

Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Farmacologia

PALOMA MOLINA HERNANDES

O papel da orexina no núcleo dorsal da rafe na mediação de
respostas defensivas associadas ao pânico.

Ribeirão Preto

2024

PALOMA MOLINA HERNANDES

O papel da orexina no núcleo dorsal da rafe na mediação de respostas defensivas associadas ao pânico.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do grau de doutor em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Hélio Zangrossi Júnior.

Coorientador: Rafael Carvalho Almada

Ribeirão Preto

2024

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

Preparada para a Biblioteca Central do Campus Administrativo de Ribeirão Preto / USP

Hernandes, Paloma Molina

O papel da orexina no núcleo dorsal da rafe na mediação de respostas defensivas associadas ao pânico. Ribeirão Preto, 2024.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Zangrossi Júnior, Hélio.

Coorientador: Almada, Rafael Carvalho.

1. Pânico 2. Orexina 3. Núcleo dorsal da rafe 4. Serotonina 5. Comportamentos defensivos

FOLHA DE APROVAÇÃO

Paloma Molina Hernandez

O papel da orexina no núcleo dorsal da rafe na mediação de respostas defensivas associadas ao pânico.

Tese apresentada para a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção do título de Doutor em Ciências

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Existe um ditado africano que diz ser necessário uma vila para se criar uma criança. Neste caso, foram necessárias algumas vilas para se formar uma doutora. Este trabalho é dedicado a todas as pessoas que formam estas vilas, em especial meus pais e minhas irmãs.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Hélio Zangrossi Júnior, pela oportunidade, incentivo paciência e ensinamentos. Obrigada por sempre ter acreditado e depositado sua confiança em mim ao longo desses seis anos de trabalho.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Rafael Caralho Almada, por ter aberto as portas do seu laboratório e topado embarcar nessa jornada. Obrigada pelo apoio, ensinamentos, parceria, por sempre acreditar e me incentivar a ir mais longe.

Aos membros da banca examinadora, por aceitarem o convite, pela prontidão e disponibilidade. Agradeço desde já pelas enriquecedoras sugestões e discussões.

A CAPES, CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro

Ao técnico e amigo Afonso Paulo Padovan, que fez o possível e o impossível para me ajudar durante esses anos. Obrigada pelas risadas, pelos ensinamentos, pelo cafezinho feito de improviso e por tornar meus dias mais leves.

Aos professores do departamento de farmacologia da FMRP que contribuíram para a minha formação acadêmica.

Aos funcionários da FMRP e do Departamento de Farmacologia. Agradeço em especial a Gislaine e a Walkira, obrigada por todo cuidado, carinho e atenção comigo ao longo desses anos. Vocês tornaram essa caminhada muito mais leve e alegre.

Aos membros antigos e recentes do laboratório da Farmacologia do Comportamento, Jefferson, Arthur, Barbara, Jhonatan, Matheus e Heloisa por toda ajuda nos experimentos, risadas e momentos de descontração. Um agradecimento especial á Alana e ao Cristian por serem meus coorientadores não oficiais que me ensinaram toda a parte técnica e

estavam sempre disponíveis para as discussões teóricas. Sem o apoio e ajuda de vocês, a realização deste projeto não teria sido possível.

Aos membros do laboratório de neurobiologia e neurobiotecnologia: Gabi, Marrie, Lana, Gi, Lais, Felipe, Solove, Monali, Ariel, Akemi. Foi um privilégio dividir um pouquinho do que eu sei e aprender com vocês.

Ao Cristian, Izabela, Eliza, Nicolas, Thati e Kiara por terem me recebido tão bem na casa de vocês, por toda preocupação, cuidado, pelos momentos de descontração e por toda ajuda ao longo dessa caminhada. Obrigada por terem acreditado no meu potencial e aberto diversas portas. O desafio de morar em outro país se tornou mais fácil com a ajuda de vocês. Muito obrigada!

A Lia, Gaby, tina, Alana, Vitor e Britinha, por terem me acolhido na casa de vocês e me tornarem parte da família. Obrigada por todo suporte, pelas vídeos-chamadas quando eu estava longe, pelos jogos ao telefone, risadas, roles, cuidado e por sempre acreditarem e me incentivarem. Vocês são parte fundamental dessa caminhada e da minha vida. Amo vocês.

A Gabi, Gui e Livia por sempre me receberem tão bem na casa de vocês, pelos roles e discussões aleatórias, pelo carinho e pelas risadas. Obrigada por me deixarem fazer parte da vida de vocês.

Ao Sege pelo apoio e incentivo constante nesta reta final. Obrigada por confiar e acreditar em mim, pelo cuidado, pelas risadas e por tornar tudo mais leve. Você foi um presente inesperado e bonito que a vida me deu.

A toda minha família que sempre esteve ao meu lado, acreditando em mim. Em especial aos meus avós, meu tio Lilinho e a minha afilhada Lis. Lis você nem imagina a força, alegria e coragem que seu nascimento me trouxe.

As minhas irmãs Natáli, Letícia e Maria Eduarda e também a melzinha e ao torresmo por serem minha fonte inesgotável de leveza e alegria. Com vocês tudo é sempre mais fácil e colorido. Letícia e Yago obrigado por toda força, pelas conversas longas ao telefone, que me fizeram sentir em casa mesmo a quilômetros de distância. por aguentarem e ajudarem nas minhas crises existenciais, pelo incentivo e por todo amor. Lela você sempre vai ser minha alegria.

Aos meus pais, Ândrea e Marco, que desde pequena incentivam e me ajudam a realizar todos os meus sonhos. Obrigada por serem porto seguro, por tornarem nossa casa meu refúgio. Por entenderem as ausências, acolherem meu choro e sempre me incentivarem a ir mais longe. A menina que brincava de ser cientista agora vai ser doutora graças a vocês! O amor de vocês é a base que me mantém de pé e me faz ser quem eu sou hoje. Essa conquista é de vocês!

E por fim, agradeço a toda a minha ancestralidade e a espiritualidade que me protege e guarda. Obrigada por abrirem e cuidarem dos meus caminhos. Com vocês eu sei que nunca ando só!

Resumo

Hernandes, Paloma Molina. **O papel da orexina no núcleo dorsal da rafe na mediação de respostas defensivas associadas ao pânico.** 2024. Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2024.

O envolvimento do sistema serotoninérgico com a fisiopatologia do transtorno do pânico (TP) é reconhecida há décadas. No sistema nervoso central a serotonina é encontrada em sete núcleos específicos, dentre os quais destaca-se o núcleo dorsal da rafe (NDR), principal fonte de inervação serotoninérgica para estruturas encefálicas criticamente envolvidas na fisiopatologia do TP, como a substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPd). Sabe-se que na SCPd, a serotonina promove efeito de reduzir a expressão de respostas fuga, comportamento consistentemente associado ao pânico, em diferentes modelos animais. Recentemente, o papel desempenhado por projeções orexinérgicas que partem do hipotálamo lateral, área perifornical e do hipotálamo dorso-medial têm merecido crescente atenção devido a sua capacidade de modular a expressão de comportamentos defensivos relacionados ao pânico. Estudos recentes mostram que a orexina-A (OXA) no NDR é capaz de excitar neurônios serotoninérgicos, o que presumivelmente acarretaria um aumento de liberação de serotonina para áreas como a SCPd, ocasionando um possível efeito panicolítico. No entanto, esta hipótese ainda não foi avaliada experimentalmente. O objetivo geral do presente trabalho foi o de investigar o papel da OXA no NDR, mais especificamente no subnúcleo asas-laterais, na modulação de respostas de fuga em camundongos, através do emprego de modelos de pânico respiratório e não respiratório. Para tal, no experimento 1, investigamos o papel dos receptores orexinérgicos do tipo 1 (OX1R) localizados nas asas-laterais, através da administração local do antagonista SB 334867 e da própria OXA, na modulação do comportamento de fuga medido no modelo experimental de exposição a uma alta concentração de CO₂ (20%). Os resultados obtidos demonstram que a injeção intra-asas-laterais do antagonista do OX1R não alterou o número de saltos e nem a atividade locomotora dos animais. Já a injeção da maior dose de OXA (28pmol/50nl) foi capaz de reduzir o número de saltos sem alterar a atividade locomotora, sugerindo um efeito panicolítico. Na sequência, ainda utilizando o teste de exposição ao CO₂, investigamos o papel dos receptores 5-HT1A da SCPd na mediação das consequências comportamentais decorrentes da estimulação farmacológica de receptores OX1R nas asas-laterais do NDR. Os resultados mostraram que a injeção prévia do antagonista de

receptores 5-HT1A WAY-100635 na SCPd bloqueou o efeito de redução de saltos provocado pela injeção de OXA. Na segunda etapa do trabalho, a fim de verificar a generalidade de nossos achados, investigamos as consequências de injeções intra-asas laterais de OXA em camundongos submetidos ao “Beetle mania task” (BMT), usado como modelo de pânico não respiratório. Antes desta análise, procuramos validar este teste para o uso em nosso laboratório. Verificamos que a linhagem de camundongos C57Bl/6 é que a mais expressa respostas de fuga quando comparada às linhagens Balbc, Swiss e CD1. Em camundongos C57Bl/6, a droga panicolítica alprazolam reduziu o número de fugas horizontais e salto, além de aumentar a tolerância ao besouro-robô. Já o ansiolítico diazepam reduziu o número de fugas horizontais. Por sua vez o tratamento crônico com a fluoxetina não alterou nenhum dos comportamentos observados. Em relação as consequências de injeções de OXA nas asas-laterais, os resultados mostraram que a OXA em sua maior dose aumentou o número de saltos, sem alterar os demais comportamentos analisados. Os resultados obtidos indicam o envolvimento da OXA nas asas-laterais do NDR na modulação dos comportamentos defensivos relacionados ao pânico. No entanto, a direção desta regulação parece depender do estímulo panicogênico empregado.

Palavras-chave: transtorno do pânico, núcleo dorsal da rafe, orexina, serotonina, exposição ao CO₂, beetle mania task.

Hernandes, Paloma Molina. **The role of orexin in the dorsal raphe nucleus on the modulation of panic-like behaviors.**2024. PhD Thesis – School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2024.

The involvement of the serotonergic system in the pathophysiology of panic disorder (PD) has been recognized for decades. The dorsal raphe nucleus (DRN) is the main source of serotonin innervation to encephalic structures involved in the pathophysiology of PD, such as the dorsal periaqueductal gray matter (dPAG). A wealth of evidences indicates that the serotonin in the dPAG promotes the effect of reducing the expression of escape responses, a behavior consistently associated with panic, in different animal models. Recently, the role played by orexinergic projection, originated from lateral hypothalamus, perifornical area and dorsomedial hypothalamus, have increasing attention due to their ability to modulate the expression of defensive behaviors related to panic. Electrophysiology studies show that orexin-A (OXA) in the DRN is capable of exciting serotonergic neurons, suggesting a potential increase in serotonin release within the dPAG, which would lead to a panicolytic effect. However, this hypothesis has not been evaluated experimentally. In this study, we investigated the role of OXA in the DRN, more specifically in the lateral wings area, on the modulation of escape behavior in mice, using respiratory and non-respiratory panic models. The experiment 1 shows no effect of SB 334867, antagonist of orexinergic type 1 receptor (OX1R), injections in the lateral wings of the DRN on the number of jumps and locomotor activity in mice exposed to 20% of CO₂. In the meantime, the injection of the highest dose of OXA (28 pmol/50nl) was able to reduce the number of jumps without altering locomotor activity, indicating a panicolytic effect. Next, we investigated the involvement of 5-HT_{1A} receptors in the dPAG in mediating the behavioral consequences resulting from pharmacological stimulation of OX1R receptors in the lateral wings. The results show that the previous injection of the 5-HT_{1A} receptor antagonist WAY-100635 in the SCPd blocked the jump

reduction effect caused by OXA injections in the lateral wing of the DRN. In order to verify the generality of our findings, in the second stage of this study we investigated the consequences of OXA injections in the lateral wings in mice exposed to the “Beetle mania task (BMT), used as a model of non-respiratory panic. Prior to this analysis, we validated this test for use in our laboratory. We found that the C57Bl/6 mouse line expresses more escape behaviors when compared to the Balbc, Swiss and CD1 lines. In C57Bl/6 mice, the panicolytic drug alprazolam reduced the number of horizontal escapes and jumps, in addition to increasing tolerance to the robot beetle. The anxiolytic diazepam reduced the number of horizontal escapes and the chronic treatment with fluoxetine did not change any of the observed behaviors. Regarding the consequences of lateral wings injections of OXA, the results showed that OXA at its highest dose increased the number of jumps, without changing the other behaviors analyzed. The results obtained indicate the involvement of OXA specifically in the lateral wings of the DRN on the modulation of defensive behaviors related to panic. However, the direction of this regulation appears to depend on the stimulus inducing the defensive response associated with panic.

Keywords: panic disorder, dorsal raphe nucleus, serotonin, orexin, CO₂ exposure, beetle mania task.

Sumário

INTRODUÇÃO	16
Transtornos de ansiedade	16
Pânico respiratório e não respiratório.....	18
Fisiopatologia do TP	21
Serotonina, núcleo dorsal da rafe e o TP.....	24
O sistema orexinérgico e o TP	27
OBJETIVOS	36
Objetivos específicos.....	36
ETAPA 1: Estudo do papel da OXA nas asas laterais do NDR sobre o comportamento de fuga de camundongos expostos a altas concentrações de CO₂	38
MATÉRIAS E MÉTODOS	38
Animais	38
Teste de exposição a altas concentrações de CO ₂	38
Drogas	39
Cirurgia estereotáxica.....	40
Procedimentos e delineamento experimental	40
Histologia	42
Análise estatística.....	42
RESULTADOS	43
ETAPA 2: Efeito da OXA na asa-lateral do NDR em camundongos submetidos ao BMT	50
MATÉRIAS E MÉTODOS	50
Animais	50
Drogas	50
Beetle Mania Task (BMT)	51
Procedimentos e delineamento experimental	52
Análise estatística.....	53
RESULTADOS	55
DISCUSSÃO	64
CONCLUSÃO	74
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

Introdução

INTRODUÇÃO

Transtornos de ansiedade

A ansiedade é um estado emocional subjetivo de antecipação, que pode ser caracterizado por alterações emocionais, fisiológicas cognitivas frente à expectativa de uma situação indeterminada e imprecisa (AMERICAN PSYCHIATRY ASSOCIATION., 2013). Assim como o medo, a ansiedade é uma emoção essencial para a sobrevivência que possui grande valor adaptativo, estando associada à tensão muscular, vigilância e comportamentos cautelosos ou de esquivas. Embora até determinado nível a ansiedade possa favorecer a motivação e o desempenho individual, quando manifestada em níveis exacerbados e persistentes, pode tornar-se patológica e prejudicar o desempenho regular do indivíduo (CRASKE; STEIN, 2016; GRAEFF, 1999).

Com o intuito de auxiliar na caracterização e diagnose, a Associação Norte Americana de Psiquiatria, de acordo com critérios operacionais baseados nos sintomas, sistematizou os diversos tipos de ansiedade patológica, também chamados de transtornos, no Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM). Em sua quinta edição (DSM-V), esses transtornos são descritos nas seguintes categorias: transtorno de ansiedade de separação, mutismo seletivo, fobia social, agorafobia, transtorno de ansiedade generalizada, transtorno de ansiedade induzido por substâncias ou medicamentos, transtornos de ansiedade devido à condição médica, transtorno de ansiedade com outras especificações, transtorno de ansiedade não especificado e o transtorno do pânico (TP) (AMERICAN PSYCHIATRY ASSOCIATION., 2013).

O TP, principal foco do presente trabalho, é caracterizado pela ocorrência de ataques de pânico inesperados e recorrentes, que podem gerar preocupações acerca da ocorrência de novos ataques. Durante um ataque de pânico, o paciente vivencia sensações de intenso medo e desconforto, que atingem seu pico em poucos minutos e são

acompanhadas de quatro ou mais sintomas físicos e cognitivos, a saber: palpitações, taquicardia, sudorese, tremores, sensação de falta de ar ou sufocamento, sensação de asfixia, dor ou desconforto no peito, náusea ou desconforto abdominal, vertigens, calafrios ou sensação de calor, parestesias, desrealização ou despersonalização, medo de perder o controle ou de enlouquecer, medo de morrer (AMERICAN PSYCHIATRY ASSOCIATION., 2013). Trata-se de uma patologia muitas vezes incapacitante e observa-se que os pacientes geralmente procuram vários atendimentos clínicos e emergenciais, até que o diagnóstico seja feito, devido aos sintomas físicos e psíquicos experienciados durante um ataque de pânico, causando um elevado custo econômico (BATELAAN et al., 2007; CHOU, 2010; SALUM; BLAYA; MANFRO, 2009).

Em termos epidemiológicos, um estudo de meta-análise, realizado em 2017, demonstrou que a prevalência de TP ao redor do mundo (levando-se em conta 25 países por todo o globo) é de 1,7%, sendo que em média, o início da patologia se dá aos 32 anos (JONGE et al., 2017). No Brasil, especificamente na cidade de São Paulo, a prevalência do TP ao longo de um ano é de 1,1%, sendo que 56,6% desses indivíduos apresentam a patologia com grande severidade (ANDRADE et al., 2012).

O tratamento para TP pode ser feito através de abordagens psicológicas e/ou pelo uso de drogas (BANDELOW; MICHAELIS, 2015), sendo este o mais frequentemente indicado por reduzir de forma eficaz a ocorrência e severidade dos ataques de pânico em tempo mais curto do que as psicoterapias (BANDELOW et al., 2008; DU et al., 2021; FREIRE et al., 2011). O tratamento farmacológico é realizado com o uso de antidepressivos, principalmente os inibidores seletivos de recaptção de serotonina (ISRS), como a fluoxetina e o escitalopram, além dos benzodiazepínicos de alta potência, como alprazolam e o clonazepam (GRAEFF; ZANGROSSI, 2021). Apesar de diversos estudos demonstrarem que não existe diferença entre as duas classes quanto a eficácia e

aceitabilidade pelo paciente (CHAWLA et al., 2022; DU et al., 2021; KASPER; RESINGER, 2001), o uso prolongado de benzodiazepínicos é desencorajado, devido ao risco de dependência e outros efeitos adversos, sendo os ISRS a primeira linha de tratamento (BALDWIN et al., 2014; DU et al., 2021; LÓPEZ-MUÑOZ; ÁLAMO; GARCÍA-GARCÍA, 2011; MOCHCOVITCH; NARDI, 2010; SZUHANY; SIMON, 2022).

Pânico respiratório e não respiratório

O termo “transtorno do pânico” apareceu pela primeira vez em uma classificação médica oficial na terceira edição do DSM (DSM-III) em 1980. O DSM-III dividiu a neurose ansiosa em transtorno do pânico (ansiedade aguda) e transtorno de ansiedade generalizada (ansiedade crônica), criando critérios operacionais para cada categoria diagnosticada. Esta separação foi baseada, principalmente, nos trabalhos de Donald Klein com a imipramina (antidepressivo tricíclico) realizados durante a década de 60 (KLEIN, 1964; KLEIN; FINK, 1962). Mais especificamente, Klein (1964) observou que o tratamento com a imipramina era eficiente em pacientes com ataques de ansiedade (ataques de pânico) mas não nos pacientes com ansiedade crônica. Ele também distinguiu três tipos de ataques de pânico: espontâneos, situacionais (associados a uma situação agorafóbica) e aquelas provocadas por estímulo fóbico constante (animais, altura, escuridão, etc.) (KLEIN, 1964).

Desde a categorização nosológica do TP dentro dos transtornos de ansiedade, diversas evidências sugerem uma ligação entre o TP e os distúrbios respiratórios (BOUDREAU et al., 2015; FAVREAU et al., 2014; GOODWIN et al., 2010; HASLER et al., 2005; PERNA et al., 1997; POLLACK et al., 1996; PORZELIUS; VEST; NOCHOMOVITZ, 1992; POTHIRAT et al., 2015; VÖGELE; VON LEUPOLDT, 2008).

Por exemplo, a prevalência do TP é significativamente maior em asmáticos (BOUDREAU et al., 2015; GOODWIN et al., 2010; PERNA et al., 1997), pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica (FAVREAU et al., 2014; NARDI, 2009; VÖGELE; /VON LEUPOLDT, 2008) e em pessoas que sofreram eventos traumáticos de sufocação (BOUWER; STEIN, 1997). Além disso, desafios respiratórios como apneia (NARDI et al., 2003, 2006a), hipóxia (BECK; OHTAKE; SHIPHERD, 1999; BECK; SHIPHERD; OHTAKE, 2000) ou inalação de ar enriquecido com CO₂ (GORMAN; MCKENZIE; GANDEVIA, 1999), podem desencadear ataques de pânico.

A associação entre alterações nos parâmetros fisiológicos relacionados à respiração e o TP é o ponto chave da teoria do falso alarme de sufocação, proposta por Klein em 1993, uma das teorias mais proeminentes sobre a etiologia do TP. De acordo com esta teoria, pacientes com TP são /hipersensíveis ao aumento de CO₂ (KLEIN, 1993) e/ou à diminuição de O₂ (PRETER; KLEIN, 2008). Mais especificamente, Klein (1993) propõe que “o ataque de pânico espontâneo ocorre quando o monitor de sufocamento do cérebro sinaliza erroneamente uma falta de ar útil, desencadeando assim um falso alarme de sufocação”.

Desde então, diversos métodos de desafios respiratórios, baseados no aumento da pressão parcial de CO₂, têm sido empregados em estudos com seres humanos para investigar o TP (para mais detalhes ver GUAN; CAO, 2023; OKURO et al., 2020). Por exemplo, inalar uma ou duas vezes uma mistura gasosa contendo 35% de CO₂ resulta na precipitação de ataques de pânico, sendo estes efeitos mais exacerbados em pacientes com TP (GRIEZ; LOUSBERG; VAN DEN HOUT, 1987; NARDI et al., 2006b; PERNA et al., 1994). Ademais, a inalação de ar enriquecido com CO₂, variando de 5% a 7%, por até 20 minutos precipita mudanças autonômicas e psicológicas, tais como aumento da frequência respiratória e cardíaca, sensação de medo, dor no peito, falta de ar e tonturas,

que se assemelham ao desencadeamento de um ataque de pânico que ocorre naturalmente (GORMAN; MCKENZIE; GANDEVIA, 1999; SANDERSON; RAPEE; BARLOW, 1988).

