

**VICTOR PASCHOAL MARQUEZIN NICOLLI SOARES**

**O papel do sistema orexinérgico no córtex pré-frontal medial na  
expressão de comportamentos relacionados ao medo inato e à ansiedade**

**ASSIS**

**2021**

**VICTOR PASCHOAL MARQUEZIN NICOLLI SOARES**

**O papel do sistema orexinérgico no córtex pré-frontal medial na expressão de comportamentos relacionados ao medo inato e à ansiedade**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências e Letras de Assis, para o Exame Geral de Qualificação, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biociências (Área de conhecimento: Caracterização e Aplicação da Diversidade Biológica)

Orientador: Prof. Dr. Rafael Carvalho Almada

Bolsista: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

**ASSIS**

**2021**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
(CIP) Ana Cláudia Inocente Garcia - CRB 8/6887

S676p Soares, Victor Paschoal Marquezin Nicolli  
O papel do sistema orexinérgico no córtex pré-frontal  
medial na expressão de comportamentos relacionados  
ao medo inato e à ansiedade / Victor Paschoal  
Marquezin Nicolli Soares. Assis, 2021.  
107 p. : il.

Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual  
Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências e Letras, Assis  
Orientador: Prof. Dr. Rafael Carvalho Almada

1. Neurofisiologia. 2. Córtex pré-frontal medial.  
3. Ansiedade. 4. Medo. 5. Sistema orexinérgico. I. Título.

CDD 612.8



**ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE VICTOR PASCHOAL MARQUEZIN NICOLLI SOARES, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS, DA FACULDADE DE CIÊNCIAS E LETRAS - CÂMPUS DE ASSIS.**

Aos 08 dias do mês de outubro do ano de 2021, às 14:00 horas, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de VICTOR PASCHOAL MARQUEZIN NICOLLI SOARES, intitulada **O papel do sistema orexinérgico no córtex pré-frontal medial na expressão de comportamentos relacionados ao medo inato e à ansiedade**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. RAFAEL CARVALHO ALMADA (Orientador(a) - Participação Virtual) do(a) Departamento de Ciências Biológicas / UNESP/FCL-Assis, Prof. Dr. NORBERTO CYSNE COIMBRA (Participação Virtual) da Faculdade de Medicina / USP/Ribeirão Preto, Profa. Dra. TELMA GONÇALVES CARNEIRO SPERA DE ANDRADE (Participação Virtual) do Departamento de Ciências Biológicas / UNESP/FCL-Assis. Após a exposição pelo mestrando e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, o discente recebeu o conceito final: APROVADO. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.



Prof. Dr. RAFAEL CARVALHO ALMADA

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço imensamente aos meus pais, Tatiane Andrea e Jorge Nicolli, por viabilizar, de todas as maneiras dentro do possível, a realização deste trabalho e pelo grande apoio, em vários âmbitos, ao longo da minha carreira acadêmica.

Aos meus grandes orientadores, Rafael Carvalho Almada e Telma Gonçalves Carneiro Spera de Andrade, por compartilhar comigo um pouco do amplo conhecimento que possuem. Certamente, por diversas razões, não seria possível o término deste trabalho sem o apoio destes grandes amigos.

À minha querida companheira para todos os momentos, Flávia Freddi Rodriguez, que em momentos de bom ou mal agouros esteve do meu lado para me guiar.

É com propriedade que afirmo que sem a presença de vocês jamais concluiria este trabalho.

Às agências de fomento, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro no período empreendido deste trabalho. No início obtive o auxílio de Treinamento Técnico (processo FAPESP: 2019/15757-6) vinculado ao programa Jovem Pesquisador de meu querido orientador e, posteriormente, o trabalho foi realizado com apoio da CAPES - Código de Financiamento 001.

Por fim, à todos aqueles que influenciaram de alguma maneira para a realização deste trabalho que culminou em um artigo publicado em uma excelente revista acadêmica.

SOARES, VPMN. **O papel do sistema orexinérgico no córtex pré-frontal medial na expressão de comportamentos relacionados ao medo inato e à ansiedade**. 2021. 112p. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Faculdade de Ciências e Letras, Assis, 2021.

## RESUMO

A habilidade para distinguir entre estímulos aversivos (repulsores), neutros e apetitivos (atratores) é essencial para a sobrevivência. Projeções de neurônios orexinérgicos do hipotálamo para estruturas límbicas, como aquelas para diferentes regiões da parte rostromedial do lobo frontal (mPFC, do inglês *medial prefrontal cortex*), sugerem que os mecanismos orexinérgicos no córtex pré-límbico (PL), uma sub-região do mPFC, estão envolvidos no processamento do medo e da ansiedade. Investigou-se o papel de receptores orexinérgicos do tipo 1 (OX<sub>1</sub>R) e do tipo 2 (OX<sub>2</sub>R) no PL, nessas emoções, a partir do confronto entre camundongos e um besouro-robô com movimentos erráticos. O bloqueio seletivo de OX<sub>1</sub>R e OX<sub>2</sub>R no PL com SB 334867 (3, 30, 300 NM) e TCS OX2 29 (3, 30, 300 NM), respectivamente, não alterou nem o comportamento exploratório, nem a expressão dos comportamentos defensivos, tais como a esquiva, salto ou imobilidade defensiva (*freezing*), mas aumentou significativamente os comportamentos de aproximação e tolerância na maior dose testada (300 NM) em uma arena de maior tamanho. Estes dados podem ser interpretados como evidência de uma avaliação cognitiva alterada do estímulo ameaçador. Conseqüentemente, o sistema orexinérgico parece estar relacionado com a percepção do estímulo frente ao perigo e a ameaças via OX<sub>1</sub>R e OX<sub>2</sub>R.

Palavras-chave: Córtex “pré-frontal” medial; medo; *beetle mania task*; sistema orexinérgico

SOARES, VPMN. ***The role of orexinergic system in the medial prefrontal cortex on the expression of behaviors related to innate fear and anxiety.*** 2021. 112p. Dissertation (Master in Biosciences) – São Paulo State University (UNESP), School of Sciences, Humanities and Literature, Assis, 2021.

### **ABSTRACT**

*The ability to distinguish between threatening (repulsors), neutral and appetitive stimuli (attractors) stimuli is essential for survival. The orexinergic neurons of hypothalamus projecting to the limbic structures, such as different subregions of medial prefrontal cortex (mPFC), suggests that the orexinergic mechanism in the prelimbic cortex (PL), a subregion of mPFC, is involved in the processing of fear and anxiety. We investigated the role of orexin receptors type 1 (OX<sub>1</sub>R) and type 2 (OX<sub>2</sub>R) in the PL for such processes upon confrontation with an erratically moving robo-beetle in mice. Selective blockade of OX<sub>1</sub>R and OX<sub>2</sub>R in the PL with SB 334867 (3, 30, 300 NM) and TCS OX2 29 (3, 30, 300 NM), respectively, did not affect general exploratory behavior or reactive fear such as avoidance, jumping or freezing, but significantly enhanced tolerance and approach behavior at the highest dose tested (300 NM) at a large arena. We interpreted these findings as evidence for an altered cognitive appraisal of the threatening stimulus. Consequently, the orexin system seems to bias the perception of stimuli towards danger or threat via OX<sub>1</sub>R and OX<sub>2</sub>R in the PL.*

**Keywords:** *Medial prefrontal cortex; fear; beetle mania task; orexinergic system.*



## LISTA DE SIGLAS

5HT - Serotonina

A - Adrenalina

AC – Córtex da Divisão Anterior do Giro do Cíngulo

ac – Comissura Anterior

ACx – Córtex Auditivo

AH – Núcleo Hipotalâmico Anterior

AIAd – Área Insular Granular Dorsal

AIAv - Área Insular Granular Ventral

AOS – Sistema Olfatório Acessório

ATN – Núcleo Talâmico Anterior

BAS – Sistema Comportamental de Aproximação

BIS – Sistema Comportamental de Inibição

BLA – Núcleo Basolateral do Complexo Amigdalóide

BMA – Núcleo Basomedial do Complexo Amigdalóide

BNST – Núcleo do Leito da Estria Terminal

CA1/CA2/CA3 – Regiões Anatômicas do Hipocampo

Cg1/Cg2/Cg3 – Regiões Anatômicas do Giro do Cíngulo

CoA – Núcleo Cortical do Complexo Amigdalóide

CPc – Área Pré-Central

CRH – Hormônio Liberador de Corticotrofina

DA – Dopamina

DG – Giro Dentado

DMH – Hipotálamo Dorsomedial do Hipotálamo

DMX – Núcleo Motor Dorsal do Nervo Vago

DRN – Núcleo Dorsal da Rafe

FFFS – Sistema Comportamental de Fuga, Esquiva e Imobilidade Defensiva (“Congelamento”)

GABA – Ácido Gama-Aminobutírico

HA – Histamina

HPC – Formação hipocampal  
IC – Colículo Inferior  
IL – Córtex Infra-Límbico  
KF – Núcleo Kölliker-Fuse  
LC – *Locus Coeruleus*  
LCE – Labirinto em cruz elevado  
LD – Núcleo Talâmico Dorso-Lateral  
LH – Hipotálamo Lateral  
LO – Córtex “Pré-Frontal” Orbital Lateral  
LP – Núcleo Posterior Lateral do Tálamo  
MEA – Núcleo Medial do Complexo Amigdalóide  
MHDS – Sistema de Defesa do Hipotálamo Medial  
MMB - Corpos Mamilares  
MO – Córtex “Pré-Frontal” Orbital Medial  
MOS – Sistema Olfatório Central  
MRN – Núcleo Mediano da Rafe  
nACSh – Núcleo *Accumbens Shell*  
OB – Bulbo Olfatório  
OAB – Bulbo Olfatório Acessório  
OXR - Orexina  
OX<sub>1</sub>R – Receptor Orexinérgico do Tipo 1  
OX<sub>2</sub>R – Receptor Orexinérgico do Tipo 2  
PARAHPC – Giro Para-hipocampal  
PAG - Substância Cinzenta Periaquedutal  
dPAG – Substância Cinzenta Periaquedutal Dorsal  
PBN – Núcleo Parabraquial  
pc – Comissura Posterior  
PFA – Área Perifornical  
PFC – Córtex “Pré-Frontal”  
mPFC - Córtex “Pré-Frontal” Medial

vmPFC – Córtex “Pré-Frontal” Ventro-Medial  
PFCo – Córtex “Pré-Frontal” Orbital  
PL – Córtex Pré-Límbico  
PMD – Núcleo Pré-Mamilar Dorsal  
PTSD – Transtorno de Estresse Pós-Traumático  
PVN – Núcleo Paraventricular do Hipotálamo  
PVT – Núcleo Paraventricular do Tálamo  
REM – *Rapid-Eye Movement*  
RGC – Células Ganglionares da Retina  
mRNA – RNA Mensageiro  
RPa – Núcleo Pálido da Rafe  
RSC – Córtex Retrospleanial  
RVLM –Rostro Ventro-Lateral Medulla Oblongata  
SARA – Sistema Ativador Reticular Ascendente  
SC – Colículo Superior  
S.E.M – Erro Padrão da Média  
SN – Substância Negra  
SUB – *Subiculum*  
SPS – Estresse Único Prolongado  
SSRI - Inibidor Seletivo de Recaptação de Serotonina  
TAG – Transtorno de Ansiedade Generalizada  
TMN – Núcleo Túbero-Mamilar  
TMT – (2,5-di-hidro-2,4,5-trimethylthiazoline)  
TP – Transtorno do Pânico  
nTS – Núcleo do Trato Solitário  
Veh - Veículo  
VMHdm – Núcleo Dorso-Medial do Hipotálamo Ventro-Medial  
VLO – Córtex “Pré-Frontal” Orbital Ventro-Lateral  
VNO – Órgão Vômero-nasal  
VO – Córtex “Pré-Frontal” Ventral

VTA – Área Tegmental Ventral

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática da hipótese da iminência da Ameaça .....	22
Figura 2	Representação esquemática dos circuitos neurais do medo Inato .....	26
Figura 3	Ilustração esquemática do encéfalo em três direções, evidenciando o circuito de Papez e suas conexões .....	35
Figura 4	Ilustração da seção sagital do encéfalo do rato demonstrando as vias de aferência de neurônios orexinérgicos com a expressão de mRNA de receptores orexinérgicos nas regiões-alvo das aferências e a afinidade da orexina A e orexina B com seus respectivos receptores .....	38
Figura 5	Ilustração da seção sagital do encéfalo de camundongo ressaltando a área anatômica estudada recebendo projeções de neurônios orexinérgicos do hipotálamo lateral .....	46

## ARTIGO

Figura 1	<i>Methodological procedure of the behavioral test BMT</i> .....	66
Figura 2	Histological verification of the injection sites .....	68
Figura 3	<i>Effects of sb 334867 injections in the PL upon confrontation with the robo-beetle in the arena</i> .....	70
Figura 04	<i>Effects of sb 334867 injections in the PL upon confrontation with the robo-beetle in the minor arena</i> .....	71
Figura 05	<i>Effects of TCS OX2 29 injections in the PL upon confrontation with the robo-beetle in the large arena</i> .....	73
Figura 06	<i>Effects of TCS OX2 29 injections in the PL upon confrontation with the robo-beetle in the minor arena</i> .....	74

## ANEXO 1

Figura 1 Efeitos da administração de SB 334867 (3, 30, 300 nM) e TCS OX2 29 (3, 30, 300 nM) no PL em animais submetidos ao LCE após o teste de restrição motora por 4h ..... 94

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	<i>Exploratory behavior during the 5-min habituation phase</i> .....	69
----------	--	----



## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	19
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	47
<b>ARTIGO - Orexin 1 and 2 receptors in the prelimbic cortex</b>	
<i>Modulate threat valuation</i> .....	57
<b>Abstract</b> .....	59
<b>Introduction</b> .....	60
<b>Material and Methods</b> .....	63
<i>Animals</i> .....	63
<i>Stereotaxic surgery</i> .....	63
<i>Drugs and Injections</i> .....	64
<i>Beetle Mania Task (BMT)</i> .....	64
<i>Histology</i> .....	67
<i>Statistics</i> .....	67
<b>Results</b> .....	68
<i>Experiment 1.1: OX<sub>1</sub>R antagonist in the PL reduces threat valuation in the large arena</i> .....	68
<i>Experiment 1.2: OX<sub>1</sub>R antagonist in the PL does not modulates defensive behaviors in the minor arena</i> .....	70
<i>Experiment 2.1: OX<sub>2</sub>R antagonist in the PL reduces threat valuation in the large arena</i> .....	72
<i>Experiment 2.2: OX<sub>2</sub>R antagonist in the PL does not modulates defensive behaviors in the minor arena</i> .....	73
<b>Discussion</b> .....	75
<b>Funding</b> .....	79

<b><i>Compliance with Ethical Standards</i></b> .....	79
<b><i>Conflict of Interest</i></b> .....	79
<b><i>Reference</i></b> .....	80
<b>ANEXO I</b> – Influência de receptores orexinérgicos no córtex pré-frontal na expressão de comportamentos relacionados à ansiedade .....	86
<b>ANEXO II</b> – Artigo publicado na <i>Neuroscience</i> .....	102
<b>ANEXO III</b> – Parecer da comissão de ética no uso de Animais (CEUA) .....	112

# INTRODUÇÃO

## 1. Prólogo

A fim de se preservar o aspecto inestimável a todos os organismos vivos, a vida, os animais desenvolveram comportamentos defensivos que foram moldados a partir de pressões ambientais e que usualmente permeiam emoções, como o medo e a ansiedade, frente ao perigo ao bem-estar animal que o mundo natural apresenta, o que se reflete na diversidade da pressão exercida por predadores e ataques de animais coespecíficos.

Proposto por Darwin (1872) em seu livro “A expressão das emoções nos homens e animais”, comportamentos defensivos refletem estados emocionais internos de animais, pelo menos em mamíferos. Estados estes que subjetivamente são percebidos por seres humanos como medo ou ansiedade (LE DOUX, 2012).

O medo e a ansiedade frequentemente estão correlacionados à presença de uma ameaça (GRAEFF, 2007) e são responsáveis por eliciar respostas comportamentais defensivas que permitem que organismos reduzam o nível da ameaça e, assim, aumentem as chances de sobrevivência (BLANCHARD e BLANCHARD, 1988) uma vez que animais silvestres e seres humanos detectam e respondem mais rapidamente a estímulos ameaçadores do que não ameaçadores no mundo natural (REN e TAO, 2020).

De acordo com Blanchard e Blanchard (1988), o medo é associado a uma estratégia defensiva frente a um perigo real (situação em que a ameaça está presente), enquanto que a ansiedade se associa com um comportamento de avaliação de risco que pode ser evocado por ameaças de caráter circunstancial,

potencial e antecipatória. Sendo assim, são emoções fundamentais à sobrevivência dos diversos organismos, incluindo a dos seres humanos, uma vez que os preparam para enfrentar situações de perigo e ameaças, o que pode ser crucial para a manutenção da vida.

No entanto, em linhas gerais, tais comportamentos podem ser mal adaptativos na medida em que são expressos em situações em que não há uma demanda ambiental ou contextual para a proteção do organismo, ocasionando, assim, no ser humano, uma diminuição da qualidade de vida e, subsequentemente o estabelecimento de um potencial gatilho para o desenvolvimento de transtornos psiquiátricos como, por exemplo, o transtorno de ansiedade generalizada (TAG) e o transtorno do pânico (TP). Diante disso, os estudos acerca das bases biológicas dos comportamentos defensivos são um importante processo de estabelecimento dos possíveis caminhos para o tratamento de alguns transtornos psiquiátricos.

## **2. Aspectos evolutivos dos comportamentos defensivos**

O caráter contínuo da evolução e as teorias evolucionistas, ressaltam-se aqui as teorias de Charles Darwin e Lamarck (1859 e 1809, respectivamente), dão-nos a concepção de que comportamentos defensivos que emergiram em organismos mais basais no fluxo da história evolutiva conservaram-se em organismos mais recentes que partilham de uma mesma filogenia.

Não obstante, quando se analisa o centro controlador de comportamentos sob a óptica da evolução, o sistema nervoso, não há como não assentir que o cérebro também não seja fruto de mudanças graduais esculpidas por pressões ambientais. De fato, compartilhamos de estruturas neurais filéticas com outros

animais e, como consequência natural, comportamentos de defesa (WEICKENMEIER et al., 2018; CROXSON et al., 2017; HELFRICH-FÖRSTER, 2004).

Proposta por Fanselow e Lester (1988), a hipótese da iminência da ameaça sugere quais comportamentos defensivos serão elencados em situação da iminência da predação baseada na proximidade espacial da ameaça (figura 1). Na medida em que a ameaça se torna cada vez mais proximal, diferentes estados emocionais e comportamentos são evocados.

Se a ameaça é próxima, o animal utiliza de determinados comportamentos com objetivo de maximizar sua sobrevivência como visto pelo comportamento de imobilidade defensiva ou “congelamento” (o animal permanece imóvel na crença de que não será notado pela ameaça), fuga e esquiva, comportamentos relacionados ao afastamento do animal em relação à ameaça, esta real ou ausente de perigo real, respectivamente (BLANCHARD e BLANCHARD, 1988). Tais comportamentos defensivos caracterizam respostas comportamentais relacionadas ao medo (MOBBS et al., 2020). Em suma, constata-se estado de pânico do animal, quando este apresenta imobilidade defensiva e/ou fuga (COIMBRA et al., 2017) frente ao ataque por exemplo de um predador. O comportamento de fuga explosivo, não mais direcionado e sim errático, de maneira que não se vê mais uma estratégia comportamental defensiva tem sido também considerado um ataque de pânico (Almada et al., 2021). De fato, p.ex., pinguins de Humboldt são conhecidos por suas reações de medo frente a seres humanos e, em algumas ocasiões, fogem erraticamente em pânico rumo à morte por se ferirem em acidentes geográficos da região; FOWLER, 1999).

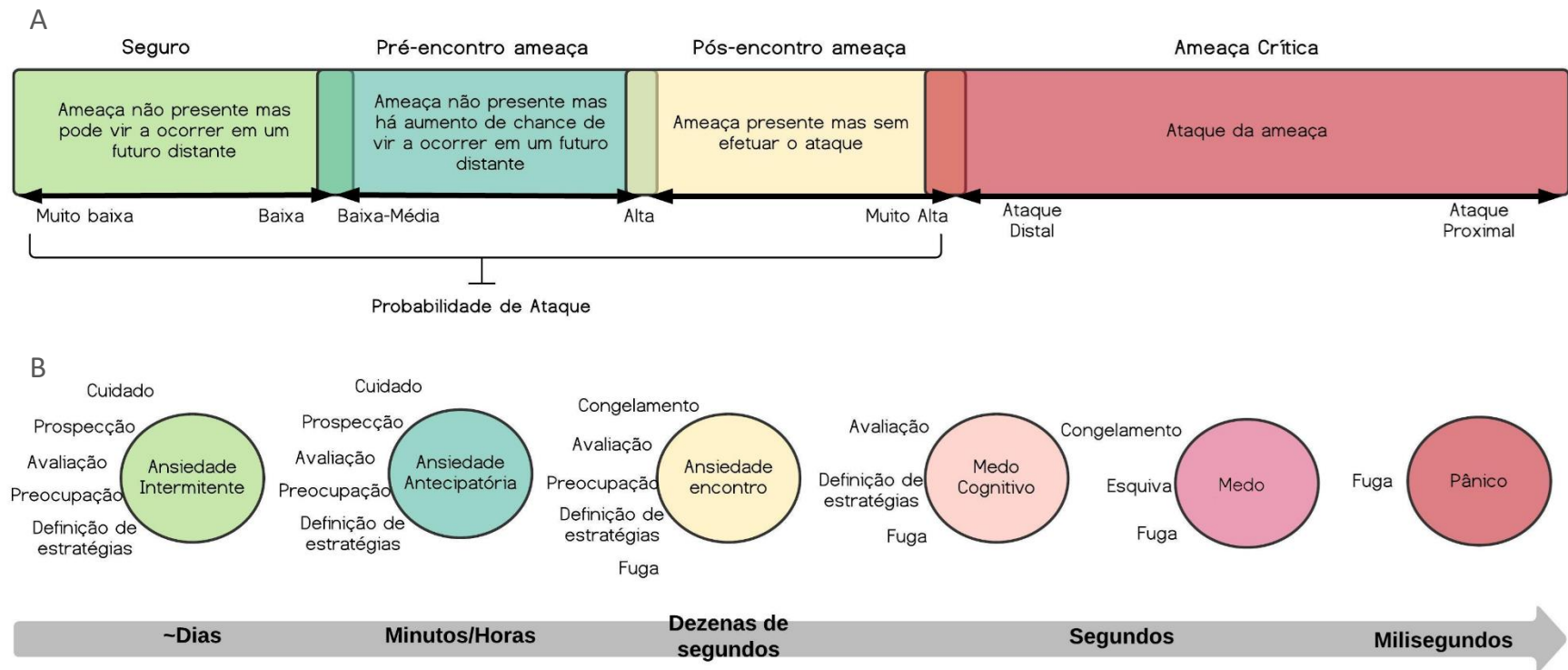


Fig. 1. Representação esquemática da hipótese da iminência da ameaça proposta por Fanselow e Lester (1988) correlacionando a probabilidade de ataque da ameaça (A) com seus respectivos comportamentos defensivos evocados pela proximidade espacial da ameaça e seus estados emocionais (B). Adaptado de Mobbs et al., 2020.

### **3. Circuitos neurais dos comportamentos defensivos**

Blanchard e Blanchard (1989) caracterizam esses comportamentos defensivos como não dependentes de uma experiência prévia do prejuízo do animal em relação à ameaça, logo, sendo independentes de um processo de aprendizado do perigo, da ameaça e, portanto, como comportamentos do medo inato, o qual teria o encéfalo como centro controlador e integrador.

O encéfalo processa diversos tipos de comportamentos, não apenas comportamentos motores essenciais à manutenção da vida, como andar, comer e fugir, mas, também todos os tipos de comportamentos e atos cognitivos complexos, como o pensamento, memória, emoções e estímulos sensoriais.

Para se compreender a maneira pela qual estímulos sensoriais estão vinculados a comportamentos defensivos, faz-se necessário seccionar diferentes regiões anatômicas encefálicas em uma primeira instância, para então, paulatinamente, acrescentar regiões encefálicas no panorama da investigação e identificar circuitos neurais envolvidos no processamento de diferentes comportamentos defensivos.

Sendo assim, os diversos tipos de ameaça são percebidas pelo encéfalo através de diferentes modalidades sensoriais como, por exemplo, olfativas, visuais e auditivas, em diferentes regiões anatômicas e circuitos encefálicos.

Enfatiza-se aqui que os dados apresentados a seguir são majoritariamente provenientes de estudos realizados com roedores, uma vez que são os modelos de organismos mais utilizados para se estudar os circuitos neurais do medo e, estão sumarizados na figura 2.

### 3.1. Estímulos olfativos

Roedores possuem o bulbo olfatório (OB), uma estrutura cortical que transmite a informação do cheiro para outras regiões cerebrais, mais avantajado do que seres humanos (SHIPLEY et al., 2003). É razoável assumir que estímulos olfativos são de grande importância para a gênese dos comportamentos defensivos.

O sistema olfatório pode ser dividido em dois componentes centrais: (I) o sistema olfatório central (MOS) que consiste no epitélio olfatório na cavidade nasal onde ocorre a transdução de odores voláteis e o OB e suas conexões com outras regiões do cérebro; e (II) o sistema olfatório acessório (AOS) que consiste no órgão vomeronasal (VNO) localizado na cavidade nasal onde ocorre a transdução de feromônios e o bulbo olfatório acessório (AOB) e suas conexões com outras regiões do cérebro (ENNIS et al., 2015).

A utilização do TMT (*2,5-dihydro-2,4,5-trimethylthiazoline*), um componente presente nas fezes de raposas, induz o comportamento de “congelamento” em roedores expostos ao odor, indicando, dessa maneira, que estímulos sensoriais olfativos podem modular respostas defensivas (RAMPIN et al., 2018). O TMT é detectado por neurônios do epitélio nasal que se projetam para o OB que, por sua vez, projeta-se para o núcleo cortical do complexo amigdalóide (CoA) (MIYAMICHI et al., 2011). A inativação optogenética de neurônios da CoA atenua respostas defensivas frente a exposição de roedores ao TMT, enquanto que sua ativação seletiva intensifica respostas defensivas (ROOT et al., 2014).

No que diz respeito ao AOS, o VNO envia projeções de neurônios para o núcleo medial do complexo amigdalóide (MEA) que, por sua vez, projeta-se para



o sistema de defesa hipotalâmico (ENNIS et al., 2015) que recruta estruturas mesencefálicas sabidamente importantes para respostas defensivas proximais, como a substância cinzenta periaquedutal dorsal (dPAG) (CANTERAS, 2002).

### *3.2. Estímulos visuais*

Respostas defensivas relacionadas ao medo também podem ser elicitadas naturalmente por estímulos de outra natureza além dos olfativos, como, por exemplo, a partir de estímulos visuais. A informação visual é coletada por fotorreceptores situados na retina nervosa, cuja atividade será processada por células bipolares, as quais se conectam com as células ganglionares da retina nervosa (RGC) (WANG, 2019). Estas se projetam para os núcleos geniculados laterais do metatálamo que, por meio da radiação óptica, ou genículo-calcarina, conectam-se com as imediações do sulco calcarino (área 17 de Brodmann, ou área visual primária). Algumas conexões também se projetam para o núcleo dorsal da rafe (DRN) e, em especial, para o colículo superior (SC), região importante para o processamento de estímulos visuais (HUANG et al., 2017).

Roedores submetidos à ativação optogenética de neurônios do SC apresentaram comportamento de “congelamento” induzido frente a um estímulo iminente, enquanto que o silenciamento dessa mesma região bloqueia a expressão do comportamento defensivo (WEI et al., 2015). Além disso, esses autores demonstraram que neurônios do SC se projetam para o núcleo posterior lateral do tálamo (LP) que, por sua vez, projeta-se para o núcleo basolateral do complexo amigdalóide (BLA). A inativação quimiogenética do BLA intensificou o

comportamento de “congelamento” e atenuou comportamento de fuga frente à exposição de roedores a uma ameaça iminente, mas escapável (TERBURG et al., 2018).

