

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

VINICIUS MENEGARDO NUNES

**NEUROBIOLOGIA DO TRANSTORNO DO PÂNICO: O PAPEL DA
MATÉRIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL VENTROLATERAL NA
TEORIA DO ALARME FALSO DE SUFOCAMENTO**

VITÓRIA
2020

VINICIUS MENEGARDO NUNES

NEUROBIOLOGIA DO TRANSTORNO DO PÂNICO: O PAPEL DA
MATÉRIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL VENTROLATERAL NA
TEORIA DO ALARME FALSO DE SUFOCAMENTO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Schenberg

VITÓRIA
2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Registro de Julgamento de Dissertação de Mestrado

A Comissão Julgadora que examinou a Dissertação de Mestrado do candidato **VINÍCIUS MENEGARDO NUNES**, intitulada "**NEUROBIOLOGIA DO TRANSTORNO DO PÂNICO: O PAPEL DA MATÉRIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL VENTROLATERAL NA TEORIA DO ALARME FALSO DE SUFOCAMENTO**", decidiu, por unanimidade, aprovar a referida Dissertação de Mestrado. Dessa forma, o candidato cumpriu todos os requisitos descritos no Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas e, portanto, a Comissão Julgadora declara que o aluno faz jus à obtenção do Grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Vitória, 22 de julho de 2020.

Prof. Dr. Luiz Carlos Schenberg
Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) – Orientador

Prof. Dr. Leandro J. Bertoglio
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) – Titular externo

Prof. Dr. Norberto Cysne Coimbra
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP) – Titular externo



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por
LUIZ CARLOS SCHENBERG - SIAPE 296953
Departamento de Ciências Fisiológicas - DCFI/CCS
Em 29/07/2020 às 16:17

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/43189?tipoArquivo=O>

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

Nunes, Vinicius Menegardo, 1989-

N972n Neurobiologia do Transtorno do Pânico : o papel da matéria cinzenta periaquedutal ventrolateral na teoria do alarme falso de sufocamento / Vinicius Menegardo Nunes. - 2020. 63 f. : il.

Orientador: Luiz Carlos Schenberg.

Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Transtornos de ansiedade. 2. Ataques de pânico. 3.

Neurobiologia. 4. Mesencéfalo. I. Schenberg, Luiz Carlos. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 612

AGRADECIMENTOS

Bendito és Tu, Eterno, meu Deus, Rei do Universo, que renovas a minha vida a cada dia. Obrigado por guiar os meus passos e me livrar daqueles que tentaram me desorientar. Em agradecimento a Ti, o único Deus, um cântico, de David (Salmo 18): Eu te amo, ó Eterno, a minha força! O Eterno é minha rocha e minha fortaleza, meu libertador; Deus é o meu rochedo e Nele me refugio; meu escudo e a força da minha salvação, meu baluarte. Louvores entoarei ao Eterno e de meus inimigos serei salvo. Ondas de morte me cercaram e torrentes de homens malvados me confrontaram. Cordas do inferno me cingiram, prenderam-me laços de morte. Em meu infortúnio clamei ao Eterno e o meu Deus invoquei; do Seu Templo ele atentou à minha voz; a seus ouvidos chegou meu clamor. E estrondeou e estremeceu a terra, e as bases das montanhas tremeram; elas se abalaram porque Ele se irou. De Suas narinas subiu uma fumaça e de Sua boca um fogo devorador, carvões por Ele acesos. Inclinou os céus e desceu; sob Seus pés havia neblina. Cavalgou um querubim e voou, pairando sobre as asas do vento. Ocultou-se num véu de escuridão, envolto em Sua Tenda, com águas escuras e nuvens espessas. Pelo resplendor da Sua presença, atravessam Suas nuvens granizo e carvão incandescente. O Eterno fez trovejar os céus, o Altíssimo fez soar a Sua voz, com granizo e carvão incandescente. Disparou Suas flechas e os dispersou, e com relâmpagos os abalou. E apareceu o fundo dos mares e se descobriram os fundamentos do mundo ante Tua repreensão, Eterno, e pelo sopro do vento de Tua cólera. Do alto, me tomou, salvando-me das muitas águas. Livrou-me de um inimigo possante e daqueles que me odiavam, porque eram mais fortes do que eu. Acossaram-me no dia da minha calamidade, porém, o Eterno Se fez o meu esteio. Tirou-me para um amplo lugar, e arrebatou-me dali, porque Se comprazia em mim. Recompensou-me o Eterno conforme a minha retidão; conforme a pureza das minhas mãos me retribuiu. Porque guardei os caminhos do Eterno e não me apartei impiamente do meu Deus. Porque todos os Seus mandamentos estavam diante de mim e de Seus estatutos não me desviei. Perante Ele fui íntegro, e guardei-me da iniquidade. E o Eterno me retribuiu segundo a minha justiça, conforme a pureza das minhas mãos diante dos Seus olhos. Com o caridoso Te mostras benigno, com o íntegro Te mostras justo. Com o puro Te mostras reto, com o perverso Te mostras sutil. Pois o povo aflito Tu livras, e os olhos altaneiros abates. Tu iluminas minha

lâmpada, ó Eterno, meu Deus; afastas de mim as trevas. Porque Contigo enfrento exércitos, com meu Deus atravesso muralhas. O caminho de Deus é perfeito; a palavra do Eterno, pura; Ele é o escudo de todos os que Nele confiam. Pois quem é Deus senão o Eterno? E quem é rochedo senão nosso Deus? Cinge-me com força, ó Eterno, e guarda o meu caminho. A meus pés deu agilidade como dos cervos, e sobre as alturas me eleva. Instrui minhas mãos para a guerra, para que meus braços distendam um arco de cobre. O escudo da Tua salvação me concedeste, Tua destra me tem sustentado e por Tua condescendência me engrandeceste. Alargaste o caminho para meus passos e não deixaste vacilar meus pés. Persegui os meus inimigos e os alcancei, e nunca voltei até os consumir. Esmaguei-os e não mais se puderam levantar, caíram todos sob meus pés. Cingiste-me de força para a guerra, e abateste os que contra mim se levantaram. Curvaste a nuca dos meus inimigos, daqueles que me odiavam, e os destruí. Clamaram ao Eterno, porém não houve quem os socorresse. Eu os triturei como o pó que o vento carrega; como a lama das ruas os tratei. Das contendas do povo me livraste, como cabeça das nações me puseste; mesmo um povo que não me conhecia me servirá. Ao me ouvirem, obedecer-me-ão os filhos de estranhos, e se sujeitarão a mim. Os filhos de estranhos enfraquecerão e temerão mesmo em seus fortes. Viva o Eterno! Bendito seja meu rochedo, e exaltado seja o Deus da minha salvação! O Deus que me proporciona vingança e a mim sujeita os povos; que me resgata dos meus inimigos, me exalta sobre os que contra mim se levantaram, e do homem violento me livra. Por isso Te louvarei entre as nações, ó Eterno, e entoarei louvores ao Teu nome. Ele engrandece as vitórias do Seu rei e faz benevolência com o Seu ungido, com David e com a sua semente, para sempre.

Ó Eterno, Deus de vingança, mostra-Te! Aparece, ó Deus da vingança!
Ergue-te, ó Juiz da terra, e retribui aos soberbos como merecem. [...]
Quando eu disse 'meu pé resvalou', Tua bondade, ó Eterno, me susteve.
Quando dúvidas se multiplicavam em meu coração, Teu conforto alegrava minha
alma. Pode o trono da perversidade estar Contigo associado?
Ou com aquele que, sob a aparência da lei, perpetra maldades?
Estes se reúnem para tramar contra a alma do justo e condenar o sangue inocente.
Mas o Eterno é meu baluarte, meu refúgio, a alta rocha em que me abrigo.
Faz voltar sobre os malévolos sua própria iniquidade, e com sua própria maldade os
exterminará. Sim, o Eterno, nosso Deus, os exterminará.
(Salmo 94).

Nunes VM. Neurobiologia do transtorno do pânico: o papel da matéria cinzenta periaquedutal ventrolateral na teoria do alarme falso de sufocamento [dissertação]. Vitória: Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo; 2020.

RESUMO

Introdução: A principal característica do transtorno do pânico (TP) é a recorrência de ataques de pânico (AP) inesperados, ocorrendo sintomas como sensação de falta de ar, taquicardia, sudorese, tremores, medo de morrer, entre outros. Klein (1993) apresentou a teoria do alarme falso de sufocamento para explicar o TP. Esta teoria propõe a existência de um monitor de sufocamento, que integra vários sinais de asfixia, e que pode ativar um sistema de alarme ao sufocamento quando identificado um potencial sufocamento. Os APs espontâneos ocorreriam em decorrência de uma interpretação fisiológica errônea por este monitor, disparando o sistema de alarme ao sufocamento mesmo em condições normais. Por sua vez, Deakin e Graeff (1991) propuseram que a falta da inibição serotoninérgica nos circuitos neuronais que integram as reações de defesa às ameaças proximais na matéria cinzenta periaquedutal (MCPA) seria a responsável pela ocorrência de APs inesperados. Vários estudos, tanto em humanos quanto em modelos animais, têm apoiado que existe uma convergência entre estas duas proposições. **Objetivo:** Investigar as respostas de ratos em testes de sufocamento e o papel da MCPA caudoventrolateral (MCPAcvl) na resposta de fuga de ratos em teste de hipercapnia + hipóxia (HH) ambiental. **Métodos:** Teste de hipóxia (HO) ou teste de HH foram aplicados em ratos *Wistar* machos. No último grupo, foi realizado neurocirurgia para obter lesões na MCPAcvl. Posteriormente, os ratos foram testados novamente. Respostas comportamentais de salto vertical e levantamento foram registradas. **Resultados:** Durante o teste HO 25 % dos animais apresentaram resposta de salto vertical, enquanto durante o teste HH 57 % dos animais apresentaram este comportamento. A lesão unilateral na MCPAcvl parece reduzir a resposta de salto vertical, que foi abolida em 80 % dos animais que apresentaram este comportamento inicialmente. A frequência do comportamento de levantamento foi maior no período de habituação do que no período do teste HH e foi maior durante o teste HH em comparação com o teste HO. **Conclusão:** Assim como outros estudos, estes resultados reforçam a teoria

do alarme falso de sufocamento e o papel da MCPA na mediação do TP. Apesar de ser amplamente sugerido o papel principal da MCPA dorsal no AP, nossos dados sugerem que o monitor de sufocamento pode estar localizado especificamente na MCPAcvl. Desta forma, sugerimos que a MCPAcvl é responsável por disparar o AP, enquanto a MCPA dorsal é responsável por mediar as respostas subsequentes.

PALAVRAS-CHAVE: Transtorno de Ansiedade; Transtorno do Pânico; Ataques de Pânico; Matéria Cinzenta Periaquedutal; Sufocamento; Hipercapnia; Hipóxia.

Nunes VM. Neurobiology of panic disorder: the role of ventrolateral periaqueductal gray matter in the suffocation false alarm theory. Vitória: Center of Health Sciences, Federal University of Espírito Santo; 2020.

ABSTRACT

Introduction: The main feature of panic disorder (PD) is the recurrence of unexpected panic attacks (PA), with symptoms such as shortness of breath, tachycardia, sweating, tremors, fear of dying, among others. Klein (1993) presented the suffocation false alarm theory to explain PD. This theory proposes the existence of a suffocation monitor, which integrates several signs of asphyxia, and which can activate a suffocation alarm system when a potential suffocation is identified. Spontaneous PAs would occur as a result of an erroneous physiological interpretation by this monitor, triggering the suffocation alarm system even under normal conditions. On the other hand, Deakin and Graeff (1991) proposed that the lack of serotonergic inhibition in the neuronal circuits that integrate defense reactions to proximal threats in periaqueductal gray (PAG) would be responsible for the occurrence of unexpected PAs. Several studies, both in humans and in animal models, have supported that there is a convergence between these two propositions. **Objective:** To investigate the responses of rats in suffocation tests and the role of caudoventrolateral PAG (cvIPAG) in the escape response of rats in an environmental hypercapnia/hypoxia (HH) test. **Methods:** Hypoxia test (HO) or HH test were applied to male Wistar rats. In the last group, neurosurgery was performed to obtain lesions in the cvIPAG. Subsequently, the rats were tested again. Vertical jump and rearing behavioral responses were recorded. **Results:** During the HO test 25% of the animals showed a vertical jump response, while during the HH test 57% of the animals showed this behavior. The unilateral lesion in cvIPAG abolished the vertical jump response in 80% of the animals that initially exhibited this behavior. The frequency of the rearing behavior was higher in the habituation period than in the HH test period and was higher during the HH test compared to the HO test. **Conclusion:** Like other studies, these results support the suffocation false alarm theory and the role of PAG in the mediation of TP. Although the main role in the PA of the dorsal PAG is widely suggested, our data suggest that the suffocation monitor is located specifically in the cvIPAG. Thus, we suggest that cvIPAG

is responsible for triggering the PA, while dorsal PAG is responsible for mediating subsequent responses.

KEYWORDS: *Anxiety Disorder; Panic Disorder; Panic Attacks; Periaqueductal Gray; Suffocation; Hypercapnia; Hypoxia.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Prevalência de transtornos de ansiedade em adultos.

Figura 2: Prevalência ao longo da vida de transtornos de ansiedade.

Figura 3: Diferenças morfofuncionais das colunas da matéria cinzenta periaquedutal.

Figura 4: Imunoistoquímica de c-Fos ao estímulo de hipóxia.

Figura 5: Comparação do período de habituação e teste de hipercapnia + hipóxia (salto).

Figura 6: Comparação do período de habituação e teste de hipercapnia + hipóxia (levantamento).

Figura 7: Comparação do comportamento levantamento entre o período de habituação e o período do teste de hipercapnia + hipóxia nos subgrupos de animais que não apresentaram o comportamento salto e que apresentaram o comportamento salto.

Figura 8: Comparação do teste de hipóxia com o teste de hipercapnia + hipóxia (salto).