Embora os sintomas respiratórios fossem uma característica central do TP, Klein observou que isso não se aplicava a todos os pacientes, sendo o primeiro a propor a existência de subtipos de TP (KLEIN, 1993). Neste mesmo ano, durante a fase II de um estudo clínico com 1.168 pacientes, Briggs e colaboradores (1993) sugeriram a divisão de pacientes com TP em dois grupos caracterizados pela presença ou ausência de sintomas respiratórios proeminentes. Neste mesmo estudo foi também observado que apesar dos dois grupos não diferirem nas variáveis demográficas ou nos diagnósticos coexistentes, o grupo com sintomas respiratórios proeminentes sofreu mais ataques de pânico espontâneos e respondeu melhor ao tratamento com a imipramina. Já o grupo sem sintomas respiratórios proeminentes sofreu mais ataques de pânico situacionais e respondeu melhor ao tratamento com o alprazolam (BRIGGS; STRETCH; BRANDON, 1993).

Diante deste estudo, Briggs e colaboradores (1993) propuseram como critério para a classificação de pacientes com TP no subgrupo respiratório, que estes apresentem pelo menos quatro dos cinco sintomas: medo de morrer, falta de ar, sensação de sufocamento, dor no peito, engasgo, e parestesia (episódios de hiperventilação reduzem os níveis de CO₂ no sangue, levando à alcalose respiratória e culminando em parestesia).

Utilizando tais critérios, estudos posteriores investigaram a incidência do subgrupo respiratório em pacientes diagnosticados com TP (para revisão ver (OKURO et al., 2020). Por exemplo, em um estudo conduzido no Brasil com uma amostra de 193 pacientes diagnosticados com TP, 56,5% (n=109) foram classificados no subtipo

respiratório (FREIRE et al., 2007). Em um outro estudo, utilizando uma amostra de 2.257 indivíduos de seis países europeus, verificou-se que a prevalência de ataques de pânico com características respiratórias representou 70% dos casos e esteve associado ao aumento da utilização dos serviços de saúde (FULLANA et al., 2011).

Em termos de resposta ao tratamento, estudos demonstraram que a administração prévia de uma única dose de benzodiazepínico (como alprazolam ou clonazepam) pode neutralizar o efeito desencadeado pela exposição ao CO₂ (BALLENGER, 1990; E. NARDI et al., 2013). Além disso, o tratamento com ISRS e antidepressivos tricíclicos também reduz a sensibilidade ao CO₂ em pacientes com TP (para revisão ver (FREIRE; NARDI, 2012; OKURO et al., 2020). Notavelmente, pacientes no subgrupo respiratório que receberam tratamento com benzodiazepínicos ou antidepressivos tricíclicos apresentaram uma melhora mais rápida do que aqueles no grupo não respiratório. Entretanto, a longo prazo, a eficácia do tratamento foi similar em ambos os grupos (NARDI et al., 2003, 2005).

Embora o emprego de desafios respiratórios em estudos com seres humanos seja uma estratégia útil para se estudar experimentalmente ataques de pânico, eles apresentam limitações em relação ao seu potencial de elucidar os mecanismos moleculares envolvidos nesse transtorno (GUAN; CAO, 2023; MOREIRA et al., 2013). Nesse sentido, a utilização de animais de laboratório se torna indispensável, representando uma das ferramentas essenciais para a compreensão da fisiopatologia do TP (GUAN; CAO, 2023; MOREIRA et al., 2013; ZANGROSSI; GRAEFF, 2014).

Fisiopatologia do TP

O uso de modelos animais para o estudo de emoções como o medo e a ansiedade baseia-se na perspectiva evolutiva, alicerçada na obra "The Expression of the Emotions

in *Man and Animals*", publicada originalmente por Darwin em 1872. Nesta obra, Darwin propõe a existência de uma relação filogenética entre as emoções humanas e os comportamentos observados em outros animais. Sob esse ângulo, é possível inferir que as emoções relacionadas ao medo, tais como a ansiedade, têm suas origens biológicas nas reações defensivas dos animais diante de estímulos que representam ameaças à sobrevivência (GRAEFF, 1999; DARWIN, 1872; MCNAUGHTON, 2011).

Baseando-se nessa proposição evolutiva, Blanchard e Blanchard (1988) realizaram diversos estudos utilizando ratos selvagens e de laboratório submetidos a estímulos ameaçadores, e propuseram a existência de três níveis principais de ameaça (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988; BLANCHARD; FLANNELLY; BLANCHARD, 1986; BLANCHARD et al., 1993). O primeiro nível é atribuído a uma ameaça potencial: o predador não está presente no ambiente, mas existem pistas de que já esteve ali, o que ocasiona comportamentos de exploração cautelosa e avaliação de risco. Esses comportamentos também podem ser observados quando o animal é exposto a um ambiente novo. Este nível fornece uma medida indireta relacionada à ansiedade, ocorrendo o recrutamento de estruturas como o córtex pré-frontal medial (mPFC), o hipocampo e o núcleo basolateral da amígdala (BLA) (GRAEFF, 1994; MCNAUGHTON; CORR, 2004; MCNAUGHTON; GRAY, 2000). Enquanto o mPFC está associado ao controle cognitivo, emergindo como o principal candidato para o controle "de cima para baixo" das respostas ligadas ao medo e ao controle de impulsos (CARLÉN, 2017; GREENBERG et al., 2013; NARAYANAN; HORST; LAUBACH, 2006) o BLA e o hipocampo fornecem informações de memória, evocando experiências passadas para prever as ações futuras da ameaça. Neste cenário, o hipocampo age como comparador e solucionador de conflitos de cunho cognitivo e emocional e o BLA como

responsável pelo caráter afetivo associado à ansiedade (BULLEY; HENRY; SUDDENDORF, 2017; MCNAUGHTON; CORR, 2004; MOBBS et al., 2020).

O segundo nível, consiste na presença de uma ameaça, porém ainda em uma distância segura, sendo adotado o comportamento de fuga orientada ou de imobilidade, dependendo da existência ou não de uma rota de fuga viável (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988; BLANCHARD et al., 1993; MOBBS et al., 2020). Neste nível, os comportamentos defensivos podem tornar-se cada vez mais dependentes do hipotálamo e da substância cinzenta periaquedutal (SCP) e menos do mPFC e hipocampo (MOBBS, 2018; MOBBS et al., 2020). Neste nível, o sistema de defesa do hipotálamo medial (HM) é o responsável pela integração de informações sensoriais provenientes da ameaça, do contexto e do estado interno do animal (CANTERAS, 2002; GROSS; CANTERAS, 2012; MENDES-GOMES et al., 2020). Os núcleos hipotalâmicos deste sistema projetam-se para a parte dorsal da SCP e do colículo superior que efetuam os comportamentos defensivos (CANTERAS; GRAEFF, 2014; GROSS; CANTERAS, 2012; MOBBS et al., 2020).

O terceiro nível é atribuído a uma ameaça proximal, na qual o predador/estímulo aversivo encontra-se muito próximo ou em contato com a presa, gerando respostas de fugas explosivas ou ataques defensivos e está ligada à condição de medo intenso/pânico recrutando estruturas como o hipotálamo dorsomedial (HDM) e a SCP (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988; BLANCHARD et al., 1993; GRAEFF, 1994; MOBBS et al., 2020; SHUHAMA et al., 2007).

Diversas evidências clínicas e experimentais indicam que os ataques de pânico estão relacionados à ameaça proximal, que é organizada principalmente pela parte dorsal da SCP (SCPd) (GRAEFF, 2004; MOBBS et al., 2020; REIS et al., 2023). Neste contexto, estudos demonstraram, que tanto a estimulação química como elétrica da SCPd induzem

comportamentos de fuga em roedores (AGUIAR; GUIMARÃES, 2009; BRANDAO et al., 1986; CARVALHO et al., 2018; EICHENBERGER et al., 2002; GRAEFF, 1991; VIANNA et al., 2003). Mais especificamente, a ativação optogenética de neurônios excitatórios na SCPd induziu respostas de fuga em camundongos submetidos ao teste de exposição a predadores (DENG; XIAO; WANG, 2016). Em comparação com estimulações elétricas e químicas, a estimulação optogenética fornece especificidade celular e alta resolução temporal sem ativar fibras de passagem (YIZHAR et al., 2011).

De modo similar, estudos mostram que a estimulação elétrica desta estrutura em humanos causa sensações de intenso medo e terror, além de alterações autonômicas como taquicardia e sudorese (NASHOLD; WILSON; SLAUGHTER, 1969; YOUNG, 1989). Além disso, estudos utilizando ressonância magnética funcional (RNMF) demonstraram um aumento da atividade da SCP em indivíduos expostos a ameaças virtuais próxima e em decisões de fuga rápida (MOBBS et al., 2010, 2020; QI et al., 2018).

Serotonina, núcleo dorsal da rafe e o TP

Além da ativação de substratos neurais específicos, vários neurotransmissores têm sido implicados na modulação dos comportamentos defensivos, tais como a serotonina, o glutamato, o ácido gama-aminobutírico (GABA), o óxido nítrico, os endocanabinóides (CAROBREZ; TEIXEIRA; GRAEFF, 2001; FALCONI-SOBRINHO et al., 2023; HERNANDES et al., 2023; JOHNSON; SHEKHAR, 2012; LI et al., 2019; VIANA et al., 2019; ZANGROSSI et al., 2001).

O envolvimento do sistema serotoninérgico com a fisiopatologia do TP é reconhecido há décadas (GRAEFF, 2004; LOWRY et al., 2005; MARTA et al., 2020). Esta neurotransmissão recebe grande destaque devido ao fato de que o mecanismo de ação de fármacos de primeira escolha para tratar este transtorno, assim como outras

patologias de ansiedade, envolve a facilitação desta neurotransmissão (GRAEFF, 2017; GUIMARÃES et al., 2010; MOCHCOVITCH; NARDI, 2010). No sistema nervoso central, a serotonina (5-HT) é encontrada em sete núcleos específicos, localizados no tronco cerebral, denominados de núcleos da rafe. Dentre eles, o núcleo dorsal da rafe (NDR) se destaca por ser a principal fonte de inervação serotoninérgica para estruturas límbicas relacionadas com a fisiopatologia dos transtornos de ansiedade (AZMITIA; SEGAL, 1978; DAVID; GARDIER, 2016; LOWRY et al., 2005)

O NDR não é uma estrutura homogênea, sendo composto por vários subnúcleos, a saber: dorsal (DRD), ventral (DRV), asas-laterais, caudal (DRC) e interfascicular (DRI) (ABRAMS et al., 2004; MUZERELLE et al., 2016; STEINBUSCH, 1981). Tais subnúcleos apresentam agrupamentos de neurônios serotoninérgicos morfológica e funcionalmente distintos, além de terem projeções para estruturas distintas (ABRAMS et al., 2005; CALIZO et al., 2011; HALE; SHEKHAR; LOWRY, 2012; REN et al., 2018). É digno de nota que além de neurônios serotoninérgicos, nestes subnúcleos também estão localizados neurônios GABAérgicos, glutamatérgicos e nitrérgicos (MICHELSEN; SCHMITZ; STEINBUSCH, 2007; REN et al., 2018)

O NDR encontra-se no cerne do modelo teórico proposto por Deakin e Graeff (1991) para explicar o papel da 5-HT nos transtornos de ansiedade. Baseados em dados clínicos e experimentais, esses pesquisadores sugeriram a existência de duas vias serotoninérgicas distintas, originadas no NDR, que participam na regulação das respostas de defesa frente a estímulos aversivos (DEAKIN; GRAEFF, 1991). De acordo com esse modelo teórico, projeções serotoninérgicas originadas no NDR, presumivelmente dos subnúcleos DRD e DRC (MATTHIESEN et al., 2020), aumentam os níveis de ansiedade devido ao aumento da liberação de 5-HT em áreas prosencefálicas, com a amígdala basolateral e o córtex frontal. Já projeções que inervam a SCPd, presumivelmente

oriundas das asas-laterais do NDR (PAUL et al., 2014), diminuem a resposta de fuga, relacionada ao pânico, devido ao aumento de 5-HT nesta estrutura. Além da SCPd, outras evidências indicam que a facilitação da neurotransmissão serotoninérgica no HDM, uma outra estrutura envolvida no TP (ABREU et al., 2020; JOHNSON; SHEKHAR, 2012), também inibe a resposta de fuga, de maneira similar ao que ocorre na SCPd (DE BORTOLI; YAMASHITA; ZANGROSSI, 2013; NASCIMENTO et al., 2014). Este efeito anti-pânico da 5-HT, tanto na SCPd como no HDM, é mediado por receptores do subtipo 1A e 2A (NASCIMENTO et al., 2014; POBBE et al., 2011; ZANOVELI et al., 2010).

Dentro desta perspectiva, diversos trabalhos mostram o envolvimento diferencial destes subnúcleos na modulação de respostas defensivas relacionadas à ansiedade e ao pânico (BATISTELA et al., 2021; JOHNSON et al., 2008, 2005; SPIACCI; COIMBRA; ZANGROSSI, 2012; VILELA-COSTA et al., 2019). Por exemplo, Spiacci e colaboradores (2012), utilizando o labirinto em T elevado (LTE) e a técnica de marcação imunoistoquímica para a proteína cFOS (marcador indireto de ativação neuronal) e para a enzima triptofano hidroxilase (marcador de neurônios serotoninérgicos), demonstraram que a esquivas inibitória, relacionada com a ansiedade, recrutava neurônios serotoninérgicos nos subnúcleos DRD, DRC e DRI, enquanto que na fuga, relacionada com o pânico, a ativação ocorre em neurônios não-serotoninérgicos localizados nas asas-laterais do NDR e na SCPd. Na mesma direção, Batistela e colaboradores (2021) demonstraram que, tanto em ratos machos quanto em fêmeas, a exposição a 7% de O₂, que gera respostas de fugas nesses animais, recrutou neurônios não-serotoninérgico nas asas-laterais do NDR (BATISTELA et al., 2021).

Vilela-Costa e colaboradores (2019) mostraram que o efeito panicolítico decorrente do tratamento crônico com a fluoxetina, inferido pela inibição da resposta de

fuga no LTE, leva a uma diminuição na ativação de neurônios não-serotonérgicos e um aumento no recrutamento de neurônios serotonérgicos localizados especificamente nas asas-laterais do NDR. Assim, o aumento no recrutamento de neurônios serotonérgicos, levaria a um aumento na liberação de 5-HT para áreas como a SCPd, ocasionando a inibição da resposta de fuga (VILELA-COSTA et al., 2019). Quanto ao fenótipo das células não serotonérgicas ativadas por esses estímulos panicogênicos, existem evidências de que elas sejam GABAérgicas. Roche e colaboradores (2003), observaram aumento significativo da expressão da proteína cFOS em neurônios GABAérgicos das asas-laterais do NDR ao colocaram ratos para nadar em um tanque com água (situação que evoca a expressão de comportamentos de defesa ativos semelhantes à fuga). Segundo os autores, essa ativação seria a responsável por inibir os neurônios serotonérgicos nesta sub-região e, em última análise, levaria a diminuição na liberação de 5HT nas regiões de projeção, como a SCPd, favorecendo a expressão da resposta de fuga (ROCHE et al., 2003).

O NDR recebe projeções de diferentes estruturas encefálicas, tais como o mPFC, núcleo central da amígdala, HDM e hipotálamo ventromedial, SCP dentre outros, que desta forma, são capazes de modular a atividade de neurônios serotonérgicos e não serotonérgicos presentes nesta estrutura (para revisão ver HALE; LOWRY, 2011). Recentemente, o papel desempenhado por projeções que partem do hipotálamo lateral (HL), área perifornical (PeF) e do HDM têm merecido crescente atenção. Isto porque, nestes núcleos hipotalâmicos existem neurônios que produzem orexinas (ORXs), dois neuropeptídios, com importantes funções neurofisiológicas, dentre as quais a de modular a expressão de comportamentos defensivos, como descrito abaixo.

O sistema orexinérgico e o TP.

O sistema orexinérgico foi descoberto em 1998, paralelamente por dois grupos de pesquisa que investigavam novos neuropeptídios envolvidos no comportamento alimentar (DE LECEA et al., 1998; SAKURAI et al., 1998). De Lecea e colaboradores (1998) identificaram dois novos tipos de RNAm expresso apenas no hipotálamo de ratos cujo resultado proteico foi denominado de hipocretina-1 e hipocretina-2, devido sua semelhança com a secretina, hormônio produzido pelo duodeno. No mesmo período, Sakurai e colaboradores (1998), a partir da farmacologia reversa, puderam identificar 2 ligantes para 2 receptores acoplados à proteína G, que receberam o nome de orexina A e orexina B (ligantes) e receptores orexinérgicos do tipo 1 e tipo 2. O nome orexina (do grego orexis- apetite) surgiu da observação de que a injeção de ICV do peptídeo sintético aumentou o consumo de alimentos em ratos. (SAKURAI et al., 1998). Descobriu-se mais tarde que a orexina-A e -B correspondem à hipocretina-1 e -2, respectivamente, e que são produzidas e armazenadas em vesículas sinápticas de terminais axônicos de neurônios que estão localizados no hipotálamo lateral (HL), no HDM e na área hipotalâmica perifornical (PeF) (DE LECEA et al., 1998; DE LECEA; SUTCLIFFE, 1999; PEYRON et al., 1998; SAKURAI et al., 1998).

Em resumo, o sistema orexinérgico compreende dois neuropeptídios, as orexinas A (OXA) e B (OXB), derivados de um precursor comum, a prepro-orexina, e dois receptores acoplados à proteína G, o tipo 1 (OX1R) e tipo 2 (OX2R) (LI; DE LECEA, 2020; SOYA; SAKURAI, 2020). Como na maioria das vias mediadas por receptores acoplados à proteína G (GPCR), as orexinas (ORX), ao se ligarem aos receptores orexinérgicos (OXRs), ativam pelo menos três subtipos de proteína G, a Gq, Gi/o e Gs. Esses efetores regulam subsequentemente fosfolipases, canais iônicos e proteínas quinases, desencadeando, em última análise, a ativação de várias vias de sinalização intracelular (BONIFAZI et al., 2023; KUKKONEN; TURUNEN, 2021). A afinidade de ligação das

ORXs foi determinada através de um ensaio de ligação competitiva que mostrou que a OXA se liga a ambos os receptores, com maior afinidade pelo OX1R (os valores de IC50 são 20 nM- OX1R e 38 nM-OX2R), enquanto a OXB apresenta mais seletividade para o OX2R (IC50 420 nM-OX1R versus IC50 36 nM- OX2R) (AMMOUN et al., 2003; BONIFAZI et al., 2023; XU et al., 2013).

Apesar de terem sido descobertas devido a participação no comportamento alimentar, as ORXs ganharam destaque primeiramente por sua capacidade de promover e manter o estado de vigília (para revisão ver LI; DE LECEA, 2020; SOYA; SAKURAI, 2020). Os registros da atividade de neurônios orexinérgicos em nível de célula única (LEE; HASSANI; JONES, 2005; MILEYKOVSKIY; KIYASHCHENKO; SIEGEL, 2005; SAKURAI et al., 2005) ou em nível populacional (LI et al., 2018) demonstram que essas células apresentam taxa máxima de disparo durante a vigília, especialmente quando os animais estão envolvidos em comportamentos voluntários, como o comportamento exploratório (Mileykovskiy et al., 2005). Mais especificamente, Mileykovskiy e colaboradores (2005), utilizando a técnica de eletrofisiologia in vivo, observaram um aumento no disparo de neurônios orexinérgicos durante comportamentos exploratório e de alerta medidos em um novo ambiente ou na presença de um som inesperado (MILEYKOVSKIY; KIYASHCHENKO; SIEGEL, 2005). A partir deste trabalho, a relação das ORXs, especialmente da OXA, com os comportamentos defensivos relacionados a ansiedade e ao pânico passou a despertar um crescente interesse

O primeiro trabalho a investigar a participação da OXA na modulação de repostas comportamentais relacionadas à ansiedade foi realizado por Suzuki e colaboradores em 2005. Neste estudo, foi observado que a administração sistêmica, ou intracerebroventricular, de OXA aumentava a ansiedade de ratos expostos ao labirinto em cruz elevado e ao teste claro/escuro (SUZUKI et al., 2005). Mais tarde, Heydendal e

colaboradores (2014) demonstraram, utilizando a técnica de optogenética, que a fotoestimulação de neurônios orexinérgicos no HL levou a um aumento de ansiedade em ratos expostos ao teste de interação social.

Já em relação ao pânico, o envolvimento do sistema orexinérgico foi proposto pela primeira vez por Johnson e colaboradores (2010), após observarem que pacientes diagnosticados com TP apresentavam níveis de ORXs elevados no líquido cefalorraquidiano em comparação com pacientes não ansiosos (JOHNSON et al., 2010). Estes pesquisadores também demonstraram que o silenciamento do gene hipotalâmico que codifica a prepro-orexina, bem como a injeção intraperitoneal de SB-334867, um antagonista de receptor OX1R, atenuaram as respostas comportamentais e autonômicas induzidas em ratos por diferentes agentes panicogênicos, tais como, a injeção de lactato de sódio, de FG-7142, um agonista inverso de receptores benzodiazepínico, e pela exposição a altas concentrações de CO₂ (JOHNSON et al., 2010, 2012b, 2013). Além disso, dados pré-clínicos, colhidos mais recentemente, sugerem que o polimorfismo no gene HCRTR1, que codifica o OX1R, esteja implicado na fisiopatologia do TP (GOTTSCHALK et al., 2019).

A compreensão dos mecanismos neurais pelos quais as ORXs exercem seus efeitos modulatórios na ansiedade e no pânico ainda é limitada. No entanto, estudos de neurotraçamento em roedores demonstraram que os neurônios orexinérgicos dos subnúcleos hipotalâmicos HL, HDM e PeF enviam projeções para estruturas relacionadas à organização de respostas defensivas associadas a essas emoções (JOHNSON et al., 2012a; SAKURAI; SAITO; YANAGISAWA, 2021). Utilizando um traçador retrógrado e marcação por imunofluorescência para OXA, Lee e colaboradores (2005) observaram que neurônios orexinérgicos, originados principalmente do LH e da PeF, projetam-se para os diferentes subnúcleos do NDR, dentre as quais as asas-laterais.

