

EFEITO DA ANSIEDADE NA RESPOSTA DE FUGA INDUZIDA PELA MICROINJEÇÃO DE NMDA NA MATÉRIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL DORSAL

Aluno: Bruno Costa Larrubia
Orientador: J. Landeira Fernandez

Introdução

Dentre os distúrbios emocionais conhecidos, a ansiedade vem afetando em diferentes níveis, um grande número de indivíduos, fazendo da compreensão deste fenômeno um dos maiores desafios dos dias atuais. A ansiedade é um estado emocional que faz parte do espectro normal das experiências humanas, sendo, em determinados níveis, propulsora do desempenho.

A lei de Yerkes-Dodson [1] sugere que toda tarefa possui um ponto ótimo de ansiedade para que ela possa ser executada da melhor forma possível. Todavia, níveis exageradamente elevados de ansiedade prejudicam a execução da tarefa, caracterizando-se assim o seu aspecto patológico.

A ansiedade passa então a ser patológica, quando seus níveis estão desproporcionais à situação que a desencadeia, ou quando não existe um objeto específico ao qual se direcione.

Como característica mais marcante da ansiedade enquanto transtorno, apresenta-se a distorção da percepção, que ocasiona alterações do significado dos acontecimentos na vida do sujeito. Pode-se constatar também, como sintoma de ansiedade o déficit de atenção, que acarreta prejuízos em relação à memória e ao aprendizado.

Baseado na sua observação clínica, Freud [2] foi capaz de distinguir estados de ansiedade crônica e pânico. Segundo ele, a ansiedade é definida como “algo sentido”, um estado afetivo, com combinações de alguns sentimentos de prazer-desprazer. Outra forma de compreender a ansiedade é considerá-la um estado de tensão diante de uma situação considerada de perigo, causando a sensação de confusão generalizada. De acordo com a definição da Associação Americana de Psiquiatria, ansiedade é a “sensação de apreensão, tensão, e inquietude provocada pela antecipação de perigo”.

Segundo Charles Darwin, dado o caráter evolutivo do comportamento emocional, a compreensão deste fenômeno no homem depende, em grande parte, do estudo do comportamento de outros animais. Os animais, assim como os seres humanos, expressam o significado de suas emoções frente a situações de perigo através do comportamento que exibem.

Todas essas emoções são mediadas por reações comandadas pelo sistema nervoso autônomo, como sudorese emocional, palpitações, náuseas e sensação de vazio no estômago. Estas alterações fisiológicas preparam o sujeito para enfrentar a fonte de perigo de forma mais eficaz. Como veremos mais adiante, o estudo sobre as estruturas cerebrais responsáveis por tais respostas autonômicas são aspectos extremamente importantes para a compreensão dos transtornos de ansiedade.

O conceito de ansiedade não envolve um construto unitário, principalmente no contexto psicopatológico, o que fica claro na história das publicações do DSM (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders) e do CID (International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems), quando tentam formular diagnósticos mais precisos sobre este transtorno. A complexidade do fenômeno e a ambigüidade das descrições teóricas da ansiedade justificam a carência de avaliações da circuitaria neural envolvida nestes

processos. Numerosos esforços têm sido feitos na tentativa de definir operacionalmente e avaliar este construto.

Outro distúrbio emocional de grande importância hoje é o transtorno do pânico. Ele se caracteriza por ataques recorrentes, que podem ocorrer espontaneamente ou associados a uma situação particular. Os ataques de pânico são definidos como episódios intensos de medo ou terror acompanhado por aceleração dos batimentos cardíacos, dores no peito, tonturas ou vertigens, náuseas, respiração curta, tremor, medo de morrer, suores frios, sentimentos de não-realidade, dormência, sensação de frio e calor, um sentimento de estar perdendo o controle ou medo de enlouquecer [3]. Este transtorno tem mostrado uma relação ambígua com a ansiedade