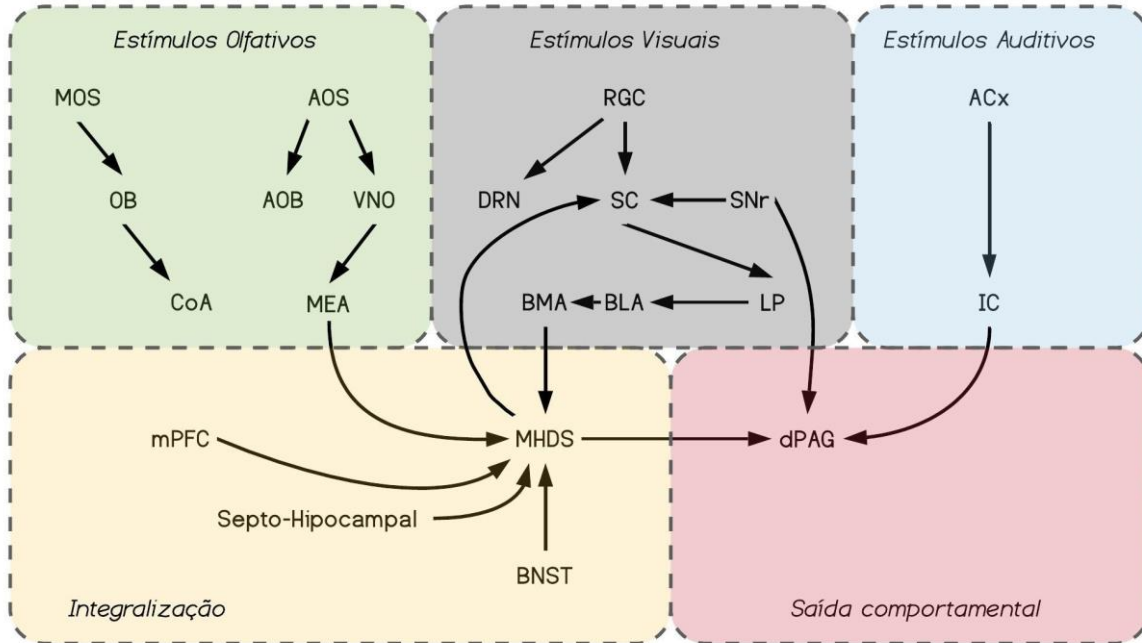


Fig. 2. Representação esquemática dos circuitos neurais do medo inato. Três diferentes unidades estão representadas: a unidade de detecção dos estímulos (representada pelos três blocos superiores), a unidade de integralização (representada pelo bloco inferior esquerdo) e a unidade de saída comportamental (representada pelo bloco inferior direito). Estímulos olfativos são captados através do sistema olfatório central (MOS) que modula respostas defensivas via amígdala cortical (CoA) após enviar projeções do bulbo olfatório (OB) e do sistema olfatório acessório (AOS) que modula respostas comportamentais através de suas projeções para o bulbo olfatório acessório (AOB) e órgão vomeronasal (VNO) que se projeta para o núcleo medial do complexo amigdalóide (MEA) que, por sua vez, projeta-se para o sistema de defesa do hipotálamo medial (MHDS), região central para a integralização dos estímulos. O MHDS recebe projeções do córtex “pré-frontal” medial (mPFC), sistema septo-hipocampal, núcleo do leito da estria terminal (BNST) e núcleo basomedial do complexo amigdalóide (BMA) e se projeta para o colículo superior (SC) e substância cinzenta periaquedutal dorsal (dPAG), região importante para a modulação de respostas defensivas. A dPAG também recebe projeções do colículo inferior (IC) e da substância negra (SNr), que se projeta para o SC. Estímulos visuais são processados por células ganglionares da retina (RGC) que se projetam para o núcleo dorsal da rafe (DRN) e SC, que se projeta para núcleo posterior lateral do tálamo (LP). O LP se projeta para o núcleo basolateral do complexo amigdalóide (BLA) que se projeta para o BMA. Estímulos auditivos são captados pelo córtex auditivo (ACx) que se projeta para o IC.

A atividade do SC está relacionada com a sinalização do ácido gama-aminobutírico (GABA), uma vez que a infusão local de um antagonista de receptores GABAérgicos do tipo A, a bicuculina, intensifica respostas defensivas na medida em que aumenta a esquiva dos roedores (BRANDÃO et al., 2005). Em suma, há evidência de projeção de neurônios GABAérgicos da substância negra (SN) para o SC (ALMADA et al., 2018) e, posteriormente à dPAG, caracterizando a via regulatória inibitória nigro-tectal (JAYARAMAN et al., 1977; ALMADA et al., 2020). Almada e colaboradores (2018) demonstraram que a estimulação optogenética de projeções da SNr para o SC no *Beetle Mania Task* (BMT), teste comportamental passível de analisar respostas defensivas ativas e passivas a partir do confronto do roedor com um besouro-robô, intensificou os comportamentos de tolerância e aproximação do animal frente à ameaça em um contexto de menor carga emocional.

Estes dados corroboram os previamente apresentados na literatura, que sugerem que o colículo superior pode modular respostas defensivas relacionadas ao medo inato a partir de um estímulo visual.

### 3.3. Estímulos auditivos

Além de informações visuais, animais frequentemente dependem de sua audição para detectar ameaças, sobretudo em ambientes desprovidos de luz e, em especial, por espécies noturnas. É razoável assumir que estímulos auditivos podem eliciar respostas defensivas relacionadas ao medo inato.

BLANCHARD et al (1993) demonstraram que vocalizações ultrassônicas servem como “grito” de alarme em roedores expostos ao odor de seu predador

e, portanto, podem servir como estímulo inicial para a evocação de comportamentos defensivos. MONGEAU et al. (2003) verificaram que camundongos expostos a tons ultrassônicos demonstraram ativação do colículo inferior (IC) vista pela alta expressão de c-Fos nesta região.

Não obstante, a ativação optogenética dos terminais de projeção do córtex auditivo (ACx) para o IC é suficiente para iniciar respostas de fuga frente a um estímulo sonoro, enquanto que sua inibição atenua comportamentos defensivos induzidos pelo som (XIONG et al., 2015). Em seguida, os autores verificaram que a ativação optogenética das projeções do IC para a dPAG, por si só, é o suficiente para induzir comportamentos de defesa, sugerindo, dessa maneira, que este controle neural pode ser o mecanismo por trás da modulação de respostas defensivas nessa modalidade sensorial.

#### *3.4. Integração das informações*

Uma vez que o encéfalo tenha detectado a ameaça, é necessário que toda informação sensorial proveniente da ameaça, o contexto e o estado interno do animal sejam integrados de maneira que haja o recrutamento orquestrado de estruturas cerebrais com o objetivo de se tomarem as respostas defensivas mais adequadas para a determinada situação (CANTERAS, 2002).

A unidade de integração para o medo pode ser descrita pela ação do sistema de defesa do hipotálamo medial (MHDS) que consiste na ação de diferentes núcleos hipotalâmicos interconectados que recebem informações de regiões sensoriais e que são seletivamente recrutados na presença de uma ameaça: o núcleo hipotalâmico anterior (AH), a porção dorso-medial do

hipotálamo ventro-medial (VMHdm) e o núcleo pré-mamilar dorsal (PMD) (CANTERAS et al., 2012)

A estimulação elétrica do VMH, um dos núcleos do sistema de defesa do hipotálamo medial, induziu ataques do pânico em seres humanos (WILENT et al., 2010), dado que suporta a conservação evolutiva de caracteres entre grupos filéticos próximos.

O MHDS recebe projeções de regiões associadas à metabolização de estímulos, como o MEA, que transmite informações olfatórias do VNO, e do núcleo basomedial do complexo amigdalóide (BMA) que recebe projeções do BLA. Em suma, o MHDS recebe projeções do núcleo do leito da estria terminal (BNST), estrutura que está implicada no processamento de situações aversivas (WALKER et al., 2003), do sistema septo-hipocampal que processa informações espaciais e temporais (CANTERAS, 2002) e da parte rostromedial do lobo frontal (mPFC, do inglês *medial prefrontal cortex*), região que participa da tomada de decisões, regulação das emoções e cognição social (HISER e KOENIGS, 2018). Portanto, o MHDS integra informações de áreas sensoriais e é um candidato para responder a uma variedade de informações sensoriais sobre ameaças ambientais.

Esses núcleos hipotalâmicos se projetam para regiões motoras de defesa como a dPAG e o SC, que efetuam os comportamentos defensivos (CANTERAS, 2002).

Ainda sobre o PFC, vale destacar alguns aspectos anatômicos desta estrutura cortical localizada na porção anterior do cérebro de mamíferos que, predominantemente, recebe projeções oriundas do núcleo dorso-medial do tálamo dorsal (ROSE e WOOLSEY, 1948). Uma das dificuldades em estudar o

papel funcional do PFC diz respeito à controvérsia existente entre a equivalência das sub-regiões do PFC ao longo das espécies (DALLEY et al., 2004).

A definição, elaboração e delimitação de critérios neuroanatômicos do PFC é muito complexa, pois sua variabilidade entre espécies é marcante (KOLB, 1984). Um critério sensível muito utilizado para a definição é a distribuição das fibras aferentes que partem do núcleo dorsomedial do tálamo dorsal para o PFC (BARBAS, 1995; KOLB, 1984; MCDONALD, 1998, FUSTER, 1997). Com a utilização desse padrão, foram identificadas cinco regiões corticofrontais no rato: (i) área anterior do giro do cíngulo (Cg1, Cg2, Cg3); (ii) área pré-límbica (PL) e infralímbica (IL); (iii) área orbital; (iv) área insular granular, que pode ser subdividida nos componentes dorsal (AIAd) e ventral (AIAv); e (v) área pré-central (CPC) (KOLB, 1984).

Essas cinco regiões podem ser ordenadas em três distintas porções, a medial, lateral e ventral, baseado em critérios funcionais e hodológicos. O mPFC, compreende o PL, IL, Cg, CPC e o orbital medial (MO). A porção ventral inclui o córtex orbital (PFCo), que pode se subdividido em orbital ventral (VO) e orbital ventrolateral (VLO). Além disso; a porção lateral é composta pelas áreas insular dorsal e ventral (AIAd, AIAv, respectivamente) e a orbital lateral (LO) (KOLB, 1984; MCDONALD, 1998).

### *3.5. Teorias das emoções*

Em conjunto, também proporcionado através do trabalho pioneiro de Charles Darwin de 1870, a ideia de que comportamentos naturais de ataque e comportamentos defensivos de animais são análogos e correspondentes aos estados emocionais de humanos foi instaurada.

### 3.5.1. James - Lange

A teoria de James e Lange (JAMES e LANGE., 1890), indubitavelmente, foi uma das primeiras teorias a procurar entender a influência das mudanças fisiológicas nas emoções e os comportamentos relacionados a ela.

Ambos os psicólogos propuseram, independentemente, a mesma teoria cujo objeto central de trabalho foi a emoção e sua relação com sua possível causa fisiológica. Sendo assim, a teoria James-Lange define a emoção como a sensação de alterações viscerais que precediam um evento de caráter excitatório eliciado por uma estimulação externa.

Esta definição, inovadora para seu período, implicava diretamente no pressuposto de que respostas comportamentais precediam a experiência emocional. Em um pequeno exemplo, porém claro, é possível exemplificar um comportamento relacionado a uma emoção de acordo com a teoria James-Lange: tem medo porque se foge e, não o oposto.

No entanto, a carência de investigações fidedignas e relações desta definição com respostas comportamentais de reflexo frente a um estímulo excitatório e, em especial, a dificuldade frente à avaliações empíricas laboratoriais para avaliação destes pressupostos, transformaram esta teoria em caráter árduo de aceitação para alguns pesquisadores, dentre eles, Walter Cannon e Phillip Bard.

### 3.5.2. Cannon – Bard

Cannon e Bard (CANNON., 1927; BARD, 1928) discordaram dos postulados da teoria de James e Lange na medida em que respostas viscerais

induzidas quimicamente, por si só, não eram o suficiente para produzir emoções e, o isolamento cirúrgico das vísceras não cessavam por completo a expressão das emoções. Dessa maneira, introduziu-se um novo modelo animal experimental para as emoções, o “gato deteriorado”, pelo qual passara por extração cirúrgica do centro controlador superior, o córtex.

A ausência do centro controlador superior permitiria uma exibição prolongada do fenômeno emocional em situação de exposição do animal a outro animal, por fim, concluindo que a experiência emocional é proveniente da ativação de circuitos do sistema nervoso central, em especial, a nível do tálamo e hipotálamo, postulando, dessa maneira, a teoria talâmica das emoções.

Isto posto, o tálamo seria a região anatômica em que residiria a organização neural para diferentes expressões emocionais. De fato, a teoria talâmica se mostrou importante para a posterior proposição da teoria emocional de Papez (PAPEZ, 1937).

### *3.5.3. Teoria da ativação de Lindsey*

Utilizando as ideias de Cannon-Bard, Lindsey (LINDSEY et al, 1950) procurou exemplificar respostas emocionais também através da ação do sistema nervoso central, no entanto, a partir de regiões pontuais: através da ativação cortical seletiva.

O sistema de ativação reticular ascendente (SARA) permitiu o pensamento de que vias ascendentes do tronco cerebral para o córtex por meio de regiões talâmicas, seriam responsáveis pela integralização de impulsos somáticos.



Sendo assim, de acordo com Lindsey, o hipotálamo seria a sede primária para a organização da expressão emocional mediada pelo reconhecimento de estímulos somáticos provenientes da SARA.

#### 3.5.4.. *Teoria de Papez*

Macroscopicamente, o encéfalo, principalmente o dos mamíferos, é passível de caracterização a partir da diferenciação morfológica de seus lobos.

Broca (1878) descreveu a existência de um sistema que circunda a borda dos hemisférios encefálicos e abrange, não apenas uma região, mas diversas regiões encefálicas. Assim, aplicou o termo límbico (limite) para a borda do córtex que continha o giro do cíngulo e o giro para-hipocampal. No entanto, foi com Papez (1937) e seu trabalho intitulado “o mecanismo proposto da emoção” que se propôs um papel funcional às emoções a este sistema caracterizado por Broca.

O mecanismo de funcionamento das emoções de Papez adicionava novas regiões ao sistema límbico de Broca, incluindo, em especial, o hipotálamo, o hipocampo, o tálamo anterior e suas conexões encefálicas como um sistema harmonioso que podia elaborar as funções das emoções, bem como em sua expressão.

De acordo com o esquema de Papez (figura 3), informações corticais são enviadas ao hipotálamo por meio de eferências do giro do cíngulo para a formação hipocampal. O hipocampo processa estas novas informações e as envia para os corpos mamilares do hipocampo através do fórnix.

Simultaneamente, o hipotálamo, projeta estas informações ao tálamo através do trato mamilotálamico e, posteriormente ao giro do cíngulo. Do giro do cíngulo, informações são enviadas a diversos substratos neurais corticais formando o sistema das emoções.

Em uma tentativa de expandir a teoria de Papez, Yaklovlev (1948), propôs o circuito Yaklviano de controle das emoções, sistema este que levava em conta o córtex orbitofrontal, temporal anterior, o complexo amigdalóide e o núcleo dorso-medial do tálamo.

Paul McLean (1949) instaurou conceito do cérebro trino, qual consistia na tripla divisão funcional do encéfalo, cada uma fazendo referência a um extrato evolutivo do sistema nervoso dos vertebrados: (i) o cérebro reptiliano, ou cérebro instintivo, comum a todos os vertebrados. Responsável pelas sensações primárias e comportamentos de sobrevivência. (ii) sistema límbico, frequentemente associado como a região encefálica emocional e, (iii) neocórtex, caracterizado, dentre as suas diversas funções, pelo envolvimento em processos cognitivos.

No entanto, o sistema límbico como controlador das emoções não é uniforme e, sua atividade não é exclusiva a apenas às regiões anatômicas aqui citadas (VOGT., 2019). Em todo o caso, regiões encefálicas podem ser controladas, dentre todas as diversas possibilidades, através da ação de neurotransmissores.

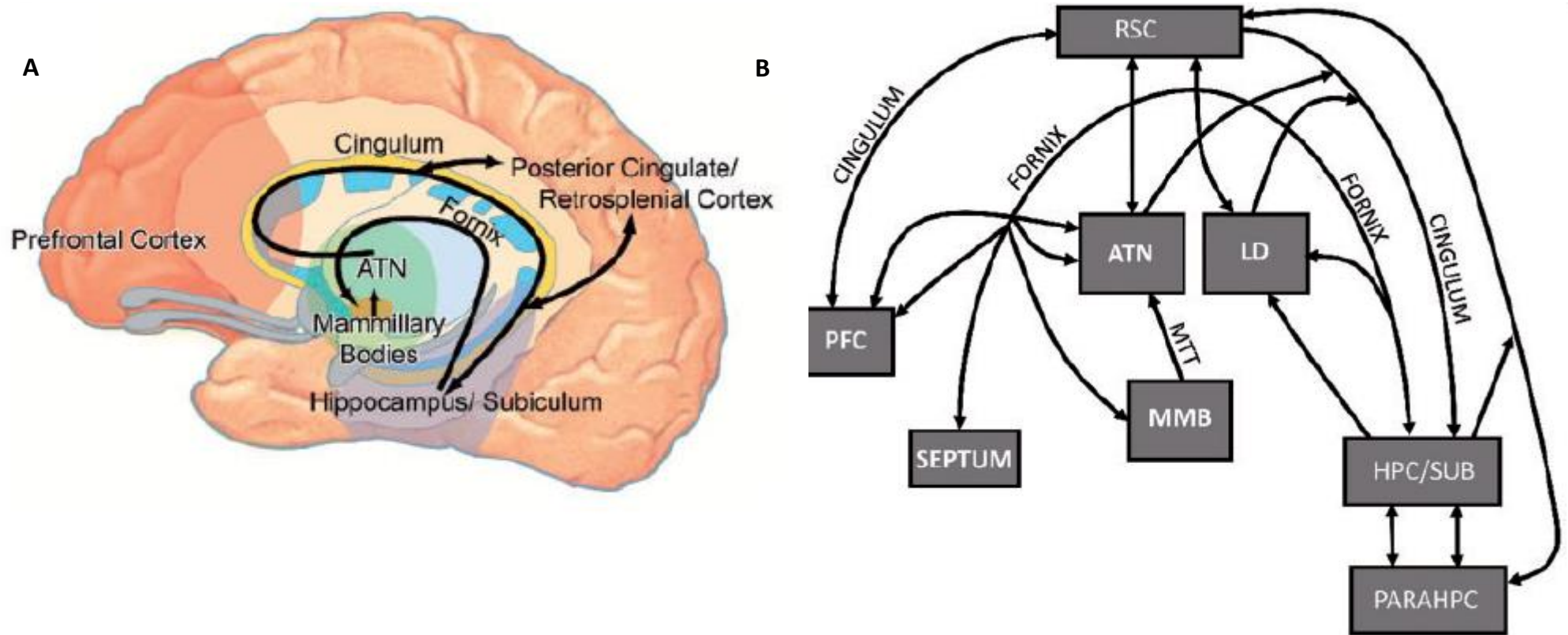


Fig. 3. Ilustração esquemática do encéfalo em três direções evidenciando o circuito de Papez (A) e suas conexões (B). PFC: Córtex “Pré-Frontal”; MMB: Corpos Mamilares; ATN: Núcleo Talâmico Anterior; RSC: Córtex Retrosplenial; LD: Núcleo Talâmico Dorso-Lateral; HPC/SUB: Formação Hipocampal incluindo o *Subiculum*; PARAHPC: Região Para-hipocampal. Trabalho adaptado de AGGLETON et al., 2016.

#### **4. Neuroquímica dos comportamentos defensivos**

Variados são os neurotransmissores capazes de modular um comportamento defensivo: o GABA, a serotonina e o glutamato são alguns dos mediadores químicos intimamente relacionados à neurofisiologia do medo e da ansiedade (ALMADA, COIMBRA e BRANDÃO, 2015; CALHOON e TYE, 2015). Por exemplo, a hipótese de Deakin e Graeff (1991) propõe que a serotonina, por meio de projeções para estruturas prosencefálicas e mesencefálicas, modula respostas a estressores agudos e crônicos e que a sua disfunção intensifica transtornos afetivos e de ansiedade, como o transtorno do pânico. Por consequência, a serotonina é capaz de modular um comportamento defensivo. É sabido que a ação do neurotransmissor GABA também modula respostas defensivas. A bicuculina, no SC, aumenta a frequência do comportamento de fuga em roedores (BRANDÃO et al., 2005) e a estimulação optogenética de terminais da SNr para o SC provoca intensificação do comportamento de tolerância e aproximação do roedor em relação à ameaça (Almada et al., 2018). Em suma, a ablação quimiogénica de neurotransmissores glutamatérgicos da área tegmental ventral (VTA) atenua respostas defensivas de roedores frente a um estímulo aversivo (BARBANO et al., 2020).

Recentemente, alguns estudos apontaram para ação de um outro neurotransmissor na modulação de respostas defensivas, as orexinas (JOHNSON et al., 2010; VANDERHAVEN et al., 2015; SOYA e SAKURAI, 2018).

#### 4.1. Sistema orexinérgico

A orexina foi descrita quase que simultaneamente por dois grupos de pesquisa, em 1998, utilizando duas metodologias diferentes. A partir da farmacologia reversa, um método que modula a atividade de um alvo proteico e elenca possíveis componentes que se ligam com grande afinidade a esse alvo proteico (ARULSAMMY et al., 2016), Sakurai *et al.* (1998) identificaram dois ligantes para dois receptores acoplados à proteína G que foram posteriormente chamados de orexina A e orexina B, uma vez que neurônios produtores de orexina foram observados no hipotálamo lateral (LH), região reconhecida como “centro” da alimentação, e a administração intracerebrovascular desses peptídeos intensificou o comportamento de alimentação. Sendo assim, os autores nomearam estes neuropeptídios de orexina a partir da palavra Grega *orexis*, que significa apetite.

No mesmo período, De Lecea *et al.* (1998), isolando diferentes tipos de RNA mensageiro (mRNA) em diferentes tecidos cerebrais, identificaram um novo tipo de mRNA expresso exclusivamente no hipotálamo. Seu produto proteico foi denominado de acordo com a localização do mRNA e o caráter da homologia com a secretina, um hormônio duodenal, originando, dessa forma, a hipocretina.

Os neuropeptídios orexina A e orexina B (também conhecidos como hipocretina 1 e hipocretina 2), são provenientes da clivagem de uma proteína precursora comum, a pré-pró-orexina. Seus receptores estão ligados à proteína G (receptores do tipo 1, OX<sub>1</sub>R; e receptores do tipo 2, OX<sub>2</sub>R, respectivamente). O OX<sub>1</sub>R possui mais afinidade para a orexina A do que para a orexina B, enquanto que o OX<sub>2</sub>R possui afinidade similar para ambos os neuropeptídeos (figura 3) (DE LECEA et al., 1998; SAKURAI et al., 1998).

Neurônios orexinérgicos estão presentes no LH, na área perifornical (PFA) e no hipotálamo dorsomedial (DMH), embora encontrem-se majoritariamente no LH, e se projetam praticamente para toda a extensão encefálica (figura 4). Essa distribuição neuronal ampla sugere que a atividade de neurônios orexinérgicos influencia diversos sistemas cerebrais, como o serotoninérgico (projeção para os núcleos da rafe), histaminérgico (projeção para o núcleo tuberomamilar) e noradrenérgico (projeção para o *locus coeruleus*, LC) (JOHNSON et al., 2012).

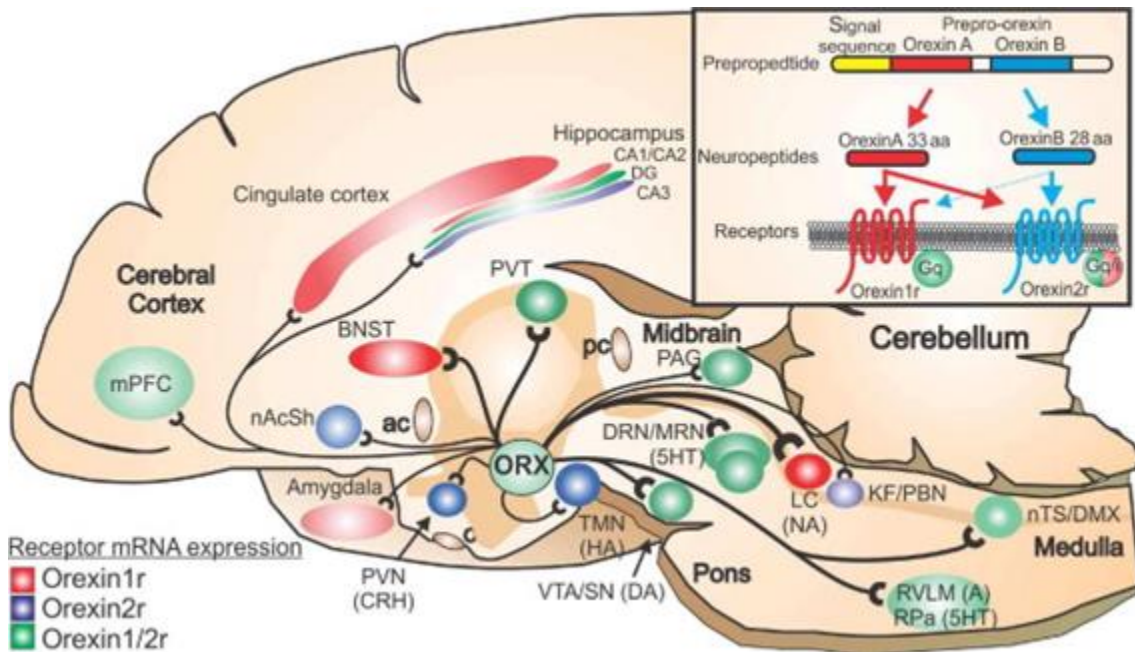


Fig. 4. Ilustração da seção parasagital do encéfalo de rato demonstrando as aferências dos neurônios orexinérgicos do hipotálamo lateral com a expressão de mRNA dos receptores orexinérgicos nas regiões-alvo e a afinidade da orexina A e orexina B com seus respectivos receptores. A densidade das projeções orexinérgicas é representada pela espessura das linhas das projeções e a densidade da expressão de mRNA de receptores orexinérgicos é representada pela intensidade da color. NA: Noradrenalina; mPFC: Córtex “pré-frontal” medial; nACSh: Núcleo *accumbens shell*; PVN: Núcleo paraventricular do hipotálamo; CRH: Hormônio liberador de corticotrofina; BNT: Núcleo do leito da estria terminal; PVT: Núcleo paraventricular do tálamo; ac: Comissura anterior; ORX: Orexina; VTA: Área tegmental ventral; SN: Substância negra; TMN: Núcleo túbero mamilar; HÁ: Histamina; DA: Dopamina; DRN: Núcleo dorsal da rafe; MRN: Núcleo mediano da rafe; 5HT: Serotonina; pc: Comissura posterior; CA1/CA2/CA3: Regiões anatômicas do hipocampo; DG: Giro dentado; PAG: Substância

cinzenta periaquedutal; LC: *Locus coeruleus*; KF: Núcleo Kölliker-Fuse; PBN: Núcleo parabraquial; RVLM: bulbo rostral ventro-lateral; RPa: Núcleo pálido da rafe; nTS: Núcleo do trato solitário; DMX: Núcleo motor dorsal do nervo vago. Johnson et al., 2012.

A distribuição de receptores orexinérgicos também é consistente com a distribuição de neurônios de orexina; no entanto, existem predominância de tipos de receptores em determinadas áreas anatômicas, o que sugere que os receptores orexinérgicos provavelmente influenciam na regulação do sistema nervoso e outras diversas funções somáticas (JOHNSON et al., 2012).

Em especial, neurônios orexinérgicos se projetam fortemente para o mPFC, sobretudo no córtex pré-límbico (PL), uma sub-região do mPFC (JIN et al., 2016) que possui ambos os receptores de orexina (JOHNSON et al., 2012), mas em densidades diferentes (LI et al., 2009; CHEN et al., 2006; Marcus et al., 2001): OX<sub>1</sub>R expresso em maiores quantidades do que OX<sub>2</sub>R.

O mPFC é uma região anatômica prosencefálica que participa da integração das informações e do sistema límbico; sendo assim, contribui para a tomada de decisão, atenção, medo, aprendizado e memória (MATOS et al., 2019). Naturalmente, cada vez mais o mPFC está sendo associado com o processamento das emoções na medida em que modula respostas defensivas a ameaças distais (MOBBS et al., 2018). Considerando-se tais aspectos, o mPFC é a região neural-alvo deste trabalho.

## **5. Orexina e modulação de funções autonômicas e comportamentais**

Em vista da ampla distribuição de projeções de neurônios orexinérgicos no encéfalo, bem como a ampla distribuição de seus receptores (JOHNSON et al., 2012), é seguro presumir que este sistema influencia diversas funções autonômicas e comportamentais.

### 5.1. *Comportamento alimentar*

É natural que se associe o sistema orexinérgico com o comportamento alimentar, visto que a nomenclatura do termo deste sistema é proveniente da consequência fisiológica da aplicação de seus neuropeptídeos no líquido intracerebrovascular, o que, como resultado, intensificou o comportamento alimentar em camundongos (SAKURAI et al., 1998).

A administração intraperitoneal do antagonista específico de receptores orexinérgicos do tipo 1, o SB 334867, diminuiu o consumo alimentar em ratos por um período de 4h após o tratamento, enquanto que a administração intracerebrovascular de orexina A promoveu o consumo de alimentos (HAYNES et al., 2000). Corroborando os achados de que o sistema orexinérgico participa na regulação do comportamento alimentar, Matsuo *et al.* (2010) demonstraram que animais *knockout* para orexina apresentaram o consumo de soluções de sucrose em menor quantidade do que animais não *knockout* para orexina.

Digno de nota, seres humanos que possuem narcolepsia (distúrbio do sono) geralmente apresentam menor concentração nos níveis de orexina A no líquido intracerebrovascular e demonstram, da mesma maneira, ingestão de alimentos em menor quantidade do que indivíduos que não apresentam a narcolepsia (NISHINO et al., 2000; LAMMERS et al., 1996).

Estes achados nos permitem observar o caráter amplo da participação do sistema orexinérgico em relação à regulação de funções autonômicas e comportamentais, em exemplo, a participação do sistema orexinérgico na regulação do comportamento alimentar e do comportamento do sono e vigília.



## 5.2. Sono e Vigília

Sabe-se que a deficiência de orexina contribui para o entendimento da etiologia da narcolepsia, uma vez que é visto que a deficiência de orexina está presente na maioria dos casos de narcolepsia (NISHINO et al., 2000; THANNICKAL et al., 2000). A narcolepsia é definida como um distúrbio do sono e pode ser caracterizada por episódios abruptos de sono durante o período ativo de vigília, sono excessivo durante o período de dia, episódios de *rapid-eye-movement* (REM) que podem ocorrer durante período consciente e, por fim, pela ocorrência intermitente de sono noturno (DE LECEA, 2014).

Alguns estudos demonstraram que a manipulação optogenética de neurônios liberadores de orexina é capaz de alterar o período de sono e vigília em camundongos, na medida em que a ativação optogenética dessas populações de neurônios induziu a transição do sono para a vigília e a inativação dessas populações promoveu a transição de vigília para o sono (ADAMANTIDIS et al., 2007). Adicionalmente, a estimulação quimiogenética de neurônios produtores de orexina também promoveu a transição de sono para a vigília em camundongos, enquanto que a inibição quimiogenética dessas populações de neurônios promoveu a transição de vigília para o sono (SASAKI et al., 2011).

Sendo assim, é possível sugerir que a orexina faça parte da regulação da transição entre o sono e a vigília; contudo, seus diversos efeitos nestes processos são regulados por diversas regiões encefálicas e neurotransmissores, com os quais este sistema interage.

### 5.3. Memória

A alteração na sinalização de neurônios orexinérgicos leva à perturbação do sono e do comportamento alimentar. Alguns estudos têm demonstrado que a orexina também é capaz de modular o aprendizado e a memória (MAVANJI et al., 2017; SHI et al., 2018).

