



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
CENTRO BIOMÉDICO

**EFEITOS DOS GLICOCORTICÓIDES SOBRE OS LIMIARES
DA REAÇÃO DE DEFESA INDUZIDA PELA ESTIMULAÇÃO
ELÉTRICA DA MATÉRIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL
DORSAL DE RATOS**

Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas

Tathiana Corrêa Rangel

Orientador:

Prof. Dr. Luiz Carlos Schenberg

Vitória, ES

**Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Fisiológicas do Centro
Biomédico da Universidade Federal do
Espírito Santo, para obtenção do título
de Mestre em Ciências Fisiológicas.**

Vitória, 27 de novembro de 2007

Rangel, Tathiana Corrêa

Título: Efeitos dos glicocorticóides sobre os limiares da reação de defesa induzidos pela estimulação elétrica da matéria cinzenta periaquedutal dorsal de ratos.

Tathiana Corrêa Rangel – Vitória, 2007.

Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Centro Biomédico, Universidade Federal do Espírito Santo.

Orientador: Prof. Dr. Luiz C. Schenberg

1. Reação de Defesa, 2. Matéria Cinzenta Periaquedutal, 3. Corticosterona, 4. Dexametasona, 5. Ansiedade, 6. Transtorno do Pânico, 7. Estresse, 8. Rato.

EFEITOS DOS GLICOCORTICÓIDES SOBRE OS LIMIARES DA REAÇÃO DE DEFESA INDUZIDA PELA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DA MATÉRIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL DE RATOS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro Biomédico da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Tathiana Corrêa Rangel

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Luiz C. Schenberg - UFES, Orientador

Prof. Dra. Adelina Martha dos Reis - UFMG

Prof. Dr. Athelson Stefanon Bittencourt- UFES

Coordenador do PPGCF - Prof. Dr. Luiz C. Schenberg

Vitória, 27 de novembro de 2007

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, gostaria de agradecer a Deus, pelas alegrias e vitórias, pela possibilidade de realizar mais um sonho e pela presença constante em minha vida.

Um agradecimento especial ao Prof Schenberg, que me recebeu, me aceitou e me incentivou na pesquisa científica. Foram momentos de paciência, dedicação, aprendizado e disponibilidade. Uma pessoa lutadora, inovadora, sábia e extremamente modesta. Um exemplo a seguir!

Ao Prof e amigo Athelson, pelas lições repassadas e pelas dicas imprescindíveis. Não podendo esquecer dos encontros animados organizados em congressos, churrascos, aniversários e até do seu casamento com a querida Ana Paula.

Aos amigos do laboratório, cuja presença e força foram indispensáveis. Especialmente ao Gustavo, a Andressa e a Cláudia que me ensinaram as metodologias iniciais. A Carol pelo companheirismo; Ana Neide, Renzo e Diego sempre dispostos a ajudar no LCE; Rachel, Fabiane, Teresa, Carla, Monique, Rúbia e Raner. Enfim, a todos pelas emoções compartilhadas!

Aos demais colegas e professores de outros laboratórios, que também me auxiliaram, principalmente a Prof^a Ester.

Agradeço também ao carinho, ao incentivo e ao apoio dos meus pais, irmão, padrinhos, familiares, especialmente das minhas tias Bebel, Sebá e Vini. Obrigada por tudo, amo vocês!

E finalmente, quero agradecer a todas as pessoas que, mesmo indiretamente, colaboraram e compreenderam certas ausências ao longo desta jornada.

A participação de vocês nesta conquista foi muito importante. O momento é de comemoração!!!