Figura 9: Comparação do teste de hipóxia com o teste de hipercapnia + hipóxia (levantamento).

Figura 10: Comparação das condições pré-neurocirurgia e pós-neurocirurgia (salto).

Figura 11: Comparação das condições pré-neurocirurgia e pós-neurocirurgia (levantamento).

Figura 12: Histologia.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sintomas que ocorrem durante um ataque de pânico.

Tabela 2: Dados dos animais do grupo controle.

Tabela 3: Dados dos animais do grupo com lesão na matéria cinzenta periaquedutal caudoventrolateral.

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT	Serotonina
AP	Ataque de pânico
CO ₂	Dióxido de carbono
CTRL	Controle
EPM	Erro padrão da média
HAB	Habituação
HH	Hipercapnia + hipóxia
HHA	Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
HO	Hipóxia
KCN	Cianeto de potássio
LVL	Lesão na matéria cinzenta periaquedutal caudoventrolateral
MCPA	Matéria cinzenta periaquedutal
MCPA _{cvl}	Matéria cinzenta periaquedutal caudoventrolateral
MCPA _d	Matéria cinzenta periaquedutal dorsal
MCPA _{dl}	Matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral
MCPA _{dm}	Matéria cinzenta periaquedutal dorsomedial
MCPA _{lt}	Matéria cinzenta periaquedutal lateral
MCPA _{rlt}	Matéria cinzenta periaquedutal rostralateral
MCPA _{vl}	Matéria cinzenta periaquedutal ventrolateral
O ₂	Oxigênio
TA	Transtorno de ansiedade
TP	Transtorno do pânico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Transtorno do Pânico	20
1.2 Hipótese de Deakin e Graeff	24
1.2.1 Matéria Cinzenta Periaquedutal	25
1.3 Teoria do Alarme Falso de Sufocamento	27
2 JUSTIFICATIVA	33
3 OBJETIVOS	35
3.1 Objetivo Geral	35
3.2 Objetivos Específicos	35
4 MÉTODOS	37
4.1 Animais	37
4.2 Testes Comportamentais	37
4.2.1 Teste de Hipóxia	38
4.2.2 Teste de Hipercapnia + Hipóxia	38
4.3 Neurocirurgia	38
4.3.1 Microlesão por Iontoforese	39
4.4 Histologia	39
4.5 Estatística	39
5 RESULTADOS	42
6 DISCUSSÃO	50
7 CONCLUSÃO	56
8 REFERÊNCIAS	58

1 INTRODUÇÃO

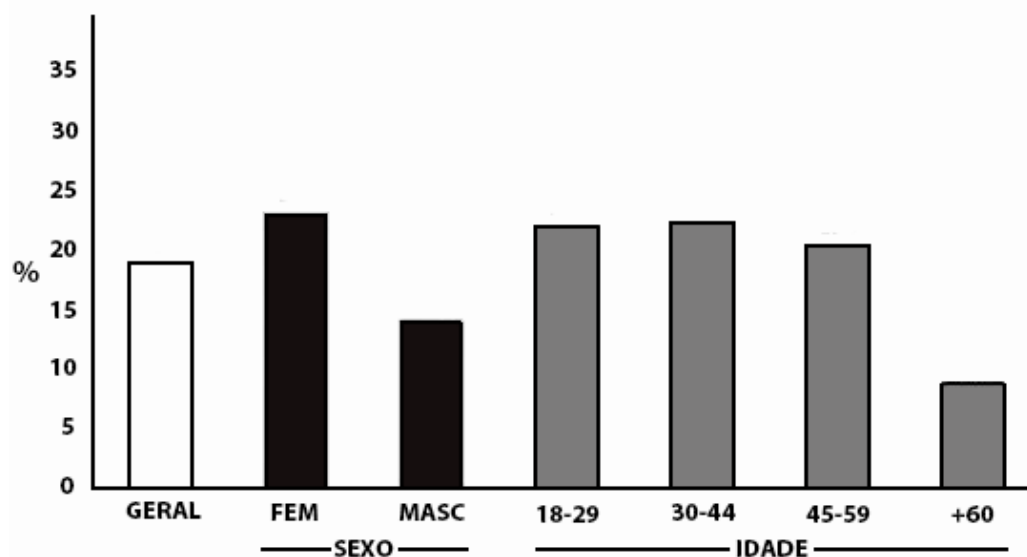
Os transtornos de ansiedade (TAs) envolvem uma regulação anormal do medo; compreendem um conjunto de transtornos que são caracterizados por medo e ansiedade excessivos, além de transtornos comportamentais. O medo é uma emoção sentida em situações de perigo, levando ao desencadeamento de uma série de respostas com o intuito de proteção contra o perigo. Nesse sentido, o medo é uma resposta emocional à uma ameaça iminente real ou percebida. Por sua vez, a ansiedade é a antecipação de uma ameaça futura, ou seja, mesmo sem a presença de uma ameaça uma pessoa ou animal pode prever uma possibilidade de perigo, o que leva ao desencadeamento de respostas relacionadas ao medo. Enquanto o medo é geralmente uma resposta transiente, dependente da duração da situação de perigo, a ansiedade é uma resposta de longa duração, tendo em vista que é desencadeada por sinais de perigos que podem tanto ser bem definidos, mas não iminentes, quanto surgir de indicações vagas (HYMAN; COHEN, 2013; *AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION (APA)*, 2013).

Os TAs são distinguidos entre si pela natureza, intensidade e duração dos sintomas, pelo fator desencadeador das respostas, sintomas associados, entre outros critérios (HYMAN; COHEN, 2013). Seguem alguns exemplos de TAs e as suas principais características. O transtorno de ansiedade de separação ocorre principalmente na infância, mas pode perdurar ao longo da vida, e é caracterizado pelo medo ou ansiedade, em níveis inapropriados, de separar-se da figura de afeto/cuidado, como a mãe, tendo como consequências, em muitos casos, o abandono escolar. O mutismo seletivo também gera prejuízos no desempenho escolar, bem como profissional, devido à grande dificuldade da pessoa em falar em situações sociais que gerem uma expectativa, como uma avaliação escolar por meio de uma apresentação oral. Objetos ou situações (como baratas, aranha, injeção ou altura) podem ser o fator desencadeador na fobia específica, mesmo que eles não ofereçam ameaça ou perigo o risco é superestimado. O transtorno de ansiedade social, ou fobia social, é caracterizado pelo medo ou ansiedade intensos em relação à possibilidade de sofrer alguma humilhação em reuniões sociais ou situações, como por exemplo, decorrente de algo que tenha falado ou feito. Já na agorafobia, o indivíduo evita estar em situações em que não possa sair facilmente como transporte

público, espaços fechados e pontes. No transtorno do pânico (TP), há ocorrência de ataques de pânico (APs) inesperados acompanhados, posteriormente, por períodos de persistente preocupação em ter novos APs ou alterações comportamentais devido aos ataques. Estes transtornos apresentam comorbidades entre si e com outros transtornos psiquiátricos (APA, 2013).

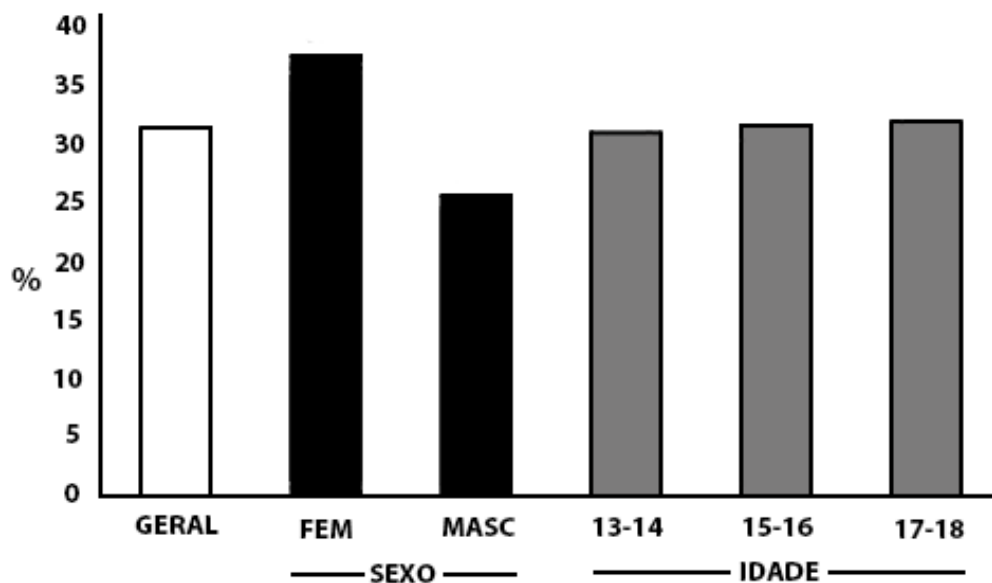
Segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde 264 milhões de pessoas vivem com TA; no Brasil, são quase 19 milhões de pessoas ou 9,3% da população, o que torna o país líder mundial em prevalência de TAs (*WORLD HEALTH ORGANIZATION* (WHO), 2017). Baseado em estudos epidemiológicos com mais de 63 mil pessoas realizados nos Estados Unidos da América e em alguns países da Europa, Bandelow e Michaelis (2015) afirmam que até 33,7 % da população é afetada por algum TA ao longo da vida, causando muitos danos individuais e sociais, tendo em vista a alta utilização de serviços médicos. O impacto econômico também ocorre devido aos prejuízos à capacidade laboral. Conforme dados obtidos em um dos estudos utilizados por Bandelow e Michaelis (2015), na população dos Estados Unidos da América, e apresentados nas figuras 1 e 2, os TAs apresentam maior prevalência em mulheres do que em homens, tanto entre os adultos quanto entre os adolescentes (KESSLER et al., 2005; MERIKANGAS et al., 2010).

Figura 1 – Prevalência de transtornos de ansiedade em adultos estadunidenses.



Fonte: Kessler et al. (2005). Figura modificada de National Institute of Mental Health, disponível em: <https://www.nimh.nih.gov/health/statistics/any-anxiety-disorder.shtml>. FEM: feminino; MASC: masculino.

Figura 2 – Prevalência ao longo da vida de transtornos de ansiedade em adolescentes estadunidenses.



Fonte: Merikangas et al. (2010). Figura modificada de National Institute of Mental Health, disponível em: <https://www.nimh.nih.gov/health/statistics/any-anxiety-disorder.shtml>. FEM: feminino; MASC: masculino.

O medo e a ansiedade são importantes para a preservação da vida, tendo em vista que prepara o indivíduo/animal para lidar com ameaças iminentes ou futuras, respectivamente. No entanto, em excesso e de forma persistente, podem se desenvolver transtornos psiquiátricos, gerando várias consequências negativas tanto para a vida das pessoas quanto para toda a sociedade. Esses transtornos podem surgir em todas as faixas etárias, inclusive na infância e, uma vez desencadeado, pode perdurar ao longo da vida. Em muitos casos, aumentam o risco de suicídio, gerando o efeito oposto ao de sua função inicial.

O presente estudo tem por foco o TP, abordando suas características específicas, suas relações com outros TA, outras doenças ou eventos/comportamentos, explorando duas das principais teorias que se propuseram a explicar os seus mecanismos fisiológicos e relacionando-as à região neuroanatômica da matéria cinzenta periaquedutal (MCPA) ventrolateral, em sua porção caudal (MCPAcvl).

1.1 TRANSTORNO DO PÂNICO

A principal característica do TP é a recorrência de APs inesperados. APs também podem ocorrer em outros TAs, por exemplo, na fobia específica e no transtorno de ansiedade de separação; no entanto, são APs esperados, tendo em vista que são desencadeados por algum estímulo específico como nos exemplos anteriores, devido à visão de uma aranha ou pela ausência da mãe, respectivamente. Também podem ocorrer em outros transtornos psiquiátricos, como transtorno de estresse pós-traumático, onde também há uma causa identificável. Já nos APs inesperados, como no TP, os ataques ocorrem sem a presença de qualquer sinal desencadeador (APA, 2013).

O AP é caracterizado pelo surgimento abrupto de um medo intenso ou desconforto intenso, acompanhado pela ocorrência de sintomas físicos ou cognitivos, conforme apresentado na tabela 1 (APA, 2013). No entanto, como assinala Graeff (2017), apenas a ocorrência destes APs não é suficiente para o diagnóstico do TP. Para tal, é necessário cumprir os seguintes requisitos: (i) que durante estes ataques ocorra quatro ou mais dos sintomas físicos e cognitivos apresentados na tabela 1; (ii) que pelo menos um dos APs seja seguido por um período (ao menos um mês) de preocupação persistente em ter novos ataques, preocupação com as possíveis consequências em ter novos APs e/ou por alterações comportamentais; (iii) o transtorno não estar relacionado a efeitos fisiológicos de alguma substância ou relacionado a outra condição médica; e, (iv) o transtorno não ser melhor explicado por outro transtorno mental (APA, 2013).

Muitas destas características que se enquadram na atual classificação de AP já foram apontadas por Sigmund Freud há mais de um século. Freud (1912) apontou que a neurose de angústia poderia se manifestar não apenas em questões relacionadas à expectativa, mas também como o que definiu de ataque de angústia, que poderia ocorrer de forma súbita sem estar associado à alguma ideia, consistindo da sensação de morte ou insanidade e podendo estar associado a parestesias, palpitações, taquicardia, alterações respiratórias como ataques de asma, tremores, tonturas, entre outros sintomas.

Tabela 1 – Sintomas que ocorrem durante um ataque de pânico.

Sintomas
1 – Palpitações, taquicardia;
2 – Sudorese;
3 – Tremores;
4 – Sensação de falta de ar ou sufocamento;
5 – Sensação de asfixia;
6 – Dor ou desconforto peitoral;
7- Náusea ou desconforto abdominal;
8 – Sensação de tontura, desequilíbrio ou desmaio;
9 – Calafrios ou sensação de calor;
10 – Parestesias (dormência ou formigamento);
11 – Desrealização ou despersonalização;
12 – Medo de perder o controle ou enlouquecer;
13 – Medo de morrer.