Utilizando modelo animal modificado geneticamente para a extinção gradual de neurônios orexinérgicos, Mavanji *et al.* (2017) demonstraram que a administração de orexina A no hipocampo, uma região anatômica diencefálica importante para a organização e expressão dos processos, foi capaz de reverter o prejuízo cognitivo em animais senis no teste da esQUIVA ativa de duas vias, indicando, dessa maneira, que a orexina está envolvida na consolidação da memória.

Ainda, a estimulação optogenética de terminais orexinérgicos no LC associada a um som seguido de choque aprimorou a efetividade da memória aversiva de longo termo em ratos submetidos ao condicionamento, enquanto que a inibição optogenética de terminais orexinérgicos no LC prejudicou a efetividade da memória aversiva (SEARS et al., 2013).

Estes são alguns recentes dados sugerem o papel modulatório do sistema orexinérgico em diferentes regiões e sistemas encefálicos durante o processamento e expressão das memórias aversivas.

## 6. Orexina e emoções

Dentre todas as semelhanças dos processos autonômicos aqui exemplificados, destaca-se uma semelhança fundamental à sobrevivência dos animais: as emoções.

Emoções surgem em situações em que algo importante para o indivíduo está em jogo. Algumas vezes, podem ser acionadas automaticamente por meio de ocasiões em que exigem alto grau de responsividade (LE DOUX, 1995), como, por exemplo, na medida em que um roedor foge com medo de uma serpente, seu possível predador. Em outras ocasiões, emoções são manifestadas após certa interpretação do significado do determinado estímulo (LE DOUX, 1995), como, por exemplo, em situação em que o experimentador reconhece tristemente que seu protocolo experimental resultou em falha.

Em ambas as ocasiões, as emoções dão início a um conjunto de medidas coordenadas que influenciam comportamentos e respostas fisiológicas que, em conjunto, influenciam como um indivíduo responde a um determinado estímulo.

### 6.1. Medo

Por mais que projeções orexinérgicas sejam presentes ao longo de toda extensão encefálica, há projeções particularmente densas para regiões que modulam comportamentos relacionados ao medo, como, por exemplo, o mPFC, núcleos hipotalâmicos, o complexo amigdalóide, o hipocampo, os núcleos da rafe, os corpos quadrigêmeos, a substância cinzenta periaquedutal, o *locus coeruleus*, entre outras estruturas límbicas (JOHNSON et al., 2012). Tais projeções nos permitem sugerir um possível papel regulatório do sistema

orexinérgico sobre a organização e expressão comportamentos defensivos relacionados ao medo, à ansiedade e ao pânico.

Sustentando este pressuposto, observa-se a ativação de neurônios orexinérgicos em situações aversivas (SOYA e SAKURAI, 2018) que podem resultar em aprendizado do indivíduo a partir da exposição a situações aversivas. Uma vez que uma memória de medo é formada, os indivíduos exibem comportamentos defensivos relacionados a esta emoção quando expostos a pistas e a contextos que previamente foram associados ao estímulo aversivo (SOYA e SAKURAI., 2018).

O bloqueio farmacológico de OX<sub>1</sub>R por um antagonista seletivo (SB 334867) no LC atenua o comportamento de “congelamento” de roedores frente a um estímulo incondicionado, enquanto que a ativação optogenética dessa região intensifica este comportamento de defesa (SOYA et al., 2017). Não obstante, o silenciamento do gene produtor de orexina e o bloqueio sistêmico de OX<sub>1</sub>R bloqueia respostas defensivas relacionados ao pânico em ratos (JOHNSON et al., 2010).

Em seres humanos, pacientes acometidos pelo transtorno do pânico demonstraram maior índice de orexina A no líquido cefalorraquidiano comparado com pacientes que não são acometidos pelo transtorno (JOHNSON et al., 2010). Ainda assim, a administração intraperitoneal de SB 334867 em roedores estimula a aproximação dos animais em direção ao odor de seu predador.

## 6.1. *Ansiedade*

Além de modular respostas defensivas relacionadas ao medo, o sistema orexinérgico parece modular comportamentos relacionados também à ansiedade (VANDERHAVEN et al., 2015).

Animais *knockout* para OX<sub>2</sub>R no BLA apresentaram comportamentos relacionados à ansiedade mais intensificados do que animais *knockout* para OX<sub>1</sub>R na medida em que diminuíram sua preferência social no teste de defesa social e diminuição do tempo gasto no centro da arena no teste de campo aberto (ARENDRT et al., 2014), indicando, dessa maneira, que a ativação de receptores orexinérgicos do tipo 2 na BLA tem função ansiolítica.

Somando-se a isso, animais tratados com SB 334867 se aproximam e se escondem menos do odor de seu predador quando comparados com animais que foram tratados com solução veículo (VANDERHAVEN et al., 2015). Algo similar viu-se em modelo animal modificado geneticamente para a extinção de neurônios orexinérgicos (KHALIL e FENDT, 2017).

Corroborando estes achados, em seres humanos, Akça *et al.* (2020) demonstraram que o nível de orexina A no plasma sanguíneo de indivíduos acometidos por algum transtorno de ansiedade é maior quando comparados com indivíduos sem algum transtorno de ansiedade.

Estes dados nos permitem verificar, a partir de evidências comportamentais e anatômicas, a participação e a influência do sistema orexinérgico nos sistemas que permeiam a ansiedade.

Assim, diante de tais evidências e considerando que ainda pouco se sabe sobre o papel dos receptores orexinérgicos no mPFC na expressão dos comportamentos defensivos associados ao medo inato e a ansiedade, o objetivo

do presente estudo foi avaliar os efeitos comportamentais do bloqueio farmacológico do OX<sub>1</sub>R e OX<sub>2</sub>R no mPFC (figura 5), visando investigar o papel dos mecanismos orexinérgicos durante a organização e expressão das respostas comportamentais associadas ao medo em camundongos submetidos ao teste comportamental Beetle Mania Task. Hipoteticamente, acredita-se que os mecanismos orexinérgicos no mPFC, atuem na modulação das respostas defensivas associadas ao medo e a ansiedade.

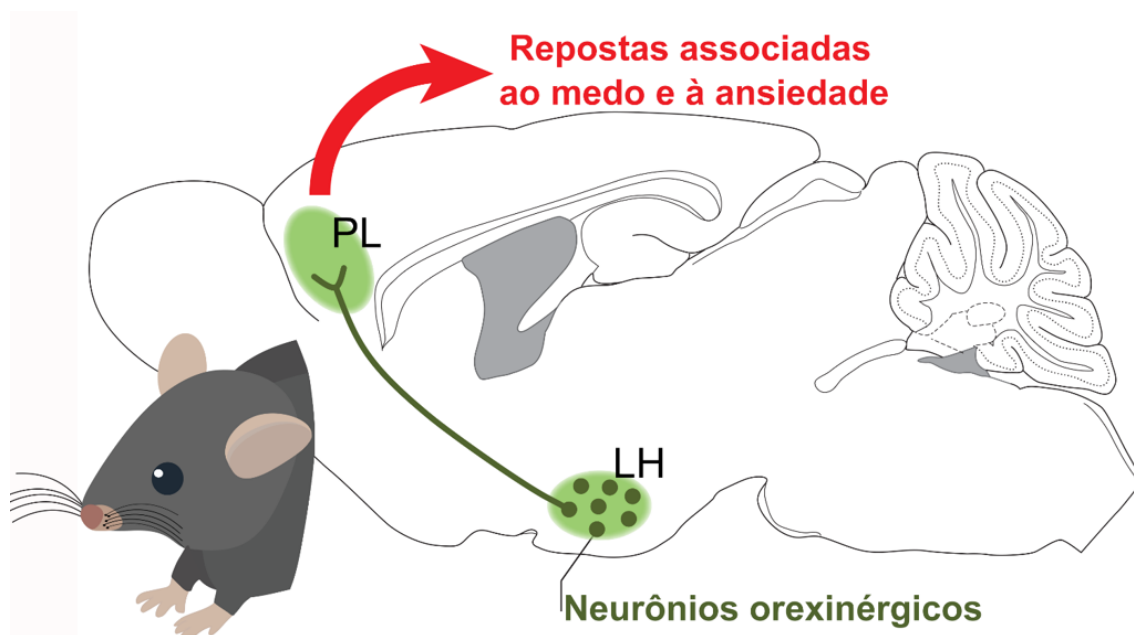


Fig. 5. Seção sagital esquemática do encefálo de camundongo ilustrando a via LH-PL, sugerindo a participação de tal via na organização das respostas comportamentais associadas ao medo e à ansiedade. LH: Hipotálamo lateral; PL: Córtex pré-límbico.

## REFERÊNCIAS

- ADAMANTIDIS, A. R.; ZHANG, F.; ARAVANIS, A. M.; DEISSEROTH, K.; DE LECEA, L. Neural substrates of awakening robed with optogenetic control of hypocretin neurons. **Nature**, v. 450, n. 15, p. 420 – 425. 2007.
- AKÇA, Ö. F.; UZUN, N.; KILINÇ, I. Orexin A in adolescents with anxiety disorders. **International Journal of Psychiatry in Clinical Practice**, v. 24, n. 2, p 127 – 134, 2020
- AGGLETON, J. P.; PRALUS, A.; NELSON, A. J. D.; HORNBERGER, M. Thalamic pathology and memory loss in early Alzheimer's disease: moving the focus from the medial temporal lobe to Papez circuit. **Brain**, v. 139, p. 1877 – 1890. 2016
- ALMADA, R. C.; COIMBRA, N. C.; BRANDÃO, M. L. Medial prefrontal cortex serotonergic and GABAergic mechanisms modulate the expression of contextual fear: Intratelencephalic pathways and differential involvement of cortical subregions. **Neuroscience**, v. 284, p. 988 – 997. 2015.
- ALMADA, R. C.; GENEWSKY, A. J.; HEINZ, D. E.; KAPLICK, P. M.; COIMBRA, N. C.; WOTJAK, C. T. Stimulation of the nigrotectal pathway at the level of the superior colliculus reduces threat recognition and causes a shift from avoidance to approach behavior. **Frontiers in Neural Circuits**, v. 12, n. 36, p. 1 – 9, 2018.
- ALMADA, R. C.; DOS ANJOS-GARCIA, T.; DA SILVA, J. A.; PIGATTO, G. R.; WOTJAK, C. T.; COIMBRA, N. C.; The modulation of striatonigral and nigrotectal pathways by CB1 signalling in the substantia nigra pars reticulata regulates panic elicited in mice by urutu-cruzeiro lancehead pit vipers. **Behavioural Brain Research**, v. 401. 2021.
- ARENDRT, D. H.; HASSEL, J.; LI, H.; ACHUA, J. K.; GUARNIERI, D. J.; DILEONE, R. J.; RONAN, P. J.; SUMMERS, C. H. Anxiolytic function of the orexin 2/hypocretin A receptor in the basolateral amygdala. **Psychoneuroendocrinology**, v. 40, n. 1, p. 17 – 26, 2014.
- ARULSAMY, A.; KUMARI, Y.; SHAIKH, M. F. Reverse Pharmacology: Fast Track Path of Drug Discovery. **Pharmacy & Pharmacology International Journal**, v. 4, n. 3, p. 358 – 359, 2016.

BARBANO, M. F.; WANG, H. L.; ZHANG, S.; LIU, B.; BARKER, D. J.; MORALES, M. VTA Glutamatergic Neurons Mediate Innate Defensive Behaviors. **Neuron**, v. 107, n. 2, p. 368 – 382, 2020.

BARD, P. A diencephalic mechanism for the expression of rage with special reference to the sympathetic nervous system. **American Journal of Physiology**, v. 84, p. 490 – 515, 1928.

BARBAS, H. Anatomic basis of cognitive-emotional interactions in the primate prefrontal cortex. **Neuroscience and Behavioral Reviews**, v. 19, n. 3, p. 499 – 510. 1995.

BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. **Annual review of psychology**, v. 39, p. 43 – 68, 1988.

BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C. Attack and defense in rodents as ethoexperimental models for the study of emotion. **Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 13, n. 1, p. 3 – 14, 1989.

BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C.; AGULLANA, R.; WEISS, S. M. Twenty-two kHz alarm cries to presentation of a predator, by laboratory rats living in visible burrow systems. **Physiology and Behavior**, v. 50, p. 967 – 972, 1993.

BRANDÃO, M. L.; BORELLI, K. G.; NOBRE, M. J.; SANTOS, J. M.; ALBRECHET-SOUZA, L.; OLIVEIRA, A. R.; MARTINEZ, R. C. Gabaergic regulation of the neural organization of fear in the midbrain tectum. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 29, n. 8, p. 1299 – 1311, 2005.

BROCA, P. Anatomie comparée des circonvolutions cérébrales: le grand lobe limbique et la scissure limbique dans la série des mammifères. **Anthropology**, v. 1, p. 385 - 498, 1878.

CALHOON, G. G.; & TYE, K. M. Resolving the neural circuits of anxiety. **Nature Neuroscience**, v. 18 n. 10, p. 1394 – 1404. 2015.

CANNON, B. The James–Lange theory of emotions: A critical examination and an alternative theory. **The American Journal of Psychology**, v. 39, p. 106 – 124, 1927.



CANTERAS, N. S. The medial hypothalamic defensive system: Hodological organization and functional implications. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 71, n. 3, p. 481 – 491, 2002.

CANTERAS, N. S., MOTA-ORTIZ, S. R., MOTTA, S. C. What ethologically based models have taught us about the neural systems underlying fear and anxiety. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, V. 45, N. 4, P. 321 – 327. 2012.

CHEN, J.; KARTERIS, E.; COLLINS, D.; RANDEVA, H, S. Differential expression of mouse orexin receptor type-2 (OX2R) variants in the mouse brain. **Brain Research**, v, 1103, p. 20 – 24, 2006.

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

CROXSON, P. L.; FORKEL, S. J.; CERLIANI, L.; SCHOTTEN, M. T. Structural Variability Across the Primate Brain: A Cross-Species Comparison. **Cerebral Cortex**, v. 28, n. 11, p. 3829 – 3841, 2017.

DALLEY, J, W.; CARDINAL, R. N.; ROBBINS, T, W. Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: neural and neurochemical substrates. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 28, p. 771 – 784. 2004.

DARWIN, C. On the origin of species by means of natural selection, or, the preservation of favored races in the struggle for life. **London**, J. Murray, 1859.

DEAKIN, J. F. W.; GRAEFF, F. G. CRITIQUE: 5-HT and mechanisms of defence. **Journal of Psychopharmacology**, v. 5, n. 4, p. 305 – 315, 1991.

DE LECEA, L.; KILDUFF, T. S.; PEYRON, C.; GAO, X. B.; FOYE, P. E.; DANIELSON, P. E.; FUKUHARA, C.; BATTENBERG, E. L. F.; GAUTVIK, V. T.; BARLETT II, F. S.; FRANKEL, W. N.; VAN DEN POL, A. N.; BLOOM, F. E.; GAUTVIK, K. M. The hypocretins: Hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 1, p. 322 – 327, 1998.

DE LECEA, L.; Optogenetic Control of Hypocretin (Orexin) Neurons and Arousal Circuits. **Current Topics in Behavioral Neurosciences**, V. 25, P 367 – 368. 2014.

ENNIS, M.; PUCHE, A C.; HOLY, T.; SHIPLEY, M T. The Olfactory System. **Neuroscience in Medicine**, p. 761 – 803. 2015.

FANSELOW, M S E LESTER, L S. A functional behavioristic approach to aversively motivated behavior: Predatory imminence as a determinant of the topography of defensive behavior. **Evolution and learning**, p. 185 – 212. 1988.

FOWLER, G. S. Behavioral and hormonal responses of Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*) to tourism and nest site visitation. **Biological Conservation**, v. 90, n. 2, p. 143 – 149, 1999.

FUSTER, J. M. Network Memory. **Trends in Neuroscience**, v. 20, n. 10, p. 451 – 459, 1997

GRAEFF, F G. Ansiedade experimental humana. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v. 34, n. 5, p. 251 - 253. 2007.

HAYNES, A. C.; JACKSON, B.; CHAPMAN, H.; TADAYYON M.; JOHNS A.; PORTER, R. A.; ARCH, J. R. S. A selective orexin-1 receptor antagonist reduces food consumption in male and female rats. **Regulatory Peptides**, v. 96, p 45 – 51. 2000.

HELFRICH – FÖRSTER, C. The circadian clock in the brain: A structural and functional comparison between mammals and insects. **Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology**, v. 190, n. 8, p. 601 – 613, 2004.

HISER, J.; KOENIGS, M. The Multifaceted Role of the Ventromedial Prefrontal Cortex in Emotion, Decision Making, Social Cognition, and Psychopathology. **Biological Psychiatry**, v. 83, n. 8, p. 638 – 647, 2018.

HUANG, I.; YUAN, T.; TAN, M.; XI, Y.; HU, Y.; TAO, Q.; ZHAO, Z.; ZHENG, J.; HAN, Y.; XU, F.; LUO, M.; SOLLARS, P. L.; PU, M.; PICKARD, G. E.; SO, K-F.; REN, C. A retinorecipient projection regulates serotonergic activity and looming-evoked defensive behaviour. **Nature**, v. 548, n. 7460, p. 1 – 13. 2017.

JAMES, W. The principles of psychology. **Holt**. 1980.

JAYARAMAN, A.; HUANG, L.; YUAN, T.; TAN, M.; XI, Y.; HU, Y.; TAO, Q.; ZHAO, Z.; ZHENG, J.; HAN, Y.; XU, F.; LUO, M.; SOLLARS, P. J.; PU, M.; PICKARD, G. E.; SO, K. F.; BATTON, R. R.; III e CARPENTER, M. B. Nigroretal projections in the monkey: an autoradiographic study A. **Brain Research**, v. 135, p. 147 – 152, 1977.

JIN, J; CHEN, Q; QIAO, Q; YANG, L; XIONG, J; XIA, J; HU, Z; CHEN, F. Orexin Neurons in the Lateral Hypothalamus Project to the Medial Prefrontal Cortex with a Rostro-Caudal Gradient. **Neuroscience Letters**, v. 621, p. 9 – 14, 2016.

JOHNSON, P. L.; SAMUELS, B. C.; FITZ, S. D.; FEDERICI, L. M.; HAMMES, N.; EARLY, M. C.; TRUITT, W.; LOWRY, C. A.; SHEKHAR, A. Orexin 1 receptors are a novel target to modulate panic responses and the panic brain network. **Physiology and Behavior**, v. 107, n. 5, p. 733 – 742, 2010.

JOHNSON, P. L.; MOLOSH, A.; TRUITT, W. A.; FITZ, S. D.; SHEKHAR, A. Orexin, stress, and anxiety/panic states. **Progress in Brain Research**, v. 198, p. 133 – 161, 2012.

KHALIL, R.; FENDT, M. Increased anxiety but normal fear and safety learning in orexin-deficient mice. *Behavioural Brain Research*, v. 320, p. 210 – 218, 2017.

KOLB, B. Functions of the frontal cortex of the rat: a comparative review. **Brain Research Review**, v. 8, p. 68 – 98. 1984.

LAMARCK, J, B. Philosophie Zoologique, **Paris, Flammarion**, v. 1, 428p. 1809.

LAMMERS, G. J.; PIJL, H.; LESTRA, J.; LANGIUS, J. A. E.; BUUNK, G.; MEINDERS, A. E. Spontaneous Food Choice in Narcolepsy. **Sleep**, v. 19, n. 1, p. 75 – 76, 1996.

LEDOUX, J. EMOTION: Clues from the brain. **Annual Review of Psychology**, v. 46, p. 209 – 235, 1995.

LEDOUX, J. Rethinking the Emotional Brain. **Neuron**, v. 73, n. 4, p. 653 – 676, 2012.

LI, B.; CHEN, F.; YE, J.; CHEN, X.; YAN, J.; LI, Y.; XIONG, Y.; ZHOU, Z.; XIA, J.; HU, Z. The modulation of orexin A on HCN currents of pyramidal neurons in mouse prelimbic cortex. **Cerebral Cortex**, v. 20, p. 1756 – 1767, 2009.

LINDSLEY, D. B.; BOWDEN, J. W.; MAGOUN, H. W. Effect upon the EEG of Acute Injury to the Brain Stem Activating System, **Electroencephalography and Clinical Neurophysiology**, v. 1, p. 475 - 486, 1949.

MACLEAN, P. D. Psychosomatic disease and the 'visceral brain': recent developments bearing on the Papez theory of emotion. **Psychosomatic Medicine**, n. 11, p. 338 – 353, 1949.

MARCUS, J. N.; ASCHKENASI, C. J.; LEE, C. E.; CHEMELLI, R. M.; SAPER, C. B.; YANAGISAWA, M.; ELMQUIST, J. K. Differential expression of orexin receptors 1 and 2 in the rat brain. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 435, p. 6 – 25, 2001.

MATOS, M. R.; KRAMVIS, I.; VAN DER LOO, R. J.; GEBUIS, T.; ZALM, R.; RAO – RUIZ, P.; MANSVELDER, H. D.; SMIT, A. B.; VAN DER OEVER, M. C. Memory strength gates the involvement of a CREB – dependent cortical fear engram in remote memory. **Nature Communications**, v. 10, n. 2315, p. 1 – 11, 2019.

MATSUO, E.; MOCHIZUKI, A.; NAKAYAMA, K.; NAKAMURA, S.; YAMAMOTO, T.; SHIODA, S.; SAKURAI, T.; YANAGISAWA, M.; SHIUCHI, T.; MINOKOSHI, Y.; INOUE, T. Decreased intake of sucrose solutions in orexin knockout mice. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 43, p. 217 – 224, 2011.

MAVANJI, V.; BUTTERICK, T. A.; DUFFY, C. M.; NIXON, J. P.; BILLINGTON C. J.; KOTZ, C. M. Orexin/hypocretin treatment restores hippocampal-dependent memory in orexin-deficient mice. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 146, p. 21 – 30, 2017.

McDONALD, A. J. Cortical pathways to the mammalian amygdala. **Progress in Neurobiology**, v. 55, p. 257 – 332. 1998.

MIYAMICHI, K.; AMAT, F.; MOUSSAVI, F.; WANG, C.; WICKERSHAM, I.; WALL, N. R.; TANIGUCHI, H.; TASIC, B.; HUANG, Z. J.; CALLAWAY, E. M.;

HOROWITZ, M. A.; LUO, L. Cortical representations of olfactory input by transsynaptic tracing. **Nature**, v. 472, n. 7342, p. 191 – 196, 2011.

MOBBS, D. The ethological deconstruction of fear(s). **Current Opinion in Behavioral Sciences**, v. 24, p. 32 – 37, 2018.

MOBBS, D.; HEADLEY, D. B.; DING, W.; DAYAN, P. Space, Time, and Fear: Survival Computations along Defensive Circuits. **Trends in Cognitive Sciences**, v. 24, n. 3, p. 228 – 241, 2020.

MONGEAU, R.; MILLER, G. A.; CHIANG, E.; ANDERSON, D. J. Neural correlates of competing fear behaviors evoked by an innately aversive stimulus. **Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 9, p. 3855 – 3868, 2003.

NISHINO, S.; RIPLEY, B. B. S.; OVEREEM, S.; LAMMERS, G. T.; MIGNOT, D. Hypocretin (orexin) deficiency In human narcolepsy. **The Lancet**, v. 355, n. 9197, p. 39 – 40, 2000.

RAMPIN, O.; JERÔME, N.; SAINT – ALBIN, A.; OUALI, C.; BOUÉ, F.; MEUNIER, N.; NIELSEN, B. Where is the TMT? GC-MS analyses of fox feces and behavioral responses of rats to fear-inducing odors. **Chemical Senses**, v. 43, n. 2, p. 105 – 115, 2018.

PAPEZ, J, W, A. A proposed mechanism of emotion. **Archives of Neurology and Psychiatry**, v. 38, p. 725 – 743. 1937.

REN, C.; TAO, Q. Neural Circuits Underlying Innate Fear. **Neural Circuits of Innate Behaviors**. Advances in Experimental Medicine and Biology. p. 1 – 9. 2020.

ROOT, C. M.; DENNY, C. A.; HEN, R.; AXEL, R. The participation of cortical amygdala in innate, odour-driven behaviour. **Nature**, v. 515, n. 7526, p. 269 – 273, 2014.

ROSE, J, E; WOOLSEY, C. N. Structure and relations of limbic cortex and anterior thalamic nuclei in rabbit and cat. **Association for Research in Nervous and Mental Disease**, v. 1, n. 27. p. 210 – 232, 1948.

SAKURAI, T.; AMEMIYA, A.; ISHII, M.; MATSUZAKI, I.; CHEMELLI, R. M.; TANAKA, H.; WILLIAMS, S. C.; RICHARDSON, J. A.; KOZLOWSKI, G. P.;

WILSON, S.; ARCH, J. R. S.; BUCKINGHAM, R. E.; HAYNES, A. C.; CARR, S. A.; ANNAN, R. S.; MCNULTY, D. E.; LIU, W. S.; TERRETT, J. A.; ELSHOUBAGY, N. A.; BERGSMA, D. J.; YANAGISAWA. Orexins and orexin receptors: A family of hypothalamic neuropeptides and G protein – coupled receptors that regulate feeding behavior. **Cell**, v. 92, n. 4, p. 573 – 585, 1998.

SEARS, R. M.; FINK, A. E.; WIGESTRAND, M. B.; FARB, C. R.; DE LECEA, L.; LE DOUX, J. Orexin/hypocretin system modulates amygdaladependent threat learning through the locus coeruleus. **PNAS**, v. 110, n. 50, p. 20260 – 20265, 2013.

SHI, L.; CHEN, W.; DENG, J.; CHEN, S.; HAN, Y.; KHAN, M. Z.; LIU, J.; QUE, J.; BAO, Y.; LU, L.; SHI, J. Orexin A Differentially Influences the Extinction Retention of Recent and Remote Fear Memory. **Frontiers in Neuroscience**, v. 12, p. 1 – 9, 2018.

SHIPLEY, M T.; ENNIS M.; PUCHE A C. The olfactory system. In: PAXINOS, G (4<sup>a</sup> Ed.). **The Rat Nervous System**. Totowa: Humana Press. p. 579 – 593. 2003.

SASAKI, K, SUZUKI, M.; MIEDA, M.; TSUJINO, N.; ROTH, B.; SAKURAI, T.; Pharmacogenetic Modulation of Orexin Neurons Alters Sleep/Wakefulness States in mice. **Plos one**, v. 6, n. 5, 2011.

SOYA, S.; TAKAHASHI, T. M.; MCHUGH, T. J.; MAEJIMA, T.; HERLITZE, S.; ABE, M.; SAKIMURA, K.; SAKURAI, T. Orexin modulates behavioral fear expression through the locus coeruleus. **Nature Communications**, v. 8, n. 1606, p. 1 – 14, 2017.

SOYA, S E SAKURAI, T. Orexin as a Modulator of Fear-Related Behavior: Hypothalamic control of noradrenaline circuit. **Brain Research**, v. 1731, n. 146037, p. 1 – 27. 2018.

TERBURG, D.; SCHEGGIA, D.; DEL RIO, R. T.; STEIN, D. J.; STOOP, R.; VAN HONK, J. The Basolateral Amygdala Is Essential for Rapid Escape: A Human and Rodent Study. **Cell**, v. 175, n. 3, p. 723 – 735, 2018.

THANNICKAL, T. C.; MOORE, R. Y.; NIENHUIS, R.; RAMANATHAN, L.; GULYANI, S.; ALDRICH, M.; CORNFORD, M.; SIEGEL, J. M. Reduced number of hypocretin neurons in human narcolepsy. **Neuron**, v. 27, p. 469 – 474, 2000.

VANDERHAVEN, M. W.; CORNISH, J. L.; STAPLES, L. G. The Orexin – 1 receptor antagonist SB-334867 decreases anxiety-like behavior and c-Fos expression in the hypothalamus of rats exposed to cat odor. **Behavioural Brain Research**, v. 278, p. 563 – 568, 2015.

VOGT, B, A. Cingulate cortex in the three limbic subsystem. **Handbook of Clinical Neurology**, v. 166, n. 3, p. 39 – 51. 2019.

WALKER, D. L.; TOUFEXIS, D. J.; DAVIS, M. Role of the bed nucleus of the stria terminalis versus the amygdala in fear, stress, and anxiety. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, p. 199 – 216, 2003.

WANG, A. Y. M.; LEE, P. Y.; BUI, B. V.; JOBLING, A. I.; GREFERATH, U.; BRANDLI, A.; DIXON, M. A.; FINDLAY, Q.; FLETCHER, E. L.; VESSEY, K. A. Potential mechanisms of retinal ganglion cell type-specific vulnerability in glaucoma. **Clinical and Experimental Optometry**, v. 103, n. 5, p. 562 – 571. 2019.

WEI, P.; LIU, N.; ZHANG, Z.; LIU, X.; TANG, Y.; HE, X.; WU, B.; ZHOU, Z.; LIU, Y.; LI, J.; ZHANG, Y.; ZHOU, X.; XU, L.; CHEN, L.; BI, G.; HU, X.; XU, F.; WANG, L. Processing of visually evoked innate fear by a non-canonical thalamic pathway. **Nature Communications**, v. 6, n. 6756, p. 1 – 12, 2015.

WEICKENMEIER, J.; KURT, M.; OZKAYA, E.; WINTERMARK, M.; PAULY, K. B.; KUHL, E. Magnetic resonance elastography of the brain: A comparison between pigs and humans. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 77, p. 702 – 710, 2018.

WILENT, W. B.; OH, M. Y.; BUETEFISCH, C. M.; BAILES, J. E.; CANTELLA, D. ANGLE, C.; WHITING, D. M. Induction of panic attack by stimulation of the ventromedial hypothalamus: Case report. **Journal of Neurosurgery**, v. 112, n. 6, p. 1295 –1298, 2010.

XIONG, X. R.; LIANG, F.; ZINGG, B.; JI, X. Y.; IBRAHIM, L. A.; TAO, H. W.; ZHANG, L. I. Auditory cortex controls sound-driven innate defense behaviour through corticofugal projections to inferior colliculus. **Nature Communications**, v. 6, n. 7224, p. 1 – 12, 2015.