Tathiana

ÍNDICE

RESUMO	10
ABSTRACT	13
INTRODUÇÃO GERAL: Função Hipotálamo-Hipófise-Adrenal nos Transtornos Psiquiátricos	16
Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal.....	16
Receptores de corticosteróides	21
Funções dos corticosteróides	25
Corticosteróides e estresse.....	29
Corticosteróides e ansiedade	34
Corticosteróides e depressão.....	43
Corticosteróides e ataques de pânico	46
Referências.....	56
OBJETIVOS	73
RESULTADOS	75
Efeitos da dexametasona e corticosterona sobre os limiares da reação de defesa induzidos pela estimulação elétrica da matéria cinzenta periaquedutal de ratos	76
Introdução	77
Material e Métodos	81
Resultados.....	89
Discussão.....	97
Referências	102
CONCLUSÕES GERAIS	108

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

Figura 1 Modelo de ligação dos receptores glicocorticóides e mineralocorticóides.....	23
Figura 2 Sistema de Inibição Comportamental.....	36
Figura 3 Comorbidade da depressão maior com o transtorno de pânico.....	45

ESTUDO

Figura 1 Localização histológica dos eletrodos implantados na MCPA	90
Figura 2 Efeitos da administração intracerebroventricular de salina sobre os limiares das respostas de defesa induzidas por estimulação da matéria cinzenta periaquedutal	91
Figura 3 Efeitos da administração central de dexametasona sobre os limiares das respostas de defesa induzidas por estimulação da matéria cinzenta periaquedutal	92
Figura 4 Efeitos da administração central de corticosterona sobre os limiares das respostas de defesa induzidas por estimulação da matéria cinzenta periaquedutal.....	94

ÍNDICE DE TABELAS

INTRODUÇÃO GERAL

Tabela 1	Comparação das propriedades do cortisol e dexametasona.....	27
Tabela 2	Isomorfismo dos ataques de pânico e das respostas induzidas por estimulação da MCPAd em homens e ratos.....	51
Tabela 3	Ação de agentes panicogênicos sobre o eixo HHA	54

ESTUDO

Tabela 1	Protocolo experimental.....	86
Tabela 2	Efeitos da administração central de dexametasona, corticosterona ou salina sobre os limiares medianos da reação de defesa ($I_{50} \pm EP$, μA) induzida por estimulação elétrica da matéria cinzenta periaquedutal dorsal	95
Tabela 3	Efeitos da administração central de dexametasona, corticosterona ou salina sobre a frequência de entradas e tempo de permanência nos braços abertos, braços fechados e plataforma central do LCE.....	96

ABREVIATURAS

ACTH – corticotrofina ou hormônio adrenocorticotrófico.

AVP – vasopressina.

CORT – corticosterona.

CRH – hormônio liberador de corticotrofina.

DEXA – dexametasona.

DM – depressão maior.

EIC – estimulação intracraniana.

GR – receptor glicocorticóide.

HHA – hipotálamo-hipófise-adrenal.

i.c.v. – intracerebroventricular.

IP – intraperitoneal.

LC – locus cerúleo.

LCE – labirinto-em-cruz elevado.

MCPA – matéria cinzenta periaquedutal.

MCPAd – matéria cinzenta periaquedutal dorsal.

MR - receptor mineralocorticóide.

OT – ocitocina.

POMC – pró-opiomelanocortina.

PVN – núcleo paraventricular do hipotálamo.

SO – núcleo supraóptico.

TEPT – transtorno de estresse pós-traumático.

TP – transtorno do pânico.

RESUMO

RESUMO: *Efeitos dos glicocorticóides sobre os limiares da reação de defesa induzida pela estimulação elétrica da matéria cinzenta periaquedutal dorsal de ratos.* Rangel, T.C., Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Brasil, 2007.