Diferentes modelos animais tem sido empregados como poderosas ferramentas com o objetivo de investigar e compreender os mecanismos envolvidos nos transtornos de ansiedade e transtorno do pânico. Através de comportamentos específicos de defesa animal, tem sido possível determinar circuitos neurais envolvidos nos diversos transtornos de ansiedade. Em particular, dois comportamentos de defesa com circuitos neurais específicos, podem ser utilizados como modelos para diferentes transtornos de ansiedade e transtorno do pânico. [4]

O primeiro, no qual o animal apresenta uma pronunciada postura de imobilidade, denominada congelamento, envolvendo a ativação da amígdala e da matéria cinzenta periaquedutal ventral (MCPV). O mau funcionamento deste sistema defensivo parece estar relacionado ao Transtorno de Ansiedade Generalizada. Ela está envolvida exclusivamente na resposta de congelamento que gradualmente aparece quando o animal é exposto a um estímulo aversivo inato [5]. A matéria cinzenta periaquedutal dorsal (MCPD) [6] está claramente associada com esta resposta defensiva ativa estereotipada e sua hiperativação parece esta relacionada com o transtorno do pânico. Ela está envolvida na resposta de fuga, no modelo de ansiedade ao contexto. As estimulações elétricas da mesma, que ocasionam respostas de fuga [6], proporcionam um dos modelos animais para o estudo do pânico. Este sistema está relacionado com formas vigorosas de comportamento ativo, como reações de fuga ou luta.

A estimulação elétrica da MCPD tem sido proposta como um dos melhores modelos de ataque de pânico. De acordo com este modelo o aumento gradual de corrente elétrica para estimular a MCPD produz alerta, congelamento e resposta tipo pânico (activity burst), como corrida e salto. Em humanos, a estimulação elétrica da MCPD também produz sintomas do pânico. Por outro lado, a resposta de congelamento ao contexto previamente associada com choques elétricos nas patas tem sido amplamente utilizada como um modelo animal de ansiedade.[7]

Outra forma igualmente importante de estimulação da MCPD é a microinjeção de NMDA. Este modelo está pautado nos mais recentes achados psicofarmacológicos, que procuram compreender o papel da 5-HT neste circuitaria neural. Visando compreender melhor o fenômeno, investigamos neste trabalho o efeito da ansiedade na resposta de fuga induzida pela microinjeção de NMDA na MCPD.

Objetivos

O objetivo do presente trabalho foi o de investigar a relação entre a ansiedade e a ocorrência de ataques do pânico. Evidências clínico-farmacológicas mostram um grande isoformismo entre as respostas de fuga em ratos induzidas através da estimulação da MCPD e os ataques de pânico em humanos. Drogas panicólicas, como a clomipramina e a fluoxetina aumentam o limiar de corrente elétrica que elicia os comportamentos de corrida e salto, enquanto drogas panicogênicas, como o pentilenotetrazol, diminuem esse limiar. Por outro lado, a modulação bidirecional da ansiedade pelo receptor benzodiazepínico (BZD) tem sido empregada para validar o paradigma do medo contextual como um modelo de ansiedade em

roedores. Agonistas BZD, diazepam ou midazolam, reduzem a quantidade de congelamento eliciada pelo contexto previamente associado com choques nas patas, enquanto o agonista BZD inverso, dimetoxi- β -carbolina, produz comportamento de congelamento parecido com aquele eliciado pelo condicionamento de medo contextual [8].

Substâncias tipo ansiolíticas como os agonistas 5-HT_{1A}, os inibidores de recaptação seletiva de 5-HT e os IMAO com comprovada eficácia no tratamento de sintomas ansiosos atenuam o comportamento condicionado em ratos indicando um considerável constructo e similaridade deste paradigma com a ansiedade humana [9]. Dessa forma, é possível investigar a relação entre ansiedade e ataques do pânico através da influência do medo condicionado sobre a resposta de fuga induzida pela microinjeção de NMDA na MCPD.