YAKOVLEV, P, I. Motility behavior and the brain: Stereodynamical organization and the neural coordinates of behavior. **Journal of Nervous Mental Disorder.** v. 107, p. 313 – 335, 1948.



## OREXIN 1 AND 2 RECEPTORS IN THE PRELIMBIC CORTEX MODULATE THREAT VALUATION

O artigo escrito para esta dissertação foi redigido conforme as normas da revista *Psychopharmacology*, exceto pelo posicionamento das figuras. De acordo com as normas da revista, para a submissão, é altamente recomendado que sejam submetidas em formato eletrônico, mas, para este momento, visando um melhor entendimento do mesmo, dispusemo-las na sequência textual.

Contudo, posterior à revisão, correções e adequações, o artigo foi submetido e publicado na revista *Neuroscience* (ANEXO II).

Fator de impacto: 3.59 (2020).

## **Orexin 1 and 2 receptors in the prelimbic cortex modulate threat valuation**

Victor P. M. N. Soares<sup>1</sup>, Telma G. C. S. de Andrade<sup>1</sup>, Newton S. Canteras<sup>2</sup>,  
Norberto C. Coimbra<sup>3,4,5</sup>, Carsten T. Wotjak<sup>6,7</sup>, Rafael C. Almada<sup>1,4\*</sup>

<sup>1</sup>*Department of Biological Sciences, São Paulo State University (UNESP), School of Science, Humanities and Languages, Assis, São Paulo, Brazil.*

<sup>2</sup>*Department of Anatomy, Biomedical Sciences Institute, University of São Paulo (USP), São Paulo, Brazil.*

<sup>3</sup>*Department of Pharmacology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo (USP), Ribeirão Preto, Brazil.*

<sup>4</sup>*Behavioural Neuroscience Institute (INeC), São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.*

<sup>5</sup>*NAP-USP-Neurobiology of Emotions Research Centre (NuPNE), Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.*

<sup>6</sup>*RG “Neuronal Plasticity”, Max Planck Institute of Psychiatry, Munich, Germany.*

<sup>7</sup>*Central Nervous System Diseases Research, Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Biberach Riss, Germany*

### **\*Corresponding author:**

Rafael Carvalho Almada, São Paulo State University (UNESP), Department of Biological Science, Assis, 19806-900, São Paulo, Brazil. Phone: +55 18 3302-5858; Email: rc.almada@unesp.br

## **Abstract**

### *Rationale:*

*The ability to distinguish between threatening (repulsors), neutral and appetitive stimuli (attractors) stimuli is essential for survival. The orexinergic neurons of hypothalamus projecting to the limbic structures, such as different subregions of medial prefrontal cortex (mPFC), suggests that the orexinergic mechanism in the prelimbic cortex (PL), subregion of mPFC, is involved in the processing of fear and anxiety.*

### *Objectives and methods:*

*We investigated the role of orexin receptors type 1 (OX<sub>1</sub>R) and type 2 (OX<sub>2</sub>R) in the PL for such processes upon confrontation with an erratically moving robo-beetle in mice.*

### *Results:*

*Selective blockade of OX<sub>1</sub>R and OX<sub>2</sub>R in the PL with SB 334867 (3, 30, 300 nM) and TCS OX2 29 (3, 30, 300 nM), respectively, did not affect general exploratory behavior or reactive fear such as avoidance, jumping or freezing, but significantly enhanced tolerance and approach behavior at the highest dose tested (300 nM) at the large arena.*

### *Conclusion:*

*We interpret these findings as evidence for an altered cognitive appraisal of the threatening stimulus. Consequently, the orexin system seems to bias the perception of stimuli towards danger or threat via OX<sub>1</sub>R and OX<sub>2</sub>R in the PL.*

*Keywords: medial prefrontal cortex; fear; threat; beetle mania task; cognitive judgement bias; anxiety*

## **Introduction**

*The confrontation with novel stimuli and test situations drives decision-making processes to resolve the emerging approach/avoidance conflicts (Paul et al. 2020; Mobbs et al. 2020). Various internal and external factors (Fendt et al. 2020), including proximity to the stimuli (e.g., threat imminence hypothesis; Fanselow & Lester), determine the appraisal of a given situation (Mobbs et al. 2020). Direct confrontation with a real threat such as a venomous snake (Almada et al. 2015b; Coimbra et al. 2017; Paschoalin-Maurin et al. 2018) leaves little space for decision-making. Instead, it activates a set of reflexive defensive responses (e.g., freezing, flight or fight behavior (Blanchard and Blanchard, 1988; Gross and Canteras, 2012), summed up as reactive fear (Mobbs et al. 2020). More ambivalent situations, in contrast, with the simultaneous presence of attractors and repulsors (McNaughton and Corr 2004) may trigger decision making between approach vs. avoidance behavior. With the beetle mania task (BMT), we have recently developed a novel test paradigm, which is based on the confrontation of mice with an erratically moving robo-beetle. Since the robo-beetle might be seen as both predator (repulsors; Almada et al., 2018; Heinz et al., 2017) and prey (attractor; Han et al., 2017), depending on the internal state of the animals (Heinz et al. 2017; Almada et al. 2018), the BMT offers a unique test platform for the pharmacological modification of valuation biases.*

*According to Jeffrey A. Gray's original reinforcement sensitivity theory (Gray and McNaughton 2000), three neural systems control approach vs. avoidance behavior: the Fight, Flight and Freeze System (FFFS), the Behavioral Approach System (BAS) and the Behavioral Inhibition System (BIS) (McNaughton and Corr 2004). According to the authors, the FFFS regulates*

*avoidance from repellent (i.e., threatening) stimuli in a rather reflexive manner, and the BAS the approach of attractive stimuli. The BIS, in turn, handles conflicts between repellent and attractive stimuli and orchestrates goal-directed behavior under threatening situations. More recently, this theoretical framework has been extended by the Constraint system, which is implicated in effortful control and suppresses impulses, thoughts and emotions (Carver 2005; Kennis et al. 2013). Interestingly, despite the diverse neuronal circuitries comprising the four systems, all four systems share the potential involvement of the prefrontal cortex (Kennis et al. 2013), rendering this brain structure an interesting site for pharmacological interventions.*

*The orexin system of the brain represents an emerging target for such interventions. The orexins A and B are hypothalamic peptides (also called hypocretins) and bind to orexin receptor type 1(OX<sub>1</sub>R) and type 2( OX<sub>2</sub>R) (de Lecea et al. 1998; Sakurai et al. 1998). They affect both the positive and the negative valence systems, such as addictive behavior (Hopf 2020), wakefulness (Sakurai 2007; Adamantidis et al. 2007), arousal (Sutcliffe and de Lecea 2002; Sakurai 2014), feeding (Tsujino and Sakurai 2013), emotion and social interaction (Johnson et al. 2010, 2012a; Blouin et al. 2013). Their therapeutic potential is illustrated best by the panicolytic and anxiolytic effects of OX<sub>1</sub>R antagonists in preclinical studies (Summers et al. 2020).*

*In recent years, the orexin system has been implicated in stress, anxiety, fear, and panic-related behavior in rodents (Berridge et al. 2010; Li et al. 2010; Flores et al. 2017) and humans (Strawn et al. 2010; Johnson et al. 2012a). Interestingly, it has been demonstrated that patients with panic anxiety have higher levels of orexin-A in the cerebrospinal fluid compared to people without*

*panic anxiety (Johnson et al. 2010). Silencing the hypothalamic orexin gene product or systemic OX<sub>1</sub>R antagonists blocks the panic responses in rats (Johnson et al. 2010). The intraperitoneal injection OX<sub>1</sub>R antagonist SB 334867 reduced cued and contextual fear memory retrieval (Flores et al. 2014). Thus, recent studies have raised the possibility of OXRs antagonists for therapeutic use to treat anxiety, panic, post-traumatic stress disorder (PTSD) and depression (Sears et al. 2013; Merlo Pich and Melotto 2014; Staton et al. 2018). The function of OXRs is required during the evoking of defensive behaviors and their antagonists act promoting the reduction of excessive such fear responses.*

*Although orexin neurons are strictly located in the lateral hypothalamus (LH), perifornical area (PFA), dorsomedial hypothalamus (DMH), and posterior hypothalamus (Peyron et al. 1998; Nambu et al. 1999), they send prominent projections to autonomic, neuroendocrine and limbic systems (Johnson et al. 2012a; Sakurai 2014; Li and de Lecea 2020), including the medial prefrontal cortex (mPFC), where both OX<sub>1</sub>R and OX<sub>2</sub>R are expressed (Johnson et al. 2012a; Jin et al. 2016). The mPFC can be divided into the anterior cingulate (AC), prelimbic (PL) and infralimbic (IL) cortices and, as stated before, plays an important role in decision making, attention, fear, learning, and memory (Almada et al., 2015b; Carlén, 2017; Matos et al., 2019). Therefore, the mPFC has been implicated in the processing of emotion, and emerged as a central hub the orchestration of avoidance vs. approach behavior and fear responses to distal threats (Mobbs et al. 2007; Mobbs 2018). Despite the anatomical and physiological evidence for a potential involvement of orexins in such processes, surprisingly little is known about the behavioral consequences of orexins at level of the mPFC. Therefore, we studied the effects of pharmacological blockade of*

*OX<sub>1</sub>R and OX<sub>2</sub>R within the PL in the BMT to disentangle consequences on approach/avoidance conflicts and the underlying neural systems FFFS, BAS and BIS in two different contexts with differential emotional loads.*

## **Material and methods**

### **Animals**

*Experiments were performed with male C57BL/6N mice purchased from the Central Animal Facility of Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo. After arriving at the Laboratory of Physiology of Department of Biological Science of São Paulo State University (UNESP) – Campus Assis, mice were group housed (four mice per cage) under standard laboratory conditions (23°C ± 1°C) with a 12:12 light cycle schedule with food and water provided ad libitum. All experiments were performed at an age of 8- to 12-week.*

*The experiments and protocols were approved by the Local Ethics Committee in Animal Experimentation of the UNESP - Campus Assis (CEUA, process number: 002/2019), which is in agreement with the ethical principles in animal research adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and by National Council for Animal Experimentation Control (CONCEA). All efforts were made to reduce the number of used animals and to diminish animal suffering. A total number of 59 animals were used in this study.*

### **Stereotactic surgery**

*Mice were anesthetized with 100 mg/kg ketamine (Ketamine Agener, União Química Farmacêutica Nacional, São Paulo, Brazil) and 10 mg/kg xylazine (Calmun, União Química Farmacêutica Nacional, São Paulo, Brazil) and placed*

*in a stereotaxic frame (Stoelting, IL, USA Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA) for implantation of guide cannulae in the PL. Cannulae (24 gauge, 5 mm lengths) were implanted bilaterally targeting the PL: +1.78 mm anterior-posterior,  $\pm$  0.30 mm medial-lateral, -1.50 mm dorsal-ventral, relative to bregma, accordingly Franklin and Paxinos mouse brain in stereotaxic coordinates atlas (2008). At the end of the surgery, each mouse was treated with an intramuscular injection of penicillin G-Benzatine (120,000 UI; 0.1 ml). The mice were given a 5-day recovery period before the behavioral test.*

### **Drugs and injections**

*The OX<sub>1</sub>R antagonist SB 334867 (3, 30, 300 nM; Tocris, Bristol, UK) and OX<sub>2</sub>R antagonist TCS OX2 29 (3, 30, 300 nM; Tocris, Bristol, UK), were dissolved with 20% DMSO in sterile saline (0.9% NaCl). Concentrations utilized on experimental procedures were based on previous studies (Farahimanesh et al. 2018; Karimi et al. 2019). The vehicle (veh) was composed of 20% DMSO diluted in sterile saline.*

*For local injections, a needle (outer diameter, 0.3 mm) attached by a polyethylene tube (PE-10) to a 5  $\mu$ l syringe (Hamilton, Reno, Nevada, USA) was introduced through the guide cannulae and used to deliver the drugs into the PL using an injector pump (Stoelting, Wood Dale, IL, USA). Each drug and vehicle were injected in a volume of 0.1  $\mu$ l into the PL bilaterally at the rate of 0.5  $\mu$ l / min 10 min before the behavioral test.*

### **Beetle mania task (BMT)**

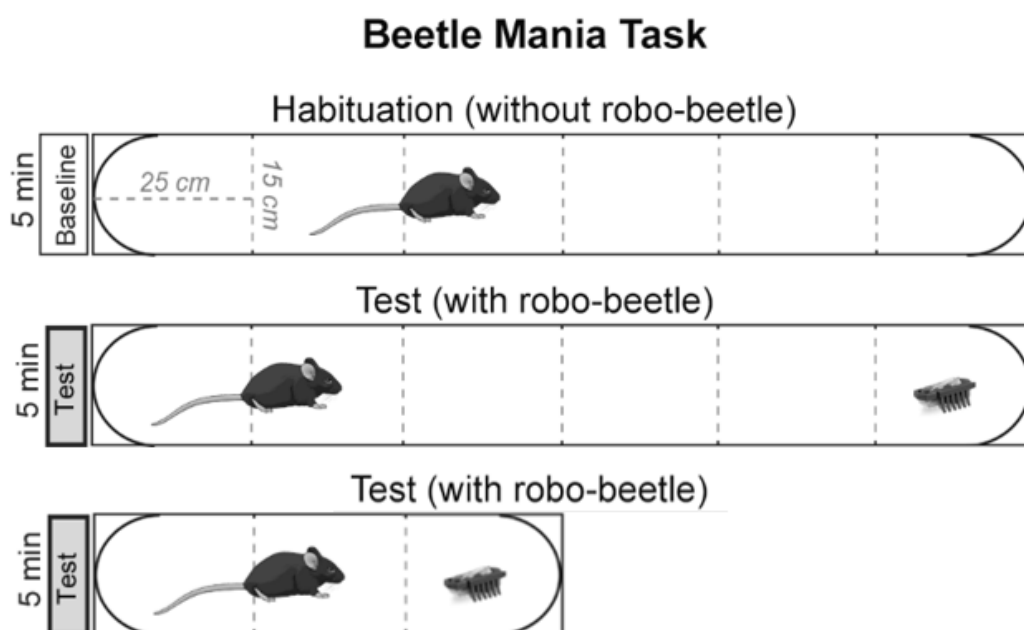
*The beetle mania task (BMT) enables the assessment of active and*



*passive fear responses as well as appetite behavior (Heinz et al. 2017; Almada et al. 2018). The setup (L150 x W15 x H37 cm, grey polyethylene with rounded end walls, Fig. 1) was evenly illuminated with 50 lux white light. The floor was demarcated into six sectors of 25 cm each and a removable wall also made of grey polyethylene (L0,02 x W15 x H37 cm) sectioned the total length of the arena in half of its size when necessary. The BMT was performed in three consecutive phases of five minutes each, the habituation phase without the robo-beetle, the first test phase in the large arena where mice were confronted with the robo-beetle and the test phase in the minor arena, half of the size of the large arena. First, we habituated the animals to the setup and measured vertical (number of rearings) and horizontal exploration (number of sections crossings). Subsequently, we placed an erratically moving robo-beetle (Hexbug Nano, [www.hexbug.com/nano](http://www.hexbug.com/nano), Innovation First Labs, Inc, TX, USA; L4.5 x W1.5 x H1.8 cm, weight: 7.3 g, mean speed: 25 cm/s) far most distant from the mouse (Fig. 1) and the following behaviors were measured: contacts (number of physical contacts between the mice and the robo-beetle), tolerance (number of times the robo-beetle approaches the mouse without exerting a behavioral response normalized to the number of contacts), approach (number or sections the mice followed the robo-beetle in close vicinity), avoidance behavior as the sum of escape response (number of withdrawals with accelerated speed in the direction opposite from the robo-beetle) and flight response (number of withdrawals with the accelerated speed in the same direction as the robo-beetle), freezing duration and number of jumps (Heinz et al. 2017; Almada et al. 2018). Past 5 minutes of the first test phase, the arena was sectioned in half of its size by a removable wall of polyethylene and the same behavioral responses accounted in the first test*

phase were measured. The entire task was recorded by a video camera (Sony Handycam, HDR-SR10, Tokyo, Japan) for subsequent offline ethological analysis by a trained observer who was unaware of the treatment.

Experiments were performed in independent runs with studying behavioral consequences of intra-PL infusion of the  $OX_1R$  antagonist SB 334867 at 3 nM ( $n = 7$ ), 30 nM ( $n = 7$ ) or 300 nM ( $n = 8$ ) vs. vehicle ( $n = 8$ ; veh) in Experiment 1, and of the  $OX_2R$  antagonist TCS OX2 29 at 3 nM ( $n = 6$ ), 30 nM ( $n = 6$ ) or 300 nM ( $n = 10$ ) vs. vehicle ( $n = 6$ ; veh) in Experiment 2.



**Fig. 1.** The BMT consisted of three consecutive 5 min phases. In the habituation phase, mice were allowed to habituate to the arena without the robo-beetle. After 5 minutes of habituation, the test phases initiated. Mice were confronted with an erratically moving robo-beetle, which ended with confrontations in a minor arena post 5 minutes of the first test phase.

## **Histology**

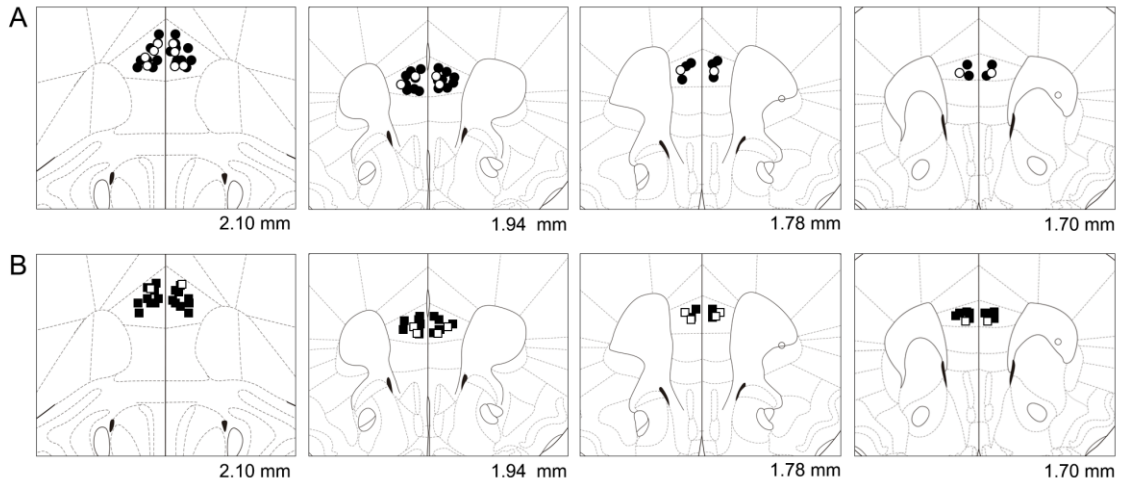
*At the end of the experiments, mice were deeply anesthetized with urethane (1.5 g/kg, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and transcardially perfused with 0.9% saline followed by 4% paraformaldehyde (PFA; pH 7.4; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Brains were removed, post-fixed in 4% PFA overnight, and then immersed in 30% sucrose for cryoprotection. After that, they were sectioned (40  $\mu$  m) a cryostat (CM 1950 Leica, Wetzlar, Germany). The accurate placement of injection cannulas was verified using a photomicroscope (Axioscope 5, Zeiss, Oberkochen, Germany) and injection sites were compared with the atlas Franklin and Paxinos (Keith Franklin and George Paxinos 2008). We excluded all animals with misplaced injection sites from further analysis by experimenters blind to treatment.*

## **Statistics**

*All results are presented as mean  $\pm$  standard error of the mean (S.E.M) and were analyzed by the GraphPad Prism software (version 7.0; GraphPad Software Inc.; San Diego, CA, USA). Statistical significance was defined as  $p \leq 0.05$ . Normality and homogeneity in the sampled distributions were confirmed with the Shapiro-Wilk's test of normality and Bartlett's test of homogeneity of variances. Based on the results of these tests, appropriate parametric tests, one way ANOVA was performed, and Tukey's comparison post hoc test was used to detect significant differences.*

## Results

*Histological verification of the injection sites confirmed the comparability of the different treatments in terms of engagement of the PL (Fig. 2).*



**Fig. 2.** Drawings of cerebrum transverse section across rostro-caudal extensions of the medial prefrontal cortex (mPFC), depicting the representation of the injection sites of the vehicle (○) and SB 334867 (●) (A), vehicle (□) and TCS OX29 (■) (B) in the PL. The number of points in the figure is fewer than the total number of mice because of overlapping injection sites.

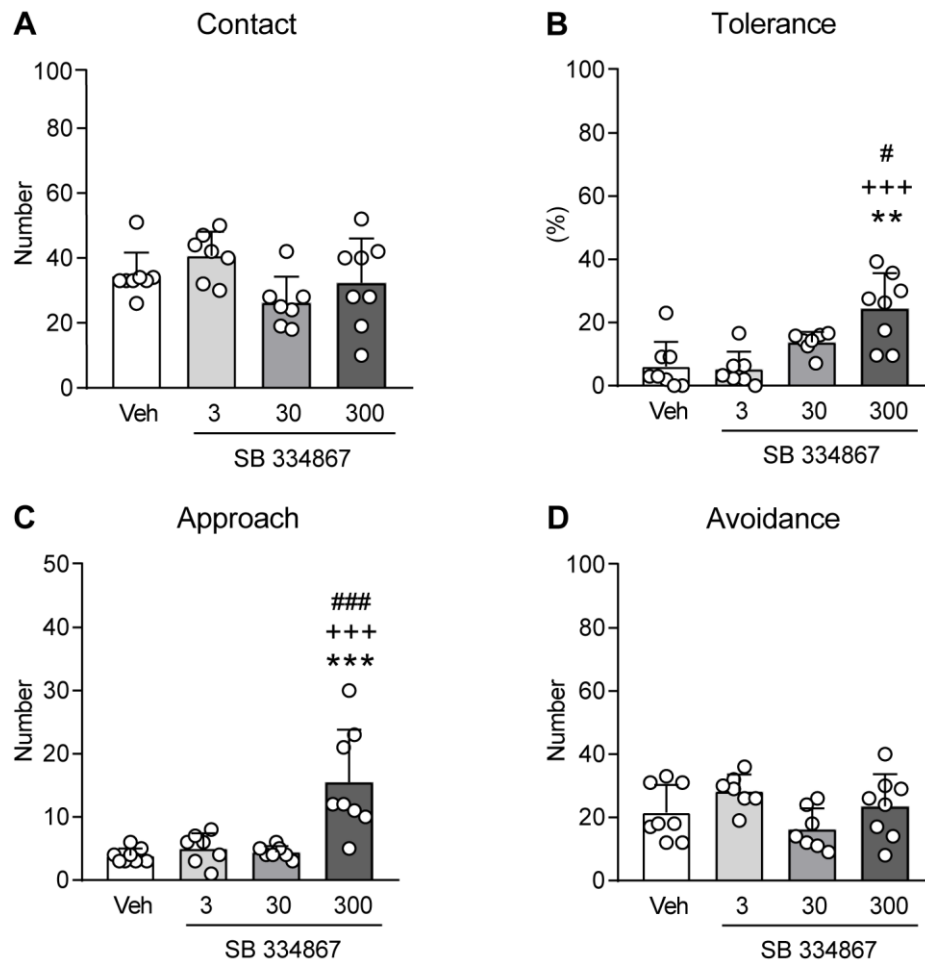
### **Experiment 1.1: OX<sub>1</sub>R antagonist in the PL reduces threat valuation in the large arena**

*To study consequences of the blockade of OX<sub>1</sub>R in the PL on the expression of defensive or appetitive behaviors, we bilaterally injected different doses of SB 334867 into the PL 10 min before exposure to the setup. As shown in Table 1, there were no general effects on exploratory behavior during habituation (i.e., prior to confrontation with the robo-beetle).*

Injection into the PL	Dose	Behaviors			
		Crossings	Statistics	Rearings	Statistics
Vehicle	Veh	112.00 ± 18.61		18.25 ± 4.10	
	3 NM	94.29 ± 10.61	F <sub>3,26</sub> = 0.423	20.86 ± 4.15	F <sub>3,26</sub> = 0.652
	30 NM	112.70 ± 17.68	p = 0.737	23.14 ± 4.35	p = 0.588
	300 NM	119.50 ± 16.13		25.88 ± 3.93	
SB 334867	Veh	135.00 ± 18.44		22.67 ± 3.90	
	3 NM	169.80 ± 17.23	F <sub>3,24</sub> = 1.17	26.33 ± 0.98	F <sub>3,24</sub> = 0.438
	30 NM	153.70 ± 13.44	p = 0.341	23.00 ± 2.43	p = 0.727
	300 NM	165.40 ± 9.03		25.10 ± 2.04	
TCS OX2 29	Veh	112.00 ± 18.61		18.25 ± 4.10	
	3 NM	94.29 ± 10.61	F <sub>3,26</sub> = 0.423	20.86 ± 4.15	F <sub>3,26</sub> = 0.652
	30 NM	112.70 ± 17.68	p = 0.737	23.14 ± 4.35	p = 0.588
	300 NM	119.50 ± 16.13		25.88 ± 3.93	

**Table 1.** Exploratory behavior during the 5-min habituation phase, assessed by the number of crossings and rearings after treatment with the OX<sub>1</sub>R antagonist SB 334867 or the OX<sub>2</sub>R antagonist TCS OX2 29 at the doses of 3, 30, and 300 NM into the PL. Data were analyzed by one-way ANOVA (n = 6-10 per group).

During the subsequent test phase, we confronted the animals with the robo-beetle. All treatment groups had the same number of contacts between robo-beetle and mice ( $F_{3,26} = 2.73$ ,  $p = 0.064$ ; Fig. 3A). The highest dose of the OX<sub>1</sub>R antagonist SB 334867 (300 nM) significantly increased tolerance ( $F_{3,26} = 10.31$ ;  $p = 0.0001$ ; Fig. 3B) and approach behavior ( $F_{3,26} = 27.78$ ;  $p < 0.0001$ ; Fig. 3C). No significant effects were observed on freezing ( $F_{3,26} = 1.219$ ;  $p = 0.323$ ; data not shown), jumping ( $F_{3,26} = 0.371$ ;  $p = 0.774$ ; data not shown) and avoidance behavior ( $F_{3,26} = 2.658$ ;  $p = 0.069$ ; Fig. 3D).

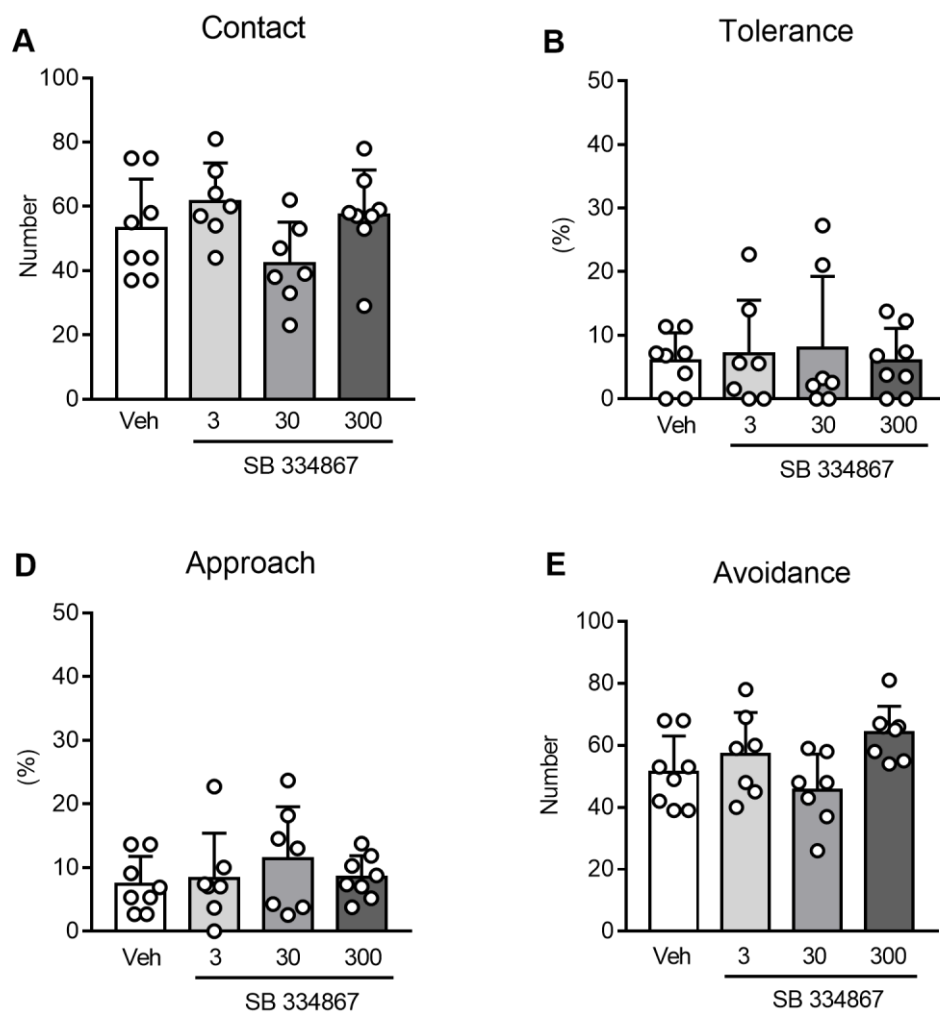


**Fig. 3.** Effects of SB 334867 (3, 30, 300 NM) injections in the PL on (A) number of contacts, (B) tolerance, (C) approach and (D) avoidance behavior upon confrontation with the robo-beetle in the major arena. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. \*  $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  (one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test).