Em estudo anterior de nosso laboratório (Vargas, 2002) verificamos que enquanto a imobilidade induzida por estimulação da matéria cinzenta periaquedutal dorsal (MCPAd) foi facilitada 3 h após a injeção intraperitoneal (IP) de dexametasona (DEXA), a micção foi inibida. Como a DEXA não atravessa a barreira hematoencefálica em condições normais, estes efeitos foram, mais provavelmente, causados pela supressão periférica do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA). Contudo, eles também poderiam ter sido causados por uma ação central da DEXA favorecida pelo aumento da permeabilidade da barreira na região do eletrodo. O presente estudo avaliou os efeitos da administração intracerebroventricular (i.c.v.) de DEXA (0,8 µg /15 µL, n=20), corticosterona (CORT, 40 µg /15 µL, n=20) ou salina (NaCl 0,9%, 15 µL, n=20) sobre os limiares da reação de defesa induzida pela estimulação elétrica da MCPAd, assim como sobre o comportamento exploratório no labirinto-em-cruz elevado (LCE), um equipamento sensível a alterações da ansiedade. Ratos com eletrodos implantados na MCPAd cuja estimulação eliciou as respostas de galopes ou saltos com intensidades a 85 µA foram submetidos a 4 sessões de estimulação senoidal (0-90 µA, 60 Hz, c.a.) em 3 dias consecutivos: Dia 1 – controle, Dia 2 – 15 minutos e 3 horas após a injeção das drogas, Dia 3 – *washout*. O teste do LCE foi realizado no Dia 2, 1 hora e 30 minutos após a administração da DEXA, CORT ou salina. Os limiares medianos ($I_{50} \pm EPM$) das respostas de imobilidade (IMO), exoftalmia (EXO), trote (TRT), galope (GLP), salto (SLT), micção (MIC) e defecação (DEF) foram estimados por regressão logística das frequências acumuladas e comparados por razão de verossimilhanças ($P < 0,05$, Bonferroni). A DEXA facilitou o SLT, reduzindo o limiar desta resposta de forma significativa ($\Delta I_{50} = -16,8\%$). Ao contrário, a DEXA atenuou o GLP ($\Delta I_{50} = 17,1\%$ aos 15 minutos e 31,2% após 24 horas) e a DEF ($\Delta I_{50} = 22,3\%$). A CORT teve efeitos similares sobre o SLT ($\Delta I_{50} = -14,3\%$ após 3 horas) e GLP ($\Delta I_{50} = 17,8\%$ aos 15 minutos e 13,8% após 3 horas), porém, facilitou a MIC ($\Delta I_{50} = -29,3\%$ aos 15 minutos) e a DEF ($\Delta I_{50} = -31,4\%$ após 3 horas). A salina atenuou a MIC ($\Delta I_{50} = 12,3\%$ aos 15 minutos e 42,2% após 24 horas) e a IMO ($\Delta I_{50} = 13,5\%$ após 24 horas), contudo, as respostas de defecação e micção foram virtualmente abolidas 3 h após. As outras respostas não

foram alteradas significativamente. Nenhum dos tratamentos realizados teve efeitos significantes sobre os valores percentuais de exploração dos braços aberto e fechado do LCE, sugerindo a ausência de efeitos ansiolíticos ou ansiogênicos. Contudo, os tratamentos tiveram um efeito significativo sobre a exploração da plataforma central. Comparado ao grupo salina, estes efeitos foram devidos, principalmente, à redução acentuada da exploração da plataforma central pela CORT. Uma redução menor, porém, marginalmente significativa também foi observada após a administração de DEXA. Os efeitos distintos sobre as respostas de MIC e DEF podem ter sido devidos à afinidade distinta das drogas pelos receptores I e II. Portanto, os efeitos anteriores de facilitação da IMO e atenuação da MIC foram, muito provavelmente, devidos à supressão periférica do eixo e redução dos níveis circulantes de CORT. Embora a atenuação do GLP possa ter sido devida à sua substituição pelo SLT, a redução dos limiares de SLT é compatível com a facilitação dos ataques de pânico pelo estresse. Assim, embora o eixo HHA não seja ativado nem nos ataques de pânico, nem na estimulação da MCPAd, situações estressantes poderiam predispor o indivíduo a estes ataques.

Palavras-Chave: Corticosterona, Dexametasona, Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal, Matéria Cinzenta Periaquedutal Dorsal, Reação de Defesa, Pânico, Estresse.

ABSTRACT

ABSTRACT: *Effects of glucocorticoids on the thresholds of the defense reaction induced by electrical stimulation of dorsal periaqueductal gray matter of rats.* Rangel, T.C., MSc Thesis, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Brazil, 2007.