Buscamos então determinar se o aumento dos níveis de ansiedade através da utilização do modelo de medo ao contexto minimizam a resposta de fuga induzida pela aplicação de NMDA na MCPD.

Metodologia

Animais

Foram usados ratos da raça Wistar, machos, pesando 250-300 g. Cada animal era alocado numa caixa individual, tendo livre acesso à água e comida, num ciclo de claro/escuro de 12 horas cada. Os experimentos eram realizados durante a fase clara. A temperatura da sala era mantida entorno dos 22°C e os experimentos foram todos conduzidos segundo as normas da SBNeC (Sociedade Brasileira de Neurociência e Comportamento).

Cirurgia

Para a implantação da cânula na MCPD foi usado tribromoethanol (250mg/kg). Para isso, os animais eram afixados em um aparelho estereotaxico [10]. Com o crânio fixo na horizontal, usando a referência do lambda, a cânula guia era inserida na região da MCPD (AP = +2.3 mm; DV = -4.5 mm e ML = -1.7 mm; tendo interaural como referência). A cânula guia possui o comprimento de 12,5 mm e estava afixada ao crânio com acrílico dental. Para a microinjeção foi usado uma agulha gengival cujo comprimento era 1 mm maior daquele da cânula guia.

Drogas

Solução salina (0,9%) e NMDA (15 ug / ul; Sigma – Aldrich) diluído em água destilada foram utilizados neste trabalho.

Procedimento

Os ratos eram submetidos à cirurgia para o implante da cânula e depois de seis dias eram divididos em grupos (choque – salina; choque – NMDA; não choque – salina; não choque – NMDA) e treinados na caixa de condicionamento ao contexto. O condicionamento era feito com a aplicação de quatro choques de 1.0 mA durante um período de cinco minutos.

Depois do condicionamento os ratos eram deixados por 6 horas na gaiola habitat. Passado esse período, se dava início à segunda fase, na qual era realizada a microinjeção de NMDA ou salina (0.2 ul aplicados em 10 segundos). Imediatamente após a aplicação, os sujeitos eram colocados na caixa de condicionamento e suas respostas de fuga eram registradas, utilizando o programa XPLORAT.[11]

Resultados

Todos os dados foram expressos em uma escala contendo o número de comportamentos de congelamento que foram registrados a cada minuto e apresentados de média de comportamento bem como o erro padrão da média (EPM). Os dados foram analisados através do teste *t* de Student para amostras independentes. Um valor de *p* igual a 0,05 foi considerado significativo. Animais submetidos ao condicionamento de medo contextual (choque – salina) apresentaram um maior número de resposta de congelamento em

comparação aos animais do grupo controle (não choque- salina) que não foram expostos aos choques elétricos.

Essa interpretação recebe suporte estatístico uma vez que o grupo que recebeu choque apresenta uma maior taxa de congelamento em comparação ao grupo que não recebeu choque. Estes resultados estão de acordo com literatura e indicam que o nosso procedimento de condicionamento do medo contextual foi validado.

Os animais que foram submetidos ao condicionamento de medo contextual e receberam a microinjeção de NMDA na MCPD (grupo choque – NMDA) apresentaram uma menor resposta de fuga em comparação com o grupo que recebeu a microinjeção de NMDA na MCPD e não receberam os choques (grupo não choque – NMDA)

Análise histológica

Ao final do experimento, os animais receberam uma overdose de Thiopental Sódico e seus cérebros foram perfundidos com salina e formalina a 10%. Os cérebros foram removidos, sendo posteriormente fixados em formalina 10% por três dias e cortados em seções coronais de 60 µm através de um criostato. Os cortes foram preparados em lâminas de microscopia e analisados a fresco com o auxílio de uma lupa. Os sítios de estimulação foram localizados em Atlas [10] de cérebro de rato através da marcação de corante Azul de Metileno.

A análise histológica indicou que as cânulas estavam localizadas dentro ou nas bordas da MCPD, possibilitando assim a correta microinjeção de NMDA na região desejada.