Além das projeções, a expressão de ORXs também foi observada no NDR de ratos e camundongos, sendo o OX1R mais expresso no DRD e nas asas-laterais do NDR (MARCUS et al., 2001; TRIVEDI et al., 1998; TSUNEOKA; FUNATO, 2024; XIAO et al., 2021) . Algumas evidências na literatura apontam para o papel modulador da OXA na atividade dos neurônios serotoninérgicos do NDR. Por exemplo, estudos de eletrofisiologia mostram que no NDR, a OXA pode causar uma despolarização direta e reversível da membrana pós-sináptica, e que essa despolarização aumenta a taxa de disparo dos neurônios ali presentes (SOFFIN et al., 2004). Mais especificamente, Brown e colaboradores (2002) mostraram que a OXA excita neurônios serotoninérgicos no NDR (BROWN et al., 2002). Além disso, Tao e colaboradores (2006), utilizando a técnica de microdiálise, observaram que a infusão de OXA, mas não de OXB, no NDR de ratos em livre movimento provocou um aumento de liberação de serotonina em tal núcleo (TAO et al., 2006). Ademais, Adidharma e colaboradores (2019), utilizando marcação por imunistoquímica, observaram que o tratamento subcrônico com o antagonista de OX1R SB 334867 foi capaz diminuir o número de neurônios serotoninérgicos tanto na porção medial, quanto na porção rostral do NDR, assim como a densidade das fibras serotoninérgicas na SCPd (ADIDHARMA et al., 2019).

Ainda que os trabalhos mencionados acima sugiram a ocorrência de uma regulação da atividade de neurônios do NDR pela OXA, ao nosso conhecimento, nenhum estudo até o momento investigou as consequências dessa regulação na modulação de comportamentos defensivos associados ao pânico. Assim sendo, permanece por ser explorado se a ativação de receptores de OX1R nas asas-laterais do NDR é capaz de inibir a expressão da resposta de fuga, uma vez que, como citado acima (BROWN et al., 2002; SOFFIN et al., 2004; WANG et al., 2005), a injeção de OXA no NDR aumenta o disparo de neurônios serotoninérgicos (BROWN et al., 2002; SOFFIN et al., 2004; WANG

et al., 2005, o que presumivelmente levaria a um aumento de serotonina em áreas de projeção, como a SCPd, inibindo tal resposta (figura 1).

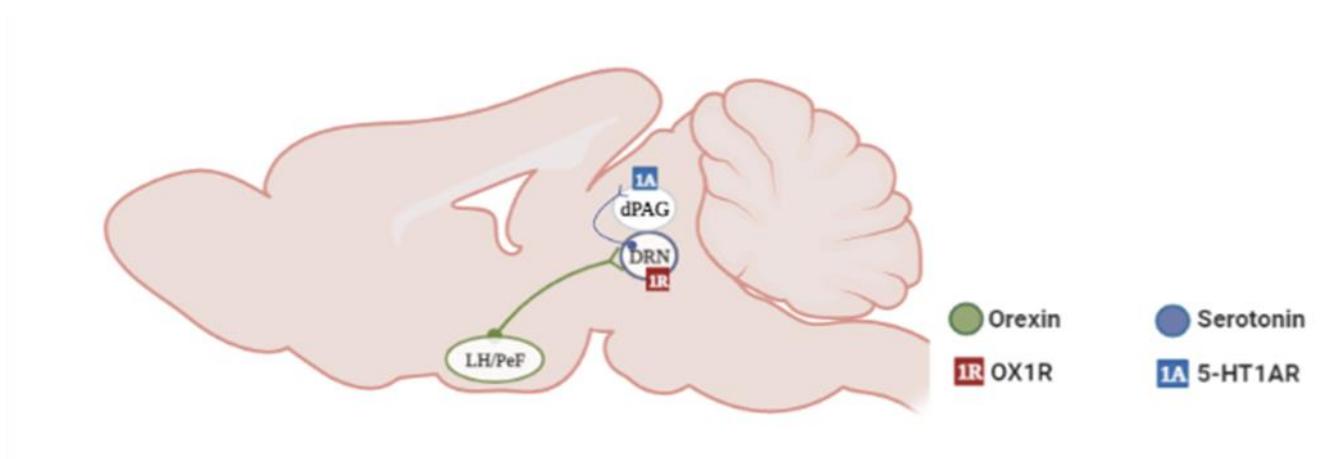


Figura 1: Plano esquemático da hipótese do projeto. A ativação de receptores de OX1R nas asas-laterais do NDR levaria a inibição da expressão da resposta de fuga, uma vez que a injeção de OXA no NDR aumenta o disparo de neurônios serotoninérgicos, o que presumivelmente levaria a um aumento de serotonina em áreas de projeção, como a SCPd e o HDM, inibindo tal resposta.

Assim, na primeira etapa do trabalho, verificamos o papel dos receptores OX1R localizados nas asas-laterais, através da administração local do antagonista SB 334867 nas asas-laterais. Também avaliamos os efeitos causados pela administração local de OXA. Na sequência, investigamos o papel dos receptores 5-HT1A da SCPd na mediação das consequências comportamentais decorrentes da estimulação farmacológica de receptores OX1R nas asas-laterais do NDR.

Para avaliar o comportamento de fuga, empregamos o teste de exposição a altas concentrações de CO₂ (20%; SPIACCI et al., 2018). Trabalhos de validação deste teste, feitos em nosso laboratório, mostram que diferentes linhagens de camundongos (C57Bl/6, Swiss e BalbC) expressam o comportamento de fuga inferido pelo número de saltos em direção ao teto da caixa experimental, sendo a resposta mais acentuada nos

C57Bl/6 (FRIAS, 2022). Além disso, nesta linhagem, o tratamento crônico (21 dias), mas não agudo, com fluoxetina ou imipramina, ou uma injeção única de alprazolam, reduz de maneira consistente o número de saltos, indicando um efeito panicolítico (SPIACCI et al., 2018a).

Já na segunda etapa, a fim de verificar a generalidade de nossos achados no modelo de exposição ao CO₂, investigamos as consequências da injeção de OXA nas asas-laterais do NDR em camundongos submetidos ao “Beetle Mania Task” (BMT). O BMT, desenvolvido por Heinz e colaboradores (2017), foi utilizado como um teste representativo do subtipo não respiratório do pânico. Este teste baseia-se em confrontos repetitivos entre um camundongo e um besouro robô, que apresenta movimentos erráticos, permitindo mensurar respostas passivas (como a tolerância) ou ativas (fuga, saltos, ataques) de defesa (ALMADA et al., 2018; HEINZ et al., 2021; HEINZ; GENEWSKY; WOTJAK, 2017; SOARES et al., 2021). Uma mudança no protocolo experimental, introduzida por Almada e colaboradores em 2018, passou a ser adotada com o intuito de se gerar mais respostas ativas de defesa (ALMADA et al., 2018; HERNANDES et al 2024). Estes autores observaram que os encontros entre o besouro robô e os camundongos geravam mais comportamentos de fuga (corridas e saltos) quando uma arena menor do que a utilizada originalmente usada por Heinz e colaboradores (2017) era empregada.

Apesar do estudo de Almada e colaboradores (2018) apontarem para o potencial do BMT para o estudo das respostas defensivas relacionadas ao pânico, até o momento, não se conhece o efeito de drogas panicolíticas sobre os comportamentos gerados pelo besouro-robô. Cientes de tais limitações, antes de testar o efeito de injeções intra-asas-laterais de OXA, estendemos a validação do teste do BMT, utilizando a arena reduzida, descrita por Almada e colaboradores (2018). Mais especificamente, investigamos o

padrão de respostas comportamentais de quatro linhagens de camundongos expostos ao BMT, a saber: C57BL/6, Balbc, Swiss e CD1. Na sequência, empregando a linhagem C57Bl/6, investigamos os efeitos do alprazolam, um agente pânico estabelecido, em comparação com o diazepam, que tem principalmente propriedades ansiolíticas. Por fim, avaliamos o efeito do tratamento crônico com a fluoxetina sobre as respostas defensivas geradas neste modelo.

Objetivos

OBJETIVOS

Investigar o papel da OXA nas asas-laterais do NDR na modulação de respostas defensivas associadas ao pânico em camundongos, através do emprego de modelos de pânico respiratório e não respiratório

Objetivos específicos:

- Investigar o papel dos receptores OX1R localizados nas asas-laterais, através da microinjeção do antagonista SB 334867, bem como os efeitos causados pela administração local de OXA, na modulação do comportamento de fuga medido no modelo experimental de exposição ao CO₂.
- Investigar o papel dos receptores 5-HT1A da SCPd na mediação das consequências comportamentais decorrentes da estimulação farmacológica de receptores OX1R nas asas-laterais do NDR de camundongos expostos ao CO₂.
- Estender a validação do modelo do BMT como modelo de pânico não respiratório em camundongos. Para tal, verificar:
 - O padrão de respostas comportamentais de diferentes linhagens de camundongos, a saber: C57Bl/6, Balbc, Swiss e CD1.
 - O efeito da administração aguda sistêmica de alprazolam e diazepam sobre as respostas defensivas de camundongos C57Bl/6.
 - O efeito do tratamento crônico com a fluoxetina em camundongos C57Bl/6.
- Investigar as consequências da injeção de OXA nas asas-laterais em camundongos C57Bl/6 submetidos ao BMT.

Etapa 1

Etapa 1: Estudo do papel da OXA nas asas-laterais do NDR sobre o comportamento de fuga de camundongos expostos a altas concentrações de CO₂

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/6, com 8 a 10 semanas de vida, no início dos procedimentos experimentais, provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo – Campus de Ribeirão Preto. Os animais permaneceram no biotério do Laboratório de Farmacologia do Comportamento, por pelo menos duas semanas antes do início dos experimentos, onde ficaram alojados em grupos de no máximo 10 animais, em caixas de polipropileno (38 x 32x 18 cm) forradas com serragem, tendo livre acesso à água e comida durante todo o procedimento. Após a cirurgia os animais foram alojados em grupos de no máximo 5 animais por caixa. O biotério foi mantido com temperatura de 22±1°C e com ciclos de claro-escuro de 12 horas, sendo o período iluminado (intensidade de 60 lux) das 7:00 às 19:00 horas. Todos os procedimentos experimentais realizados neste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética em pesquisa da Universidade de São Paulo (protocolos nº 100/2020).

Teste de exposição a altas concentrações de CO₂.

A câmara de exposição ao CO₂ (Figura 2), é constituída por uma arena cilíndrica (18 cm de diâmetro) com paredes de acrílico transparente (18 cm de altura), vedada hermeticamente contendo 2 válvulas. A primeira, localizada na parte mediana da câmara, é conectada à uma fonte de CO₂. A segunda, localizada na parte lateral inferior da câmara, fica acoplada a um analisador de gás (GasLab, GasLab.com), que monitora continuamente as concentrações de CO₂ e O₂ dentro da câmara.

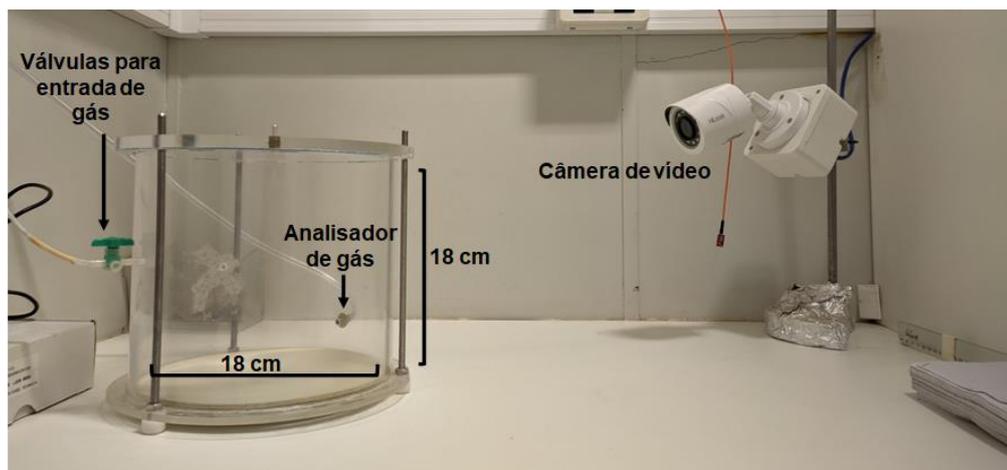


Figura 2: Câmara padrão de exposição ao CO₂.

No teste da exposição ao CO₂, os animais foram primeiramente colocados no aparato experimental em condição de normóxia (ar ambiente: 21% de O₂, <1% de CO₂) por 5 minutos – período no qual foi avaliada a atividade locomotora com o auxílio do programa de análise de imagem Anymaze (Soelting Co., EUA). Após esse período, o cilindro de CO₂ foi acionado levando a uma liberação gradativa do gás na câmara, até que a concentração de 20% de CO₂ fosse atingida (aproximadamente 2 minutos). A válvula de CO₂, então, foi fechada, e os animais permaneceram na condição de 20% de CO₂ e por mais 5 minutos. Durante estes 7 minutos, foi avaliado manualmente o comportamento de fuga, caracterizados por saltos em direção a saída da câmara experimental.

Drogas

Foram utilizadas as seguintes drogas: Orexina A (OXA) (Tocris, Bristol, UK), SB 334867 (Tocris, Bristol, UK), WAY-100635 (Sigma, EUA). A OXA e o WAY-100635 foram dissolvidos em salina estéril a 0,9%, já o SB 334867 foi dissolvido em DMSO conforme as especificações do fabricante. Todas as doses utilizadas nestes estudos foram baseadas em estudos prévios (HO et al., 2011; POBBE et al., 2011; RUSSELL et al., 2001; TAO et al., 2006).

Cirurgia estereotáxica

Os animais foram anestesiados com cetamina e xilazina (Cetamin, Syntec, 10%; Xilazin, Syntec, 4%, sendo 1mL/100g, i.p) e, após indução anestésica, foram fixados no aparelho estereotáxico para implante unilateral de uma cânulas-guia de aço inoxidável (8 mm de comprimento, 0,45 mm de diâmetro) no hemisfério esquerdo das asas laterais do NDR. Para tal, utilizou-se um ângulo de 10° e as seguintes coordenadas: antero-posterior: 0,8 mm partindo do lambda, lateral: +0,8 mm e dorsoventral: -2,8 mm. No experimento 2B, além do implante de uma cânula-guia na asa lateral esquerda, essa outra cânula foi implantada no hemisfério direito da SCPd. Para tal, utilizou-se um ângulo de 16°, e as coordenadas: antero-posterior: -0,5 mm partindo do lambda, lateral: +1,0 mm e dorsoventral: -2,4 mm. Após determinado o local de implante, as cânulas foram fixadas à calota craniana por meio de resina acrílica, e mandris de aço inoxidável foram introduzidos nas mesmas para evitar entupimento até a realização dos experimentos. Por fim, os animais receberam três injeções subcutânea, uma a cada 12 horas, de fluxinina meglumina, um agente analgésico com atividade anti-inflamatória e antipirética.

Procedimentos e delineamento experimental

Em todos os experimentos, as injeções centrais foram realizadas pela inserção de uma agulha de injeção (0,25 mm de diâmetro externo; 9 mm de comprimento) através de cânula-guia. Esta agulha estava conectada a uma seringa (Hamilton 7000/7001KH) através de um tubo de polietileno (PE-10), preenchido com água destilada. O controle do volume e do tempo de injeção (50 nl/1min) foi realizado por uma bomba microinjetora digital (modelo 55-2222, Harvard Apparatus). Para verificar se a droga foi realmente injetada, foi verificado o deslocamento de uma bolha de ar no polietileno. Ao término da injeção, a agulha de injeção permaneceu no local por mais um minuto, para evitar o refluxo da droga.

Experimento 1: Efeito da manipulação farmacológica dos receptores OX₁R nas asas-laterais do NDR em camundongos expostos à alta concentração de CO₂.

No experimento 1, cinco dias após a cirurgia estereotáxica para implantação de cânula-guia direcionada a asa lateral esquerda do NDR, os animais (n = 7-10/ por grupo) foram divididos nos seguintes grupos experimentais e injetados com: Experimento 1A- veículo ou SB334867 (3, 30, 300 nM em 50 nl); experimento 1B- veículo ou OXA (0,28, 2,8 e 28 pmol/50 nl). Dez minutos após a injeção, os animais foram submetidos ao teste da exposição ao CO₂, como descrito acima.

Experimento 2: Envolvimento de receptores 5HT_{1A} da SCPd na regulação de comportamentos defensivos mediados pela OXA na asa-lateral do NDR.

No experimento 2, buscamos avaliar se as respostas defensivas encontradas no experimento 1, são decorrentes do aumento da liberação de serotonina na SCPd. Para determinar a dose do antagonista de receptores 5-HT_{1A} a ser utilizada, no experimento 2A, cinco dias após a cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas na SCPd, os animais receberam a injeção intra-SCPd de WAY 100635 (0,18, 0,37 e 0,74 nmol/50 nl) ou salina (n= 7-8/grupo). Passados 10 minutos, os animais foram submetidos à avaliação comportamental no teste de exposição ao CO₂, como descrito acima.

No experimento 2B, cinco dias após a cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas na SCPd e na asa lateral do NDR, os animais receberam injeção intra-SCPd de WAY 100635 (0,74 nmol/50 nl) ou salina. Dez minutos após, os animais foram injetados com OXA (28 pmol/50 nl) ou salina na asa lateral do NDR. Os grupos formados foram: veículo-asa-lateral/veículo-SCPd (n=7), veículo-asa-lateral/WAY-SCPd (n=9), OXA-asa-lateral/veículo-SCPd (n=8), OXA-asa-lateral/WAY-SCPd (n=8). Passados 10

minutos, os animais foram submetidos à avaliação comportamental no teste de exposição ao CO₂.

Histologia

Após o término dos testes comportamentais, os animais foram anestesiados cetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) e injetados (50 nl) na asa lateral e/ou na SCPd com o azul de Evans a 1%, com intuito de visualizar o sítio de injeção. Os animais foram então submetidos a perfusão intracardíaca com solução salina 0,9%, seguida de solução de formalina 10%. Os encéfalos foram removidos e fixados também em solução de formalina 10%. Os encéfalos foram cortados em secções coronais de 30µm de espessura em um criostato (Leica CM1850) para verificação microscópica do sítio de microinjeção.

Análise Estatística

Os dados obtidos foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) de uma via, com exceção do experimento 2B onde os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de duas vias, tendo como fatores independentes os tratamento com o antagonista (sal ou WAY-100635) ou com o agonista (sal ou OXA) utilizados. Quando apropriado foram realizadas comparações múltiplas pelo teste de Duncan.

RESULTADOS

A figura 3A mostra os sítios de injeções dentro e fora da asa lateral do NDR das drogas empregadas nos experimentos 1. Na figura 3B são mostrados os sítios de injeções dentro e fora da asa-lateral e da SCPd no experimento 2.

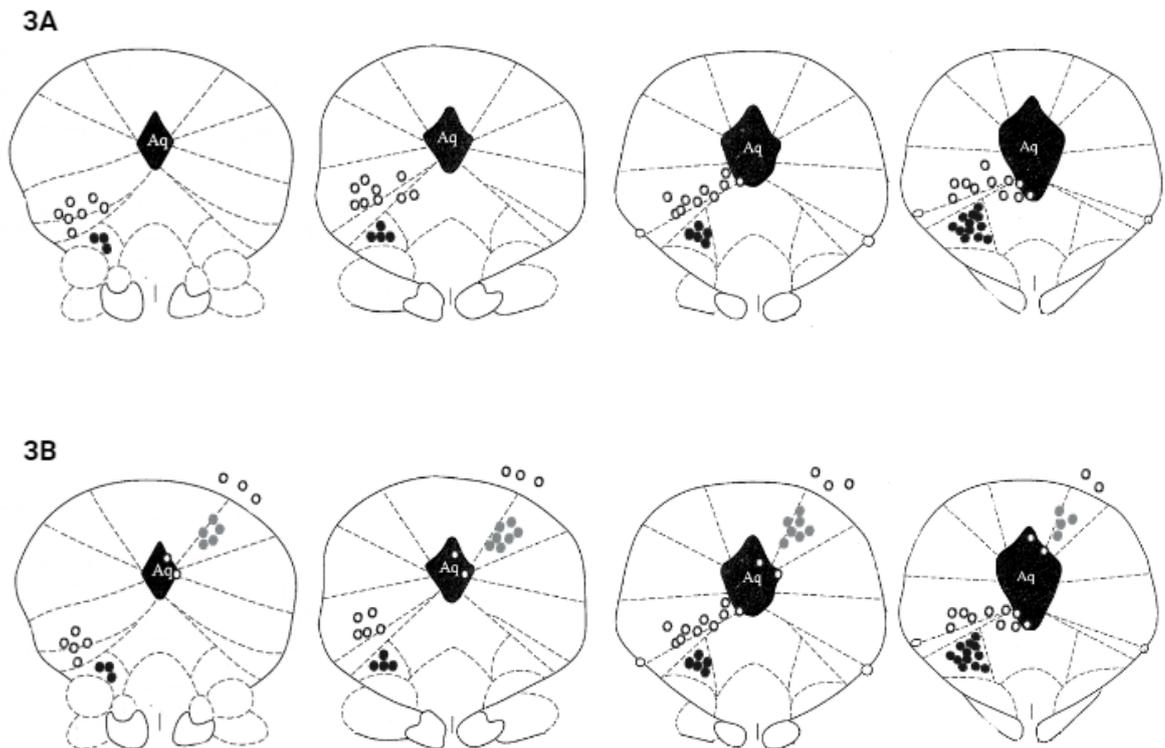


Figura 3. Representação de sessões coronais do cérebro de camundongo mostrando a localização dos sítios de injeção dentro (círculos pretos) e fora (círculos brancos) da asa lateral esquerda do NDR e dentro (círculos cinzas) e fora da SCPd (círculos brancos) nos experimentos 1 e 2. As figuras representam as coordenadas do Atlas Paxinos e Franklin (2008) a partir do bregma. O número total de pontos é menor do que o número total de animais devido a sobreposições dos sítios de injeção.

Experimento 1: Efeito da manipulação farmacológica dos receptores OX_1R nas asas-laterais do NDR em camundongos expostos ao CO_2 .

Experimento 1A: A figura 4A mostra que não houve diferença no número de saltos entre os animais que receberam injeção de SB-334867 ou veículo dentro [F(3,26)= 1,33; p= 0,29] ou fora [F(3,22)= 0,51 ; p= 0,68] da asa lateral do NDR. Além disso, não houve alteração da atividade locomotora em animais com injeções tanto dentro [F(3,26)= 0,23; p=0,87], como fora [F(3,22)= 0,04; p=0,99)] da asa lateral do NDR (figura 4B).