Preliminary results (Vargas, 2002) showed that after 3 hours peripheral injections of dexamethasone (DEXA) caused a reduction in the thresholds of DPAG-evoked immobility. In contrast, DPAG-evoked micturition thresholds were raised. Because DEXA is supposed to suppress the hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) axis peripherally. The present study evaluated the effect of intracerebroventricular (i.c.v.) injections of DEXA (0.8 µg /15 µL, n=20), corticosterone (CORT, 40 µg /15 µL, n=20) or salina (NaCl 0,9%, 15 µL, n=20) on the thresholds of the defense reaction induced by electrical stimulation of DPAG, as well as by the exploration behaviour in the elevated-plus-maze (EPM), a sensitive equipment that changes the anxiety. Rats which stimulation induced gallops or jumps with less than 85 µA were submitted to 4 stimulation sessions with sine-wave increasing intensities (0-90 µA, 60 Hz, a.c.) in 3 consecutive days: Day 1 - control, Day 2 - 15 min and 3 h after the central injection of DEXA, CORT or salina, Day 3 – washout. The EPM performance was assessed in the Day 2, 1.5 h after its administration. The thresholds median ($I_{50} \pm SE$) of responses of immobility (IMM), exophthalmus (EXO), trotting (TRT), galloping (GLP), jumping (JMP), micturition (MIC) e defecation (DEF) were compared through likelihood ratio tests ($P < 0.05$, Bonferroni's criterion). The DEXA facilitated JMP ($\Delta I_{50} = -16.8\%$), they attenuated GLP ($\Delta I_{50} = 17.1\%$ 15 minutes and 31.2% after 24 hours) and DEF ($\Delta I_{50} = 22.3\%$). Whereas the CORT had similar effects on JMP ($\Delta I_{50} = -14.3\%$ after 3 hours) and GLP ($\Delta I_{50} = 17.8\%$ 15 minutes and 13.8% after 3 hours), but facilitated DEF ($\Delta I_{50} = -31.4\%$ after 3 hours) and MIC ($\Delta I_{50} = -29.3\%$ after 15 minutes). The salina attenuated MIC ($\Delta I_{50} = 12.3\%$ 15 minutes and 42.2% after 3 hours) and the IMM ($\Delta I_{50} = 13.5\%$ after 24 hours), but the responses DEF and MIC were virtually abolished after 3 h. Remaining defensive responses were not changed significantly. Nobody of the drugs produced an anxiolytic-like effect significant by the open-arm and close-arm exploration in the EPM. Although, the treatments were the effect significant by the exploration in the central platform. Compared with the salina, these effects were due the marked reduction of exploration in the central platform by CORT. A significant reduction was observed too, after injections of DEXA. Glucocorticoids diverse effects on MIC and DEF were most likely due to their distinct affinity for type- I and II receptors. Because DEXA present

results were the opposite of the previous studies with peripheral injections, the latter results should be ascribed to the peripheral suppression of HPA axis and ensuing reduction in CORT plasma levels. GLP attenuation was most likely due to its replacement by JMP, which thresholds were significantly facilitated. The decrease in JMP thresholds is compatible with the stress facilitation of panic attacks. Although panic attacks do not activate the HPA axis, there are evidences of the hyperactivity of HPA axis in panic disorder. Likewise to panic attacks, DPAG stimulation does not activate the HPA axis. Nevertheless, stress-induced increases in HPA axis activity are likely to influence the functioning of DPAG.

Keywords: Corticosterone, Dexamethasone, Hypothalamus-Pituitary-Adrenal axis, Periaqueductal Gray Matter, Defense Reaction, Panic, Stress.

INTRODUÇÃO GERAL

FUNÇÃO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-ADRENAL NOS TRANSTORNOS PSIQUIÁTRICOS

Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal

O eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) integra um sistema neural e endócrino que visa à manutenção da homeostase. A regulação apropriada do eixo é essencial para a saúde e sobrevivência do indivíduo, o eixo sofre influências do ritmo circadiano, estresse, estruturas neurais e, principalmente, da retroalimentação negativa exercida pelos glicocorticóides.