Discussão

Os progressos recentes na neurociência vêm mostrando que a ansiedade e o medo tem suas raízes em sistemas neurais específicos e podem ser quantificados através de reações de defesa que animais apresentam frente a estímulos de perigo inato ou aprendido. Esses modelos animais podem ser utilizados para buscar compreender a relação entre os diferentes transtornos de ansiedade.

A resposta de defesa tem sido amplamente utilizada como modelo animal de pânico. Por outro lado, o condicionamento contextual de medo pode ser utilizado como modelo animal de ansiedade. Dessa forma, a relação entre ansiedade e transtorno de pânico pode ser investigada em uma condição experimental altamente controlada através de animais de laboratório.

O modelo de Deakin e Graeff [12] formula a teoria do papel dual da 5-HT, postulando a existência de dois sistemas serotoninérgicos independentes que modulariam respostas comportamentais a estímulos aversivos agudos condicionados e incondicionados.

Neste modelo, a amígdala, encarregada da avaliação do grau de perigo representado por estímulos e situações externas, seria responsável pela investigação cautelosa [13]. O resultado desta interpretação seria, então, transmitido a MCPD, que, por sua vez, se encarregaria de programar e selecionar diferentes padrões comportamentais de defesa. A inervação serotoninérgica chegaria até a amígdala e MCPD através de duas vias distintas provenientes do núcleo dorsal da rafe (NDR), respectivamente o trato prosencefálico medial e o trato periventricular.

Na MCPD, a 5-HT parece desempenhar uma função inibitória, impedindo a manifestação de padrões fixos de defesa ativa a estímulos aversivos inatos (luta e fuga), em situações onde o perigo é apenas potencial ou distal. Neste caso, a movimentação brusca do animal é indesejável, fazendo com que este fosse mais facilmente percebido pelo predador. Paralelamente, a 5-HT promove estratégias de defesa elaboradas, tais como a investigação cautelosa e o congelamento, mais adequadas a tais situações. Apenas quando o perigo se torna iminente, a estimulação da MCPD sobrepuja a inibição serotoninérgica, liberando comportamentos de fuga, já mais apropriados.

Para Deakin e Graeff estando o trato NDR-Amígdala relacionado à ansiedade condicionada e o NDR-MCPD a incondicionada, disfunções nestes dois sistemas resultariam naqueles quadros psicopatológicos já apresentados anteriormente: transtorno de ansiedade generalizada e transtorno do pânico. Este mecanismo explicaria, pelo menos em parte, evidências obtida com a 5-HT no século passado.

Visto que nossos resultados indicam que o comportamento de congelamento, induzido pelo condicionamento contextual aversivo, foi capaz de inibir reações ativas de fuga induzida pela microinjeção de NMDA na MCPD, pode-se concluir que ativação de mecanismos cerebrais que permeiam a ansiedade produz um efeito inibitório nos ataques de pânico. Assim, como sugerido na teoria do papel dual da serotonina por Deakin e Graeff, os dados estão de acordo com a proposição que o sistema serotoninérgico ascendente aumentaria o medo (ou ansiedade) por estimular o substrato de defesa da amígdala e, simultaneamente, impediria a expressão de pânico por inibir os neurônios que comandam a fuga na MCPD.

Nesse sentido, os estímulos aversivos condicionados teriam a função de guiar o organismo fora de situações de perigo. Esses estímulos produzem medo ou ansiedade antecipatória e a ativação disfuncional desse mecanismo de defesa produziria ansiedade generalizada.

O fato do condicionamento de medo contextual ter sido capaz de inibir reações ativas de fuga pela microinjeção de NMDA MCPD está em conformidade com a teoria de Fanselow que diz serem as respostas defensivas animais organizadas hierarquicamente. Segundo esta teoria [14], o congelamento é a principal resposta a um estímulo aversivo, inato ou aprendido e pode inibir formas ativas de comportamento nociceptivos a uma variedade de situações ameaçadoras. Por exemplo, o condicionamento de medo contextual pode disparar uma reação analgésica que pode inibir o reflexo de retirada a um estímulo doloroso [15].