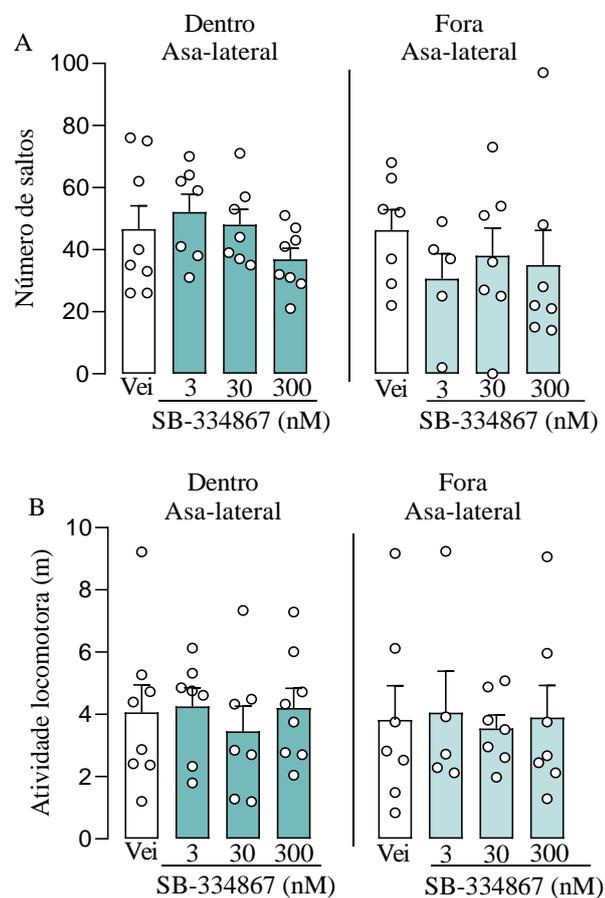


Figura 4: Efeito (média \pm EPM) da injeção intra-asa-lateral do NDR ou fora desta área de SB-334867 (3, 30 e 300 nM em 50 nl) ou veículo (Vei) em camundongos C57BL/6 expostos a 20% de CO_2 sobre: [A] o número de saltos e [B] a distância percorrida nos primeiros cinco minutos de teste.

Experimento 1B: A figura 5A mostra que o tratamento com OXA alterou o número de saltos durante a exposição ao CO₂, quando realizado dentro [F(3,29)= 3,33; p= 0,03], mas não fora da asa-lateral [F(3,34)= 1,07; p=0,37]. Nos animais do primeiro grupo, o teste *post-hoc* de Duncan mostrou que a maior dose de OXA (28 pmol /50 nl) diminuiu o número de saltos quando comparada aos demais grupos. Além disso, não houve alteração da atividade locomotora tanto com injeções dentro [F(3,29)= 0,21; p=0,89] como fora da asa-lateral do NDR [F(3,34)= 0,80; p=0,50] (figura 5B).

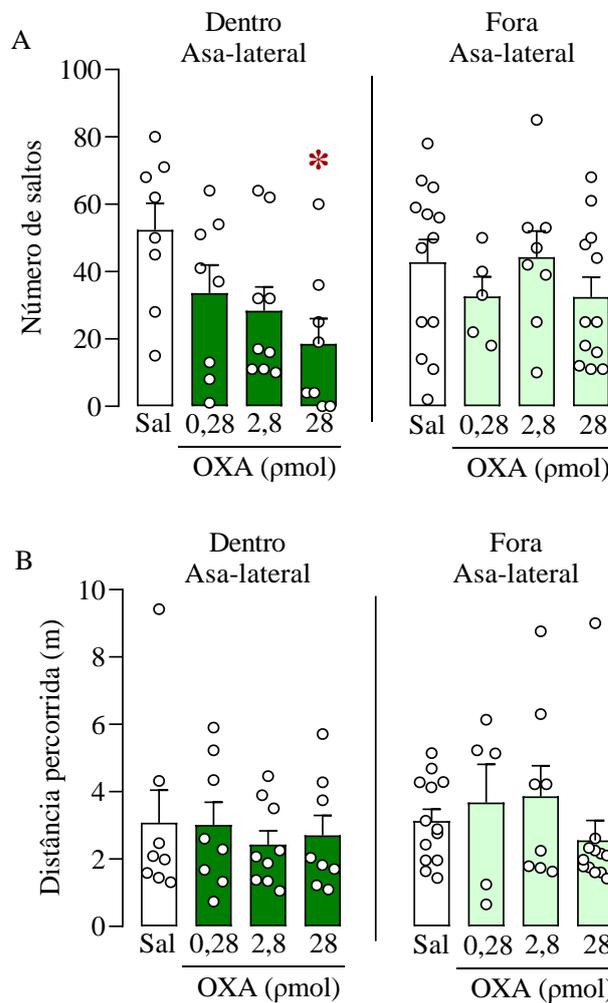


Figura 5: Efeito (média \pm EPM) da injeção intra-asa-lateral do NDR ou fora desta área de orexina-A (OXA; 0,28, 2,8 e 28 pmol/50 nl) ou salina (Sal) em camundongos C57BL/6 expostos a 20% de CO₂ sobre: [A] o número de saltos e [B] a distância

percorrida nos primeiros cinco minutos de teste. * $p < 0,05$ quando comparado aos demais grupos.

Experimento 2: Envolvimento dos receptores 5HT1A do SCPd na regulação de comportamentos defensivos mediados pela OXA nas asas-laterais do NDR.

Experimento 2A: A figura 6A mostra que não houve diferença no número de saltos entre os animais que receberam injeção de WAY-100635 ou salina dentro [$F(3,28) = 2,57$; $p = 0,07$] ou fora [$F(3,8) = 0,14$; $p = 0,93$] da SCPd. Além disso, não houve alteração da atividade locomotora tanto dentro [$F(3,28) = 0,854$; $p = 0,476$] ou fora [$F(3,8) = 0,32$; $p = 0,81$] da SCPd (figura 6B).

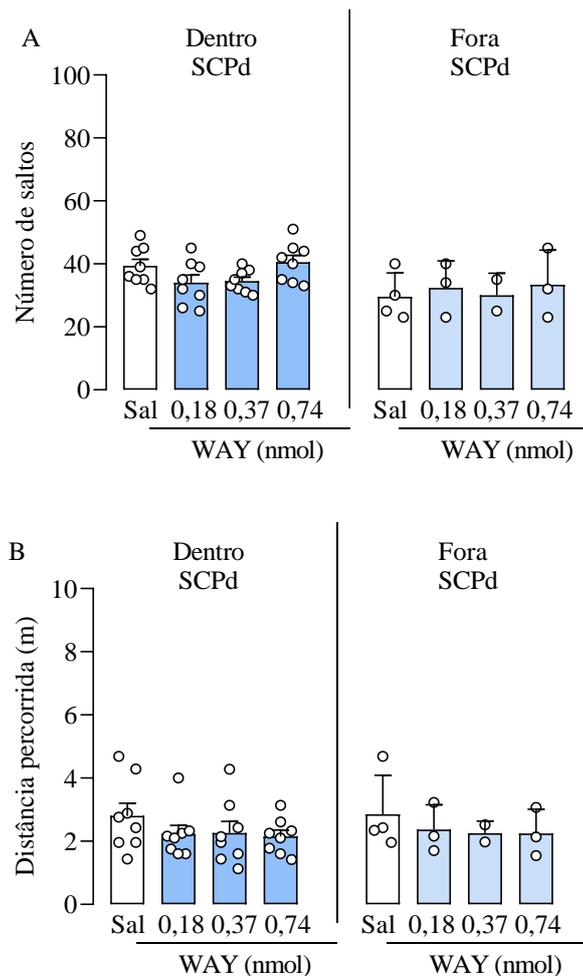


Figura 6: Efeito (média \pm EPM) da injeção intra-SCPd ou fora desta área de WAY-100635 (WAY- 0,18, 0,37 e 0,74 nmol/50 nl) ou salina (SAL) em camundongos C57BL/6 expostos a 20% de CO₂ sobre: [A] o número de saltos e [B] a distância percorrida nos primeiros cinco minutos de teste.

Experimento 2B: A figura 7A ilustra o efeito causado no teste de exposição ao CO₂ pela administração combinada de WAY-100635 (intra-SCPd) e de OXA (intra-asa-lateral). Os resultados apontam que administração prévia de WAY-100635 (0,74 nmol/50 nl) bloqueou a redução de saltos provocada pela injeção intra-asa-lateral de OXA, quando realizadas dentro [Fator tratamento com o antagonista – $F(3,28) = 0,01$; $p=0,94$; tratamento com o agonista – $F(3,28) = 23,39$; $p<0,001$; interação entre os fatores – $F(3,28) = 7,98$; $p=0,09$], mas não fora [Fator tratamento com o antagonista – $F(3,29) = 0,04$; $p=0,84$; tratamento com o agonista – $F(3,29) = 0,12$; $p=0,73$; interação entre os fatores – $F(3,29) = 4,48$; $p=0,43$] da asa-lateral do NDR e da SCPd. Não houve alteração na atividade locomotora tanto com injeções dentro [Fator tratamento como o antagonista – $F(3,28) = 0,06$; $p=0,81$; tratamento com o agonista – $F(3,28) = 0,77$; $p=0,38$; interação entre os fatores – $F(3,28) = 2,35$; $p=0,14$] como fora [Fator tratamento com o antagonista – $F(3,29) = 0,94$; $p=0,34$; tratamento com o agonista – $F(3,29) = 1,87$; $p=0,18$; interação entre os fatores – $F(3,29) = 0,98$; $p=0,33$] da asa lateral do NDR e da SCPd (figura 7B).

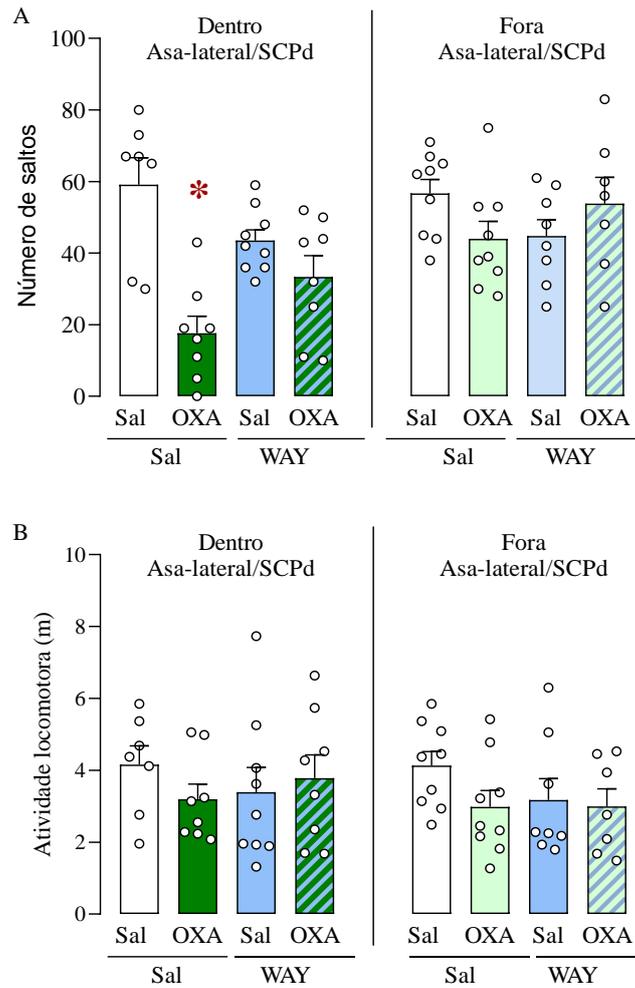


Figura 7: Efeito (média \pm EPM) causado por injeções combinadas de WAY-100635 (WAY- 0,74nmol) intra-SCPd e Orexina-A (OXA- 28 pmol) intra-asa-lateral do NDR ou fora destas áreas em camundongos C57BL/6 expostos a 20% de CO₂ sobre: [A] o número de saltos e [B] a distância percorrida nos primeiros cinco minutos de teste. *p<0,05 quando comparado aos demais grupos.

Etapa 2

Etapa 2: Efeito da OXA na asa-lateral do NDR em camundongos submetidos ao BMT.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

No experimento 3A, de validação do BMT, foram utilizados camundongos C57Bl/6, Swiss, Balbc e CD1. Já nos demais experimentos, foram usados camundongos C57Bl/6. Em todos os casos, os animais foram testados entre 8 e 10 semanas de vida e eram provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo – Campus de Ribeirão Preto. Os animais permaneceram no biotério do Laboratório de Farmacologia do Comportamento por pelo menos duas 2 semanas antes do início dos experimentos, onde ficaram alojados em grupos de no máximo 10 animais, em caixas de polipropileno (38 x 32x 18 cm) forradas com serragem, tendo livre acesso à água e comida durante todo o procedimento. O biotério foi mantido com temperatura de $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ e com ciclos de claro-escuro de 12 horas, sendo o período iluminado (intensidade de 60 lux) das 7:00 às 19:00 horas. Todos os procedimentos experimentais realizados neste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética em pesquisa da Universidade de São Paulo (protocolos nº 1166/2023).

Drogas

Foram utilizadas as seguintes drogas: orexina A (OXA- Tocris, Bristol, UK), alprazolam (EMS, Brasil), diazepam (Sigma, EUA) e fluoxetina (Cristália, Brasil). Todas as drogas foram dissolvidas em salina estéril contendo 2% de Tween-80, com exceção da OXA que foi diluída em salina estéril a 0,9%. Todas as doses utilizadas neste estudo foram baseadas em estudos prévios (HEINZ; GENEWSKY; WOTJAK, 2017; HO et al., 2011; SPIACCI et al., 2018; TAO et al., 2006).

Beetle Mania Task (BMT)

Uma arena poligonal feita de polietileno (50 x 25 x 37 cm) foi utilizada para o BMT. O “beetle” (besouro-robô) é feito de plástico e borracha, com 12 pernas e equipados com um motor vibratório permitindo que se movimentem erraticamente, para qualquer lado do assoalho da arena (Hexbug Micro Robotic Creatures, Greenville, EUA).



Figura 8: Vista de cima da arena do BMT, mostrando o besouro-robô e o camundongo.

O teste do BMT é composto por duas sessões sucessivas de 5 min: (i) habituação:, os animais foram inseridos na arena para familiarização e avaliação da atividade locomotora; (ii) teste: o besouro-robô foi colocado na arena no lado oposto ao camundongo e os seguintes comportamentos foram medidos: número de contatos (número de contatos físicos entre o camundongo e o besouro-robô), porcentagem de tolerância (número de vezes que o besouro-robô se aproxima do camundongo sem desencadear uma resposta comportamental, normalizada pelo número de contatos), número de fugas horizontais (número de retiradas com velocidade acelerada para longe do besouro-robô), número de saltos (número de saltos para cima com todas as 4 patas

saindo do chão em direção ao topo da arena) e o número de perseguições ao besouro (número de vezes que o camundongo seguia o besouro-robô).

A cada troca de animal, a arena foi limpa com álcool etílico 20%. Toda a tarefa foi gravada por uma câmera de vídeo (Sony Handycam, HDR-SR10, Tóquio, Japão) para posterior análise comportamental off-line por um observador treinado (PMH) que desconhecia o tratamento. A distância total percorrida durante a fase de habituação foi medida pelo sistema de rastreamento de vídeo ANY-maze (Stoelting, EUA).

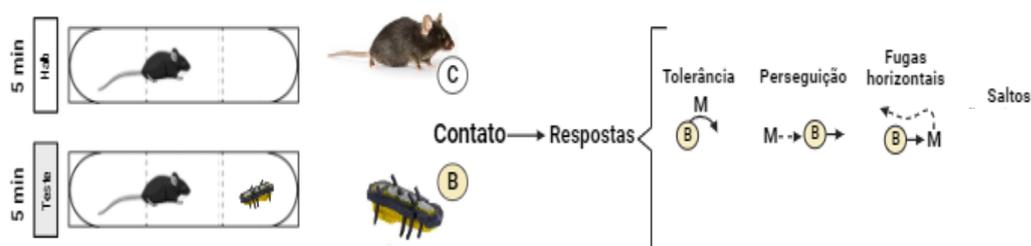


Figura 9: Plano esquemático das duas sessões consecutivas do BMT, onde é possível observar do lado direito o besouro robô utilizado e as respostas comportamentais que foram analisadas.

Procedimentos e delineamento experimental

Experimento 3A – Estudo do padrão comportamental de diferentes linhagens de camundongos expostos ao BMT.

Para identificar linhagens de camundongos que são mais sensíveis ao BMT, no experimento 3A camundongos machos das linhagens C57BL/6 (n=8), Balbc (n=8), Swiss (n=9) e CD1 (n=7) foram expostos ao teste do BMT conforme descrito na sessão acima.

Experimento 3B- Efeitos da administração de alprazolam e diazepam em camundongos C57Bl/6 expostos ao BMT.

No experimento 3B, grupos independentes de camundongos receberam uma única injeção intraperitoneal de alprazolam (0,05 ou 0,1 mg/kg; n = 10/grupo), diazepam (1 mg/kg; n = 10) ou solução veículo (n =10) e foram submetidos ao BMT 30 min após a injeção.

Experimento 3C- Efeitos do tratamento crônico com fluoxetina em camundongos C57BL/6 expostos ao BMT.

No experimento 3C, investigamos se o tratamento crônico com fluoxetina era capaz de modificar o comportamento de camundongos expostos ao BMT. Para tal, grupos independentes de camundongos foram injetados por via intraperitoneal com fluoxetina (10, 15 ou 20 mg/kg) ou veículo diariamente durante 21 dias (n = 7-9/grupo) e foram submetidos ao BMT 30 minutos após a última injeção.

Experimento 4: Efeito da OXA na asa-lateral do NDR sobre o comportamento de fuga de camundongos expostos ao BMT.

Cinco dias após a cirurgia os animais receberam uma injeção intra-NDR de salina ou de OXA nas doses de 0,28, 2,8 e 28 pmol/50 nl. Dez minutos após a administração, os animais foram submetidos ao BMT.

A análise dos sítios de injeção foi realizada conforme descrita na sessão histologia da etapa 1.

Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) de uma via, tendo como fatores independentes os tratamentos farmacológicos utilizados. Quando apropriado foram realizadas comparações múltiplas pelo teste de Duncan. Além disso, no experimento 3A, onde o número de contatos com o besouro-robô foi maior na linhagem

C57Bl/6, a análise de covariância (ANCOVA) foi utilizada para se verificar se há uma relação entre este aumento e o aumento no número de saltos.

RESULTADOS

- Estudos de validação do BMT

Experimento 3A – Análise comparativa das respostas comportamentais de diferentes linhagens de camundongos expostos ao BMT.

A Figura 10 mostra as respostas comportamentais de camundongos C57BL/6, Balbc, Swiss e CD1 expostas ao BMT. A ANOVA de uma via mostrou diferenças no número de contatos [$F(3,26)=10,08$; $p=0,0001$], saltos [$F(3,26)=6,75$; $p=0,001$] e perseguições ao besouro [$F(3,26)=8,16$; $p=0,0005$]. Não houve diferença entre as linhagens na porcentagem de tolerância [$F(3,26)=0,98$; $p=0,41$], no número de fugas horizontais [$F(3,26)=0,88$; $p=0,45$] ou na atividade locomotora [$F(3,26)=1,43$; $p=0,25$]. O teste *post-hoc* de Duncan mostrou que os camundongos C57Bl/6 apresentaram um aumento no número de contatos e de saltos quando comparados às outras linhagens. Uma análise de covariância (ANCOVA) mostrou uma independência entre o aumento do número de contatos e de saltos não orientados nos camundongos C57Bl/6 [$F(1,6)=0,45$; $p=0,53$]. No comportamento de perseguição, os camundongos Swiss exibiram um aumento quando comparados às demais linhagens.

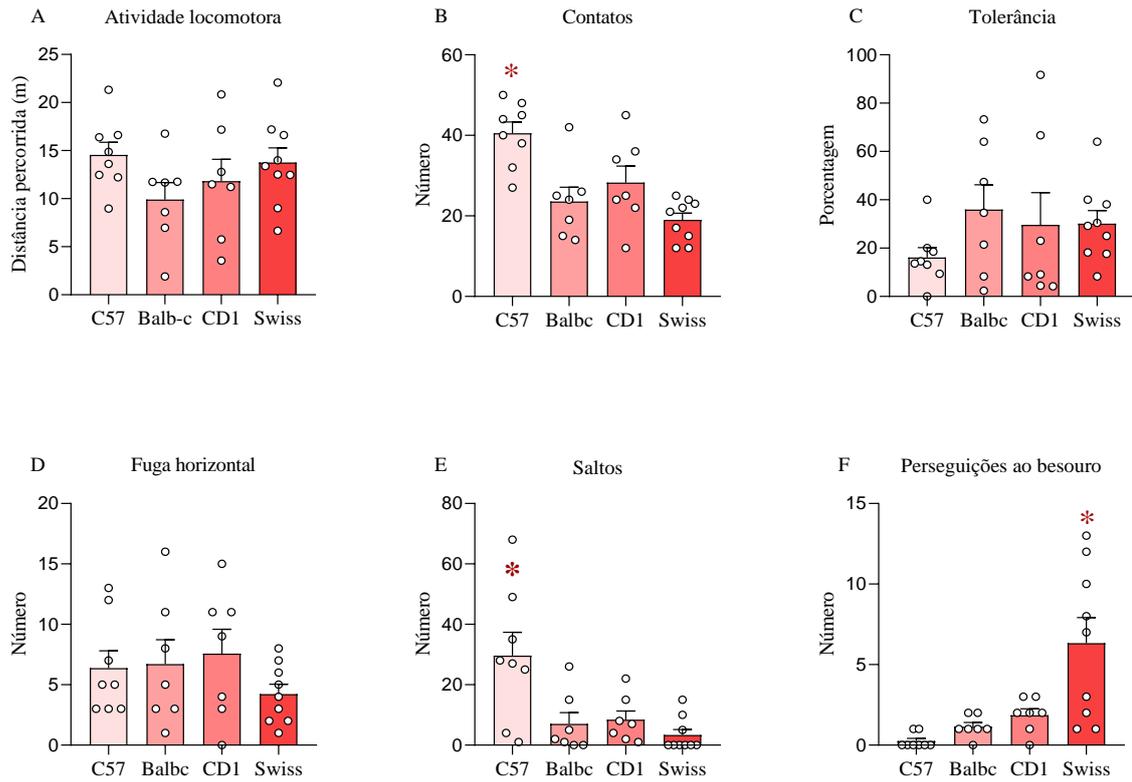


Figura 10: Efeito (média \pm SEM) da exposição de diferentes linhagens de camundongos ao BMT sobre: (A) atividade locomotora, (B) número de contatos, (C) porcentagem de tolerância, (D) número de fugas horizontais, (E) número de saltos e (F) número de perseguições ao besouro. * $p < 0,05$ comparado com todos os grupos.

Experimento 3B- Efeitos da administração de alprazolam e diazepam em camundongos C57Bl/6 expostos ao BMT.