O hipotálamo é a parte do diencefalo localizado abaixo do tálamo entre a lâmina terminal e os corpos mamilares, formando as paredes e o assoalho do 3° ventrículo. No assoalho do 3° ventrículo, as duas metades do hipotálamo se reúnem, para formar uma região semelhante a uma ponte, conhecida como eminência mediana. O hipotálamo está ligado à hipófise anterior e posterior pelo sistema porta hipotalâmico-hipofisário. As artérias hipofisária superior, medial e inferior suprem o estoque arterial sangüíneo para a eminência mediana e hipófise. Os neurônios magnocelulares dos núcleos supraóptico (SO) e paraventricular (PVN) apresentam longos axônios que terminam na hipófise posterior. Os axônios dos neurônios parvocelulares terminam na eminência mediana, onde eles liberam seus neuropeptídeos. A veia portal longa drena a eminência mediana, transportando os peptídeos do

plexo capilar primário para o plexo secundário, que supre o estoque sanguíneo da hipófise anterior (Molina, 2006).

Os hormônios produzidos pela hipófise anterior são: a prolactina (PRL), o hormônio estimulante da tireóide ou tireotrofina (TSH), o hormônio do crescimento (GH), o hormônio luteinizante (LH), o hormônio folículo estimulante (FSH) e os pró-hormônios originados da clivagem da pró-opiomelanocortina (POMC). Entre os sintetizados a partir da POMC temos: o hormônio adrenocorticotrófico ou corticotrofina (ACTH), as β -endorfinas, a β -lipotrofina (β -LPH) e o α -hormônio estimulante dos melanócitos (α -MSH). Esta glândula exerce o controle central da maioria dos hormônios endócrinos através da produção e liberação dos hormônios tróficos.

Os neuropeptídeos produzidos pelos neurônios magnocelulares liberados na hipófise posterior são a ocitocina (OT) e a arginina-vasopressina (AVP). Como os axônios partem do SO e do PVN, eles originam colaterais, algumas das quais terminam na eminência mediana. O efeito clássico da OT é a estimulação da contração de células mioepiteliais que envolvem o alvéolo e os ductos das glândulas mamárias e a contração miometrial rítmica no útero, ajudando na expulsão do feto. Contudo, a OT também potencializa a liberação de ACTH pelo CRH, interage com o receptor da AVP para produzir vasoconstrição, estimula a liberação de prolactina e tem uma influência proeminente sobre o comportamento maternal. O efeito principal da AVP consiste no aumento da reabsorção de água no túbulo contorcido distal e nos ductos coletores medulares do rim (Griffin e Ojeda, 1996).

A AVP, isoladamente, é um secretagogo fraco de ACTH, mas apresenta ação sinérgica com o hormônio liberador de corticotrofina (CRH),

potencializando a liberação do primeiro. Acredita-se que o CRH e a AVP mobilizem estoques diferentes de ACTH hipofisário durante a resposta ao estresse (Salomé *et al.*, 2006).

Os principais hormônios do eixo HHA são o cortisol, em humanos, e a corticosterona (CORT), em roedores e outras espécies. Os corticosteróides são derivados do colesterol e sintetizados na zona fasciculada do córtex da adrenal sob controle do ACTH (Griffin e Ojeda, 1996; Boyle *et al.*, 2006).

O ACTH provém da clivagem da POMC e é sintetizado por células especializadas da hipófise anterior (corticotrófos). Sua liberação é controlada pela ação coordenada de dois neuropeptídeos, o CRH e a AVP. Contudo, embora a AVP seja secretada pelos neurônios do PVN e SO, a secreção de ACTH induzida por AVP deve-se apenas à secreção do PVN (Aguilera e Rabadan-Diehl, 2000). Ambos os hormônios são liberados no leito capilar da eminência mediana, de onde alcançam a hipófise anterior (CRH) via circulação porta hipotalâmica-hipofisária (Aguilera e Rabadan-Diehl, 2000; Molina, 2006).

A liberação de ACTH também é facilitada, em menor grau, pela angiotensina II, OT, peptídeo intestinal vasoativo e aferências catecolaminérgicas que deságuam no hipotálamo, provenientes dos núcleos adrenérgicos e noradrenérgicos do tronco cerebral (bulbo ventrolateral, núcleo dorsal motor do vago, núcleo do trato solitário e locus cerúleo (LC)) (Palkovits, 1987).

O PVN recebe numerosas aferências de outros núcleos hipotalâmicos, do tronco encefálico, do órgão subfornicial (que monitora a composição do líquido) e de várias estruturas do sistema límbico (Mormède *et*

al., 2007). Em particular, o hipocampo, mediante neurônios do subiculum ventral, é a principal influência neurogênica, inibindo o eixo HHA (Sapolsky *et al.*, 1984; Mueller *et al.*, 2004). Além do hipocampo, o córtex préfrontal também inibe a secreção do eixo, enquanto a amígdala está relacionada à sua ativação (Herman *et al.*, 2005). A multiplicidade de sinais convergindo para o PVN, explica a sensibilidade do eixo HHA para uma ampla variedade de estímulos, tanto de origem interna quanto externa.

A expressão de CRH no hipotálamo sofre influências de vários fatores, como catecolaminas, serotonina (5-HT), acetilcolina, citocinas, ácido gama-aminobutírico (GABA) e glicocorticóides. Os neurônios do PVN com imunopositividade para o CRH recebem aferências adrenérgicas do núcleo do trato solitário, LC e bulbo ventrolateral (Holsboer e Barden, 1996). Existem evidências de que o CRH funcione como um neurotransmissor nessas regiões. Desta maneira, acredita-se que os sistemas neuronais de CRH, tanto hipotalâmicos quanto da amígdala (Kalin *et al.*, 1994), estejam estrategicamente situados para integrar respostas endócrinas, comportamentais, autonômicas e imunes do estresse (Kalin *et al.*, 1988, 1994; Kalin e Takahashi, 1990; Arborelius *et al.*, 2000).

As ações do CRH são mediadas por receptores de membrana de alta afinidade (CRH-R) acoplados à guanilato ciclase. Portanto, sua estimulação resulta na elevação dos níveis intracelulares de monofosfato cíclico da guanosina (GMPc). Foram identificados dois subtipos de receptores de CRH (CRH-1 e CRH-2) tanto em humanos quanto em ratos. O receptor CRH tipo-1 é encontrado nos corticotrófos, neocórtex, cerebelo, estruturas límbicas, incluindo a amígdala e matéria cinzenta periaquedutal (MCPA). O

CRH-2 está distribuído no PVN, área septal lateral, núcleo ventromedial, adrenal, além da MCPA (Arborelius *et al.*, 2000; Gutman *et al.*, 2003). Além disto, ambos os receptores são encontrados em inúmeros órgãos periféricos. A MCPA é uma região que contém tanto neurônios quanto receptores de CRH. Os efeitos fisiológicos do CRH nesta estrutura são desconhecidos, porém existem evidências de que o CRH exerça efeitos pós-sinápticos predominantemente excitatórios (Bowers *et al.*, 2003). A participação fisiológica do CRH-1 está relacionada com a regulação do eixo HHA em resposta ao estresse, enquanto o CRH-2 está envolvido com o efeito anorexigênico do CRH e da urocortina (um peptídeo análogo ao CRH) na homeostase do balanço energético (Arborelius *et al.*, 2000; De Kloet, 2003; Gutman *et al.*, 2003).

A atividade do eixo é altamente variável e a secreção do cortisol é pulsátil, com uma periodicidade de 90 minutos (Mormède *et al.*, 2007). Na maioria dos vertebrados a secreção de corticosteróides apresenta um ritmo circadiano com picos no início da fase ativa. A ritmicidade circadiana dos glicocorticóides depende do núcleo supraquiasmático. Lesões desta estrutura produzem um nivelamento do ritmo de corticosteróides para níveis intermediários entre o nadir e acrofase circadianas (Herman *et al.*, 2005).

