

Evolução da neurociência comportamental nos últimos 50 anos. Foco no sistema de defesa e na neurotransmissão

Evolution of behavioral neuroscience during the last 50 years. Focus on the defense system and neurotransmission.

Frederico Guilherme Graeff¹

RESUMO

A evolução da Neurociência Comportamental nos últimos 50 anos é apresentada em função das pesquisas desenvolvidas pelo autor e colaboradores na área de Neuropsicofarmacologia. A principal linha de investigação relatada aborda o papel da serotonina na regulação das repostas de defesa, que estão relacionadas com as emoções ansiedade, medo e pânico, bem como com as respectivas patologias: transtorno de ansiedade generalizada, fobias e pânico. As estruturas cerebrais críticas para a ansiedade – amígdala, hipocampo e insula – estão localizadas no cérebro anterior, enquanto que as relacionadas com o medo e o pânico – hipotálamo e matéria cinzenta periaquedutal (MCP) – situam-se no diencefalo e no tronco cerebral. Dá-se ênfase ao papel da MCP nas reações a ameaças proximais – imobilidade, fuga e luta – que estão relacionadas com ataques de pânico. São relatados resultados obtidos em modelos animais de pânico e em experimentação com seres humanos, incluindo testes de ansiedade experimental e neuroimagem morfométrica e funcional, cujas implicações para o conhecimento da fisiopatologia do transtorno de pânico e seu tratamento farmacológico são discutidas.

Palavras-chave: Reações de Defesa. Serotonina. Modelos Animais; Ansiedade/Pânico. Ansiedade; Experimentação Humana. Imagem por Ressonância Magnética. Transtorno de Pânico.

ABSTRACT

The evolution of Behavioral Neuroscience along the last 50 years is presented on the basis of the research work carried out by the author and his coworkers. The main line of investigation reported deals with the role of serotonin in the regulation of defense reactions that are related to the emotions anxiety, fear and panic, as well as to the respective pathologies: generalized anxiety disorder, phobias and panic disorder. The key brain structures for anxiety – amygdala, hippocampus and insula – are localized in the forebrain, whereas those related to fear and panic –

1. Professor Titular aposentado do Departamento de Psicologia da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Afiliação: Instituto de Neurociências e Comportamento (INeC)

CORRESPONDÊNCIA:
Instituto de Neurociências e Comportamento,
Av. do Café, 2450, Monte Alegre,
Ribeirão Preto, São Paulo 14050-220, Brasil.

Recebido em 22/06/2018
Aprovado em 28/07/2018

hypothalamus and periaqueductal gray matter (PAG) – are placed in the diencephalon and brain stem. The role of the defense reactions to proximal danger – immobility, flight and fight – that are related to panic attacks are highlighted. The results obtained in animal models of anxiety and panic, as well as in humans, including experimental anxiety tests and morphometric and functional neuroimaging are reported, and their implications for the knowledge of the pathophysiology of panic disorder and its pharmacological treatment are discussed.

Keywords: Defense Reactions. Serotonin. Animal Models; Anxiety /Panic. Anxiety; Human Experimentation. Magnetic Resonance Imaging. Panic Disorder.

INTRODUÇÃO

Ao atender ao convite dos editores da Revista Medicina para escrever sobre – “Reflexões sobre a evolução do conhecimento na sua área específica ao longo de sua vida, destacando os avanços ocorridos assim como apontando os desafios futuros” – considere duas possibilidades: a primeira seria falar em termos impessoais e genéricos; a segunda, descrever a experiência vivida no fazer científico durante mais de 50 anos. Optei pela última, que considero mais autêntica para transmitir uma mensagem aos jovens que se iniciam no campo da pesquisa.

O início

Iniciei a carreira científica nos anos 1960, trabalhando no Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, então dirigido pelo eminente cientista Maurício O. Rocha e Silva, que foi orientador de minha tese de doutorado, juntamente com Alexandre P. Corrado. Já manifestava, então, interesse pelo comportamento e pela Psiquiatria. Assim, foi natural encaminhar-me para a nascente disciplina da Psicofarmacologia. Na época, apenas Elisaldo A. Carlini fazia pesquisa na área, fundando um laboratório na Faculdade de Medicina da Santa Casa de São Paulo. No departamento onde estava, Alexandre Corrado era o único docente que pesquisava em Neurofarmacologia, tendo estagiado com o eletrofisiologista Italiano V. G. Longo. Por isso, iniciei o doutorado sob sua orientação, estudando os efeitos centrais da bradicinina (BK), que como se sabe havia sido descoberta por Rocha e Silva, Wilson Teixeira Beraldo e Gastão Rosenfeld.¹ Antes disso, porém, havia realizado

iniciação científica com João Garcia Leme, que trabalhava com medidas da dor e compostos que interferem com a serotonina (5-HT). Assim, minha primeira publicação foi sobre os efeitos deste tipo de agentes no comportamento exploratório de camundongos.² Como veremos, a 5-HT veio a se tornar meu principal objeto de investigação.

No que se refere à BK, o trabalho mais significativo desta época foi relativo aos efeitos comportamentais e fisiológicos da injeção do peptídeo nos ventrículos laterais do coelho, que foi realizado em colaboração com Irene R. Pelá, que viria a ser minha primeira orientada na pós-graduação.³ Ocorreu também uma descoberta, cujo impacto só recentemente percebi. Realizando a perfusão dos ventrículos cerebrais de coelhos com solução contendo BK, notei que a atividade da mesma desaparecia. Relatando o achado ao colega bioquímico Antônio C. M. Camargo, ele sugeriu que isto poderia ser devido à degradação do peptídeo por enzimas existentes no tecido cerebral. Para testar a hipótese, realizou uma série de experimentos de caracterização com homogeneizados do tecido cerebral, do que resultou a primeira publicação do campo das oligopeptidases.⁴ Esta classe de enzimas degrada apenas peptídeos pequenos, ao contrário das proteases, como a tripsina, que também catabolizam proteínas. Ao longo dos anos, as funções das oligopeptidases foram sendo desvendadas, revelando importantes papéis como, por exemplo, nas doenças neurodegenerativas de Parkinson e Alzheimer.⁵ Em grande parte isto se deve à contribuição de Antônio Camargo, que dedicou frutuosa carreira ao estudo dessas enzimas. Em 1999, seu grupo de pesquisa mostrou que o gene NDL1/EOPA, que expressa a primeira oligopeptidase isolada e caracterizada não somente está

envolvido com a enzima que degrada peptídeos bioativos, mas também é fundamental para a formação do córtex cerebral; a redução parcial dessa proteína causa a lissencefalia e sua deleção total é fatal (ver: <https://en.wikipedia.org/wiki/Oligopeptidase>).

Nessa descoberta, foi a primeira vez que me deparei com o que ficou conhecido como *serendipity*. Podemos dizer que é a combinação de um feliz acaso com a intuição do pesquisador, que suspeita haver algo importante no fenômeno observado por acaso. A palavra deriva do antigo conto persa: “Os Três Príncipes de Serendip”, os quais escapavam de terríveis tribulações por acontecimentos fortuitos.

PÓS-DOCTORADO

Devido à inexistência de grupos de pesquisa avançados em Psicofarmacologia no Brasil, tornou-se imperativo a realização de estágio de pós-doutorado no exterior. No meu caso, ele se deu no Departamento de Farmacologia da Universidade de Harvard, onde o farmacologista britânico Peter B. Dews havia instalado um laboratório de Farmacologia Comportamental. A recomendação partiu de um psicólogo norte-americano, Fred S. Keller, que atuava no Brasil, difundindo a escola de psicologia a que pertencia, o behaviorismo, e que era amigo de Rocha e Silva. Em Harvard, figurava o fundador do behaviorismo, Burrhus F. Skinner, por cuja influência a Farmacologia Comportamental utilizava métodos de condicionamento operante. Mais do que isto, como o Behaviorismo Radical não considerava dados da subjetividade como relevantes para a ciência, nem achava necessário conhecer o que se passava no cérebro, tratado como *black-box*, tudo o que restava era estabelecer relações funcionais entre dose da droga administrada e parâmetros quantitativos do comportamento, principalmente a frequência de respostas emitidas para obter um reforço ou recompensa, por exemplo, uma porção de alimento.

Dada minha formação médica, pareceu-me um tanto limitada esta abordagem, porém sendo impossível a transferência para outro local, tentei tirar o maior proveito da oportunidade. Apesar dos esforços, não consegui nenhum resultado promissor. Para um bolsista do *National Institute*

of Health (NIH), trabalhando em Harvard, era um completo fracasso. Foi então que um colaborador, Ronald I. Schoenfeld, doutorado em Chicago, entrou no escritório com dois frascos na mão, um contendo carbonato de lítio e outro metisergida. Os motivos eram alegações de que ambas as substâncias eram úteis no tratamento de transtornos afetivos, o que futuramente se verificou verdadeiro para o carbonato de lítio, e que não havia nenhum estudo pré-clínico publicado sobre os efeitos delas sobre o comportamento. Assim, resolvemos testá-las em um grupo de pombo, que haviam sido utilizados por um estagiário alemão, Wolfgang Wuttke, que pertencia a um grande laboratório farmacêutico, para avaliar o efeito de compostos ansiolíticos da classe dos benzodiazepínicos, então recentemente lançados no mercado. Como o efeito mais característico dos ansiolíticos era o de desinibir respostas suprimidas por punição no chamado teste de conflito, quatro dos animais eram treinados a bicar um disco iluminado, situado na parede da caixa experimental, para obter alimento a cada 5 min, sendo que a cada 10 bicadas, recebiam um choque elétrico logo após a última resposta. Como resultado, a frequência de respostas era muito reduzida, sendo que os ansiolíticos a restauravam, porque sob sua influência a punição perdia a capacidade de reprimir as bicadas. Assim, o efeito anticonflito era o melhor preditor do efeito clínico ansiolítico de uma droga testada em animais de laboratório.

Após verificarmos que o tratamento com carbonato de lítio produzia efeitos tóxicos, passamos a medir o efeito de doses crescentes de metisergida. Para nossa surpresa, verificamos que a mesma mostrou efeito anticonflito de intensidade comparável ao mais potente benzodiazepínico. Ao ver este resultado, tive a forte sensação de que havia algo importante a ser estudado – novamente a *serendipity*. O próximo passo era entender porque a droga causava este efeito. Pouco se sabia sobre o mecanismo de ação da metisergida, porém encontramos informação de que ela bloqueava receptores de 5-HT. Conheciam-se, então, apenas dois tipos de receptor onde atua a 5-HT, denominados M, bloqueado pela morfina e D, bloqueado pela dibenzilina, que haviam sido identificados pela farmacologista brasileira, Zuleica Picarelli em 1957. Para testar a hipóte-

se de que o efeito anticonflito da metisergida era mediado por receptor da 5-HT, buscamos outro antagonista conhecido, o ácido bromo-lisérgico e um agonista, a alfa-metil-triptamina. Para nossa felicidade, a primeira droga teve efeito anticonflito e a segunda acentuou a supressão de respostas determinada pela punição. Foi o suficiente para propormos que mecanismos triptaminérgicos cerebrais poderiam estar envolvidos na supressão de respostas punidas. O estudo foi publicado na mais prestigiosa revista de Farmacologia de então, o *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*.⁶ Note-se que neste artigo não chegamos a falar de ansiedade e de 5-HT como mediadora da punição. No primeiro por cautela; no segundo, porque não se sabia com certeza se a 5-HT era um neurotransmissor no sistema nervoso central (SNC); poderia ser a triptamina. Isto dá uma ideia dos limites do conhecimento da época – apenas a acetilcolina e a noradrenalina (NA) eram neurotransmissores centrais estabelecidos. Atualmente, mede-se o impacto de uma publicação por meio do número de citações que ela recebe ao longo dos anos, registrada em banco de dados. Utilizando o Google Acadêmico, verifica-se que o índice de impacto é no momento, abril de 2018, igual a 192 (IGA = 192).

A explicitação da participação da 5-HT na ansiedade foi feita dois anos após por Wise, Berger e Stein, em artigo publicado na prestigiosa revista *Science*.⁷ Como base de dados para justificar a proposta de que a 5-HT aumentava a ansiedade, e que a ação ansiolítica dos benzodiazepínicos era devida à diminuição de sua ação ansiogênica no SNC, esses pesquisadores utilizaram nossos resultados farmacológicos, além de outros anteriormente publicados, mostrando que a inibição da síntese de 5-HT tinha efeito anticonflito no rato. A eles adicionaram resultados bioquímicos evidenciando que um benzodiazepínico reduzia a taxa de renovação (*turnover*) da 5-HT, tanto no prosencéfalo como na matéria cinzenta periaquedutal do mesencéfalo, que ficou conhecida pela abreviatura inglesa PAG. Trabalhos realizados na Suécia, utilizando técnicas de histofluorescência haviam permitido mapear vias monoaminérgicas no SNC. Assim, os mencionados autores sugeriram que as projeções dos neurônios serotoninérgicos presentes no núcleo dorsal

da rafe (NDR) mesencefálica, que inervam tanto o prosencéfalo como a PAG, mediariam o efeito supressor da punição sobre respostas mantidas por reforço positivo (recompensa), entendido como índice de ansiedade. A recompensa seria mediada por vias noradrenérgicas.