**Experiment 1.2:  $OX_1R$  antagonist in the PL does not modulates defensive behaviors in the minor arena**

Following the exposition of mice to the robo-beetle in the large arena, we further tested if the blockade of  $OX_1R$  could modulate behavioral responses upon a context with more emotional load and looming threat by shortening the size of the large arena, resulting in a context with more exposure of the mice to the robo-

beetle. All treatment groups also had the same number of contacts between robo-beetle and mice ( $F_{3, 26} = 2.61$ ,  $p = 0.072$ ; Fig. 4A) as seen with SB 334867 treatment in the large arena. However, the treatment did not alter the tolerance behavior ( $F_{3, 26} = 0.127$ ,  $p = 0.943$ ; Fig. 4B) and approach behavior ( $F_{3, 26} = 0.628$ ,  $p = 0.603$ ; Fig. 4C). No significant effects were seen on avoidance behavior ( $F_{3, 26} = 3.567$ ,  $p = 0.075$ ; Fig. 4D) freezing duration ( $F_{3, 26} = 2.567$ ,  $p = 0.076$ ; not shown) and jumping ( $F_{3, 26} = 0.324$ ,  $p = 0.807$ ; not shown).

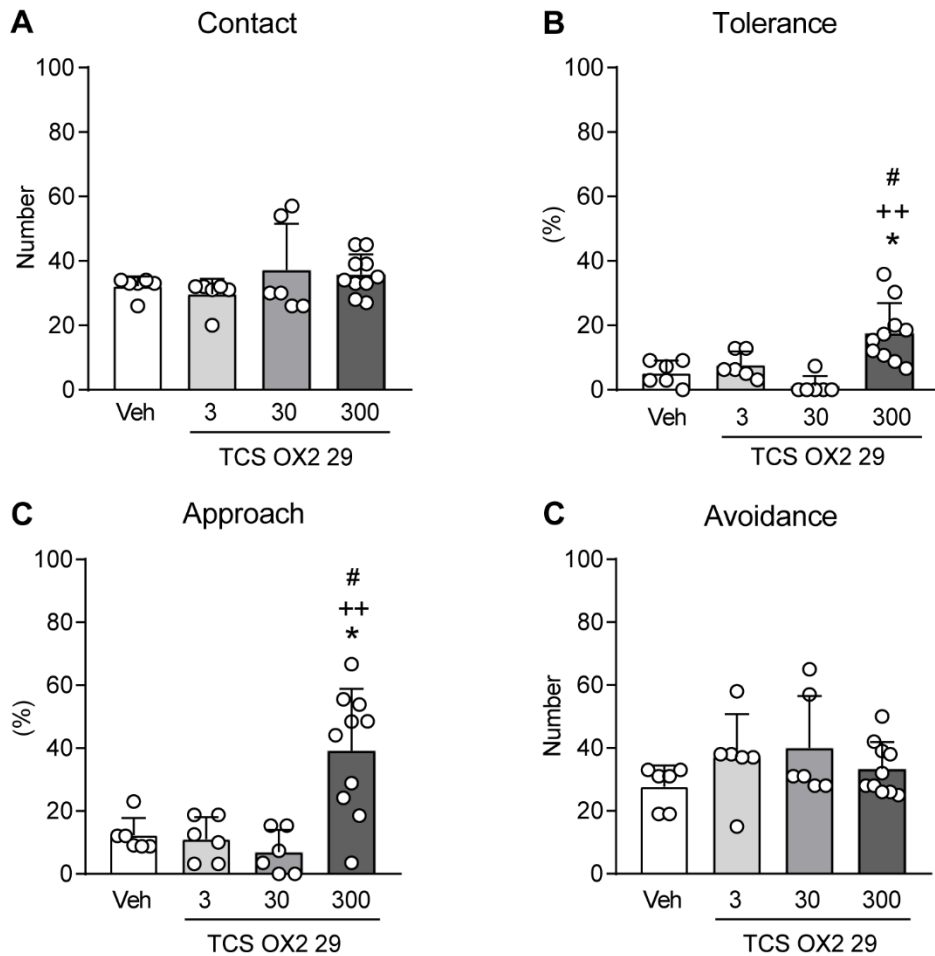


**Fig. 4.** Effects of SB 334867 (3, 30, 300 NM) injections in the PL on (A) number of contacts, (B) tolerance, (C) approach and (D) avoidance behavior upon confrontation with the robo-beetle in the minor arena. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M.

### **Experiment 2.1: OX<sub>2</sub>R antagonist in the PL reduces threat valuation in the large arena**

To study consequences of the blockade of OX<sub>2</sub>R, we bilaterally injected different doses of TCS OX2 29 into the PL before the behavioral test. As for the OX<sub>1</sub>R antagonist, there were no differences in exploratory behavior in the habituation phase (Table 1). Upon the subsequent confrontation with the robo-beetle, treatment with the OX<sub>2</sub>R revealed essentially the same findings as treatment with the OX<sub>1</sub>R in the large arena with mice showing increased tolerance ( $F_{3, 24} = 9.649$ ,  $p = 0.0002$ ; Fig. 5B) and approach behavior ( $F_{3,24} = 10.81$ ,  $p = 0.0001$ ; Fig. 5C) and no significant effects on the number of contacts ( $F_{3, 24} = 1.173$ ,  $p = 0.340$ ; Fig. 5A), freezing duration ( $F_{3,24} = 2.31$ ;  $p = 0.101$ ; not shown), jumping ( $F_{3,24} = 2.089$ ;  $p = 0.128$ ; not shown) and avoidance ( $F_{3,24} = 1.306$ ,  $p = 0.295$ ; Fig. 5D).



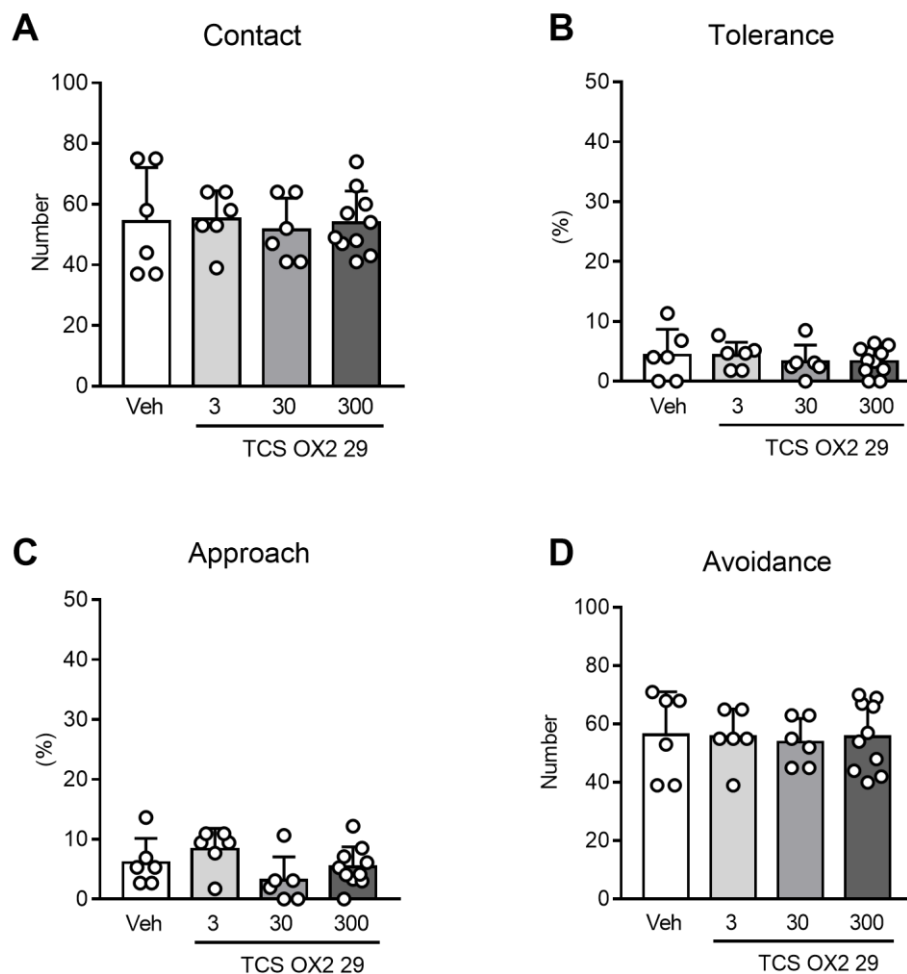


**Fig. 5.** Effects of TCS OX2 29 (3, 30, 300 NM) injections in the PL on (A) number of contacts, (B) tolerance, (C) approach and (D) avoidance behavior upon confrontation with the robo-beetle. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. \*  $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  (one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test).

**Experiment 2.2: OX<sub>2</sub>R antagonist in the PL does not modulates defensive behaviors in the minor arena**

We aimed to see if the blockade of OX<sub>2</sub>R in the PL would modulate defensive responses in a context of more emotional load to mice by segmenting the large arena, and therefore, creating a context of more imminent contact between the mice and the robo-beetle.

Treatment with  $OX_2R$  antagonist had the same findings as the treatment with the  $OX_1R$  antagonist in the minor arena with mice showing no statistical difference of the number of contacts ( $F_{3,24} = 0.100$ ,  $p = 0.958$ ; Fig. 5A), tolerance ( $F_{3,24} = 0.282$ ,  $p = 0.837$ ; Fig. 5B), approach ( $F_{3,24} = 2.091$ ,  $p = 0.128$ ; Fig. 5C), avoidance ( $F_{3,24} = 0.054$ ,  $p = 0.982$ ; Fig. 5D), jumping ( $F_{3,24} = 0.079$ ,  $p = 0.970$ ; not shown) and freezing behavior ( $F_{3,24} = 1,355$   $p = 0.280$ ; not shown),



**Fig. 6.** Effects of TCS OX2 29 (3, 30, 300 NM) injections in the PL on (A) number of contacts, (B) tolerance, (C) approach and (D) avoidance behavior upon confrontation with the robo-beetle in the minor arena. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M.

## **Discussion**

*The present study showed that intra-PL injection of either OX<sub>1</sub>R or OX<sub>2</sub>R antagonists increased the tolerance of the approaching and close following of the bypassing robo-beetle. Other behavioral measures, in contrast, such as basal exploratory activity, number of contacts or active (i.e., avoidance, jumping) and passive defensive responses (i.e., freezing) remained unaffected.*

*We employed local infusion of OX<sub>1</sub>R or OX<sub>2</sub>R antagonists to selectively interfere with orexinergic signaling at level of the PL. Despite histological confirmation of the correct placement of the injection sites and the small injection volume, it is highly unlikely that the action of the antagonist was restricted to the PL (Wanisch and Wotjak 2008). Instead, we have to assume that the antagonists diffused along the guide cannulas to other parts of the mPFC, such as the anterior cingulate cortex. With this in mind, we refrain from ascribing the behavioral consequences of the treatment to the specific engagement of the PL.*

*The fear responses are a natural behavior reaction to threats and unpredictable occurrences in the environment that increases arousal, wakefulness, and prepares the individual to cope in a dangerous situation. It is reasonable to hypothesize that threatening stimuli increase the activity on orexin neurons, consequently will release more orexin in their terminal axons located in brain limbic regions, such as mPFC that regulate the expression of fear-related responses. Contrary to the well-described anxiolytic and panicolytic effects of OX<sub>1</sub>R antagonists after systemic treatment (Johnson et al. 2012b; Merlo Pich and Melotto 2014), intra-PL injections failed to affect defensive avoidance (as the sum of flight or escape behavior) and freezing in both the arenas. We see this as evidence that the regulation of the FFFS by orexins occurs at subcortical levels,*

*such as the amygdala, hypothalamus or midbrain (Johnson et al. 2012a). In support of this conclusion and in accordance to the predator imminence hypothesis (Mobbs et al. 2020), the mPFC seems to get engaged during the confrontation with distal, less explicit threatening stimuli (Mobbs et al. 2007). Direct confrontation with the stimuli such as the robo-beetle, in contrast, reactive fear responses without negligible engagement of the mPFC (Kennis et al. 2013; Mobbs et al. 2020).*

*However, local administration of the OX<sub>1</sub>R antagonist into the PL increased the tolerance upon contact with the robo-beetle. We cannot explain this effect by reduced locomotor activity, which remained unaffected by the treatment. Moreover, it does not simply reflect an increase in passive fear, since freezing behavior remained unaffected, or impaired sensory perception, which would have caused an increase in contacts (Almada et al. 2018). Instead, the increased tolerance seems to result from altered appraisal of the robo-beetle with a shift from threatening (repulsive) to neutral and even rewarding (attractive) valuation. The latter conclusion finds its support in the increased approach behavior, which may not only reflect curiosity, but also the initiation of hunting behavior (Butler 1973; Hoy et al. 2016; Han et al. 2017). It is unlikely that this re-valuation results from increased appetite (i.e., activation of the BAS), since orexin antagonists are expected to reduce rather than increase food intake (Sakurai et al. 1998; Rodgers et al. 2001; Li and de Lecea 2020). Instead, we hypothesize that orexins bias cognitive judgement towards threat perception at level of the mPFC as part of the BIS. At the same time, orexins may reduce the impulse to hunt for the potential prey.*

*Local infusion of an OX<sub>2</sub>R antagonist into the PL revealed essentially the same phenotype as the OX<sub>1</sub>R antagonist. This finding confirms the importance of orexin for valuation of the robo-beetle. However, the similar direction of effects was rather unexpected, given that activation of OX<sub>2</sub>R may have anxiogenic or anxiolytic effects (Furlong et al. 2009; Steiner et al. 2012; Viviani et al. 2014; Chen et al. 2014; Soya and Sakurai 2020). For instance, OX<sub>2</sub>R knockout mice exhibited a decrease in freezing behavior during contextual fear conditioning (Tsuji and Sakurai 2013; Soya and Sakurai 2020). On the contrary, recent works suggest that activation of OX<sub>2</sub>R receptors has anxiolytic and antidepressive consequence, at least in the amygdala or hippocampus, and may exert opposite effects to OX<sub>1</sub>R (Arendt et al. 2013, 2014; Staton et al. 2018). There is evidence indicating that OX<sub>1</sub>R expressed in several regions of the brain plays different roles in fear-related behavior through independent mechanisms, and OX<sub>2</sub>R may also be involved in establishing contextual fear memory, suggesting a further complex mechanism involving the mPFC or other OX<sub>2</sub>R-expressing regions (Soya et al. 2013).*

*We hypothesize that the defensive circuitry allows an individual to adapt its behavior flexibly based on the level of threat imminence since we observed orexin modulation only in the approach and tolerance behavior in the large arena. Several lines of evidence have shown that distal threat elicits activity in the PFC (Fanselow 1994; McNaughton and Corr 2004; Mobbs et al. 2007, 2009; Mobbs 2018), suggesting that the PFC [PL/IL cortex in rodents and the ventromedial PFC (vmPFC) in humans] is involved in deliberative strategizing and distinguishes between safe and aversive locations (Bach and Dayan 2017). Although when the threat becomes proximal, the brain activity shifted from the vmPFC to midbrain structures such as PAG (Mobbs et al. 2007; Tovote et al.*

2016; Motta et al. 2017). Thus, the PL neurons are recruited during the exposition to robo-beetle, consequently the orexin mechanism acts as a modulatory system in such cortical structure. It is worth considering that the PFC contains specific cells that are involved in eliciting and inhibiting defensive behaviors, such as freezing or flight, depends on the threatening situation, mainly via interaction with the amygdala and PAG (Halladay and Blair 2015).

On the other hand, we can not be sure if the antiaversive effects of OXRs antagonists on PL in the large arena was due to: (I) the emotional load of the test situation, once we indeed provoked a context with more imminent contacts among the mice and the robo-beetle; (II) the balance between forebrain and midbrain responses to threat and (III) the familiarity of mice with the test procedure.

Taken together, the results from this study demonstrate that pharmacological blockade of OX<sub>1</sub>R or OX<sub>2</sub>R at level of the mPFC leaves reactive fear responses to a robo-beetle unaffected. At the same time, it diminishes the cognitive judgement bias, resulting in tolerance of the erratically moving object and the emergence of proactive approach behavior. This mode of action is unique compared to consequence of the classical anxiolytic diazepam, which also increased tolerance, but failed to increase approach behavior at all (Heinz et al. 2017). Therefore, pharmacological blockade of OX<sub>1</sub>R and/or OX<sub>2</sub>R may represent an innovative approach for the treatment of cognitive judgement bias, which underlies many anxiety disorders.

## **Funding**

*This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (young investigator program; grant 2018/03898-1). C.T.W GIF (I-1442-421. 13/2017 to CTW). V. P. M. N. Soares is master student supported by CAPES (processes no. 88887.498215/2020-00) and received a technician scholarship from FAPESP (TT-3, process no. 2019/15757-6). R.C. Almada is granted a research fellowship by FAPESP (processes no. 2019/01713-7). Each organization played no further role in the design of the study; the collection, analysis, and interpretation of data; the writing of the report; or the decision to submit the paper for publication.*

## **Compliance with ethical standards**

*The experiments and protocols were approved by the Local Ethics Committee in Animal Experimentation of the UNESP - Campus Assis (CEUA, process number: 002/2019), which is in agreement with the ethical principles in animal research adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and by National Council for Animal Experimentation Control (CONCEA).*

## **Conflict of interest**

*The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential Conflict of interests.*

## Reference

- Adamantidis AR, Zhang F, Aravanis AM, Deisseroth, K, De Lecea, L (2007) Neural substrates of awakening probed with optogenetic control of hypocretin neurons. *Nature* 450:420–4. <https://doi.org/10.1038/nature06310>
- Almada RC, Coimbra NC, Brandão ML (2015a) Medial prefrontal cortex serotonergic and GABAergic mechanisms modulate the expression of contextual fear: intratelencephalic pathways and differential involvement of cortical subregions. *Neuroscience* 284:988–97. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.11.001>
- Almada RC, Genewsky AJ, Heinz DE, Kaplick, PM, Coimbra NC, Wotjack, CT (2018) Stimulation of the nigrotectal pathway at the level of the superior colliculus reduces threat recognition and causes a shift from avoidance to approach behavior. *Front Neural Circuits* 12:36. <https://doi.org/10.3389/fncir.2018.00036>
- Almada RC, Roncon CM, Elias-Filho DH, Coimbra NC (2015b) Endocannabinoid signaling mechanisms in the substantia nigra pars reticulata modulate GABAergic nigrotectal pathways in mice threatened by urutu-cruzeiro venomous pit viper. *Neuroscience* 303:503–514. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.06.048>
- Arendt DH, Hassell J, Li H, Achua JK, Guarnieri DJ, Dileone RJ, Ronan PJ, Summers CH (2014) Anxiolytic function of the orexin 2/hypocretin A receptor in the basolateral amygdala. *Psychoneuroendocrinology* 40:17–26. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2013.10.010>
- Arendt DH, Ronan PJ, Oliver KD, Callahan LB, Summers TR, Summers CH (2013) Depressive behavior and activation of the orexin/hypocretin system. *Behav Neurosci* 127:86–94. <https://doi.org/10.1037/a0031442>
- Bach DR, Dayan P (2017) Algorithms for survival: a comparative perspective on emotions. *Nat Rev Neurosci* 18:311–319. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.35>
- Berridge CW, España RA, Vittoz NM (2010) Hypocretin/orexin in arousal and stress. *Brain Res Brain Res* 1314:91–102. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.09.019>
- Blanchard DC, Blanchard RJ (1988) Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. *Annu Rev Psychol* 39:43–68. <https://doi.org/10.1146/annurev.ps.39.020188.00355>
- Blouin AM, Fried I, Wilson CL, Staba RJ, Behnke EJ, Lam HA, Maidment NT, Karlsson KAE, Lapierre JL, Siegel JM (2013) Human hypocretin and melanin-concentrating hormone levels are linked to emotion and social interaction. *Nat Commun* 4:1547. <https://doi.org/10.1038/ncmms2461>
- Butler K (1973) Predatory behavior in laboratory mice: strain and sex comparisons. *J Comp Physiol Psychol* 85:243–9. <https://doi.org/10.1037/h0035008>
- Carlén M (2017) What constitutes the prefrontal cortex? *Science* 358:478–482.



<https://doi.org/10.1126/science.aan8868>

- Carver CS (2005) *Impulse and constraint: perspectives from personality psychology, convergence with theory in other areas, and potential for integration.* *Personal Soc Psychol Rev* 9:312–333. [https://doi.org/10.1207/s15327957pspr0904\\_2](https://doi.org/10.1207/s15327957pspr0904_2)
- Chen X, Wang H, Lin Z, Li S, Li Y, Bergen HT, Vrontakis ME, Kirouac GJ (2014) *Orexins (hypocretins) contribute to fear and avoidance in rats exposed to a single episode of footshocks.* *Brain Struct Funct* 219:2103–2018. <https://doi.org/10.1007/s00429-013-0626-3>
- Coimbra NC, Paschoalin-Maurin T, Bassi GS, Kanashiro A, Biagioni AF, Felippotti TT, Elias-Filho DH, Mendes-Gomes J, Cysne-Coimbra JP, Almada RC, Lobão-Soares B (2017) *Critical neuropsychobiological analysis of panic attack- and anticipatory anxiety-like behaviors in rodents confronted with snakes in polygonal arenas and complex labyrinths: a comparison to the elevated plus- and T-maze behavioral tests.* *Rev Bras Psiquiatr* 39:72–83. <https://doi.org/10.1590/1516-4446-2015-1895>
- de Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, Gao X, Foye PE, Danielson PE, Fukuhara C, Battenberg EL, Gautvik VT, Bartlett 2nd FS, Frankel WN, van den Pol AN, Bloom FE, Gautvik KM, Sutcliffe JG (1998) *The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity.* *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:322–327. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.1.322>
- Fanselow MS (1994) *Neural organization of the defensive behavior system responsible for fear.* *Psychon Bull Rev* 1:429–438. <https://doi.org/10.3758/BF03210947>
- Farahimanesh S, Karimi S, Haghparast A (2018) *Role of orexin-1 receptors in the dorsal hippocampus (CA1 region) in expression and extinction of the morphine-induced conditioned place preference in the rats.* *Peptides* 101:25–31. <https://doi.org/10.1016/peptides.2017.12.017>
- Fendt M, Parsons MH, Apfelbach R, Carthey AJR, Dickman CR, Endres T, Frank ASK, Heinz DE, Jones ME, Kiyokawa Y, Kreuzmann JC, Roelofs K, Schneider M, Sulger J, Wotjak CT, Blumstein DT (2020) *Context and trade-offs characterize real-world threat detection systems: A review and comprehensive framework to improve research practice and resolve the translational crisis.* *Neurosci Biobehav Rev* 115:25–33. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2020.05.002>
- Flores Á, Herry C, Maldonado R, Berrendero F (2017) *Facilitation of contextual fear extinction by orexin-1 receptor antagonism is associated with the activation of specific amygdala cell subpopulations.* *Int J Neuropsychopharmacol* 20:654–659. <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyx029>
- Flores Á, Valls-Comamala V, Costa G, Saraiva R, Maldonado R, Berrendero F (2014) *The hypocretin/orexin system mediates the extinction of fear memories.* *Neuropsychopharmacology* 39:2732–2741. <https://doi.org/10.1038/npp.2014.146>
- Furlong TM, Vianna DML, Liu L, Carrive P (2009) *Hypocretin/orexin contributes*

- to the expression of some but not all forms of stress and arousal. *Eur J Neurosci* 30:1603–1614. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2009.06952.x>
- Gray JA, McNaughton N (2000) *The Neuropsychology of Anxiety: An enquiry into the function of the septo-hippocampal system*. Oxford University Press. [https://doi.org/10.1016/S0165-0327\(00\)00344-X](https://doi.org/10.1016/S0165-0327(00)00344-X)
- Gross CT, Canteras NS (2012) The many paths to fear. *Nat Rev Neurosci* 13:651–658. <https://doi.org/10.1038/nrn3301>
- Halladay LR, Blair HT (2015) Distinct ensembles of medial prefrontal cortex neurons are activated by threatening stimuli that elicit excitation vs. inhibition of movement. *J Neurophysiol* 114:793–807. <https://doi.org/10.1152/jn.00656.2014>
- Han W, Tellez LA, Rangel MJ, Motta SC, Zhang X, Perez IO, Canteras NS, Shammah-Lagnado SJ, van den Pol AN, de Araujo IE (2017) Integrated control of predatory hunting by the central nucleus of the amygdala. *Cell* 168:311–324.e18. <https://doi.org/10.1016/l.cell.2016.12.027>
- Heinz DE, Genewsky A, Wotjak CT (2017) Enhanced anandamide signaling reduces flight behavior elicited by an approaching robo-beetle. *Neuropharmacology* 126:233–241. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.09.010>
- Hopf FW (2020) Recent perspectives on orexin/hypocretin promotion of addiction-related behaviors. *Neuropharmacology* 168:108013. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.108013>
- Hoy JL, Yavorska I, Wehr M, Niell CM (2016) Vision drives accurate approach behavior during Prey capture in laboratory mice. *Curr Biol* 26:3046–3052. <https://doi.org/10.1016/j.cun.2016.09.009>
- Jin J, Chen Q, Qiao Q, Yang L, Xiong J, Xia J, Hu Z, Chen F (2016) Orexin neurons in the lateral hypothalamus project to the medial prefrontal cortex with a rostro-caudal gradient. *Neurosci Lett* 621:9–14. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.04.002>
- Johnson PL, Molosh A, Truitt WA, Fitz SD, Shekhar A (2012a) Orexin, stress, and anxiety/panic states. *Prog Brain Res* 198:133–61. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59489-1.00009-4>
- Johnson PL, Samuels BC, Fitz SD, Federici LM, Hammes N, Early MC, Truitt W, Lowry CA, Shekhar A (2012b) Orexin 1 receptors are a novel target to modulate panic responses and the panic brain network. *Physiol Behav* 107:733–42. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2012.04.016>
- Johnson PL, Truitt W, Fitz SD, Minick PE, Dietrich A, Sanghani S, Träskman-Bendz L, Goddard AW, Brundin L, Shekhar A (2010) A key role for orexin in panic anxiety. *Nat Med*. <https://doi.org/10.1038/nm.2075>
- Karimi S, Hamidi G, Fatahi Z, Haghparast A (2019) Orexin 1 receptors in the anterior cingulate and orbitofrontal cortex regulate cost and benefit decision-making. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 89:227–235. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2018.09.006>

- Keith Franklin and George Paxinos (2008) *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, Compact, 3rd Edition, 3rd edn.* Academic press, San Diego, California
- Kennis M, Rademaker AR, Geuze E (2013) Neural correlates of personality: An integrative review. *Neurosci Biobehav Rev* 37:73–95. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2012.10.012>
- Li S-B, de Lecea L (2020) The hypocretin (orexin) system: from a neural circuitry perspective. *Neuropharmacology* 167:107993. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.107993>
- Li Y, Li S, Wei C, Wang H, Sui N, Kirouac J (2010) Orexins in the paraventricular nucleus of the thalamus mediate anxiety-like responses in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 212:251–65. <https://doi.org/10.1007/s00213-010-1948-y>
- Matos MR, Visser E, Kramvis I, van der Loo RJ, Gebuis T, Zalm R, Rao-Ruiz P, Mansvelder HD, Smit AB, van den Oever (2019) Memory strength gates the involvement of a CREB-dependent cortical fear engram in remote memory. *Nat Commun* 10:2315. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10266-1>
- McNaughton N, Corr PJ (2004) A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. *Neurosci Biobehav Rev* 28:285–305. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2004.03.005>
- Merlo Pich E, Melotto S (2014) Orexin 1 receptor antagonists in compulsive behavior and anxiety: possible therapeutic use. *Front Neurosci* 8:26. <https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00026>
- Mobbs D (2018) The ethological deconstruction of fear(s). *Curr Opin Behav Sci* 24:32–37. <https://doi.org/10.1016/j.cobeha.2018.02.008>
- Mobbs D, Headley DB, Ding W, Dayan P (2020) Space, time, and fear: survival computations along defensive circuits. *Trends Cogn Sci* 24:228–241. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2019.12.016>
- Mobbs D, Marchant JL, Hassabis D, Seymour B, Tan G, Gray M, Petrovic P, Dolan RJ, Frith CD (2009) From threat to fear: the neural organization of defensive fear systems in humans. *J Neurosci* 29:12236–12243. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2378-09.2009>
- Mobbs D, Petrovic P, Marchant JL, Hassabis D, Weiskopf N, Seymour B, Dolan RJ, Frith CD (2007) When fear is near: threat imminence elicits prefrontal-periaqueductal gray shifts in humans. *Science* 317:1079–1083. <https://doi.org/10.1126/science.1144298>
- Motta SC, Carobrez AP, Canteras NS (2017) The periaqueductal gray and primal emotional processing critical to influence complex defensive responses, fear learning and reward seeking. *Neurosci Biobehav Rev* 76:39–47. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.10.012>
- Nambu T, Sakurai T, Mizukami K, Hoyosa Y, Yanagisawa M, Goto K (1999) Distribution of orexin neurons in the adult rat brain. *Brain Res* 827:243–260. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(99\)01336-0](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(99)01336-0)

- Paschoalin-Maurin T, Dos Anjos-Garcia T, Falconi-Sobrinho LL, de Freitas RL, Cysne-Coimbra JD, Laure CJ, Coimbra NC (2018) The rodent-versus-wild snake paradigm as a model for studying anxiety- and panic-like behaviors: face, construct and predictive validities. *Neuroscience* 369:336–349. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.11.031>
- Paul ES, Sher S, Tamietto M, Winkielman P, Mendl MT (2020) Towards a comparative science of emotion: Affect and consciousness in humans and animals. *Neurosci Biobehav Rev* 108:749–770. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2019.11.014>
- Peyron C, Tighe DK, van den Pol AN, de Lecea L, Heller HC, Sutcliffe JG, Kilduff TS (1998) Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J Neurosci* 18:9996–10015. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-23-09996.1998>
- Rodgers RJ, Halford JCG, Nunes de Souza RL, Canto de Souza AL, Piper DC, Arch JN, Upton N, Porter RA, Johns A, Blundell JE (2001) SB-334867, a selective orexin-1 receptor antagonist, enhances behavioural satiety and blocks the hyperphagic effect of orexin-A in rats. *Eur J Neurosci* 13:1444–1452. <https://doi.org/10.1046/j.0953-816x.2001.01518.x>
- Sakurai T (2007) The neural circuit of orexin (hypocretin): maintaining sleep and wakefulness. *Nat Rev Neurosci* 8:171–181. <https://doi.org/10.1038/nrn2092>
- Sakurai T (2014) The role of orexin in motivated behaviours. *Nat Rev Neurosci* 15:719–731. <https://doi.org/10.1038/nrn3837>
- Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, Williams SC, Richardson JA, Kozlowski GP, Wilson S, Arch JR, Buckingham RE, Haynes AC, Carr SA, Annan RS, McNulty DE, Liu WS, Terrett JA, Elshourbagy NA, Bergsma DJ, Yanagisawa M (1998) Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 92:573–85. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80949-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80949-6)
- Sears RM, Fink AE, Wiggestrand MB, Farb CR, de Lecea L, LeDoux JE (2013) Orexin/hypocretin system modulates amygdala-dependent threat learning through the locus coeruleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:20260–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.1320325110>
- Soya S, Sakurai T (2020) Orexin as a modulator of fear-related behavior: Hypothalamic control of noradrenaline circuit. *Brain Res* 1731:146037. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.11.032>
- Soya S, Shoji H, Hasegawa E, Hondo M, Miyakawa T, Yanagisawa M, Mieda M, Sakurai T (2013) Orexin receptor-1 in the locus coeruleus plays an important role in cue-dependent fear memory consolidation. *J Neurosci* 33:14549–57. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1130-13.2013>
- Staton CD, Yaeger JDW, Khalid D, Haroun F, Fernandez BS, Fernandez JS, Summers BK, Summers BK, Summers TR, Sathyanesan M, Newton SS, Summers CH (2018) Orexin 2 receptor stimulation enhances resilience, while orexin 2 inhibition promotes susceptibility, to social stress, anxiety and

depression. *Neuropharmacology* 143:79–94. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.09.016>

Steiner MA, Lecourt H, Jenck F (2012) The brain orexin system and almorexant in fear-conditioned startle reactions in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* 223:465–475. <https://doi.org/10.1007/s00213-012-2736-7>

Strawn JR, Pyne-Geithman GJ, Ekhtator NN, Horn PS, Uhde TW, Shutter LA, Baker DG, Geraciotti Jr TD (2010) Low cerebrospinal fluid and plasma orexin-A (hypocretin-1) concentrations in combat-related posttraumatic stress disorder. *Psychoneuroendocrinology* 35:1001–1007. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2010.01.001>

Summers CH, Yaeger JDW, Staton CD, Arendt DH, Summers TR (2020) Orexin/hypocretin receptor modulation of anxiolytic and antidepressive responses during social stress and decision-making: Potential for therapy. *Brain Res* 1731:146085. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.12.036>

Sutcliffe JG, de Lecea L (2002) The hypocretins: Setting the arousal threshold. *Nat Rev Neurosci* 3:339–348. <https://doi.org/10.1038/nrn808>

Tovote P, Esposito MS, Botta P, Chaudun F, Fadok JP, Markovic M, Wolff SBE, Ramakrishnan C, Fenno L, Deisseroth K, Herry C, Arber S, Lüthi A (2016) Midbrain circuits for defensive behaviour. *Nature* 534:206–212. <https://doi.org/10.1038/nature17996>

Tsujino N, Sakurai T (2013) Role of orexin in modulating arousal, feeding, and motivation. *Front Behav Neurosci* 7:28. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2013.00028>

Viviani D, Haegler P, Jenck F, Steiner MA (2014) Orexin neuropeptides contribute to the development and persistence of generalized avoidance behavior in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* 232:1383–1393. <https://doi.org/10.1007/s00213-014-3769-x>

Wanisch K, Wotjak CT (2008) Time course and efficiency of protein synthesis inhibition following intracerebral and systemic anisomycin treatment. *Neurobiol Learn Mem* 90:485–94. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2008.02.007>

# ANEXO I – INFLUÊNCIA DE RECEPTORES OREXINÉRGICOS NO CÓRTEX “PRÉ-FRONTAL” NA EXPRESSÃO DE COMPORTAMENTOS RELACIONADOS À ANSIEDADE

## 1. Introdução

Embora a relação entre estresse fisiológico e ansiedade pareça intuitivo, é de extrema complexidade a diferenciação biológica entre estes dois estados.