Além disso, tem sido mostrado que o condicionamento do medo contextual pode inibir vigorosas respostas de corrida e saltos disparados pelo choque nas patas bem como a fuga defensiva induzida por choque [16].

Finalmente, nossos resultados têm uma consequência imediata na compreensão à cerca da relação entre ansiedade e pânico em humanos. Experimentos bem controlados indicam que há duas, mas diferentes circuitárias neurais responsáveis pela ocorrência de vias opostas dos comportamentos defensivos animal [17]. Um sistema, relacionado a uma postura de congelamento defensivo, envolve a ativação do complexo amigdalóide e da MCPV. O mau funcionamento deste sistema defensivo parece estar relacionado aos Transtornos de Ansiedade Generalizada [18].

O outro sistema é responsável pela via completamente oposta do comportamento defensivo. Ele envolve formas extremamente vigorosas de comportamento ativo, como as reações tipo fuga-luta. A MCPD está claramente associada com estas respostas defensivas ativas estereotipadas e sua hiperativação parece esta relacionada ao Transtorno do Pânico [19]. Assim nossos resultados indicaram que o condicionamento de medo contextual induziu comportamento defensivo de congelamento e inibiu reações defensivas ativas evocadas pela microinjeção de NMDA na MCPD, que pode estar implicada na relação inversa entre ansiedade e ataques de pânico. Assim, a frequência de ataques de pânico é maior no início da agorafobia, quando há pouca ansiedade antecipatória, se comparada com a última fase, quando a ansiedade esta totalmente desenvolvida [20].

Resultados farmacológicos também têm sugerido que o aumento de ansiedade inibe a ocorrência de ataques de pânico. Pacientes com Transtorno de Pânico tratados com drogas que bloqueiam a recaptção de serotonina mostram uma diminuição nos ataques de pânico [21]. Portanto, parece que a ativação da circuitaria neural envolvida na ansiedade pode de fato inibir a incidência de pânico.

Conclusões

Os dados apresentados neste trabalho apontam para a direção de que o medo produzido através do condicionamento contextual de medo é capaz de inibir reações inatas de defesa produzidas pela microinjeção de NMDA na MCPD. Esses resultados estão de acordo com a teoria dual do papel da serotonina, que postula uma relação inversamente proporcional entre ansiedade e transtorno do pânico. Esses resultados representam uma demonstração experimental da relação inibitória entre diferentes transtornos relacionados à ansiedade [22].

Finalmente, nossos dados também indicam que as respostas defensivas dos animais são organizadas hierarquicamente. Desta forma, o congelamento é a principal resposta inata ou aprendida a um estímulo aversivo, podendo inibir formas ativas de comportamento nociceptivos a uma variedade de situações ameaçadoras.