Fonte: APA (2013).

A partir de dados epidemiológicos, Von Korff, Eaton e Keyl (1985) demonstraram que os sintomas mais comuns de ocorrer durante um AP são taquicardia, tremores, sudorese, calafrios ou sensação de calor, medo de morrer e falta de ar. Estes seis sintomas foram reportados por mais da metade das pessoas com TP. Ainda, 25 % das pessoas relataram a ocorrência de 10 ou mais sintomas, sendo a média geral de seis sintomas. O início destes ataques ocorreu predominantemente na idade entre 15 e 19 anos, com poucos casos iniciando após os 40 anos. A prevalência de TP em mulheres foi maior do que em homens. A APA (2013) também aponta para esta diferença entre os gêneros, sendo a prevalência de TP em mulheres o dobro da prevalência em homens; esta característica também está presente quando analisados os TAs em conjunto.

Os participantes do estudo citado acima (VON KORFF; EATON; KEYL, 1985) foram entrevistados novamente após 12 meses, permitindo uma análise prospectiva, onde Keyl e Eaton (1990) abordaram os fatores de risco para o início do TP. Seis eventos ocorridos ao longo da vida apresentaram associação com o desenvolvimento do TP, como depressão ou grande episódio de luto, histórico de sintomas cardíacos,

falta de ar, abuso ou dependência de drogas, abuso ou dependência de álcool e convulsões. Segundo APA (2013), pessoas que têm depressão, transtorno bipolar e pais com TAs têm maior risco de desenvolver TP. Também, é mais comum a presença de histórico de abuso sexual e físico em pessoas com TP do que em pessoas com outros TAs.

Existe alta comorbidade entre doenças pulmonares e TP, sendo o TP o transtorno psiquiátrico mais prevalente em pacientes com doenças respiratórias (KLEIN, 1993). Karajgi et al. (1990), em estudo com paciente com doença pulmonar obstrutiva crônica, apontaram que a taxa de prevalência de TP foi mais do que 5 vezes maior do que a encontrada na população geral, apesar de a taxa de prevalência de TAs ser próxima à da população geral. Nesse mesmo sentido, Yellowlees et al. (1987) encontraram uma taxa de prevalência de 34 % para TAs, enquanto apenas para o TP esse índice foi de 24 %. Pessoas com asma também têm maior probabilidade de ter TP (PERNA et al. 1997; YELLOWLEES et al., 1988; SHAVITT; GENTIL; MANDETTA, 1992; GOODWIN; EATON, 2003). Dados nesse mesmo sentido também são encontrados em crianças (GOODWIN et al., 2005; CRASKE et al., 2001). Comparando a prevalência de doenças respiratória prévias com o desencadeamento de TA, Verburg et al. (1995) encontraram valores significativamente mais altos para o TP do que para outros TAs.

Dentre os TAs, a comorbidade do TP com a agorafobia merece destaque. Segundo APA (2013), entre 30 a 50 % dos indivíduos com agorafobia relatam a ocorrência prévia de AP ou TP e, apesar da agorafobia começar em média aos 17 anos de idade, quando considerados apenas os indivíduos que não apresentaram AP ou TP prévios, este valor apresenta uma grande elevação, passando para 25-29 anos. Um estudo epidemiológico demonstrou que 28,3 % dos participantes já haviam sofrido AP, dentre os quais 22,7 % tiveram apenas AP, 3,7 % tiveram TP sem agorafobia, 0,8 % tiveram agorafobia sem TP e 1,1 % tiveram tanto TP quanto agorafobia (KESSLER et al., 2006).

Também é importante destacar a comorbidade do TP com o transtorno de ansiedade de separação. Battaglia et al. (1995) apontam uma associação entre TP e transtorno de ansiedade de separação na infância, além de histórico familiar de TP, com e sem agorafobia. Ainda apontam que o transtorno de ansiedade de separação

na infância e o histórico familiar de TP com agorafobia, independentemente, influenciam a idade de início do TP, antecipando-a. Klein (1995), em estudo de grande importância que reavaliou, na idade adulta (entre 23 e 34 anos), crianças que foram diagnosticadas com transtorno de ansiedade de separação e tiveram recusa escolar, demonstrou que há relação entre o transtorno de ansiedade de separação na infância e o TP na vida adulta. Por fim, Roberson-Nay et al. (2012), em uma pesquisa com 1.437 pares de gêmeos, apontaram que o transtorno de ansiedade de separação na infância e o desenvolvimento do TP na vida adulta compartilham de uma diátese genética comum.

Devido às características dos sintomas ocorridos durante um AP, como por exemplo taquicardia, dor peitoral, sensação de sufocamento e medo de morrer, pessoas com TP utilizam os serviços médicos primários com alta frequência, e, geralmente, o quadro não é identificado como TP rapidamente, demorando bastante tempo para o diagnóstico (BALLENGER, 1998; METZLER; MAHONEY; FREEDY, 2016). Por exemplo, a maioria dos pacientes com dor peitoral que vão até um serviço de emergência médica não recebem diagnóstico de isquemia cardíaca; 17,5 % desses pacientes apresentam quadro compatível com TP (YINGLING et al., 1993). Os dados de pacientes com palpitações analisados por cardiologista apontam a mesma direção (BARSKY et al., 1996). Em suma, este quadro leva à elevação dos custos e sobrecarga das unidades de serviços de saúde.

Apesar dos avanços nas pesquisas sobre o TP ocorrido nos últimos anos, os mecanismos pelos quais ele ocorre ainda não são totalmente conhecidos. Duas das principais contribuições para o entendimento do TP foram apresentadas por Deakin e Graeff (1991) e por Klein (1993). A seguir, serão abordadas as teorias apresentadas por estes dois importantes trabalhos e algumas pesquisas antecedentes que as embasaram, bem como as principais pesquisas subsequentes que dão suporte aos seus apontamentos. Também serão abordados elementos que indicam uma conjunção entre as duas teorias.

1.2 HIPÓTESE DE DEAKIN E GRAEFF

Deakin e Graeff (1991) hipotetizaram que o sistema serotoninérgico encefálico está envolvido com respostas adaptativas à eventos aversivos, dividindo estes eventos em três grupos: estímulo aversivo agudo incondicionado, agudo condicionado e crônico. No primeiro grupo estariam incluídos estímulos como dor, asfixia e medo inato que desencadeariam respostas comportamentais incondicionadas como congelamento, luta ou fuga. Eles sugeriram que o pânico em seres humanos era devido à ativação espontânea destes reflexos de fuga. Graeff (1990 *apud* Deakin e Graeff, 1991, p. 306) já havia sugerido que os APs espontâneos eram decorrentes da ativação espontânea do componente de fuga da MCPA, que ocorria mesmo na ausência de um estímulo incondicionado.

Utilizando um modelo animal de teste de conflito, onde uma resposta instrumental é suprimida por uma punição (por exemplo, o animal toma um choque ao comer ou beber) Graeff (1991 *apud* Graeff, 2017, p. 49) analisou os efeitos de drogas que diminuem ou aumentam a liberação de serotonina (5-HT). As drogas que diminuem a liberação de 5-HT suprimiram o efeito da punição, enquanto as drogas que aumentam a liberação de 5-HT reforçaram o efeito da punição. No entanto, enquanto esses resultados indicam um efeito ansiogênico da 5-HT, um efeito ansiolítico é verificado no comportamento de fuga a um estímulo aversivo incondicionado; por exemplo, a exposição de um rato a um gato. Devido a esses efeitos opostos, Graeff (1991 *apud* Graeff, 2017, p.49) propôs que a 5-HT desempenha um duplo papel, dependendo se o estímulo aversivo é (i) potencial (ameaça distal) ou condicionado, ou (ii) uma ameaça próxima ou incondicionada, que desencadeia reações de defesa primitivas. Essas diferentes respostas dependem de diferentes sistemas neuronais, sendo a primeira relacionada às estruturas do prosencéfalo, como córtex pré-frontal, complexo amigdalóide e hipocampo, e sendo a segunda relacionada a uma estrutura do mesencéfalo, a MCPA. Nesse sentido, a 5-HT aumenta a ansiedade atuando nas primeiras estruturas e inibe a ocorrência de AP na última; a falta da inibição serotoninérgica nos circuitos neuronais que integram as reações de defesa às ameaças proximais na MCPA seria a responsável pela ocorrência de APs inesperados (DEAKIN; GRAEFF, 1991; GRAEFF, 2017).

1.2.1 Matéria cinzenta periaquedutal

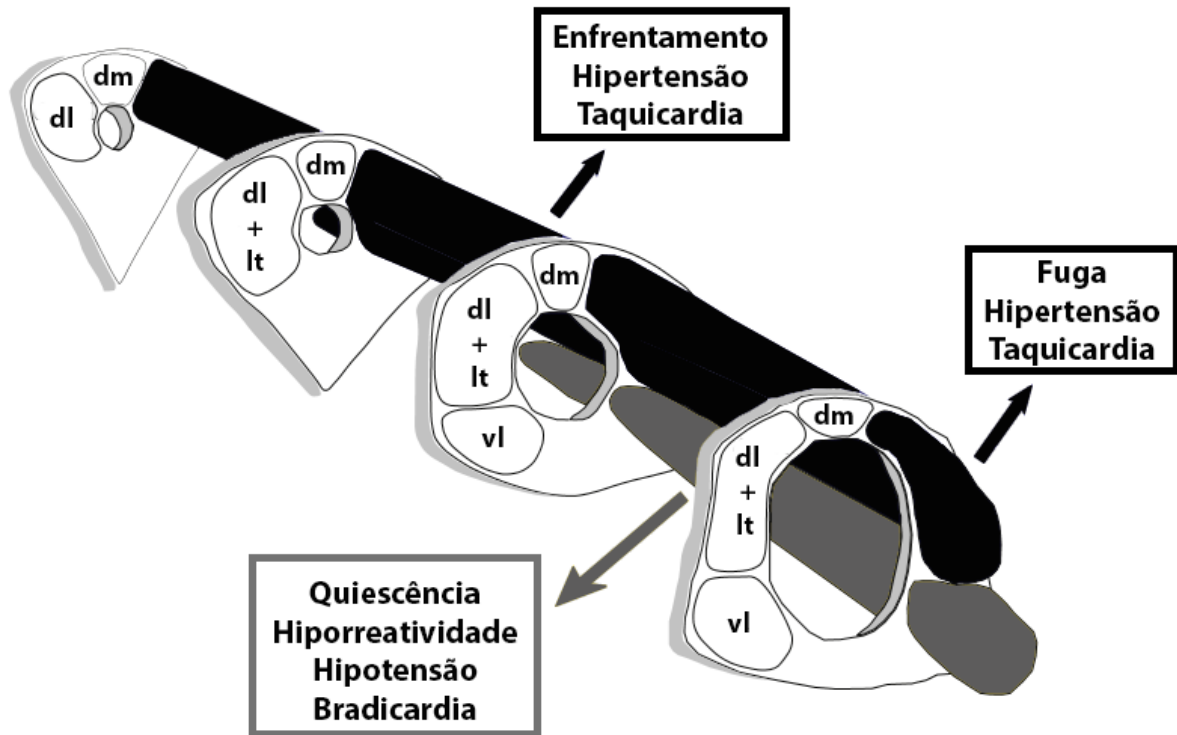
A MCPA é uma região do mesencéfalo, situada ao redor do aqueduto cerebral, entre o terceiro e o quarto ventrículo, e apresenta um formato diferenciado ao longo do sentido rostro-caudal, variando sua aparência de uma “pera invertida” a um formato oval (figura 3). A MCPA apresenta tanto organização radial quanto colunar. Radialmente apresenta uma região justa-aquedutal, composta por células esparsas; uma zona interna ou medial, com densidade moderada de neurônios pequenos e uma zona externa ou lateral, com alta densidade de neurônios de tamanho pequeno a médio. Até então, esta organização radial tem sido pouco explorada, com a maioria dos estudos explorando a sua organização longitudinal em colunas morfofuncionais (KEAY; BANDLER, 2015).

A MCPA está organizada nas colunas ventrolateral (MCPAvl), lateral (MCPAl), dorsolateral (MCPAdl) e dorsomedial (MCPAdm). Alguns estudos abordam as três últimas colunas em conjunto, sendo designada como MCPA dorsal (MCPAd). Estas subdivisões estão baseadas em aspectos funcionais (como diferentes respostas fisiológicas ou comportamentais quando estimuladas separadamente), anatômicos (com diferentes aferências e eferências) e neuroquímicos. Novos estudos ainda poderão apontar subdivisões em cada coluna (KEAY; BANDLER, 2015; RUIZ-TORNER, 2001).

Estudos em animais apontam que a estimulação elétrica, química e optogenética da MCPA evocam reações de defesa acompanhadas de respostas cardiovasculares e respiratórias (BANDLER; DEPAULIS, 1991; BITTENCOURT et al., 2004; SUBRAMANIAN; BALNAVE; HOLSTEGE, 2008; SCHIMITEL et al., 2012; DENG; XIAO; WANG, 2016; TOVOTE et al., 2016). A MCPAvl e a MCPAd têm papel oposto, eliciando respostas adequadas de acordo com a situação enfrentada, dependendo se o animal detecta uma ameaça distante ou próxima, respectivamente (KEAY; BANDLER, 2015; JOHNSON; LIGHTMAN; LOWRY, 2004). Essas diferentes estratégias são definidas como estratégias passiva e ativa (Figura 3). A estratégia passiva é eliciada pela MCPAvl (caudal), apresentando quiescência, hiporreatividade, hipotensão, bradicardia e analgesia mediada por opioides. A estratégia ativa é eliciada pela MCPAd (dois terços caudais) e apresenta diferentes respostas dependendo da porção longitudinal desta coluna que é ativada; a porção intermediária

evoca reações de enfrentamento, taquicardia e hipertensão, e a porção caudal evoca reações de fuga, taquicardia e hipertensão; ambas evocam analgesia não mediada por opioides (KEAY; BANDLER, 2015).

Figura 3 – Diferenças morfofuncionais das colunas da matéria cinzenta periaquedutal.



Fonte: Modificado de Keay e Bandler (2015). dm: matéria cinzenta periaquedutal dorsomedial; dl: matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral; lt: matéria cinzenta periaquedutal lateral; vl: matéria cinzenta periaquedutal ventrolateral.

Estudos realizados tanto em seres humanos quanto em modelos animais apoiam a hipótese de Deakin/Graeff. Protopopescu et al. (2006), utilizando imagem por ressonância magnética, encontraram um aumento significativo no volume do mesencéfalo dorsal e ventral de pacientes com TP quando comparados com o grupo controle. Utilizando o mesmo tipo de método, Uchida et al. (2008) também encontraram um aumento no volume do mesencéfalo de pacientes com TP. Por sua vez, Fujiwara et al. (2011) também indicam um aumento significativo do volume do mesencéfalo dorsal; porém, não do mesencéfalo ventral. Além desse resultado, apontam uma correlação positiva entre o volume mesencefálico dorsal e a severidade dos sintomas apresentados pelos pacientes com TP. Por fim, utilizando imagens por ressonância magnética funcional durante um teste virtual onde voluntários fugiam, em

um labirinto, de um predador virtual que era capaz de perseguir, capturar e infligir dor real, através de choques, Mobbs et al. (2007) mostraram que à medida que o predador virtual se aproximava, a atividade encefálica era deslocada do córtex pré-frontal ventromedial para a MCPA.

Alguns estudos em animais utilizam a estimulação da MCPAd como modelo experimental de AP; esta estimulação produz respostas comportamentais como congelamento, trote, galope e saltos, sendo consideradas como respostas do tipo pânico (BITTENCOURT et al., 2004; SCHIMITEL et al., 2012, 2014; BERNABÉ, 2013; QUINTINO-DOS-SANTOS et al., 2014; ARMINI et al., 2015; MÜLLER et al., 2017). Tais respostas foram atenuadas pelo tratamento com fluoxetina, um medicamento panicolítico (BERNABÉ, 2013). Quintino-dos-Santos et al. (2014) demonstraram que o isolamento social neonatal em ratos, um modelo de ansiedade de separação, facilitou as respostas comportamentais do tipo pânico produzidas pela eletroestimulação da MCPAd. Em suma, estes dados são condizentes com a proposição do TP ser mediado pela MCPA, conforme a hipótese de Deakin/Graeff.

1.3 TEORIA DO ALARME FALSO DE SUFOCAMENTO

Outra contribuição de grande relevância na área de estudos do TP é a teoria do alarme falso de sufocamento. Apresentada por Klein (1993), esta teoria propõe a existência de um monitor de sufocamento, que integra vários sinais de asfixia, e que pode ativar um sistema de alarme ao sufocamento quando identificado um potencial sufocamento. Este evoluído sistema de alarme produz reações de emergência específicas ao sufocamento, como um súbito desconforto respiratório seguido por hiperventilação, pânico e vontade de fugir. Os APs espontâneos ocorreriam em decorrência de uma interpretação fisiológica errônea por este monitor, disparando o sistema de alarme ao sufocamento mesmo em condições normais. Klein (1993) afirma que a dispneia é uma fase preliminar do AP, ela inicia o ataque, não sendo uma consequência da hiperventilação que ocorre numa fase seguinte. O autor também destaca que o medo do sufocamento é comum em pessoas normais e o sufocamento é um evento extremamente aversivo.

Como abordado anteriormente, a sensação de falta de ar ou sufocamento é um sintoma ocorrido com frequência durante um AP, assim como o medo (APA, 2013; VON KORFF; EATON; KEYL, 1985). No entanto, Klein (1993) aponta que há diferença entre o pânico clínico e o medo provocado por um perigo, tanto por ser a dispneia a principal característica no TP, mas não no medo comum, quanto pela ausência de ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) (LIEBOWITZ et al., 1985; UHDE et al., 1988; KATHOL et al., 1989; SINHA et al., 1999). Armini et al. (2015) também encontraram a mesma característica em um modelo de eletroestimulação da MCPAd, aplicando, posteriormente, a mesma intensidade de corrente elétrica que foi capaz de produzir respostas de fuga, em um ambiente de espaço reduzido que impedia estas respostas.

Além do fato da alta comorbidade entre TP e doenças respiratórias, o lactato - um subproduto do processo respiratório - é um agente panicogênico (HOLLANDER et al., 1989; GORMAN et al., 1990). Hollander et al. (1989) demonstraram que a infusão de lactato de sódio induziu a ocorrência de AP em pacientes com TP, mas o mesmo não ocorreu com pessoas sem o TP. Similarmente, o dióxido de carbono (CO₂) foi capaz, a uma concentração de 5%, de induzir AP em pacientes de TP, mas o mesmo também não ocorreu em pessoas saudáveis (WOODS et al., 1988). Altas concentrações de CO₂ é capaz de evocar AP até mesmo em pacientes com dano bilateral da amígdala (FEINSTEIN et al., 2013).

Klein (1993) destacou a necessidade de ampliar a explicação do TP, propondo uma mudança de foco da hipersensibilidade ao CO₂ para o sufocamento, tendo em vista que aquela não é suficiente para explicar a ação panicogênica do lactato. No entanto, a abordagem a partir do sufocamento explicaria esta ação panicogênica, tendo em vista a alta produção encefálica de lactato, devido à glicólise anaeróbica, que ocorre durante a asfixia (SIESJO et al., 1974). Klein (1993) também sugere que, segundo sua proposição, outros indicadores de sufocamento devem ser capazes de provocar AP. Em ordem com esta afirmação, os resultados de Beck, Ohtake e Shipherd (1999) mostram que um teste de hipóxia com 12 % de oxigênio (O₂) foi capaz de induzir AP em pacientes com TP.

Preter e Klein (2008, 2014) ampliaram a teoria do alarme falso de sufocamento para apresentar uma explicação integrada da alta comorbidade entre TP com o

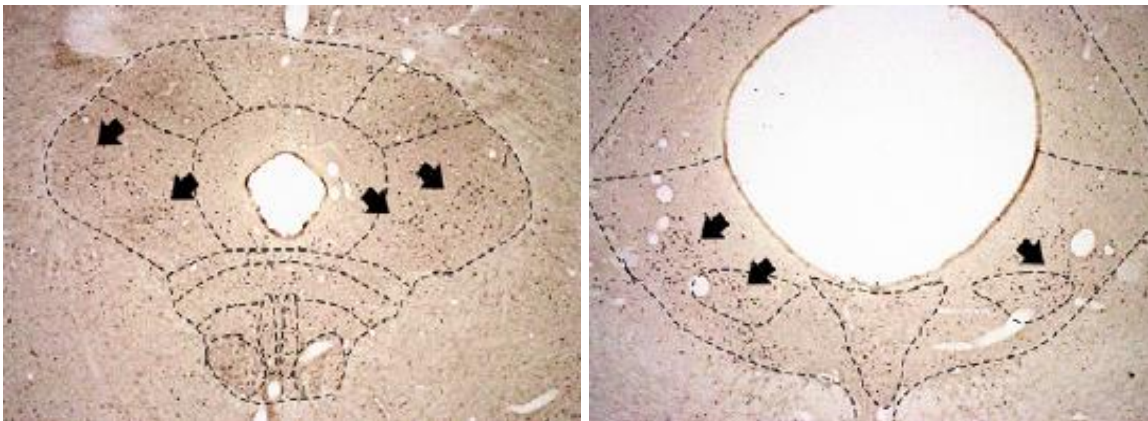
transtorno de ansiedade de separação na infância, episódios de perda repentina e luto (BATTAGLIA et al., 1995; KLEIN, 1995; ROBERSON-NAY et al., 2012; APA, 2013). Baseados no papel dos opioides tanto em problemas respiratórios quanto na ansiedade de separação, Preter e Klein (2008, 2014) propõem que uma disfunção no sistema opioidérgico, com um déficit de opioides endógenos, pode desencadear em uma diminuição do limiar de disparo do monitor de sufocamento. Isso explicaria, por exemplo, porque pacientes com TP são mais susceptíveis à APs provocados por CO₂, O₂ e lactato.

É interessante notar que nos últimos anos alguns estudos têm indicado uma convergência entre a hipótese de Deakin/Graeff e a teoria do alarme falso de sufocamento. Entre estes, destaca-se o trabalho de Graeff (2017) que aponta para uma conciliação das duas hipóteses devido à atuação sinérgica da 5-HT e de opioides endógenos na MCPAd, através de receptores 5-HT_{1A} e μ -opioide, para inibir as respostas de defesa proximal. Por outro lado, é importante ressaltar que Roberson-Nay, Latendresse e Kendler (2012) apontam para a existência de dois subtipos de APs, respiratório e não-respiratório, classificados com base nos sintomas apresentados durante os APs. Interessantemente, não foi encontrada diferença entre os dois subtipos quanto à resposta a tratamento com pânicolíticos.

Estudos em animais que têm utilizado a hipercapnia e a hipóxia como modelo experimental de AP também indicam a mesma convergência citada acima. Schimittel et al. (2012) utilizaram um modelo animal (em ratos) de hipóxia química, induzida por infusão intravenosa de cianeto de potássio (KCN), estimulação elétrica da MCPAd e exposição ao CO₂. Seus resultados demonstram que a infusão *in bolus* de KCN produziu respostas de fuga, que foram suprimidas em ratos que tiveram lesão eletrolítica da MCPAd. Por outro lado, as respostas de fuga à estimulação elétrica da MCPAd foram facilitadas quando associadas à infusão lenta de KCN. Quanto ao CO₂, 8 % e 13 % de concentração não desencadearam respostas de fuga, mas potenciaram as respostas de fuga à infusão *in bolus* de KCN. Ainda, as respostas de fuga ao KCN foram atenuadas pela administração de pânicolíticos (SCHIMITTEL et al., 2014). Em conjunto, estes resultados apontam para uma mediação da MCPA nas respostas à hipóxia e à hipercapnia.

Também utilizando um modelo animal de hipóxia química, Müller et al. (2017) realizaram análises imunohistoquímica de expressão da proteína c-Fos que demonstraram uma ativação específica da MCPA_{cvl} e da MCPA_{lt} (rostral) (MÜLLER et al., 2017). Por outro lado, em teste de hipóxia ambiental (6 % de O₂), Casanova et al. (2013) encontraram expressão da atividade de pronto-oncogenes c-fos na MCPA_{dl} e na MCPA_{lt}, onde houve aumento da proteína Fos, principalmente na MCPA_{lt}. Em outro experimento deste estudo, os ratos apresentaram resposta de corrida à hipóxia de 6-13 % de O₂.

Figura 4 – Imunoistoquímica para proteína Fos em resposta ao estímulo de hipóxia, imunomarcada em cortes da matéria cinzenta periaquedutal (MCPA). Esquerda: corte da MCPA rostral. Direita: corte da MCPA caudal.



Fonte: Müller et al. (2017).

Também utilizando um modelo de hipóxia ambiental (7% de O₂) em uma câmara cilíndrica (25 cm de diâmetro), Spiacci Junior et al. (2015) mostraram que ratos apresentaram resposta de saltos verticais em direção à tampa da câmara, o que foi interpretado como tentativas de fuga. Essa resposta foi atenuada pela injeção intra-MCPA_{dl} de 5-HT, agonistas de receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A}, bem como por tratamento crônico com pânicolíticos. Contrariamente, Spiacci Junior et al. (2018) apontam que camundongos não apresentaram resposta de salto num teste de hipóxia ambiental (7% de O₂), mas apresentaram quando expostos a um teste de hipercapnia (20 % de CO₂). Estas respostas também foram atenuadas por tratamento crônico com pânicolíticos. Apesar da diferença entre as espécies, ambas apresentaram resposta de fuga quando expostas à uma situação de sufocamento, conforme apontou Klein (1993); e, os resultados de Spiacci Junior et al. (2015) também confirmam a

proposição de Deakin e Graeff (1991) a respeito do papel, no pânico, da inibição serotoninérgica na MCPAd.

Em conjunto, os resultados de vários estudos apontam para uma convergência entre a hipótese apresentada por Deakin e Graeff (1991) e a teoria do alarme falso de sufocamento apresentada por Klein (1993). Ainda, sugerem a possibilidade do monitor de sufocamento envolvido nos APs, apontado por este, se localizar na MCPA, estrutura apontada por aqueles. No entanto, ainda não está claro o papel específico de cada coluna morfofuncional da MCPA dentro desta perspectiva. Nesse sentido, o presente estudo se propõe a aprofundar estas análises com foco na coluna MCPAvI, em sua porção caudal. A hipótese deste trabalho é que a MCPAcvI pode abrigar o monitor de sufocamento sugerido por Klein (1993) como responsável por iniciar o AP enquanto as reações subsequentes à ativação deste seriam mediadas pela MCPAd. Nesse sentido, a lesão da MCPAcvI poderia abolir as respostas do tipo pânico em um modelo experimental de AP.

2 JUSTIFICATIVA

A importância desta pesquisa encontra-se no esforço em elucidar os mecanismos fisiológicos do AP, o que pode levar ao melhor entendimento do TP, assim como de outros TAs. Uma grande parcela da população mundial é afetada por TAs, gerando grandes prejuízos pessoais e sociais. Também se destaca a abordagem desse tema numa perspectiva que converge duas das principais teorias/hipóteses sobre o TP e a exploração de uma região neural pouco explorada nesse contexto, a MCPAcvl, uma vez que a maior parte dos estudos tem voltado a atenção para a MCPAd. O Conhecimento a respeito destas questões pode trazer contribuições para o melhor entendimento do TP, bem como contribuir nas áreas de TAs, neurofisiologia e fisiologia respiratória.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar as respostas de ratos em testes de sufocamento e o papel da MCPAcvl na resposta de fuga de ratos em teste de hipercapnia + hipóxia ambiental (HH).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar respostas comportamentais de ratos em teste de hipóxia (HO) com as respostas comportamentais em teste de HH;
- Comparar respostas comportamentais de ratos em teste de HH antes e após neurocirurgia para realização de lesão na MCPAcvl.

4 MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos *Wistar* (*Rattus norvegicus*; *Rodentia, Muridae*) (N = 22), machos, pesando em média $252,5 \pm 6,8$ g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Espírito Santo sob o projeto *Estudos optogenéticos, genômicos e neurofuncionais de um modelo translacional de transtorno de pânico* aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas com Animais (protocolo 82/2017). Entre a chegada dos animais do Biotério Central e o término dos experimentos, os animais permaneceram no biotério local do Laboratório de Neurobiologia dos Transtornos do Humor e da Ansiedade. Os ratos foram mantidos em gaiolas individuais com assoalho coberto com maravalha e água e comida *ad libitum*, num ambiente com som (45 dB) e temperatura (20-25°C) controlados e ciclo de iluminação de 12 h (luzes acessas às 6:00 h).

4.2 TESTES COMPORTAMENTAIS

Os testes comportamentais foram realizados em uma câmara cilíndrica de acrílico (20 cm de diâmetro e 50 cm de altura). A parte dianteira da câmara foi mantida transparente para observação e filmagem dos testes enquanto a parte traseira foi coberta com material escuro, facilitando o contraste com o animal. O piso da câmara foi forrado com lona de vinil preta. O teto foi fechado com uma tampa de acrílico transparente, onde estava a entrada de gases, acoplada aos respectivos cilindros. Também na tampa foi inserido um pequeno aparelho para mistura de gases, mantendo todo o ambiente com concentrações homogêneas. Todos os testes foram filmados e posteriormente analisado, com registro dos comportamentos de saltos e levantamentos. O critério para considerar salto foi o animal ficar com as quatro patas sem contato com o chão. O levantamento foi considerado quando o animal ficou apoiado apenas nas patas traseiras.

Um grupo de 8 animais foi exposto nessa câmara à um teste de HO. Outro grupo de 14 animais foi exposto à um teste de HH. No dia seguinte, os animais expostos ao teste HH foram submetidos à neurocirurgia. Uma semana depois, foram testados novamente, na mesma condição. Após análise histológica, estes animais foram divididos em dois grupos: os animais que tiveram lesão na MCPAcvl (LVL) (n=7); e os animais sem lesão na MCPA, controle (CTRL) (n=7).

4.2.1 Teste de hipóxia

Após cinco minutos de habituação (HAB), o ambiente foi progressivamente enriquecido com nitrogênio (N₂) até a concentração de O₂ alcançar em média 6,1 ± 0,1 %. A partir deste momento, os comportamentos foram registrados por um período de cinco minutos.

4.2.2 Teste de hipercapnia + hipóxia

Após cinco minutos de HAB, o ambiente foi progressivamente enriquecido com CO₂ e, em seguida, enriquecido com N₂, até alcançar as seguintes concentrações de gases: 11,4 ± 0,3 % de CO₂ e 6,5 ± 0,0 % de O₂. A partir deste momento, os comportamentos foram registrados por um período de cinco minutos.

4.3 NEUROCIRURGIA

Os ratos foram tratados com ceftriaxona sódica (20 mg/kg, I.M.) e diclofenaco sódico (1 mg/kg, I.M.) e anestesiados com cetamina (100 mg/kg, i.p.) e xilazina (10 mg/kg, i.p.). Posteriormente, foram fixados a um aparelho estereotáxico (David Kopf, Tujunga, EUA) montado sobre uma placa térmica (35°C-36°C). O crânio foi exposto ao redor do lambda e foi feito um pequeno orifício para introdução de uma micropipeta nas seguintes coordenadas a partir da linha interaural: + 0,72 mm ântero-posterior, 0,0 mm lateral e + 4,1 mm dorsoventral em uma inclinação de 15° (PAXINOS; WATSON, 1998). Após a realização da iontoforese, o procedimento foi repetido do lado oposto.

4.3.1 Microlesão por iontoforese

A iontoforese foi realizada com micropipeta com ponta de 15-30 μm de diâmetro preenchida com solução de ácido caínico (10 μM em 10 Mm de cloreto de sódio), com corrente de 12 μA , durante 15 minutos, com corrente alternada de 7/7 segundos. O procedimento foi realizado durante a neurocirurgia, com a retirada da micropipeta logo em seguida.

4.4 HISTOLOGIA

Ao término do experimento os animais foram anestesiados por via com 1,5 dose anestésica de hidrato de cloral (600 mg/kg) e perfundidos por via intracardíaca por meio de uma bomba peristáltica (Masterflex CE, Barrington, IL, EUA) com 300 ml de solução salina (0,9%) seguidos por 300 ml de solução de formaldeído 10%. Os ratos foram decapitados e as cabeças armazenadas em formaldeído por até 3 dias. Em seguida, os encéfalos foram removidos e mantidos em solução de formaldeído por mais 3 dias. Após isto, os encéfalos foram preparados em blocos com mesencéfalo, seccionados em cortes de 40 μm de espessura num criostato (Leica CM1850, Wetzlar, Germany) do Laboratório de Histologia Molecular e Imunohistoquímica, estendidos em lâminas gelatinizadas, desidratados, corados com vermelho neutro e montados com DPX (Aldrich Chemical Company, Milwaukee, EUA). Por fim, foi realizada captura de imagens dos cortes encefálicos no Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins utilizando fotomicroscópio (Olympus® AX70) acoplado com câmera digital (Axiocam Erc5s, Zeiss®).

4.5 ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas no software Graphpad Prism 7.00. A normalidade foi avaliada usando o teste Shapiro-Wilk. As comparações entre os grupos foram realizadas através dos testes de hipótese não paramétricos Mann-Whitney ou Wilcoxon (para medidas repetidas). Os dados estão apresentados em

formato média \pm erro padrão da média (EPM). $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

5 RESULTADOS

Os dados dos animais do grupo CTRL e do grupo LVL e suas respostas comportamentais ao teste HH, antes e após a neurocirurgia, estão apresentados nas tabelas 1 (CTRL) e 2 (LVL).

Tabela 2 – Dados dos animais do grupo controle (CTRL). EPM: erro padrão da média; HAB: habituação; LEVn: número de levantamentos; SLTn: número de saltos.

CTRL		PRÉ-NEUROCIURURGIA						PÓS-NEUROCIURURGIA					
		HAB		TESTE				HAB		TESTE			
RATO	Peso	LEVn	SLTn	LEVn	SLTn	% O₂	% CO₂	LEVn	SLTn	LEVn	SLTn	% O₂	% CO₂
1	228	4	0	12	0	6,3	12,0	2	0	3	0	6,5	12,5
2	256	5	0	9	9	6,5	11,5	2	0	10	17	6,3	13,0
3	230	3	0	17	28	6,5	11,0	3	0	10	6	6,3	11,0
4	246	6	0	7	0	6,5	12,5	2	0	8	0	6,4	11,5
5	220	2	0	6	0	6,7	12,0	1	0	0	0	6,5	12,5
6	210	2	0	10	0	6,8	12,0	2	0	11	0	7,0	12,5
7	268	13	0	11	4	6,3	9,5	7	0	11	8	6,5	9,5
MÉDIA	236,9	5,0	0,0	10,3	5,9	6,5	11,5	2,7	0,0	7,6	4,4	6,5	11,8
EPM	7,8	1,4	0,0	1,4	3,9	0,1	0,4	0,7	0,0	1,6	2,5	0,1	0,5

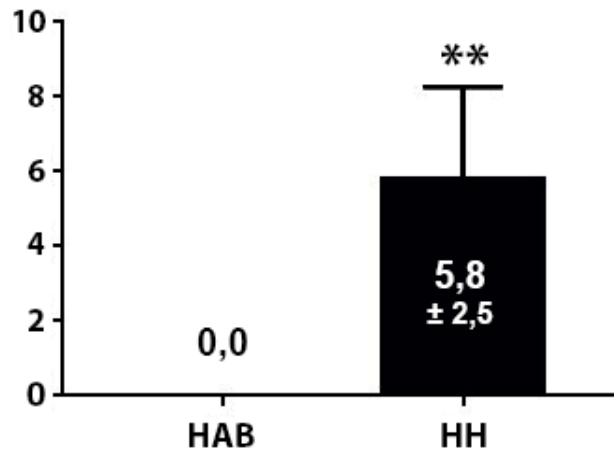
Tabela 3 – Dados dos animais do grupo com lesão na matéria cinzenta periaquedutal caudoventrolateral (LVL). EPM: erro padrão da média; HAB: habituação; LEVn: número de levantamentos; SLTn: número de saltos.

LVL		PRÉ-NEUROCIURURGIA						PÓS-NEUROCIURURGIA					
		HAB		TESTE				HAB		TESTE			
RATO	Peso	LEVn	SLTn	LEVn	SLTn	% O₂	% CO₂	LEVn	SLTn	LEVn	SLTn	% O₂	% CO₂
8	220	0	0	11	6	6,5	10,5	1	0	14	4	6,5	11,5
9	220	9	0	10	25	6,5	11,5	0	0	12	0	6,7	11,5
10	248	9	0	8	0	6,3	11,0	8	0	1	0	6,5	12,5
11	212	2	0	25	7	6,7	13,0	0	0	17	0	6,7	12,0
12	336	2	0	8	1	6,7	10,0	2	0	9	0	6,5	11,5
13	248	6	0	7	1	6,3	11,0	0	0	3	0	6,3	11,0
14	226	1	0	5	0	6,3	10,0	1	0	6	0	6,5	10,0
MÉDIA	244,3	4,1	0,0	10,6	5,7	6,5	11,0	1,7	0,0	8,9	0,6	6,5	11,4
EPM	16,2	1,4	0,0	2,5	3,4	0,1	0,4	1,1	0,0	2,2	0,6	0,1	0,3

A comparação do comportamento de saltos entre o período de HAB e o período do teste HH demonstra que houve um aumento estatisticamente significativo do número de saltos no período do teste HH (n=14; teste Wilcoxon; $P = 0,008$), conforme

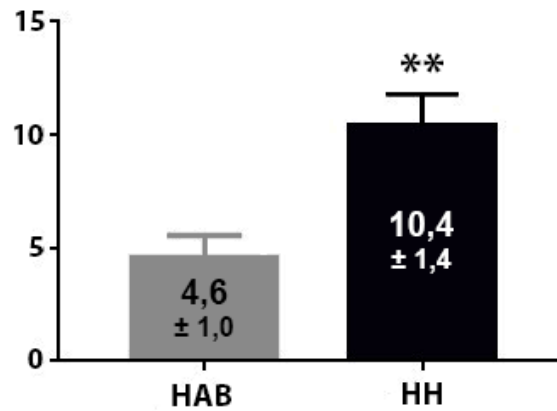
figura 5. Durante o período HAB nenhum animal apresentou o comportamento de salto. No entanto, durante o período do teste HH, 8 dos 14 animais apresentaram saltos. Este comportamento apresentou grande variação entre os animais, com alguns apresentando apenas um salto e outros apresentando 25 ou mais saltos. Por sua vez, 6 dos 14 animais não apresentaram resposta de salto durante o teste HH. A média foi de $5,8 \pm 2,5$ saltos quando considerado todo o grupo ($n=14$) e $10,1 \pm 3,7$ saltos quando considerado apenas os que saltaram ($n=8$).

Figura 5 – Comparação do período de habituação (HAB) e teste de hipercapnia + hipóxia (HH) quanto à frequência do comportamento de salto ($n=14$). Os dados estão expressos em média \pm EPM. ** $P < 0,01$.



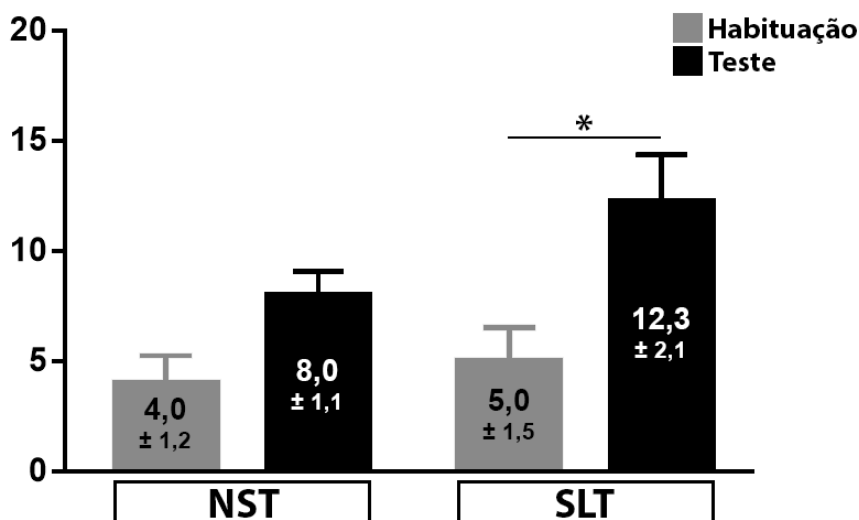
A comparação do comportamento de levantamento entre o período de HAB e o período do teste HH demonstra que houve um aumento estatisticamente significativo no número de levantamentos no período do teste HH ($n=14$; teste Wilcoxon; $P = 0,003$). Durante o período HAB os animais apresentaram $4,6 \pm 1,0$ levantamentos, enquanto durante o período do teste HH a média foi de $10,4 \pm 1,4$, conforme figura 6.

Figura 6 – Comparação do período de habituação (HAB) e teste de hipercapnia + hipóxia (HH) quanto à frequência do comportamento de levantamento (n=14). Os dados estão expressos em média \pm EPM. ** $P < 0,01$.