Das afirmações desta hipótese resta apenas como válida a de que a 5-HT aumenta a ansiedade atuando no cérebro anterior. Como veremos a seguir, sua ação na PAG parece ser oposta. Quanto à recompensa, admite-se que a dopamina (DA) seja a mediadora do sistema de recompensa – na ocasião sabia-se que era precursora da síntese de NA, mas sua função neurotransmissora ainda não tinha sido evidenciada. Contudo, o valor heurístico – o de orientar e estimular pesquisas ulteriores – do modelo teórico de Wise et al. (1972)⁷ é significativo, pois foi com base nele que prosseguimos nossos estudos sobre o papel da 5-HT na regulação dos sistemas cerebrais que organizam respostas de defesa contra diferentes tipos de ameaça. Talvez esta seja a principal função das hipóteses, pois seu valor explicativo, que permite compreender o funcionamento da natureza, é temporário, dado que não há verdades permanentes no conhecimento científico.

O RETORNO

Naquela época em que a pesquisa científica no Brasil ainda engatinhava, retornar de um país desenvolvido era um desafio. As facilidades lá eram tão maiores, e não somente em termos de recursos materiais, mas sobretudo humanos, que gerava sensação de impotência. A tendência natural era a de continuar fazendo o que se havia aprendido no exterior, nem sempre com bons resultados, pois significava competir em grande desvantagem. Ainda assim, durante os primeiros anos do retorno montei um laboratório baseado no comportamento operante, com recursos obtidos graças ao apoio da FAPESP.

Durante o período de instalação, que demorou vários meses, trabalhei no laboratório de neurofisiologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, USP, então dirigido por Cleber G. Gentil, que generosamente me acolheu. Nele pesquisavam-se os mecanismos da sede utilizando

a injeção de pequenas quantidades de substâncias ativas através de cânulas implantadas por método estereotático, uma linha de investigação liderada pelo eminente neurofisiologista argentino Miguel R. Covian, pioneiro no estudo da fisiologia do comportamento no Brasil e chefe do Departamento de Fisiologia da FMRP, sob cuja orientação ele e sua colega Vera L. Peres haviam realizado o doutorado. Dentre os estudos que realizamos, destaco a demonstração de que a microinjeção do peptídeo angiotensina II na área septal fazia com que ratos saciados votassem a pressionar uma barra para beber, comportamento este que haviam aprendido a fazer quando tinham sede.⁸ Assim, mostramos que a droga induzia um estado motivacional – a sede – e não apenas eliciava um comportamento consumatório, o de beber. É um exemplo de como podemos utilizar um comportamento manifesto como índice de um estado interior do organismo. Uma vez completada a instalação do meu laboratório, iniciei estudos sobre drogas serotoninérgicas e também sobre o psicoestimulante anfetamina,⁹ este último tema da minha tese de livre-docência.

Cabe aqui um parêntese: Um ponto de viragem na qualidade e quantidade da pesquisa foi a implantação da pós-graduação formal no Departamento de Farmacologia da FMRP, iniciada em 1970. Em função disso, passei a orientar estudantes de mestrado e doutorado, cuja contribuição para a produção científica foi inestimável. Tais esforços têm sido apoiados e avaliados criteriosamente pelas agências financiadoras FAPESP, CAPES e CNPq, cuja importância na formação de recursos humanos para pesquisa em larga escala nunca é demais salientar. Dessa forma, os estudos mencionados a seguir, realizados no Departamento de Farmacologia, foram realizados com a colaboração de vários pós-graduandos, contando sempre com o valioso apoio técnico de José Carlos de Aguiar, que em alguns deles tornou-se, por sua competência, um verdadeiro colaborador.

Voltando ao conteúdo científico, assinalo que o fato de a BK ter um sistema de inativação no sistema nervoso central (SNC), além de causar alterações fisiológicas e comportamentais de origem central, despertou a ideia de que ela poderia ser um neurotransmissor central. Era en-

tão uma ideia inusitada, pois esta função nunca havia sido atribuída a um peptídeo. Com as limitadas evidências disponíveis, uma publicação desta proposta em periódico internacional era inviável. Contudo, tinha forte intuição de que era uma boa ideia, que merecia ser registrada, nem que fosse apenas para estimular a investigação local dos possíveis papéis centrais da BK. Assim, escrevi um artigo que foi publicado na revista *Ciência e Cultura*, propondo esta função para a BK.¹⁰ Continuando a linha de pesquisa sobre seus efeitos centrais, estudamos o efeito da injeção intraventricular da BK e de outros peptídeos no comportamento de coelhos treinados a levantar uma alavanca com os dentes incisores para obter água adocicada, realizado pela pós-graduanda Emília A. Arisawa.¹¹ Contudo, esta linha de pesquisa que não se aprofundava em mecanismos, nem considerava a fisiologia não me satisfazia inteiramente. Como consequência, orientei um estudante de mestrado, Fernando Morgan de Aguiar Corrêa, que mais tarde iria se tornar docente do Departamento de Farmacologia da FMRP, a realizar estudos sobre efeitos centrais da BK sobre a pressão arterial do rato. Com isto foi introduzida a técnica de injeção intracerebral no laboratório, pela qual diminutos volumes de solução contendo a droga são injetados em locais definidos do SNC, através de cânulas implantadas por meio de aparelho estereotático. Desse modo, identificou-se o local da ação hipertensora da BK na área septal lateral.¹² Em função do seu interesse pela função da BK no SNC, Fernando Correa foi estagiar no laboratório do renomado neurocientista Salomon H. Snyder, em Baltimore, EUA, onde conseguiu evidenciar a presença de imunoreatividade do tipo-BK no SNC.¹³ Foi a primeira evidência da existência do peptídeo no SNC, com a implicação de que pode exercer funções fisiológicas e comportamentais. A importância deste achado é atestada pelo impacto da publicação: IGA = 191. Esta descoberta substanciava a hipótese de que a BK poderia ser um neurotransmissor central, ideia que já não era insólita, pois a substância P havia sido proposta como neurotransmissora, inaugurando a extensa lista dos neuropeptídeos. Voltarei a este tema no final desta narrativa, pois recentemente os caminhos da pesquisa levaram-me de volta aos neuropeptídeos.

Nos meados dos anos 1970, assumi a orientação de dois estudantes – Nylson G. da Silveira Filho e Luiz Carlos Schenberg – que haviam realizado iniciação científica no laboratório de Miguel Covian, e lá haviam aprendido a técnica da estimulação elétrica intracerebral, que permitia ativar áreas delimitadas do SNC, graças à localização precisa da ponta do eletrodo por meio do estereotáxico. Esta técnica passou a ser utilizada em numerosos estudos que descrevo a seguir.

Buscando na literatura conhecimento sobre as bases neurais da ansiedade, deparei-me com a teoria do psicólogo britânico Jeffrey A. Gray, propondo que a ansiedade seria gerada pela ativação do sistema septo-hipocampal por sinais de ameaça ou da perda de recompensa esperada (frustração), gerando inibição comportamental. Projeções noradrenérgicas e serotoninérgicas ao septo-hipocampo aumentariam a atividade do sistema de inibição comportamental e, conseqüentemente, a ansiedade. Já pensando na possibilidade de estagiar em seu laboratório, concebi um experimento baseado nesta proposta que foi executado em colaboração com Nylson Silveira. Tendo em vista que o sistema septo-hipocampal era inervado por fibras serotoninérgicas originárias do núcleo mediano da rafe (NMR) mesencefálica, decidimos estudar os efeitos da estimulação elétrica do NMR sobre o comportamento operante de ratos treinados a pressionar uma barra para obter água a intervalos variáveis de tempo. Este esquema de reforço gera um padrão regular de respostas, que se sabia ser suprimido por sinais de perigo, fenômeno este denominado supressão condicionada. Verificamos, assim, que a estimulação elétrica do NMR causava a mesma supressão, acompanhada de sinais neurovegetativos característicos de emoção, como defecação e micção. Como o NMR contém outros tipos de neurônios, além dos que contém 5-HT, inibimos a síntese de 5-HT com injeção intraperitoneal (i. p.) de para-clorofenilalanina (PCPA), reduzindo assim os níveis centrais da monoamina. Como a supressão de respostas determinada pela estimulação elétrica do NMR foi muito reduzida pela PCPA, concluímos que o efeito supressor era mediado pela 5-HT.¹⁴ Este resultado era compatível tanto com a hipótese de Jeffrey Gray, bem como

com o modelo teórico de Wise et al. (1972)⁷, na parte em que postula uma ação ansiogênica da 5-HT, exercida em estruturas do cérebro anterior.

Como o mesmo modelo admite que a 5-HT também aumenta a ansiedade na PAG, resolvemos, com Luiz Schenberg, testar esta hipótese experimentalmente. Já se sabia que a estimulação elétrica da parte dorsal da PAG (PAGd) eliciava comportamento de fuga e ou luta defensiva em diferentes espécies de mamíferos estudados no laboratório. Admitindo que a fuga desencadeada pela estimulação elétrica de PAGd do rato fosse modelo de ansiedade, esperávamos que uma droga que bloqueia receptores da 5-HT – a ciproptadina – deveria atenuar os efeitos aversivos da estimulação elétrica, elevando o valor da intensidade mínima da corrente elétrica capaz de desencadear a fuga. Este valor é denominado limiar de fuga ou limiar aversivo. Qual não foi nossa surpresa, portanto, ao verificarmos que o inverso ocorria, isto é, a ciproptadina reduzia o limiar de fuga de modo proporcional à dose injetada.¹⁵ Foi a primeira evidência que nos levou futuramente a questionar o modelo de Wise e colaboradores, no que se refere à PAG.

Um evento significativo durante este período foi a fundação do Laboratório de Comportamento e Drogas na Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP), USP. Isto se deu em colaboração com um docente do Departamento de Psicologia, Luiz M. de Oliveira, em espaço outorgado pelo então diretor, o estaticista Geraldo Duarte. Este laboratório foi o embrião do futuro programa de pós-graduação em Psicobiologia, sobre o qual voltaremos a falar posteriormente. Um trabalho relevante realizado neste laboratório foi o primeiro estudo comportamental com a ketamina, executado pelo mestrando Marcus Lira Brandão, que revelou um efeito anti-conflito desta substância.¹⁶ A ketamina é um anestésico geral denominado dissociativo, pois o paciente continua acordado, embora com a consciência alterada, não sentindo dor, nem se recordando depois do trauma cirúrgico. Recentemente, sua importância cresceu, pois a ketamina está sendo utilizada para o tratamento da depressão refratária ao tratamento convencional com agentes antidepressivos.

OXFORD

No segundo semestre do ano de 1978 iniciei um estágio como Professor Visitante, no laboratório de Jeffrey Gray, Professor Associado do Departamento de Psicologia Experimental da Universidade de Oxford, Inglaterra. Uma bolsa da FAPESP deu apoio financeiro. Como projeto de investigação propus a comparação entre o efeito da estimulação elétrica do NMR com o de um estímulo condicionado que havia sido pareado com um choque elétrico aplicado nas patas do rato (CS⁻). As medidas usadas foram o tempo de imobilidade (congelamento) e a atividade elétrica (EEG) do córtex cerebral e do hipocampo dorsal. Além disso, seriam avaliados os efeitos do agente anticolinérgico escopolamina, do bloqueador de receptores 5-HT metisergida, do inibidor da síntese de 5-HT PCPA, bem como do benzodiazepínico clordiazepóxido e do barbitúrico amobarbital. Os experimentos foram realizados com a colaboração da psicóloga venezuelana Stela Quintero. Em conformidade com as previsões derivadas da hipótese de que ativação do sistema serotoninérgico do NMR mimetizaria o estado de medo condicionado, verificamos que tanto o estímulo elétrico como o CS⁻ evocavam congelamento, acompanhado de dessincronização do EEG cortical e ondas teta de baixa frequência no hipocampo, o que era interpretado como índice de ansiedade. Em ambos os casos, o ritmo teta era bloqueado pela escopolamina e alterado igualmente pelos agentes ansiolíticos clordiazepóxido e amobarbital. Contudo, nem a metisergida, nem o PCPA bloquearam o ritmo teta.¹⁷ Tais resultados indicam que o efeito da estimulação elétrica do NMR sobre o EEG é mediado pela acetilcolina, ao contrário do efeito comportamental, o qual seria dependente da 5-HT, como demonstrado anteriormente por Graeff e Silveira Filho (1978).¹⁴

Havia um aspecto da teoria do sistema de inibição comportamental que me intrigava – a estimulação elétrica dessas estruturas funcionava como reforço positivo, mantendo o comportamento de auto-estimulação. Porém, sabemos que a ansiedade é uma emoção desagradável. Assim, seu aspecto aversivo deveria ser gerado em outras estruturas do SNC. Com base no estudo sobre a estimulação elétrica da PAG, suspeitei ser

esta última forte candidata a desempenhar este papel. Como consequência, solicitei a Jeffrey Gray permissão para desenvolver um segundo projeto, sendo meu pedido generosamente atendido. Assim, em colaboração com o doutorando John N. Rawlins, verificamos o efeito da lesão do septo lateral, supostamente inativando o sistema de inibição comportamental, com o efeito da injeção, i. p., do ansiolítico clordiazepóxido sobre o comportamento do rato de pressionar uma barra para obter alimento. Esta resposta também era punida pela ministração, logo após sua emissão, por um estímulo aversivo. Em um dos grupos experimentais este último era representado por um choque elétrico nas patas, enquanto que no outro, por um estímulo elétrico aplicado na PAGd. Verificamos, assim, que a lesão septal tinha efeito anticonflito apenas no grupo punido com choques nas patas, enquanto o clordiazepóxido tinha o mesmo efeito em ambos os grupos. Além disso, o efeito anticonflito do clordiazepóxido nos animais punidos com choque nas patas era maior do que o da lesão septal. Concluimos que a supressão da resposta por punição – índice de ansiedade – era devida a dois componentes, quais sejam: a inibição comportamental gerada no sistema de inibição comportamental aventado por Gray e a aversão gerada na PAGd.¹⁸ Isto nos levou a propor, mais tarde, que o sistema de inibição comportamental seria o substrato neural do componente cognitivo da ansiedade, ao passo que o componente emocional seria integrado pelo que denominamos sistema cerebral aversivo, o qual compreendia, além da PAGd, a amígdala e o hipotálamo medial.