De fato, é possível que um determinado estímulo estressante ocasione respostas comportamentais relacionadas à ansiedade (XUE et al., 2020; JANCZAREK et al., 2020): Xue *et al.* (2020) demonstraram que a exposição ao odor de um dentre vários os tipos de predadores era capaz de acentuar comportamentos relacionados à ansiedade em roedores submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado (LCE). Esses animais apresentaram diminuição significativa da atividade motora e aumento do período em que permaneceram no braço fechado do LCE. Da mesma maneira, Janczarek *et al.* (2020) demonstraram que a exposição de cavalos domesticados a sons de vocalizações de seus predadores acentuou a taxa de batimentos cardíacos e cortisol na saliva, hormônio este que é associado a respostas fisiológicas relacionadas à ansiedade (FIKSIDAL et al., 2020). Estes dados, embora que breves, demonstram o caráter evolutivo dos comportamentos defensivos relacionados à ansiedade.

O neuropeptídeo orexina é importante na regulação de sistemas neurobiológicos que respondem a um estímulo estressante (GRAFE e BHATNAGAR, 2018). Não obstante, é sabido que diversos neurotransmissores são capazes de modular um comportamento defensivo (ALMADA et al., 2015; CALHOON e TYE, 2015; DEAKIN e GRAEFF, 1991) e não seria diferente com

a orexina (JOHNSON et al., 2010; VANDERHAVEN et al., 2015; SOYA e SAKURAI, 2018).

A administração de orexina A no núcleo central do complexo amigdalóide atenuou em roedores o tempo despendido nos braços abertos do LCE (AVOLIO et al., 2011). Corroborando evidências de que a orexina A poderia modular comportamentos defensivos relacionados à ansiedade, VANDERHAVEN et al., 2015, demonstraram que animais tratados com um antagonista seletivo de receptores orexinérgicos do tipo 1, o SB 334867, aproximavam-se em maior frequência ao odor de seu predador. Algo similar foi observado em um modelo animal modificado geneticamente para a extinção de neurônios orexinérgicos (KHALIL e FENDT, 2017).

A administração de um antagonista seletivo de receptores orexinérgicos do tipo 2, o TCS OX2 29, no ventrículo lateral de roedores, não foi o suficiente para alterar comportamentos defensivos relacionados à ansiedade no LCE (ASADI et al., 2018). Interessantemente, animais *knockout* para OX<sub>2</sub>R no BLA apresentaram comportamentos relacionados à ansiedade mais intensificados do que animais *knockout* para OX<sub>1</sub>R na medida em que diminuíram sua preferência social no teste de defesa social e diminuição do tempo gasto no centro da arena no teste de campo aberto (ARENDETT et al., 2014).

Em especial, o córtex “pré-frontal” medial (mPFC) participa ativamente em papéis relacionados à tomada de decisões, atenção, medo, aprendizado e memória (ALMADA ET AL., 2015; CARLÉN, 2017; MATOS et al., 2019) e recebe, maciçamente, projeções hipotalâmicas de neurônios orexinérgicos (JOHNSON et al., 2012), embora com expressão desigual de receptores orexinérgicos (LI et

al., 2009; CHEN et al., 2006; Marcus et al., 2001): OX<sub>1</sub>R expresso em maiores quantidades do que OX<sub>2</sub>R.

Dessa maneira, o mPFC tem sido associado ao processamento das emoções e como centro controlador de comportamentos vinculados às respostas defensivas relacionadas a ameaças distais (MOBBS et al. 2007; MOBBS, 2018). No entanto, apesar de evidências anatômicas e fisiológicas do envolvimento do mPFC nestes processos, pouco se sabe sobre as influências da orexina em nível de mPFC nos comportamentos defensivos relacionados à ansiedade. Sendo assim, estudamos os efeitos do bloqueio farmacológico de receptores orexinérgicos no mPFC na manifestação de comportamentos defensivos relacionados à ansiedade a partir da exposição de roedores ao teste comportamental do labirinto em cruz elevado que passaram por exposição prévia ao estresse de restrição e posterior bloqueio farmacológico de receptores orexinérgicos. Por fim, a nossa hipótese é que o bloqueio farmacológico de receptores orexinérgicos, principalmente, do tipo 1, no mPFC, atenuará comportamentos relacionados à ansiedade no teste comportamental LCE.

## **2. Material e métodos**

### **2.1. Animais**

Os experimentos foram realizados com camundongos da linhagem C57BL/6N provenientes da instalação central de animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Após a chegada dos animais no Laboratório de Fisiologia da Universidade Estadual de São Paulo (UNESP), *Campus* de Assis, foram agrupados no biotério do laboratório na quantidade de 4 camundongos por gaiola sobre condições padrões laboratoriais



(23°C ± 1°C), com um ciclo de luz 12:12 com início às 7h e, comida e água *ad libitum*. Todos os experimentos foram realizados nos animais com um intervalo etário de 8 a 12 semanas de idade.

Todos os experimentos e protocolos foram aprovados pela comissão local de ética de experimentação animal da UNESP, *Campus* de Assis (número do processo: 002/2019) que se harmoniza com os princípios de pesquisa animal adotados pela comissão nacional do bem estar animal (COBEA) e pelo conselho nacional de controle de experimentação animal (CONCEA).

## **2.2. Cirurgia estereotáxica**

Os camundongos foram anestesiados com cetamina na dose de 100 mg/kg (cetamina Agener, União química Farmacêutica Nacional, São Paulo, Brasil) e 10 mg/kg de xilazina (Calmiun, União química Farmacêutica Nacional, São Paulo, Brasil) e postos no aparato estereotáxico (Stoelting, IL, USA, Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA) com o objetivo da implantação bilateral da cânula-guia (24 x 5 mm) no PL, segundo as seguintes coordenadas: 1,78 mm ântero - posterior, ± 0.30 mm médio - lateral, -1.50 mm dorso - ventral relativo ao Bregma, de acordo com o atlas estereotáxico do encéfalo de camundongo Paxinos e Watson (2008). No final da cirurgia, cada animal recebeu uma injeção intramuscular de penicilina G benzatina (0.1 ml). Os animais foram submetidos a período de 5 dias de recuperação após a cirurgia estereotáxica e início dos testes comportamentais.

### **2.3. Drogas e injeções**

O antagonista seletivo de receptores orexinérgicos do tipo 1 SB 334869 (300 NM; Tocris, Bristol, UK) e o antagonista seletivo de receptores do tipo 2 TCS OX2 29 (300 NM; Tocris, Bristol, UK) foram dissolvidos em DMSO a 20% em salina (0.9% NaCL). As concentrações aqui utilizadas foram baseadas em estudos prévios (FARAHIMANESH et al. 2018; KARIMI et al. 2019) e o veículo (veh) foi composto a partir da solução de 20% de DMSO diluído em salina.

Para injeções locais, uma agulha (diâmetro externo de 0.3mm) fixada a um tubo de polietileno (PE-10) a uma seringa de 5 µL (Hamilton, Reno, Nevada, USA) foi introduzida através da cânula-guia e usada para administrar as drogas utilizadas neste trabalho ao PL a partir de uma bomba injetora (Stoelting, Wood Dale, IL, USA). As drogas e o veículo foram injetados no PL bilateralmente em um volume de 0.1 µL em uma faixa de 0.5 µL/min 10 minutos antes do teste comportamental, após 30 min do procedimento do estresse de restrição.

### **2.4. Labirinto em cruz elevado**

O aparato é feito de polietileno cinza e consiste de dois braços abertos opostos (30 x 5 cm) cercados por barreiras de acrílico de 1 cm de altura, dois braços fechados cercados por paredes altas (30 x 5 x 14 cm), conectados a uma plataforma central (5 x 5 cm) formando uma cruz, sendo EPM 50 cm elevado do chão (*Master-One* Suprimentos e Equipamentos para laboratório LTDS, Ribeirão Preto, SP, Brasil).

## **2.5. Estresse de restrição**

O aparato consiste em um tubo de acrílico transparente (11 cm de comprimento x 2 cm de diâmetro interno e 5 furos laterais de 0,5 cm de diâmetro para ventilação) (*Master-One* Suprimentos e Equipamentos para laboratório LTDS, Ribeirão Preto, SP, Brasil).

## **2.6. Histologia**

No final dos experimentos, os camundongos foram anestesiados com uretana (1,5 g/kg, Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, USA) e perfundidos transcardicamente com solução salina de 0,9% de concentração, seguido por paraformaldeído a 4% (PFA; pH 7,4; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Os encéfalos foram removidos e armazenados em solução de paraformaldeído a 4% por um período de dois dias e, posteriormente, inseridos em de sacarose a a 30% para crioproteção. Após estes procedimentos, os encéfalos foram seccionados em fatias de 40 µm utilizando um criostato (CM 1950 Leica, Wetzlar, Germany). As posições das injeções no PL foram mensuradas utilizando um microscópio óptico (Axioscope 5, Zeiss, Oberkochen, Germany) e comparadas com o atlas anatômico encefálico Franklin and Paxinos (FRANKLIN e PAXINOS, 2008). Todos os animais que apresentaram injeções em outras estruturas anatômicas que não o PL foram excluídos da análise estatística.

## **2.7. Estatística**

Todos os resultados foram apresentados como média e  $\pm$  erro padrão da media (E.P.M) e foram analisados pelo *software* GraphPad Prism (versão 7;

*GraphPad Software Inc.*; San Diego, Califórnia, EEUU). Diferenças estatísticas foram definidas como  $p \leq 0,05$ . A normalidade e homogeneidade dos dados foram confirmadas com os testes de Shapiro-Wilk e Bartlett, respectivamente. Os dados foram, pois, submetidos a uma análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste *post hoc* de Tukey.

## **2.8. Procedimento experimental**

Cinco dias após a cirurgia estereotáxica, os animais foram divididos em grupos independentes: (i) sem estresse de restrição e (ii) com estresse de restrição. Vinte quatro horas antes de serem submetidos ao labirinto em cruz elevado (EPM), grupos independentes de animais foram submetidos a um episódio de 4h de estresse de restrição. Vinte quatro horas após o estresse de restrição os camundongos foram inseridos no aparato em sua região central de compartilhamento mútuo após dez minutos da injeção dos antagonistas de orexina no PL em suas respectivas concentrações e foi mensurado o número de entradas nos braços fechados, isto é, quando o animal adentrava com os quatros membros no braço fechado, número de entradas no braço aberto, quando o animal adentrava com os quatros membros no braço aberto, o tempo gastos nestes segmentos do aparato e, o tempo que passou imóvel com um limiar de início de 2 segundos, durante o período de 5 minutos.

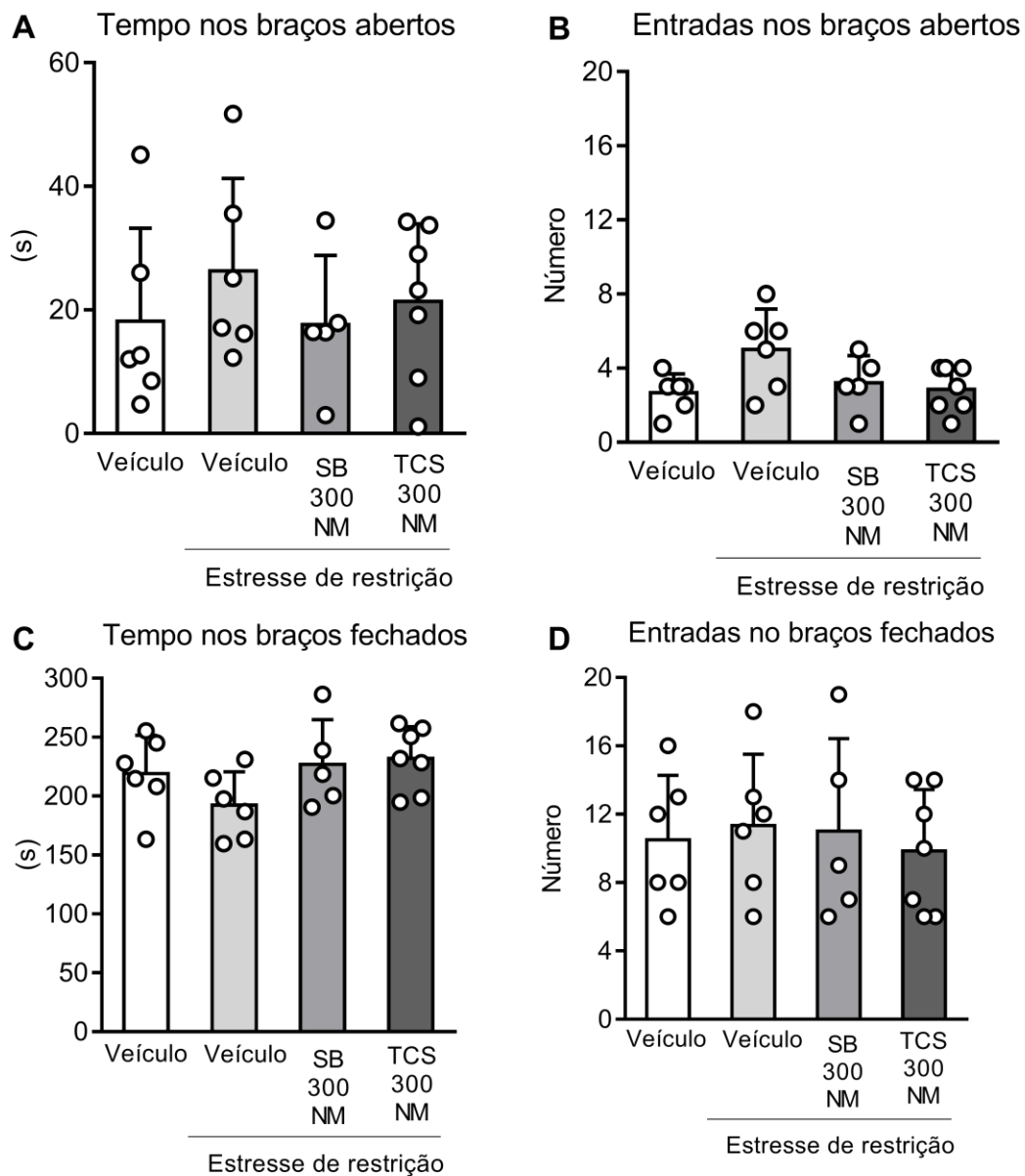
Os animais passaram por um período de 30 minutos no aparato com o objetivo de habituação, um dia antes da exposição ao teste e estresse de restrição. Todos os testes foram gravados para posterior análise de maneira mais fidedigna.

### **3. Resultados**

#### **3.1. Papel do bloqueio farmacológico de receptores orexinérgicos no PL na ansiedade**

Para se avaliar as consequências do bloqueio farmacológico de receptores orexinérgicos do tipo 1 e 2 na manifestação de comportamentos defensivos relacionados à ansiedade, injetaram-se, bilateralmente, diferentes doses de SB 334867 e TCS OX2 29 no PL, 10 min antes da exposição dos animais ao teste comportamental do labirinto em cruz elevado.

Durante a fase de testes, não se observou diferença estatisticamente significativa do bloqueio farmacológico de receptores orexinérgicos do tipo 1 e tipo 2 nas diferentes concentrações de SB 334867 e TCS OX2 29, respectivamente, no PL no tempo despendido pelos animais nos braços abertos ( $p = 0.634$ , figura 1A) e no número de entrada dos animais nos braços abertos ( $p = 0.1816$ , figura 1B). De maneira semelhante, não se observou diferença estatística significativa para o tempo despendido pelos animais nos braços fechados ( $p = 0.1517$ , figura 1C) e no número de entrada dos animais nos braços fechados ( $p = 0.9591$ , figura 1D).



**Fig.1.** Efeitos do tratamento do córtex pré-límbico, uma sub-região do córtex “pré-frontal” medial, com o antagonista de receptores orexinérgicos do tipo 1 (SB 334867; 300 NM/0,1  $\mu$ l/lado) e do tipo 2 (TCS OX2 29; 300 NM/0,1  $\mu$ l/lado) de camundongos previamente expostos a 4 horas de estresse de restrição e vinte quatro horas depois submetidos ao labirinto em cruz elevado (LCE). (A) Tempo de permanência nos braços abertos, (B) número de entradas nos braços aberto do LCE, (C) tempo de permanência nos braços fechados, (D) número de entradas nos braços fechados do LCE. As colunas representam médias e as barras o EPM. Os resultados foram submetidos à ANOVA de uma via, seguido pelo teste *post hoc* de Tukey. N = 6 por grupo. (s): segundos.

#### **4. Discussão**

O teste do labirinto em cruz elevado é utilizado como medida para mensuração de comportamentos relacionados à ansiedade em roedores, na medida em que é baseado à aversão inata destes animais a lugares abertos e elevados. Em teoria, animais menos ansiosos tendem a passar um maior período e adentrar nos braços abertos com maior frequência, enquanto que animais mais ansiosos tendem a passar maior período nos braços fechados (KRAEUTER et al., 2018)

Animais submetidos aos diferentes tratamentos aqui utilizados demonstraram maior preferência aos braços fechados, indicando, dessa maneira, ótima funcionalidade do modelo experimental, assim como evidenciam diversos outros trabalhos (KRAEUTER et al., 2018; ARI et al., 2019; YOSHIZAKI et al., 2020). No entanto, o protocolo de estresse de restrição falhou em provocar estado emocional de ansiedade mais elevado.

De fato, o estresse de restrição motora agudo é suficiente para acentuar estado de ansiedade em animais submetidos a este protocolo experimental (SOUSA et al., 2018; CIOATO et al., 2010; RAVIZZONI et al., 2007). Souza et al (2018) demonstraram que o estresse de restrição por um período de 4h foi capaz de acentuar o estado emocional de ansiedade em camundongos quando submetidos ao LCE, uma vez que o número de entradas e tempo despendido pelos animais nos braços fechados aumentou. De maneira semelhante, Cioato et al (2010) e Ravizzoni et al (2007) verificaram que a restrição motora de apenas 1h em animais submetidos ao estresse de restrição motora é capaz de acentuar o estado emocional de animais no LCE.

Estas evidências nos levam a crer que a incapacidade de acentuar o estado emocional de ansiedade do modelo animal empregado neste estudo seja proveniente da linhagem animal utilizada. Animais da linhagem C57BL/6N são utilizados com frequência alta em trabalhos cujo foco é a investigação de comportamentos relacionados à ansiedade (MARTIN e BROWN, 2010; COSTA et al., 2013; ZHU et al., 2014; MARCHETTE et al., 2018); no entanto, diversos autores comparam a linhagem C57BL/6N com outras linhagens (BROOKS et al., 2005; XUE-LEN et al., 2011; MEZIANE et al., 2007; MARCHETTE et al., 2018) e concluíram que esta linhagem apresenta menos fenótipos relacionados à ansiedade no teste do LCE e do campo aberto.

Em uma outra linha de pensamento, é possível que o protocolo experimental do estresse de restrição motora agudo fosse alterado para a exposição do animal ao LCE imediatamente após o término do período de restrição. Em todo o caso, novas investigações serão necessárias para se identificar a relação entre o resultado obtido e o protocolo experimental aqui empregado.

O córtex “pré-frontal” participa do processamento das emoções e da cognição. Neste trabalho, injetaram-se diversas concentrações de antagonistas de receptores orexinérgicos do tipo 1 e 2, o SB 334867 e o TCS OX2 29, respectivamente, bilateralmente no mPFC. Embora não tenham se observado alterações nos comportamentos relacionados à ansiedade no LCE, principalmente em decorrência da incapacidade de acentuar a ansiedade nos animais submetidos ao estresse de restrição, utilizando o modelo animal de estresse único prolongado (SPS) para estresse pós-traumático, modelo animal que apresenta altos níveis de ansiedade (LISIESKI et al., 2018) e, concentração



de receptores orexinérgicos do tipo 1 no mPFC mais elevada (HAN et al., 2021), Han et al (2021) demonstraram que a administração de orexina A por via intracerebroventricular reinstaurou a homeostase, a concentração de receptores orexinérgicos do tipo 1 no mPFC e atenuou comportamentos relacionados à ansiedade no LCE, indicando que o sistema orexinérgico do mPFC participa da regulação da ansiedade.

Nesta direção, novas investigações deverão ser realizadas acerca do papel dos mecanismos orexinérgicos no mPFC na expressão da ansiedade.

## 5. Referências

ALMADA, R. C.; COIMBRA, N. C.; BRANDÃO, M. L. Medial prefrontal cortex serotonergic and GABAergic mechanisms modulate the expression of contextual fear: Intratelencephalic pathways and differential involvement of cortical subregions. **Neuroscience**, v. 284, p. 988 – 997. 2015.

ARENDDT, D. H.; HASSEL, J.; LI, H.; ACHUA, J. K.; GUARNIERI, D. J.; DILEONE, R. J.; RONAN, P. J.; SUMMERS, C. H. Anxiolytic function of the orexin 2/hypocretin A receptor in the basolateral amygdala. **Psychoneuroendocrinology**, v. 40, n. 1, p. 17 – 26, 2014.

ARI, C.; D'AGOSTINO, D, P.; DIAMOND, D, M.; KINDY, M.; PARK, C.; KOVÁCS, Z. Elevated plus maze test combined with video tracking software to investigate the anxiolytic effect of exogenous ketogenic supplements, **Journal of Visualized Experiments**, v. 143, p. 1 – 10, 2019.

ASADI, S.; ROOHBAKHSH, A.; SHAMSIZADEH, A.; FEREDONI, M.; KORDIJAZ, E.; MOGHIMI, A. The effect of nitracerebroventricular administration of orexin receptor type 2 antagonist on pentylentetrazol-induced kindled seizures and anxiety in rats. **BMC Neuroscience**, v. 19, n. 49, p. 1 – 8, 2018.

AVOLIO, E.; ALÒ, R.; CARELLI, A, CANONACO, M. Amygdalar orexnergic-GABAergic interactions regulate anxiety behaviors of the Syrian golden hamster. **Behavioral Brain Research**, v. 218, p. 288 – 295, 2011.

BROOKS, S, P.; PASK, T.; JONES, L.; DUNNET, S, B. Behavioral profiles of inbred mouse strains used as transgenic backgrounds. **Genes, Brains and Behavior**, v. 4, p. 307 – 307, 2005.

CALHOON, G. G.; & TYE, K. M. Resolving the neural circuits of anxiety. **Nature Neuroscience**, v. 18 n. 10, p. 1394 – 1404. 2015.

CIOATO, S, G.; SOUZA, A.; MEDEIROS, L.; ROSISKY, J, R.; SCARABELOT, V.; DOS SANTOS, V, S.; HIDALGO, M, P.; CAUMO, W.; TORRES, I, L, D. Estresse por restrição em ratos altera o padrão temporal de comportamentos do tipo ansioso, **Clinical and Biomedical Research**, v. 30, p. 4 – 8, 2010.

CHEN, J.; KARTERIS, E.; COLLINS, D.; RANDEVA, H, S. Differential expression of mouse orexin receptor type-2 (OX2R) variants in the mouse brain. **Brain Research**, v, 1103, p. 20 – 24, 2006.

COSTA, A, P, R.; VIEIRA, C.; BOHNER, L, O, L.; SILVA, C, F.; SANTOS, E, C, S.; DE LIMA, T, C, M.; LINO-DE-OLIVEIRA, C. A proposal for refining the forced swim test in Swiss mice, **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 45, p. 150 – 155, 2013.

DEAKIN, J. F. W.; GRAEFF, F. G. CRITIQUE: 5-HT and mechanisms of defence. **Journal of Psychopharmacology**, v. 5, n. 4, p. 305 – 315, 1991.

FARAHIMANESH, S.; KARIMI, S.; HAGHPARAST, A. Role of orexin-1 receptors in the dorsal hippocampus (CA1 region) in expression and extinction of the morphine-induced conditioned place preference in the rats. **Peptides**, v. 101, p. 25 – 31, 2018

FIKSIDAL, A.; HANLIN, L.; GIANFERANTE, D.; CHEN, X.; THOMA, M, V.; ROHLEDER, N. Association between symptoms of depression and anxiety and cortisol responses to and recovery from acute stress, **Psychoneuroendocrinology**, v. 102, p. 44 – 52, 2019.

FRANKLIN, F.; PAXINOS, G. The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. 3<sup>o</sup>

edição, **Academic press**, San Diego, California, 2008.

GRAFE, L, A.; BHATNAGAR, S. Orexins and stress, *Frontiers in Neuroendocrinology*, v. 51, p. 132 – 145, 2018.

HAN, D.; SHI, Y.; HAN, F. The effects of orexin-A and orexin receptors on anxiety – and depression – related behaviors in a male rat model of post-traumatic stress disorder. *Journal of Comparative Neurology*, 2021.

JANCZAREK, I.; STACHURSKA A.; KEDZIERSKI, W.; WISNIEWSKA, A.; RYZAK, M.; KOZIOL, A. The intensity of physiological and behavioral responses of horses to predator vocalizations, *BMC Veterinary Research*, v. 16, n. 31, p. 1 – 12, 2020.

JOHNSON, P. L.; SAMUELS, B. C.; FITZ, S. D.; FEDERICI, L. M.; L. M.; HAMMES, N.; EARLY, M. C.; TRUITT, W.; LOWRY, C. A.; SHEKHAR, A. Orexin 1 receptors are a novel target to modulate panic responses and the panic brain network. *Physiology and Behavior*, v. 107, n. 5, p. 733 – 742, 2010.

JOHNSON, P. L.; MOLOSH, A.; TRUITT, W. A.; FITZ, S. D.; SHEKHAR, A. Orexin, stress, and anxiety/panic states. *Progress in Brain Research*, v. 198, p. 133 – 161, 2012.

KARIMI, S.; HAMIDI, G.; FATAHI, Z.; HAGHPARAST, A. Orexin 1 receptors in the anterior cingulate and orbitofrontal cortex regulate cost and benefit decision-making. *Progress Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry*, v. 8, n. 89, p. 227 – 235, 2019.

KHALIL, R.; FENDT, M. Increased anxiety but normal fear and safety learning in orexin-deficient mice. *Behavioural Brain Research*, v. 320, p. 210 – 218, 2017.

KRAEUTER, A, N.; GUET, P, C.; SARNYAI, Z. The elevated plus maze test for measuring anxiety-like behavior in rodents. *Method in Molecular Biology*, v. 1916, p. 69 – 74, 2019.