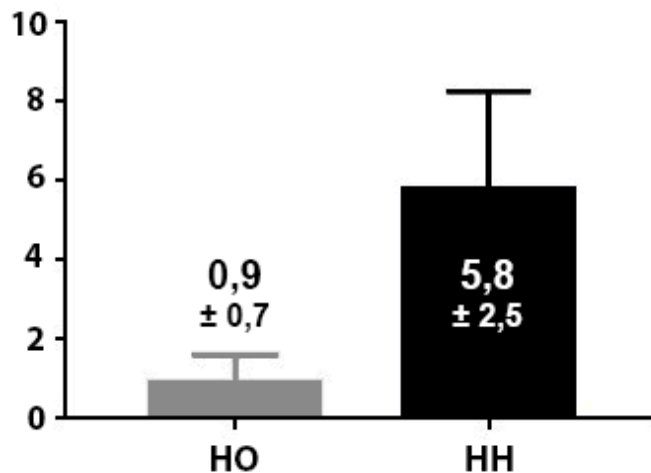
Quando analisados separadamente os animais que apresentaram resposta de salto no teste HH (SLT) e os que não apresentaram (NST), o grupo SLT teve aumento estatisticamente significativo no comportamento de levantamento durante o teste HH em comparação com HAB (de $5,0 \pm 1,5$ na HAB para $12,3 \pm 2,1$ no teste HH) (n=8; teste Wilcoxon; $P=0,03$). Por outro lado, esta mesma comparação não apresentou diferença estatística no grupo NST (de $4,0 \pm 1,2$ na HAB para $8,0 \pm 1,1$ no teste HH) (n=6; teste Wilcoxon; $P=0,09$), conforme figura 7.

Figura 7 – Comparação do comportamento levantamento entre o período de habituação e o período do teste de hipercapnia + hipóxia no grupo de animais que não apresentaram o comportamento salto (NST) (n = 6) e no grupo de animais que apresentaram o comportamento salto (SLT) (n = 8) (n=14). Os dados estão expressos em média \pm EPM. * $P < 0,05$.



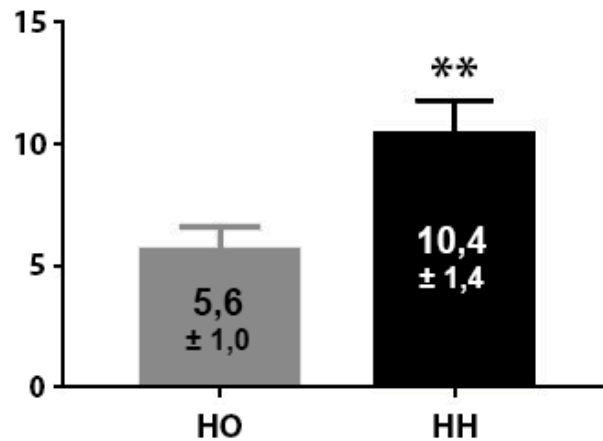
A comparação da resposta de salto entre os testes HO e HH não apresentou diferença estatística significativa ($n=8$ para HO; $n=14$ para HH; teste Mann-Whitney; $P = 0,12$), conforme figura 8. Os animais submetidos ao teste HH apresentaram em média $5,8 \pm 2,5$ saltos, enquanto os animais submetidos ao teste HO apresentaram em média $0,9 \pm 0,7$ saltos. Enquanto 8 dos 14 animais (57%) do grupo HH apresentaram o comportamento de salto, apenas 2 dos 8 (25%) animais do grupo HO apresentaram este comportamento no teste HO. Embora os saltos foram determinados pela perda de contato com o solo das quatro patas simultaneamente independente da altura, também se observou que os animais submetidos ao teste HH realizaram saltos mais altos do que os animais do grupo HO. A concentração de O_2 no teste HH foi de $6,5 \pm 0,0$ %, enquanto no teste HO foi de $6,1 \pm 0,1$.

Figura 8 – Comparação do teste de hipóxia (HO) com o teste de hipercapnia + hipóxia (HH) quanto à frequência do comportamento de salto. Os dados estão expressos em média \pm EPM.



A comparação das respostas apresentadas durante os testes HO e HH demonstram que o comportamento de levantamento ocorre com maior frequência durante o teste HH ($n=8$ para HO; $n=14$ para HH; teste Mann-Whitney; $P = 0,008$). Os animais submetidos ao teste HH apresentaram em média $10,4 \pm 1,4$ levantamentos, enquanto os animais submetidos ao teste HO apresentaram média de $5,6 \pm 1,0$ levantamentos, conforme figura 9.

Figura 9 – Comparação do teste de hipóxia (HO) com o teste de hipercapnia + hipóxia (HH) quanto à frequência do comportamento de levantamento. Os dados estão expressos em média \pm EPM. ** $P < 0,01$.



A figura 10 apresenta as médias do comportamento de salto nos grupos CTRL e LVL durante o teste HH, antes e após a realização de neurocirurgia. Não houve diferença estatística no comportamento de salto quando comparado os períodos antes e após a neurocirurgia em ambos os grupos. O grupo CTRL antes da neurocirurgia apresentou $5,9 \pm 3,9$ saltos e, depois, $4,4 \pm 2,5$ ($n = 7$; teste Wilcoxon; $P = 0,99$). O grupo LVL antes da neurocirurgia apresentou $5,7 \pm 3,4$ levantamentos e, depois, $0,6 \pm 0,6$ ($n = 7$; teste Wilcoxon; $P = 0,06$). Destaca-se que no grupo CTRL, todos os animais que não apresentaram resposta de fuga no primeiro teste também não apresentaram no segundo teste. Assim também, todos os animais que apresentaram resposta de fuga no primeiro teste também apresentaram no segundo teste. Por outro lado, no grupo LVL apenas um animal apresentou resposta de fuga depois da neurocirurgia (com diminuição da resposta), dentre os cinco animais que apresentaram esta resposta no teste realizado antes da neurocirurgia. As concentrações dos gases foram semelhantes nos dois grupos, tanto nos testes realizados antes quanto nos realizados após a neurocirurgia.

A figura 11 apresenta as médias do comportamento de levantamento nos grupos CTRL e LVL durante o teste HH, antes e após a realização de neurocirurgia. Não houve diferença no comportamento de levantamento quando comparado os períodos antes e após a neurocirurgia em ambos os grupos. O grupo CTRL antes da neurocirurgia apresentou $10,3 \pm 1,4$ levantamentos e, depois, $7,6 \pm 1,7$ ($n = 7$; teste

Wilcoxon; $P = 0,44$). O grupo LVL antes da neurocirurgia apresentou $10,6 \pm 2,5$ levantamentos e, depois, $8,9 \pm 2,2$ ($n = 7$; teste Wilcoxon; $P = 0,55$). A histologia, demonstrando a localização das lesões estão expostas na figura 12.

Figura 10 – Comparação da condição pré-neurocirurgia e pós-neurocirurgia no grupo controle (CTRL, $n=7$) e no grupo com lesão na MCPAcvl (LVL, $n=7$) quanto ao comportamento de salto no teste de hipercapnia + hipóxia. Os dados estão expressos em média \pm EPM.

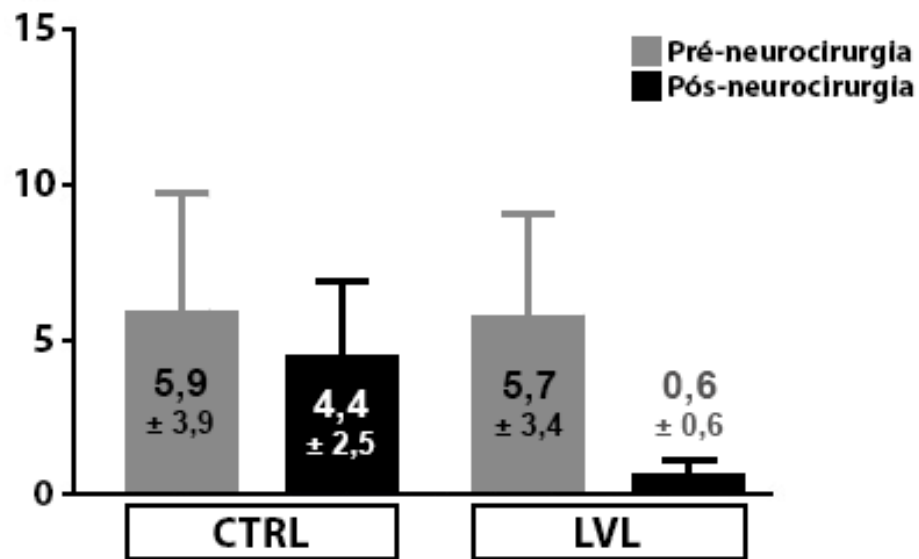


Figura 11 – Comparação da condição pré-neurocirurgia e pós-neurocirurgia no grupo controle (CTRL, $n=7$) e no grupo com lesão na MCPAcvl (LVL, $n=7$) quanto ao comportamento de levantamento no teste de hipercapnia + hipóxia. Os dados estão expressos em média \pm EPM.

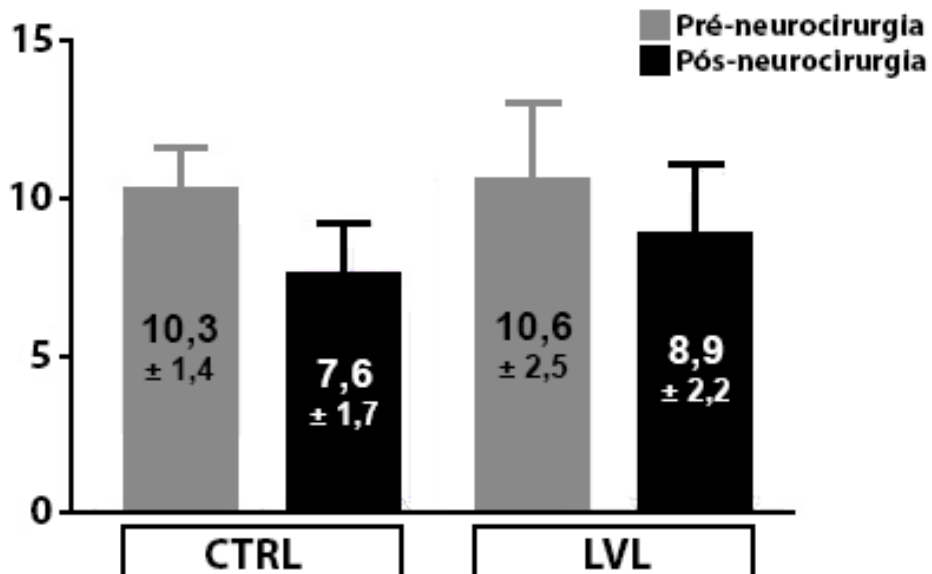
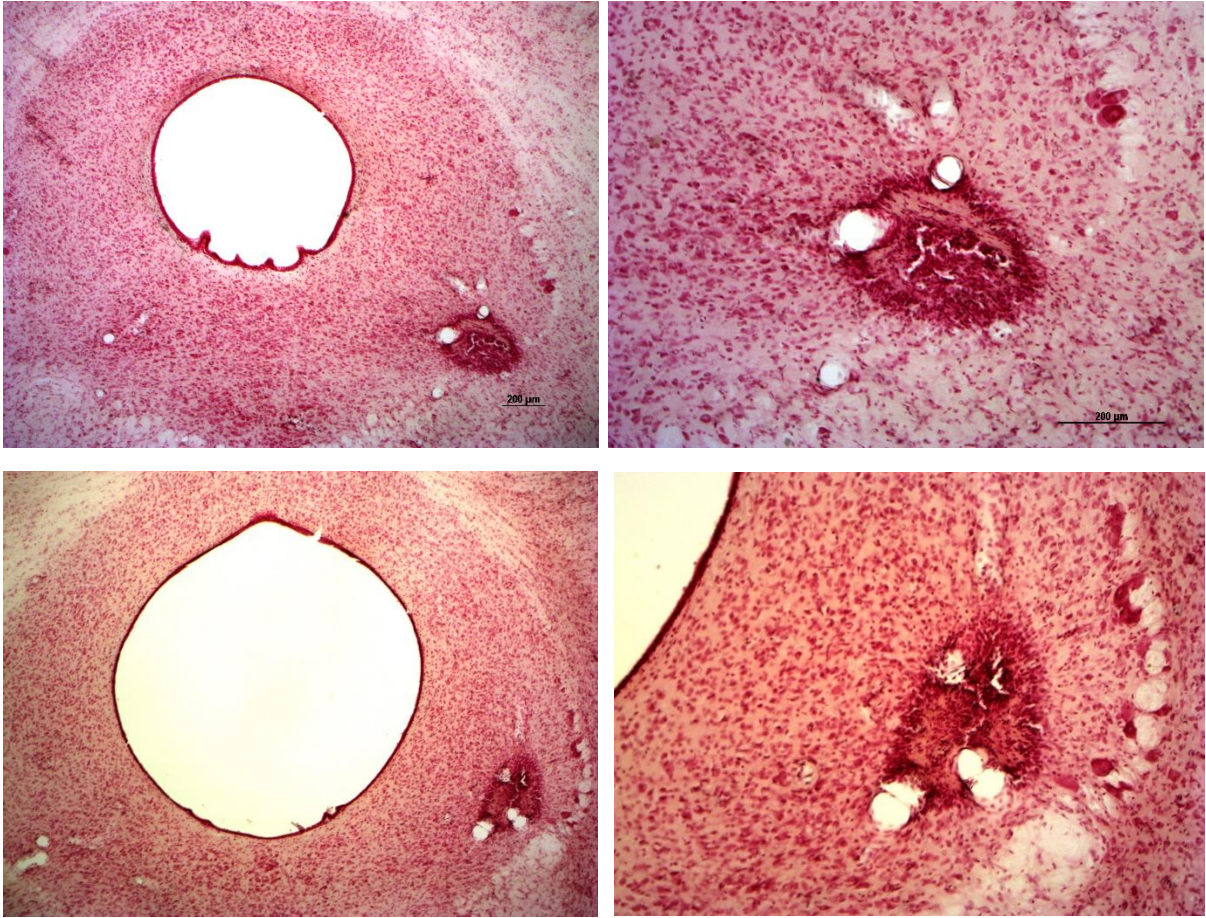


Figura 12 – Histologia de dois animais diferentes demonstrando a microlesão na matéria cinzenta periaquedutal caudoventrolateral.



6 DISCUSSÃO

Klein (1993) apresentou a teoria do alarme falso de sufocamento. Segundo esta teoria, existe um sistema fisiológico de alarme que monitora sinais que indiquem a ocorrência de um sufocamento; e, os APs espontâneos ocorrem quando este monitor é disparado erroneamente, mesmo em uma situação em que não há sufocamento. Esta teoria ampliou a ideia de que os APs ocorriam devido a uma hipersensibilidade ao CO₂. Klein (1993) afirmou que essa ampliação teórica teria suporte se outros indicadores de potencial sufocamento provocassem AP. Nesse sentido, o autor discutiu a ação panicogênica do lactato e como este fenômeno não seria suportado pela hipersensibilidade ao CO₂, mas poderia ser explicado pela teoria do alarme falso de sufocamento. Baseado no fato de que o sufocamento pode ocorrer tanto pela hipercapnia quanto pela hipóxia, Beck, Ohtake e Shipherd (1999) examinaram as respostas de pacientes com TP e pessoas saudáveis em testes de desafio respiratório de hipercapnia (5 % de CO₂) ou de hipóxia (12 % de O₂). Seus resultados mostraram que, além da hipercapnia, a hipóxia também foi capaz de induzir AP em pacientes com TP.

Em modelos animais, respostas comportamentais como trote, galope e saltos são consideradas respostas do tipo pânico (BITTENCOURT et al., 2004; SCHIMITEL et al., 2012, 2014; MÜLLER et al., 2017; SPIACCI JUNIOR et al., 2015, 2018). No entanto, em ratos o CO₂ não produz estas reações, sendo inclusive utilizado em protocolos de eutanásia. Schimitel et al. (2012) e Müller et al. (2017) demonstraram que ratos submetidos à hipercapnia (13 % de CO₂) não apresentaram estas respostas. Apesar de também não encontrarem as respostas comportamentais citadas anteriormente, Hickman et al. (2016) apontam que a exposição de ratos à 20 % de CO₂ levou ao aumento da locomoção, da frequência respiratória e da pressão arterial, enquanto houve diminuição da frequência cardíaca. Após a exposição ao CO₂, também foi identificado o aumento da ansiedade. Por outro lado, a exposição de ratos à 6 % de O₂ levou a breves episódios de corrida rápida, aumento da pressão arterial e a uma resposta bifásica da frequência cardíaca, apresentando taquicardia na fase inicial de aumento da hipóxia e bradicardia quando atingido níveis abaixo de 8 % de O₂ (CASANOVA et al., 2013). Spiacci Junior et al. (2015) apontam que ratos expostos

à 7 % de O₂ em uma câmara de espaço reduzido (25 cm de diâmetro) apresentaram saltos verticais em direção à tampa.

No presente estudo, foi padronizado um teste de HH ($\cong 11,5$ % de CO₂ e 6,5 % de O₂) em uma câmara de espaço reduzido (20 cm de diâmetro). Também realizamos um teste de HO ($\cong 6,1$ % de O₂). Em ambos os testes, identificamos o comportamento de salto vertical; este comportamento não foi observado em nenhum animal durante o período de HAB. Já durante o teste de HO e de HH, alguns animais saltaram enquanto outros não. Durante o teste HO 25 % dos animais apresentaram resposta de salto vertical (frequência média de $0,9 \pm 0,7$ saltos), enquanto durante o teste HH 57 % dos animais apresentaram este comportamento (frequência média de $5,8 \pm 2,5$ saltos). Apesar do teste HH provocar saltos em maior percentual dos animais e em maior frequência, não houve diferença estatística significativa quando comparados os dois testes. Este resultado pode ser atribuído ao fato de os grupos serem formados por todos os animais que foram submetidos aos testes. Sugerimos que novos estudos analisem os animais em subgrupos que saltaram e não saltaram, o que não foi realizado neste estudo devido ao pequeno número de animais submetidos ao teste HO. Contudo, estes resultados tanto confirmaram os resultados obtidos por Casanova et al. (2013) e Spiacci Junior et al. (2015) quanto sugerem que a hipercapnia pode potencializar as respostas do tipo pânico à hipóxia ambiental, o que deve ser confirmado por novos estudos. Esta observação já foi realizada em um modelo de anoxia produzida por infusão intravenosa de KCN (SCHIMITEL et al., 2012). Sendo assim, vai de encontro à proposição de Klein (1993), uma vez que a soma de sinais de sufocamento poderia potencializar a ativação do monitor de sufocamento. Em comparação ao modelo utilizado por Schimitel et al. (2012), o teste HH apresenta a vantagem de não ser necessário a realização de intervenção cirúrgica, nem a utilização de algum agente químico, além de induzir uma resposta de fuga muito vigorosa e facilmente mensurável. Já em comparação ao teste aplicado por Spiacci Junior et al. (2015), tanto o teste HH quanto o teste HO apresentam desvantagem, tendo em vista que nestes testes os animais se dividem em subgrupos que apresentam ou não a resposta de salto vertical, enquanto naquele teste Spiacci Junior et al. (2015) apontam que todos os ratos apresentaram a resposta. No entanto, em nosso laboratório não conseguimos reproduzir este resultado.

Além da corrida, Casanova et al. (2013) também analisaram o levantamento como resposta de fuga, destacando que tal comportamento se assemelha como se o animal estivesse procurando uma saída. Também observamos este comportamento em nosso estudo. Casanova et al. (2013) apontaram que quando o nível de hipóxia estava entre 21% e 13 % de O₂, não foram registrados episódios de levantamento, o que só ocorreu durante hipóxia severa (entre 13 % e 6 % de O₂). Em nosso estudo também ocorreram levantamentos no período de HAB, que pode estar associado à atividade exploratória, no entanto, encontramos um grande aumento da frequência de levantamentos durante o teste HH, com diferença estatística significativa ($P < 0,01$). Contrariamente, Sturman, Germain e Bohacek (2018) demonstraram que o comportamento de levantamento no teste do campo aberto, atribuído à atividade exploratória, foi reduzido pelo estresse agudo. Isto indica que em nosso teste este comportamento pode estar associado à resposta de fuga. É importante destacar que grande parte dos saltos aconteceram em sequência ao levantamento.

Ao separar em subgrupos os animais que apresentaram (SLT) ou não (NST) a resposta de salto, encontramos um aumento significativo da frequência de levantamentos no período do teste HH em comparação com o período de HAB ($P < 0,05$) no subgrupo SLT, o que não ocorreu no subgrupo NST. Este resultado indica que parte dos animais apresenta maior tolerância ao teste HH e/ou adota uma estratégia passiva de enfrentamento a este ambiente aversivo, enquanto outra parte tem menor tolerância e/ou adota uma estratégia ativa. Também encontramos uma maior frequência de levantamentos no teste HH em comparação ao teste HO ($P < 0,05$), o que pode sugerir que o teste HH é mais aversivo ou produz respostas mais intensas do que o teste HO.

Schimitel et al. (2012) sugeriram que o sistema de alarme ao sufocamento está localizado na MCPA. No entanto, os seus dados não permitem inferir o papel das diferentes colunas morfofuncionais. Uma questão conflitante é o efeito contrário do CO₂, inibindo as respostas de fuga à estimulação da MCPAd e potenciando as respostas de fuga à hipóxia química. Com base nestes resultados, é improvável que o monitor de sufocamento se localize MCPAd, apesar de seu papel no AP amplamente conhecido. Por sua vez, análises imunoistoquímicas de expressão da proteína c-Fos realizadas por Müller et al. (2017) demonstraram que a MCPAcvl e a MCPAIt, na sua porção rostral (MCPArlt), foram ativadas especificamente pela hipóxia química

induzida por KCN e, a exposição ao CO₂ ativou a MCPAcvl, mas não ativou a MCPArIt. Ainda, a associação dos estímulos de hipóxia química com a exposição ao CO₂ ativou a MCPAcvl. Estes dados levaram Müller et al. (2017) a sugerirem que a MCPAcvl e a MCPArIt são os principais componentes efetores das respostas iniciais dos APs.

Por outro lado, em modelos de hipóxia ambiental, Casanova et al. (2013) demonstraram que as respostas de corrida eliciadas por este, resultam principalmente da ativação da MCPAlt, além da MCPAdI. No mesmo sentido, Spiacci Junior et al. (2015) mostraram que a resposta de fuga à hipóxia ambiental foi atenuada pela injeção intra-MCPAd de 5-HT, agonista de receptor 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A}. Em conjunto, tanto os modelos de hipóxia química (associada ou não à hipercapnia) quanto os modelos de hipóxia ambiental demonstraram participação da MCPA no desencadeamento das respostas comportamentais. Em conjunto, estes estudos corroboram não só a teoria do alarme falso de sufocamento, mas também a hipótese apresentada por Deakin e Graeff (1991), ao apontarem que os APs ocorriam em decorrência da ativação espontânea do componente de fuga da MCPAd. Uma hipótese que associa a participação da MCPAcvl e da MCPAd nos APs foi apresentada por Johnson, Lightman e Lowry (2004). Estes autores sugeriram que uma subpopulação de neurônios serotoninérgicos localizados na MCPAcvl (onde também se situa a asa lateral do núcleo dorsal da rafe) é a origem da 5-HT endógena que mantém a MCPAd inibida. Interessantemente, Matthiesen, Spiacci Junior e Zangrossi Junior (2017) encontraram respostas de pânico induzidas pela estimulação química desta mesma região.

No presente estudo ratos foram submetidos ao teste HH antes e após realização de neurocirurgia para provocar microlesões na MCPAcvl. Em 80% dos animais do grupo LVL que apresentaram resposta de salto antes da neurocirurgia, a resposta foi abolida após esta. Já no grupo CTRL, todos os animais que apresentaram resposta de salto antes, também apresentaram depois. Ainda, os animais tanto do grupo LVL quanto do grupo CTRL que não saltaram antes da neurocirurgia também não saltaram depois. A comparação da frequência média de saltos antes e depois da neurocirurgia no grupo LVL foi de $5,71 \pm 3,39$ para $0,57 \pm 0,57$ ($P = 0,06$), enquanto no grupo CTRL foi de $5,86 \pm 3,91$ para $4,43 \pm 2,45$ ($P = 0,99$). Apesar de não ser encontrado diferença estatística significativa, acreditamos que um número maior de animais apresentaria esta diferença. Também apontamos para a limitação das lesões

serem unilaterais e não comprometerem toda a região da MCPAcvl; sugerimos que lesões bilaterais da MCPAcvl podem abolir completamente os saltos verticais. novas análises apenas com os animais que saltaram apresentarão esta diferença. Por fim, o fato de alguns animais apresentarem resposta de salto e outros não também pode ter interferido na análise; sendo assim, sugerimos que novos estudos separem estes animais em subgrupos.

Quando comparado o comportamento de levantamento antes e após a neurocirurgia, não foram encontradas diferenças em nenhum dos grupos, sugerindo que tal comportamento não é mediado pela MCPAcvl.

As vantagens deste estudo, quando comparado o modelo experimental de hipercapnia/hipóxia ambiental com o modelo de anóxia química por KCN, é que a hipercapnia e a hipóxia também são utilizados em pesquisas com seres humanos como panicogênicos e não exigem a realização de nenhum procedimento cirúrgico, além de produzir respostas de fuga vigorosas. No presente estudo, as respostas à hipercapnia/hipóxia ambiental também foram mais vigorosas do que no modelo de hipóxia ambiental, porém, este modelo permite conclusões mais específicas, uma vez que utiliza apenas um agente panicogênico.

Em síntese, este estudo contribui para o avanço do conhecimento na área do TP na medida que Schimitel et al. (2012) sugeriram que o sistema de alarme ao sufocamento apresentado por Klein (1993) se localiza na MCPA; os resultados de Müller et al. (2017) especificaram esta localização, indicando a MCPAcvl e MCPArlt, e os resultados do presente estudo sugerem que tal monitor de sufocamento se localiza especificamente na MCPAcvl. Esta proposição não entra em conflito com os demais resultados apresentados acima, tendo em vista que a MCPAcvl pode abrigar diferentes circuitos neurais com funções distintas. Dessa forma, sugerimos que a MCPAcvl é essencial para o disparo do sistema de alarme ao sufocamento que após atingir seu limiar, desencadearia as suas respostas subsequentes mediadas tanto pela MCPAIt quanto pela MCPAdl. Essa proposição apoia a conciliação da teoria apresentada por Klein (1993) com a hipótese apresentada por Deakin e Graeff (1991), como vem sendo apontado por alguns estudos recentes.

7 CONCLUSÃO

O presente estudo traz algumas contribuições para a área de estudos do TP. Entre elas, o desenvolvimento e a padronização de um modelo animal para estudo do TP, que se destaca pelo fato de produzir respostas de fuga vigorosas sem a necessidade de realização de nenhum procedimento anterior com os animais. Estas características permitem boa comparação entre as diferentes intervenções, diminuindo a quantidade de fatores que podem interferir nos resultados. Outra contribuição foi a padronização da aplicação da técnica de iontoforese para realização de microlesões em regiões localizadas das colunas da MCPA, ou em outras regiões. Muitos estudos da área analisam diferentes colunas da MCPA em conjunto; por exemplo, frequentemente as colunas MCPAlt, MCPAdl e MCPAdl são agrupadas como MCPAd. Este agrupamento tem um sentido funcional, mas as vezes é adotado tendo em vista a precisão da técnica utilizada. A técnica utilizada neste estudo permite fazer inferências específicas para cada coluna, permitindo avançar ainda mais nos conhecimentos acerca do TP e da neurofisiologia do mesencéfalo. Destaca-se que tanto o teste quanto a técnica já têm sido aplicados em outros projetos do laboratório.