Cabem aqui algumas considerações sobre os ganhos obtidos neste estágio. Em primeiro lugar, a oportunidade de conviver com Jeffrey Gray, que era uma figura rara e inspiradora. Tendo formação behaviorista, havia abandonado a postura da “caixa preta” e se dedicado a entender como o cérebro organiza o comportamento. Filiou-se, assim, à Neuropsicologia, disciplina inaugurada pelo neurologista russo Alexander Luria, o qual valeu-se, sobretudo, da avaliação de soldados da Primeira Guerra Mundial, feridos por projéteis que lesavam, com precisão, estruturas cerebrais definidas. Pode, assim, estabelecer sólidas correlações entre lesão e funções psicológicas altera-

das. Outra característica rara de Jeffrey Gray era a de ele ser capaz de elaborar teorias abrangentes, utilizando dados de várias disciplinas. Ao contrário da maioria dos pesquisadores, conseguia “ver a floresta e não somente cada árvore”. Na ocasião, já estava escrevendo um livro sobre neuropsicologia da ansiedade, que se tornaria um clássico na área, onde desenvolveu em profundidade a teoria do sistema de inibição comportamental.¹⁹ Além disso, um aprendizado importante foi alcançado ao participar das reuniões semanais onde se discutiam todos os trabalhos em andamento no laboratório. Havia grande preocupação em planejar muito bem os experimentos, destinados a testar previsões claramente definidas de hipóteses de trabalho solidamente fundamentadas. Dessas discussões surgiam críticas e sugestões valiosas e consolidava-se o espírito de equipe.

Outro evento significativo, em termo de futuras consequências, foi o de conhecer o psiquiatra John Francis William Deakin, ou Bill Deakin, como é normalmente chamado. Nosso primeiro encontro ocorreu em reunião científica realizada em Londres, onde apresentei o estudo sobre efeitos comportamentais da estimulação elétrica do NMR realizado no Brasil, cujos resultados chamaram sua atenção. Isto porque, além da formação clínica ele havia trabalhado em pesquisa básica com animais de laboratório. Este tipo de formação era raro, mesmo na Inglaterra. Discuti com ele a possibilidade de realizar estudos em seres humanos para testar as hipóteses derivadas de estudos em animais de laboratório, o que deu início a uma frutuosa colaboração, como veremos posteriormente.

O SEGUNDO RETORNO

Uma vez de volta ao Brasil, continuei a investigar a punição pela estimulação elétrica da PAGd com o psicólogo Sílvio Morato de Carvalho, que em seu projeto de doutorado estudou o efeito de dois antagonistas 5-HT e dois ansiolíticos sobre o responder operante suprimido por punição central, no rato. Os resultados mostraram que os ansiolíticos tinham efeito anticonflito, porém o mesmo não acontecia com os antagonistas 5-HT, indicando que a supressão de respostas por pu-

nição na PAGd não é mediada pela 5-HT, em contraste com o que se verifica com a punição por choques nas patas.²⁰ Este resultado dava apoio à ideia anterior da existência de dois sistemas de supressão de respostas punidas.

Simultaneamente ao desenvolvimento da pesquisa empírica, procurei expor minha visão sobre o modo de ação dos ansiolíticos em um artigo de revisão temática, que foi publicado no *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. Nele propus que os ansiolíticos reduzem a ansiedade por diminuírem o funcionamento de dois sistemas neuronais que integram respostas de defesa: 1) o sistema septo-hipocampal somado às aferências monoaminérgicas provenientes do mesencéfalo, que gera inibição comportamental em resposta a ameaças de punição ou frustração e 2) o sistema cerebral aversivo compreendendo a PAGd, a matéria cinzenta periventricular do hipotálamo e a amígdala, que integra reações de defesa do tipo luta ou fuga, além de gerar motivação aversiva ou desconforto.²¹ O primeiro sistema era o que havia sido proposto por Jeffrey Gray, enquanto que o segundo havia sido demarcado por Fernandez de Molina e Robert W. Hunsperger (1962)²², com base nas repostas evocadas pela estimulação elétrica intracerebral, aplicada sistematicamente em diferentes regiões do SNC, realizando um mapeamento funcional.

Vale lembrar que essa abordagem tem origem no achado seminal de Walter R. Hess, mostrando que a estimulação do hipotálamo medial do gato desencadeava respostas de defesa integradas e bem orientadas, com as mesmas características das provocadas por ameaças naturais, no caso, a presença de um cão agressivo.²³ Tais resultados indicam a existência no SNC de sistemas neurais pré-organizados, capazes de gerar manifestações de emoções básicas, como o medo. Pela magnitude desta contribuição científica, Hess foi agraciado com o prêmio Nobel, em 1949. Mais ainda, o achado de Hess foi a primeira evidência experimental substanciando a teoria elaborada por Charles Darwin postulando que as emoções básicas – alegria, medo, ira e tristeza – tinham valor adaptativo e, por isso, haviam sido selecionadas naturalmente ao longo da evolução dos seres vivos. Como consequência, haveria correspondência ou homologia entre suas manifestações nas

diferentes espécies, inclusive a humana.²⁴ Estava implícito que deveriam existir sistemas cerebrais que coordenam as manifestações dessas emoções, conservados ao longo da evolução. Portanto, o substrato neural das emoções básicas poderia ser estudado em animais de laboratório, como o fez Walter Hess, sendo as conclusões extrapoláveis ao ser humano. Para a Psicologia e a Psiquiatria, esta proposta de Charles Darwin tem a mesma relevância da ideia da seleção natural para a biologia, fundamentando as abordagens hoje denominadas Psicologia Evolutiva e Psiquiatria Evolutiva.

Quanto aos neurotransmissores, um marco da biologia molecular da época foi a elucidação do local de ação dos ansiolíticos benzodiazepínicos, que se dá em receptores específicos (RBZ) acoplados ao receptor tipo A do neurotransmissor inibitório ácido gama-aminobutírico (RGABA-A). Ao se combinarem com o RBZ, os benzodiazepínicos modulam positivamente o RGABA-A, intensificando a ação inibitória do GABA sobre o funcionamento dos neurônios-alvo.^{25,26} Esta descoberta levou-nos a explorar a função do GABA na PAGd em uma série de estudos utilizando uma técnica que permite a microinjeção de drogas combinada com a estimulação elétrica em um mesmo local do SNC. Isto é possível graças ao uso de um dispositivo denominado quimitrodo, formado por um eletrodo colado a uma cânula, pela qual é introduzida uma agulha de injeção, sendo que as extremidades da agulha e do eletrodo situam-se 1 mm abaixo da ponta da cânula. O teste comportamental utilizado em nossos experimentos era realizado em uma caixa de dois compartimentos iguais, onde o rato podia desligar o estímulo passando de um lado para o outro, por isso denominada "caixa de vai-e-vem". Com este método pode-se determinar o limiar aversivo, definido como a menor intensidade da corrente elétrica que elicia resposta de fuga, no caso a passagem de um compartimento da caixa para o lado oposto. O primeiro estudo foi realizado por Marcus Brandão, como requisito de sua tese de doutorado, tendo mostrado que a microinjeção na PAGd dos ansiolíticos clordiazepóxido e pentobarbital, bem como do GABA elevava o limiar aversivo. Em direção oposta, a administração dos antagonistas do RGABA-A bicuculina e picrotoxina produzi-

am comportamento de fuga semelhante ao evocado pela estimulação elétrica. Tais resultados sugerem que o GABA exerce inibição tônica sobre os neurônios da PAGd que comandam a fuga, sendo que o efeito antiaversivo dos ansiolíticos seria devido à intensificação desta função do GABA.²⁷

Como as facilidades da *internet* não existiam, enviei pelo correio separatas do mencionado artigo do *Brazilian Journal* aos principais laboratórios que pesquisavam sobre a ação dos ansiolíticos. Um deles despertou particularmente nosso interesse, pois há anos nele se investigavam as funções comportamentais da PAG. Era o então denominado *Centre de Neurochimie* da Universidade de Estrasburgo, capital da província francesa da Alsácia, o qual era dirigido pelo renomado neurofisiologista Pierre Karli. Quando lá cheguei tive uma boa acolhida, pelo fato de o artigo de revisão que havia enviado ter sido escrutinado pelos docentes e pós-graduandos. Além disso, eles também estavam investigando o papel do GABA na PAGd. Como consequência, programamos um estágio de pós-doutorado para Marcus Brandão, que deu início a uma longa colaboração, não somente com o nosso laboratório, mas com outros centros de pesquisa brasileiros.

Cabe um parêntese para destacar a importância de elaborar conceitos teóricos e publicá-los. No nosso caso, em revista nacional que prestou muitos serviços para promover a biociência brasileira, numa época em que poucos pesquisadores tinham competência para redigir um trabalho científico em inglês. A outra, é a da colaboração internacional com centros de pesquisa mais avançados, hoje bem mais difundida que naquela época, porém cuja expansão é ainda meta a ser atingida pelas universidades brasileiras.

Os estudos seguintes com estimulação elétrica e microinjeção de drogas exploraram as ações do GABA e de aminoácidos excitatórios, que têm efeitos opostos aos do GABA, tanto na PAG como no hipotálamo medial, em estudos conduzidos pelos pós-graduandos Elizabeth A. Audi e Humberto Milani, que mais tarde viriam a se tornar docentes na Universidade Estadual de Maringá, Paraná, por Antônio Pádua Carobrez, que fez carreira na Universidade Federal de Santa Catarina, e por Maria Cristina Silveira. Como ilus-

tração, cito um artigo de revisão que cobre parte dos resultados obtidos.²⁸

Um marco importante na direção das nossas pesquisas deu-se com a chegada de Francisco S. Guimarães, candidatando-se à Pós-graduação em Farmacologia. Sendo na época coordenador do programa e percebendo as qualidades do candidato, lamentei não poder orientá-lo, pelo fato de minha cota de alunos já estar preenchida. Como ele era formado em Medicina, ocorreu-me que poderia ser orientado por um psiquiatra e iniciar uma linha de pesquisa em seres humanos. A escolha do orientador recaiu sobre Antônio W. Zuardi, com quem já havia colaborado em estudo pioneiro, realizado na Universidade de Campinas, onde ele foi docente antes de retornar para a FMRP. Neste estudo havíamos empregado uma variante do teste baseado na ansiedade de falar em público, no qual, em lugar da videocâmara original, a voz do participante era registrada em um gravador de fita.²⁹ Como Antônio Zuardi e eu havíamos conseguido a outorga de um quarto da enfermaria do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (HCRP) para instalar o primeiro laboratório de pesquisa em psiquiatria, foi consequência lógica o projeto de doutorado de Francisco Guimarães ser realizado nesse local, com o teste da simulação de falar em público (TSFP), agora com videocâmara.³⁰ Devido ao contato com Bill Deakin, que trabalhava com outro modelo de ansiedade experimental humana, o condicionamento da resposta de condutância da pele (CRCP), não foi difícil que ele admitisse Francisco Guimarães como estagiário de pós-doutorado na Universidade de Manchester. Este estágio dava início a uma frutífera colaboração.