KOLB, B. Functions of the frontal cortex of the rat: a comparative review. *Brain Research Review*, v. 8, p. 68 – 98. 1984.

LI, B.; CHEN, F.; YE, J.; CHEN, X.; YAN, J.; LI, Y.; XIONG, Y.; ZHOU, Z.; XIA, J.; HU, Z. The modulation of orexin A on HCN currents of pyramidal neurons in mouse prelimbic cortex. **Cerebral Cortex**, v. 20, p. 1756 – 1767, 2009.

LISIESKI, M, J.; EAGLE, A, L.; CONTI, A, C.; LIBERZON, I.; PERRINE, S, A. Single-rolonged stress: a review of two decades of progress in a rodent model post-traumatic stress disorder. **Frontiers in Psychiatry**, v. 9, p. 1 – 22, 2018.

MARCHETTE, R, C, N.; BICCA, M, A.; SANTOS, E, C, S.; DE LMA, T, C, M. Distinticve stress sensitivity and anxiety-like behavior in female mice: strain differences matter, **Neurobiology of Stress**, v. 9, p. 55 – 63, 2018.

MARCUS, J, N.; ASCHKENASI, C, J.; LEE, C, E.; CHEMELLI, R, M.; SAPER, C, B.; YANAGISAWA, M.; ELMQUIST, J, K. Differential expressioni of orexin receptors 1 and 2 in the rat brain. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 435, p. 6 – 25, 2001.

MARTIN, A.; BROWN, R, E. The lonely mouse: verification of a separation-induced model of depression in female mice, **Behavioral Brain Research**, v. 207, p. 196 – 207, 2010.

MEZIANE, H.; OUAGAZZAL, A, M.; AUBERT, A.; WIETRZYCH, M.; KREZEL, W. Estrous cycle effects on behavior of C57BL/6 and BALB/cByJ female mice; implications for phenotyping strategies. **Genes, Brain and Behavior**, v. 6, p. 192 – 200, 2007.

SOUSA, S, S, S.; BIRMANN, P, T.; BALAGUEZ, R.; ALVES, D.; BRÜNING, C, A.; SAVEGNAGO, L.  $\alpha$ -(phenylselanyl) acetophenone abolishes acute restraint stress inducedcomorbid pain, depression and anxiety-related behaviors in mice. **Neurochemistry Internatioal**, v. 120, p. 112 – 120, 2018.

SOYA, S E SAKURAI, T. Orexin as a Modulator of Fear-Related Behavior: Hypothalamic control of noradrenaline circuit. **Brain Research**, v. 1731, n. 146037, p. 1 – 27. 2018

VANDERHAVEN, M. W.; CORNISH, J. L.; STAPLES, L. G. The Orexin – 1 receptor antagonist SB-334867 decreases anxiety-like behavior and c-Fos expression in the hypothalamus of rats exposed to cat odor. **Behavioural Brain Research**, v. 278, p. 563 – 568, 2015.

XIU-LEN, A.; ZOU, J, X.; WU, R, Y.; YANG, Y.; TAI, F, D.; ZENG, S, Y.; JIA, R.; ZHANG, X.; LIU, E, Q.; BRODERS, H. Strain and sex differences in anxiety-like and social behaviors in C57BL/6 and BALB/cJ mice. **Experimental Analysis**, v. 60, n. 2, p. 11 – 123, 2010.

XUE, B.; XUE, J.; YU, Y.; WEI, SG.; BELTZ, T, G.; FELDER, R.B.; JOHNSON, A.K. Predator scent-induced sensitization of hypertension and anxiety-like behaviors. **Cellular and Molecular Neurology**, p. 1 – 12, 2020.

YOSHIZAKI, K.; ASAI, M.; HARA, T. High-Fat Diet Enhances Working Memory in the Y-Maze Test in Male C57BL/6J Mice with Less Anxiety in the Elevated Plus Maze Test, **Nutrients**, v. 12, n. 2036, p. 1 – 9, 2020.

ZHU, S.; SHI, R.; WANG, J.; WANG, J, F.; LI, X, M. Unpredictable chronic mild stress not chronic restraint stress induces depressive behaviors in mice, **Neuro Report**, v. 25, n. 14, p. 1151 – 1155, 2014.

## Orexin 1 and 2 Receptors in the Prelimbic Cortex Modulate Threat Valuation

Victor P. M. N. Soares,<sup>a</sup> Telma G. C. S. de Andrade,<sup>a</sup> Newton S. Canteras,<sup>d</sup> Norberto C. Coimbra,<sup>c,e,f</sup> Carsten T. Wotjak<sup>b,g</sup> and Rafael C. Almada<sup>a,g\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Biological Sciences, School of Sciences, Humanities and Languages of the São Paulo State University (UNESP), Assis, São Paulo, Brazil

<sup>b</sup> Neuronal Plasticity Research Group, Max Planck Institute of Psychiatry, Munich, Germany

<sup>c</sup> Department of Pharmacology, Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo (FMRP-USP), Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

<sup>d</sup> Department of Anatomy, Biomedical Sciences Institute of the University of São Paulo (ICB-USP), São Paulo, São Paulo, Brazil

<sup>e</sup> Behavioural Neuroscience Institute (INeC), Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

<sup>f</sup> NAP-USP-Neurobiology of Emotions Research Centre (NuPNE), Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

<sup>g</sup> Central Nervous System Diseases Research, Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals Die Gesellschaft mit Beschränkter Haftung & Compagnie Kommanditgesellschaft, Biberach Riss, Germany

**Abstract**—The ability to distinguish between threatening (repulsors), neutral and appetitive stimuli (attractors) stimuli is essential for survival. The orexinergic neurons of hypothalamus send projections to the limbic structures, such as different subregions of the medial prefrontal cortex (mPFC), suggesting that the orexinergic mechanism in the prefrontal cortex (PL) is involved in the processing of fear and anxiety. We investigated the role of orexin receptors type 1 (OX<sub>1</sub>R) and type 2 (OX<sub>2</sub>R) in the PL in such processes upon confrontation with an erratically moving robo-beetle in mice. The selective blockade of OX<sub>1</sub>R and OX<sub>2</sub>R in the PL with SB 334867 (3, 30, 300 nM) and TCS OX2 29 (3, 30, 300 nM), respectively, did not affect general exploratory behavior or reactive fear such as avoidance, jumping or freezing, but significantly enhances tolerance and approach behavior at the highest dose of each antagonist tested (300 nM). We interpret these findings as evidence for an altered cognitive appraisal of the potential threatening stimulus. Consequently, the orexin system seems to bias the perception of stimuli towards danger or threat via OX<sub>1</sub>R and OX<sub>2</sub>R in the PL. © 2021 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Key words:** medial prefrontal cortex, orexin receptors, fear, beetle mania task, cognitive judgment bias, anxiety.

### INTRODUCTION

The confrontation with novel stimuli and test situations drives decision-making processes to resolve the emerging approach/avoidance conflicts (Mobbs et al., 2020; Paul et al., 2020). Various internal and external factors (Fendt et al., 2020), including proximity to the stimuli (e.g., threat imminence hypothesis; Fanselow & Lester), determine the appraisal of a given situation (Mobbs

et al., 2020). Direct confrontation with a real threat such as a venomous snake (Almada et al., 2015; Almada and Coimbra, 2015; Coimbra et al., 2017a; Paschoalin-Maurin et al., 2018) leaves little space for decision-making. Instead, it activates a set of reflexive defensive responses (e.g., freezing, flight or fight behavior (Blanchard and Blanchard, 1988; Gross and Canteras, 2012), summed up as reactive fear (Mobbs et al., 2020). More ambivalent situations, in contrast, with the simultaneous presence of attractors and repulsors (McNaughton and Corr, 2004) may trigger decision-making between approach versus avoidance behavior. We have recently developed a novel test paradigm, the beetle mania task (BMT), which is based on the confrontation of mice with an erratically moving robo-beetle. Since the robo-beetle might be seen as both predator (repulsors) (Heinz et al., 2017; Almada et al., 2018) and prey (attractor) (Han et al., 2017), depending on the internal

\*Correspondence to: R. C. Almada, Department of Biological Sciences, School of Sciences, Humanities and Languages of the São Paulo State University (UNESP), Assis, 19806-900 São Paulo, Brazil.

E-mail address: rc.almada@unesp.br (R. C. Almada).

**Abbreviations:** BAS, behavioral approach system; BIS, behavioral inhibition system; BMT, beetle mania task; DMH, dorsomedial hypothalamus; FFFS, fight, flight and freeze system; LH, lateral hypothalamus; PAG, periaqueductal gray matter; PFA, perifornical area; mPFC, medial prefrontal cortex; OX<sub>1</sub>R, orexin receptors type 1; OX<sub>2</sub>R, orexin receptors type 2; PL, prefrontal cortex.

<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2021.06.006>

0306-4522/© 2021 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

state of the animals (Heinz et al., 2017; Almada et al., 2018), the BMT offers a unique test platform for the pharmacological modification of valuation biases.

According to Jeffrey A. Gray's original reinforcement sensitivity theory (Gray and McNaughton, 2000), three neural systems control approach versus avoidance behavior: the Fight, Flight and Freeze System (FFFS), the Behavioral Approach System (BAS) and the Behavioral Inhibition System (BIS) (McNaughton and Corr, 2004). According to the authors, the FFFS regulates avoidance from repellent (i.e., threatening) stimuli in a rather reflexive manner and the BAS the approach of attractive stimuli. The BIS, in turn, handles conflicts between repellent and attractive stimuli and orchestrates goal-directed behavior under threatening situations. More recently, this theoretical framework has been extended by the Constraint system, which is implicated in effortful control and suppresses impulses, thoughts, and emotions (Carver, 2005; Kennis et al., 2013). Interestingly, despite the diverse neuronal circuitries comprising the four systems, all four systems share the potential involvement of the prefrontal cortex (Kennis et al., 2013), rendering this brain structure an interesting site for pharmacological interventions.

The orexin system of the brain represents an emerging target for such interventions. The orexins A and B are hypothalamic peptides (also called hypocretins) and bind to orexin receptor type 1 (OX<sub>1</sub>R) and type 2 (OX<sub>2</sub>R) (de Lecea et al., 1998; Sakurai et al., 1998). They affect both the positive and the negative valence systems, such as addictive behavior (Hopf, 2020), wakefulness (Adamantidis et al., 2007; Sakurai, 2007), arousal (Sutcliffe and de Lecea, 2002; Sakurai, 2014), feeding (Tsujino and Sakurai, 2013), emotion and social interaction (Johnson et al., 2010, 2012a; Blouin et al., 2013). Their therapeutic potential is illustrated best by the panicolytic and anxiolytic effects of OX<sub>1</sub>R antagonists in preclinical studies (Summers et al., 2020).

In recent years, the orexin system has been implicated in stress, anxiety, fear, and panic-related behavior in rodents (Berridge et al., 2010; Li et al., 2010; Flores et al., 2017) and humans (Strawn et al., 2010; Johnson et al., 2012a). Interestingly, it has been demonstrated that patients with panic anxiety have higher levels of orexin-A in the cerebrospinal fluid compared to people without panic anxiety (Johnson et al., 2010). Silencing the hypothalamic orexin gene product or systemic OX<sub>1</sub>R antagonists blocks the panic responses in rats (Johnson et al., 2010). The intraperitoneal injection OX<sub>1</sub>R antagonist SB 334867 reduced cued and contextual fear memory retrieval (Flores et al., 2014). Thus, recent studies have raised the possibility of OXRs antagonists for therapeutic use to treat anxiety, panic, post-traumatic stress disorder, and depression (Sears et al., 2013; Merlo Pich and Melotto, 2014; Staton et al., 2018). The function of OXRs is required during the evoking of defensive behaviors and their antagonists act promoting the reduction of excessive such fear responses.

Although orexin neurons are strictly located in the lateral hypothalamus (LH), perifornical area (PFA), dorsomedial hypothalamus (DMH), and posterior

hypothalamus (Peyron et al., 1998; Nambu et al., 1999), they send prominent projections to autonomic, neuroendocrine, and limbic systems (Johnson et al., 2012a; Sakurai, 2014; Li and de Lecea, 2020), including the medial prefrontal cortex (mPFC), where both OX<sub>1</sub>R and OX<sub>2</sub>R are expressed (Johnson et al., 2012a; Jin et al., 2016). The mPFC can be divided into the anterior cingulate (AC), prelimbic (PL) and infralimbic (IL) cortices and, as stated before, plays an important role in decision-making, attention, fear, learning, and memory (Carlén, 2017; Matos et al., 2019). Therefore, the mPFC has been implicated in the processing of emotionally and emerged as a central hub the orchestration of avoidance versus approach behavior and fear responses to distal threats (Mobbs et al., 2007; Mobbs, 2018). In this scenario, a leading hypothesis is that the PL has been implicated in behavioral responses to conflict (Walton et al., 2002; Sangha et al., 2014), evaluates possible outcomes in the presence of competing drives (Ridderinkhof et al., 2004; Rushworth and Behrens, 2008), such as in the presence of a potential threat (Friedman et al., 2015; Diehl et al., 2020), as well as in behavioral flexibility, all of which potentially related to emotion and its modulation (Walton et al., 2002; Sangha et al., 2014; Friedman et al., 2015). Despite the anatomical and physiological evidence for the potential involvement of orexins in such processes, surprisingly little is known about the behavioral consequences of orexins at the level of the mPFC as well as in the PL. Therefore, we studied the effects of pharmacological blockade of OX<sub>1</sub>R and OX<sub>2</sub>R within the PL in the BMT to disentangle consequences on approach/avoidance conflicts and the underlying neural systems FFFS, BAS, and BIS.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Animals

Experiments were performed with male C57BL/6N mice purchased from the Central Animal Facility of Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo. After arriving at the Laboratory of Physiology of the Department of Biological Science of São Paulo State University (UNESP) – Assis Campus, mice were housed (four mice per cage) under standard laboratory conditions (23 °C ± 1 °C) with a 12:12 light cycle schedule with food and water provided ad libitum. All experiments were performed at an age from 8 to 12 weeks.

The experiments and protocols were approved by the Local Ethics Committee in Animal Experimentation of the UNESP at Assis Campus (CEUA process number, 002/2018), which is in agreement with the ethical principles in animal research adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and by National Council for Animal Experimentation Control (CONCEA). All efforts were made to reduce the number of used animals and to diminish animal suffering. A total number of 58 animals were used in this study, already excluding around 10% of animals with mislocated guide cannulae that were removed from further analysis.

### Stereotactic surgery

Mice were anesthetized with 100 mg/kg ketamine (Ketamine Agener, União Química Farmacêutica Nacional, São Paulo, Brazil) and 10 mg/kg xylazine (Calmun, União Química Farmacêutica Nacional, São Paulo, Brazil) and placed in a stereotaxic frame (Stoelting, IL, USA Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA) for implantation of guide cannulae in the PL. Cannulae (24 gauge, 5 mm lengths) were bilaterally implanted, targeting the PL: +1.78 mm anterior-posterior, ±0.30 mm medial-lateral, –1.50 mm dorsal-ventral, relative to Bregma, accordingly Franklin and Paxinos mouse brain in stereotaxic coordinates atlas (2008) (Keith Franklin and George Paxinos, 2008). At the end of the surgery, each mouse was treated with an intramuscular injection of penicillin G-Benzathine (120,000 UI; 0.1 ml). The mice were given a 5-day recovery period before the behavioral test.

### Drugs and injections

The OX<sub>1</sub>R antagonist SB 334867 (3, 30, 300 nM; Tocris, Bristol, UK) and OX<sub>2</sub>R antagonist TCS OX2 29 (3, 30, 300 nM; Tocris, Bristol, UK) were dissolved in 20% DMSO in sterile saline (0.9% NaCl). Concentrations utilized on experimental procedures were based on previous studies (Farahimanesh et al., 2018; Karimi et al., 2019). The vehicle (veh) was composed of 20% DMSO diluted in sterile saline.

For local injections, a needle (outer diameter, 0.3 mm, 6 mm length) attached by a polyethylene tube (PE-10) to a 5 µl syringe (Hamilton, Reno, Nevada, USA) was inserted into the cerebral cortex through the guide cannulae and used to deliver the drugs into the PL using an injector pump (Stoelting, Wood Dale, IL, USA). Each drug and vehicle were injected in a volume of 0.1 µl into the PL bilaterally at the rate of 0.5 µl/min 10 min before the behavioral test.

### Beetle mania task (BMT)

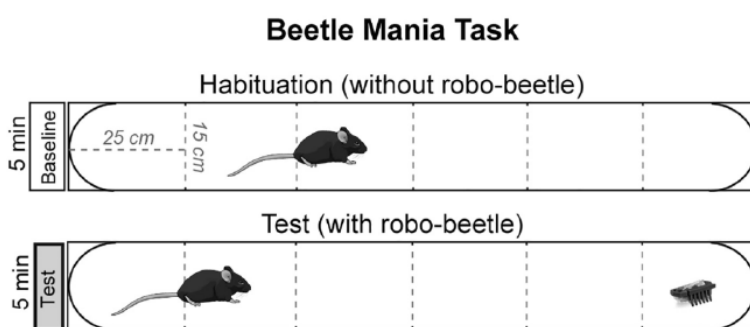
The beetle mania task (BMT) enables the assessment of active and passive fear responses as well as appetite

behavior (Heinz et al., 2017; Almada et al., 2018). The setup (L150 × W15 × H37 cm, grey polyethylene with rounded end walls, Fig. 1) was evenly illuminated with 50 lux white light. The floor was demarcated into six sectors of 25 cm each. The BMT was performed in consecutive phases of five minutes each: (a) the habituation phase without robo-beetle and (b) the test phase with robo-beetle. First, we habituated the animals to the setup and measured vertical (number of rearings) and horizontal exploration (number of sections crossings). Subsequently, we placed an erratically moving robo-beetle (Hexbug Nano, [www.hexbug.com/nano](http://www.hexbug.com/nano), Innovation First Labs, Inc, TX, USA; L4.5 × W1.5 × H1.8 cm, weight: 7.3 g, mean speed: 25 cm/s) far most distant from the mouse (Fig. 1) and the following behaviors were measured: contacts (number of physical contacts between the mice and the robo-beetle), tolerance (number of times the robo-beetle approaches the mouse without exerting a behavioral response normalized to the number of contacts), approach (number or sections the mice followed the robo-beetle in close vicinity), active avoidance behavior as the sum of escape response (number of withdrawals with accelerated speed in the direction opposite from the robo-beetle) and flight response (number of withdrawals with the accelerated speed in the same direction as the robo-beetle), freezing duration and number of jumps (Heinz et al., 2017; Almada et al., 2018). The entire task was recorded by a video camera (Sony Handycam, HDR-SR10, Tokyo, Japan) for subsequent offline ethological analysis by a trained observer who was unaware of the treatment.

Experiments were performed in independent runs with studying behavioral consequences of intra-PL infusion of the OX<sub>1</sub>R antagonist SB 334867 at 3 nM ( $n = 7$ ), 30 nM ( $n = 7$ ) or 300 nM ( $n = 8$ ) vs. vehicle ( $n = 8$ ; veh) in Experiment 1, and of the OX<sub>2</sub>R antagonist TCS OX2 29 at 3 nM ( $n = 6$ ), 30 nM ( $n = 6$ ) or 300 nM ( $n = 10$ ) versus vehicle ( $n = 6$ ; veh) in Experiment 2.

### Histology

At the end of the experiments, mice were deeply anesthetized with urethane (1.5 g/kg, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and transcardially perfused with 0.9% saline followed by 4% paraformaldehyde (PFA; pH 7.4; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The brain was removed, post-fixed in 4% PFA overnight, and then immersed in 30% sucrose for cryoprotection. After that, brain tissue was sectioned (40 µm) in a cryostat (CM 1950 Leica, Wetzlar, Germany). The accurate placement of injection cannulas was verified using a photomicroscope (Axioscope 5, Zeiss, Oberkochen, Germany) and injection sites were compared with the atlas Franklin and Paxinos (Keith Franklin and George



**Fig. 1.** The BMT consisted of two consecutive 5 min phases. In the habituation phase, mice were allowed to habituate to the arena without robo-beetle. The test phases included confrontations with an erratically moving robo-beetle.



Paxinos, 2008). We excluded all animals with misplaced injection sites from further analysis by experimenters blind to treatment.

### Statistics

All data are presented as mean  $\pm$  standard error of the mean (S.E.M) and were analyzed by the GraphPad Prism software (version 7.0; GraphPad Software Inc.; San Diego, CA, USA). Statistical significance was defined as  $p \leq 0.05$ . Normality and homogeneity in the sampled distributions were confirmed with the Shapiro–Wilk’s test of normality and Bartlett’s test of homogeneity of variances. Based on the results of these tests, appropriate parametric tests, one-way ANOVA was performed, and Tukey’s comparison post hoc test was used to detect significant differences.

## RESULTS

Histological verification of the injection sites confirmed the comparability of the different treatments in terms of engagement of the PL (Fig. 2).

### Experiment 1: OX<sub>1</sub>R antagonist in the PL reduces threat valuation

To study the consequences of the blockade of OX<sub>1</sub>R in the PL on the expression of defensive or appetitive behaviors, we bilaterally injected different doses of SB 334867 into the PL 10 min before exposure to the setup. As shown in Table 1, there were no general effects on exploratory behavior during habituation (i.e., prior to the confrontation with the robo-beetle).

During the subsequent test phase, we confronted the animals with the robo-beetle. All treatment groups had the same number of contacts between robo-beetle and mice ( $F_{3,26} = 2.73$ ,  $p = 0.064$ ; Fig. 3A). The highest dose of

the OX<sub>1</sub>R antagonist SB 334867 (300 nM) significantly increased tolerance ( $F_{3,26} = 10.31$ ;  $p = 0.0001$ ; Fig. 3B) and approach behavior ( $F_{3,26} = 27.78$ ;  $p < 0.0001$ ; Fig. 3C). No significant effects were observed on freezing ( $F_{3,26} = 1.219$ ;  $p = 0.323$ ; data not shown), jumping ( $F_{3,26} = 0.371$ ;  $p = 0.774$ ; data not shown) and avoidance behavior ( $F_{3,26} = 2.658$ ;  $p = 0.069$ ; Fig. 3D).

### Experiment 2: OX<sub>2</sub>R antagonist in the PL reduces threat valuation

To study consequences of the blockade of OX<sub>2</sub>R, we bilaterally injected different doses of TCS OX2 29 into the PL before the behavioral test. As for the OX<sub>1</sub>R antagonist, there were no differences in exploratory behavior in the habituation phase (Table 1). Upon the subsequent confrontation with the robo-beetle, treatment with the OX<sub>2</sub>R antagonist revealed essentially the same findings as treatment with the OX<sub>1</sub>R antagonist, with increased tolerance ( $F_{3,24} = 9.649$ ,  $p = 0.0002$ ; Fig. 4B) and approach behavior ( $F_{3,24} = 10.81$ ,  $p = 0.0001$ ; Fig. 4C) and no significant effects on the number of contacts ( $F_{3,24} = 1.173$ ,  $p = 0.340$ ; Fig. 4A), freezing duration ( $F_{3,24} = 2.31$ ;  $p = 0.101$ ; not shown), jumping ( $F_{3,24} = 2.089$ ;  $p = 0.128$ ; not shown) and avoidance ( $F_{3,24} = 1.306$ ,  $p = 0.295$ ; Fig. 4D).

## DISCUSSION

In this work, we showed that intra-PL injection of either OX<sub>1</sub>R or OX<sub>2</sub>R antagonists increased the tolerance of the approaching and close following of the bypassing robo-beetle. Other behavioral measures, in contrast, such as basal exploratory activity, number of contacts or active (i.e., avoidance, jumping), and passive defensive responses (i.e., freezing) remained unaffected.

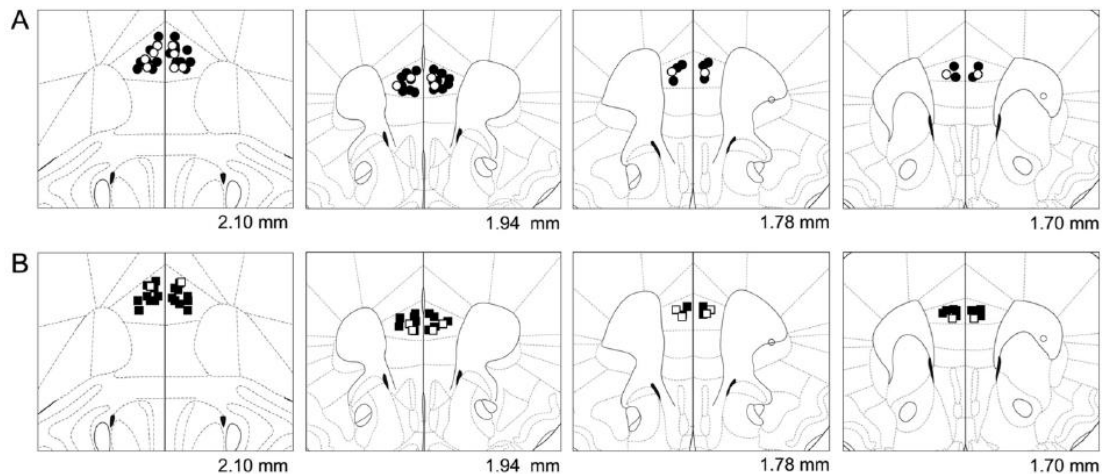


Fig. 2. Drawings of cerebrum transverse section across rostro-caudal extensions of the medial prefrontal cortex (mPFC), depicting the representation of the injection sites of the vehicle (○) and SB 334867 (●) (A), vehicle (□) and TCS OX2 29 (■) (B) in the PL. The number of points in the figure is fewer than the total number of mice because of overlapping injection sites.

Table 1.

Injection into the PL	Sample size	Dose	Exploratory behaviors			
			Crossings	Statistics	Rearings	Statistics
Vehicle	<i>n</i> = 7	Veh	112.00 ± 18.61		18.25 ± 4.10	
SB 334867	<i>n</i> = 7	3 nM	94.29 ± 10.61	$F_{3,26} = 0.423$	20.86 ± 4.15	$F_{3,26} = 0.652$
	<i>n</i> = 8	30 nM	112.70 ± 17.68	$p = 0.737$	23.14 ± 4.35	$p = 0.588$
	<i>n</i> = 8	300 nM	119.50 ± 16.13		25.88 ± 3.93	
Vehicle	<i>n</i> = 6	Veh	135.00 ± 18.44		22.67 ± 3.90	
TCS OX2 29	<i>n</i> = 6	3 nM	169.80 ± 17.23	$F_{3,24} = 1.17$	26.33 ± 0.98	$F_{3,24} = 0.438$
	<i>n</i> = 6	30 nM	153.70 ± 13.44	$p = 0.341$	23.00 ± 2.43	$p = 0.727$
	<i>n</i> = 10	300 nM	165.40 ± 9.03		25.10 ± 2.04	

We employed local infusion of OX<sub>1</sub>R or OX<sub>2</sub>R antagonists to selectively interfere with orexinergic signaling at the level of the PL. Despite histological confirmation of the correct placement of the injection sites and the small injection volume, it is highly unlikely that the action of the antagonist was restricted to the PL (Wanisch and Wotjak, 2008). Instead, we have to assume that the antagonists diffused along the guide cannulas to other parts of the mPFC, such as the anterior cingulate

cortex. With this in mind, we refrain from ascribing the behavioral consequences of the treatment to the specific engagement of the PL.

The fear responses are a natural behavior reaction to threats and unpredictable occurrences in the environment that increases arousal, wakefulness, and prepares the individual to cope in a dangerous situation. It is reasonable to hypothesize that threatening stimuli increase the activity of orexin neurons, consequently will release more orexin in their terminal axons located in brain

limbic regions, such as mPFC that regulate the expression of fear-related responses. Contrary to the well-described anxiolytic and panicolytic effects of OX<sub>1</sub>R antagonists after systemic treatment (Johnson et al., 2012b; Merlo Pich and Melotto, 2014), intra-PL injections failed to affect defensive avoidance (as the sum of flight or escape behavior) and freezing. We see this as evidence that the regulation of the FFFS by orexins occurs at subcortical levels, such as the amygdala, hypothalamus or midbrain (Johnson et al., 2012a). In support of this conclusion and following the predator imminence hypothesis (Mobbs et al., 2020), the mPFC seems to get engaged during the confrontation with distal, less explicit threatening stimuli (Mobbs et al., 2007). One should keep in mind that direct confrontation with stimuli such as the robo-beetle may recruit the mPFC during the organization of reactive fear-like responses (Kennis et al., 2013; Mobbs et al., 2020).