Referências

- 1- DRACTU, L.; Lader, M. Ansiedade: conceito, classificação e biologia. Uma interpretação contemporânea da literatura. *Jornais Brasileiros de Psiquiatria*, 1993; 42(1): 19-32.
- 2- FREUD, S. Inhibition, symptoms and anxiety. In: Strachey J. Editor The Standart edition of complet works of Sigmund Freud vol. 20.London: The Hogarth Press 1959.
- 3- DSM IV^{TR}: Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais. Porto Alegre :Artes Médicas, 1995.
- 4- GRAEFF, G. F. Serotonina, matéria cinzenta periaquedutal e transtorno do pânico. *Rev Bras Psiquiatr* 2003; 25(Supl II): 42-5.
- 5- LANDEIRA-FERNANDEZ, J.; FANSELOW, M. S. ; DEOCA, B. Opposite roles of ventral dorsolateral periaqueductal gray in conditioned fear-related defensive behavior.. In: *Soc. Neuroscience Abstract*, 1992, Anaheim, 1992.
- 6- MAGIEREK, Valeska; RAMOS, P. L.; SILVEIRA-FILHO, N.G.; NOGUEIRA, R. L. and LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Context fear conditioning inhibits panic-like behavior elicited by electrical stimulation of dorsal periaqueductal gray.
- 7- CONTI, L. H.;MACIVER, C.R.; FERKANY, J. W.; ABREU, M. E. Footshock-induced freezing behavioral in rats as a model for assesing anxiolytics. *Psychopharmacology (Berl)*, 1990; 102(4):492-497
- 8-FANSELOW, M. S.; KIM, J. J. ; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Anatomically selective blockade of Pavlov fear conditioning by application of NMDA antagonist to the amygdala and periaqueductal gray. In: *SOC. Neuroscience Abstract*, 1991. Nova Orleans, 1991.
- 9- FANSELOW, M. S.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J.; DECOLA, J. P.; DEOCA, B. Ventral and dorsolateral regions of midbrain periaqueductal gray control different stages of defensive behavior: dorsolateral PAG lesions enhance the defensive freezing produced by massed and immediate shock. *AGRESSIVE BEHAVIOR*, v. 23, p. 335-338, 1995.
- 10- PAXINOS, G.; WATSON, C. The brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, New York, 1986.

- 11- CARDENAS, F. P.; LAMPREA, M. R. and MORATO, S. (202): XPLORAT: freeware for animal recording. In press
- 12- DEAKIN, J.W.F.; GRAEFF, F. G. 5-HT and mechanisms of defense. *Journal of Psychopharmacology*, 1991;5:305-315
- 13- FANSELOW, M. S. Analgesia as a response to aversive Pavlovian conditional stimuli: Cognitive and emotional mediators. In Denny, Maurice Ray (Ed). *Fear, avoidance, and phobias: A fundamental analysis*. Hillsdale, NJ, England: Lawrence Erlbaum Associates, Inc. 1991b; 61-86.
- 14- FANSELOW, M. S. Conditional and unconditional components of post-shock freezing. *Pavlovian Journal of Biological Science*, 1980; 15:177-182.
- 15- BRANDÃO, M.L; AGUIAR, J.C; GRAEFF, F. G. GABA mediation of the antiaversive action of the minor tranquilizers. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 1982; 16: 397-402.
- 16- BOLLES, R.C; FANSELOW, M. S. Endorphins and behavior. *Annual Review Psychology*, 1982;33:87-101.
- 17- FANSELOW, M. S.; SIGMUND, R. A .Specie specific dangers signals, endogenous opioid analgesia, and defensive behavior, *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Process*, 1986.12:301-309.
- 18- GRAY, J. A. *The Neuropsychology of Anxiety*. New York, Oxford University Press, 1982
- 19- LANDEIRA-FERNANDEZ, J; DECOLA, J. P; KIM, J. J.; FANSELOW, M. S. . Immediate Shock Deficit in Fear Conditioning: Effects of Shock Manipulations. *Behavioral Neuroscience*, v. 120, p. 873-879, 2006.
- 20- GRAEFF, F.G.; ZANGROSSI, H. Jr. Animal models of anxiety disorders. In: D'haenen, H.; den Boer, J.A and Willner, P. (eds) *Biological Psychiatry*. John Wiley & Son Ltd, New York. 2002
- 21- KLEIN, D. F.; KLEIN, H. M. The definition and psychopharmacology of spontaneous panic and phobia. In: *Psychopharmacology of Anxiety*, Typer P (ed), Oxford University Press, Oxford, 1989; 135-162
- 22- GORMAN, J. M.; LIEBOWITZ, M. R.; FYER, A.J; GOETZ, D.; CAMPEÃS, R.B.; FYER, M.R.; DAVIES, S. O.; KLEIN, D.F. An open trail of fluoxetine in the treatment of panic attacks. *Journal Clinical Psychopharmacological*, 1987: 7 (5): 329-32