A figura 11 mostra os efeitos da administração de alprazolam e diazepam em camundongos expostos ao BMT. A ANOVA de uma via mostrou efeito do tratamento no número de fugas horizontais [F(3,36)=8,22; p<0,001], saltos [F(3,36)=3,46; p=0,0263] e na porcentagem de tolerância ao besouro robô [F(3,36) = 3,42; p=0,0275]. Não houve alteração na atividade locomotora [F(3,36)=1,53; p=0,22]; no número de contatos [F(3,36)=0,18; p=0,90] e no número de perseguições ao besouro [F(3,36)=1,36; p=0,27]. O teste *post-hoc* de Duncan mostrou que o tratamento com alprazolam produziu uma redução significativa nos comportamentos de fugas horizontais (0,05 e 0,1 mg/kg) e de saltos (0,1 mg/kg) e um aumento na porcentagem de tolerância (0,1 mg/kg), enquanto o tratamento com o diazepam promoveu uma redução no número de fugas horizontais.

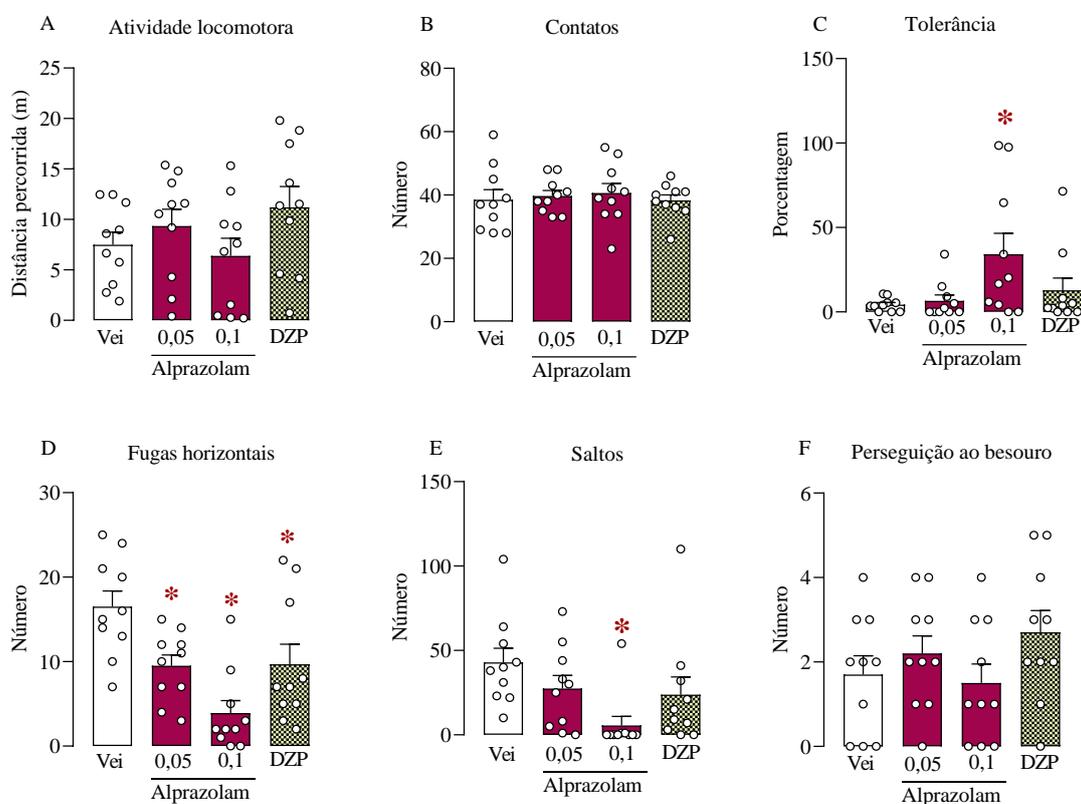


Figura 11. Efeito (média \pm E.P.M.) da administração aguda (i.p) de alprazolam (0,05 ou 0,1 mg/kg), diazepam (DZP; 1 mg/kg) ou veículo (Vei) em camundongos submetidos ao BMT sobre: (A) distância total percorrida, (B) número de contatos, (C) porcentagem de tolerância, (D) número de fugas horizontais, (E) número de saltos e (F) número de perseguições ao besouro. * $p < 0,05$ em comparação com o grupo veículo.

Experimento 3C- Efeitos do tratamento crônico com fluoxetina em camundongos C57BL/6 expostos a arena pequena do BMT.

A figura 12 mostra os efeitos do tratamento crônico com fluoxetina em camundongos C57 expostos ao BMT. A ANOVA mostrou que o tratamento crônico com a fluoxetina não alterou nenhum dos comportamentos avaliados, a saber: atividade locomotora [F(3,28)=1,29; $p=0,30$], número de contatos [F(3,28)=0,87; $p=0,47$] porcentagem de tolerância [F(3,28)=0,78; $p=0,51$], número de fugas horizontais [F(3,28)=1,89; $p=0,15$], número de saltos [F(3,28)=0,13; $p=0,94$], número de perseguições ao besouro [F(3,28)=0,46; $p=0,71$].

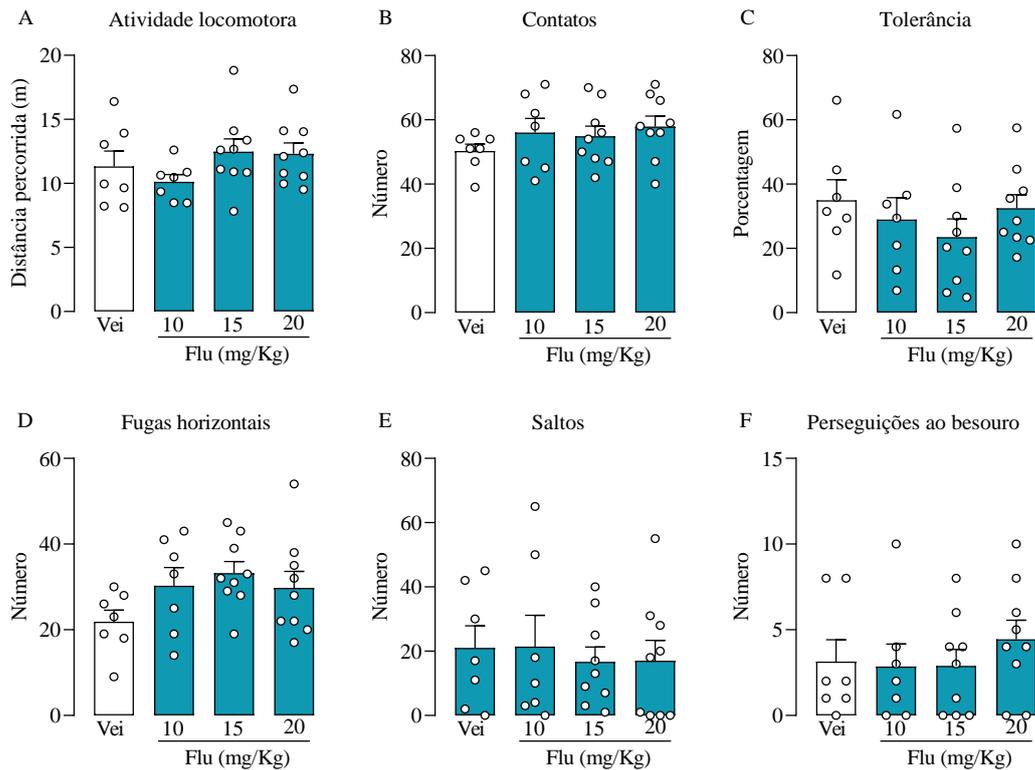


Figura 12. Efeito (média \pm SEM) do tratamento crônico (21 dias) com fluoxetina (Flu- 10, 15 ou 20 mg/kg, i.p) ou veículo (Vei) em camundongos C57Bl/6 expostos ao BMT sobre: (A) distância percorrida, (B) número de contatos, (C) porcentagem de tolerância, (D) número de fugas horizontais, (E) número de saltos e (F) número de perseguições ao besouro

Experimento 4: Efeito da OXA nas asa-lateral do NDR sobre o comportamento de fuga de camundongos expostos ao BMT.

A figura 13 mostra os sítios de injeções dentro e fora da asa lateral do NDR de OXA ou salina no experimento 4.

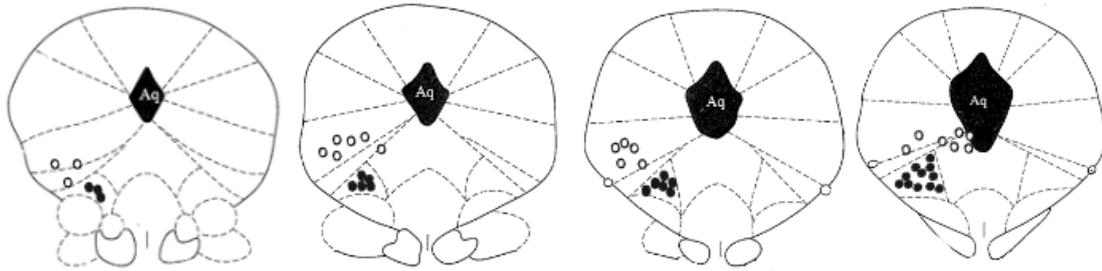


Figura 13. Representação de sessões coronais do cérebro de camundongo mostrando a localização dos sítios de injeção dentro (círculos pretos) e fora (círculos brancos) da asa lateral esquerda do NDR no experimento 4. As figuras representam as coordenadas do Atlas Paxinos e Frankilin (2008) a partir do bregma.

A figura 14 mostra os efeitos da injeção intra-asa-lateral do NDR de OXA em animais expostos ao BMT. Na figura 14E é possível observar que as injeções de OXA alterou o número de saltos no BMT quando localizadas dentro [F(3,25)= 8,14; $p < 0,001$], mas não fora da asa-lateral do NDR [F(3,16)= 0,37 ; $p = 0,77$]. Nos animais do primeiro grupo, o teste *post-hoc* de Duncan mostrou que a maior dose de OXA (28 pmol /50 nl) aumentou o número de saltos quando comparado aos demais grupos. Não houve diferenças na atividade locomotora [F(3,25)= 0,09; $p = 0,96$], no número de contato [F(3,25)= 0,80; $p = 0,50$], na porcentagem de tolerância [F(3,25)= 2,47; $p = 0,08$], ou no número de fugas horizontais [F(3,25)= 1,71; $p = 0,19$] com injeções dentro ou fora da asa-lateral do NDR (atividade locomotora [F(3,16)= 1,23; $p = 0,33$], número de contatos [F(3,16)= 1,34; $p = 0,30$], porcentagem de tolerância [F(3,16)= 0,05; $p = 0,98$], número de fugas horizontais [F(3,16)= 0,35; $p = 0,79$].

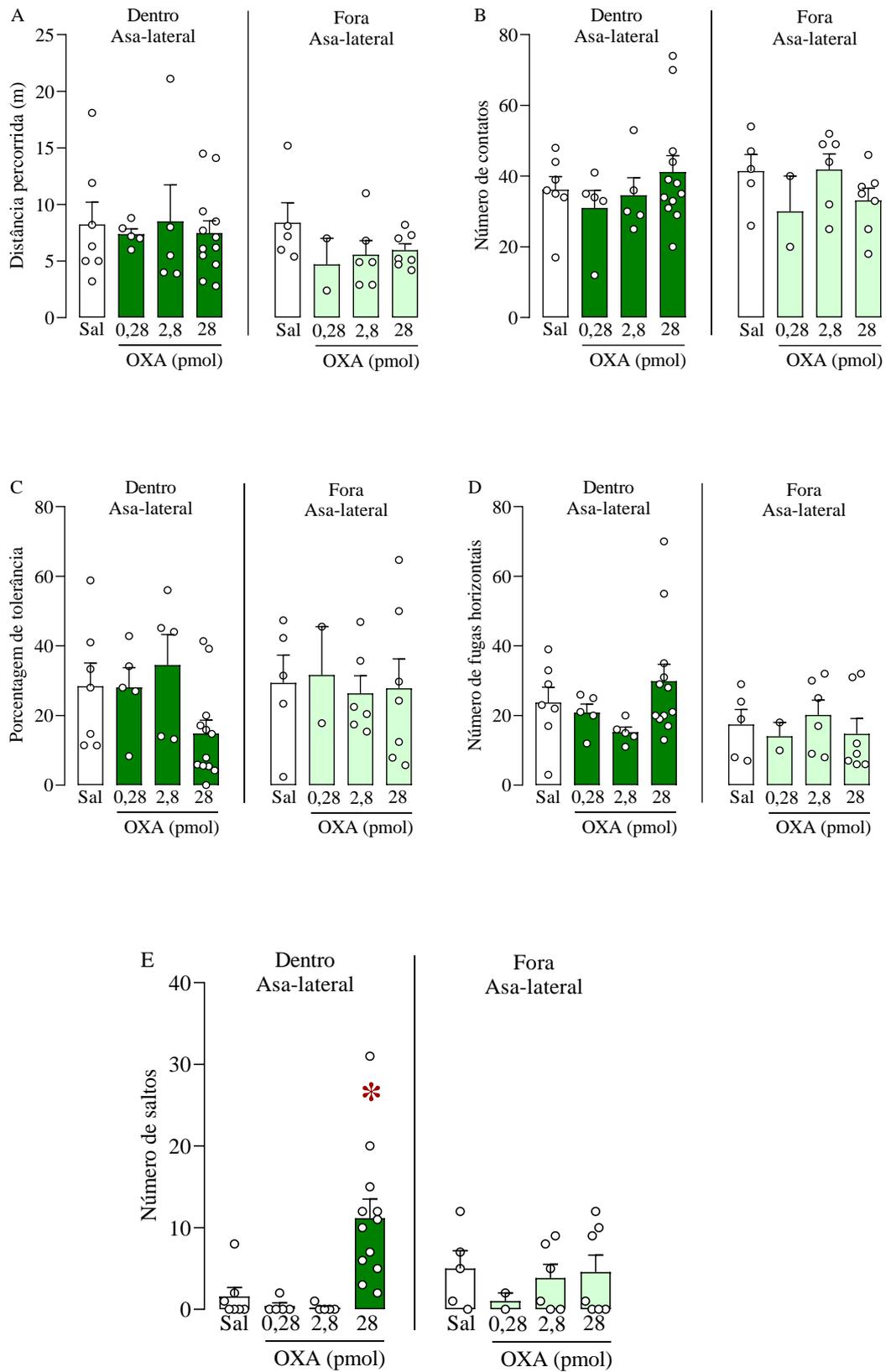


Figura 14: Efeito (média \pm EPM) da injeção intra-asa-lateral do NDR ou fora de orexina-A (OXA; 0,28, 2,8 e 28 pmol/50 nl) em camundongos C57Bl/6 expostos ao BMT

sobre: [A] a atividade locomotora, [B] o número de contatos, [C] porcentagem de tolerância, [D] o número de fugas horizontais e [E] o número de saltos. * $p < 0,05$ quando comparado aos demais grupos.

Discussão

DISCUSSÃO

Na primeira etapa deste trabalho, avaliamos o efeito da OXA na asa-lateral do NDR sobre o comportamento de fuga de camundongos expostos a altas concentrações de CO₂.

Os resultados obtidos no experimento 1A demonstram a ausência de efeito das três doses do antagonista do OX1R injetadas nas asas-laterais do NDR sobre o número de saltos e a atividade locomotora dos animais expostos a 20% de CO₂. Estes resultados sugerem a ausência de um pulso tônico orexinérgico nas asas-laterais do NDR. A associação entre a exposição a altas concentrações de CO₂ e o recrutamento de neurônios orexinérgicos é descrita por diferentes trabalhos na literatura (JOHNSON et al., 2012c; KOHLMEIER et al., 2008; TAKAHASHI et al., 2005; WILLIAMS et al., 2007). Por exemplo, Willians e colaboradores (2007) avaliaram a taxa de disparo de neurônios orexinérgicos frente a exposição a diferentes concentrações de CO₂. Estes pesquisadores observaram um aumento do disparo destes neurônios quando expostos a 10% de CO₂ e uma redução quando expostos a 5% de CO₂, demonstrando uma regulação da atividade dos neurônios orexinérgicos dependente da concentração de CO₂ (WILLIAMS et al., 2007). Nesta mesma direção, Sunaga e colaboradores (2009) demonstraram um aumento na expressão de c-Fos em neurônios orexinérgicos localizados no HDM e no PeF de camundongos exposto a 10% de CO₂ por 3 horas (SUNANAGA et al., 2009). Esta ativação dos neurônios orexinérgicos frente a exposição ao CO₂ presume um aumento na liberação de ORX para as áreas de projeção como o NDR.

Uma possível explicação para os resultados encontrados no experimento 1A é que no nosso modelo o aumento da concentração de CO₂ é acompanhado por uma leve queda na concentração de O₂ (de 20,9% para 16,6%). Esta exposição mista à altas concentrações de CO₂ + hipóxia leve poderia levar a alteração diferente na regulação da atividade dos

neurônios orexinérgicos. Em concordância com tal hipótese, Dergacheva e colaboradores (2016) demonstraram que condições mistas de hipercapnia (20% de CO₂) e hipóxia (10% de O₂) inibem a taxa de disparo de neurônios orexinérgicos no LH (DERGACHEVA et al., 2016). Além disso, Yamaguchi e colaboradores (2015) observaram um aumento de expressão de c-fos em neurônios orexinérgicos do LH, Pef e HDM de camundongos expostos a hipóxia intermitente (10% de O₂ em cinco sessões de 5min), mas não nos expostos ao protocolo de hipóxia sustentada (10% de O₂ por 25 min) (YAMAGUCHI et al., 2015). Tais resultados demonstram uma fina regulação na atividade dos neurônios orexinérgicos frente a diferentes desafios respiratório, abrindo espaço para que novos estudos investiguem a participação dos OX1R nestes cenários.

Em relação aos efeitos desencadeados pela injeção de OXA nas asas-laterais do NDR, os resultados obtidos no experimento 1B mostram que a maior dose de OXA (28pmol/50nl) foi capaz de reduzir o número de saltos sem alterar a atividade locomotora de animais expostos a 20% de CO₂, indicando um efeito do tipo panicolítico. Nossos resultados mostram ainda que esse efeito é dependente da injeção da droga na asa lateral e não em regiões circunvizinhas.

O efeito da OXA na asa-lateral do NDR parece ser mediado pela ativação do OX1R presentes em neurônios serotoninérgicos nesta região. Tal suposição baseia-se em evidências na literatura provindas de estudos de eletrofisiologia e de imunomarcações para os OXRs (BROWN et al., 2002; KOHLMIEIER et al., 2008; LIU; VAN DEN POL; AGHAJANIAN, 2002; SOFFIN et al., 2004; TAKAHASHI et al., 2005; WANG et al., 2005; XIAO et al., 2021). Nesse cenário, Xião e colaboradores (2021) investigaram sistematicamente a expressão dos OXRs no NDR. Utilizando camundongos transgênicos que expressam fluorescência vermelha nos neurônios serotoninérgicos (SERT^{tdtomato}) e técnicas de marcação por imunofluorescência, estes pesquisadores observaram que tais

receptores estão majoritariamente expressos em neurônios serotoninérgicos sendo o OX2R mais expresso no DRV, e o OX1R mais expresso no DRD e nas asas-laterais do NDR, regiões conhecidas por seu envolvimento nos comportamentos defensivos relacionados a ansiedade e ao pânico, respectivamente (HALE; SHEKHAR; LOWRY, 2012; SPIACCI; COIMBRA; ZANGROSSI, 2012). Além disso, Wang e colaboradores (2005), utilizando técnicas imunohistoquímicas em nível de microscopia eletrônica, observaram que fibras neuronais imunorreativas à OXA no NDR fazem contato próximo com neurônios serotoninérgicos.

Estudos de eletrofisiologia *in vivo* e *in vitro* demonstram ainda que a OXA é capaz de excitar e aumentar o número de disparo dos neurônios serotoninérgicos no NDR (BROWN et al., 2002; LIU; VAN DEN POL; AGHAJANIAN, 2002; SOFFIN et al., 2004; TAKAHASHI et al., 2005). Tal excitação é mediada, principalmente, pelo aumento de cálcio intracelular através da ativação da via da fosfolipase C (KOHLMEIER et al., 2008), principal via de sinalização intracelular dos OXRs (WANG et al., 2018). Nesta direção, Wang e colaboradores (2005) observaram que as sinapses feitas por terminais de axônio contendo OXA nos neurônios serotoninérgicos do NDR, onde os OX1R encontram-se expressos, eram axodendríticas e axossomáticas, sugerindo que efeito de excitação da OXA nos neurônios serotoninérgicos do NDR é via comunicação sináptica através do OX1R. Ademais, Tao e colaboradores (2006) demonstraram que a injeção no NDR de diferentes doses de OXB, que possui maior afinidade pelo OX2R, não promove o aumento de liberação de serotonina por tal núcleo.

Trabalhos na literatura demonstram, ainda que indiretamente, que a estimulação de neurônios serotoninérgicos do NDR promove a liberação de serotonina para áreas de projeções modulando comportamentos defensivos relacionados ao pânico. Por exemplo Bernabe e colaboradores (2024) demonstram que a estimulação seletiva de fibras

serotonérgicas provinda das asas-laterais do NDR para o Pef atenuou tanto os comportamentos de fuga quanto as respostas cardiorrespiratórias provocadas pelo desafio de exposição ao CO₂. Os autores sugerem que este efeito seja mediado pelos receptores 5-HT1A presentes no Pef (BERNABE et al., 2024). De modo similar, Pobbe e Zangrossi (2005) demonstram que o aumento na latência de fuga de ratos expostos ao LTE desencadeada pela estimulação química do NDR é anulado pela injeção prévia de WAY-100635 na SCPd. Ademais Zanoveli e colaboradores (2010) observaram que o tratamento crônico com a fluoxetina aumenta a concentração de serotonina da SCPd e promove aumento da latência de fuga de ratos expostos ao LTE. Estes pesquisadores também mostraram que este efeito é bloqueado pela injeção prévia de WAY-100635 na SCPd (ZANOVELI et al., 2010).

Diante de tais evidências, no experimento 2B investigamos se o efeito panicolítico desencadeado pela injeção de OXA na asa-lateral do NDR era mediado pelo receptor 5-HT1A na SCPd. Os resultados mostraram que a injeção prévia de WAY-10063 na SCPd anulou a diminuição de saltos provocada pela injeção de OXA na asa-lateral expostos ao CO₂. Este resultado demonstra a participação dos receptores 5-HT1A da SCPd na mediação dos efeitos panicolítico decorrentes na injeção de OXA nas asas laterais do NDR.

Tomados em conjuntos nossos dados e as evidências da literatura citadas acima, indicam que o efeito panicolítico desencadeado pela injeção de OXA nas asas-laterais do NDR é desencadeado pelo aumento no número de disparo de neurônios serotonérgicos nesta região e mediado pelo aumento de serotonina na SCPd.

Na segunda etapa deste trabalho, fomos verificar a generalidade de nossos achados no modelo de exposição a altas concentrações de CO₂ investigando as consequências da injeção de OXA nas asas-laterais do NDR em camundongos submetidos ao BMT.

Conforme, citado na introdução deste estudo, o BMT é um teste comportamental novo que apresenta limitações quanto a sua validade para o estudo das respostas defensivas associadas ao pânico. Assim, antes de testar o efeito de injeções intra-asa-lateral do NDR de OXA estendemos a validação do teste do BMT.

O primeiro experimento de validação (experimento 3A) mostrou que existe uma diferença no padrão comportamental das diferentes linhagens testadas no BMT. Mais especificamente, camundongos C57bl/6 apresentaram um maior número de contatos e de saltos quando comparados as demais linhagens. Ademais a análise de covariância demonstrou que o aumento no número de saltos não é decorrente do aumento no número de contato. Resultado similar foi obtido por Frias e colaboradores (2021) no teste de exposição a altas concentrações de CO₂ onde os camundongos da linhagem C57BL/6 expressaram um maior número de saltos comparado as linhagens Balbc e Swiss. Em termos de comportamentos relacionados à ansiedade, trabalhos na literatura divergem acerca da sensibilidade de diferentes linhagens aos testes comportamentais. Por exemplo, Marchette e colaboradores (2018) encontraram que a linhagem Swiss é mais ansiosa que a C57Bl/6 no labirinto em cruz elevado e no teste de sobressalto potencializado pelo medo. Já Miller e colaboradores (2010) mostraram que a linhagem Balbc é descrita como mais ansiosa do que a C57BL/6 no teste do campo aberto e no teste do claro-escuro. Ademais outros estudos também mostraram a maior expressão de comportamentos relacionados à ansiedade em camundongos C57BL/6 quando comparados a outras linhagens (AVGUSTINOVICH et al., 2000; GRIEBEL et al., 2000; NESHER et al., 2012; TRULLAS; SKOLNICK, 1993). Dessa forma, é possível dizer que as respostas das diferentes linhagens diferem dependendo do estímulo empregado e do protocolo experimental utilizado.

Ainda neste experimento observamos que os camundongos da linhagem Swiss

exibiram um aumento significativo no número de perseguições ao besouro-robô em comparação com as outras linhagens. O comportamento de perseguição ao besouro assemelha-se à estratégia de caça utilizada por camundongos (COMOLI; RIBEIRO-BARBOSA; CANTERAS, 2003; HEINZ; GENEWSKY; WOTJAK, 2017). Estudos na literatura documentaram a caça e a predação de insetos por camundongos tanto em seu ambiente natural quanto em ambientes de laboratório (para revisão ver GALVIN et al., 2021). Neste contexto, o tamanho e peso superiores dos camundongos da linhagem Swiss em comparação com outras linhagens podem ter influenciado a percepção do camundongo sobre o besouro-robô, mudando de um estímulo aversivo para o de uma presa potencial, sugerindo uma resposta adaptativa por parte destes animais.

Além da sensibilidade de diferentes linhagens, avaliamos também o efeito de drogas panicolíticas sobre os comportamentos gerados pelo besouro-robô no BMT. No experimento 3B observamos que o alprazolam, em doses que não alteraram a atividade locomotora, produziu uma redução dose-dependente nos comportamentos de fuga horizontais e de saltos. Além disso, um aumento na porcentagem de tolerância ao besouro também foi observado na maior dose testada. Estes resultados são corroborados por evidência obtidas em outros modelos experimentais que associam a resposta de fuga a ataques de pânico, como a exposição a altas concentrações de CO₂ (SPIACCI et al., 2018b), a bateria de testes de defesa em camundongos (BLANCHARD; GRIEBEL; BLANCHARD, 2003); o teste de exposição ao rato (CAMPOS et al., 2013) e no teste de conflito presa-predador (PASCHOALIN-MAURIN et al., 2018). Neste mesmo experimento observamos que o diazepam diminuiu o número de fugas horizontais dos animais expostos ao BMT sem alterar os demais comportamentos mensurados. Um efeito discreto do diazepam sobre os comportamentos defensivos também foi observado por Campos e colaboradores (2013) no teste de exposição ao rato. Neste estudo apenas o

comportamento de postura esticada foi reduzido após a injeção de diazepam (CAMPOS et al., 2013). Na mesma direção, Heinz e colaboradores (2017) reportaram ausência de efeito do diazepam na arena grande do BMT. Em contraste com estes resultados, o diazepam atenuou o comportamento defensivo em testes de ansiedade como o modelo de transição claro-escuro (GRIEBEL et al., 1989; GRIEBEL et al., 2000) e o labirinto em cruz elevado (COLE et al., 1993; GRIEBEL et al., 2000).

Tomados em conjunto, nossos resultados apontam para uma maior sensibilidade do BMT a benzodiazepínicos de alta potência, como o panicolítico alprazolam, do que ao diazepam que tem sido considerado mais ansiolítico do que panicolítico em testes com roedores (CAMPOS et al., 2013).

Na sequência avaliamos a sensibilidade do BMT ao tratamento crônico com a fluoxetina. Os resultados do experimento 3B mostraram que o tratamento crônico com a fluoxetina não alterou nenhum dos comportamentos analisados nas três doses testadas. Este resultado contrasta com estudos prévios na literatura onde a fluoxetina foi capaz de reduzir o comportamento de fuga de animais expostos a diferentes testes comportamentais, como a exposição a altas concentrações de CO₂ (SPIACCI et al., 2018), a fuga do LTE (ZANGROSSI; GRAEFF, 2014), o teste de exposição ao rato (CAMPOS et al., 2013), e o teste de confronto presa-predador (PASCHOALIN-MAURIN et al., 2018). Não temos uma explicação clara de por que a fluoxetina não conseguiu atenuar os comportamentos defensivos dos camundongos expostos ao BMT. Novos estudos investigando o efeito de outros ISRS no BMT deverão ser feitos para verificar a sensibilidade do teste a esta classe de drogas.

A respeito dos efeitos das consequências da injeção de OXA nas asas-laterais do NDR em camundongos submetidos ao BMT, os resultados mostraram um aumento no número de saltos e uma tendência a redução da porcentagem de tolerância ao besouro robô. Este

resultado vai em direção oposta ao observado no teste de exposição ao CO₂, apontando para uma possível dependência de estímulo, respiratório ou não respiratório, para sua ação. Uma possível explicação para tal efeito provém de um estudo de eletrofisiologia realizado por Liu e colaboradores em 2002. Estes pesquisadores observaram que em baixas concentrações a OXA estimula o disparo dos neurônios serotoninérgicos no NDR. No entanto em altas concentrações a OXA inibe indiretamente o disparo dos neurônios serotoninérgicos do NDR devido a sua ação em interneurônios GABAérgicos presentes nesta região.

Assim, sugerimos que o efeito encontrado no BMT seja devido ao recrutamento destes interneurônios GABAérgicos presente no NDR. Tal suposição baseia-se em estudos que demonstram que situações aversivas e de estresse recrutam e aumentam a atividade de neurônios orexinérgicos no LH, PeF e no HDM (JOHNSON et al., 2012a; SOYA; SAKURAI, 2020). Além disso, Zhang e colaboradores (2006) demonstraram que algumas características fisiológicas associadas as respostas defensivas, tais como o aumento na pressão arterial, da frequência cardíaca e da ventilação, são mediadas pela ação sistêmica da OXA. Estas informações permitem a inferência de que a exposição ao BMT recruta e aumenta a liberação de OXA para as áreas de projeção como o NDR, sugerindo um possível pulso tônico e uma concentração de OXA maior nesta região quando comparada ao teste de exposição ao CO₂. Estudos futuros que investiguem a existência de um pulso tônico orexinérgico nas asas-laterais do NDR, bem como a participação dos interneurônios GABAérgicos desta região no efeito modulatórios da OXA, podem fornecer mais informações a cerca dos mecanismos subjacentes dos efeitos observados no experimento 4.

Tomados em conjunto nossos resultados demonstram o envolvimento da OXA nas asas-laterais do NDR na modulação dos comportamentos defensivos relacionados ao

pânico. Ademais, tais resultados também indicam uma possível dependência de estímulo, respiratório ou não respiratório, e recrutamento de circuitos neurais distintos para ação modulatória da OXA na asa-lateral no NDR.

Conclusão

CONCLUSÃO

- A OXA na asa-lateral do DRN promove um efeito panicolítico em camundongos expostos a 20% de CO₂. Este efeito é bloqueado pela administração intra-SCPd do antagonista dos receptores 5-HT_{1A}, WAY100635.
- Os camundongos da linhagem C57Bl/6 são mais propensos a expressar comportamentos de fuga frente a exposição ao BMT, quando comparados com as linhagens Balbc, Swiss e CD1.
- O BMT apresenta maior sensibilidade a benzodiazepínicos de alta potência, como o alprazolam, do que ao ansiolítico diazepam e ao tratamento crônico com a fluoxetina.
- A OXA na asa-lateral do DRN promove um aumento no número de saltos, sugerindo um feito panicogênico, em camundongos expostos ao BMT.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMS, JOLANE K.; JOHNSON, PHILIP L.; HOLLIS, JACOB H.; LOWRY, CHRISTOPHER A. Anatomic and Functional Topography of the Dorsal Raphe Nucleus. **Annals of the New York Academy of Sciences**, [S. l.], v. 1018, n. 1, p. 46–57, 2004. DOI: 10.1196/annals.1296.005.

ABREU, Aline R.; MOLOSH, Andrei I.; JOHNSON, Philip L.; SHEKHAR, Anantha. Role of medial hypothalamic orexin system in panic, phobia and hypertension. **Brain Research**, [S. l.], v. 1731, n. September 2018, p. 145942, 2020. DOI: 10.1016/j.brainres.2018.09.010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.09.010>.

ADIDHARMA, Widya; DEATS, Sean P.; IKENO, Tomoko; LIPTON, Jack W.; LONSTEIN, Joseph S.; YAN, Lily. Orexinergic modulation of serotonin neurons in the dorsal raphe of a diurnal rodent, *Arvicanthis niloticus*. **Hormones and Behavior**, [S. l.], v. 116, n. May, p. 104584, 2019. DOI: 10.1016/j.yhbeh.2019.104584. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2019.104584>.

AGUIAR, Daniele Cristina; GUIMARÃES, Francisco Silveira. Blockade of NMDA receptors and nitric oxide synthesis in the dorsolateral periaqueductal gray attenuates behavioral and cellular responses of rats exposed to a live predator. **Journal of Neuroscience Research**, [S. l.], v. 87, n. 11, p. 2418–2429, 2009. DOI: 10.1002/jnr.22082.

ALMADA, Rafael C.; GENEWSKY, Andreas J.; HEINZ, Daniel E.; KAPLICK, Paul M.; COIMBRA, Norberto C.; WOTJAK, Carsten T. Stimulation of the nigrotectal pathway at the level of the superior colliculus reduces threat recognition and causes a shift from avoidance to approach behavior. **Frontiers in Neural Circuits**, [S. l.], v. 12,

n. May, p. 1–9, 2018. DOI: 10.3389/fncir.2018.00036.

AMERICAN PSYCHIATRY ASSOCIATION. **Diagnostic and statistical manual of mental disorders. 5th edition, text revision.** Washington, DC.

AMMOUN, Sylwia; HOLMQVIST, Tomas; SHARIATMADARI, Ramin; OONK, Hendrica B.; DETHEUX, Michel; PARMENTIER, Marc; ÅKERMAN, Karl E. O.; KUKKONEN, Jyrki P. Distinct recognition of OX1 and OX2 receptors by orexin peptides. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, [*S. l.*], v. 305, n. 2, p. 507–514, 2003. DOI: 10.1124/jpet.102.048025.

AZMITIA, Efrain C.; SEGAL, Menahem. An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. **Journal of Comparative Neurology**, [*S. l.*], v. 179, n. 3, p. 641–667, 1978. DOI: 10.1002/cne.901790311.

BALDWIN, David S. et al. Evidence-based pharmacological treatment of anxiety disorders, post-traumatic stress disorder and obsessive-compulsive disorder: A revision of the 2005 guidelines from the British Association for Psychopharmacology. **Journal of Psychopharmacology**, [*S. l.*], v. 28, n. 5, p. 403–439, 2014. DOI: 10.1177/0269881114525674.

BALLENGER, James. EFFICACY OF BENZODIAZEPINES IN PANIC DISORDER AND AGORAPHOBIA. **Journal of Psychiatric Research**, [*S. l.*], v. 24, 1990.

BANDELOW, Borwin et al. World Federation of Societies of Biological Psychiatry (WFSBP) Guidelines for the Pharmacological Treatment of Anxiety, Obsessive-Compulsive and Post-Traumatic Stress Disorders – First Revision. **The World Journal of Biological Psychiatry**, [*S. l.*], v. 9, n. 4, p. 248–312, 2008. DOI: 10.1080/15622970802465807.

BANDELOW, Borwin; MICHAELIS, Sophie. Epidemiology of anxiety disorders in the

21st century. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, [*S. l.*], v. 17, n. 3, p. 327–335, 2015.

DOI: 10.31887/DCNS.2015.17.3/bbandelow.

BATELAAN, Neeltje M.; DE GRAAF, Ron; VAN BALKOM, Anton;

VOLLEBERGH, Wilma; BEEKMAN, Aartjan. Thresholds for health and thresholds for illness: panic disorder versus subthreshold panic disorder. **Psychological Medicine**, [*S. l.*], v. 37, n. 2, p. 247–256, 2007. DOI: 10.1017/S0033291706009007.

BATISTELA, Matheus F.; VILELA-COSTA, Heloísa H.; FRIAS, Alana T.;

HERNANDES, Paloma M.; LOVICK, Thelma A.; ZANGROSSI, Helio. Enhanced responsiveness to hypoxic panicogenic challenge in female rats in late diestrus is suppressed by short-term, low-dose fluoxetine: Involvement of the dorsal raphe nucleus and the dorsal periaqueductal gray. **Journal of Psychopharmacology**, [*S. l.*], v. 35, n. 12, p. 1523–1535, 2021. DOI: 10.1177/02698811211058986.

BERNABE, Cristian S.; CALIMAN, Izabela F.; DE ABREU, Aline R. R.; MOLOSH, Andrei I.; TRUITT, William A.; SHEKHAR, Anantha; JOHNSON, Philip L.

Identification of a novel perifornical-hypothalamic-area-projecting serotonergic system that inhibits innate panic and conditioned fear responses. **Translational Psychiatry**, [*S. l.*], v. 14, n. 1, 2024. DOI: 10.1038/s41398-024-02769-3.

BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. **Annual review of psychology**, [*S. l.*], v. 39, p. 43–68, 1988. DOI: 10.1146/ANNUREV.PS.39.020188.000355.

BLANCHARD, D. Caroline; GRIEBEL, Guy; BLANCHARD, Robert J. The Mouse Defense Test Battery: Pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. **European Journal of Pharmacology**, [*S. l.*], v. 463, n. 1–3, p. 97–116, 2003. DOI: 10.1016/S0014-2999(03)01276-7.

BLANCHARD, R. J.; FLANNELLY, K. J.; BLANCHARD, D. C. Defensive behavior

of laboratory and wild *Rattus norvegicus*. **Journal of comparative psychology** (Washington, D.C. : 1983), [S. l.], v. 100, n. 2, p. 101–107, 1986. DOI: 10.1037/0735-7036.100.2.101.

BLANCHARD, Robert J.; YUDKO, Errol B.; RODGERS, R. John; BLANCHARD, D. Caroline. Defense system psychopharmacology: an ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. **Behavioural brain research**, [S. l.], v. 58, n. 1–2, p. 155–165, 1993. DOI: 10.1016/0166-4328(93)90100-5.

BONIFAZI, Alessandro et al. Targeting orexin receptors: Recent advances in the development of subtype selective or dual ligands for the treatment of neuropsychiatric disorders. **Medicinal Research Reviews**, [S. l.], n. December 2022, p. 1–61, 2023. DOI: 10.1002/med.21959.

BOUDREAU, Maxine; LAVOIE, Kim L.; CARTIER, André; TRUTSHNIGG, Barbara; MORIZIO, Alexandre; LEMIÈRE, Catherine; BACON, Simon L. Do asthma patients with panic disorder really have worse asthma? A comparison of physiological and psychological responses to a methacholine challenge. **Respiratory medicine**, [S. l.], v. 109, n. 10, p. 1250–1256, 2015. DOI: 10.1016/J.RMED.2015.09.002.

BOUWER, Colin; STEIN, Dan J. Association of panic disorder with a history of traumatic suffocation. **American Journal of Psychiatry**, [S. l.], v. 154, n. 11, p. 1566–1570, 1997. DOI: 10.1176/ajp.154.11.1566.

BRANDAO, M. L.; DI SCALA, G.; BOUCHET, M. J.; SCHMITT, P. Escape behavior produced by the blockade of glutamic acid decarboxylase (GAD) in mesencephalic central gray or medial hypothalamus. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, [S. l.], v. 24, n. 3, p. 497–501, 1986. DOI: 10.1016/0091-3057(86)90547-2.

BRIGGS, A. C.; STRETCH, D. D.; BRANDON, S. Subtyping of panic disorder by symptom profile. **British Journal of Psychiatry**, [S. l.], v. 163, n. AUG., p. 201–209,

1993. DOI: 10.1192/bjp.163.2.201.

BROWN, Ritchie E.; SERGEEVA, Olga A.; ERIKSSON, Krister S.; HAAS, Helmut L. Convergent excitation of dorsal raphe serotonin neurons by multiple arousal systems (orexin/hypocretin, histamine and noradrenaline). **Journal of Neuroscience**, [S. l.], v. 22, n. 20, p. 8850–8859, 2002. DOI: 10.1523/jneurosci.22-20-08850.2002.

BULLEY, Adam; HENRY, Julie D.; SUDDENDORF, Thomas. Thinking about threats: Memory and prospection in human threat management. **Consciousness and Cognition**, [S. l.], v. 49, p. 53–69, 2017. DOI: 10.1016/j.concog.2017.01.005.

CAMPOS, Kelciane Ferreira Caetano; AMARAL, Vanessa Cristiane Santana; RICO, Javier Leonardo; MIGUEL, Tarciso Tadeu; NUNES-DE-SOUZA, Ricardo Luiz. Ethopharmacological evaluation of the rat exposure test: A prey-predator interaction test. **Behavioural Brain Research**, [S. l.], v. 240, n. 1, p. 160–170, 2013. DOI: 10.1016/j.bbr.2012.11.023. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2012.11.023>.

CANTERAS, Newton S. The medial hypothalamic defensive system: Hodological organization and functional implications. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, [S. l.], v. 71, n. 3, p. 481–491, 2002. DOI: 10.1016/S0091-3057(01)00685-2.

CANTERAS, Newton S.; GRAEFF, Frederico G. Executive and modulatory neural circuits of defensive reactions: Implications for panic disorder. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, [S. l.], v. 46, n. P3, p. 352–364, 2014. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2014.03.020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.03.020>.

CARLÉN, Marie. What constitutes the prefrontal cortex? **Science**, [S. l.], v. 358, n. 6362, p. 478–482, 2017. DOI: 10.1126/science.aan8868.

CAROBREZ, Antonio P.; TEIXEIRA, Karina V.; GRAEFF, Frederico G. Modulation of defensive behavior by periaqueductal gray NMDA/glycine-B receptor. **Neuroscience**

and biobehavioral reviews, [*S. l.*], v. 25, n. 7–8, p. 697–709, 2001. DOI:

10.1016/S0149-7634(01)00059-8.

CARVALHO, M. C.; VELONI, A. C.; GENARO, K.; BRANDÃO, M. L. Behavioral sensitization induced by dorsal periaqueductal gray electrical stimulation is counteracted by NK1 receptor antagonism in the ventral hippocampus and central nucleus of the amygdala. **Neurobiology of Learning and Memory**, [*S. l.*], v. 148, n.

February, p. 60–68, 2018. DOI: 10.1016/j.nlm.2018.01.009. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.nlm.2018.01.009>.

CHAWLA, Natasha; ANOTHASINTAWEE, Thunyarat;

CHAROENRUNGRUEANGCHAI, Kridsada; THAIPISUTTIKUL, Papan; MCKAY, Gareth J.; ATTIA, John; THAKKINSTIAN, Ammarin. Drug treatment for panic

disorder with or without agoraphobia: systematic review and network meta-analysis of randomised controlled trials. **The BMJ**, [*S. l.*], v. 376, 2022. DOI: 10.1136/BMJ-2021-066084.

CHOU, Kee Lee. Panic disorder in older adults: evidence from the national epidemiologic survey on alcohol and related conditions. **International journal of geriatric psychiatry**, [*S. l.*], v. 25, n. 8, p. 822–832, 2010. DOI: 10.1002/GPS.2424.

COMOLI, E.; RIBEIRO-BARBOSA, E. R.; CANTERAS, Newton Sabino. Predatory hunting and exposure to a live predator induce opposite patterns of Fos immunoreactivity in the PAG. **Behavioural Brain Research**, [*S. l.*], v. 138, n. 1, p. 17–28, 2003. DOI: 10.1016/S0166-4328(02)00197-3.

CRASKE, Michelle G.; STEIN, Murray B. Anxiety. **The Lancet**, [*S. l.*], v. 388, n. 10063, p. 3048–3059, 2016. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)30381-6.

DAVID, D. J.; GARDIER, A. M. Les bases de pharmacologie fondamentale du système sérotoninergique : application à la réponse antidépressive. **L'Encéphale**, [*S. l.*], v. 42, n.

3, p. 255–263, 2016. DOI: 10.1016/j.encep.2016.03.012.

DE BORTOLI, Valquíria Camin; YAMASHITA, Paula Shimene De Melo;

ZANGROSSI, Hélio. 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptor control of a panic-like defensive response in the rat dorsomedial hypothalamic nucleus. **Journal of**

Psychopharmacology, [*S. l.*], v. 27, n. 12, p. 1116–1123, 2013. DOI: 10.1177/0269881113492900.

DE LECEA, L. et al. The hypocretins: Hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [*S. l.*], v. 95, n. 1, p. 322–327, 1998. DOI:

10.1073/pnas.95.1.322.

DE LECEA, L.; SUTCLIFFE, J. G. The hypocretins/orexins: Novel hypothalamic neuropeptides involved in different physiological systems. **Cellular and Molecular Life Sciences**, [*S. l.*], v. 56, n. 5–6, p. 473–480, 1999. DOI: 10.1007/s000180050446.

DEAKIN, J. F. Willia.; GRAEFF, Frederico G. 5-HT and mechanisms of defence.

Journal of psychopharmacology (Oxford, England), [*S. l.*], v. 5, n. 4, p. 305–315, 1991. DOI: 10.1177/026988119100500414.

DENG, Hanfei; XIAO, Xiong; WANG, Zuoren. Periaqueductal gray neuronal activities underlie different aspects of defensive behaviors. **Journal of Neuroscience**, [*S. l.*], v. 36, n. 29, p. 7580–7588, 2016. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4425-15.2016.

DERGACHEVA, Olga; YAMANAKA, Akihiro; SCHWARTZ, Alan R.; POLOTSKY, Vsevolod Y.; MENDELOWITZ, David. Hypoxia and hypercapnia inhibit hypothalamic orexin neurons in rats. **Journal of Neurophysiology**, [*S. l.*], v. 116, n. 5, p. 2250–2259, 2016. DOI: 10.1152/jn.00196.2016.

DU, Yang; DU, Biao; DIAO, Yun; YIN, Zubin; LI, Jin; SHU, Yunfeng; ZHANG, Zizhen; CHEN, Lizhi. Comparative efficacy and acceptability of antidepressants and

benzodiazepines for the treatment of panic disorder: A systematic review and network meta-analysis. **Asian Journal of Psychiatry**, [S. l.], v. 60, 2021. DOI:

10.1016/J.AJP.2021.102664.

E. NARDI, Antonio et al. Clonazepam for the Treatment of Panic Disorder. **Current Drug Targets**, [S. l.], v. 14, n. 3, p. 353–364, 2013. DOI:

10.2174/138945013804999025.

EICHENBERGER, G. C. D.; RIBEIRO, S. J.; OSAKI, M. Y.; MARUOKA, R. Y.; RESENDE, G. C. C.; CASTELLAN-BALDAN, L.; CORRÊA, S. A. L.; 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 . **Neuropharmacology**, [S. l.], v. 42, n. 1, p. 48–59, 2002.

DOI: 10.1016/S0028-3908(01)00155-1.

FALCONI-SOBRINHO, Luiz Luciano; DOS ANJOS-GARCIA, Tayllon;

HERNANDES, Paloma Molina; RODRIGUES, Bruno Mangili de Paula; ALMADA, Rafael Carvalho; COIMBRA, Norberto Cysne. Unravelling the dorsal periaqueductal grey matter NMDA receptors relevance in the nitric oxide-mediated panic-like

behaviour and defensive antinociception organised by the anterior hypothalamus of

male mice. **Psychopharmacology**, [S. l.], p. 319–335, 2023. DOI: 10.1007/s00213-

023-06309-7. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00213-023-06309-7>.

FAVREAU, Helene; BACON, Simon L.; LABRECQUE, Manon; LAVOIE, Kim L.

Prospective impact of panic disorder and panic-anxiety on asthma control, health service use, and quality of life in adult patients with asthma over a 4-year follow-up.

Psychosomatic medicine, [S. l.], v. 76, n. 2, p. 147–155, 2014. DOI:

10.1097/PSY.0000000000000032.

FREIRE, Rafael C.; HALLAK, Jaime E.; CRIPPA, José A.; NARDI, Antonio E. New treatment options for panic disorder: clinical trials from 2000 to 2010.

<http://dx.doi.org/10.1517/14656566.2011.562200>, [S. l.], v. 12, n. 9, p. 1419–1428, 2011. DOI: 10.1517/14656566.2011.562200.

FREIRE, Rafael C.; NARDI, Antonio E. Panic disorder and the respiratory system: clinical subtype and challenge tests. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, [S. l.], v. 34, p. S32–S52, 2012. DOI: 10.1590/s1516-44462012000500004. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-44462012000500004>.

FREIRE, Rafael C.; VALENÇA, Alexandre M.; NASCIMENTO, Isabella; LOPES, Fabiana L.; MEZZASALMA, Marco A.; ZIN, Walter A.; NARDI, Antonio E. Clinical features of respiratory and nocturnal panic disorder subtypes. **Psychiatry Research**, [S. l.], v. 152, n. 2–3, p. 287–291, 2007. DOI: 10.1016/j.psychres.2006.01.003.

FRIAS, Alana Tercino. Envolvimento do núcleo dorsal da rafe na mediação de comportamentos defensivos relacionados ao pânico evocados por desafios respiratórios.

In: tese de doutorado. [s.l: s.n.]. p. 96.

FULLANA, M. A. et al. Prevalence and correlates of respiratory and non-respiratory panic attacks in the general population. **Journal of Affective Disorders**, [S. l.], v. 131, n. 1–3, p. 330–338, 2011. DOI: 10.1016/j.jad.2010.11.031. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jad.2010.11.031>.

GALVIN, Liam; MIRZA AGHA, Behroo; SALEH, Muhammad; MOHAJERANI, Maid H.; WHISHAW, Ian Q. Learning to cricket hunt by the laboratory mouse (*Mus musculus*): Skilled movements of the hands and mouth in cricket capture and consumption. **Behavioural Brain Research**, [S. l.], v. 412, n. March, p. 113404, 2021.

DOI: 10.1016/j.bbr.2021.113404. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2021.113404>.

GOODWIN, Renee D.; PAGURA, Jina; COX, Brian; SAREEN, Jitender. Asthma and mental disorders in Canada: impact on functional impairment and mental health service use. **Journal of psychosomatic research**, [S. l.], v. 68, n. 2, p. 165–173, 2010. DOI: 10.1016/J.JPSYCHORES.2009.06.005.

GORMAN, Robert B.; MCKENZIE, David K.; GANDEVIA, Simon C. Task failure, breathing discomfort and CO2 accumulation without fatigue during inspiratory resistive loading in humans. **Respiration Physiology**, [S. l.], v. 115, n. 3, p. 273–286, 1999. DOI: 10.1016/S0034-5687(99)00010-9.

GOTTSCHALK, Michael G. et al. Orexin in the anxiety spectrum: association of a HCRTR1 polymorphism with panic disorder/agoraphobia, CBT treatment response and fear-related intermediate phenotypes. **Translational Psychiatry**, [S. l.], v. 9, n. 1, 2019. DOI: 10.1038/s41398-019-0415-8.

GRAEFF, F. G. Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviors and related emotions in mammals. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira de Pesquisas Medicas e Biologicas**, [S. l.], v. 27, n. 4, p. 811–829, 1994.

GRAEFF, Frederico G. Serotonin, the periaqueductal gray and panic. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, [S. l.], v. 28, n. 3, p. 239–259, 2004. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2003.12.004.

GRAEFF, Frederico G. Translational approach to the pathophysiology of panic disorder: Focus on serotonin and endogenous opioids. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, United States, v. 76, n. Pt A, p. 48–55, 2017. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2016.10.013.

GRAEFF, Frederico Guilherme. Periaqueductal Grey and Animal Models of. [S. l.], 1991.

GRAEFF, Frederico Guilherme. Ansiedade. *In: Neurobiologia das doenças mentais*. 5. ed. [s.l.: s.n.]. p. 135–178.

GRAEFF, Frederico Guilherme; ZANGROSSI, Hélio Jr. Medicamentos Antiansiedade. *In: GUIMARÃES, F. S.; GRAEFF, Frederico Guilherme (org.). Fundamentos de Psicofarmacologia*. 3^a ed. [s.l.] : Atheneu, 2021. p. 199–240.

GREENBERG, Tsafirir; CARLSON, Joshua M.; CHA, Jiok; HAJCAK, Greg; MUJICA-PARODI, Lilianne R. Ventromedial prefrontal cortex reactivity is altered in generalized anxiety disorder during fear generalization. **Depression and Anxiety**, [S. l.], v. 30, n. 3, p. 242–250, 2013. DOI: 10.1002/da.22016.

GRIEZ, Eric J. L.; LOUSBERG, Harold; VAN DEN HOUT, Marcel A. CO2 vulnerability in panic disorder. **Psychiatry Research**, [S. l.], v. 20, n. 2, p. 87–95, 1987. DOI: [https://doi.org/10.1016/0165-1781\(87\)90001-1](https://doi.org/10.1016/0165-1781(87)90001-1).

GROSS, Cornelius T.; CANTERAS, Newton Sabino. The many paths to fear. **Nature Reviews Neuroscience**, [S. l.], v. 13, n. 9, p. 651–658, 2012. DOI: 10.1038/nrn3301.

GUAN, Xuyan; CAO, Peng. Brain Mechanisms Underlying Panic Attack and Panic Disorder. **Neuroscience Bulletin**, [S. l.], 2023. DOI: 10.1007/s12264-023-01088-9. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12264-023-01088-9>.

GUIMARÃES, Francisco S.; ZANGROSSI, Hélio; DEL BEN, Cristina M.; GRAEFF, Frederico G. Serotonin in Panic and Anxiety Disorders. **Handbook of Behavioral Neuroscience**, [S. l.], v. 21, p. 667–685, 2010. DOI: 10.1016/S1569-7339(10)70105-3.

HALE, Matthew W.; LOWRY, Christopher A. Functional topography of midbrain and pontine serotonergic systems: Implications for synaptic regulation of serotonergic circuits. **Psychopharmacology**, [S. l.], v. 213, n. 2–3, p. 243–264, 2011. DOI: 10.1007/s00213-010-2089-z.

HALE, Matthew W.; SHEKHAR, Anantha; LOWRY, Christopher A. Stress-related

serotonergic systems: Implications for symptomatology of anxiety and affective disorders. **Cellular and Molecular Neurobiology**, [S. l.], v. 32, n. 5, p. 695–708, 2012. DOI: 10.1007/s10571-012-9827-1.

HASLER, Gregor; GERGEN, Peter J.; KLEINBAUM, David G.; AJDACIC, Vladeta; GAMMA, Alex; EICH, Dominique; RÖSSLER, Wulf; ANGST, Jules. Asthma and panic in young adults: A 20-year prospective community study. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, [S. l.], v. 171, n. 11, p. 1224–1230, 2005. DOI: 10.1164/rccm.200412-1669OC.

HEINZ, Daniel E.; GENEWSKY, Andreas; WOTJAK, Carsten T. Enhanced anandamide signaling reduces flight behavior elicited by an approaching robo-beetle. **Neuropharmacology**, [S. l.], v. 126, p. 233–241, 2017. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2017.09.010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.09.010>.

HEINZ, Daniel E.; SCHÖTTLE, Vivian A.; NEMCOVA, Paulina; BINDER, Florian P.; EBERT, Tim; DOMSCHKE, Katharina; WOTJAK, Carsten T. Exploratory drive, fear, and anxiety are dissociable and independent components in foraging mice. **Translational Psychiatry**, [S. l.], v. 11, n. 1, 2021. DOI: 10.1038/s41398-021-01458-9. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41398-021-01458-9>.

HERNANDES, Paloma Molina; BATISTELA, Matheus Fitipaldi; NASCIMENTO-SILVA, Jefferson Manoel; FRIAS, Alana Tercino; MATTHIESEN, Melina; CAMPOS, Alline Cristina; LOVICK, Thelma Anderson; ZANGROSSI, Helio. Sex and estrous cycle-linked differences in the effect of cannabidiol on panic-like responding in rats and mice. **Behavioural Brain Research**, [S. l.], v. 455, n. September, p. 114663, 2023. DOI: 10.1016/j.bbr.2023.114663. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2023.114663>.

HO, Yu Cheng; LEE, Hsin Jung; TUNG, Li Wei; LIAO, Yan Yu; FU, Szu Ying; TENG, Shu Fang; LIAO, Hsin Tzu; MACKIE, Ken; CHIOU, Lih Chu. Activation of orexin 1 receptors in the periaqueductal gray of male rats leads to antinociception via retrograde endocannabinoid (2-arachidonoylglycerol)-induced disinhibition. **Journal of Neuroscience**, [S. l.], v. 31, n. 41, p. 14600–14610, 2011. DOI:

10.1523/JNEUROSCI.2671-11.2011.

JOHNSON, P. L.; LOWRY, C. A.; TRUITT, W.; SHEKHAR, A. Disruption of GABAergic tone in the dorsomedial hypothalamus attenuates responses in a subset of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus following lactate-induced panic.

Journal of Psychopharmacology, [S. l.], v. 22, n. 6, p. 642–652, 2008. DOI:

10.1177/0269881107082900.

JOHNSON, Philip L. et al. A key role for orexin in panic anxiety. **Nature Medicine**, [S. l.], v. 16, n. 1, p. 111–115, 2010. DOI: 10.1038/nm.2075. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1038/nm.2075>.

JOHNSON, Philip L.; MOLOSH, Andrei; FITZ, Stephanie D.; TRUITT, William A.; SHEKHAR, Anantha. **Orexin, stress, and anxiety/panic states**. [s.l.: s.n.]. v. 198 DOI:

10.1016/B978-0-444-59489-1.00009-4.

JOHNSON, Philip L.; SAMUELS, Brian C.; FITZ, Stephanie D.; FEDERICI, Lauren M.; EARLY, Maureen C.; TRUITT, William; LOWRY, Christopher A. Orexin 1 receptors are a novel target to modulate panic responses and the panic brain network Philip. [S. l.], v. 107, n. 5, p. 733–742, 2013. DOI:

10.1016/j.physbeh.2012.04.016.Orexin.

JOHNSON, Philip L.; SAMUELS, Brian C.; FITZ, Stephanie D.; FEDERICI, Lauren M.; HAMMES, Nathan; EARLY, Maureen C.; TRUITT, William; LOWRY, Christopher A.; SHEKHAR, Anantha. Orexin 1 receptors are a novel target to modulate

panic responses and the panic brain network. **Physiology and Behavior**, [S. l.], v. 107, n. 5, p. 733–742, 2012. b. DOI: 10.1016/j.physbeh.2012.04.016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2012.04.016>.

JOHNSON, Philip L.; SAMUELS, Brian C.; FITZ, Stephanie D.; LIGHTMAN, Stafford L.; LOWRY, Christopher A.; SHEKHAR, Anantha. Activation of the orexin 1 receptor is a critical component of CO₂-mediated anxiety and hypertension but not bradycardia. **Neuropsychopharmacology**, [S. l.], v. 37, n. 8, p. 1911–1922, 2012. c. DOI: 10.1038/npp.2012.38. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/npp.2012.38>.

JOHNSON, Philip L.; SHEKHAR, Anantha. An animal model of panic vulnerability with chronic disinhibition of the dorsomedial/perifornical hypothalamus. **Physiology and Behavior**, [S. l.], v. 107, n. 5, p. 686–698, 2012. DOI: 10.1016/j.physbeh.2012.03.016.

JOHNSON, Philip Lee; HOLLIS, Jacob H.; MORATALLA, Rosario; LIGHTMAN, Stafford L.; LOWRY, Christopher A. Acute hypercarbic gas exposure reveals functionally distinct subpopulations of serotonergic neurons in rats. **Journal of Psychopharmacology**, [S. l.], v. 19, n. 4, p. 327–341, 2005. DOI: 10.1177/0269881105053281.

KASPER, Siegfried; RESINGER, Eva. Panic disorder: The place of benzodiazepines and selective serotonin reuptake inhibitors. **European Neuropsychopharmacology**, [S. l.], v. 11, n. 4, p. 307–321, 2001. DOI: 10.1016/S0924-977X(01)00100-6.

KLEIN, Donald F. Delineation of two drug-responsive anxiety syndromes. **Psychopharmacologia**, [S. l.], v. 5, n. 6, p. 397–408, 1964. DOI: 10.1007/BF02193476.

KLEIN, Donald F. False Suffocation Alarms, Spontaneous Panics, and Related Conditions: An Integrative Hypothesis. **Archives of General Psychiatry**, [S. l.], v. 50,

n. 4, p. 306–317, 1993. DOI: 10.1001/archpsyc.1993.01820160076009.

KLEIN, F.; FINK, M. Psychiatric reaction patterns to imipramine. **American Journal of Psychiatry**, [*S. l.*], v. 119, n. 5, p. 432–438, 1962.

KOHLMEIER, K. A.; WATANABE, S.; TYLER, C. J.; BURLET, S.; LEONARD, C. S. Dual orexin actions on dorsal raphe and laterodorsal tegmentum neurons: Noisy cation current activation and selective enhancement of Ca²⁺ transients mediated by L-type calcium channels. **Journal of Neurophysiology**, [*S. l.*], v. 100, n. 4, p. 2265–2281, 2008. DOI: 10.1152/jn.01388.2007.

KUKKONEN, Jyrki P.; TURUNEN, Pauli M. Cellular Signaling Mechanisms of Hypocretin/Orexin. **Frontiers of Neurology and Neuroscience**, [*S. l.*], v. 45, p. 91–102, 2021. DOI: 10.1159/000514962.

LEE, Maan Gee; HASSANI, Oum K.; JONES, Barbara E. Discharge of identified orexin/hypocretin neurons across the sleep-waking cycle. **Journal of Neuroscience**, [*S. l.*], v. 25, n. 28, p. 6716–6720, 2005. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1887-05.2005.

LI, Shi Bin; DE LECEA, Luis. The hypocretin (orexin) system: from a neural circuitry perspective. **Neuropharmacology**, [*S. l.*], v. 167, n. February, p. 107993, 2020. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2020.107993. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.107993>.

LI, Shi Bin; NEVÁREZ, Natalie; GIARDINO, William J.; DE LECEA, Luis. Optical probing of orexin/hypocretin receptor antagonists. **Sleep**, [*S. l.*], v. 41, n. 10, p. 1–13, 2018. DOI: 10.1093/sleep/zsy141.

LI, Meng Meng; ZHOU, Ping; CHEN, Xiao Dong; XU, Huai Sha; WANG, Jun; CHEN, Ling; ZHANG, Ning; LIU, Na. NO in the dPAG modulates panic-like responses and ASIC1a expression in the prefrontal cortex and hippocampus in mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [*S. l.*], v. 511, n. 2, p. 274–279, 2019. DOI:

10.1016/j.bbrc.2019.02.020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.02.020>.

LIU, Rong Jian; VAN DEN POL, Anthony N.; AGHAJANIAN, George K. Hypocretins (orexins) regulate serotonin neurons in the dorsal raphe nucleus by excitatory direct and inhibitory indirect actions. **Journal of Neuroscience**, [S. l.], v. 22, n. 21, p. 9453–9464, 2002. DOI: 10.1523/jneurosci.22-21-09453.2002.

LÓPEZ-MUÑOZ, Francisco; ÁLAMO, Cecilio; GARCÍA-GARCÍA, Pilar. The discovery of chlordiazepoxide and the clinical introduction of benzodiazepines: Half a century of anxiolytic drugs. **Journal of Anxiety Disorders**, [S. l.], v. 25, n. 4, p. 554–562, 2011. DOI: 10.1016/j.janxdis.2011.01.002.

LOWRY, Christopher A.; JOHNSON, Philip L.; HAY-SCHMIDT, Anders; MIKKELSEN, Jens; SHEKHAR, Anantha. Modulation of anxiety circuits by serotonergic systems. **Stress**, [S. l.], v. 8, n. 4, p. 233–246, 2005. DOI: 10.1080/10253890500492787.

MARCUS, Jacob N.; ASCHKENASI, Carl J.; LEE, Charlotte E.; CHEMELLI, Richard M.; SAPER, Clifford B.; YANAGISAWA, Masashi; ELMQUIST, Joel K. Differential expression of Orexin receptors 1 and 2 in the rat brain. **Journal of Comparative Neurology**, [S. l.], v. 435, n. 1, p. 6–25, 2001. DOI: 10.1002/cne.1190.

MARTA, Cristina; BEN, Del; GRAEFF, Frederico Guilherme; GUIMARA, Francisco Silveira. Serotonin in panic and anxiety disorders. [S. l.], p. 611–633, 2020. DOI: 10.1016/B978-0-444-64125-0.00036-0.

MATTHIESEN, Melina; MENDES, Leonardo D.; SPIACCI, Ailton; FORTALEZA, Eduardo A. T.; CORRÊA, Fernando M. A.; ZANGROSSI, Hélio. Serotonin 2C receptors in the basolateral amygdala mediate the anxiogenic effect caused by serotonergic activation of the dorsal raphe dorsomedial subnucleus. **Journal of Psychopharmacology**, [S. l.], v. 34, n. 4, p. 391–399, 2020. DOI:

10.1177/0269881119882797.

MCNAUGHTON, Neil; CORR, Philip J. A two-dimensional neuropsychology of defense: Fear/anxiety and defensive distance. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, [*S. l.*], v. 28, n. 3, p. 285–305, 2004. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2004.03.005.

MCNAUGHTON, Neil; GRAY, Jeffrey A. Anxiolytic action on the behavioural inhibition system implies multiple types of arousal contribute to anxiety. **Journal of Affective Disorders**, [*S. l.*], v. 61, n. 3, p. 161–176, 2000. DOI: 10.1016/S0165-0327(00)00344-X.

MENDES-GOMES, Joyce; MOTTA, Simone Cristina; PASSONI BINDI, Ricardo; DE OLIVEIRA, Amanda Ribeiro; ULLAH, Farhad; BALDO, Marcus Vinicius C.; COIMBRA, Norberto Cysne; CANTERAS, Newton Sabino; BLANCHARD, D.

Caroline. Defensive behaviors and brain regional activation changes in rats confronting a snake. **Behavioural Brain Research**, [*S. l.*], v. 381, n. January, p. 112469, 2020.

DOI: 10.1016/j.bbr.2020.112469. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.112469>.

MICHELSEN, Kimmo A.; SCHMITZ, Christoph; STEINBUSCH, Harry W. M. The dorsal raphe nucleus—From silver stainings to a role in depression. **Brain Research Reviews**, [*S. l.*], v. 55, n. 2, p. 329–342, 2007. DOI: 10.1016/j.brainresrev.2007.01.002.

MILEYKOVSKIY, Boris Y.; KIYASHCHENKO, Lyudmila I.; SIEGEL, Jerome M. Behavioral correlates of activity in identified hypocretin/orexin neurons. **Neuron**, [*S. l.*], v. 46, n. 5, p. 787–798, 2005. DOI: 10.1016/j.neuron.2005.04.035.

MOBBS, Dean. The ethological deconstruction of fear(s). **Current Opinion in Behavioral Sciences**, [*S. l.*], v. 24, p. 32–37, 2018. DOI:

10.1016/j.cobeha.2018.02.008.

MOBBS, Dean; HEADLEY, Drew B.; DING, Weilun; DAYAN, Peter. Space , Time ,

and Fear : Survival Computations along Defensive Circuits. **Trends in Cognitive Sciences**, [S. l.], p. 1–14, 2020. DOI: 10.1016/j.tics.2019.12.016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tics.2019.12.016>.

MOBBS, Dean; YU, Rongjun; ROWE, James B.; EICH, Hannah; FELDMANHALL, Oriel; DALGLEISH, Tim. Neural activity associated with monitoring the oscillating threat value of a tarantula. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 107, n. 47, p. 20582–20586, 2010. DOI: 10.1073/pnas.1009076107.

MOCHCOVITCH, Marina Dyskant; NARDI, Antonio Egidio. Selective serotonin-reuptake inhibitors in the treatment of panic disorder: A systematic review of placebo-controlled studies. **Expert Review of Neurotherapeutics**, [S. l.], v. 10, n. 8, p. 1285–1293, 2010. DOI: 10.1586/ern.10.110.

MOREIRA, Fabrício A.; GOBIRA, Pedro H.; VIANA, Thércia G.; VICENTE, Maria A.; ZANGROSSI, Hélio; GRAEFF, Frederico G. Modeling panic disorder in rodents. **Cell and tissue research**, [S. l.], 2013. DOI: 10.1007/s00441-013-1610-1.

MUZERELLE, Aude; SCOTTO-LOMASSESE, Sophie; BERNARD, Jean François; SOIZA-REILLY, Mariano; GASPAR, Patricia. Conditional anterograde tracing reveals distinct targeting of individual serotonin cell groups (B5–B9) to the forebrain and brainstem. **Brain Structure and Function**, [S. l.], v. 221, n. 1, p. 535–561, 2016. DOI: 10.1007/s00429-014-0924-4.

NARAYANAN, N. S.; HORST, N. K.; LAUBACH, Mark. Reversible inactivations of rat medial prefrontal cortex impair the ability to wait for a stimulus. **Neuroscience**, [S. l.], v. 139, n. 3, p. 865–876, 2006. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2005.11.072.

NARDI, Antonio E.; NASCIMENTO, Isabella; VALENÇA, Alexandre M.; LOPES, Fabiana L.; MEZZASALMA, Marco A.; ZIN, Walter A.; VERSIANI, Marcio.

Respiratory panic disorder subtype: Acute and long-term response to nortriptyline, a noradrenergic tricyclic antidepressant. **Psychiatry Research**, [S. l.], v. 120, n. 3, p. 283–293, 2003. DOI: 10.1016/S0165-1781(03)00132-X.

NARDI, Antonio E.; VALENÇA, Alexandre M.; LOPES, Fabiana L.; NASCIMENTO, Isabella; VERAS, Andre B.; FREIRE, Rafael C.; MEZZASALMA, Marco A.; DE-MELO-NETO, Valfrido L.; ZIN, Walter A. Psychopathological profile of 35% CO₂ challenge test-induced panic attacks: a comparison with spontaneous panic attacks. **Comprehensive Psychiatry**, [S. l.], v. 47, n. 3, p. 209–214, 2006. a. DOI: 10.1016/j.comppsy.2005.07.007.

NARDI, Antonio E.; VALENÇA, Alexandre M.; MEZZASALMA, Marco A.; LOPES, Fabiana L.; NASCIMENTO, Isabella; VERAS, Andre B.; FREIRE, Rafael C.; DE-MELO-NETO, Valfrido L.; ZIN, Walter A. 35% Carbon dioxide and breath-holding challenge tests in panic disorder: a comparison with spontaneous panic attacks. **Depression and anxiety**, United States, v. 23, n. 4, p. 236–244, 2006. b. DOI: 10.1002/da.20165.

NARDI, Antonio E.; VALENÇA, Alexandre M.; NASCIMENTO, Isabella; LOPES, Fabiana L.; MEZZASALMA, Marco A.; FREIRE, Rafael C.; VERAS, André B.; ZIN, Walter A.; VERSIANI, Marcio. A three-year follow-up study of patients with the respiratory subtype of panic disorder after treatment with clonazepam. **Psychiatry Research**, [S. l.], v. 137, n. 1–2, p. 61–70, 2005. DOI: 10.1016/j.psychres.2005.05.011.

NASCIMENTO, Juliana O. G.; KIKUCHI, Letícia Sumiko; DE BORTOLI, Valquíria Camin; ZANGROSSI, Hélio; VIANA, Milena B. Dorsomedial hypothalamus serotonin 1A receptors mediate a panic-related response in the elevated T-maze. **Brain Research Bulletin**, [S. l.], v. 109, p. 39–45, 2014. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2014.09.011.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresbull.2014.09.011>.

OKURO, Renata T.; FREIRE, Rafael C.; ZIN, Walter A.; QUAGLIATO, Laiana A.; NARDI, Antonio E. Panic disorder respiratory subtype: Psychopathology and challenge tests – an update. **Brazilian Journal of Psychiatry**, [S. l.], v. 42, n. 4, p. 420–430, 2020. DOI: 10.1590/1516-4446-2019-0717.

PASCHOALIN-MAURIN, Tatiana; DOS ANJOS-GARCIA, Tayllon; FALCONI-SOBRINHO, Luiz Luciano; DE FREITAS, Renato Leonardo; COIMBRA, Jade Pissamiglio Cysne; LAURE, Carlos Júlio; COIMBRA, Norberto Cysne. The Rodent-versus-wild Snake Paradigm as a Model for Studying Anxiety- and Panic-like Behaviors: Face, Construct and Predictive Validities. **Neuroscience**, [S. l.], v. 369, n. November, p. 336–349, 2018. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2017.11.031.

PAUL, Evan D.; JOHNSON, Philip L.; SHEKHAR, Anantha; LOWRY, Christopher A. The Deakin/Graeff hypothesis: Focus on serotonergic inhibition of panic. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, [S. l.], v. 46, n. P3, p. 379–396, 2014. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2014.03.010. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.03.010>.

PERNA, G.; BERTANI, A.; POLITI, E.; COLOMBO, G.; BELLODI, L. Asthma and panic attacks. **Biological psychiatry**, [S. l.], v. 42, n. 7, p. 625–630, 1997. DOI: 10.1016/S0006-3223(96)00436-2.

PERNA, Giampaolo; BATTAGLIA, Marco; GARBERI, Anna; ARANCIO, Cinzia; BERTANI, Angelo; BELLODI, Laura. Carbon dioxide/oxygen challenge test in panic disorder. **Psychiatry Research**, [S. l.], v. 52, n. 2, p. 159–171, 1994. DOI: 10.1016/0165-1781(94)90085-X.

PEYRON, Christelle; TIGHE, Devin K.; VAN DEN POL, Anthony N.; DE LECEA, Luis; HELLER, H. Craig; SUTCLIFFE, J. Gregor; KILDUFF, Thomas S. Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. **Journal of**

Neuroscience, [*S. l.*], v. 18, n. 23, p. 9996–10015, 1998. DOI: 10.1523/jneurosci.18-23-09996.1998.

POBBE, Roger L. H.; ZANGROSSI, Helio; BLANCHARD, D. Caroline; BLANCHARD, Robert J. Involvement of dorsal raphe nucleus and dorsal periaqueductal gray 5-HT receptors in the modulation of mouse defensive behaviors.

European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology, [*S. l.*], v. 21, n. 4, p. 306–315, 2011. DOI: 10.1016/J.EURONEURO.2010.05.004.

POLLACK, Mark H.; KRADIN, Richard; OTTO, Michael W.; WORTHINGTON, John; GOULD, Robert; SABATINO, Susan A.; ROSENBAUM, Jerrold F. Prevalence of panic in patients referred for pulmonary function testing at a major medical center.

American Journal of Psychiatry, [*S. l.*], v. 153, n. 1, p. 110–113, 1996. DOI: 10.1176/ajp.153.1.110.

PORZELIUS, James; VEST, Marianne; NOCHOMOVITZ, Michael. Respiratory function, cognitions, and panic in chronic obstructive pulmonary patients. **Behaviour Research and Therapy**, [*S. l.*], v. 30, n. 1, p. 75–77, 1992. DOI: 10.1016/0005-7967(92)90101-L.

POTHIRAT, Chaicharn; CHAIWONG, Warawut; PHETSUK, Nittaya; PISALTHANAPUNA, Sangnual; CHETSADAPHAN, Nonglak; INCHAI, Juthamas. Major affective disorders in chronic obstructive pulmonary disease compared with other chronic respiratory diseases. **International Journal of COPD**, [*S. l.*], v. 10, n. 1, p. 1583–1590, 2015. DOI: 10.2147/COPD.S86742.

PRETER, Maurice; KLEIN, Donald F. Panic, suffocation false alarms, separation anxiety and endogenous opioids. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, [*S. l.*], v. 32, n. 3, p. 603–612, 2008. DOI:

10.1016/J.PNPBP.2007.07.029.

QI, Song; HASSABIS, Demis; SUN, Jiayin; GUO, Fangjian; DAW, Nathaniel; MOBBS, Dean. How cognitive and reactive fear circuits optimize escape decisions in humans. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 115, n. 12, p. 3186–3191, 2018. DOI: 10.1073/pnas.1712314115.

REIS, Fernando M. C. V.; MOBBS, Dean; CANTERAS, Newton S.; ADHIKARI, Avishek. Orchestration of innate and conditioned defensive actions by the periaqueductal gray. **Neuropharmacology**, [S. l.], v. 228, n. February, p. 109458, 2023. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2023.109458. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2023.109458>.

REN, Jing et al. Anatomically Defined and Functionally Distinct Dorsal Raphe Serotonin Sub-systems. **Cell**, [S. l.], v. 175, n. 2, p. 472- 487.e20, 2018. DOI: 10.1016/j.cell.2018.07.043.

RUSSELL, S. H.; SMALL, C. J.; DAKIN, C. L.; ABBOTT, C. R.; MORGAN, D. G. A.; GHATEI, M. A.; BLOOM, S. R. The central effects of orexin-A in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in vivo and in vitro in male rats. **Journal of Neuroendocrinology**, [S. l.], v. 13, n. 6, p. 561–566, 2001. DOI: 10.1046/j.1365-2826.2001.00672.x.

SAKURAI, Takeshi et al. Orexins and orexin receptors: A family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. **Cell**, [S. l.], v. 92, n. 4, p. 573–585, 1998. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)80949-6.

SAKURAI, Takeshi et al. Input of orexin/hypocretin neurons revealed by a genetically encoded tracer in mice. **Neuron**, [S. l.], v. 46, n. 2, p. 297–308, 2005. DOI: 10.1016/j.neuron.2005.03.010.

SALUM, Giovanni Abrahão; BLAYA, Carolina; MANFRO, Gisele Gus. Transtorno do

pânico. **Revista de Psiquiatria do Rio Grande do Sul**, [S. l.], v. 31, n. 2, p. 86–94, 2009. DOI: 10.1590/S0101-81082009000200002.

SANDERSON, William C.; RAPEE, Ronald M.; BARLOW, David H. Panic induction via inhalation of 5.5% CO₂ enriched air: a single subject analysis of psychological and physiological effects. **Behaviour Research and Therapy**, [S. l.], v. 26, n. 4, p. 333–335, 1988. DOI: 10.1016/0005-7967(88)90086-1.

SHUHAMA, Rosana; DEL-BEN, Cristina M.; LOUREIRO, Sônia R.; GRAEFF, Frederico G. Animal defense strategies and anxiety disorders. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, [S. l.], v. 79, n. 1, p. 97–109, 2007. DOI: 10.1590/S0001-37652007000100012.

SOARES, Victor P. M. N.; DE ANDRADE, Telma G. C. S.; CANTERAS, Newton S.; COIMBRA, Norberto C.; WOTJAK, Carsten T.; ALMADA, Rafael C. Orexin 1 and 2 Receptors in the Prelimbic Cortex Modulate Threat Valuation. **Neuroscience**, [S. l.], v. 468, p. 158–167, 2021. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2021.06.006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2021.06.006>.

SOFFIN, Ellen M.; GILL, Catherine H.; BROUGH, Stephen J.; JERMAN, Jeff C.; DAVIES, Ceri H. Pharmacological characterisation of the orexin receptor subtype mediating postsynaptic excitation in the rat dorsal raphe nucleus. **Neuropharmacology**, [S. l.], v. 46, n. 8, p. 1168–1176, 2004. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2004.02.014.

SOYA, Shingo; SAKURAI, Takeshi. Orexin as a modulator of fear-related behavior: Hypothalamic control of noradrenaline circuit. **Brain Research**, [S. l.], v. 1731, n. June 2018, p. 146037, 2020. DOI: 10.1016/j.brainres.2018.11.032. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.11.032>.

SPIACCI, A.; COIMBRA, N. C.; ZANGROSSI, H. Differential involvement of dorsal raphe subnuclei in the regulation of anxiety- and panic-related defensive behaviors.

Neuroscience, [S. l.], v. 227, p. 350–360, 2012. DOI:

10.1016/J.NEUROSCIENCE.2012.09.061.

SPIACCI, Ailton; VILELA-COSTA, Heloisa H.; SANT'ANA, Ana Beatriz;

FERNANDES, Gabriel Gripp; FRIAS, Alana Tercino; DA SILVA, Glauber S. Ferreir.;

ANTUNES-RODRIGUES, José; ZANGROSSI, Hélio. Panic-like escape response

elicited in mice by exposure to CO₂, but not hypoxia. **Progress in Neuro-**

Psychopharmacology and Biological Psychiatry, [S. l.], v. 81, n. October 2017, p.

178–186, 2018. a. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2017.10.018. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.pnpbp.2017.10.018>.

SPIACCI, Ailton; VILELA-COSTA, Heloisa H.; SANT'ANA, Ana Beatriz;

FERNANDES, Gabriel Gripp; FRIAS, Alana Tercino; DA SILVA, Glauber S. Ferreir.;

ANTUNES-RODRIGUES, José; ZANGROSSI, Hélio. Panic-like escape response

elicited in mice by exposure to CO₂, but not hypoxia. **Progress in Neuro-**

Psychopharmacology and Biological Psychiatry, England, v. 81, p. 178–186, 2018. b.

DOI: 10.1016/j.pnpbp.2017.10.018.

STEINBUSCH, H. W. M. Distribution of serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of the rat-Cell bodies and terminals. **Neuroscience**, [S. l.], v. 6, n. 4, p.

557–618, 1981. DOI: 10.1016/0306-4522(81)90146-9.

SUNANAGA, Jinko; DENG, Ben Shiang; ZHANG, Wei; KANMURA, Yuichi;

KUWAKI, Tomoyuki. CO₂ activates orexin-containing neurons in mice. **Respiratory**

Physiology and Neurobiology, [S. l.], v. 166, n. 3, p. 184–186, 2009. DOI:

10.1016/j.resp.2009.03.006.

SUZUKI, Michiyuki; BEUCKMANN, Carsten T.; SHIKATA, Kohdoh; OGURA,

Hiroo; SAWAI, Toru. Orexin-A (hypocretin-1) is possibly involved in generation of

anxiety-like behavior. **Brain Research**, [S. l.], v. 1044, n. 1, p. 116–121, 2005. DOI:

10.1016/j.brainres.2005.03.002.

SZUHANY, Kristin L.; SIMON, Naomi M. Anxiety Disorders: A Review. **Jama**, [*S. l.*], v. 328, n. 24, p. 2431–2445, 2022. DOI: 10.1001/jama.2022.22744.

TAKAHASHI, Kazumi; WANG, Qing Ping; GUAN, Jian Lian; KAYAMA, Yukihiro; SHIODA, Seiji; KOYAMA, Yoshimasa. State-dependent effects of orexins on the serotonergic dorsal raphe neurons in the rat. **Regulatory Peptides**, [*S. l.*], v. 126, n. 1- 2 SPEC. ISS., p. 43–47, 2005. DOI: 10.1016/j.regpep.2004.08.009.

TAO, R.; MA, Z.; MCKENNA, J. T.; THAKKAR, M. M.; WINSTON, S.; STRECKER, R. E.; MCCARLEY, R. W. Differential effect of orexins (hypocretins) on serotonin release in the dorsal and median raphe nuclei of freely behaving rats. **Neuroscience**, [*S. l.*], v. 141, n. 3, p. 1101–1105, 2006. DOI:

10.1016/j.neuroscience.2006.05.027.

TOVOTE, Philip; ESPOSITO, Maria Soledad; BOTTA, Paolo; CHAUDUN, Fabrice; JONATHAN, P. Midbrain circuits for defensive behaviour. **Nature**, [*S. l.*], v. 534, n. 7606, p. 206–212, 2016. DOI: 10.1038/nature17996. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nature17996>.

TRIVEDI, Prashant; YU, Hong; MACNEIL, Douglas J.; VAN DER PLOEG, L. H. T.; GUAN, Xiao Ming. Distribution of orexin receptor mRNA in the rat brain. **FEBS Letters**, [*S. l.*], v. 438, n. 1–2, p. 71–75, 1998. DOI: 10.1016/S0014-5793(98)01266-6.

TSUNEOKA, Yousuke; FUNATO, Hiromasa. Whole brain mapping of orexin receptor mRNA expression visualized by branched in situ hybridization chain reaction . **Eneuro**, [*S. l.*], v. 1, n. February, p. ENEURO.0474-23.2024, 2024. DOI: 10.1523/eneuro.0474-23.2024.

VIANA, Thércia G.; BASTOS, Juliana R.; COSTA, Rayssa B.; HOTT, Sara C.; MANSUR, Frederico S.; COIMBRA, Cândido C.; RESSTEL, Leonardo B.; AGUIAR,

Daniele C.; MOREIRA, Fabrício A. Hypothalamic endocannabinoid signalling modulates aversive responses related to panic attacks. **Neuropharmacology**, [S. l.], v. 148, n. January, p. 284–290, 2019. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2019.01.022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.01.022>.

VIANNA, Daniel Machado Luiz; BORELLI, Karina Genaro; FERREIRA-NETTO, Cristina; MACEDO, Carlos Eduardo; BRANDÃO, Marcus Lira. Fos-like immunoreactive neurons following electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray at freezing and escape thresholds. **Brain Research Bulletin**, [S. l.], v. 62, n. 3, p. 179–189, 2003. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2003.09.010.

VILELA-COSTA, Heloisa Helena; SPIACCI, Ailton; BISSOLLI, Isabella Galante; ZANGROSSI, Hélio. A Shift in the Activation of Serotonergic and Non-serotonergic Neurons in the Dorsal Raphe Lateral Wings Subnucleus Underlies the Panicolytic-Like Effect of Fluoxetine in Rats. **Molecular Neurobiology**, [S. l.], v. 56, n. 9, p. 6487–6500, 2019. DOI: 10.1007/s12035-019-1536-z.

VÖGELE, Claus; VON LEUPOLDT, Andreas. Mental disorders in chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **Respiratory medicine**, [S. l.], v. 102, n. 5, p. 764–773, 2008. DOI: 10.1016/J.RMED.2007.12.006.

WANG, Chunmei; WANG, Qinqin; JI, Bingyuan; PAN, Yanyou; XU, Chao; CHENG, Baohua; BAI, Bo; CHEN, Jing. The Orexin/Receptor System: Molecular Mechanism and Therapeutic Potential for Neurological Diseases. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, [S. l.], v. 11, n. June, p. 1–16, 2018. DOI: 10.3389/fnmol.2018.00220.

WANG, Qing Ping; KOYAMA, Yoshimasa; GUAN, Jian Lian; TAKAHASHI, Kazumi; KAYAMA, Yukihiro; SHIODA, Seiji. The orexinergic synaptic innervation of serotonin- and orexin 1-receptor-containing neurons in the dorsal raphe nucleus. **Regulatory Peptides**, [S. l.], v. 126, n. 1- 2 SPEC. ISS., p. 35–42, 2005. DOI:

10.1016/j.regpep.2004.08.030.

WILLIAMS, Rhîannan H.; JENSEN, Lise T.; VERKHRATSKY, Alex; FUGGER, Lars; BURDAKOV, Denis. Control of hypothalamic orexin neurons by acid and CO₂. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 104, n. 25, p. 10685–10690, 2007. DOI: 10.1073/pnas.0702676104.

XIAO, Xing et al. Orexin receptors 1 and 2 in serotonergic neurons differentially regulate peripheral glucose metabolism in obesity. **Nature Communications**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 1–20, 2021. DOI: 10.1038/s41467-021-25380-2. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-021-25380-2>.

XU, Tian Rui; YANG, Yang; WARD, Richard; GAO, Linghuan; LIU, Ying. Orexin receptors: Multi-functional therapeutic targets for sleeping disorders, eating disorders, drug addiction, cancers and other physiological disorders. **Cellular Signalling**, [S. l.], v. 25, n. 12, p. 2413–2423, 2013. DOI: 10.1016/j.cellsig.2013.07.025. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.07.025>.

YAMAGUCHI, Keiji; FUTATSUKI, Takahiro; USHIKAI, Jumpei; KUROKI, Chiharu; MINAMI, Toshiaki; KAKIHANA, Yasuyuki; KUWAKI, Tomoyuki. Intermittent but not sustained hypoxia activates orexin-containing neurons in mice. **Respiratory Physiology and Neurobiology**, [S. l.], v. 206, p. 11–14, 2015. DOI: 10.1016/j.resp.2014.11.003. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.resp.2014.11.003>.

YIZHAR, Ofer; FENNO, Lief E.; DAVIDSON, Thomas J.; MOGRI, Murtaza; DEISSEROTH, Karl. Optogenetics in Neural Systems. **Neuron**, [S. l.], v. 71, n. 1, p. 9–34, 2011. DOI: 10.1016/j.neuron.2011.06.004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2011.06.004>.

ZANGROSSI, Hélio; GRAEFF, Frederico G. Serotonin in anxiety and panic:

Contributions of the elevated T-maze. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, [*S. l.*], v. 46, n. P3, p. 397–406, 2014. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2014.03.007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.03.007>.

ZANGROSSI, Hélio; VIANA, Milena B.; ZANOVELI, Janaína; BUENO, Cíntia; NOGUEIRA, Regina L.; GRAEFF, Frederico G. Serotonergic regulation of inhibitory avoidance and one-way escape in the rat elevated T-maze. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, [*S. l.*], v. 25, n. 7–8, p. 637–645, 2001. DOI: 10.1016/S0149-7634(01)00047-1.

ZANOVELI, Janaina M.; POBBE, Roger L. H.; DE BORTOLI, Valquiria C.; CARVALHO, Milene C.; BRANDO, Marcus L.; ZANGROSSI, Helio. Facilitation of 5-HT1A-mediated neurotransmission in dorsal periaqueductal grey matter accounts for the panicolytic-like effect of chronic fluoxetine. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, [*S. l.*], v. 13, n. 8, p. 1079–1088, 2010. DOI: 10.1017/S146114570999099X.