However, local administration of the OX<sub>1</sub>R antagonist into the PL increased the tolerance upon contact with the robo-beetle. We cannot explain this effect by reduced locomotor activity, which

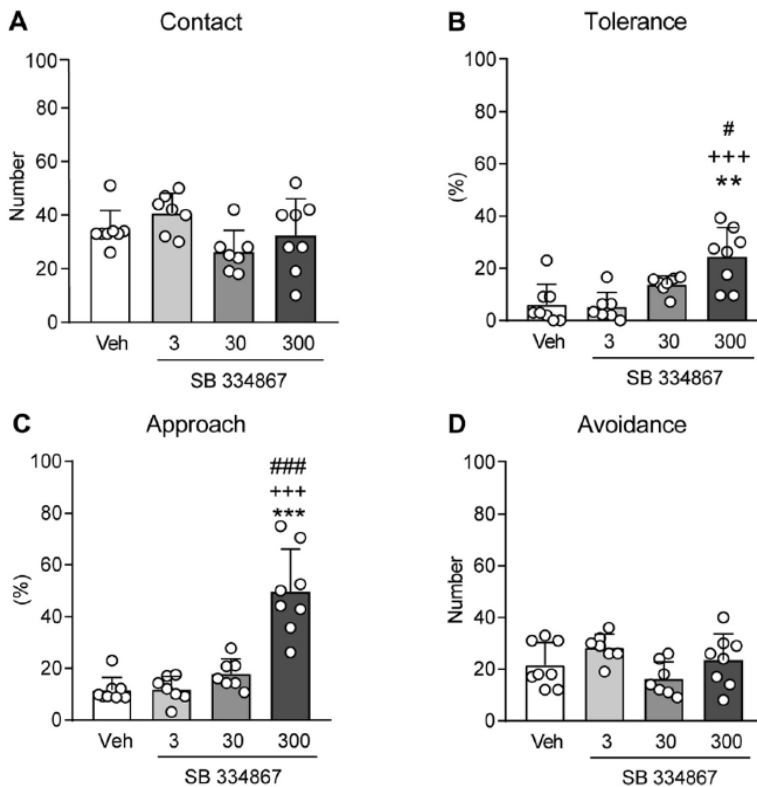
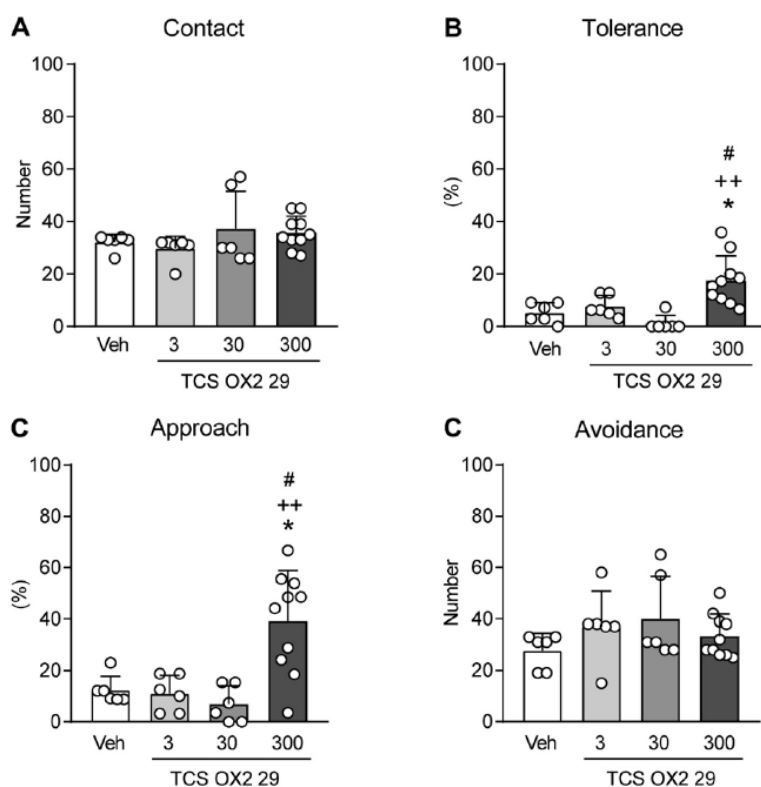


Fig. 3. Effects of SB 334867 (3, 30, 300 nM) injections in the PL on (A) number of contacts, (B) tolerance, (C) approach and (D) avoidance behavior upon confrontation with the robo-beetle. Data are expressed as mean ± S.E.M. \*\**p* < 0.01, \*\*\**p* < 0.001 compared to the veh; +++*p* < 0.001 compared to the 3 nM; #*p* < 0.05, ##*p* < 0.001 compared to the 30 nM (one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test).



**Fig. 4.** Effects of TCS OX2 29 (3, 30, 300 nM) injections in the PL on (A) number of contacts, (B) tolerance, (C) approach and (D) avoidance behavior upon confrontation with the robo-beetle. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. \* $p < 0.05$ , compared to the veh; ++ $p < 0.01$  compared to the 3 nM; # $p < 0.001$  compared to the 30 nM (one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test).

remained unaffected by the treatment. Moreover, it does not simply reflect an increase in passive fear, since freezing behavior remained unaffected, or impaired sensory perception (i.e. optogenetic stimulation of axon terminals of substantia nigra pars reticulata neurons at the level of the SC, a multimodal sensory structure that integrates visual, auditory, and somatosensory stimuli to start orienting movements of the eyes and head toward salient clues, increased the number of contacts between robo-beetle and test mouse in the BMT), which would have caused an increase in contacts (Almada et al., 2018). Instead, the increased tolerance seems to result from altered appraisal of the robo-beetle with a shift from threatening (repulsive) to neutral and even rewarding (attractive) valuation. The latter conclusion finds its support in the increased approach behavior, which may not only reflect curiosity but also the initiation of hunting behavior (Butler, 1973; Hoy et al., 2016; Han et al., 2017). It is unlikely that this re-valuation results from increased appetite (i.e., activation of the BAS) since orexin antagonists are expected to reduce rather than increase food intake (Sakurai et al., 1998; Rodgers et al., 2001; Li and de Lecea, 2020). Instead, we hypothesize that orexins bias cognitive judgment towards threat perception at the level

of the mPFC as part of the BIS. At the same time, orexins may reduce the impulse to hunt potential prey. Recent pharmacological-based experiments have shown that OX<sub>1</sub>R antagonist into the anterior cingulate cortex and orbitofrontal cortex, especially decreased high reward choices in the cost and benefit decision-making tasks (Karimi et al., 2019), suggesting that OX<sub>1</sub>-Rs recruitment in the mPFC play a crucial role in allowing the animal to evaluate between approach and avoidance behaviors.

Local infusion of an OX<sub>2</sub>R antagonist into the PL essentially revealed the same phenotype as the OX<sub>1</sub>R antagonist. This finding confirms the importance of orexin for the valuation of the robo-beetle aversive valence. However, the similar direction of effects was rather unexpected, given that the activation of OX<sub>2</sub>R may have either anxiogenic or anxiolytic effects (Furlong et al., 2009; Steiner et al., 2012; Chen et al., 2014; Viviani et al., 2014; Soya and Sakurai, 2020). For instance, OX<sub>2</sub>R knockout mice exhibited a decrease in freezing behavior during contextual fear conditioning (Tsuji and Sakurai, 2013; Soya and Sakurai, 2020). On the contrary, recent reports suggest that the activation of OX<sub>2</sub>R receptors has anxiolytic and antidepressive

consequences, at least in the amygdala or hippocampus, and may exert opposite effects to OX<sub>1</sub>R (Arendt et al., 2013, 2014; Staton et al., 2018). There is evidence indicating that the expression of OX<sub>1</sub>R in several regions of the brain plays different roles in fear-related behavior through independent mechanisms, and OX<sub>2</sub>R may also be involved in establishing contextual fear memory, suggesting a further complex mechanism involving the mPFC or other OX<sub>2</sub>R-expressing regions (Soya et al., 2013). In this work, the selective blockade of OX<sub>1</sub>R and OX<sub>2</sub>R in the PL with SB 334867 and TCS OX2 29 enhanced tolerance and approach behavior at the highest dose tested (300 nM). However, due to a relatively sparse expression of OX<sub>2</sub>R in the PFC of rats (Lu et al., 2000; Marcus et al., 2001) and the potential loss of selectivity of the antagonists used in this work at the higher doses, further investigation will be needed to properly explore the density of the expression of both OX<sub>1</sub>R and OX<sub>2</sub>R at the level of PFC in mice.

Another point that we might address herein is concerning the fact surprisingly the pharmacological treatment increased approach, but not avoidance response. We might consider here that the beetle mania

test does not comprise a robust aversive stimulus, and for this reason, oriented and non-oriented escape behaviors were merged and considered avoidance. However, in a classical prey versus predator paradigm, based on interactions between mice or rats and wild snakes in polygonal arenas for snakes, several times the prey, during risk assessment behavior, such as stretch attend posture and flat back approach, elicit startle, and after flat back approach and short interaction with the predator, they elicit oriented escape behavior to safe places (burrow and elevated platforms for escape) (Almada et al., 2021; dos Anjos-Garcia and Coimbra, 2019, 2020, Coimbra et al., 2017a, 2017b). It is possible that in the beetle mania test, after increased approach behavior to the robo-beetle in erratic movements, mice display active avoidance justifying some paradoxical findings.

We hypothesize that the defensive circuitry allows an individual to adapt its behavior flexibly based on the level of threat imminence. Several lines of evidence have shown that distal threat elicits activity in the PFC (Fanselow, 1994; McNaughton and Corr, 2004; Mobbs et al., 2007, 2009; Mobbs, 2018), suggesting that the PFC [PL/IL cortex in rodents and the ventromedial PFC (vmPFC) in humans] is involved in deliberative strategizing and distinguishes between safe and aversive locations (Bach and Dayan, 2017). Although when the threat becomes proximal, the brain activity shifted from the vmPFC to midbrain structures such as the periaqueductal gray matter (PAG) (Mobbs et al., 2007; Tovote et al., 2016; Motta et al., 2017). It is worth considering that the PFC contains specific cells that are involved in eliciting or inhibiting defensive behaviors, such as freezing and escape, depending on the threatening situation, mainly via interaction with the amygdala and PAG neuronal networks (Halladay and Blair, 2015). Thus, when PL neurons are recruited during the exposition to robo-beetle test, the orexin neurotransmission acts as a modulatory system in such cortical structure.

Taken together, our findings demonstrate that pharmacological blockade of OX<sub>1</sub>R or OX<sub>2</sub>R at the level of the mPFC leaves reactive fear responses to the robo-beetle unaffected. At the same time, it diminishes the cognitive judgment bias, resulting in tolerance of the erratically moving object and the emergence of proactive approach behavior. This mode of action is unique compared to the consequence of the classical anxiolytic diazepam, which also increased tolerance, but failed to increase approach behavior at all (Heinz et al., 2017). Therefore, pharmacological blockade of OX<sub>1</sub>R and/or OX<sub>2</sub>R may represent an innovative approach for the treatment of cognitive judgment bias, which underlies many anxiety disorders.

## FUNDING

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Young Researcher Program; grant 2018/03898-1). V. P. M. N. Soares is a Scientiae Magister student supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível

Superior (CAPES) (Sc.M. grant 88887.498215/2020-00) and received a technician scholarship from FAPESP (TT-3, grant 2019/15757-6). C.T. Wotjak is granted by German-Israeli Foundation for Scientific Research (GIF) (I-1442-421. 13/2017). R.C. Almada is granted a research fellowship by FAPESP (grant 2019/01713-7). Each organization played no further role in the design of the study; the collection, analysis, and interpretation of data; the writing of the report; or the decision to submit the paper for publication.

## COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

The experiments and protocols were approved by the Local Ethics Committee in Animal Experimentation of the UNESP–Assis Campus (CEUA, process 002/2018), which is in agreement with the ethical principles in animal research adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and by National Council for Animal Experimentation Control (CONCEA).

## DECLARATION OF COMPETING INTEREST

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

## REFERENCES

- Adamantidis AR, Zhang F, Aravanis AM, Deisseroth K, de Lecea L (2007) Neural substrates of awakening probed with optogenetic control of hypocretin neurons. *Nature* 450:420–424. <https://doi.org/10.1038/nature06310>.
- Almada RC, Coimbra NC (2015) Recruitment of striatonigral disinhibitory and nigroreticular inhibitory GABAergic pathways during the organization of defensive behavior by mice in a dangerous environment with the venomous snake *Bothrops alternatus* (Reptilia, Viperidae). *Synapse* 69(6):299–313. <https://doi.org/10.1002/syn.21814>.
- Almada RC, dos Anjos-Garcia T, da Silva JA, Pigatto GR, Wotjak CT, Coimbra NC (2021) The modulation of striatonigral and nigroreticular pathways by CB1 signalling in the substantia nigra pars reticulata regulates panic elicited in mice by urutu-cruzeiro lancehead pit vipers. *Behav Brain Res* 401. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.112996>
- Almada RC, Genewsky AJ, Heinz DE, Kaplick PM, Coimbra NC, Wotjak CT (2018) Stimulation of the nigroreticular pathway at the level of the superior colliculus reduces threat recognition and causes a shift from avoidance to approach behavior. *Front Neural Circuits* 12:36. <https://doi.org/10.3389/fncir.2018.00036>.
- Almada RC, Roncon CM, Elias-Filho DH, Coimbra NC (2015) Endocannabinoid signaling mechanisms in the substantia nigra pars reticulata modulate GABAergic nigroreticular pathways in mice threatened by urutu-cruzeiro venomous pit viper. *Neuroscience* 303:503–514. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.06.048>.
- Arendt DH, Hassell J, Li H, Achua JK, Guarnieri DJ, Dileone RJ, Ronan PJ, Summers CH (2014) Anxiolytic function of the orexin 2/hypocretin A receptor in the basolateral amygdala. *Psychoneuroendocrinology* 40:17–26. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2013.10.010>.
- Arendt DH, Ronan PJ, Oliver KD, Callahan LB, Summers TR, Summers CH (2013) Depressive behavior and activation of the orexin/hypocretin system. *Behav Neurosci* 127:86–94. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2013.10.010>.

- Bach DR, Dayan P (2017) Algorithms for survival: a comparative perspective on emotions. *Nat Rev Neurosci* 18:311–319. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.35>.
- Berridge CW, España RA, Vittoz NM (2010) Hypocretin/orexin in arousal and stress. *Brain Res* 1314:91–102. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.09.019>.
- Blanchard DC, Blanchard RJ (1988) Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. *Annu Rev Psychol* 39:43–68. <https://doi.org/10.1146/annurev.ps.39.020188.000355>.
- Blouin AM, Fried I, Wilson CL, Staba RJ, Behnke EJ, Lam HA, Maidment NT, Karlsson KÆ, Lapiere JL, Siegel JM (2013) Human hypocretin and melanin-concentrating hormone levels are linked to emotion and social interaction. *Nat Commun* 4:1547. <https://doi.org/10.1038/ncomms2461>.
- Butler K (1973) Predatory behavior in laboratory mice: strain and sex comparisons. *J Comp Physiol Psychol* 85:243–249. <https://doi.org/10.1037/h0035008>.
- Carlén M (2017) What constitutes the prefrontal cortex?. *Science* 358:478–482. <https://doi.org/10.1126/science.aan8868>.
- Carver CS (2005) Impulse and constraint: perspectives from personality psychology, convergence with theory in other areas, and potential for integration. *Personal Soc Psychol Rev* 9:312–333. [https://doi.org/10.1207/s15327957pspr0904\\_2](https://doi.org/10.1207/s15327957pspr0904_2).
- Chen X, Wang H, Lin Z, Li S, Li Y, Bergen HT, Vrontakis ME, Kirouac GJ (2014) Orexins (hypocretins) contribute to fear and avoidance in rats exposed to a single episode of footshocks. *Brain Struct Funct* 219:2103–2118. <https://doi.org/10.1007/s00429-013-0626-3>.
- Coimbra NC, Calvo F, Almada RC, Freitas RL, Paschoalin-Maurin T, dos Anjos-Garcia T, Elias-Filho DH, Ubiali WA, Lobão-Soares B, Tracey I (2017a) Opioid neurotransmission modulates defensive behavior and fear-induced antinociception in dangerous environments. *Neuroscience* 354:178–195. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.04.032>.
- Coimbra NC, Paschoalin-Maurin T, Bassi GS, Kanashiro A, Biagioni AF, Felippotti TT, Elias-Filho DH, Mendes-Gomes J, Cysne-Coimbra JP, Almada RC, Lobão-Soares B (2017b) Critical neuropsychological analysis of panic attack- and anticipatory anxiety-like behaviors in rodents confronted with snakes in polygonal arenas and complex labyrinths: a comparison to the elevated plus- and T-maze behavioral tests. *Braz J Psiquiatr* 39:72–83. <https://doi.org/10.1590/1516-4446-2015-1895>.
- de Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, Gao X, Foye PE, Danielson PE, Fukuhara C, Battenberg EL, Gautvik VT, Bartlett FS, Frankel WN, van den Pol AN, Bloom FE, Gautvik KM, Sutcliffe JG (1998) The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:322–327. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.1.322>.
- Diehl MM, Iravedra-García JM, Morán-Sierra J, Rojas-Bowe G, Gonzalez-Diaz FN, Valentin-Valentin VP, Quirk GJ (2020) Divergent projections of the prelimbic cortex bidirectionally regulate active avoidance. *Elife* 9. <https://doi.org/10.7554/eLife.59281>.
- dos Anjos-Garcia T, Coimbra NC (2019) Opposing roles of dorsomedial hypothalamic CB1 and TRPV1 receptors in anandamide signaling during the panic-like response elicited in mice by Brazilian rainbow Boidae snakes. *Psychopharmacology (Berl)* 236:1863–1874. <https://doi.org/10.1007/s00213-019-5170-2>.
- dos Anjos-Garcia T, Coimbra NC (2020) Anandamide in the anterior hypothalamus diminishes defensive responses elicited in mice threatened by *Epicrates cenchria* constrictor serpents. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 80:179–191.
- Fanselow MS (1994) Neural organization of the defensive behavior system responsible for fear. *Psychon Bull Rev* 1:429–438. <https://doi.org/10.3758/BF03210947>.
- Farahimanesh S, Karimi S, Haghparast A (2018) Role of orexin-1 receptors in the dorsal hippocampus (CA1 region) in expression and extinction of the morphine-induced conditioned place preference in the rats. *Peptides* 101:25–31. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2017.12.017>.
- Fendt M, Parsons MH, Apfelbach R, Carthey AJR, Dickman CR, Endres T, Frank ASK, Heinz DE, Jones ME, Kiyokawa Y, Kreuzmann JC, Roelofs K, Schneider M, Sulger J, Wotjak CT, Blumstein DT (2020) Context and trade-offs characterize real-world threat detection systems: A review and comprehensive framework to improve research practice and resolve the translational crisis. *Neurosci Biobehav Rev* 115:25–33. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2020.05.002>.
- Flores Á, Herry C, Maldonado R, Berrendero F (2017) Facilitation of contextual fear extinction by orexin-1 receptor antagonism is associated with the activation of specific amygdala cell subpopulations. *Int J Neuropsychopharmacol* 20:654–659. <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyx029>.
- Flores Á, Valls-Comamala V, Costa G, Saravia R, Maldonado R, Berrendero F (2014) The hypocretin/orexin system mediates the extinction of fear memories. *Neuropsychopharmacology* 39:2732–2741. <https://doi.org/10.1038/npp.2014.146>.
- Friedman A, Homma D, Gibb LG, Amemori K, Rubin SJ, Hood AS, Riad MH, Graybiel AM (2015) A corticostriatal path targeting striosomes controls decision-making under conflict. *Cell* 161:1320–1333. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.04.049>.
- Furlong TM, Vianna DML, Liu L, Carrive P (2009) Hypocretin/orexin contributes to the expression of some but not all forms of stress and arousal. *Eur J Neurosci* 30:1603–1614. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2009.06952.x>.
- Gray JA, McNaughton N (2000) *The Neuropsychology of Anxiety: An enquiry into the function of the septo-hippocampal system*. Oxford University Press. [https://doi.org/10.1016/S0165-0327\(00\)00344-X](https://doi.org/10.1016/S0165-0327(00)00344-X).
- Gross CT, Canteras NS (2012) The many paths to fear. *Nat Rev Neurosci* 13:651–658. <https://doi.org/10.1038/nrn3301>.
- Halladay LR, Blair HT (2015) Distinct ensembles of medial prefrontal cortex neurons are activated by threatening stimuli that elicit excitation vs. inhibition of movement. *J Neurophysiol* 114:793–807. <https://doi.org/10.1152/jn.00656.2014>.
- Han W, Tellez LA, Rangel MJ, Motta SC, Zhang X, Perez IO, Canteras NS, Shammah-Lagnado SJ, van den Pol AN, de Araujo IE (2017) Integrated control of predatory hunting by the central nucleus of the amygdala. *Cell* 168:311–324.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.12.027>.
- Heinz DE, Genewsky A, Wotjak CT (2017) Enhanced anandamide signaling reduces flight behavior elicited by an approaching roach. *Neuropharmacology* 126:233–241. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.09.010>.
- Hopf FW (2020) Recent perspectives on orexin/hypocretin promotion of addiction-related behaviors. *Neuropharmacology* 168. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.108013>.
- Hoy JL, Yavorska I, Wehr M, Niell CM (2016) Vision drives accurate approach behavior during Prey capture in laboratory mice. *Curr Biol* 26:3046–3052. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.09.009>.
- Jin J, Chen Q, Qiao Q, Yang L, Xiong J, Xia J, Hu Z, Chen F (2016) Orexin neurons in the lateral hypothalamus project to the medial prefrontal cortex with a rostro-caudal gradient. *Neurosci Lett* 621:9–14. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.04.002>.
- Johnson PL, Molosh A, Fitz SD, Truitt WA, Shekhar A (2012a) Orexin, stress, and anxiety/panic states. *Prog Brain Res* 198:133–161. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59489-1.00009-4>.
- Johnson PL, Samuels BC, Fitz SD, Federici LM, Hammes N, Early MC, Truitt W, Lowry CA, Shekhar A (2012b) Orexin 1 receptors are a novel target to modulate panic responses and the panic brain network. *Physiol Behav* 107:733–742. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2012.04.016>.
- Johnson PL, Truitt W, Fitz SD, Minick PE, Dietrich A, Sanghani S, Traskman-Bendz L, Goddard AW, Brundin L, Shekhar A (2010) A key role for orexin in panic anxiety. *Nat Med* 16:111–115. <https://doi.org/10.1038/nm.2075>.
- Karimi S, Hamidi G, Fatahi Z, Haghparast A (2019) Orexin 1 receptors in the anterior cingulate and orbitofrontal cortex regulate cost and benefit decision-making. *Prog*

- Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 89:227–235. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2018.09.006>.
- Keith Franklin, George Paxinos (2008) *The mouse brain in stereotaxic coordinates*, compact, 3rd ed. San Diego, California: Academic press.
- Kennis M, Rademaker AR, Geuze E (2013) Neural correlates of personality: An integrative review. *Neurosci Biobehav Rev* 37:73–95. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2012.10.012>.
- Li S-B, de Lecea L (2020) The hypocretin (orexin) system: from a neural circuitry perspective. *Neuropharmacology* 167. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.107993> 107993.
- Li Y, Li S, Wei C, Wang H, Sui N, Kirouac GJ (2010) Orexins in the paraventricular nucleus of the thalamus mediate anxiety-like responses in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 212:251–265. <https://doi.org/10.1007/s00213-010-1948-y>.
- Lu XY, Bagnol D, Burke S, Akil H, Watson SJ (2000) Differential distribution and regulation of OX1 and OX2 orexin/hypocretin receptor messenger RNA in the brain upon fasting. *Horm Behav* 37:335–344. <https://doi.org/10.1006/hbeh.2000.1584>.
- Marcus JN, Aschkenasi CJ, Lee CE, Chemelli RM, Saper CB, Yanagisawa M, Elmquist JK (2001) Differential expression of orexin receptors 1 and 2 in the rat brain. *J Comp Neurol* 435:6–25. <https://doi.org/10.1002/cne.1190>.
- Matos MR, Visser E, Kramvis I, van der Loo RJ, Gebuis T, Zalm R, Rao-Ruiz P, Mansvelde HD, Smit AB, van den Oever MC (2019) Memory strength gates the involvement of a CREB-dependent cortical fear engram in remote memory. *Nat Commun* 10:2315. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10266-1>.
- McNaughton N, Corr PJ (2004) A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. *Neurosci Biobehav Rev* 28:285–305. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2004.03.005>.
- Merlo Pich E, Melotto S (2014) Orexin 1 receptor antagonists in compulsive behavior and anxiety: possible therapeutic use. *Front Neurosci* 8:26. <https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00026>.
- Mobbs D (2018) The ethological deconstruction of fear(s). *Curr Opin Behav Sci* 24:32–37. <https://doi.org/10.1016/j.cobeha.2018.02.008>.
- Mobbs D, Headley DB, Ding W, Dayan P (2020) Space, time, and fear: survival computations along defensive circuits. *Trends Cogn Sci* 24:228–241. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2019.12.016>.
- Mobbs D, Marchant JL, Hassabis D, Seymour B, Tan G, Gray M, Petrovic P, Dolan RJ, Frith CD (2009) From threat to fear: the neural organization of defensive fear systems in humans. *J Neurosci* 29:12236–12243. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2378-09.2009>.
- Mobbs D, Petrovic P, Marchant JL, Hassabis D, Weiskopf N, Seymour B, Dolan RJ, Frith CD (2007) When fear is near: threat imminence elicits prefrontal-periaqueductal gray shifts in humans. *Science* 317:1079–1083. <https://doi.org/10.1126/science.1144298>.
- Motta SC, Carobrez AP, Canteras NS (2017) The periaqueductal gray and primal emotional processing critical to influence complex defensive responses, fear learning, and reward seeking. *Neurosci Biobehav Rev* 76:39–47. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.10.012>.
- Nambu T, Sakurai T, Mizukami K, Hosoya Y, Yanagisawa M, Goto K (1999) Distribution of orexin neurons in the adult rat brain. *Brain Res* 827:243–260. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(99\)01336-0](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(99)01336-0).
- Peyron C, Tighe DK, van den Pol AN, de Lecea L, Heller HC, Sutcliffe JG, Kilduff TS (1998) Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J Neurosci* 18:9996–10015. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-23-09996.1998>.
- Ridderinkhof KR, Ullsperger M, Crone EA, Nieuwenhuis S (2004) The role of the medial frontal cortex in cognitive control. *Science* 306:443–447. <https://doi.org/10.1126/science.1100301>.
- Rodgers RJ, Halford JCG, Nunes de Souza RL, Canto de Souza AL, Piper DC, Arch JRS, Upton N, Porter RA, Johns A, Blundell JE (2001) SB-334867, a selective orexin-1 receptor antagonist, enhances behavioural satiety and blocks the hyperphagic effect of orexin-A in rats. *Eur J Neurosci* 13:1444–1452. <https://doi.org/10.1046/j.0953-816x.2001.01518.x>.
- Rushworth MF, Behrens TE (2008) Choice, uncertainty and value in prefrontal and cingulate cortex. *Nat Neurosci* 11:389–397. <https://doi.org/10.1038/nn2066>.
- Sakurai T et al (1998) Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 92:573–585. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80949-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80949-6).
- Sakurai T (2007) The neural circuit of orexin (hypocretin): maintaining sleep and wakefulness. *Nat Rev Neurosci* 8:171–181. <https://doi.org/10.1038/nrn2092>.
- Sakurai T (2014) The role of orexin in motivated behaviours. *Nat Rev Neurosci* 15:719–731. <https://doi.org/10.1038/nrn3837>.
- Sangha S, Robinson PD, Greba Q, Davies DA, Howland JG (2014) Alterations in reward, fear and safety cue discrimination after inactivation of the rat prelimbic and infralimbic cortices. *Neuropsychopharmacology* 39:2405–2413. <https://doi.org/10.1038/npp.2014.89>.
- Sears RM, Fink AE, Wiggestrand MB, Farb CR, de Lecea L, Ledoux JE (2013) Orexin/hypocretin system modulates amygdala-dependent threat learning through the locus coeruleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:20260–20265. <https://doi.org/10.1073/pnas.1320325110>.
- Soya S, Sakurai T (2020) Orexin as a modulator of fear-related behavior: Hypothalamic control of noradrenaline circuit. *Brain Res* 1731. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.11.032> 146037.
- Soya S, Shoji H, Hasegawa E, Hondo M, Miyakawa T, Yanagisawa M, Mieda M, Sakurai T (2013) Orexin receptor-1 in the locus coeruleus plays an important role in cue-dependent fear memory consolidation. *J Neurosci* 33:14549–14557. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1130-13.2013>.
- Staton CD, Yaeger JDW, Khalid D, Haroun F, Fernandez BS, Fernandez JS, Summers BK, Summers BK, Summers TR, Sathyanesan M, Newton SS, Summers CH (2018) Orexin 2 receptor stimulation enhances resilience, while orexin 2 inhibition promotes susceptibility, to social stress, anxiety and depression. *Neuropharmacology* 143:79–94. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.09.016>.
- Steiner MA, Lecourt H, Jenck F (2012) The brain orexin system and almorexant in fear-conditioned startle reactions in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* 223:465–475. <https://doi.org/10.1007/s00213-012-2736-7>.
- Strawn JR, Pyne-Geithman GJ, Ekhtor NN, Horn PS, Uhde TW, Shutter LA, Baker DG, Geraciotti Jr TD (2010) Low cerebrospinal fluid and plasma orexin-A (hypocretin-1) concentrations in combat-related posttraumatic stress disorder. *Psychoneuroendocrinology* 35:1001–1007. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2010.01.001>.

- Arber S, Lüthi A (2016) Midbrain circuits for defensive behaviour. *Nature* 534:206–212. <https://doi.org/10.1038/nature17996>.
- Tsujino N, Sakurai T (2013) Role of orexin in modulating arousal, feeding, and motivation. *Front Behav Neurosci* 7:28. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2013.00028>.
- Viviani D, Haegler P, Jenck F, Steiner MA (2014) Orexin neuropeptides contribute to the development and persistence of generalized avoidance behavior in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* 232:1383–1393. <https://doi.org/10.1007/s00213-014-3769-x>.
- Walton ME, Bannerman DM, Rushworth MF (2002) The role of rat medial frontal cortex in effort-based decision making. *J Neurosci* 22:10996–11003. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-24-10996.2002>.
- Wanisch K, Wotjak CT (2008) Time course and efficiency of protein synthesis inhibition following intracerebral and systemic anisomycin treatment. *Neurobiol Learn Mem* 90:485–494. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2008.02.007>.

*(Received 7 April 2021, Accepted 3 June 2021)*  
*(Available online 12 June 2021)*

## ANEXO III – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
Faculdade de Ciências e Letras de Assis  
Comissão de Ética no Uso de Animais

### CERTIFICADO

CERTIFICAMOS que o Projeto de Pesquisa **MEDO E ANSIEDADE: O PAPEL DO SISTEMA OREXINÉRGICO NO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL MEDIAL**, Registro nº 002/2018, sob a responsabilidade do pesquisador **Rafael Carvalho Almada** e colaboração de **Telma Gonçalves Carneiro Spera de Andrade**, conforme registrado, atende à legislação vigente em relação ao respeito aos princípios éticos na experimentação animal.

Animais utilizados: **Camundongos C57/BL6, machos**

Número de animais solicitados e autorizados: **400 (quatrocentos)**

CERTIFICAMOS, ainda, que o referido projeto será desenvolvido em 48 meses, no período de 01/03/2019 a 28/02/2023, sendo que o **Relatório Final** deverá ser entregue em **março/2023**.

Assis, 20 de dezembro de 2018.

**LUCINEIA DOS SANTOS**

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA