativação simpática, além de organizar uma antinocicepção serotoninérgica (COIMBRA et al., 1992); já a região ventral inibe o sistema simpático, atua na antinocicepção mediada por opioide e comportamento de ansiedade. Essa diferença na intensidade de respostas de fuga produzidas pela SCP foi discutida anteriormente, com base nos estudos de Blanchard & Blanchard (1988), dos quais podemos inferir que em um contexto de ameaça iminente, o padrão comportamental é organizado principalmente pela região dorsal. Num segundo contexto, onde a ameaça é remota, ou seja, o perigo é incerto, a resposta evocada é organizada prioritariamente por substratos superiores e a SCP não está (ou desempenha papel secundário) envolvida.

1.6 Núcleo central do colículo inferior

Localizado na superfície dorsal do mesencefálico caudal, o CI é uma das primeiras estruturas a receber as informações auditivas, juntamente com o núcleo do lemnisco lateral e as retransmite para o núcleo geniculado medial e deste ao córtex auditivo. A informação auditiva pode ser também proveniente principalmente de células glutamatérgicas das camadas V e VI do córtex auditivo que se projetam ipsilateralmente ao CI. As informações sobre frequência, intensidade, duração e localização de estímulos auditivos, permitem uma rica discriminação de fontes sonoras diferentes e, dessa forma, o CI integra esses estímulos e organiza uma resposta descendente frente a eles. No que se refere à constituição celular, a maioria das células que compõem o CI são glutamatérgicas, que atuam recebendo e integrando os sinais advindos principalmente do lemnisco lateral e do CI contralateral. Já a população de neurônios GABAérgicos são a minoria e inibem os neurônios do corpo geniculado medial e do CI contralateral (DRISCOLL & TADI, 2020).

O CI é dividido em três córtices: núcleo central, córtex dorsal e córtex externo, dos quais o dorsal e o externo constituem os principais locais de entrada não auditiva para o CI. A respeito destas informações não auditivas, tratam-se das informações que o CI envia e recebe do colículo superior, que correspondem a estímulos visuais, provavelmente para ajudar a mapear o local, somando-se às informações auditivas. As entradas auditivas e visuais são integradas às entradas somatossensoriais da medula espinal e de nervos cranianos, que parecem também colaborar para a orientação do corpo com relação ao som percebido. Um dado interessante é que o CI é capaz de filtrar os ruídos, identificando aqueles que não desempenham um papel importante (como os da mastigação e da respiração), daqueles que o tornam mais ativo, como sons emitidos de forma inesperada e alta, ou mesmo a comunicação de um membro da mesma espécie. Além disso, conforme o corpo muda de posição e se movimenta, a atividade do CI também se modifica, para buscar informações adicionais e discriminar com melhor refinamento entre os sons percebidos (GRUTERS & GROH, 2012; HURLEY & SULLIVAN, 2012; DRISCOLL & TADI, 2020).

O CI também tem sido implicado na elaboração de respostas defensivas, como outras estruturas já citadas do sistema encefálico de aversão. Diversos estudos utilizando animais de laboratório verificaram que a estimulação elétrica ou química do CI, ou mesmo o estímulo aversivo como a presença de um predador, produz um padrão de respostas defensivas, desencadeadas quando o animal sente medo, como o alerta defensivo, o congelamento e a fuga (BRANDÃO et al., 2001; TWARDOWSCHY & COIMBRA, 2015; CALVO et al., 2019; da SILVA SOARES et al., 2019). Além disso, essas respostas ocorriam juntamente com analgesia

e alterações autonômicas (aumento da pressão arterial, frequências cardíaca e respiratória) (BRANDÃO et al., 1993). De fato, o CI envia fibras para o núcleo geniculado medial do tálamo, hipotálamo, complexo amigdaloide e colículo superior, além de realizar conexões recíprocas com a SCPd, estruturas estas já bem estabelecidas na literatura como diretamente implicadas na elaboração do comportamento defensivo (LEDOUX et al., 1985, 1990; BEITZ, 1990; OSAKI et al., 2003).

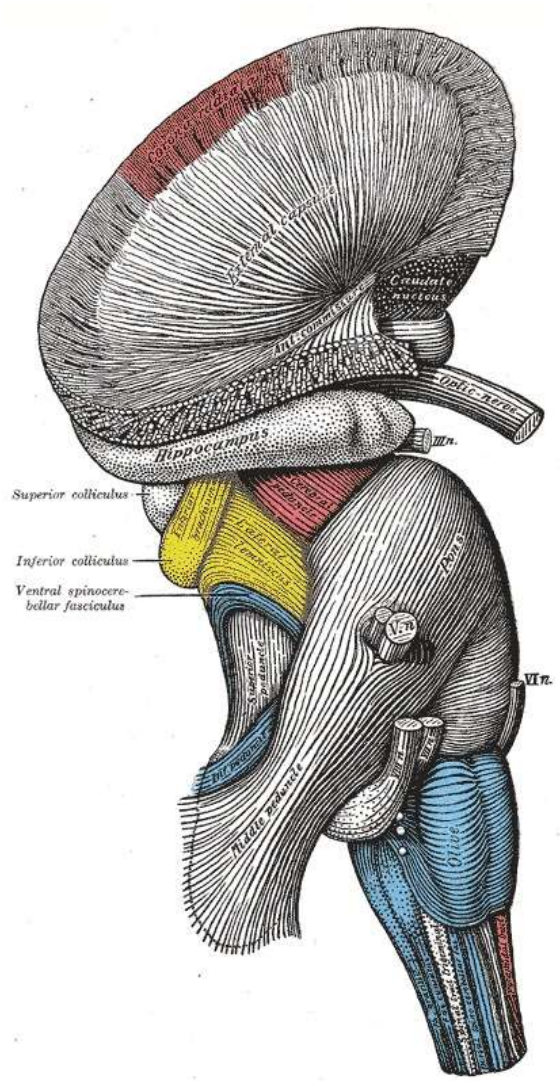

Figura 3. Dissecção superficial do tronco cerebral; Vista lateral, cápsula externa, hipocampo, colículo superior, **colículo inferior** (em amarelo), fascículo espinocerebelar ventral (Contribuição de Gray's Anatomy Plates – extraído e modificado por DRISCOLL & TADI, 2020).

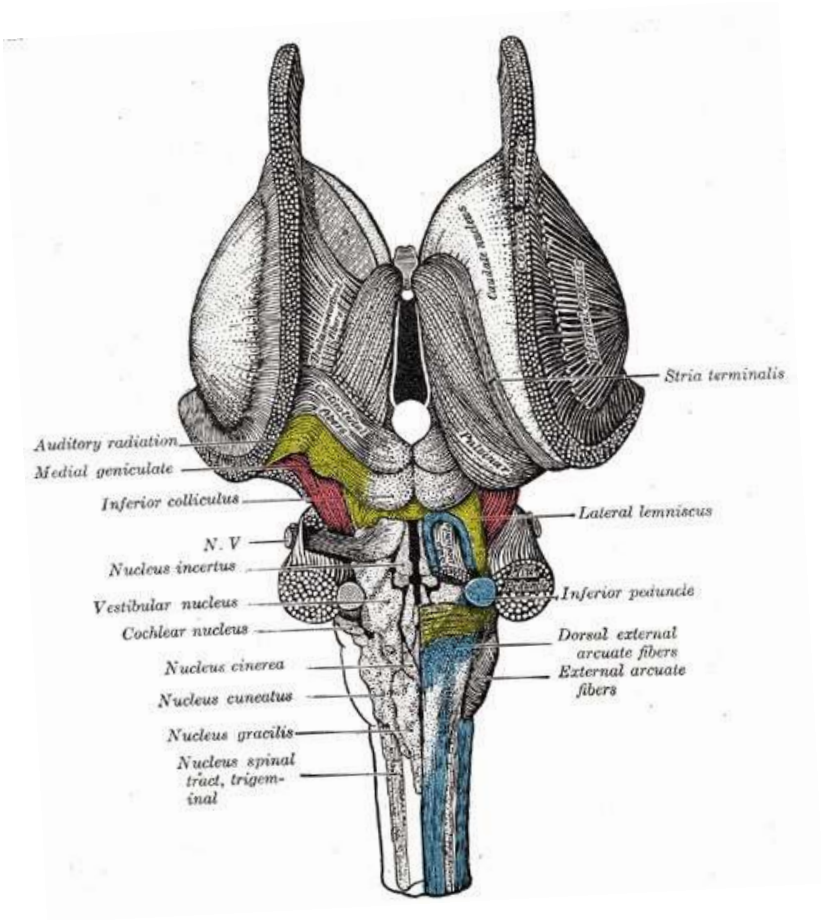

Figura 4. Dissecção do tronco cerebral; Vista dorsal, estria terminal, radiação auditiva, geniculado medial, **colículo inferior** (em destaque; Contribuição de Gray's Anatomy Plates – extraído e modificado por DRISCOLL & TADI, 2020).

1.7 Ansiedade sob as perspectivas fisiológica, clínica e experimental

O tema ansiedade tem ganhado grande repercussão nos últimos tempos, às vezes aplicado de forma errônea e generalista. Naturalmente, nosso corpo reage diante de algum estímulo desafiador com mudanças fisiológicas e comportamentais, que são geradas para nos preparar para responder de forma eficaz a este enfrentamento. Uma vez que a resposta ao desafio se conclui, fisiologicamente voltamos ao estado basal. Esta capacidade de resposta foi fundamental para garantir a sobrevivência dos nossos ancestrais, e foi-nos passada evolutivamente, já que aqueles que conseguiram obter sucesso contra as intempéries e predadores aos quais eram continuamente expostos, puderam sobreviver e passar estas características às próximas gerações.

Uma questão crucial neste tema é compreender que esta resposta tem um “teto”, e isto quer dizer que uma vez que este limite seja alcançado e ultrapassado, a capacidade de responder com sucesso ao estímulo passa a cair, como representado no gráfico da figura 5. Esse gráfico advém da teoria do U-invertido, que combina as teorias negativa e positiva, originalmente pensada por Yerkes e Dodson, em 1908 (BENSON, 2005). Esta relação sobre estresse (eixo x) e desempenho (eixo y) explica que, para alcançar um nível ótimo de desempenho, é necessário algum nível de estresse. Porém, o estresse abaixo ou acima do nível ótimo é prejudicial ao desempenho, tal qual ocorre quando estamos diante de um evento que nos causa ansiedade, quando então somos capazes de corresponder de forma eficiente e saudável até um determinado limite; porém, para alguns o nível de ansiedade torna-se tamanho que sequer as atividades cotidianas comumente realizadas outrora com facilidade, são conseguidas. Temos, a partir daí a ansiedade que determinamos como patológica.

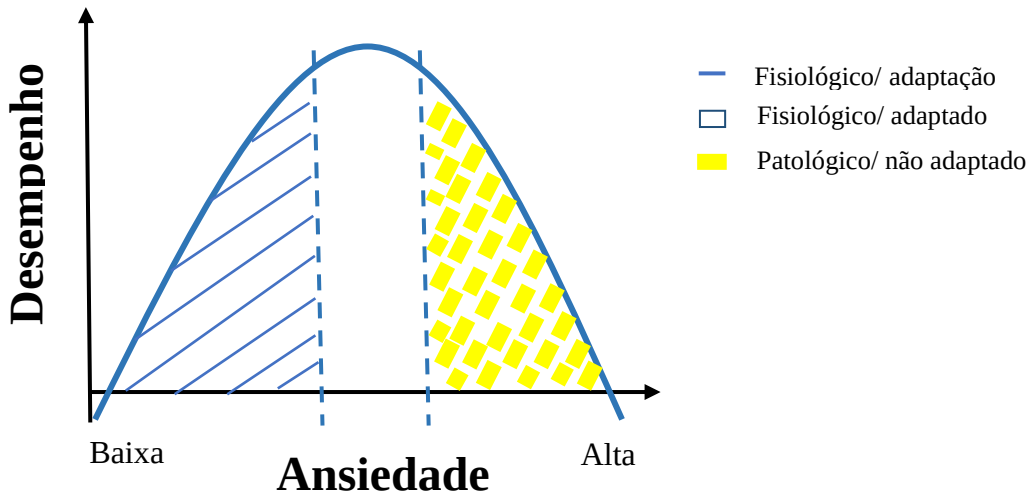

Figura 5. Lei de Yerkes-Dodson e a relação entre os níveis de ansiedade e a capacidade de desempenho.

Como visto no gráfico, diante de um desafio que se impõe, tanto o desempenho quanto o nível de ansiedade passam por mudanças, podendo ser adaptativas ou não. A ansiedade está sempre ligada ao medo/apreensão de um evento futuro e só será adaptativa e benéfica caso consigamos aumentar o nosso desempenho. Nos indivíduos em que a ansiedade gerada não foi adaptativa, há um padrão de sintomas que são comuns entre eles, como o medo excessivo, a esquiva de situações ou ambientes ameaçadores, além de sintomas físicos que refletem o estado

de alerta e medo, tal qual foi descrito em animais em um contexto desconhecido, que oferecia sinais de um perigo que não era claro. Uma característica marcante é a de que, para ser classificada como um transtorno de ansiedade, a resposta ocorre de forma desproporcional e é sustentada pelo risco ou pelo perigo real. Além disso, apresenta-se de forma constante e persistente (por pelo menos 6 meses), geralmente simultânea a prejuízos sociais, ocupacionais e físicos importantes, como descrito no Manual Diagnóstico e Estatístico de Distúrbios (DSM-5). Fisiologicamente, o medo ocorre ao perceber uma ameaça ou perigo iminente, e a ansiedade surge quando nosso corpo se antecipa para responder adequadamente caso seja necessário (CRASKE et al., 2009).

Sob a perspectiva clínica, então, temos que os transtornos de ansiedade constituem um grupo de distúrbios que têm em comum o medo excessivo, ansiedade ou fuga/esquiva excessiva de estímulos externos e internos. É visto que o início destes sintomas começa na infância e podem ser altamente incapacitantes. O tratamento precisa ocorrer ao longo da vida, pois estes distúrbios tendem a ser crônicos; apesar disto, respondem bem à associação de terapia cognitiva comportamental e à abordagem farmacológica. A investigação científica tem procurado entender o mecanismo pelo qual estes distúrbios ocorrem, bem como o tratamento mais adequado (CRASKE & STEIN, 2016).

O impacto causado pelos transtornos da ansiedade é maciço. Por meio de pesquisas epidemiológicas, foi visto que pelo menos um terço da população é afetada por um transtorno de ansiedade no decorrer da vida, além desse transtorno ser mais prevalente em mulheres. Esses distúrbios estão associados a um elevado grau de comprometimento, elevada utilização e ônus a serviços de saúde e, além disso, ônus econômico para a sociedade. Apesar disto, ainda são muitos os casos que não entram na estatística pelo fato de os indivíduos afetados não procurarem assistência médica ou, ainda, não obterem um diagnóstico adequado. Os estudos epidemiológicos mostraram, ainda, que ocorre uma alta comorbidade entre os transtornos de ansiedade e outros transtornos mentais, e enquadra-se dentre um conjunto de outros fatores de risco mais associados ao suicídio, o que torna evidente a importância de investimento em pesquisa e assistência para entender a etiologia desse distúrbio (BANDELOW & MICHAELIS, 2015; BACHMANN, 2018).

Ainda que a percepção subjetiva da ansiedade possa ocorrer de forma diferente entre animais e seres humanos, no contexto fisiológico e comportamental, estas reações parecem ser correspondentes entre as espécies, havendo também componentes neurais que organizam esses comportamentos de defesa de forma similar. Especialmente pelo fato dessa correspondência ser ainda mais presente entre mamíferos é que muitos modelos animais de ansiedade são utilizados

para investigação pré-clínica de novas drogas, bem como a investigação e teste de hipóteses fisiopatológicas relacionadas a esse distúrbio.

Para o estudo dos comportamentos defensivos comumente vistos em transtornos de ansiedade, duas abordagens podem ser utilizadas, no que se refere ao tipo de estímulo: o medo inato ou o condicionamento clássico. Dessa forma, um rato de laboratório, por exemplo, sem nunca ter tido contato com um predador natural, como o gato ou a serpente, será capaz de reconhecer a presença de perigo ao detectar o odor destes animais e, por conseguinte, irá deflagrar reações de defesa sem a necessidade de aprendizado. Por outro lado, por meio do condicionamento clássico, é possível ensinar aos animais o medo de algo que antes não representava um estímulo aversivo. Um exemplo seria associar um som ou luz de baixa intensidade (estímulo inócuo) com a presença de um predador (estímulo aversivo), assim, o som e a luz utilizados neste exemplo, tornam-se estímulos aversivos também, e os ratos apresentarão reações defensivas condicionadas. Portanto, o objetivo comum destas duas abordagens é permitir seu uso em laboratório, de forma que o animal possa sinalizar e antecipar o perigo potencial no ambiente e, assim, seja desencadeada a resposta de defesa compatível. Com base nesses fatores são elaboradas medidas de ansiedade que são capazes de corresponder com as medidas de ansiedade em seres humanos (PAVLOV, 1927; TREIT, 1985; CRUZ & LANDEIRA-FERNADEZ, 2012).

Um outro exemplo de abordagem experimental é a estimulação elétrica da substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPd) como modelo experimental de ataques de pânico. Em 1969, Nashold et al. haviam relatado que a estimulação desta área em seres humanos causou uma série de reações muito semelhantes ao que é vivenciado em um ataque de pânico, tais como a dor no peito, sensação de sufocamento, náuseas, sensação de pavor e/ou morte iminentes. Ao estimular essa mesma estrutura em ratos, de forma gradual, foi vista a resposta de alerta defensivo, de congelamento e, com o aumento da estimulação, uma intensa resposta de fuga, com corridas e saltos (COIMBRA & BRANDÃO, 1993; JENCK et al., 1995; SCHENBERG et al., 2001), e estas reações cessam a partir do momento em que são interrompidos os estímulos elétricos. Visto que a SCPd e o CI são estruturas envolvidas nas reações de medo e estão no cerne das investigações sobre as bases neurais do transtorno do pânico, serão abordados mais profundamente a seguir os sistemas de transmissão que atuam na modulação dessas duas estruturas e, por conseguinte, nas respostas elaboradas pelas mesmas.

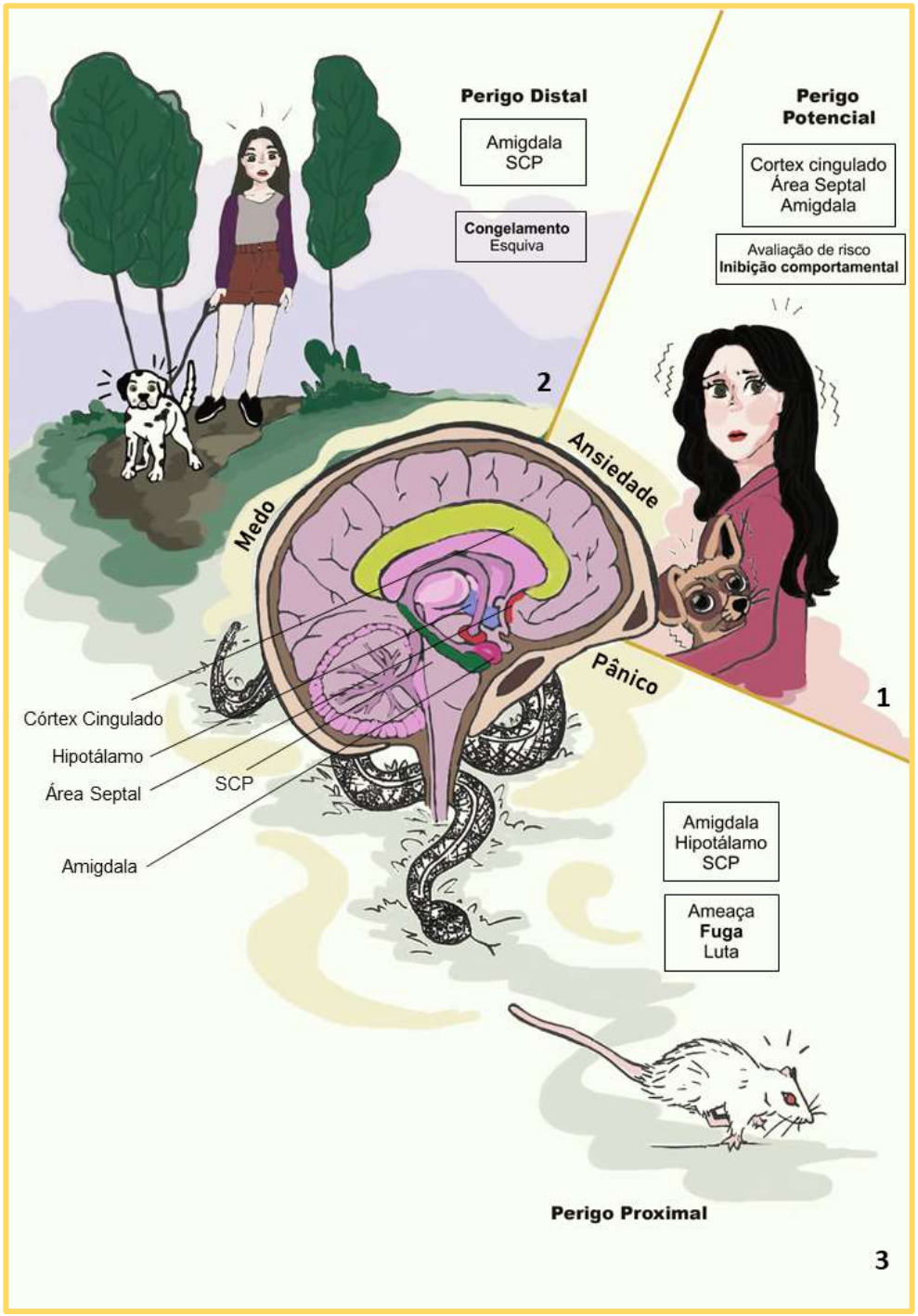

Figura 6. Relação entre as estratégias de defesa, emoções e o respectivo substrato neural. Nos quadros de 1-3, temos que, em (1) a ansiedade é a emoção predominante quando o contexto trata-se de um perigo potencial; em (2) predomina o medo, uma vez que o perigo é distal; em (3) a emoção predominante é o pânico, pois o perigo encontra-se proximal. As estratégias de defesa para cada situação estão nos respectivos quadros. Ao centro, estão esquematizadas o principal substrato neural das emoções em geral, e que participam no reconhecimento e elaboração das reações defensivas (Figura da autora).

1.8 Sistemas opioidérgico e GABAérgico na modulação das respostas defensivas

São denominados opioides os compostos que, de forma geral, são relacionados ao ópio; podem ser endógenos ou sintéticos. Os receptores endógenos consistem em três tipos: **μ, k e δ** (GUSTEIN & AKIL, 2005); são do tipo metabotrópico, ou seja, acoplados à proteína G, que atuam diminuindo a síntese do segundo mensageiro (AMPc). Estes receptores facilitam a abertura dos canais de potássio, o que gera hiperpolarização, e inibem a abertura dos canais de cálcio, o que impede a liberação do transmissor (RANG et al., 2007). Quando um ligante (endógeno ou exógeno) se acopla a um receptor opioide, uma gama de efeitos pode ocorrer, desde a analgesia, euforia, liberação de hormônios, depressão respiratória, assim como efeitos relacionados à ansiedade (WALDHOER et al., 2004). A capacidade modulatória exercida por mecanismos opioides no teto mesencefálico tem sido investigada para elucidar o nível de influência deste sistema com os transtornos de ansiedade, bem como a forma como estão organizadas estas redes neurais (EICHEINBERGER et al., 2002; OSAKI et al., 2003). Com relação aos diversos efeitos analgésicos e adversos dos opioides, acredita-se que eles ocorram por meio do receptor μ, e a morfina constitui o seu principal agonista (RANG et al., 2007).

Já está bem estabelecido que a estimulação elétrica ou química de estruturas mesencefálicas, como a SCPd, camadas profundas do colículo superior (cpCS) e núcleo central do colículo inferior (NCCI), eliciam comportamentos de defesa simultaneamente com reações autonômicas. Outra observação é a de que a microinjeção de baixas doses de morfina nessas estruturas é capaz de atenuar estas respostas, e em doses altas ela desempenha um perfil pró-aversivo (BRANDÃO et al., 1985, 1990; JENCK et al., 1986). Ademais, foi visto por Coimbra et al. (1996) que a administração intraperitoneal (IP) de antagonistas opioides não seletivos, como a naltrexona e a naloxona, atenua as respostas aversivas eliciadas pela estimulação elétrica da SCPd ou do colículo superior (CS), reforçando a hipótese de que os mecanismos opioides podem estar envolvidos no controle destas reações defensivas. Posteriormente, essa hipótese foi corroborada, demonstrando que o bloqueio de receptores opioides, tanto por antagonistas opioides não seletivos (naltrexona e naloxona), quanto por antagonista seletivo de receptor μ_1 (naloxonazina), administrados perifericamente e centralmente, causaram aumento significativo no limiar do comportamento de defesa eliciado pela estimulação elétrica do CI, num claro efeito antiaversivo (COIMBRA et al., 2000). A SCPd, as cpCS e o NCCI sabidamente participam da organização do repertório comportamental evocado através de estímulos aversivos; todavia,

essas evidências apontam para uma possível participação do sistema opioide na modulação desses comportamentos.

Esse efeito promovido por antagonistas opioides, no entanto, parecem depender do tipo de receptor com o qual se ligam. O fato de o pré-tratamento com baixas doses de morfina ter efeito panicolítico e, ao contrário, altas doses de morfina no CI culminarem em reações pró-aversivas que não são revertidas por antagonistas opioides, sugere que o mecanismo opioide exerce um controle inibitório sobre estruturas que controlam estas respostas de defesa. Além disso, a morfina tem maior afinidade pelo receptor μ do que pelo kappa (k), e o CI possui alta concentração de μ e moderada concentração de k, sendo que os efeitos antiaversivos parecem estar relacionados com o receptor μ, ao passo que os efeitos panicogênicos surgem por ativação de receptores k (MARTIN, 1983; JENK et al., 1983; MANSOUR et al., 1988; CARDOSO et al., 1992; MOTTA & BRANDÃO, 1993; NOBRE et al., 2000).

Outro sistema que está envolvido na modulação das respostas de medo e pânico é o sistema GABAérgico, cujo principal e mais distribuído neurotransmissor inibitório no sistema nervoso central é o ácido γ–aminobutírico (GABA) (BLOOM, 1996; KORPI et al., 2002). O GABA é formado através da descarboxilação do L-glutamato pela enzima glutamato-descarboxilase (GAD) e seu catabolismo é promovido pela enzima GABA-transaminase (GABA-T), num processo de transaminação em semialdeído succínico (TREVOR, 1998; STAHL, 2002).

Existem três tipos de receptores GABAérgicos (GABA-A, GABA-B e GABA-C) e os efeitos mais estudados ocorrem por meio dos receptores do tipo A e do tipo B, sendo que o primeiro aumenta a condutância de cloro nos neurônios, e o segundo atua via proteína G, aumentando a condutância de potássio. Os receptores do tipo A são constituídos por uma proteína transmembrana formada por um conjunto de cinco subunidades que se agrupam em torno de um poro central (duas unidades α 1, duas β 2 e uma γ 2). Quando o GABA se liga ao seu receptor do tipo A, exerce rapidamente sua ação inibitória: ocorre mudança conformacional que acarreta na abertura dos poros, havendo, por conseguinte, entrada de íons cloreto. Este receptor também é alvo de benzodiazepínicos, barbitúricos, esteroides neuroativos e agentes anticonvulsivos diversos (CHEBIB & JOHNSTON, 1999; ZWANZGER & RUPPRECHT, 2005).

São consideráveis as evidências de que a disfunção dos receptores $GABA_A$ e/ou um desequilíbrio na concentração de GABA no SNC tenham um papel crítico na fisiopatologia do transtorno de pânico. Uma evidência disso é que o aumento da concentração de GABA pela administração de vigabatrina (que inibe irreversivelmente a GABA transaminase, aumentando a disponibilidade de GABA no SNC) ou de tiagabina (que bloqueia especificamente transportadores de GABA), promoveu efeito ansiolítico no pânico induzido experimentalmente

(ZWANZGER & RUPPRECHT, 2005). Em experimentos pré-clínicos, foi mostrado que microinjeção de bicuculina, um antagonista seletivo de receptor GABAérgico do tipo A, em estruturas do teto mesencefálico causa reações defensivas intensas. Estas reações são atenuadas com a ação de antagonistas opioides e, além disso, evidências imuno-histoquímicas revelaram que, de fato, o mesencéfalo dorsal é rico em neurônios contendo beta-endorfina e fibras com varicosidades positivas para opioides endógenos, sugerindo a presença de sinapse local. Outrossim, Eichenberger et al. (2002) evidenciaram que, além de evidências psicofarmacológicas do efeito panicolítico de antagonistas opioides, há uma base neuroanatômica que reforça a hipótese de interação entre estes mecanismos, de forma que ocorre uma inibição opioide em nível pré-sináptico de neurônios GABAérgicos de projeção nigrotectal. Corroborando esses dados, Ribeiro et al. (2005) mostraram por meio de abordagens ultraestruturais a presença de sinapses axo-axônicas inibitórias no teto mesencefálico e sinapses axo-somáticas/ axo-axônicas inibitórias na substância negra parte reticulada (SNpr), que atuariam modulando o comportamento de defesa.

Nosso grupo tem evidenciado de forma bem fundamentada o envolvimento de receptores μ e k opioides na modulação de comportamentos defensivos, em abordagens psicofarmacológicas e investigações neuroanatômicas. Além das conexões entre SCPd, SNpr e CS citadas anteriormente, Osaki et al. (2003) demonstraram a existência de conexões recíprocas entre o núcleo central do CI e as colunas dorsomedial e lateral da SCP, em nível caudal. Embora sejam robustas as evidências desta modulação opioide sobre neurônios GABAérgicos, o mecanismo *per se* é complexo e parece envolver mais estruturas do neuroeixo, bem como diferentes neurotransmissores. De fato, Twardowschy e Coimbra (2015) mostraram que a ativação de receptores μ e k opioides na SCPd exerce uma influência antagônica vista em comportamentos defensivos de imobilidade e fuga, causadas pela estimulação elétrica e química do CI. Considerando essas evidências e também as lacunas ainda existentes, é mister o estudo de vias GABAérgicas e projeções opioides na SCPd e CI, pois estas revelam-se promissoras no entendimento da etiologia do transtorno de pânico.

2 HIPÓTESE E OBJETIVOS

2.1 Hipótese

A hipótese do presente trabalho é que a neurotransmissão opioide deprime a atividade de vias GABAérgicas que se projetam tanto ao CI quando às colunas dorsais da SCPd, facilitando a elaboração das respostas defensivas induzidas pelo bloqueio de receptores GABAérgicos do tipo A em cada uma das estruturas abordadas neste estudo.

2.2 Objetivo geral

O principal objetivo deste trabalho foi avaliar o papel da neurotransmissão opioide e GABAérgica no duplo elo conectivo entre o CI e as colunas dorsais da SCP, na elaboração do comportamento de defesa organizado no mesencéfalo dorsal em nível caudal.

2.3 Objetivos específicos

Os experimentos foram conduzidos a fim de responder a estas questões:

1. Qual o efeito da administração intracolicular de um antagonista opioide, seletivo para receptor do tipo kappa, sobre as reações defensivas induzidas pela microinjeção de bicuculina na SCPd?

2. Qual o efeito da administração intra-SCPd de um antagonista opioide, seletivo para receptor do tipo kappa, sobre as reações defensivas induzidas pela microinjeção de bicuculina no CI?

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 da Universidade de São Paulo (FMRP-USP) sob o processo 092/2016. 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). Os protocolos foram pensados de forma a garantir não só a confiabilidade dos resultados, mas também a utilização mínima possível de animais. Todo cuidado e esforço foram tomados para minimizar o sofrimento dos animais.

3.2 Animais

Foram utilizados ratos machos Wistar-Hannover, com peso médio entre 270-290g, provenientes do Biotério Central do *Campus* da USP em Ribeirão Preto. Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Fisiologia, do Prédio Central da FMRP-USP. Durante todo o protocolo, os animais foram alojados (máximo de 5 por caixa) em gaiolas de acrílico, medindo 24x18x35 cm, forradas com "maravalha", com água e ração *ad libitum*. Permaneceram em condições controladas de fotoperíodo (12/12h) e temperatura (24±1ºC).

3.3 Cirurgia estereotáxica

Os animais foram anestesiados por via intramuscular, com uma associação de cloridrato de cetamina (100 mg/kg) e Xilazina (10 mg/kg). Após a fixação da cabeça do animal no estereotáxico para animais de pequeno porte (David-Kopff *Instruments*, EUA), foi aplicada lidocaína com vasoconstritor, para assegurar a total ausência de percepção dolorosa e sangramento local. Após a exposição da calota craniana, foram feitos três orifícios na calvária com

auxílio de uma broca odontológica acoplada a um motor elétrico. Em um dos orifícios foi rosqueado um parafuso, que serviu de apoio para o capacete de acrílico polimerisável; nos outros orifícios foram implantadas as cânulas-guia, confeccionadas a partir de segmentos de agulhas hipodérmicas com 0.6 mm de diâmetro externo e 0.4 mm de comprimento, implantadas unilateralmente no mesencéfalo e dirigidas à SCPd e ao CI.

As coordenadas foram obtidas do Atlas de Paxinos e Watson (2005), e tiveram o Lambda como referência: (AP) = 1 mm e 0 mm, médio-lateral (ML) = 0.6 mm e 1.9 mm e dorsoventral (DV) = 4.3 mm e 4.3 mm, para a SCPd e CI, respectivamente (sendo cada cânula implantada na SCPd e no CI). Depois de implantadas, as cânulas-guia foram fixadas na calvária por uma prótese de acrílico autopolimerisavel que, por sua vez, foi ancorada por um parafuso de fornitura de ácido inoxidável. Após a cirurgia, 60.000 U.I de penicilina G benzatina foram aplicadas, por via intramuscular, em cada animal. Os animais também foram tratados com uma droga analgésica e anti-inflamatória (banamine-meglumine) na dose de 2,5 mg/kg. O período de recuperação dos animais foi de 5 dias com água e ração à vontade, no biotério do Departamento de Fisiologia da FMRP-USP.

3.4 Drogas

Neste estudo foi utilizada uma droga antagonista específica para o receptor k (Nor-binaltorfimina; Sigma) diluída em solução de salina fisiológica a 0.9%, e uma droga antagonista seletiva para o receptor $GABA_A$, o metiliodeto de bicuculina (Sigma).

As doses e o tempo para ação das drogas adotadas foram de acordo com dados prévios da literatura: Nor-binaltorfimina nas doses 0.05, 0.5 e 5.0/0.2 µL (BIRCH et al., 1987; OSAKI et al., 2003). A desinibição GABAérgica foi feita através da microinjeção de bicuculina (40 ng/0.2 µL), após o pré-tratamento com o bloqueador opioide ou seu veículo, realizada 2h após microinjeção de nor-binaltorfimina, conforme a literatura concernente (HAHN & PASTERNACK, 1982; LINK et al., 1986; OSAKI et al., 2003; FREITAS et al., 2005).

As drogas foram administradas por meio de uma agulha gengival curta (30G), introduzida 1 mm abaixo da ponta da cânula-guia. A agulha de injeção estava acoplada a uma seringa Hamilton (5 µL, EUA), por meio de um catéter de polietileno. A agulha foi preenchida com a droga, enquanto que a seringa e o catéter de polietileno, com água destilada, de modo que as duas substâncias foram separadas por uma bolha de ar. A microinjeção foi realizada em 60

segundos, com o auxílio de uma bomba de microinjeção eletrônica, e a agulha foi deixada na cânula-guia por mais 60 segundos a fim de evitar o refluxo das soluções injetadas no tecido encefálico **(Figura 7, quadro 2)**.

3.5 Equipamentos

As cirurgias estereotáxicas foram realizadas por meio de um aparelho estereotáxico de duas torres ultra preciso, desenvolvido para cirurgias em pequenos animais (David Kopff, *Instruments*, EUA).

As microinjeções dos fármacos foram realizadas com o auxílio de uma bomba de microinjeção eletrônica (Harvard Apparatus).

A estimulação intramesencefálica foi realizada em uma arena circular (teste de "open field"), fabricada em material acrílico transparente, medindo 60 cm de altura x 50 cm de largura, e seu assoalho era demarcado em doze seções iguais.

Durante o teste, os comportamentos de defesa foram filmados de minuto a minuto, num total de 15 minutos por animal, com uma de uma câmera filmadora (Sony).

Para a perfusão, foi utilizada uma bomba de infusão (Master Flex® L/S TM). Os cortes histológicos do material foram realizados através de um micrótomo de congelamento (HM 505 E, Zeiss, Alemanha), e a localização dos sítios de microinjeção de drogas e dos locais em que foram inseridas as cânulas-guia foram avaliados com o auxílio de um microscópio de luz (*AxioImager* ZI, Zeiss).

3.6 Procedimento experimental

Grupos independentes de animais foram utilizados (n=8/ grupo), devidamente anestesiados e submetidos à cirurgia estereotáxica para implante de cânulas-guia **(Figura 7, quadro 1)**. Após um período de recuperação pós-operatório com duração de cinco dias, os animais foram levados do biotério até a sala onde o teste de *open-field* foi realizado, após uma habituação ambiental de cerca de quinze minutos **(Figura 7, quadro 2)**.

Diferentes grupos tiveram ou a SCPd, ou o CI pré-tratados com microinjeção de salina fisiológica (0.9%; 0.2 µL) ou nor-binaltorfimina (0.05, 0.5 ou 5 µg/µL). Duas horas após esse procedimento, foi feita microinjeção de uma dose única de bicuculina (40 ng/0.2 µL) **(Figura 8)**. Imediatamente após a administração de bicuculina, os animais foram colocados no *open-field* em uma arena circular e tiveram seu comportamento filmado por quinze minutos, para análise quantitativa e qualitativa dos comportamentos de defesa eliciados, a saber: alerta defensivo, imobilidade defensiva, fuga explosiva, saltos (levantamento concomitante das quatro patas), podendo ser acompanhada de vocalização; quantificação do número de cruzamentos das secções da arena (foi considerado para cada cruzamento quando o animal estivesse com as quatro patas em uma das divisões do assoalho da arena), levantamentos (apoio das patas anteriores nas amuradas da arena ou apoio do corpo sobre as patas traseiras tendo as patas anteriores livres), rotação (giros de 360 graus em torno do próprio eixo do animal) e autolimpeza.

O congelamento foi definido quando o animal ficou em um estado de imobilidade, por tempo igual ou superior a 6 segundos, durante o período de estimulação química, acompanhando-se de, no mínimo, duas reações autonômicas, como micção, defecação, piloereção ou exoftalmia. Animais que não apresentaram comportamento de fuga explosiva após a microinjeção de bicuculina foram descartados do presente trabalho, considerando que o sítio estimulado poderia estar fora das áreas pretendidas no presente trabalho, mas esses dados foram reservados para outro possível controle da ação intrínseca do antagonista opioide. Os comportamentos foram quantificados por meio do software *X-Plo-Rat* (Versão 2005 1.1.0).

3.7 Perfusão e histologia

Com o término de cada experimento, os animais foram anestesiados na proporção de 100 mg/kg de cetamina (Ketamina, frasco de 10ml) para 10 mg/kg de Xilazina (Dopaser, frasco de 10ml) e perfundidos através do ventrículo cardíaco esquerdo com solução fisiológica (0.9%), seguida de paraformoldeido a 4% em volume suficiente para fixar os tecidos. Os encéfalos foram removidos e embebidos primeiramente em paraformoldeido (mínimo de 48h) e posteriormente em soluções de sacarose a 10 e a 20% (mínimo de 24h em cada solução) **(Figura 7, quadro 3)**. Em seguida, foram realizados cortes de 40 µm de espessura no criostato e montados em lâminas de vidro, gelatinizadas, secos ao ar e corados com hematoxilina-eosina para observação do sítio de microinjeção. Posteriormente, os cortes foram analisados com o auxílio de

microscopia de luz (AxioImager Z1; Zeiss), e a posição das pontas das agulhas de microinjeção de drogas no neuroeixo foi assinalada em anagramas do atlas de Paxinos e Watson (2005). Foram incluídos na análise estatística somente os animais que tiveram os pontos de microinjeção das drogas localizadas na SCPd e no CI **(Figura 7, quadro 4)**.

3.8 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM), e os gráficos representados na forma de *scatter dot plot*. Foi realizado inicialmente o teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Como os dados seguiram a curva de Gauss, foi realizada a análise de variância de um fator (ANOVA), seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls. Todas as análises foram feitas com o auxílio do o *software GraphPad Prism* 7.00 (GraphPad Software Inc., San Diego CA, EUA). Foram consideradas estatisticamente significativas as diferenças que apresentaram valores de *P* igual ou menor a 0,05.

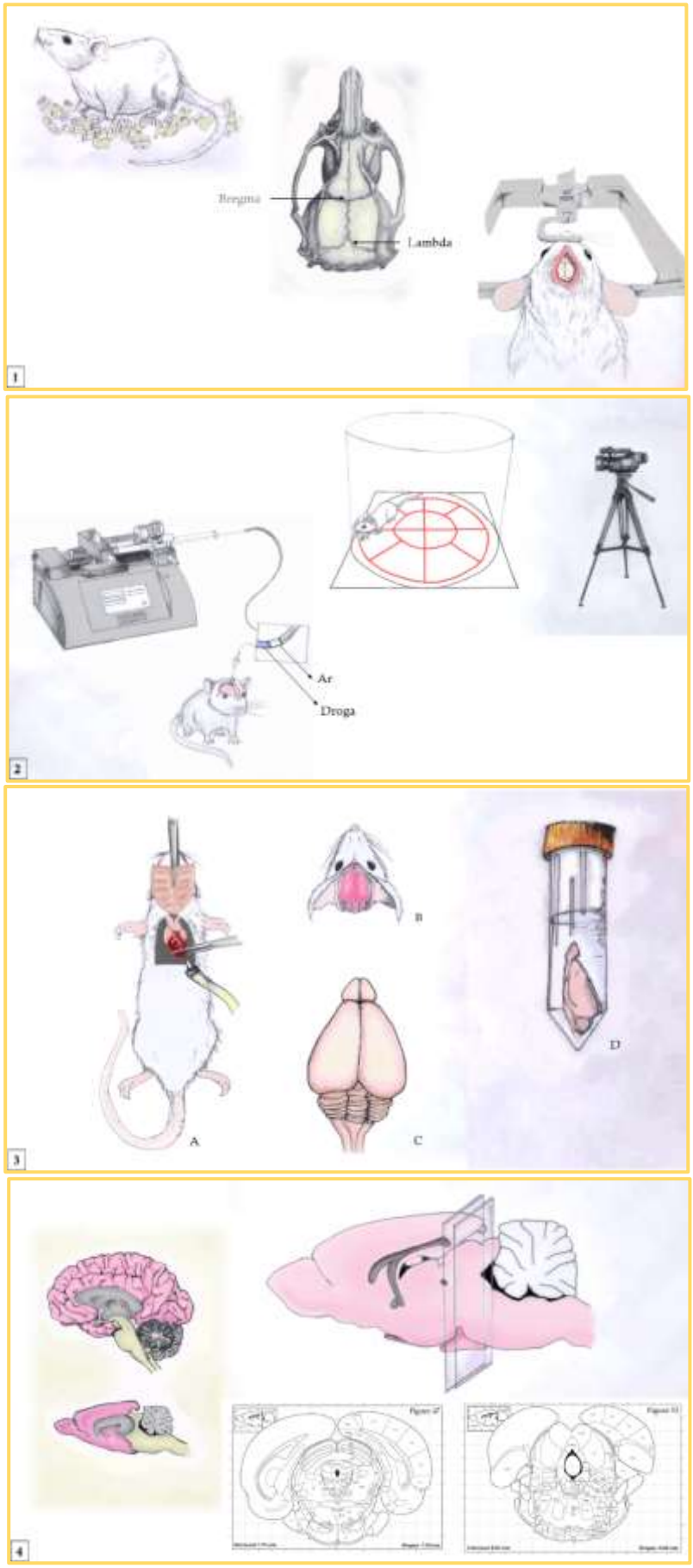

Figura 7. Resumo ilustrado da metodologia utilizada. (1) Acima, representa-se o período em que o animal permanece no biotério. Ao centro, está representado o crânio do roedor, com destaque para as suturas Bregma e Lambda, utilizadas como ponto de referência para a cirurgia estereotáxica, representada no campo inferior; (2) bomba de microinjeção para infusão de drogas e, ao lado, representação do *open field* onde os comportamentos são registrados por meio de câmera filmadora; (3) (a) perfusão, (b, c) retirada do encéfalo e (d) conservação até a realização da (4) histologia (Figura da autora).

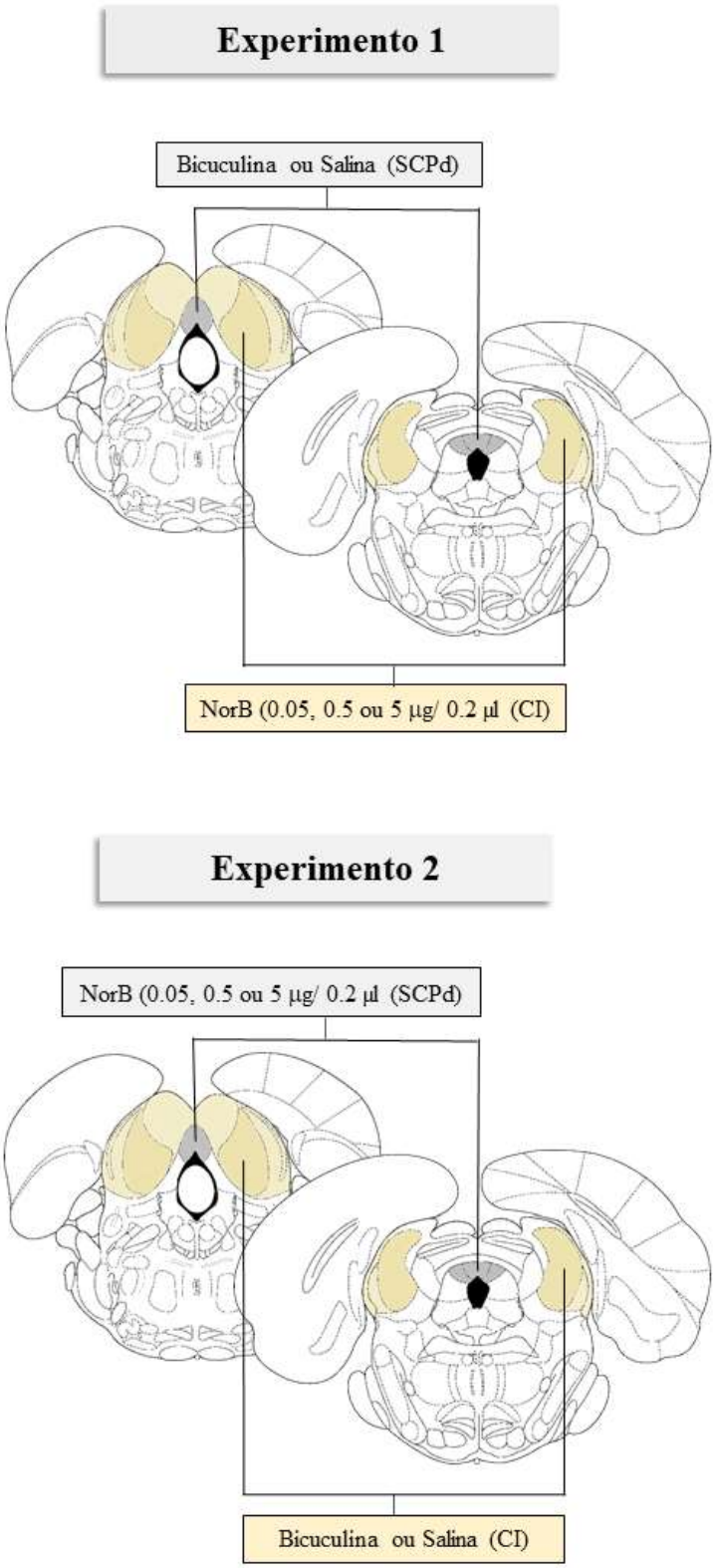

Figura 8. Esquema resumido da metodologia utilizada em cada experimento (1 e 2). Os diagramas esquemáticos foram adaptados do Atlas de Paxinos e Watson (2005), em destaque o CI (amarelo) e a SCPd (cinza), onde foram realizadas as microinjeções em diferentes grupos, segundo as coordenadas estereotaxicas descritas no item 3.3.

4 RESULTADOS

4.1 *Efeito da administração intracolicular de um antagonista opioide, seletivo para receptor do tipo kappa, sobre as reações defensivas induzidas pela microinjeção de bicuculina na substância cinzenta periaquedutal dorsal (Experimento 1)*

A microinjeção de bicuculina na SCPd evocou comportamentos sugestivos do repertório comportamental que constitui o medo inato, como a rotação defensiva, o alerta defensivo, a imobilidade defensiva ("congelamento"), que podem anteceder e suceder reações motoras intensas, marcadas por corridas explosivas e saltos, os quais denominamos de fuga **(figuras 9, 10 e 11)**.

A análise fornecida pelo teste de variância de uma via demonstrou que, com a microinjeção do antagonista seletivo de receptor opioide do tipo k, houve diminuição estatisticamente significante sobre o tempo ($F_{4,48}$ =14,02; p<0,0001) e o número ($F_{4,48}$ = 11,52; p<0,0001) de alerta defensivo nas doses de 0.5 e 5 µg com relação ao grupo que recebeu apenas bicuculina + veículo (teste de *post hoc* de Newman-Keuls; p<0,05). Ainda na **figura 9**, além do comportamento de alerta **(A e B)**, também está demonstrado o tempo e o número de congelamento. Apenas a dose de 0.5 µg de Nor-binaltorfimina foi eficaz em atenuar o número ($F_{4,54}$ =3,891; p<0,0001), mas não o tempo ($F_{4,54}$ = 2,176; p<0,0001) em que este comportamento ocorreu **(Figura 9; C e D)**.

Com relação ao comportamento de fuga, as três diferentes doses utilizadas (0.05, 0.5 e 5 µg) do antagonista opioide reduziram de forma significante a duração ($F_{4,50}$ = 18,02; p<0,0001) e a incidência ($F_{4,51}$ = 45,3; p<0,0001) das corridas que constituem a fuga, em comparação ao grupo controle (bicuculina + veículo), e não foi diferente do grupo que recebeu apenas microinjeção de salina, confirmadas com o teste *post hoc* de Newman-Keuls (p<0,05), como mostrado na **figura 10 (A e B)**. Os saltos também são comportamentos sugestivos de medo e o pré-tratamento com a três doses de Nor-binaltorfimina reduziu significativamente o efeito pró-aversivo da microinjeção de bicuculina, tanto na duração deste comportamento ($F_{4,38}$ = 8,322; p<0,0001) quanto no número de vezes em que ele ocorreu ($F_{4,51}$ = 13,96; p<0,0001). Todavia, dentre as doses utilizadas, foi visto que as de 0.05 e 0.5 µg reduziram os saltos de maneira ainda mais significante, nas duas variáveis analisadas de tempo e frequência **(Figura 10; C e D**; *post hoc* de Newman-Keuls; p<0,05).

No que se refere ao comportamento de rotação **(figura 11; B e C)**, de acordo com a *one-way ANOVA*, houve uma atenuação significativa no tempo ($F_{4,37}$ = 8,484; p<0,0001) e na

incidência ($F_{4,51}$ = 19,31; p<0,0001) deste comportamento. As doses de 0.05, 0.5 e 5 µg foram igualmente significativas em reduzir o número de rotações evocadas em relação ao grupo controle. Seguindo este mesmo padrão, as três doses utilizadas atenuaram de forma significativa a duração deste comportamento, das quais a dose de 0.05 foi ainda mais eficaz (teste de *post hoc* de Newman-Keuls; p<0,05).

Quando colocados no *open-field*, os ratos evocam comportamentos exploratórios, que podem dar lugar a comportamentos exuberantes de fuga, como por ação de um antagonista GABAérgico, como a bicuculina. O conjunto de comportamentos que o animal evoca para se familiarizar ao local incluem a deambulação pelo território, o que, no caso do *open-field*, avaliamos pelo cruzamento das seções divididas no assoalho, e o levantamento, comportamento em que o animal pode se apoiar (membros inferiores) com/sem os membros superiores nas paredes do aparato. Na **figura 11 (A)** está representado o número de cruzamento para cada grupo estudado. As doses de 0.05, 0.5 e 5 µg utilizadas reverteram significativamente (*post hoc* de Newman-Keuls; p<0,05) a incidência desse comportamento ($F_{4,41}$ = 12,74; p<0,0001), principalmente as de 0.05 e 0.5, quando comparadas ao grupo controle (bicuculina + veículo).

A **figura 11 (D e E)** nos mostra, ainda, o efeito do pré-tratamento com doses distintas de Nor-binaltorfimina sobre o comportamento de levantamento. A dose mais alta utilizada, de 5 µg reverteu o efeito da bicuculina de forma significativa ($F_{4,50}$ = 9,123; p<0,0001) a incidência deste comportamento quando comparado ao controle; embora as doses de 0.05 e 0.5 µg não terem apresentado diferença significante, são sugestivas de uma possível tendência a aumentar este comportamento (*post hoc* de Newman-Keuls; p<0,05). Com relação ao tempo cujo comportamento foi evocado, a **figura 11 (D)** demonstra que a dose de 5 µg de Nor-binaltorfimina provocou um significante aumento deste comportamento, estatisticamente diferente com relação a todos os grupos testados ($F_{4,50}$ = 8,482; p<0,0001; *post hoc* de Newman-Keuls; p<0,05), sobretudo com relação ao grupo controle.

4.2 Esquematização dos sítios de microinjeção de Nor-binaltorfimina no Colículo Inferior e bicuculina ou veículo na coluna dorsal da Substância Cinzenta Periaquedutal

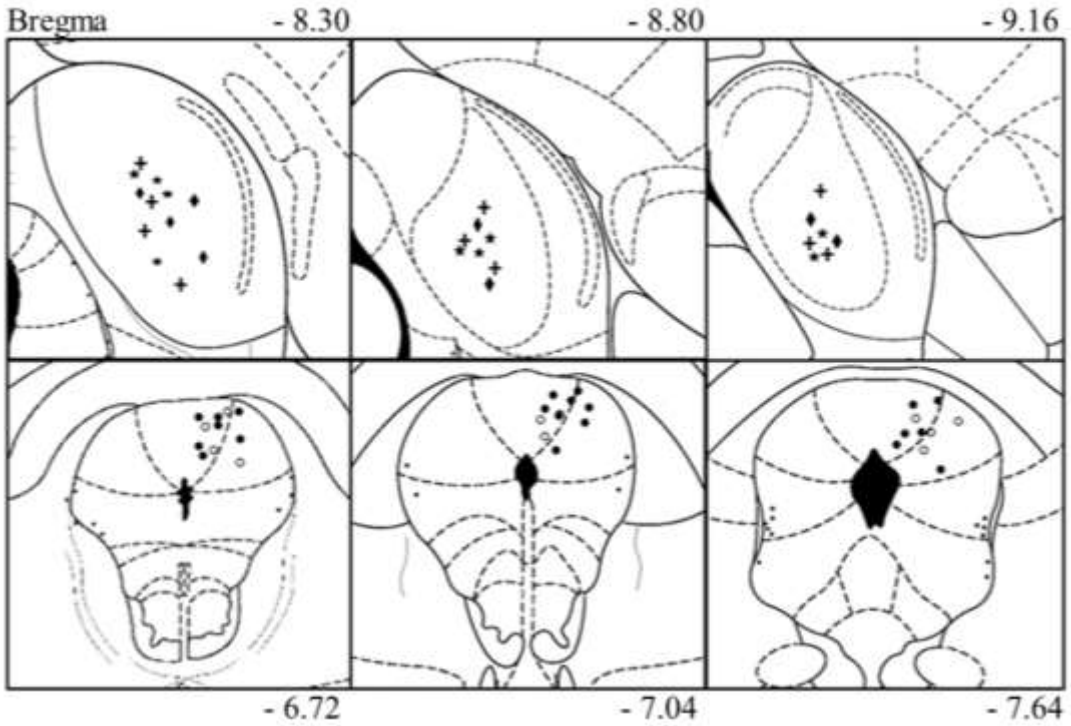

Figura 9. Representação esquemática em diagramas do Atlas de Paxinos e Watson (2005) de cortes coronais do mesencéfalo de Rattus norvegicus, mostrando os sítios de microinjeções. Em (A) Nor-binaltorfimina (NorB) no colículo inferior, este sendo representado segundo as diferentes doses como segue: NorB na dose de 0.05 (+), NorB na dose de 0.5 (★), NorB na dose de 5 (♦); Em (B) bicuculina (•) ou salina (○) na SCPd.

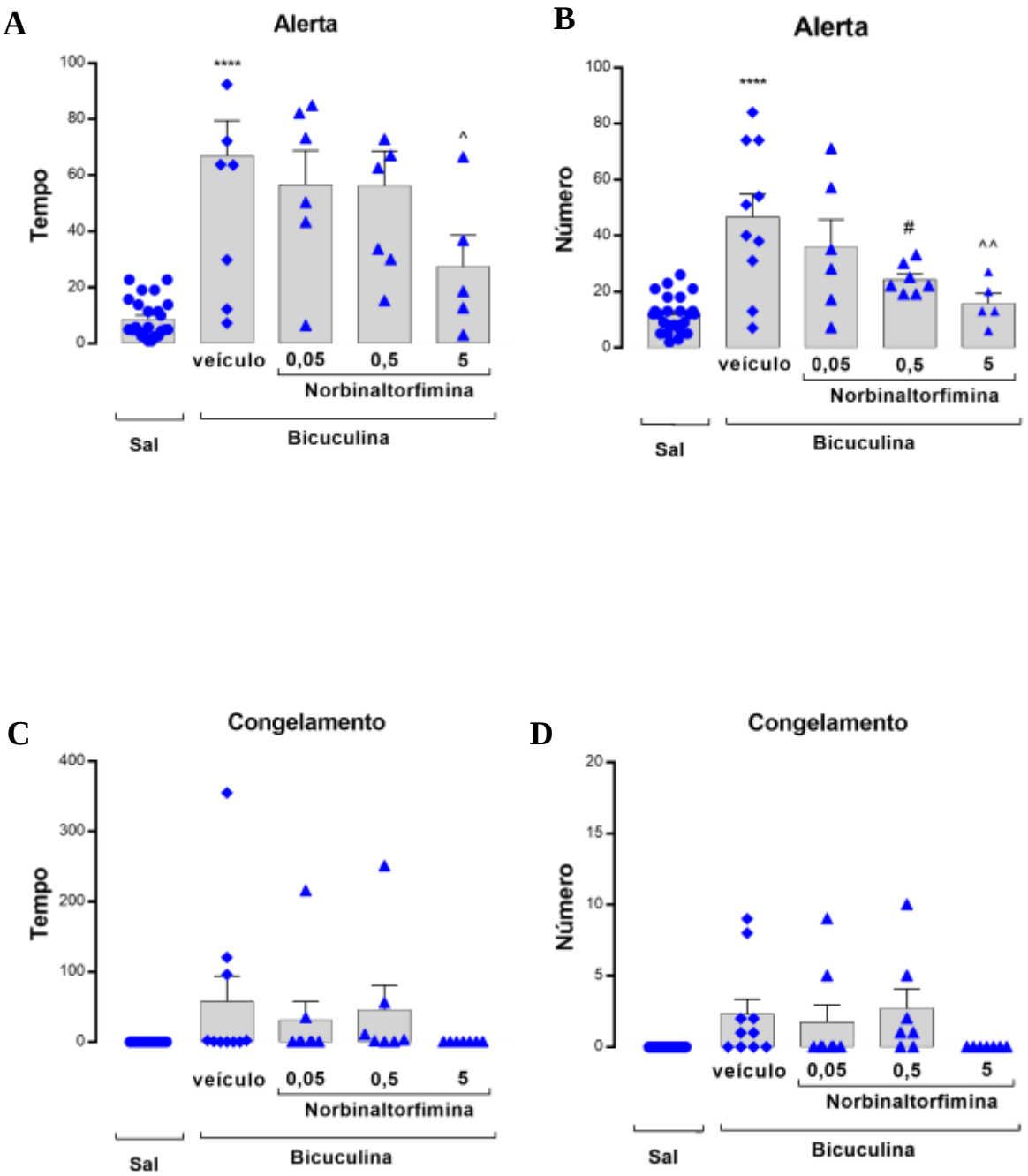

Figura 10. Efeito de microinjeções de salina, Nor-binaltorfimina (NorB) ou veículo no colículo inferior (CI), sobre o tempo de alerta (A), número de alerta (B), tempo de congelamento (C) e número de congelamento (D) evocados pelo bloqueio de receptores GABAérgicos na coluna dorsal da substância cinzenta periaquedutal (SCPd) com microinjeção local de bicuculina (bic; 40 ng/0,2 µL). Os dados são apresentados como média e erro padrão da média. $p<0,001$ quando comparado com o grupo tratado com salina; # $p<0,05$, ## $p<0,01$, ### $p<0,001$, quando comparado com o grupo tratado com veículo + bicuculina, de acordo a ANOVA de uma via, seguida do teste de *post-hoc* de Newman-Keuls.

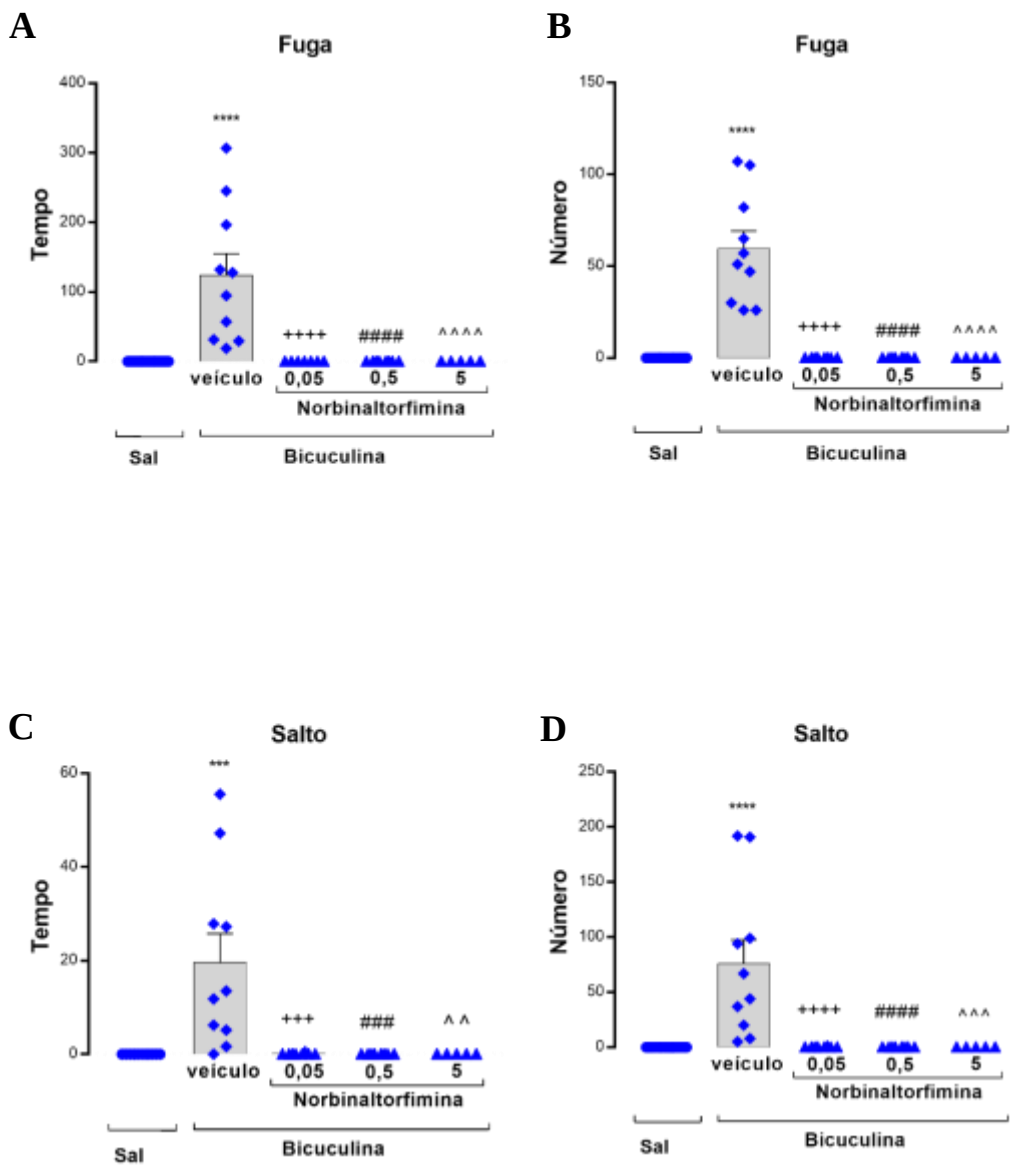

Figura 11. Efeito de microinjeções de salina, Nor-binaltorfimina (NorB) ou veículo no colículo inferior (CI), sobre o tempo de fuga (A), número de fuga (B), tempo de salto (C) e número de salto (D) evocados pelo bloqueio de receptores GABAérgicos na coluna dorsal da substância cinzenta periaquedutal (SCPd) com microinjeção local de bicuculina (bic; 40 ng/0.2 µL). Os dados são apresentados como média e erro padrão da média. ***p<0,001, ****p<0,0001, em relação ao grupo tratado com salina fisiológica; p<0,01, p<0,001, p<0,0001, quando comparado ao grupo tratado com veículo e bicuculina, segundo a ANOVA de uma via, seguida do teste de *post-hoc* de Newman-Keuls.

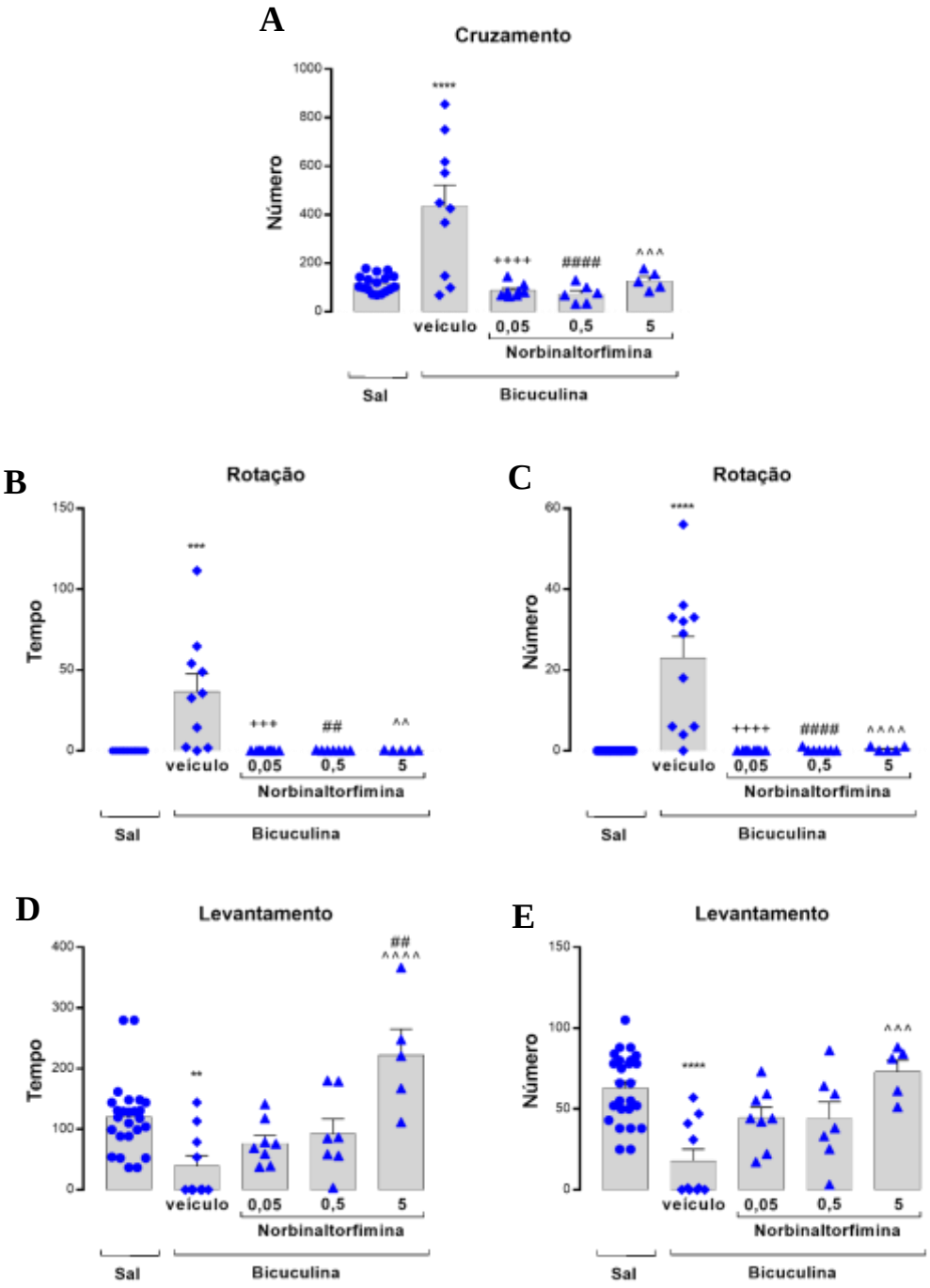

Figura 12. Efeito de microinjeções de salina, Nor-binaltorfimina (NorB) ou veículo no colículo inferior (CI), sobre o número de cruzamento (A), tempo de rotação (B), número de rotação (C), tempo de levantamento (D) e número de levantamento (E) evocados pelo bloqueio de receptores GABAérgicos na coluna dorsal da substância cinzenta periaquedutal (SCPd) com microinjeção local de bicuculina (bic; 40 ng/0.2 µL). Os dados são apresentados como média e erro padrão da média. *** p<0,001, **** p<0,0001, quando comparado como grupo tratado com veículo; # p<0,05, ## p<0,01, ### p<0,001, quando comparado ao grupo tratado com veículo e bicuculina, de acordo com a ANOVA de uma via, seguida do teste de *post-hoc* de Newman-Keuls.

4.3 *Efeito da administração intra-SCPd de um antagonista opioide seletivo para receptor do tipo kappa sobre as reações defensivas induzidas pela microinjeção de bicuculina no colículo inferior (Experimento 2)*

O bloqueio de receptores GABAérgicos efetuado através da microinjeção de bicuculina no CI causou, como bem estabelecido na literatura, o aumento significante de comportamentos comumente evocados por animais em situações de medo. Estes comportamentos constituem o alerta defensivo, a imobilidade defensiva ou "congelamento", a rotação, a fuga explosiva acompanhada de saltos **(figuras 13, 14 e 15)**.

Começando pelos comportamentos defensivos como o alerta, de acordo com a ANOVA de uma via, o pré-tratamento da SCPd com nenhuma das três doses de Nor-binaltorfimina não causou diferença significativa em relação ao controle (*post hoc* de Newman-Keuls; $p<0,05$). Apesar disto, a dose de 0.5 µg demonstrou diferença significativa quando comparada ao grupo tratado com salina fisiológica sobre o tempo em que este comportamento foi observado ($F_{4,43} = 3,711$; $p<0,05$). Utilizando os mesmos critérios de análise, não foi observada nenhuma diferença importante quanto à incidência de alerta defensivo entre os grupos ($F_{4,42}= 2,534$; $p>0,05$).

Quando o animal experiencia uma situação de medo intenso, a depender do contexto e nível de ameaça, ele pode apresentar o comportamento de congelamento, no qual ele fica imóvel por tempo igual ou superior a 6 segundos. O pré-tratamento com o antagonista de receptor opioide do tipo k mostrou-se capaz de atenuar significativamente o tempo de congelamento ($F_{4,40} = 5,618$; $p<0,01$), nas doses de 0.5 e 5 µg comparadas ao controle (grupo que recebeu bicuculina + veículo; **figura 13 C)**. Com relação à incidência de congelamento, não foram observadas diferenças significantes entre os grupos ($F_{4,40}= 2,58$; $p>0,05$).

O comportamento de congelamento muitas vezes antecede uma reação explosiva de fuga. A corrida intensa e vigorosa apresentada pelos animais pela ação da bicuculina no CI foi atenuada de forma significante em sua incidência ($F_{4,38}= 4,622$; $p<0,01$) e duração ($F_{4,38} = 11,83$; $p<0,0001$). Como mostrado **(figura 14 A e B)**, a Nor-binaltorfimina nas doses utilizadas no presente trabalho (0.05, 0.5 e 5 µg) reduziram significantemente tanto a incidência como a duração da fuga (*post hoc* de Newman-Keuls; $p<0,05$ em todos os casos).

A corrida e o salto compõem o comportamento de fuga. Este trabalho analisou cada componente separadamente. Com relação ao número de vezes em que este comportamento foi evocado **(figura 14 C e D)**, o pré-tratamento com Nor-binaltorfimina causou um significativo efeito panicolítico, especialmente nas doses de 0.05 e 0.5 µg ($F_{4,31} = 5,198$; $p<0,01$), quando

comparado ao controle. Este efeito também se mostrou estatisticamente significante sobre o tempo em que o comportamento esteve presente ($F_{4,31}$ = 4,129; p<0.01), segundo o teste *post hoc* de Newman-Keuls (p<0,05 em todos os casos).

No que se refere ao comportamento de rotação **(Figura 15 A e B)**, segundo a ANOVA de uma via, o pré-tratamento da SCPd com nor-binaltorfimina na dose de 0.5 µg atenuou de forma significativa o tempo de rotação no grupo tratado em comparação ao controle ($F_{4,51}$= 4,518; p<0,01).

Ainda na figura 15, temos os comportamentos que fazem parte do repertório exploratório eliciado pelo animal para reconhecimento do ambiente, como o levantamento e o cruzamento, respectivamente **(Figura 15 C e D)**. Apenas o grupo que recebeu a microinjeção de bicuculina no CI apresentou diferença significativa sobre a incidência de levantamento ($F_{4,45}$= 2,827; p<0,05), enquanto que as diferentes doses utilizadas de Nor-binaltorfimina, aparentemente causaram apenas uma tendência a elevar este comportamento.

No que se refere ao número de cruzamento, como dito anteriormente, foram consideradas as seções que dividem o assoalho do *open-field* para avaliarmos de forma quantitativa o movimento do animal durante o teste. O pré-tratamento da SCPd com antagonista de receptor opioide do tipo k, na dose de 0.5 µg causou uma significante diminuição na incidência de cruzamentos ($F_{4,43}$= 3,518; p<0,05) quando comparado ao controle.

4.4. Esquematização dos sítios de microinjeção de Nor-binaltorfimina na coluna dorsal da Substância Cinzenta Periaquedutal e bicuculina ou veículo no Colículo Inferior.

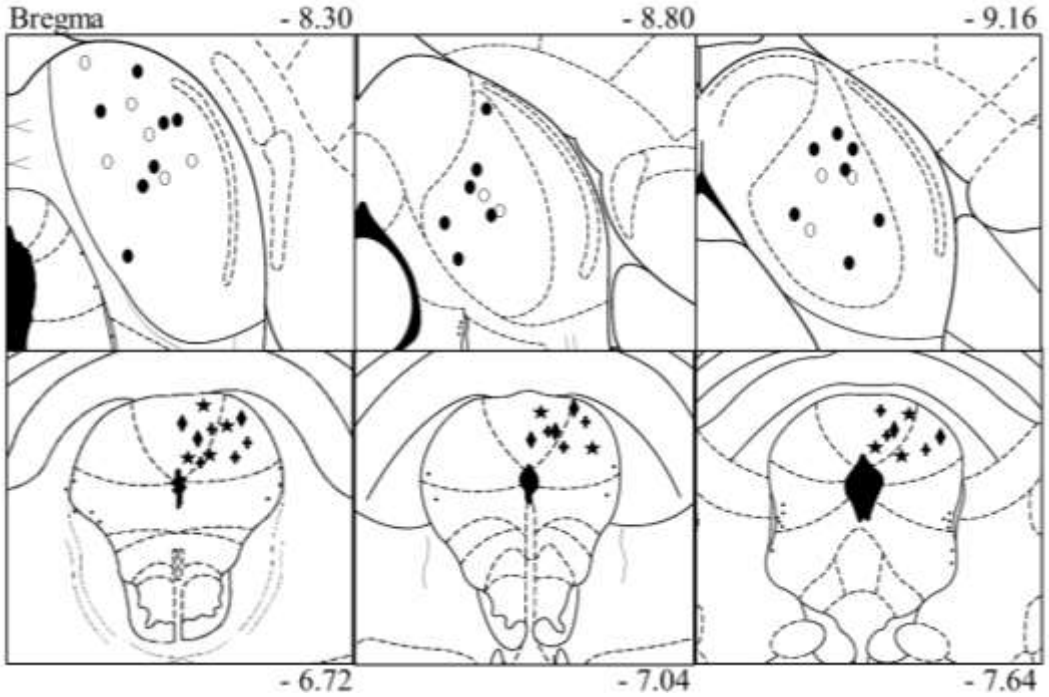

Figura 13. Representação esquemática em diagramas do Atlas de Paxinos e Watson (2005) de cortes coronais do mesencéfalo de Rattus norvegicus, mostrando os sítios de microinjeções. Em (A) Nor-binaltorfimina (NorB) na SCPd, este sendo representado segundo as diferentes doses como segue: NorB na dose de 0.05 (+), NorB na dose de 0.5 (★), NorB na dose de 5 (♦); Em (B) bicuculina (•) ou salina (○) no colículo inferior.

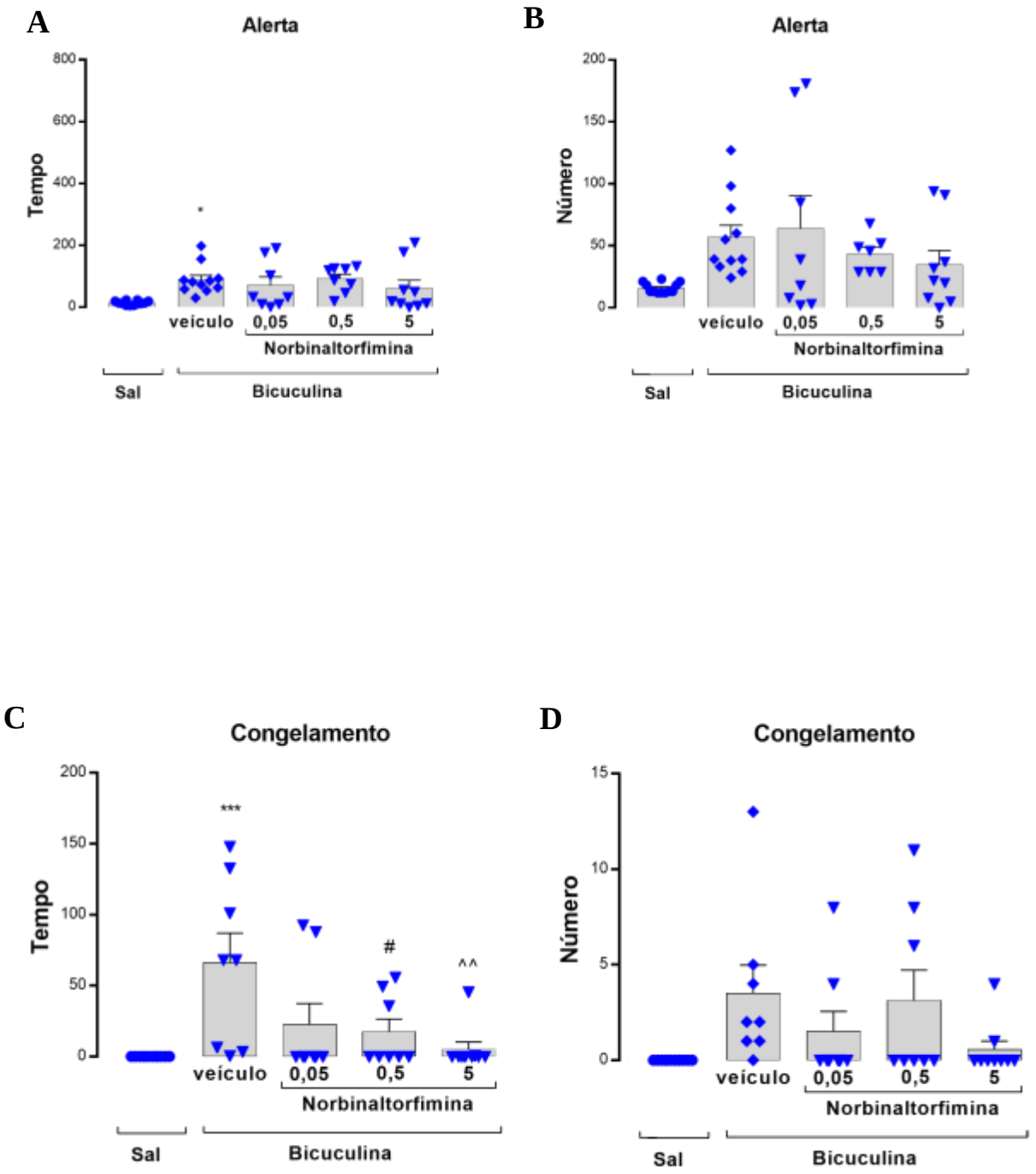

Figura 14. Efeito de microinjeções de salina, Nor-binaltorfimina (NorB) ou veículo na coluna dorsal da substância cinzenta periaquedutal (SCPd), sobre o tempo de alerta (A), número de alerta (B), tempo de congelamento (C) e número de congelamento (D) evocados pelo bloqueio de receptores GABAérgicos no colículo inferior (CI) com microinjeção local de bicuculina (bic; 40 ng/0.2 µL). Os dados são apresentados como média e erro padrão da média. * $p<0,05$, *** $p<0,001$, quando comparado com o grupo tratado com salina; # $p<0,05$, ## $p<0,01$, quando comparado com o grupo tratado com veículo + bicuculina, de acordo com a ANOVA de uma via, seguida do teste de post-hoc de Newman-Keuls.

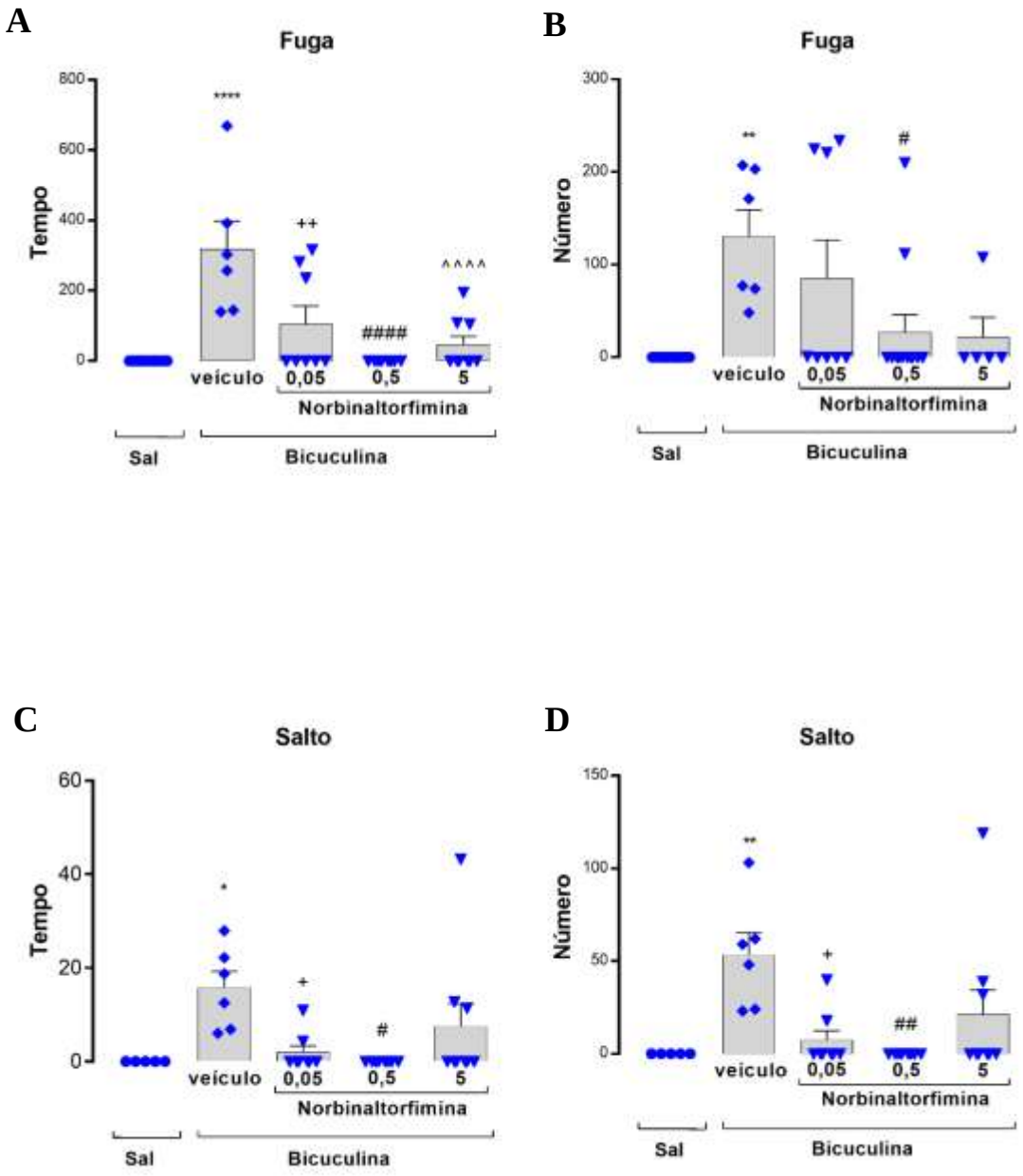

Figura 15. Efeito de microinjeções de salina, Nor-binaltorfimina (NorB) ou veículo na coluna dorsal da substância cinzenta periaquedutal (SCPd), sobre o tempo de fuga (A), número de fuga (B), tempo de salto (C) e número de salto (D) evocados pelo bloqueio de receptores GABAérgicos no colículo inferior (CI) com microinjeção local de bicuculina (bic; 40 ng/0.2 µL). Os dados são apresentados como média e erro padrão da média. * p<0,05, ** p<0,01 *** p<0,001, quando comparado ao grupo tratado com salina; # p<0,05, ## p<0,01, ### p<0,001, quando comparado com o grupo tratado com veículo + bicuculina, de acordo com a ANOVA de uma via, seguida do teste de *post-hoc* de Newman-Keuls.

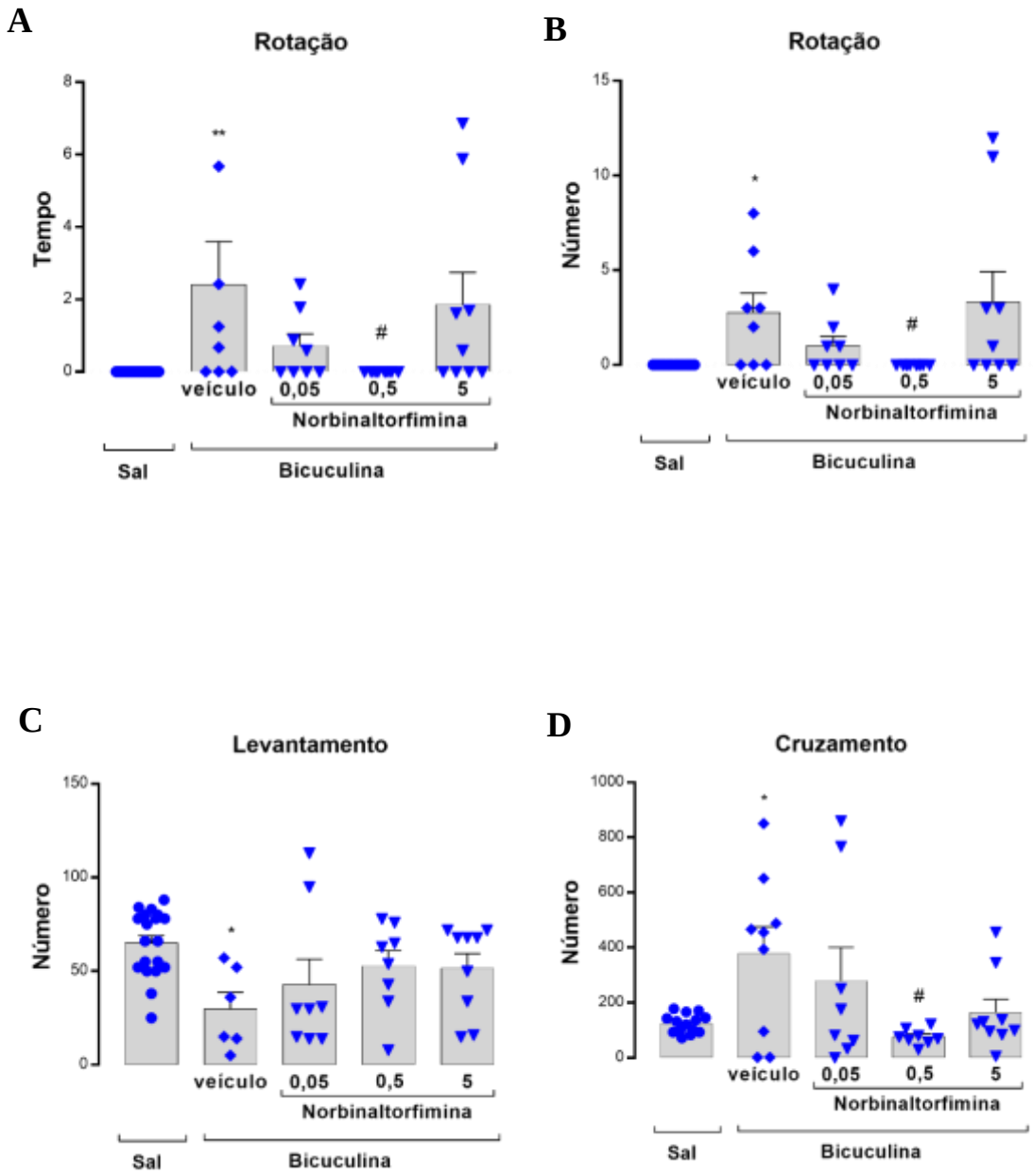

Figura 16. Efeito de microinjeções de salina, Nor-binaltorfimina (NorB) ou veículo na coluna dorsal da substância cinzenta periaquedutal (SCPd), sobre o tempo de rotação (A), número de rotação (B), número de levantamento (C) e número de cruzamento (D) evocados pelo bloqueio de receptores GABAérgicos no colículo inferior (CI) com microinjeção local de bicuculina (bic; 40 ng/0.2 µL). Os dados são apresentados como média e erro padrão da média. * $p<0,05$, ** $p<0,01$; # $p<0,05$ quando comparado com o grupo tratado com veículo + bicuculina, de acordo com a ANOVA de uma via, seguida do teste de *post-hoc* de Newman-Keuls.

5 Discussão

O transtorno de pânico é uma doença mental altamente incapacitante. Gera um impacto significante na qualidade de vida de pessoas por ele acometidas e também ao sistema de saúde. Dentre os transtornos de ansiedade, o transtorno de pânico é o mais prevalente e sua etiologia ainda não está elucidada. As numerosas lacunas ainda existentes a esse respeito justificam a importância do presente estudo.

O medo, a ansiedade e o pânico, assim como os comportamentos inerentes a cada estado emocional correspondente, têm sido estudados há décadas. Os comportamentos e emoções correlatos em animais e no homem, descritos por Darwin, somaram-se aos posteriores resultados de estudos em eletrofisiologia. Por meio deles, ficou evidente a existência de um sistema encefálico de aversão, do qual participam estruturas, tais como o hipotálamo, tálamo, colículo superior e inferior e SCP. Essas estruturas foram agrupadas como participantes deste sistema, ao observar que, quando estimuladas eletricamente ou quimicamente, causavam nos animais testados, reações defensivas como a fuga ou congelamento.

Foi proposto por Blanchard & Blanchard (1988) a existência de estratégias diferentes de defesa e que estas ocorrem em função do nível de ameaça presente, classificadas como potencial, distal ou proximal. A literatura também mostra que os sintomas descritos por pacientes que sofrem de um ataque de pânico foram eliciados com a estimulação elétrica da SCP em seres humanos (NASHOLD et al., 1969). Experimentalmente, essas reações vigorosas de fuga explosiva que cursam com saltos e alterações autonômicas são eliciadas em ratos quando se deparam com seu predador natural (ameaça proximal). De maneira semelhante, a desinibição GABAérgica e a estimulação química (seja por bloqueio do receptor GABA-A ou estimulação de receptores NMDA, respectivamente) e elétrica da SCPd e do CI causam estas respostas comportamentais intensas em ratos (BRANDÃO et al., 1988; MELO et al., 1992; COIMBRA & BRANDÃO, 1993; COIMBRA et al., 2006). O fato destes comportamentos serem semelhantes e correlatos ao quadro clínico do transtorno de pânico possibilitou que fosse estabelecido como um bom modelo para o estudo com animais de laboratório.

Diversos trabalhos apontaram para o envolvimento de outros sistemas atuando no controle das respostas defensivas elaboradas pelo teto mesencefálico, tais como o serotoninérgico (COIMBRA & BRANDÃO, 1993; CASTILHO & BRANDÃO, 2001; BORELLI et al., 2004), o opioide (JENCK et al., 1986; BLANCHARD et al., 1997; EICHENBERGER et al., 2002; RIBEIRO et al., 2005) e o GABAérgico (COIMBRA et al., 1989; COIMBRA & BRANDÃO,

1993; BRANDÃO et al., 2005), e a complexidade destas conexões refletem o desafio de compreender o exato mecanismo neural que modula esses comportamentos defensivos implicados no transtorno de pânico. O caminho pelo qual o presente trabalho buscou para responder algumas questões partiu dos achados de Osaki et al. (2003), que mostraram a existência de vias neurais que se conectavam de forma recíproca duas estruturas ricas em neurônios opioides, o núcleo central do CI e a SCP. Somado a isso, outros estudos evidenciaram que a SCP contém os dois tipos de receptores opioides (μ e k). Ademais, várias pesquisas observaram efeitos opostos de opioides em respostas comportamentais do tipo ansiedade e do tipo pânico em diferentes modelos experimentais, cuja explicação parece estar atrelada à dependência da dose ou o tipo de receptor opioide envolvido (JENCK et al., 1986; BRANDÃO et al., 1988, 1993; EICHENBERGER et al., 2002; RONCON et al., 2013).

A hipótese que tem sido apontada por vários pesquisadores é a de que os receptores μ opioides causam efeitos ansiolíticos e os do tipo k induzem a efeitos ansiogênicos, o que explicaria o fato de que a administração de baixas doses de morfina atenuam os comportamentos do tipo pânico, enquanto que a microinjeção de altas doses causam efeitos panicogênicos, possivelmente por ação dos receptores do tipo k (MOTTA et al., 1995; BRANDÃO et al., 1999; NOBRE et al., 2000). Twardowschy et al. (2015) investigaram a ativação de receptores do tipo μ e k opioides na SCPd com ativação química e elétrica do CI. Seus resultados mostraram que o pré-tratamento de estruturas do *tectum* utilizando uma dose do agonista μ, causou efeito panicolítico, enquanto que o pré-tratamento de estruturas do *tectum* com uma dose do agonista de receptor k, teve efeito panicogênico. Todavia, a divergência nos efeitos causados por agonistas e antagonistas opioides despertou o nosso interesse e nos motivou a investigar de forma mais específica essa relação entre dose e efeito. Por esse motivo, para responder a primeira pergunta desse estudo, nosso primeiro passo foi a realização de uma curva dose-efeito do antagonista de receptor k sobre as reações defensivas induzidas pela microinjeção de bicuculina na SCPd.

Com o bloqueio de receptor $GABA_A$ na coluna dorsal da SCP, confirmamos os resultados prévios que mostram comportamentos sugestivos de medo intenso, com fugas explosivas que cursam com saltos, aumento do alerta defensivo e congelamento. Os resultados deste trabalho demonstraram que o pré-tratamento com o antagonista seletivo para receptor k teve um claro e consistente efeito panicolítico. Com relação ao alerta defensivo, a atenuação estatisticamente significante deste comportamento ocorreu nas três doses, sendo ainda maior conforme o aumento da dose utilizada.

No que se refere aos comportamentos de fuga, salto e rotação, as três diferentes doses foram capazes de abolir ou tornar quase ausente estas respostas defensivas. Ao avaliar o congelamento, as três doses de nor-binaltorfimina utilizadas como pré-tratamento no CI foram significativamente capazes em atenuar este comportamento, mas somente a dose de 5 µg, tornou esta reação quase que ausente. De maneira geral, o antagonismo de receptores kappa opioides no CI apresentou um claro efeito panicolítico sobre as respostas evocadas por bloqueio de receptor $GABA_A$ na SCPd.

Um efeito similar foi relatado por Calvo et al. (2019), que demonstraram que ratos tratados com concentrações elevadas do antagonista seletivo de receptores opioides do tipo kappa, no CI, apresentaram efeito panicolítico mesmo com a administração de bicuculina *in situ*. Outros estudos demonstraram que o pré-tratamento com Nor-binaltorfimina inibiu significativamente a ansiedade provocada pela microinjeção de altas doses de morfina na SCPd (MOTTA & BRANDÃO, 1993; MOTTA et al., 1995). Essas evidências estão em consonância com os resultados do presente estudo e corroboram a hipótese de que os neurônios opioidérgicos atuam sobre interneurônios GABAérgicos, inibindo-os, e, por conseguinte, o teto mesencefálico fica menos inibido tonicamente por aferências GABAérgicas. Dessa maneira, as vias de aminoácidos excitatórios, menos inibidos pelo controle de interneurônios GABAérgicos, contribuiria para o comportamento defensivo exacerbado.

Foi demonstrado pelo nosso grupo que as camadas profundas do colículo superior fazem conexões recíprocas com a SCPd e que a substância negra parte reticulada atuou no controle da expressão de comportamentos induzidos por medo inato (EINCHENBERGER et al., 2002). Esses dados forneceram uma base morfológica para os efeitos antiaversivos observados por meio da administração central de antagonistas de receptores opioides (COIMBRA et al., 1996). Possivelmente, a modulação opioide exerce o mesmo tipo de controle inibitório sobre vias GABAérgicas, desta vez, vistas nas projeções nigro-tectais, sendo confirmados esses efeitos por abordagens morfológicas, psicofisiológicas e psicofarmacológicas. Em 2013, da Silva et al. obtiveram o mesmo efeito antiaversivo com a microinjeção de antagonistas opioides seletivos para o receptor kappa em doses mais elevadas, sobre estimulação elétrica do colículo superior ou da coluna dorsolateral da SCP. Além disto, esse trabalho do nosso grupo trouxe mais uma evidência morfológica sobre a interação de vias opioides e GABAérgicas, culminando na inibição de neurônios GABAérgicos que fazem o controle tônico pela via nigro-tectal.

Outros dados relatados publicados por nosso grupo de pesquisa já mostravam evidências morfológicas, psicofarmacológicas e comportamentais sobre a importância de estruturas como

os corpos quadrigêmeos na organização do comportamento defensivo, principalmente os eliciados pelo medo inato como a fuga e imobilidade defensiva (CARDOSO et al., 1994; COIMBRA et al., 2000; 2001). O presente trabalho mostrou evidências de que o bloqueio de receptores GABAérgicos, com microinjeções de bicuculina no CI eliciaram reações aversivas como fuga explosiva e saltos, que ocorrem simultaneamente com alterações fisiológicas que já foram muito bem descritas na literatura. Comparando a ação da bicuculina no CI e na SCPd, vimos que, no geral, os comportamentos foram semelhantes, embora a fuga tenha ocorrido por um período sobremaneira superior quando houve estimulação da SCPd, enquanto que a rotação, foi mais duradoura e mais frequente quando o CI foi estimulado.

A respeito do pré-tratamento da SCPd com Nor-binaltorfimina, os resultados foram semelhantes aos do pré-tratamento do CI; porém, com algumas diferenças sutis. De forma geral, o antagonista de receptor k exerceu um papel antiaversivo, atenuando as respostas defensivas provocadas pela bicuculina em ambas as estruturas do teto mesencefálico. Com relação ao alerta defensivo, essa resposta parece não ter sido tão expressiva na ocasião do bloqueio de receptores $GABA_A$ no CI.

Quanto ao congelamento, os grupos que receberam as doses de 0.5 e 5 µg apresentam uma diminuição significativa deste comportamento, comparados aos animais do grupo controle. O comportamento de fuga foi claramente revertido pelo antagonismo opioide, nas três doses utilizadas. Este efeito foi ainda mais expressivo na dose de 0.5 µg, levando em consideração as variáveis de tempo e frequência. A dose de 5 µg, embora tenha mostrado efeito significativo na atenuação do tempo em que apresentaram fuga, com relação à incidência desse comportamento, não apresentou significância.

A estimulação química e elétrica de estruturas do teto mesencefálico, como no CI e SCPd, apresentam respostas de fuga explosiva que são geralmente acompanhadas por saltos frequentes, numa clara tentativa de escape eliciadas por animais em situações de medo intenso. A Nor-binaltorfimina, nas doses de 0.05 e de 0.5 µg, causou uma clara atenuação dos saltos observados, e esse efeito foi significativo tanto no tempo em que este comportamento ocorreu, quanto na incidência. Dessas duas doses mais efetivas, ressalta-se que a dose de 0.5 µg foi a que promoveu o efeito panicolítico mais evidente.

De maneira semelhante, o comportamento rotacional observado foi significativamente menor em animais tratados com a dose de 0.5 µg, enquanto que as outras doses testadas, não apresentaram diferenças com relação ao controle. Apesar disto, observamos que a dose de 5 µg promoveu um aumento deste comportamento, e isto foi significativamente diferente quando comparado à dose de 0.5 µg. Sobre os comportamentos exploratórios, como o cruzamento, essa

mesma dose intermediária de Nor-binaltorfimina (0.5 µg) desempenhou de forma significativa a diminuição desse comportamento quando comparado aos animais controle. Outro comportamento exploratório observado foi o levantamento e, quanto a este, o pré-tratamento da SCPd com antagonista de receptor kappa opioide não demonstrou interferência nas três doses estudadas enquanto que somente os animais controle (microinjeção de bicuculina no CI), foram estatisticamente diferentes. Efetivamente, tem sido demonstrado na literatura que o comportamento exploratório resultante da microinjeção de bicuculina no *tectum* em nível cranial, parece expressar-se ao final do efeito aversivo causado pelo bloqueio de receptores GABAérgicos nas cpCS e na SCPd (COIMBRA & BRANDÃO, 1993).

Em conjunto, os resultados do presente trabalho demonstraram que o pré-tratamento da SCPd ou do CI com antagonista seletivo de receptor kappa opioide exerce um claro efeito panicolítico. Assim como outros dados mostraram que estruturas do *tegmentum* mesencefálico, como a SNpr, tratadas com naloxonazine ou nor-binaltorfimina, tendem a reduzir a ação pró-aversiva causada pela bicuculina administrada no teto mesencefálico (BORELLI et al., 2004; RIBEIRO et al., 2005). Acreditamos que os dados apresentados neste trabalho somam-se às evidências anteriores, que sustentam a hipótese de que os receptores kappa opioides desempenham um papel importante na modulação de comportamentos induzidos por estímulos aversivos. Esse efeito antipânico de antagonistas opioides já foi demonstrado no teto mesencefálico (COIMBRA et al., 1996; 2000; EICHENBERGER et al., 2002); porém, o presente trabalho, vem dar um passo adicional na literatura, na medida em que comprova a ação frenadora exercida pela via opioide intratectal de alça curta especificamente envolvida no duplo elo conectivo entre a SCPd e o CI no controle das emoções, onde o receptor *kappa* opioide parece ser recrutado.

Em conclusão, os comportamentos que têm sido relacionados ao medo inato e a ataques de pânico parecem ser modulados por interação entre vias opioides e aquelas mediadas por GABA no *tectum*, sendo que interneurônios opioides parecem inibir eferências GABAérgicas às estruturas do mesencéfalo dorsal, e o receptor kappa opioide parecer ser recrutado nessa interação de redes neurais entre o CI e a SCPd que organizam pela parte dos comportamentos defensivos induzidos pelo medo inato.

6 Conclusão

O bloqueio de receptores GABAérgicos do tipo A, seja na SCPd, seja no CI, causa uma ativação comportamental caracterizada por alerta defensivo, imobilidade defensiva e fuga expressa por corridas e saltos, o que sugere que vias GABAérgicas exercem uma modulação tônica de estruturas do teto mesencefálico envolvidas com a elaboração de emoções relacionadas ao medo inato, o comportamento defensivo.

O bloqueio de receptores opioides do tipo kappa na SCPd deprime as respostas panicogênicas evocadas pelo bloqueio de receptores GABAérgicos do tipo a no CI e vice-versa, o que sugere um duplo elo opioide conectivo entre essas duas estruturas, com papel relevante no controle da atividade neural relacionada ao medo inato no CI e na SCPd.

Receptores kappa opioides situados no CI e na SCPd podem vir a se apresentarem como um potencial alvo sináptico do tratamento panicolítico com antagonistas opioides como possíveis coadjuvantes farmacológicos na terapêutica da síndrome do pânico.

7 Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas

ANDERSON, D. M: Dorland. Dicionário Medico Ilustrado. São Paulo: Manole, 1999.

BACHMANN, S. Epidemiology of Suicide and the Psychiatric Perspective. **Int J Environ Res Public Health** 2018; 15(7): 1425.

BANDELOW, B., MICHAELIS, S. Epidemiology of anxiety disorders in the 21st century. **Dialogues Clin Neurosci.** 2015; 17(3): 327-335.

BANDLER, R., CARRIVE, P., DEPAULIS, A. Emerging principles of organization of the midbrain periaqueductal gray-matter – introduction. Midbrain Periaqueductal Gray Matter. 1991; 213:1-8.

BATES, D. G. Thomas Willis and the epidemic fever of 1661: a commentary**". Bulletin of History of Medicine** 1965; 39: 393-414.

BAY, N. S., BAY, B. H. Greek anatomist Herophilus: the father of anatomy. **Anat Cell Biol.** 2010;43(4):280-3.

BAZOU, A. Cerebral localization theories in antiquity. Asklepios. **International Annual for History and Philosophy of Medicine.** Issue II/2008, p. 20-24.

BEAR, M. F., CONNORS, B. W., PARADISO, M. A. *Neurociências: Desvendando o Sistema Nervoso.* Porto Alegre: Artmed, 2002.

BEHBEHANI, M. M. Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. **Prog. Neurobiol.** 1995; 46:575-605.

BEITZ, A. J., SHEPARD, R. D., WELLS, W. E. The periaqueductal gray-raphe magnus projection contains somatostatin, neurotensin and serotonin but not cholecystokinin. **Brain Res** 1983; 261(1): 132-137.

BEITZ, A. J. Relationship of glutamate and aspartate to the periaqueductal gray-raphe magnus projection: analysis using immunocytochemistry and microdialysis. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry** 1990; 38: 1755-1765.

BENSON, H. Estresse, uma questão de equilíbrio. **Harvard Business Review** 2005; 12:35-39.

BIAGIONI, A. F., dos ANJOS-GARCIA, T., ULLAH, F., FISHER, I. R., FALCONI-SOBRINHO, L. L., de FREITAS, R. L., FELIPPOTTI, T. T., COIMBRA, N. C. 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. **Behav Brain Res.** 2016; 298:65-77.

BLITS, K. C.: from, function, and comparative anatomy. **Anat Rec**. 1999; 257(2):58-63.

BLANCHARD, R. J. & BLANCHARD, D. C. Crouching as an index of fear. **J Comp Physiol Psychol**. 1969; 67:370-75.

BLANCHARD, R. J. & BLANCHARD, D. C. Ethoexperimental approaches to the study of fear. **Psychol Rec**. 1987.

BLANCHARD, D. C. and BLANCHARD, R. J. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. **Ann Rev Psychol**. 1988; 39:43-68.

BLANCHARD R. J., YUDKO, E. B., RODGERS, R. J., BLANCHARD, D. C. Defense system psychopharmacology: an ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. **Behav Brain Res**. 1993; 58:155-65.

BLANCHARD, D. C., GRIEBEL, G., BLANCHARD, R. J. Mouse defensive behaviors: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. **Neurosci Biobehav Rev.** 2001; 25:205-18.

BLOOM, E. F. Neurotransmissão e o sistema nervoso central. In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; MOLINOFF, P. B.; RUDDON, R. W.; GILMAN, A. G. eds. Goodman &

Gilman as bases farmacológicas da terapêutica. 9.ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana, 1996. P.198-216.

BRANDÃO, M. L., CABRAL, A. M., VASQUEZ, E. C. AND SCHIMITT, P. Chlordiazepoxide and morphine reduce pressor response to brain stimulation in awake rats. **Pharmacol**. **Biochem. Behav**. 1985; 23: 1069-1071.

BRANDÃO, M. L., COIMBRA, N. C. & LEAO-BORGES, P. C. Effects of morphine and midazolam on reactivity to peripheral noxious and central aversive stimuli**. Neurosci. Biobehav**. **Rev.** 1990; 14: 495-499.

BRANDÃO, M. L., COIMBRA, N. C., OSAKI, M.Y. Changes in the auditory-evoked potentials induced by fear-evoking stimulations. **Physiol Behav** 2001; 72(3): 365-72.

BRANDÃO, M. L., VIANNA, D. M., MASSON, S., SANTOS, J. Organização neural de diferentes tipos de medo e suas implicações na ansiedade. **Brazilian Journal of Psychiatry** 2003; 25(Supl II):36-41.

BRANDÃO, M. L. Psicofisiologia. 4.ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2019. pg.132-3.

CALVO, F., ALMADA, R. C., da SILVA, J. A., MEDEIROS, P., da SILVA SOARES, R. Jr., de PAIVA, Y. B., RONCON, C. M., COIMBRA, N. C. **Neuropsychobiology** 2019; 78(4): 218-228.

CANNON, W. and BRITTON, S. Studies on the conditions of activity in endocrine glands: Xv. pseudaffective medulliadrenal secretion. **Americam Journal of Physiology-Legacy Content, American Physiological Society** 1925;72(2):283-294.

CAPLAN, L. Posterior circulation ischemia: then, now, and tomorrow. The Thomas Willis Lecture-2000. **Stroke.** 2000;31(8):2011-23.

CAPUTI, F., SPAZIANTE, R., DE DIVITIIS, E., NASHOLD, B. S. JR. Luigi Rolando and his pioneering efforts to relate structure to function in the nervous system. **J Neurosurg.** 1995;83(5):933-7.

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

CARVALHO-NETTO, E. F. de. Medo e ansiedade: Aspectos comportamentais e neuroanatômicos. **Arq. Med. Hosp. Fac. Cienc. Med. Santa Casa São Paulo** 2000; 54(2): 62-5.

CASTILHO, F. M. 2010. Concepções evolutivas de Charles Darwin na Origem das espécies (1859) e na Expressão das emoções no homem e nos animais (1872): um estudo comparativo. **Dissertação.** [Mestrado em História da Ciência] – Pontifícia Universidade Católica de São Paulo.

CASTRO, F. C. & LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Alma, Corpo e a Antiga Civilização Grega: As Primeiras Observações do Funcionamento Cerebral e das Atividades Mentais: **Psicologia: Reflexão e Critica**. 2011;24(4):798-809.

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

COIMBRA, N. C., EICHENBERGER, G. C., GORCHINSKI, R. T., MAISONNETTE, S. Effects of the blockade of opioid receptor on defensive reactions elicited by electrical stimulation within the deep layers of the colliculus and DPAG. **Brain Res**. 1996; 736 (1-2): 348-52.

COIMBRA, N. C., OSAKI, M. Y., EICHENBERGER, G. C., CISCATO, J. G. Jr., JUCÁ, C. E., BIAGIONE, C. R. Effects of opioid receptor blockade on defensive behaviour elicited by electrical stimulation of the aversive substrates of the inferior colliculus in Rattus norvergicus (Rodentia, Muridae). **Psychopharmacology (Berl)** 2000; 152(4): 422-30.

COIMBRA, N. C., PASCHOALIN-MAURIN, T., BASSI, G. S., KANASHIRO, A., BIAGIONI, A. F. FELIPPOTTI, T. T., ELIAS-FILHO, D. H., MENDES-GOMES, J., CYSNE-COIMBRA, J. P., ALMADA, R. C., LOBAO-SOARES, B. 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. **Braz J Psychiatry.** 2017; 39(1):72-83.

COIMBRA, N. C., CALVO, F., ALMADA, R. C., FREITAS, R. L., PASCHOALIN-MAURIN, T., dos ANJOS-GARCIA, T., ELIAS-FILHO, D. H., UBIALI, W. A., LOBÃO-SOARES, B., TRACEY, I. Opioid neurotransmission modulates defensive behaviour and fear-induced antinociception in dangerous environments. **Neuroscience** 2017; 354: 178-195.

CONTI, F., BARBARESI, P., FABRI, M. Cytochrome oxidase histochemistry reveals regional subdivisions in the rat periaqueductal gray matter. **Neuroscience** 1988; 24(2):629-633.

COSENZA, R. M. Fundamentos de neuroanatomia. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**; 1990.

CRASKE, M. G., RAUCH, S. L., URSANO, R., PRENOVEAU, J., PINE, D. S., ZINBARG, R. E. What is an anxiety disorder? **Depress Anxiety** 2009; 26:1066-85.

CRASKE, M. G., & STEIN, M. B. Anxiety. **Lancet** 2016; 388:3048-59.

CRUZ, A. P. M., LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Modelos animais de ansiedade e o estudo experimental de drogas serotoninérgicas. **Métodos em Neurociência**, 2012; 192-217.

DAMÁSIO, H., GRABOWSKI T., FRANK R., GALABURDA A. M., DAMASIO A. R. The Return of Phineas Gage: Clues About the Brain from the Skull of a Famous Patient. **Science** 1994; 264(5162):1102-5.

DAMÁSIO, A. A estranha ordem das coisas, as origens biológicas dos sentimentos e da cultura. São Paulo, **Companhia das Letras**, 2018.

DAMÁSIO, A. O mistério da consciência. São Paulo: Cia. Das Letras, 2000.

DARWIN, C. The Expression of the Emotions in Man and Animals. London: John Murray, 1872.

da SILVA SOARES, R. Jr., FALCONI-SOBRINHO, L. L., Dos ANJOS-GARCIA, T., COIMBRA, N. C. 5-Hydroxytryptamine 2A receptors of the dorsal raphe nucleus modulate panic-like behaviours and mediate fear-induced antinociception elicited by neuronal activation in the central nucleus of the inferior colliculus. **Behav Brain Res**. 2019; 357-358: 71-81.

DEL-BEM, C. M., & GRAEFF, F. G. Panic Disorder: Is the PAG involved? **Neural Plasticity** 2009; 1-9.

DEL MAESTRO, R. F. Leonardo da Vinci: the search for the soul. Journal of neurosurgery. **J Neurosurg.** 1998;89(5):874-87.

DOLAN, R. J. Emotion, Cognition and Behavior. **Science, New Series** 2002; 5596(298):1191-1194. Disponível em <https://www.jstor.org/stable/3832941>. Acesso em 5 de maio de 2020.

DRISCOLL, M. E. & TADI, P. Neuroanatomy, Inferior Colliculus. **StatPearls Publishing** 2020.

DRONKERS, N. F., PLAISANT, O., IBA-ZIZEN, M. T., CABANIS, E. A. Paul Broca's historic cases: high resolution MR imaging of the brains of Leborgne and Lelong. **Brain.** 2007;130:1432-41.

DROR, O. E. Techniques of the brain and the paradox of emotions, 1880-1930. **Sci Context.** 2001; 14(4): 643-60.

EICHENBERGER, G. C., RIBEIRO, S. J., OSAKI, M. Y., MARUOKA, R. Y., RESENDE, G. C., CASTELLAN-BALDAN, L., CORREA, S. A., da SILVA, L. A., COIMBRA, N. C. 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** 2002; 42(1):48-59.

ESPERIDIÃO-ANTONIO, V., MAJESKI-COLOMBO, M., TOLEDO-MONTEVERDE, D, MORAES-MARTINS, G., FERNANDES, J. J., de ASSIS, M. B., SIQUEIRA-BATISTA, R. Neurobiologia das emoções. **Rev Psiq Clin**. 2008;35(2):55-65.

FANSELOW, M. S, KIM, J. J. The benzodiazepine inverse agonist DMCM as an unconditional stimulus for fear-induced analgesia: Implications for the role of GABAA receptors in fear-related behavior. **Behav Neurosci** 1992; 106: 336–344.

FEINDEL, W. Thomas Willis (1621-1675) – The Founder of Neurology. **Can Med Assoc J.** 1962;87(6):289-96.

GEORGETO, S. M., GARIBA M. A., PARRON, K., COLLONE, A. G. G., AGUIAR, L.R. Evolução cronológica do conhecimento neuroanatomico. **Rev Bras Neurol.** 2016; 52(2):17-22.

GEORGETO, S. M, ZICARELLI, C. A. M., AGUIAR, L. R, GARIBA, M. A., FERNANDES, K. B. P., COLIONE, A. G. G., PESENTE, F. S., SAMPAIO, M. G. Evolução cronológica do conhecimento neuroanatomico: da antiguidade ao pós-renascimento - Part 1. **J Bras Neurocirurg**. 2014: 25(2):127-135.

GLOOR, P., FEINDEL, W. Affective behavior and temporal lobe. In: Monnier M, ed. **Physiologie und pathophysiologie des vegetativen nervensystems: II. Pathologie.** Stuttgart, Hippokrates-Verlag; 1963:685-716.

GUTSTEIN, H. B., AKIL, H. Analgésicos Opióides. In: Hardman, J. G., LIMBIRD, L. E., (editors). Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica. 10ª ed, Rio de Janeiro: Mc Graw-Hill; 2005. P427-464.

GUSMÃO, S., SILVEIRA, R. L., FILHO, G. C. Broca e o nascimento da moderna neurocirurgia. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria.** 2000;58(4):1149-52.

GRAY, J. A., MCNAUGHTON, N. The neuropsychology of anxiety: an enquiry into the functions of the septo-hippocampel system. Oxford University Press. 1982. Pp 548. £27.50. **British Journal of Psychiatry**, 141(6), 634-634.

GRAEFF, F. G., HETEM, L. A. B. Neurobiologia. In: Hetem LAB, Graeff FG. Transtornos de Ansiedade. 1ª edição. São Paulo: Atheneu; 2004. p. 107-132.

GRUTERS, K. G., GROH, J. M. Sounds and beyond: multisensory and other non-auditory signals in the inferior colliculus. **Front Neural Circuits** 2012; 6:96.

HENSCHEN, C., KLINGER, J., RIECHERT, T. Kraniocerebrale korrelationstopographie thalamofrontaler bahnen und gezielte hirnoperationen. **Langenbecks Arch kiln Chir Rev Dtsch Z Chir.** 1953;273:548-565.

HOUNSFIELD, G. N: Computadorized transverse axial scanning (tomography): Part I – description of system. **Brit J Radiol.** 1973; 46:1016.

HURLEY, L. M., SULLIVAN, M. R. From behavioral context to receptors: serotonnergic modulatory pathways in the IC. **Front Neural Circuits**. 2012; 6:58.

JACQUET, Y. F., SQUIRES, R. F. Excitatory amino acids: role in morphine excitation in rat periaqueductal gray. **Behav Brain Res** 1988; 31: 85– 88.

JAMES, W. What is an Emotion? **IN Mind**, vol. 9. N. 34, Abril de 1884, p. 188-205. Disponível em < https://www.jstor.org/stable/2246769?seq=1> Acesso em 16 de abril de 2020.

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

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

JENCK, F., MOREOU, J. L., MARTIN, J. R. Dorsal periaqueductal gray-induced aversion as a simulation of panic anxiety: elements of face and predictive validity. **Psychiatry Res**. 1995: 57:181-91.

KARENBERG, A. Cerebral Localization in the Eighteenth Century – An Overview. Journal of the history of the neurosciences. **J History of the Neurosciences**. 2009;18, 248-253.

KICKHOFEL, E. H. P. Uma falsa lição de anatomia ou de um simples caso de impregnação teórica dos fatos. **Scientiae Studia**. 2003;1(3):389-404.

KICKHOFEL, E. H. P. A lição de anatomia de Andreas Vesalius e a ciência moderna. **Revista Scientiae Studia** 2003;1(3): 389-404.

KLINGER, J., GLOOR, P. The connections of the amygdala and of the anterior temporal cortex in the human brain. **J Comp Neurol.** 1960;115:333-369.

KORPI, E. R., GRÜNDER, G., LÜDDENS, H. Drug interactions at $GABA_A$ receptors. **Prog. Neurobiol**.2002; 67: 113-159.

KURCGANT, D. & PEREIRA, M. E. C. A teoria de John Hughlings Jackson sobre evolução e dissolução do sistema nervoso: observações clinicas, influencias e repercussões. **Rev. Latinoam. Psicop. Fund.** VI, 1, 148-153.

LEDOUX, J. E. Biografia. Disponível em <https://joseph-ledoux.com/pages/ledoux_bio.html> Acesso em 05 de maio de 2020.

LEDOUX, J.E., FARB, C., RUGGIERO, D. A. Topographic organization of neurons in the acoustic thalamus that project to the amygdala. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience** 1990; 10: 1043-54.

LEDOUX, J. E., SAKAGUCHI, A., IWATA, J., D.J. Auditory emotional memories: establishment by projections from the medial geniculate nucleus to the posterior neostriatum and/or dorsal amygdala. **Annals of the New York Academy of Science**, v.444, p. 463-463, 1985.

MANSOUR, A., KHACHATURIAN, H., LEWIS, M. E., AKIL, H., WATSON, S. J. Anatomy of CNS opioid receptors. **Trends Neurosci**. 1988; 11(7): 308-314.

MARTIN, W. R. Pharmacology of opioids. **Pharmacol. Rev**. 1983; 35: 283-323.

MEYER, A. Karl Friedrich Burdach and his place in the history of neuroanatomy. **Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry.** 1970;33(5):553-61.

MISULIS, K. E., HEAD T. C. Netter Neurologia Essencial. **Elsevier Brasil**, 2008.

MOON K., FILIS A. K., COHEN A. R. The Birth and evolution of Neuroscience through cadaveric dissection. **Neurosurgery** 2010; 67:799-810.

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

MOTTA, V., PENHA, K., BRANDÃO, M. L. Effects of microinjections of m and k receptors agonists in the dorsal periaqueductal gray of rats submitted to the plus maze. **Psychopharmacology** 1995; 120: 470– 474.

NASHOLD, B. S., WILSON, W. P., SLAUGTHER, D. G. Sensations evoked by stimulation in the midbrain of man. **Neurosurg.** 1969; 30:14-24.

NETTER, F. H. Atlas de anatomia humana. 5th ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2011.

NOBRE, M. J., RIBEIRO DOS SANTOS, N., AGUIAR, M. S., BRANDÃO, M. L. Blockade of mu- and activation of kappa-opioid receptors in the dorsal periaqueductal gray matter produce defensive behaviour in rats tested in the elevated pus-maze**. Eur. J. Pharmacol.** 2000; 404 (1-2): 145-51.

O'CONNELL, L. A., HOFMANN, H. A. Evolution of a vertebrate social decision-making network. **Science** 2012; 336(6085):1154-1157.

OSAKI, M. Y., CASTELLAN-BALDAN, L., CALVO, F., CARVALHO, A. D., FELIPPOTTI, T. T., de OLIVEIRA, R., UBIALI, W. A., PASCHOALIN-MAURIN, T., ELIAS-FILHO, D. H., MOTTA, V., da SILVA, L. A., COIMBRA, N. C. Neuroanatomical and neuropharmacological study of opioid pathways in the mesencephalic tectum: effect of mu(1)-and kappa-opioid receptor blockade on escape behavior induced by electrical stimulation of the inferior colliculus. **Brain Res** 2003; 992(2): 179-92.

PAVLOV, I. P. Conditioned reflexes. London: **Oxford University Press**; 1927.

PAPEZ, J. W. A proposed mechanism of Emotion. **Arch Neurol Psychiatry** 1997; (38):725-43.

PARENT, A. Felix Vicq d'Azyr: anatomy, medicine and revolution. **Can J Neurol Sci.** 2007;34(1):30-7.

PASCHOALIN-MAURIN, T., dos ANJOS-GARCIA, T., FALCONI-SOBRINHO, L. L., de FREITAS, R. L., COIMBRA, J. P. C., LAURE, C. J., COIMBRA, N. C. The Rodent-versus-wild Snake Paradigm as a Model for Studying Anxiety- and Panic-like Behaviors: Face, Construct and Predictive Validities. **Neuroscience** 2018; 369:336-349.

PAXINOS, G. Neuroscientist discovers hidden region of the human brain. **Neuroscience Research Australia – NeuRA (Channel)**, 20 de novembro de 2018. Disponível em: < https://www.youtube.com/watch?v=M5zsmKZV5-M&t=1s> Acesso em: 13 abr. 2020.

PESSOA, L. AND HOF, P. R. From Paul Broca's Great Limbic Lobe to the Limbic System. **The Journal of Comparative Neurology** 2015; 523(17):2477-2636.

PERGHER, G. K., GRASSI-OLIVEIRA, R., DE AVILA, L. M. STEIN, L. M. Memoria, emoção e humor. **Rev Psiquiatr**. **RS.** 2006;1(28):61-8.

PHELPS, E.A. and LEDOUX, J. E. Contributions of the amygdala to emotion processing: From animal models to human behavior. **Neuron, Elsevier** 2005; 48(2):175-187.

PILCHER, L. S. The Mondino Myth. **Med Library Hist J.** 1906;4(4):311-31.

RANG, H. P., DALE, M. M., RITTER, J., FLOWER, R. J. Rang & Dale: Farmacologia. 6ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2007. p588-609.

RATEY, J. J. A user's guide to the brain: Perception, Attention, and the Four Theaters of the Brain. **Vintage Books** 2001.

REZENDE, J. M. de. Seara de Asclépio: uma visão diacrônica da medicina [Recurso eletrônico] / Joffre Marcondes de Rezende; Vardeli Alves de Moraes; Gil Eduardo Perini. – 2. Ed. – Goiânia: **Editora UFG**, 2018.

RIBAS, G. C. Das trepanações pré-históricas a neuronavegação: evolução histórica das contribuições da neuroanatomia e das técnicas de Neuroimagem a pratica neurocirúrgica. **Arq Bras Neurocir.** 2006; 25(4):166-175.

RIBEIRO, S. J., CISCATO, J. G. JR., DE OLIVEIRA, R., et al. Functional and ultrastructural neuroanatomy of interactive intratectal/tectonigral mesencephalic opioid inhibitory links and nigrotectal GABAergic pathways: involvement of GABAA and mu1-opioid receptors in the modulation of panic-like reactions elicited by electrical stimulation of the dorsal midbrain. **J Chem Neuroanat**. 2005;30(4):184-200.

ROLLS, E. T. Emotion and Decision-Making Explained. **Oxford, Oxford University Press** 2014.

SABBATINI, R. M. E. A História da Psicocirurgia: O Espantoso Caso de Phineas Gage. **Revista Cérebro & Mente**, junho 1997. Disponível em: <http://www.cerebro-mente.org.br/n02/historia/phineas_p.htm>Acesso em: 27 mar. 2020.

SANVITO, W. L., TILBERY, C. P., RIBEIRO-PINTO, L., SOARES, C. A. S., OLIVEIRA, S. V., LANCELLOTTI, C. L. P. Síndrome de Kluver-Bucy determinada por encefalite a vírus. **Arq Neuro-psiquiatria** (São Paulo) setembro 1982; vol 40, n. 3.

SCHENBERG, L. C., BITTERNCOURT, A. S., SUDRE, E. C. VARGAS, L. C. Modeling panic attacks. **Neurosci Biobehav Rev**. 2001; 25:647-59.

SHOJA, M. M., TUBBS, R. S. The history of anatomy in Persia. **J Anat.** 2007; 210(4):359-78.

SILVA, C. & MCNAUGHTON, N. Are periaqueductal gray and dorsal raphe the foundation of appetitive and aversive control? A comprehensive review. **Progress in Neurobiology** 2019; 177:33-72.

STAHL, S. M. Princípios da neurotransmissão Química. Psicofarmacologia: base neurocientífica e aplicações práticas. 2.ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2002.p.1-33.

TREIT, D. Animal models for the study of anti-anxiety agents: a review. **Neurosc Biobehav Rev**. 1985; 9:203-22.

TREVOR, A. J. Drogas sedativo-hipnóticas. In: KATSUNG, B. G. Farmacologia básica e clínica. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. p.255-266.

TUBBS, R. S. LOUKAS, M., SHOJA, M. M., APAYADIN, N. ARDALAN, M. R., SHOKOUHI, G., & OAKES, W. J. Costanzo Varolio (Constantius Varolius 1543-1575) and the Pons Varolli. **Neurosurgery,** 2008; 62(3):734-737.

TWARDOWSCHY, A., & COIMBRA, N. C. μ- and κ-Opioid receptor activation in the dorsal periaqueductal grey matter differentially modulates panic-like behaviours induced by electrical and chemical stimulation of the inferior colliculus. **Brain Res**. 2015; 1597:168-79.

ULLAH, F., dos ANJOS-GARCIA, T., MENDES-GOMES, J., ELIAS-FILHO, D. H., FALCONI-SOBRINHO, L. L., de FREITAS, R. L., KHAN, A. U., OLIVEIRA, R., COIMBRA, N. C. 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. **Behav Brain Res**. 2017; 319:135-147.

VAN DER KOLK, B. A. The Body Keeps the Score: Memory and the Evolving Psychobiology of Posttraumatic Stress. **Harvard Rev Psychiatry** 1994. Vol 1, n. 5.

VAN GIJN, J. Franciscus Sylvius (1614-1672). **J Neurol.** 2001;248(10):915-6.

VAN GIJN, J. Felix Vicq d'Azyr (1748-1794). **J Neurol.** 2009; 256:1384-1385.

WIJDICKS, E. The galling and gifted Franz Joseph Gall. **The Lancet Neurol.** September 04, 2019; DOI: https://doi.org/10.1016/S1474-4422(19)30225-X.

WILLIAMS, L. M. et al. Mode of functional connectivity in amygdala pathways dissociates level of awareness for signals of fear. **Journal of Neuroscience**, Soc Neuroscience 2006; v.26, n.36; 9264-9271.

WALDHOER, M., BARLETT, S. E., WHISTLER, J. L. Opioid receptors. **Annu Rev Biochem.** 2004;73: 953-90.

YASARGIL, M. G. **Microneurosurgery of CNS tumors** (vol. IV A). New York, Thieme; 1994.

YASARGIL, M. G. A legacy of microsurgery: memoirs, lessons and axioms. **Neurosurgery.** 1999; 45(5):1025-92.

ZAGO, S., MERAVIGLIA, M. V. Constanzo Varolio (1543-1575). **J Neurol.** 2009;256(7):1195-6.

ZOLA-MORGAB, S. Localization of brain function: The legacy of Franz Joseph Gall (1758-1828). **Annu Rev Neurosci.** 1995; 18: 359-83.

ZWANZGER, P., RUPPRECHT, R. Selective GABAergic treatment for panic? Investigations in experimental panic induction and panic disorder. **J Psychiatry Neurosci.** 2005;30(3):167-175.

8 ANEXOS

8.1 Anexo 1: Prêmio recebido durante o Doutorado:

2020 Prêmio "Juarez Aranha Ricardo", na XLIII Reunião Anual da SBNeC (13 a 17 de outubro de 2020). Título do trabalho: "HANDLING OF PREY IMPAIRS PHARMACOLOGICAL TREATMENTS OF THE VENTROMEDIAL HYPOTHALAMUS EFFECTS ON INNATE DEFENSIVE RESPONSES EVOKED BY CAVIA PORCELLUS THREATENED BY SNAKES" (de Paiva, Y.B., Coimbra, N.C.)

8.2 Anexo 2: Trabalhos de co-autoria

8.2.1 Artigo publicado (Vieira-Rasteli *et al, Physiology & Behavior,* 2018): "Restricted lesions of the ventrolateral or dorsal columns of the periaqueductal grey promotes distinct effects on tonic immobility and defensive analgesia in guinea pigs". Publicado em Outubro de 2018.

ABSTRACT

Tonic immobility (TI) is an innate defensive response exhibited by prey when physical contact with a predator is prolonged and inescapable. This defensive response is able to activate analgesia mechanisms; this activation has adaptive value because, during an attack by a predator, the manifestation of recuperative behaviors can affect the appropriate behavioral defense strategy. Some studies have suggested that similar structures of the central nervous system can regulate the response of both TI and nociception. Thus, this study evaluated the effect of chemical lesion through the administration of ibotenic acid in restricted brain areas of the periaqueductal gray matter (PAG) in guinea pig on the TI response and nociception evaluated in the hot plate test before and after emission of TI. The data showed that an irreversible chemical lesion in the ventrolateral PAG reduced of the TI response as well as defensive antinociception. However, a lesion in the dorsal PAG blocked the defensive antinociception induced by TI but did not alter TI duration. In summary, one could hypothesize that the neural substrates responsible for defensive behavior and antinociception represent similar systems that are distinct in modulation. Thus, the ventrolateral PAG has been associated with the modulation of TI and the defensive antinociception induced by TI. In contrast, the integrity of the dorsal PAG should be necessary for defensive antinociception to occur but not to elicit TI behavior in guinea pigs.

8.2.2 Artigo publicado (Calvo *et al, Neuropsychobiology*, 2019*)*: "The Blockade of μ1- and κ-Opioid Receptors in the Inferior Colliculus Decreases the Expression of Panic Attack-Like Behaviours Induced by Chemical Stimulation of the Dorsal Midbrain". Publicado em Setembro de 2019)

ABSTRACT

Background: Gamma-aminobutyric acid (GABA)ergic and opioid systems play a crucial role in the neural modulation of innate fear organised by the inferior colliculus (IC). In addition, the IC is rich in GABAergic fibres and opioid neurons, which are also connected to other me encephalic structures, such as the superior colliculus and the substantia nigra. However, the contribution of distinct opioid receptors (ORs) in the IC during the elaboration and expression of innate fear and panic-like responses is unclear. The purpose of the present work was to investigate a possible integrated action exerted by ORs and the GABAA receptor-mediated system in the IC on panic-like responses. Methods: The effect of the blockade of either μ1- or κ-ORs in the IC was evaluated in the unconditioned fear-induced responses elicited by GABAA antagonism with bicuculline. Microinjections of naloxonazine, a μ1-OR antagonist, or nor binaltorphimine (nor-BNI), a κ-OR antagonist, were made into the IC, followed by intramesencephalic administration of the GABAA-receptor antagonist bicuculline. The defensive behaviours elicited by treatments in the IC were quantitatively analysed, recording number of escapes expressed as running (crossing),jumps, and rotations, over a 30-min period in a circular arena. The exploratory behaviour of rearing was also recorded. Results: GABAA-receptor blockade with bicuculline in the IC increased defensive behaviours. However, pretreatment of the IC with higher doses (5 μg) of naloxonazine or nor-BNI followed by bicuculline resulted in a significant decrease in unconditioned fear-induced responses. Conclusions: These findings sugest a role played by μ1- and κ-OR-containing connexions and GABAA receptor-mediated neurotransmission on the organisation of panic attack-related responses elaborated by the IC neurons.

8.2.3 Artigo publicado (da Silva*, et al, Journal of Neural Transmission*, 2020*)*: "Endocannabinoid neuromodulation in the neostriatum decreases the GABAergic striato-nigral disinhibitory function and increases the nigro-collicular inhibitory pathway activity". Publicado em Junho de 2020).

ABSTRACT

We previously reported the involvement of neostriato-nigral projections in the organisation of innate fear and panic attack-like responses organised by dorsal midbrain neurons, such as the periaqueductal grey matter and the deep layers of the superior colliculus (dlSC). In addition, several lines of evidence have demonstrated that cannabinoid receptor type 1 is found in the neostriatum (caudate nucleus and putamen; CPu). In the present study, we investigated the role of endocannabinoid neuromodulation in CPu in the expression of unconditioned fear-related behavioural responses elicited by microinjections of the γ-aminobutyric acid (GABA)A receptor selective antagonist bicuculline (BIC) in the dlSC. Wistar rats received injection of vehicle or anandamide (AEA) at 0.5, 5, 50, 100 pmol in CPu, followed by injections of BIC in a dose of 40 ng in the dlSC. The treatment of the CPu with AEA in a dose of 5 and 50 pmol attenuated the unconditioned fear-related behaviour, such as defensive alertness, defensive immobility and

escape, induced by GABAA receptor blockade in dlSC. These findings suggest that endogenous cannabinoids acting on CPu neurons exert an indirect modulatory influence on the activity of superior colliculus neurons, possibly through an inhibitory activity on neostriato-nigral disinhibitory connections that modulate the nigro-collicular inhibitory GABAergic pathways.