Por fim, os resultados deste estudo reforçam a teoria do alarme falso de sufocamento e o papel da MCPA na mediação do TP. Apesar de ser amplamente sugerido o papel principal da MCPAd no AP, nossos dados sugerem que o monitor de sufocamento pode estar localizado especificamente na MCPAcvl. Desta forma, sugerimos que a MCPAcvl é responsável por disparar o AP, enquanto a MCPAd é responsável por mediar as respostas subsequentes. Este apontamento pode auxiliar no direcionamento de novas pesquisas que poderão confirmá-lo, ou não, com maior robustez, contribuindo para o esclarecimento dos mecanismos fisiológicos do AP e do TP.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- APA. American Psychiatric Association: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. v. 5th. Arlington, VA: American Psychiatric Association, 2013.
- ARMINI, R. S. et al. In a rat model of panic, corticotropin responses to dorsal periaqueductal gray stimulation depend on physical exertion. **Psychoneuroendocrinology**, v. 53, p. 136-147, 2015.
- BALLENGER, J. C. Comorbidity of panic and depression: implications for clinical management. **Int.Clin.Psychopharmacol**, v. 13, 1998.
- BANDELOW, B.; MICHAELIS, S. Epidemiology of anxiety disorders in the 21st century. **Dialogues Clin. Neurosci.**, v. 17, p. 327-335, 2015.
- BANDLER, R.; DEPAULIS, A. Midbrain periaqueductal gray control of defensive behavior in the cat and rat. In: DEPAULIS, A.; BANDLER, R. **The Midbrain Periaqueductal Gray Matter**. New York: Plenum Press, 1991. p. 175–198.
- BARSKY, A. J. et al. Somatized psychiatric disorder presenting as palpitations. **Arch. Intern. Med.**, v. 156, p. 1102-1108, 1996.
- BATTAGLIA, M. et al. Age at onset of panic disorder: influence of familial liability to the disease and of childhood separation anxiety disorder. **Am. J. Psychiatry**, v. 152, p.1362–1364, 1995.
- BECK, J. G.; OHTAKE, P.J.; SHIPHERD, J. C. Exaggerated anxiety is not unique to CO₂ in panic disorder: a comparison of hypercapnic and hypoxic challenges. **J. Abnorm. Psychol.**, v. 108, p. 473–482, 1999.
- BERNABÉ, C. S. **Efeitos agudos e crônicos da fluoxetina em modelos experimentais de pânico, ansiedade e depressão em ratos adultos submetidos ao isolamento social neonatal**. 2013. 152 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2013.
- BITTENCOURT, A. S. et al. Organization of single components of defensive behaviors within distinct columns of periaqueductal gray matter of the rat: role of N-methyl-D-aspartic acid glutamate receptors. **Neuroscience**, v. 125, p. 71-89, 2004.
- CASANOVA, J. P. et al. Effects of insular cortex inactivation on autonomic and behavioral responses to acute hypoxia in conscious rats. **Behav. Brain Res.**, 253, 60-67, 2013.
- CRASKE, M. G. et al. Paths to panic disorder/agoraphobia: an exploratory analysis from age 3 to 21 in an unselected birth cohort. **J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry**, v. 40, p. 556–563, 2001.
- DEAKIN, J. F. W.; GRAEFF, F.G. 5-HT and mechanisms of defence. **J. Psychopharmacol**, v. 5, p. 305-315, 1991.
- DENG, H.; XIAO, X.; WANG, Z. Periaqueductal gray neuronal activities underlie different aspects of defensive behaviors. **J. Neurosci.**, v. 36, p. 7580-7588, 2016.
- FEINSTEIN, J. S. et al. Fear and panic in humans with bilateral amygdala damage. **Nature Neuroscience**, v. 16, n. 3, p. 270-272, 2013.

- FREUD, S. On the right to separate from neurasthenia a definite symptom-complex as anxiety neurosis. In: BRILL, J. A. A. (ed.). **Selected papers on hysteria and other psychoneuroses**. New York: The Journal of Nervous and Mental Disease Publishing Company; cap. 6, p. 133-154, 1912.
- FUJIWARA, A. et al. Midbrain volume increase in patients with panic disorder. **Psychiatry Clin. Neurosci.**, v. 65, p. 365–373, 2011.
- GOODWIN, R. D.; EATON, W. W. Asthma and the risk of panic attacks among adults in the community. **Psychol. Med.**, v. 33, p. 879–885, 2003.
- GOODWIN, R. D. et al. Prevalence of probable mental disorders among pediatric asthma patients in an inner-city clinic. **Journal of Asthma**, v. 42, p. 643–647, 2005.
- GORMAN, J. M. et al. Sodium D-lactate infusion of panic disorder patients. **Neuropsychopharmacology**, v. 3, p. 181-189, 1990.
- GRAEFF, F. G. Translational approach to the pathophysiology of panic disorder: Focus on serotonin and endogenous opioids. **Neurosci.Biobehav.Rev.**, v. 76, p. 48-55, 2017.
- HICKMAN, D. L. et al. Evaluation of low versus high volume per minute displacement CO₂ methods of euthanasia in the induction and duration of panic-associated behavior and physiology. **Animals**, v. 6, n. 45, 2016.
- HOLLANDER, E. et al. Cortisol and sodium lactate-induced panic. **Arch.Gen.Psychiatry**, v. 46, p. 135-140, 1989.
- HYMAN, S. E.; COHEN, J. D. Disorders of mood and anxiety. In: KANDEL, E. R. et al. (ed.). **Principles of neural science**. 5 ed. McGraw-Hill, cap. 63, p. 1402-1024, 2013.
- JOHNSON, P. L.; LIGHTMAN, S. L.; LOWRY, C. A. 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.**, v. 1018, p. 58–64, 2004.
- KARAJGI, B. et al. The prevalence of anxiety disorders in patients with chronic obstructive pulmonary disease. **Am J Psychiatry**, v. 147, p. 200–201, 1990.
- KATHOL, R. G. et al. Direct comparison of urinary free cortisol excretion in patients with depression and panic disorder. **Biol. Psychiatry**, v. 25, p. 873-878, 1989.
- KEAY, K. A.; BANDLER, R. Periaqueductal Gray. In: PAXINOS, G. (Org.). **The Rat Nervous System**. 4 ed., San Diego: Elsevier, cap. 10, p. 207-221, 2015.
- KEYL, P. M.; EATON, W. W. Risk factors for the onset of panic disorder and other panic attacks in a prospective, population-based study. **Am. J. Epidemiol.**, v. 131, n. 2, p. 301-311, 1990.
- KESSLER, R. C. et al. Prevalence, severity, and comorbidity of 12-month DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. **Arch Gen Psychiatry**, v. 62, n. 6, p. 617-627, 2005.
- KESSLER, R. C. et al. The epidemiology of panic attacks, panic disorder, and agoraphobia in the national comorbidity survey replication. **Arch. Gen. Psychiatry**, v. 63, p. 415-424, 2006.
- KLEIN, D. F. False suffocation alarms, spontaneous panics, and related conditions. An integrative hypothesis. **Arch. Gen. Psychiatry**, v. 50, p. 306-317, 1993.

- Klein, R. G. (1995) Is panic disorder associated with childhood separation anxiety disorder? **Clin. Neuropharmac.**, v.18, 1995.
- LIEBOWITZ, M. R. et al. Lactate provocation of panic attacks, II: biochemical and physiological findings. **Arch. Gen. Psychiatry**, v. 42, p. 709-719, 1985.
- MATTHIESEN, M.; SPIACCI JUNIOR, A.; ZANGROSSI JUNIOR, H. Effects of chemical stimulation of the lateral wings of the dorsal raphe nucleus on panic-like defensive behaviors and Fos protein expression in rats. **Behav. Brain Res.**, v. 326, p. 103-111, 2017.
- MERIKANGAS, K. R. et al. Lifetime prevalence of mental disorders in U.S. adolescents: results from the National Comorbidity Survey Replication--Adolescent Supplement (NCS-A). **J. Am. Acad. Child. Adolesc. Psychiatry**, v. 49, n. 10, p. 980-989, 2010.
- METZLER, D. H.; MAHONEY, D.; FREEDY, J. R. Anxiety disorders in primary care. **Prim. Care Clin. Office Pract.**, v. 43, p. 245–261, 2016.
- MOBBS, D. et al. When fear is near: threat imminence elicits prefrontal-periaqueductal gray shifts in humans. **Science**, n. 317, p. 1079-1083, 2007.
- MÜLLER, C. J. T. et al. On the verge of a respiratory-type panic attack: selective activations of rostromedial and caudomedial periaqueductal gray matter following short-lasting escape to a low dose of potassium cyanide. **Neuroscience**, n. 348, p. 228-240, 2017.
- PAXINOS, G.; WATSON, C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates**. San Diego: Academic Press, 1998.
- PERNA, G. et al. Asthma and panic attacks. **Biol. Psychiatry**, v. 42, p. 625–630, 1997.
- PRETER, M.; KLEIN, D. F. Panic, suffocation false alarms, separation anxiety and endogenous opioids. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**, v. 32, p. 603-612, 2008.
- PRETER, M.; KLEIN, D. F. Lifelong opioidergic vulnerability through early life separation: A recent extension of the false suffocation alarm theory of panic disorder. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 46, p. 345-351, 2014.
- PROTOPODESCU, X. et al. Increased brainstem volume in panic disorder: a voxel-based morphometric study. **Neuroreport**, v. 17, n. 4, p. 361–363, 2006.
- QUINTINO-DOS-SANTOS et al. Evidence that the periaqueductal gray matter mediates the facilitation of panic-like reactions in neonatally-isolated adult rats. **Plos One**, v. 9, n. 3, 2014.
- ROBERSON-NAY, R. et al. Childhood separation anxiety disorder and adult onset panic attacks share a common genetic diathesis. **Depress. Anxiety**, v. 29, p. 320-327, 2012.
- ROBERSON-NAY, R.; LATENDRESSE, S. J.; KENDLER, K. S. A latent class approach to the external validation of respiratory and non-respiratory panic subtypes. **Psychol. Med.**, v. 42, p. 461-474, 2012.
- RUIZ-TORNER, A. et al. The chemical architecture of the rat's periaqueductal gray based on acetylcholinesterase histochemistry: a quantitative and qualitative study. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 21, p. 295–312, 2001.

- SCHIMITEL, F. G. et al. Evidence of a suffocation alarm system within the periaqueductal gray matter of the rat. **Neuroscience**, v. 200, p. 59-73, 2012.
- SCHIMITEL, F. G. et al. Evidence of a suffocation alarm system sensitive to clinically-effective treatments with the panicolytics clonazepam and fluoxetine. **J. Psychopharm.**, v. 28, p. 1184-1188, 2014.
- SHAVITT, R. G.; GENTIL, V.; MANDETTA, R. The association of panic/agoraphobia and asthma. Contributing factors and clinical implications. **Gen. Hosp. Psychiatry**, v. 14, p. 420-423, 1992.
- SIESJO, B. K. et al. Brain dysfunction in cerebral hypoxia and ischemia. In: Plum, F. (ed.). **Brain Dysfunction in Metabolic Disorders**. New York: Raven Press; p. 75-112, 1974.
- SINHA, S. S. et al. Panic induced by carbon dioxide inhalation and lack of hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation. **Psychiatry Res.**, v. 86, n. 2, p. 93-98, 1999.
- SPIACCI JUNIOR, A. et al. Serotonin in the dorsal periaqueductal gray inhibits panic-like defensive behaviors in rats exposed to acute hypoxia. **Neuroscience**, v. 307, p. 191-198, 2015.
- SPIACCI JUNIOR, A. et al. Panic-like escape response elicited in mice by exposure to CO₂, but not hypoxia. **Prog. Neuropsychopharmacol Biol. Psychiatry**, v. 81, p. 178-186, 2018.
- STURMAN, O.; GERMAIN, P.; BOHACEK, J. Exploratory rearing: a context- and stress-sensitive behavior recorded in the open-field test. **Stress**, v. 21, n. 5, p. 443-452, 2018.
- SUBRAMANIAN, H. H.; BALNAVE, R. J.; HOLSTEGE, G. The midbrain periaqueductal gray control of respiration. **J. Neurosci.**, v. 28, n. 47, p. 12274-12283, 2008.
- TOVOTE, P. et al. Midbrain circuits for defensive behaviour. **Nature**, v. 534, p. 206–212, 2016.
- UCHIDA, R. R. et al. Regional grey matter abnormalities in panic disorder: a voxel-based morphometry study. **Psychiatry Res. Neuroimaging**, v. 163, p. 21–29, 2008.
- UHDE, T. W. et al. Normal urinary free cortisol and plasma MHPG in panic disorder: clinical and theoretical implications. **Biol. Psychiatry**, v. 23, p. 575-585, 1988.
- VERBURG, K. Respiratory disorders as a possible predisposing factor for panic disorder. **Journal of Affective Disorders**, v. 33, p. 129-134, 1995.
- VON KORFF, M. R.; EATON, W. W.; KEYL, P. M. The epidemiology of panic attacks and panic disorder: results of three community surveys. **American Journal of Epidemiology**, v. 122, n. 6, 1985.
- WOODS, S. W. et al. Carbon dioxide-induced anxiety; behavioral, physiologic, and biochemical effects of carbon dioxide in patients with panic disorders and healthy subjects. **Arch. Gen. Psychiatry**, v. 45, p. 43-52, 1988.
- WHO. World Health Organization: **Depression and other common mental disorders: Global Health Estimates** [Internet]. 2017.

YELLOWLEES, P. M. et al. Psychiatric morbidity in patients with chronic airflow obstruction. **Med. J. Aust.**, v. 146, p. 305-307, 1987.

YELLOWLEES, P. M. et al. Psychiatric morbidity in patients with life-threatening asthma: initial report of a controlled study. **Med. J. Aust.**, v. 149, p. 246-249, 1988.

YINGLING, K. W. et al. Estimated prevalences of panic disorder and depression among consecutive patients seen in an emergency department with acute chest pain. **J. Gen. Intern. Med.**, v. 8, p. 231-235, 1993.