Voltando a investigar o papel da 5-HT na PAGd, a doutoranda Maria Tereza Schütz, utilizando o quimitrodo e a caixa de vai-e-vem mediu o efeito da própria 5-HT e de um agonista 5-HT direto, 5-MeODMT, sobre o limiar de fuga da estimulação elétrica da dPAG. Os resultados mostraram que, tanto a 5-HT como o 5-MeODMT elevavam o limiar de fuga de modo dose-dependente. Além disso, o efeito antiaversivo de ambos agentes serotoninérgicos foi bloqueado pelo tratamento prévio com o antagonista 5-HT não seletivo metergolina, bem como com a ciproeptadina, que bloqueia predominantemente os receptores 5-HT

do tipo 2. Concluiu-se que a 5-HT reduz a aversão na PAGd atuando sobre receptores 5-HT₂.³¹ Como os antagonistas 5-HT não eliciavam a fuga concluiu-se que a inibição mediada pela 5-HT deveria ser fásica, em contraste com aquela exercida pelo GABA, que, como vimos, é tônica. Essas evidências são particularmente significativas, porque mostram claramente que a 5-HT exerce um papel antiaversivo na PAGd, contrariamente ao postulado pelo modelo de Wise e colaboradores, discutido anteriormente. Por tal motivo, o impacto desta publicação é relativamente elevado, com IGA = 132.

A PSICOBIOLOGIA

Uma mudança importante nos rumos da minha carreira foi a de prestar concurso de Professor Titular no Departamento de Psicologia da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP), USP, em 1986. A meta era viabilizar o recém-criado Programa de Pós-graduação em Psicobiologia, que carecia de massa crítica e liderança. Além dos fundadores, Lino B. De Oliveira, Sílvio M. de Carvalho, Luiz de Oliveira e José Aparecido da Silva, agregaram-se ao grupo Carlos Alberto B. Tomaz, vindo de um doutorado em Düsseldorf, além de Marcus L. Brandão, que retornou após trabalhar como docente na Universidade Federal do Espírito Santo. Em conjunto com Carlos Tomaz, instalamos um novo laboratório, onde foram produzidos muitos estudos nos anos seguintes. Esta mudança também representou uma inflexão nos rumos da pesquisa, pois abandonei os métodos baseados no comportamento operante e passei a utilizar o labirinto em cruz-elevado (LCE) como modelo de ansiedade. Este último representa uma abordagem diferente da anterior, que se fundamentava na análise experimental do comportamento behaviorista, por basear-se em conceitos etológicos, no caso a aversão inata de roedores por espaços abertos e elevados, onde não podem exercer a exploração por meio do contato com as vibrissas. O aparelho é constituído por dois braços cercados de paredes (fechados), perpendiculares a dois outros com as mesmas dimensões, desprovidos de paredes (abertos). Quando colocados no centro do labirinto, ratos e camundongos preferem explorar os

braços fechados, entrando neles com maior frequência e aí permanecendo por mais tempo. Sob o efeito de ansiolíticos esta preferência desaparece. Embora já largamente empregado no exterior, creio que foi a primeira vez que o LCE foi utilizado no Brasil, tanto na pesquisa, como em aulas práticas, onde produzia resultados consistentes, demonstrando assim sua robustez. Como sua fabricação é simples e de baixo custo, seu uso difundiu-se rapidamente, o que traz uma lição sobre o tipo de técnica a ser adotada em países onde os recursos proporcionados para a pesquisa científica são escassos.

Dos muitos trabalhos publicados por nós com o LCE, destaca-se um de natureza metodológica, que além das medidas espaço-temporais – percentagem de entradas e tempo dispendido nos braços abertos e fechados – acrescentou o registro de itens comportamentais, tais como comportamento de avaliação de risco e de exploração da extremidade do braço aberto, sendo as medidas submetidas à análise fatorial. O estudo foi realizado pelo doutorando Antônio Pedro M. Cruz, atualmente docente na Universidade de Brasília, tendo grande impacto, com IGA = 781.³² Também despertou atenção (IGA = 204) o estudo realizado no laboratório de Francisco Guimarães revelando o efeito ansiolítico do canabidiol no LCE.³³

Outra contribuição significativa foi dada pelo doutorando Hélio Zangrossi Jr., atualmente docente do Departamento de Farmacologia da FMRP. Verificou ele que a exposição mais prolongada ao labirinto revertia o fenômeno da tolerância à segunda tentativa no LCE, descrito originalmente no laboratório da psicofarmacologista britânica Sandra File, em Londres. Ele consiste na perda do efeito ansiolítico de benzodiazepínicos em animais que haviam realizado exploração prévia do LCE. Em estágio realizado no referido laboratório, Hélio Zangrossi reproduziu o achado, resultando daí uma publicação conjunta, com IGA = 222.³⁴

Cabe aqui um comentário sobre a decisão do pós-graduando Ricardo L. Nunes de Souza de realizar doutorado-sanduíche na Universidade de Zurique, Suíça, trabalhando no laboratório do psicofarmacologista Bert Siegfried, cuja linha de pesquisa era a derrota social em camundongos. Na época, trabalhar com camundongo era pouco comum, devido à dificuldade para localizar estru-

turas em um cérebro bem menor que o do rato. Entretanto, esta escolha mostrou-se feliz, pois atualmente o camundongo é o preferido, por se prestar ao uso de técnicas de genética molecular e farmacogenética. Posteriormente, Ricardo e sua esposa e também pesquisadora Azair Canto de Souza realizaram pós-doutorado em Leeds, Grã-Bretanha, no laboratório de John Rogers, que também trabalhava com a mesma espécie. Fiéis à escolha original, eles vêm dando contribuição expressiva ao estudo dos sistemas de defesa no camundongo, sendo ele atualmente docente no campus de Araraquara da Universidade Estadual Paulista (UNESP) e ela na Universidade Federal de São Carlos.

A relação entre os resultados obtidos em animais de laboratório e a Psiquiatria iniciou-se com outro episódio de *serendipity*. No ano de 1987, fui convidado a fazer uma palestra sobre o sistema cerebral aversivo no Instituto de Psiquiatria da USP, em São Paulo, onde relatei a descrição feita pelo neurocirurgião norte-americano Blaine S. Nashold dos efeitos da estimulação elétrica da PAG lateral em pacientes. Foi então que o psiquiatra Valentim Gentil Filho manifestou-se com a afirmação: “Isto é um ataque de pânico”. Foi a primeira vez que se estabeleceu relação entre PAG e pânico, hoje largamente admitida. Para registrar este acontecimento, sugeri a Valentim Gentil a redação de um anexo a um capítulo de livro que estava redigindo, sobre modelos animais de aversão.³⁵ Esta colocação levou-me a conceber um modelo teórico sobre o papel da 5-HT na ansiedade e no pânico no qual propus que as projeções serotoninérgicas do NDR para o prosencéfalo aumentam a ansiedade, como no modelo de Wise e colaboradores, enquanto que as que inervam a PAGd inibem neurônios do sistema cerebral aversivo que estariam envolvidos no ataque de pânico.³⁶ Esta organização aparentemente paradoxal, foi justificada por sua possível vantagem adaptativa – quando a ameaça for potencial ou distante da presa, é melhor refrear comportamentos que despertem a atenção do predador, como a fuga. Tal argumento baseia-se nos conceitos de níveis de ameaça elaborados por Robert e Caroline Blanchard, que realizaram a análise etoexperimental – uma convergência entre as mencionadas abordagens behaviorista e etológica – do compor-

tamento de defesa de roedores.³⁷ Segundo eles, o primeiro nível de defesa verifica-se quando um predador que havia sido encontrado neste local não mais está presente, ou quando a situação é nova, podendo reservar tanto recompensas como ameaças (conflito). A resposta de defesa verificada nessas condições é a exploração cautelosa (*risk assessment*) do ambiente. Caso o predador esteja presente, porém situado a distância segura da presa, esta emprega a segunda estratégia de defesa, que é a imobilidade atenta – a já mencionada inibição comportamental ou congelamento. Tal comportamento visa diminuir o risco de percepção pelo predador. Finalmente, no terceiro nível de defesa o predador está a curta distância ou mesmo em contato com a presa, restando a ela fugir desabaladamente ou lutar com o predador. Tais níveis de defesa estariam relacionados a estados emocionais distintos: ansiedade, medo e pânico, respectivamente.

O próximo passo, que hoje seria denominado translacional – relacionando pesquisa básica com aplicações clínicas – foi dado em colaboração com Bill Deakin. Da mesma forma que nós, ele havia proposto que diferentes vias serotoninérgicas desempenham papéis distintos na regulação das emoções. No caso, a via que vai do NDR à amígdala aumentaria a ansiedade antecipatória ou generalizada, enquanto a que vai do NMR ao hipocampo dorsal promoveria a tolerância ao estresse crônico, e cuja falência levaria à depressão. Em viagem de Bill Deakin ao Brasil para participar de congresso científico, resolvemos combinar as duas hipóteses no que ficou conhecido como a “teoria de Deakin-Graeff”. Em conversação, delineamos um artigo que justificaria nossa ideias. Ao retornar à Inglaterra, ele foi convidado por David Nutt, então novo editor do *Journal of Psychopharmacology*, para escrever um artigo-alvo, contendo novas ideias, que seria enviado para comentário a alguns dos mais eminentes pesquisadores da área. A publicação conteria os comentários, mais a réplica dos autores. Apesar de a revista estar em fase ruim, tendo perdido a indexação em bases de dados, aceitamos a oferta.³⁸ O resultado foi muito positivo, testemunhado pelo alto impacto das citações que o artigo tem obtido (IGA = 897). Com respeito às ameaças agudas, relacionamos os níveis de defesa,

definidos pelo casal Blanchard, com emoções normais e com psicopatologia, e propusemos possíveis estruturas cerebrais como seu substrato neural. Especificamente, o primeiro nível, de risco potencial, estaria relacionado com a ansiedade e com o transtorno de ansiedade generalizada (TAG), tal como definido pela classificação do *Diagnostic Statistical Manual* (DSM III). As estruturas-chave seriam a amígdala, o hipocampo e o córtex pré-frontal. O segundo nível, onde o perigo está distante, corresponderia ao medo e às fobias. O substrato neural seria o hipotálamo medial. Já, no terceiro nível a ameaça iminente geraria o pavor ou pânico, e a patologia correspondente seria o transtorno de pânico (TP). A PAGd seria a estrutura-chave, cujo hiperfuncionamento tornaria os portadores vulneráveis a ataques de pânico espontâneos. Para as ameaças persistentes, que geram estresse crônico, a resposta adaptativa é a de desconectar as atribuições das atividades correntes, o que permite uma vida quase normal. Tal capacidade de tolerar a adversidade crônica denomina-se resiliência. Naturalmente, há um limite variável para cada um e, quando este é esgotado, precipita-se o transtorno afetivo denominado depressão maior. Quanto aos papéis da 5-HT, postulamos que a via NDR-amígdala aumentaria a ansiedade e propiciaria o TAG, enquanto a via NDR-PAGd inibiria o pânico. Por fim, a via NMR-hipocampo promoveria a resiliência. Para explicar o efeito terapêutico dos agentes antidepressivos inibidores da recaptção de 5-HT, utilizados para tratar as três patologias, propusemos ainda que sua administração crônica (por três ou mais semanas) aumentaria a função da 5-HT na PAGd, restando os ataques de pânico, bem como no hipocampo dorsal, restaurando a resiliência. Já para o TAG, a atividade da via NDR-amígdala seria reduzida, posto que os receptores ansiogênicos, do tipo 5-HT₂ (hoje se sabe serem do subtipo 5-HT_{2C}) teriam seu número e/ou sensibilidade reduzida.

Como já destacamos, o principal valor de uma teoria é do estimular a pesquisa. Neste caso o valor heurístico da teoria de Deakin-Graeff tem sido apreciável, pois ao longo dos anos vem sendo testada experimentalmente em diferentes laboratórios com técnicas cada vez mais sofisticadas de biologia celular e molecular e de neuro-

imagem funcional. A propósito, a psicobióloga Cláudia M. Padovan organizou dois simpósios na USP Ribeirão Preto para comemorar os 21 e os 25 anos da teoria, respectivamente. Também editou os números de duas revistas internacionais que publicaram matéria apresentada nas reuniões. Destes, cito dois artigos de revisão que julgo particularmente relevantes, o primeiro sobre pesquisa pré-clínica realizada nos Estados Unidos³⁹ e o segundo sobre investigação em seres humanos.⁴⁰

Toda teoria científica deve se prestar ao teste empírico de suas previsões. No caso da teoria de Deakin-Graeff, planejamos verificações em animais de laboratório e em seres humanos. No primeiro caso, decidimos criar um modelo animal que medisse índices relacionados à ansiedade e ao pânico no mesmo animal, executando a mesma tarefa motora. Partimos do LCE, obstruindo a entrada de um dos braços fechados com um anteparo, formando um labirinto com um braço fechado e dois abertos, que foi denominado labirinto em T-elevado (LTE). Como índice de ansiedade, mede-se a latência de saída do braço fechado com as quatro patas por três tentativas sucessivas. Como os braços abertos são aversivos para o rato, o tempo que ele leva para sair do braço fechado aumenta a cada tentativa, mostrando a aquisição de uma esquia inibitória. Para medir o índice de pânico, o mesmo rato é colocado na extremidade de um dos braços abertos, medindo-se a latência da saída do braço que o animal realiza para se dirigir ao braço fechado, executando assim uma resposta de fuga. Cabe salientar, que este teste se enquadra em nova fase dos modelos animais de psicopatologia – a dos modelos teoricamente fundamentados – que são derivados de hipóteses abrangendo tanto mecanismos de fisiopatologia humana como os subjacentes aos comportamentos dos animais de laboratório no aparelho-teste.

Os primeiros experimentos de validação do modelo foram feitos com o uso do ansiolítico diazepam. Como esperado, ele prejudicou a aquisição da esquia inibitória sem afetar a fuga. Também prejudicou a memória, avaliada com medida realizada no dia seguinte, por sugestão de Carlos Tomaz. Os resultados foram originalmente publicados no *Brazilian Journal* em artigo que tem ele-

vado impacto de citações (IGA = 206), devido ao sucesso ulterior do modelo.⁴¹ Os experimentos foram executados pela pós-graduanda Milena B. Viana, que seguiu trabalhando por muitos anos com o LTE e é, atualmente, docente na Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), campus de Santos.

Para o teste da vertente ansiedade-pânico da teoria Deakin-Graeff, vários experimentos foram realizados em nosso laboratório com injeção intracerebral de agentes que estimulam ou inibem o funcionamento do NDR. Já o papel do NMR e do hipocampo dorsal na depressão foi estudado no laboratório de Francisco Guimarães, utilizando modelo de estresse por contenção, no qual ratos confinados por algum tempo num cilindro mostram-se mais ansiosos no dia seguinte, quando avaliados no LCE. Finalmente, para testes em seres humanos foram utilizados os já mencionados modelos experimentais: o TSFP como modelo de pânico e o CRCP como modelo de ansiedade. Os experimentos com este último foram conduzidos por Francisco Guimarães no laboratório de Bill Deakin, enquanto os que utilizaram o TSFP foram realizados no HCRP pelo psiquiatra e então doutorando Luiz Alberto Hetem. O efeitos de agentes que modificam a neurotransmissão serotoninérgica foram medidos em ambos os modelos. O conjunto dos resultados obtidos foi compatível com as previsões da teoria de Deakin-Graeff, tendo sido publicados em artigo que atinge alto impacto de citações, com IGA = 944.⁴²

Outros testes farmacológicos da teoria foram realizados durante este período, como relatado em artigo de revisão.⁴³ Entretanto, para aprofundar sua validação acrescentamos métodos não farmacológicos. Um deles foi de natureza neuroquímica – a microdiálise intracerebral. Para realizá-la, cânulas com membranas semipermeáveis na extremidade são localizadas no SNC pelo método estereotáxico e perfundidas com solução fisiológica, da qual podem ser colhidas e dosadas substâncias ativas. Para o aprendizado da técnica, Milena Viana realizou estágio no laboratório de Peter A. Löschmann, docente da Universidade de Tübingen, Alemanha. Lá demonstrou que a estimulação do NDR com microinjeção de ácido kaínico liberava 5-HT no espaço extracelular, tanto na amígdala como na PAGd, como

previsto pela nossa teoria.⁴⁴ O outro foi de natureza molecular, denominado c-fos, que designa um oncogene. Com ele, verifica-se que o núcleo de neurônios ativado fica marcado pela proteína Fos, detectada por método imunológico. Pode-se assim mapear as estruturas nervosas ativadas por determinadas condições. Para aprendizado do método, Maria Cristina Silveira estagiou no laboratório de Guy Sandner, em Estrasburgo, onde realizou vários estudos mostrando que as várias estruturas do sistema cerebral de defesa são ativadas por diferentes condições de estresse (ver, e. g., Siveira et al., 1995).⁴⁵ De volta ao Brasil, realizou no laboratório de Hélio Zangrossi, importante validação do LTE, ao mostrar que as tarefas de esquiva inibitória e de fuga, realizadas isoladamente, geravam um padrão diferencial de ativação das estruturas cerebrais de defesa. Em particular, a amígdala era ativada pela esquiva, enquanto que a PAGd era ativada pela fuga, o que dá suporte à ideia de que a primeira tarefa relaciona-se com a ansiedade e a segunda com o pânico.⁴⁶ Assinale-se que este estudo contou com a colaboração do pesquisador uruguaio Rodolfo Silveira, então professor-visitante na FFCLRP. De modo mais amplo, este parágrafo mostra a importância da colaboração internacional na aquisição e implantação de novas técnicas de investigação.

No último período em que atuei na Psicobiologia, montei um novo laboratório, com maior espaço e recursos técnicos, em colaboração com Marcus Brandão, que permaneceu em sua direção após minha saída, em 1998, até 2017. Entre as numerosas contribuições de Marcus Brandão ao estudo dos mecanismos de defesa, destaco duas: A primeira foi a demonstração do papel do colículo inferior na defesa proximal, como relatado, entre outros, em artigo de revisão.⁴⁷ A segunda refere-se à distinção entre o congelamento produzido pelo medo (defesa distal) e a imobilidade determinada pela estimulação elétrica da PAGd, característica da defesa proximal.⁴⁸ Quanto a esta última, cabe um parêntese que ilustra a importância da neurociência comportamental para a vida diária. Graças a informação veiculada por Regina Nogueira a juristas influentes em Brasília, há disposição para rever a interpretação do significado da imobilidade apresentada por

cerca de 30% das vítimas de estupro, que tem sido erroneamente considerada como falta de resistência e aceitação.

A PSQUIATRIA

Após um intervalo de dois anos de dedicados a tarefas didáticas, passei a atuar na Pós-graduação em Saúde Mental do atual Departamento de Neurociências e Comportamento da FMRP, entre os anos de 2000 e 2010, para promover a reestruturação do Programa. Como consequência, a atividade de pesquisa voltou-se para o ser humano. Uma vertente dela foram experimentos com o TSFP realizados em pacientes de pânico, iniciados pelo estudo que fundamentou a tese de doutorado da psiquiatra Cristina Marta Del Ben. (Del-Ben et al., 2001),⁴⁹ a qual veio a se tornar docente do mesmo Departamento. Seus resultados mostraram que os pacientes de pânico apresentavam alto nível de ansiedade generalizada antes do teste, porém reagiam muito pouco ao desafio de falar diante da câmera de televisão. Este perfil foi considerado semelhante ao de voluntários sadios que haviam ingerido o antagonista 5-HT não seletivo metergolina, como relatado no mencionado estudo realizado com gravador de som.²⁹ Isto levou Cristina Del-Ben a sugerir que os pacientes de pânico poderiam sofrer de um déficit de 5-HT nas vias que inibem ataques de pânico, provavelmente localizadas na PAGd. Esta hipótese fisiopatogênica foi depois explorada em animais de laboratório, como veremos ulteriormente, tendo recebido considerável apoio experimental.

Estudos subsequentes com o teste de TSFP foram conduzidos pelos pós-graduandos Cibele Garcia-Leal e Alexandre C. Parente, cujos resultados, somados a evidências anteriores, foram analisados em artigo de revisão.⁵⁰ Além de serem compatíveis com a teoria de Deakin-Graeff sobre o papel da 5-HT na ansiedade e no pânico, os últimos estudos evidenciam que o TSFP não ativa o eixo hormonal de estresse – hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA). Isto valida o TSFP como modelo de pânico, pois há evidências mostrando que o ataque de pânico natural ou provocado por agentes panicogênicos também não o faz.⁵¹ Saliente-se, aliás, que a estimulação elétrica da PAGd

igualmente não aciona o eixo HPA, como demonstrado no laboratório de Luiz Schenberg.⁵²

O fato de experiência tão estressante quanto um ataque de pânico não liberar corticoides pode parecer paradoxal. Entretanto, esta expectativa deriva do conceito clássico da “síndrome geral de adaptação”, que se supõe ser a mesma para qualquer tipo de estresse. Entretanto, o que ocorre na realidade são respostas adaptativas específicas para diferentes ameaças à homeostase. No caso do pânico, que requer respostas como fuga ou luta, não faz sentido liberar hormônios que aumentem o consumo de energia. O mesmo se dá no estresse causado por frio intenso. Para uma discussão do tema ver Graeff e Zangrossi (2010).⁵³

Outra vertente refere-se à questão de se as estratégias de defesa – definidas a partir de estudos em animais de laboratório ou da observação sistemática do seu comportamento em condições naturais – podem, de fato, ser extrapoladas para o ser humano. Claro que este é o pressuposto básico da perspectiva evolutiva. Porém, poucos estudos procuram validá-la empiricamente. Um deles foi conduzido por Caroline Blanchard, no Havaí, em colaboração com psicólogos, no qual se utilizaram cenários em que variavam as condições de intensidade, proximidade e possibilidade de fuga de situações de ameaça, requerendo-se dos participantes que respondessem a perguntas de um questionário sobre o que fariam em cada uma dessas circunstâncias.⁵⁴ Com base nos resultados obtidos, os autores concluíram haver alto grau de correspondência entre tais respostas e os padrões de defesa verificados nos outros animais. Como nesse tipo de pesquisa é importante avaliar-se o peso de fatores psicossociais, devem ser realizadas investigações em condições socioculturais diferentes da original. Assim sendo, resolvemos reproduzir o estudo em Ribeirão Preto, não sem antes realizar a validação da tradução do questionário de medo original. O estudo foi conduzido pela pós-graduanda Rosana Shuhama, sob orientação de Cristina Del-Ben. Com poucas exceções, que podem ser atribuídas a diferenças culturais, os resultados obtidos apoiaram as conclusões do primeiro estudo.⁵⁵ Como reproduções adicionais desta pesquisa em diferentes países chegaram à mesma conclu-

são, podemos admitir que se trata de fenômeno transcultural, fundamentando na biologia, como supôs originalmente Charles Darwin. A razão mais provável desta coincidência é a conservação ao longo da árvore evolutiva da organização cerebral que organiza as reações de defesa. Como veremos abaixo, isto que tem sido comprovado por estudos de neuroimagem.

Os estudos com neuroimagem foram introduzidos na pesquisa em Psiquiatria no HCRP por Cristina Del-Ben, após treinamento realizado no Departamento de Psiquiatria da Universidade de Manchester, dirigido por Bill Deakin. Durante este estágio, ela participou de pesquisas envolvendo o reconhecimento de faces emocionais associado a imagens de ressonância magnética funcional (IRMf), combinado com o efeito de drogas serotoninérgicas. Continuando esta linha de pesquisa em Ribeirão Preto, foi realizado um estudo sobre o efeito do inibidor seletivo de recaptção de 5-HT, escitalopram, verificando-se que a droga facilitava o reconhecimento de faces expressando tristeza e inibia o reconhecimento daquelas expressando felicidade, porém apenas em voluntários do sexo masculino.⁵⁶ Além de destacarem o papel da 5-HT na modulação do reconhecimento de faces emocionais. (ver Del-Ben et al., 2008),⁵⁷ estes resultados mostram a influência do gênero neste fenômeno.

Esta última questão foi explorada em estudo ulterior, conduzido pelo psiquiatra Vinícius G. Guapo, cujos resultados mostraram que a acurácia em reconhecer determinadas emoções varia com a fase do ciclo menstrual e, em particular, destacaram a importância dos estrógenos no reconhecimento de emoções negativas, como tristeza, ira e medo.⁵⁸ Devido ao controle rigoroso das fases do ciclo hormonal, este estudo dá uma contribuição significativa ao conhecimento do dimorfismo sexual e tem tido impacto significativo (IGA = 84).

Outro estudo com reconhecimento de faces emocionais e IRMf avaliou o efeito do ansiolítico diazepam, mostrando que a droga afetou diferencialmente o processamento do reconhecimento de faces expressando diferentes emoções aversivas, além de salientar o papel da amígdala e da ínsula na ação ansiolítica do benzodiazepínico.⁵⁹

A importância da ínsula também foi atestada por estudo morfológico de ressonância mag-

nética, conduzido no HCRP pelo doutorando Ricardo R. Uchida, cuja análise dos dados foi realizada no laboratório de Geraldo F. Busatto, na Faculdade de Medicina da USP, São Paulo.⁶⁰ Nele foi empregado o método da morfometria baseada no voxel para acessar o volume de matéria cinzenta em diferentes estruturas do SNC em pacientes de pânico, comparados com voluntários saudáveis. Encontrou-se aumento relativo de matéria cinzenta na ínsula esquerda desses pacientes. Outras estruturas igualmente afetadas foram o giro temporal superior esquerdo, o mesencéfalo e a ponte, enquanto que diminuição da matéria cinzenta foi encontrada no córtex cingulado anterior direito. Os achados foram interpretados em relação à fisiopatologia do transtorno de pânico. Assim, os aumentos encontrados no tronco cerebral, onde se encontra a PAG, estariam associados à maior vulnerabilidade a ataques de pânico, enquanto os referentes à ínsula e ao cíngulo anterior foram associados à avaliação distorcida de estímulos interoceptivos, verificada nos pacientes de pânico. O impacto desta contribuição tem sido apreciável (IGA = 130).

Mesmo após meu desligamento da Programa de Pós-graduação em Saúde Mental, continuei a colaborar com o grupo de pesquisa dirigido por Cristina Del-Ben, daí resultando, entre outros, um estudo que merece destaque por se referir a um tema central deste artigo que é a organização cerebral do sistema de defesa. Como antecedente, é necessário descrever sucintamente o estudo com IRMf realizado por Dean Mobbs, no qual voluntários saudáveis eram instruídos a movimentar um triângulo (presa virtual) num labirinto apresentado numa tela para evitar que um círculo (predador virtual) o alcançasse. Um programa de computador instrua o círculo a perseguir e capturar o triângulo. Quando isto acontecia, o participante recebia choques elétricos nos dedos da mão. O principal achado foi a demonstração de que ativação localizava-se no córtex pré-frontal medial quando o círculo estava longe do triângulo, tipificando uma situação de ameaça potencial ou distal. A medida que o círculo se aproximava do triângulo, a ativação deslocava-se para a PAG.⁶¹ A importância desses resultados é difícil de ser exagerada, pois foi a primeira demonstração de estruturas cerebrais envolvidas na defe-

sa em seres humanos. Validaram, ainda, a extrapolação de resultados obtidos em animais de laboratório para nossa espécie, fundamentando a perspectiva original de Charles Darwin. Finalmente, os autores relacionaram a defesa potencial ou distal com a ansiedade e a proximal com pânico, na esteira da teoria de Deakin-Graeff. Era uma estratégia complementar e mais direta do aquela empregada por Caroline Blanchard com o uso dos cenários de ameaça do mencionado questionário de medo. Por tal razão, ocorreu-me a ideia de realizar um estudo combinando as duas abordagens. A principal investigadora foi a então pós-doutoranda Rosana Shuhama, sob a supervisão de Cristina Del-Ben. Em síntese, voluntários saudáveis foram colocados no interior de uma máquina de ressonância magnética e, em lugar de ler a descrição dos cenários, ouviam o relato dos mesmos gravados por um locutor. Os participantes eram instruídos a imaginar a situação o mais vividamente possível, como se estivessem nela. A escolha dos cenários recaiu em dois extremos do referido questionário de medo – o mais distal e o mais proximal. No primeiro caso, era ouvir um ruído suspeito próximo à janela do quarto, à noite. No segundo, a entrada em elevador de um atacante portando uma faca na mão, obstruindo a porta. Para realizar as subtrações necessárias para medida da IRMf, adicionaram-se dois cenários, um prazeroso – andar em uma praia, e outro neutro – agendar uma reunião por telefone. Os resultados com escalas de avaliação psicométrica mostraram que os cenários de ameaça, tanto o iminente como o potencial, aumentaram o sentimento e os sintomas corporais de desconforto. As imagens de ressonância funcional mostraram ativação do córtex pré-frontal ventromedial pela ameaça potencial e da PAG pela ameaça iminente, em surpreendente concordância com os relatados por Dean Mobbs e colaboradores (2007)⁵⁷, usando ameaças virtuais.⁶² Pode-se dizer, também, que tais resultados validam o questionário de medo elaborado por Caroline Blanchard e colaboradores (2001).⁵⁴ Mais importante, salientam o uso da imaginação como recurso de investigação associado a imagens funcionais do cérebro, cujas vantagens são várias: De natureza prática, pois dispensa equipamentos dispendiosos que podem interferir no campo magnético; de nature-

za ética, poupando os voluntários de dor e outros desconfortos. Sem esquecer que chama a atenção para as peculiaridades do ser humano, que permitem delineamentos experimentais diferentes dos empregados em outras espécies, o que nem sempre é lembrado por investigadores treinados em pesquisa animal.

Antes de passar à próxima seção, devo assinalar que durante este período uma ex-orientada desenvolveu uma linha de pesquisa em seu laboratório, na UNESP, campus de Assis, estudando a participação do NMR e do hipocampo dorsal na defesa, utilizando o LTE e contando com a colaboração de Hélio Zangrossi. As principais conclusões a que levaram os resultados obtidos é a de que o NMR participa da regulação da defesa potencial (ansiedade), mas não da defesa proximal (pânico), lembrando que o NDR que participa de ambas. Indicam, ainda, que a ativação da via serotoninérgica que nasce no NMR e inerva o hipocampo dorsal aumenta a ansiedade, mas não afeta o pânico. Estes resultados resgatam o papel do hipocampo dorsal na ansiedade, postulado por Jeffrey Gray, que tem sido relegado a segundo plano pela ênfase (justificada) nos papéis do hipocampo na memória e na resiliência ao estresse. Por isso, dedicamos a ele o artigo de revisão que redigimos para sintetizar esses resultados e reavaliar o papel do NMR e do hipocampo dorsal na ansiedade.⁶³

DE VOLTA AOS MODELOS ANIMAIS

O retorno aos modelos animais iniciou-se por mais um episódio de *serendipity*. Participando de um simpósio na Universidade Estadual de Maringá, Paraná, assisti à apresentação de Elisabeth Audi, onde ela apresentou resultados iniciais obtidos por sua orientada Camila Roncon, mostrando que o pré-tratamento, i. p., com o antagonista não seletivo de receptores opioides naloxona bloqueia o efeito antifuga (panicolítico) da administração crônica de fluoxetina, medido no LTE. Como a fluoxetina não se liga diretamente a receptores opioides, suspeitei haver uma interação entre receptores 5-HT e opioides endógenos, que seria relevante tanto do ponto de vista terapêutico como fisiopatológico (ver abaixo). Iniciou-se assim uma colaboração para

explorar este tema, que envolveu a fundamental participação de Hélio Zangrossi Jr.

O primeiro estudo aprofundou a investigação sobre a fluoxetina. Lembrando que evidências anteriores haviam mostrado que o efeito antifuga da fluoxetina crônica era mediado por receptores 5-HT_{1A} (R5HT1A) localizados na PAGd,⁶⁴ o próximo passo foi verificar se a injeção intra-PAGd de naloxona era capaz de antagonizar este efeito da fluoxetina, o que de fato ocorreu. Portanto, opioides endógenos na PAGd parecem participar da ação panicolítica do antidepressivo. Resultados adicionais mostraram que a naloxona bloqueia os efeitos da 5-HT, tendo sido ambas injetadas na PAGd, o que sugere que a 5-HT interage com opioides locais para atenuar a defesa proximal e, supostamente, ataques de pânico.⁶⁵ Resultados de estudos ulteriores utilizando agonistas e antagonistas seletivos de receptores da 5-HT e opioides, que não cabe aqui descrever em detalhe, apontam para uma interação cooperativa entre o R5HT1A e o receptor Mu-opioide (RMO) resultando em ação sinérgica entre os agonistas de ambos receptores. Uma revisão recente abrange estes resultados, bem como discute as implicações teóricas e práticas dos mesmos.⁶⁶

Quanto às implicações teóricas, propusemos que a existência de uma interação cooperativa entre a 5-HT e os opioides na PAGd permite reconciliar as duas principais teorias neuroquímicas da vulnerabilidade dos pacientes de pânico aos ataques de pânico – a serotoninérgica e a opioidérgica.^{66,67} A primeira já foi mencionada anteriormente a respeito do trabalho de Cristina Del-Ben com o TSFP em pacientes de pânico, quando ela sugeriu que estes últimos poderiam apresentar um déficit de 5-HT nas vias que inibem ataques de pânico. Esta hipótese foi fortalecida por evidências pré-clínicas obtidas por Johnson e colaboradores⁶⁸ em ratos tornados vulneráveis a manifestações comportamentais e fisiológicas semelhantes ao ataque de pânico pela diminuição prolongada do tono GABAérgico no hipotálamo. Esses autores verificaram que tais animais apresentam redução do funcionamento de um subgrupo de neurônios do NDR que envia projeções dorsais para a PAGd, onde exercem ação inibitória sobre as reações comportamentais da defesa proximal, bem como projeções ventrais

para núcleos do bulbo ventral que regulam o sistema simpático periférico, inibindo assim as manifestações neurovegetativas da reação de defesa. Com base nessas evidências, propuseram que pacientes de pânico apresentariam um déficit de funcionamento deste sistema neuronal serotoninérgico, tornando-se mais vulneráveis à ocorrência de ataques de pânico espontâneos.

Já a hipótese opioide baseia-se nos trabalhos e ideias do eminente psiquiatra norte-americano Donald Klein, o qual, vale lembrar, foi o descobridor do tratamento farmacológico do transtorno de pânico com antidepressivos, fato este que levou ao reconhecimento deste transtorno como diferente da ansiedade generalizada na classificação dos transtornos psiquiátricos. Observando que havia comorbidade entre transtorno de pânico e disfunções respiratórias, além de semelhanças entre as manifestações do ataque de pânico e a sufocação, Donald Klein havia proposto que pacientes de pânico teriam um alarme de sufocação supersensível.⁶⁹ Mais recentemente, ele e seu colaborador Maurice Preter estenderam a teoria da sufocação para abranger outro fator de vulnerabilidade, este de natureza psicossocial, que é a ansiedade de separação na infância. Como se sabe que tanto a respiração como o vínculo materno-infantil são modulados por opioides endógenos, Preter e Klein (2008)⁷⁰ sugeriram que uma falha no sistema opioide que normalmente refreia ataques de pânico estaria na raiz da vulnerabilidade apresentada pelos pacientes. Em teste clínico da teoria, mostraram que a administração do antagonista opioide naloxona tornava indivíduos sadios suscetíveis a ataques de pânico provocados pela injeção de lactato de sódio, tal como ocorre com os pacientes de pânico.

Muitos dos achados de Donald Klein foram reproduzidos por experimentos realizados com o modelo animal de pânico da estimulação elétrica da PAGd no laboratório de Luiz Schenberg – um exemplo marcante de pesquisa translacional. Para assinalar este fato e a possível reconciliação das hipóteses serotoninérgica e opioidérgica proporcionado pelos achados referentes à interação 5-HT-opioides na PAGd, Luiz Schenberg organizou um simpósio em Vitória, Espírito Santo, ocorrido entre 16 e 18 de novembro de 2012, que contou com a honrosa presença de Donald Klein. Os anais des-

te simpósio, intitulado “*Ist World Symposium on Translational Models of Panic Disorder*” foram por ele editados e publicados em 2014 no periódico *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, volume 46 Pt 3. Nele se encontram artigos relevantes para compreensão mais aprofundada dos temas aqui discutidos.

Quanto a possíveis aplicações, trata-se do tratamento farmacológico do transtorno de pânico e, possivelmente da depressão. Apesar da eficácia, os antidepressivos têm limitações – demoram pelo menos três semanas para começar a atuar, provocam efeitos colaterais indesejáveis e, sobretudo, há cerca de 30% dos pacientes que não respondem ao tratamento. Por isso, novas alternativas ou associações têm sido buscadas. Já mencionamos, por exemplo, o uso da ketamina para tratamento da depressão resistente. Nossos resultados com modelos animais de pânico indicam que eles atuam via 5HT1A na dPAG e que estes interagem cooperativamente com o RMO. Portanto, é de se esperar que a adição de um opioide potencialize o efeito dos antidepressivos. Com efeito, verificou-se que a injeção de doses sub-eficazes de um agonista RMO seletivo na dPAG acelera o efeito antifuga da fluoxetina crônica, que já aparece aos 7 dias de injeção diária, em lugar dos 21, verificados no grupo controle.⁷¹ Este achado encoraja a investigação clínica para verificar se a adição de opioides exógenos é capaz de acelerar a ação dos antidepressivos, e mesmo tornar sensíveis pacientes resistentes. Contudo, há óbices evidentes ao uso dessas drogas, tipificadas pela morfina, devido a efeitos colaterais, como depressão respiratória, constipação e, principalmente, ao elevado potencial de abuso, com desenvolvimento de tolerância, dependência psicológica e fisiológica. No entanto, há alternativas que podem ser exploradas. Uma delas refere-se ao tramadol, medicamento em uso para o tratamento da dor. Embora tenha potencial de abuso em altas doses, este é menor do que o da morfina ou da oxicodona, a ponto de ser comercializado sem necessidade de receituário especial. O tramadol combina ação agonista fraca sobre o RMO com inibição da recaptção da 5-HT e da noradrenalina. Não é surpresa, portanto, que tenha mostrado efeito do tipo antidepressivo em modelos animais⁷² e em relatos de casos clínicos de depressão re-

sistente a antidepressivos,⁷³ depressão com forte tendência suicida⁷⁴ ou associada a perda social.⁷⁵ Estes últimos resultados levam a pensar que talvez os mecanismos que estamos identificando na dPAG – a cooperação entre o R5HT1A e RMO – possam estar presentes em sistemas neuronais envolvidos na depressão. Isto aumentaria muito sua importância clínica, dado que o impacto psicossocial e econômico da depressão é bem maior do que o do pânico, ao mesmo tempo que encoraja a investigação de tal possibilidade em ensaios clínicos controlados.

Outra possibilidade é o uso de antagonistas do receptor opioide Kappa (RKO), como a buprenorfina, que também se encontra em uso para o manejo da dependência a opioides. A estimulação do RKO tem efeitos opostos à do RMO e, segundo nossos resultados com modelos animais de pânico, interage negativamente com o R5HT1A.⁷⁶ Também este mecanismo pode estar presente no substrato neuronal da depressão, pois foi relatado que baixas doses de buprenorfina atenuam marcadamente a ideação suicida em pacientes deprimidos.⁷⁷

Um terceira opção é a dos derivados da opiorfina. Esta substância é um pentapeptídeo, encontrado originalmente na saliva humana, que inibe duas enzimas degradantes de peptídeos de curta cadeia de aminoácidos. Por isso estes são chamado oligopeptídeos, e as enzimas cababolizantes, oligopeptidases. Entre os primeiros estão os opioides endógenos denominados encefalinas. Como resultado da inibição das oligopeptidases pela opiorfina, acredita-se que aumentem os níveis extracelulares de encefalina e, conseqüentemente, seja intensificada sua ação sobre receptores opioides onde elas se ligam, respectivamente o Mu e o Delta. Desta forma, a opiorfina estimularia tais receptores indiretamente, ao contrário dos agonistas opioides diretos, como a morfina. Com isto, é possível que tenham menos inconvenientes. De fato, resultados em modelos animais têm mostrado que a opiorfina exerce ponderável ação analgésica, sem contudo haver tolerância ao uso repetido, nem indícios de desenvolvimento de dependência (ver, e. g., Thanawala et al., 2008).⁷⁸ O inconveniente da opiorfina para uso clínico é o de ser rapidamente inativada quando ministrada por via oral. Contudo análogos resistentes a esta

inativação já foram desenvolvidos e estão sendo testados em ensaios clínicos.

Como se poderia prever, a opiorfina teve efeito do tipo panicolítico no LTE e no teste da estimulação elétrica da dPAG, quando injetada no interior desta estrutura, o qual foi bloqueado por um antagonista RMO seletivo.⁷⁹ Contudo, resultados ulteriores questionam o mecanismo de ação através das encefalinas, pelo menos exclusivamente. Isto porque o efeito antifuga da opiorfina não foi afetado por um antagonista seletivo do R5HT1A, e foi bloqueado por um antagonista do receptor da BK (bradicinina) do tipo B₂.⁸⁰ Isto não é tão surpreendente, pois a BK é um nonapeptídeo suscetível à ação proteolítica das mesmas oligopeptidases que degradam as encefalinas. Além disso, sua injeção intra-PAGd determina efeito antifuga bloqueado tanto por um antagonista do receptor B₂ como por um antagonista do RMO.⁸¹ Além disso, o mesmo estudo mostrou que a inibição da inativação enzimática da BK pelo agente anti-hipertensivo captopril (também inibidor da conversão da angiotensina) determinou efeito antifuga no modelo da estimulação elétrica da PAGd. Este resultado é muito significativo, porque sinaliza a presença de BK endógena na PAGd, a qual poderia estar atuando fisiologicamente como modulador da reação de defesa proximal e, supostamente, de ataques de pânico. O uso de agentes que afetam a BK, como o captopril, seria outra avenida a ser explorada para o desenvolvimento de novos medicamentos panicolíticos.

Assim, termino esse relato voltando às origens – às pesquisas realizadas no início da carreira sobre os efeitos comportamentais da BK, único neurotransmissor até agora descoberto no Brasil.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em primeiro lugar, quero assinalar que a abordagem escolhida padece de limitações. Ao seguir os rumos de minha carreira científica, mostrei uma estrada estreita, que percorre o vasto território da neurociência comportamental. Mesmo considerando apenas o tema central – neurotransmissores que modulam reações de defesa, deixamos de abordar ou apenas mencionamos importantes atores, como os aminoácidos excita-

tórios e os chamados neurotransmissores atípicos – óxido nítrico e canabinoides –, que inclusive são estudados por alguns dos nossos colaboradores, como Francisco Guimarães, Antônio Zuardi e Antônio Pádua Carobrez. Igualmente, vastas áreas do conhecimento de fundamental importância, como a memória e as demências foram omitidas. Também não foi devidamente enfatizada a contribuição de estudos neuroanatômicos, que descrevem conexões entre grupos neuronais situados em diferentes estruturas cerebrais formando os circuitos e redes neurais que regulam as reações de defesa. Em particular, os estudos conduzidos pelo grupo liderado por Newton Canteras mostraram que respostas inatas ou aprendidas a diferentes ameaças – predatória, de membros da mesma espécie ou sinalizadas por estímulos interoceptivos e dolorosos – são processadas por circuitos independentes, envolvendo áreas cortico-límbicas (amígdala, hipocampo e córtices pré-frontal e da ínsula), hipotalâmicas e do tronco cerebral. Em revisão recente, Canteras e eu reunimos evidências neuroanatômicas e farmacológicas que convergem para salientar o papel crítico da PAG e do hipotálamo na geração de ataques de pânico e nos mecanismos de ação das medicações antipânico atualmente em uso.⁸² Faltaram ainda as abordagens da neuroquímica, genética ou biologia molecular – hibridização *in situ*, animais *knot out*, optogenética e farmacogenética – que são temas fronteiriços na atualidade. Sem falar nas simulações computacionais, nas redes neurais e na robótica cognitiva e afetiva. Desta forma, este artigo não tem a menor pretensão de apresentar o estado da arte da área.

No entanto, espero que o material apresentado, permita ao leitor algumas reflexões gerais sobre o fazer científico, que naturalmente deverão variar conforme sua perspectiva e experiência. Fazendo aqui as minhas, tenho a dizer que o progresso da ciência parece depender de avanços em dois níveis, o conceitual e o técnico. Iniciando por este último, vimos como a introdução de novos instrumentos pode permitir a exploração de novos temas. Por exemplo, a neuroimagem funcional permite estabelecer correlações entre estados subjetivos e ativação de estruturas cerebrais, elevando a outro patamar a Neuropsicologia. No campo conceitual, acompanhamos a evolução de visões reducionistas do comportamento, como o

Behaviorismo Radical, para a Análise Etoexperimental, a Neurociência Cognitiva, a Neurociência Afetiva, cada vez mais interdisciplinares. Como é impossível que um mesmo investigador domine técnicas de várias disciplinas, formam-se redes de pesquisa, a mais das vezes internacionais, para estudar um assunto. Com isto, tem se verificado a autoria cada vez mais numerosa de publicações. Porém, cabe assinalar que ao lado do saldo positivo desta colaboração, há mais dificuldade de controle, com vulnerabilidade a falhas intencionais ou não. Isto explica o crescente número de retratações e denúncias de más práticas na ciência que têm se verificado.

Em âmbito ainda mais geral, a sequência de estudos que apresentei ilustram um modo clássico de pesquisa teoricamente embasada. Nele, os dados conhecidos são interpretados, gerando hipóteses, que devem fazer previsões verificáveis experimentalmente. Se os resultados dos testes forem compatíveis com essas previsões, a hipótese continua de pé, até que novas evidências a contradigam, o que leva a modificações ou mesmo ao abandono da hipótese original. Apesar da fertilidade desta abordagem ao longo de muitos anos, recentemente a mesma vem sendo questionada pela estratégia da denominada *Big Data*. Dada a enorme e crescente capacidade de processamento dos megacomputadores, é possível alimentá-los com enorme quantidade de dados disponíveis, deixando por conta da inteligência artificial o estabelecimento de relações entre eles, despidas de vieses teóricos. Alegam seus defensores, que assim é possível conseguir revelações insuspeitadas. Penso que ainda é cedo para dizer se a *Big Data* irá prevalecer como complemento ou mesmo substituto da pesquisa orientada por teoria. Contudo, pode ser que, em última análise, estejamos fazendo a mesma coisa, pois em entrevista gravada que pude assistir, o famoso neurologista português Antônio Damásio colocou a ideia de a que o que chamamos de intuição – que está na origem de novas hipóteses – nada mais é que o resultado do processamento inconsciente de grandes volumes de dados pelo cérebro humano.

Assim, encerro estas considerações, esperando que a leitura deste artigo possa aumentar a compreensão de como evoluiu a neurociência comportamental nos últimos 50 anos.

REFERÊNCIAS

1. Rocha e Silva M, Beraldo WT, Rosenfeld G. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. *Am J Physiol.* 1949; 156:261-73.
2. Graeff FG, Leme JG, Rocha e Silva M. Role played by catechol and indolamines in the central actions of reserpine after mono-aminoxidase inhibition. *Int J Neuropharmacol.* 1965; 4:17-26.
3. Graeff FG, Pelá IR, Rocha e Silva M. Behavioural and somatic effects of bradykinin injected into the cerebral ventricles of unanaesthetized rabbits. *Br J Pharmacol.* 1969; 37:723-32.
4. Camargo AC, Graeff FG. Subcellular distribution and properties of the bradykinin inactivation system in rabbit brain homogenates. *Biochem Pharmacol.* 1969; 18:548-9.
5. Männistö PT, Venäläinen J, Jalkanen A, García-Horsman JA. Prolyloligopeptidase: a potential target for the treatment of cognitive disorders. *Drug News Perspect.* 2007; 20:293-305.
6. Graeff FG, Schoenfeld RI. Tryptaminergic mechanisms in punished and nonpunished behavior. *J Pharmacol Exp Ther.* 1970;173:277-83.
7. Wise CD, Berger BD, Stein L. Benzodiazepines: anxiety-reducing activity by reduction of serotonin turnover in the brain. *Science.* 1972; 177:180-3.
8. Graeff FG, Gentil CG, Peres VL, Covian MR. Lever-pressing behavior caused by intraseptal angiotensin II in water satiated rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 1973; 1:357-9.
9. Graeff FG, De Oliveira L. Influence of response topography on the effect of apomorphine and amphetamine on operant behavior of pigeons. *Psychopharmacologia.* 1975; 41:127-32.
10. Graeff FG. Kinins as possible neurotransmitters in the central nervous system. *Ciênc Cult. (São Paulo).* 1971; 23:465-73.
11. Arisawa EA. Effect of intracerebroventricular bradykinin, angiotensin II, and substance P on multiple fixed-interval fixed-ratio responding in rabbits. *Psychopharmacology.* 1978; 57:89-95.
12. Corrêa FM, Graeff FG. Central site of the hypertensive action of bradykinin. *J Pharmacol Exper Ther* 1975; 192:670-76.
13. Corrêa FM, Innis RB, Uhl GR, Snyder SH. Bradykinin-like immunoreactive neuronal systems localized histochemically in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979;76:1489-93.
14. Graeff FG, Silveira Filho NG. Behavioral inhibition induced by electrical stimulation of the median raphe nucleus of the rat. *Physiol Behav.* 1978; 21:477-84.
15. Schenberg LC, Graeff FG. Role of periaqueductal gray substance in the antianxiety action of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behav.* 1978; 9:287-95.
16. Brandão ML, Fontes JC, Graeff FG. Facilitatory effect of ketamine on punished behavior. *Pharmacol Biochem Behav.* 1980;13:1-4.
17. Graeff FG, Quintero S, Gray JA. Median raphe stimulation, hippocampal theta rhythm and threat-induced behavioral inhibition. *Physiol Behav.* 1980; 25:253-61.
18. Graeff FG, Rawlins JN. Dorsal periaqueductal gray punishment, septal lesions and the mode of action of minor tranquilizers. *Pharmacol Biochem Behav.* 1980; 12:41-5.
19. Gray JA. *The neuropsychology of anxiety: an enquiry into the functions of the septo-hippocampal system.* Oxford University Press 1982.
20. Morato de Carvalho S, de Aguiar JC, Graeff FG. Effect of minor tranquilizers, tryptamine antagonists and amphetamine on behavior punished by brain stimulation. *Pharmacol Biochem Behav.* 1981;15:351-6.
21. Graeff FG. Minor tranquilizers and brain defense systems. *Braz J Med Biol Res.* 1981;14:239-65.
22. Fernandez de Molina A, Hunsperger RW. Organization of the subcortical system governing defence and flight reactions in the cat. *J Physiol.* 1962; 160:200-13.
23. Hess W R, Brügger M. Das subkortikale Zentrum der affektiven Abwehrreaktion [The subcortical center for affective defense reactions]. *Helv Physiol Pharmacol Acta.* 1943; 1:33-52.
24. Darwin C. *The expression of the emotions in man and animals,* London: John Murray, 1872.
25. Braestrup C, Squires RF. Specific benzodiazepine receptors in rat brain characterized by high-affinity (3H) diazepam binding. *Proc Nat Acad Sci.* 1977; 74:3805-9.
26. Mohler H, Okada T. Benzodiazepine receptor: demonstration in the central nervous system. *Science.* 1977; 198:849-51.
27. Brandão ML, de Aguiar JC, Graeff FG. GABA mediation of the anti-aversive action of minor tranquilizers. *Pharmacol Biochem Behav.* 1982; 16:397-402.
28. Graeff FG, Brandão ML, Audi EA, Milani H. Role of GABA in the anti-aversive action of anxiolytics. *Adv Biochem Psychopharmacol.* 1986; 42:79-86.
29. Graeff FG, Zuardi AW, Giglio JS, Lima Filho EC, Karniol IG. Effect of metergoline on human anxiety. *Psychopharmacology.* 1985; 86:334-8.
30. Guimarães FS, Zuardi AW, Graeff FG. Effect of chlorimipramine and maprotiline on experimental anxiety in humans. *J Psychopharmacol.* 1987; 1:184-92.
31. Schütz MT, de Aguiar JC, Graeff FG. Anti-aversive role of serotonin in the dorsal periaqueductal grey matter. *Psychopharmacology.* 1985; 85:340-5.
32. Cruz AP, Frei F, Graeff FG. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav.* 1994;49:171-6.
33. Guimarães FS, Chiaretti TM, Graeff FG, Zuardi AW. Antianxiety effect of cannabidiol in the elevated plus-maze. *Psychopharmacology.* 1990; 100:558-9.
34. File SE, Zangrossi H Jr, Viana M, Graeff FG. Trial 2 in the elevated plus-maze: a different form of fear? *Psychopharmacology.* 1993; 111(4):491-4.
35. Gentil V. The aversive system, 5HT and panic attacks. In: Simon P, Soubrié P, Widlocher D, editors. *Animal models of psychiatric disorders, Vol. 1. Selected models of anxiety, depression and psychosis.* Basel, Switzerland: Karger; 1988. p. 142-5.
36. Graeff FG. Neurotransmitters in the dorsal periaqueductal grey and animal models of panic anxiety. In: Briley M, File SE, editors. *New Concepts in Anxiety.* London: Palgrave; 1991. p. 288-312.

37. Blanchard RJ, Blanchard DC. Attack and defense in rodents as ethoexperimental models for the study of emotion. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 1989; 13 Suppl:S3-14.
38. Deakin JF, Graeff FG. 5-HT and mechanisms of defence. *J Psychopharmacol*. 1991; 5:305-15.
39. Paul ED, Johnson PL, Shekhar A, Lowry CA. The Deakin/Graeff hypothesis: focus on serotonergic inhibition of panic. *Neurosci Biobehav Rev*. 2014; 46 Pt 3:379-96.
40. Shuhama R, Blanchard DC, Graeff FG, Del-Ben CM. What we imagine is what we do? A critical overview about mental imagery as a strategy to study human defensive responses. *Behav Brain Res*. 2017; pii: S0166-4328(17)30444-8.
41. Graeff FG, Viana MB, Tomaz C. The elevated T maze, a new experimental model of anxiety and memory: effect of diazepam. *Braz J Med Biol Res*. 1993; 26:67-70.
42. Graeff FG, Guimarães FS, De Andrade TG, Deakin JF. Role of 5-HT in stress, anxiety, and depression. *Pharmacol Biochem Behav*. 1996; 54:129-41.
43. Graeff FG, Viana MB, Mora PO. Dual role of 5-HT in defense and anxiety. *Neurosci Biobehav Rev*. 1997; 21:791-9.
44. Viana MB, Graeff FG, Löschmann PA. Kainate microinjection into the dorsal raphe nucleus induces 5-HT release in the amygdala and periaqueductal gray. *Pharmacol Biochem Behav*. 1997; 58:167-72.
45. Silveira MC, Sandner G, Di Scala G, Graeff FG. c-fos immunoreactivity in the brain following electrical or chemical stimulation of the medial hypothalamus of freely moving rats. *Brain Res*. 1995; 674:265-74.
46. Silveira MC, Zangrossi H, de Barros Viana M, Silveira R, Graeff FG. Differential expression of Fos protein in the rat brain induced by performance of avoidance or escape in the elevated T-maze. *Behav Brain Res*. 2001; 126:13-21.
47. Brandão ML, Melo LL, Cardoso SH. Mechanisms of defense in the inferior colliculus. *Behav Brain Res*. 1993; 58:49-55.
48. Vianna DM, Graeff FG, Landeira-Fernandez J, Brandão ML. Lesion of the ventral periaqueductal gray reduces conditioned fear but does not change freezing induced by stimulation of the dorsal periaqueductal gray. *Learn Mem* 2001; 8:164-9.
49. Del-Ben CM, Vilela JA, Hetem LA, Guimarães FS, Graeff FG, Zuardi AW. Do panic patients process unconditioned fear vs. conditioned anxiety differently than normal subjects? *Psychiatry Res*. 2001; 104:227-37.
50. Garcia-Leal C, Graeff FG, Del-Ben CM. Experimental public speaking: contributions to the understanding of the serotonergic modulation of fear. *Neurosci Biobehav Rev*. 2014;46 Pt 3:407-17.
51. Graeff FG, Garcia-Leal C, Del-Ben CM, Guimarães FS. Does the panic attack activate the hypothalamic-pituitary-adrenal axis? *An Acad Bras Cienc*. 2005; 77(3):477-91.
52. de Souza Armini R, Bernabé CS, Rosa CA, Siller CA, Schimittel FG, Tufik S, Klein DF, Schenberg LC. In a rat model of panic, corticotropin responses to dorsal periaqueductal gray stimulation depend on physical exertion. *Psychoneuroendocrinology*. 2015; 53:136-47.
53. Graeff, F. G., & Zangrossi Junior, H. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis in anxiety and panic. *Psychol Neurosci*. 2010; 3:3-8.
54. Caroline Blanchard D, Hynd AL, Minke KA, Minemoto T, Blanchard RJ. Human defensive behaviors to threat scenarios show parallels to fear- and anxiety-related defense patterns of non-human mammals. *Neurosci Biobehav Rev*. 2001; 25:761-770.
55. Shuhama R, Del-Ben CM, Loureiro SR, Graeff FG. Defensive responses to threat scenarios in Brazilians reproduce the pattern of Hawaiian Americans and non-human mammals. *Braz J Med Biol Res*. 2008; 41:324-32.
56. Alves-Neto WC, Guapo VG, Graeff FG, Deakin JF, Del-Ben CM. Effect of escitalopram on the processing of emotional faces. *Braz J Med Biol Res*. 2010; 43:285-9.
57. Del-Ben CM, Ferreira CA, Alves-Neto WC, Graeff FG. Serotonergic modulation of face-emotion recognition. *Braz J Med Biol Res*. 2008; 41:263-9.
58. Guapo VG, Graeff FG, Zani AC, Labate CM, dos Reis RM, Del-Ben CM. Effects of sex hormonal levels and phases of the menstrual cycle in the processing of emotional faces. *Psychoneuroendocrinology*. 2009; 34:1087-94.
59. Del-Ben CM, Ferreira CA, Sanchez TA, Alves-Neto WC, Guapo VG, de Araujo DB, Graeff FG. Effects of diazepam on BOLD activation during the processing of aversive faces. *J Psychopharmacol*. 2012; 26:443-51.
60. Uchida RR, Del-Ben CM, Busatto GF, Duran FL, Guimarães FS, Crippa JA, Araújo D, Santos AC, Graeff FG. Regional gray matter abnormalities in panic disorder: a voxel-based morphometry study. *Psychiatry Res*. 2008; 163:21-9.
61. Mobbs D, Petrovic P, Marchant JL, Hassabis D, Weiskopf N, Seymour B, Dolan RJ, Frith CD. When fear is near: threat imminence elicits prefrontal-periaqueductal gray shifts in humans. *Science*. 2007; 317:1079-83.
62. Shuhama R, Rondinoni C, de Araujo DB, de Freitas Caetano G, Dos Santos AC, Graeff FG, Del-Ben CM. Behavioral and neuroimaging responses induced by mental imagery of threatening scenarios. *Behav Brain Res*. 2016; 313:358-69.
63. Andrade TG, Zangrossi H Jr, Graeff FG. The median raphe nucleus in anxiety revisited. *J Psychopharmacol*. 2013; 27:1107-15.
64. Zanoveli JM, Pobbe RL, de Bortoli VC, Carvalho MC, Brandão ML, Zangrossi H Jr. Facilitation of 5-HT1A-mediated neurotransmission in dorsal periaqueductal grey matter accounts for the panicolytic-like effect of chronic fluoxetine. *J Neuropsychopharmacol* 2010; 13:1079-88.
65. Roncon CM, Biesdorf C, Santana RG, Zangrossi. H Jr, Graeff FG, Audi EA. The panicolytic-like effect of fluoxetine in the elevated T-maze is mediated by serotonin-induced activation of endogenous opioids in the dorsal periaqueductal grey. *J Psychopharmacol*. 2012; 26:525-31.
66. Graeff FG. Translational approach to the pathophysiology of panic disorder: Focus on serotonin and endogenous opioids. *Neurosci Biobehav Rev*. 2017; 76(Pt A):48-55.

67. Graeff FG. New perspective on the pathophysiology of panic: merging serotonin and opioids in the periaqueductal gray. *Braz J Med Biol Res.* 2012; 45:366-75.
68. Johnson PL, Lightman SL, Lowry CA. A functional subset of serotonergic neurons in the rat ventrolateral periaqueductal gray implicated in the inhibition of sympathoexcitation and panic. *Ann N Y Acad Sci.* 2004; 1018:58-64.
69. Klein DF. False suffocation alarms, spontaneous panics, and related conditions. An integrative hypothesis. *Arch Gen Psychiatry* 1993; 50:306-17.
70. Preter M, Klein DF. Panic, suffocation false alarms, separation anxiety and endogenous opioids. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2008; 32:603-12.
71. Roncon CM, Almada RC, Maraschin JC, Audi EA, Zangrossi H Jr, Graeff FG, Coimbra NC. Pharmacological evidence for the mediation of the panicolytic effect of fluoxetine by dorsal periaqueductal gray matter μ -opioid receptors. *Neuropharmacology.* 2015; 99:620-6.
72. Barber, J. Examining the use of tramadol hydrochloride as an antidepressant. *Exp. Clin Psychopharmacol.* 2011; 19:123-130.
73. Shapira NA, Verduin ML, DeGraw JD. Treatment of refractory major depression with tramadol monotherapy. *J Clin Psychiatr.* 2001; 62:205-6.
74. Spencer C. The efficacy of intramuscular tramadol as a rapid-onset antidepressant. *Aust New Zealand J Psychiatr.* 2000; 34:1032-3.
75. Rougemont-Bücking A, Gamma F, Panksepp J. Use of tramadol in psychiatric care: A comprehensive review and report of two cases. *Swiss Med Wkly.* 2017;147:w14428.
76. Maraschin JC, Almeida CB, Rangel MP, Roncon CM, Sestile CC, Zangrossi H Jr, Graeff FG, Audi EA. Participation of dorsal periaqueductal gray 5-HT_{1A} receptors in the panicolytic-like effect of the μ -opioid receptor antagonist Nor-BNI. *Behav Brain Res.* 2017; 327:75-82.
77. Yovell Y, Bar G, Mashiah M, Baruch Y, Briskman I, Asherov J, Lotan A, Rigbi A, Panksepp J. Ultra-low-dose buprenorphine as a time-limited treatment for severe suicidal ideation: a randomized controlled trial. . 2016; 173: 491-8.
78. Thanawala V, Kadam VJ, Ghosh R. Enkephalinase inhibitors: potential agents for the management of pain. *Curr Drug Targets.* 2008; 9:887-94.
79. Maraschin JC, Rangel MP, Bonfim AJ, Kitayama M, Graeff FG, Zangrossi H Jr, Audi EA. Opiorphin causes a panicolytic-like effect in rat panic models mediated by μ -opioid receptors in the dorsal periaqueductal gray. *Neuropharmacology* 2015; 101:264-70.
80. Sestile CC, Maraschin JC, Rangel MP, Santana RG, Zangrossi H Jr, Graeff FG, Audi EA. B₂-kinin receptors in the dorsal periaqueductal gray are implicated in the panicolytic-like effect of opiorphin. *Prog. Neuropsychopharmacol Biol Psychiatr.* .2017b; 79(Pt B):493-8.
81. Sestile CC, Maraschin JC, Gama VS, Zangrossi H Jr, Graeff FG, Audi EA. Panicolytic-like action of bradykinin in the dorsal periaqueductal gray through μ -opioid and B₂-kinin receptors. *Neuropharmacology.* 2017; 123:80-87.
82. Canteras NS, Graeff FG. Executive and modulatory neural circuits of defensive reactions: implications for panic disorder. *Neurosci Biobehav Rev* 2014; 46 Pt 3:352-64.