O eixo HHA é raramente inibido, sendo sensível a uma variedade enorme de estímulos. As respostas dos corticosteróides podem ser iniciadas por ativação direta do PVN através de vias nociceptivas (dor), recrutamento de programas defensivos inatos (aversão ao predador) ou por estimulação sensorial multimodal (medo condicionado) (Herman *et al.*, 2005). Além dessas condições, o eixo HHA é influenciado por fatores ambientais como temperatura e humidade (Mormède *et al.*, 2007).

Receptores de Corticosteróides

O sistema nervoso central expressa dois tipos de receptores citosólicos de glicocorticóides com padrões similares de expressão: o receptor mineralocorticóide (MR) ou tipo-I e o receptor glicocorticóide (GR) ou tipo-II. O MR apresenta a mesma afinidade por glicocorticóides e mineralocorticóides, enquanto o GR apresenta baixa afinidade por mineralocorticóides. (Erdeljan *et al.* 2001; Gesing *et al.*, 2001; Kalman e Spencer, 2002; Boyle *et al.*, 2006).

Usando ensaios de ligação citosólica, Reul e De Kloet (1985) mostraram que os MRs estão presentes principalmente no septo dorsolateral e sítios heterogêneos do hipocampo, tendo sido observados altos níveis de MR na camada piramidal CA1 e CA2, na camada granular do giro denteado e na MCPA (Reul *et al.*, 2000; Gesing *et al.*, 2001). Os GRs são encontrados majoritariamente em toda a extensão do cérebro, com altos níveis no córtex cerebral, hipocampo, amígdala, MCPA, tálamo, PVN e SO (Reul *et al.*, 2000).

As diferenças de afinidade e distribuição no sistema nervoso sugerem que o receptor tipo-I, de alta afinidade, esteja envolvido com a atividade basal do eixo HHA, enquanto o receptor tipo-II, de baixa afinidade, seja responsável pela modulação do eixo em presença dos altos níveis de glicocorticóides no estresse (Holsboer e Barden, 1996).

O GR é um fator de transcrição pertencente a uma superfamília de receptores nucleares. Em seu estado inativo, os GRs estão localizados no citoplasma. Contudo, ao se ligarem aos glicocorticóides, os GRs são ativados e translocados para o núcleo da célula, influenciando a transcrição mediante ligação em seqüências específicas, chamadas 'elementos responsivos aos

glicocorticóides' (GRE, *glucocorticoid responsive elements*), situadas na região promotora de genes alvos ou pela interação com outros fatores de transcrição (Kitchener *et al.*, 2004; Mormède *et al.*, 2007). Um mecanismo adicional, isto é, o antagonismo dos fatores de transcrição, pode resultar na atenuação ou suspensão das atividades transcricionais. Em particular, a interação entre o GR e o fator nuclear de transcrição kappa B (NF κB) regula a expressão de vários componentes predominantemente envolvidos nas respostas imune e inflamatória (Ferreira *et al.*, 2005; Mikics *et al.*, 2005). Ambos os tipos de receptores esteróides (GRs ou MRs), ligam-se aos GRE na região regulatória de promotores de genes alvos como homodímeros ou formando um complexo heterodimérico com propriedades transcricionais diferentes dos respectivos homodímeros (Figura 1) (Holsboer e Barden, 1996). Estes mecanismos realçam muitos efeitos fisiológicos dos GRs, incluindo regulações do metabolismo, respostas imunes e comportamento (Kitchener *et al.*, 2004; Mormède *et al.*, 2007). Os GRs somente são ocupados de forma extensa quando os níveis de glicocorticóides estão altos como em situações de estresse, na acrofase do ciclo circadiano e na vigência de inibição da retroalimentação negativa do eixo HHA (Boyle *et al.*, 2006; Herrero *et al.*, 2006).

O GR é mantido em seu estado inativo, formando um heteroligômero com imunofilinas, ou com 'proteínas de choque térmico' (HSP, *heat shock proteins*), tais como a HSP-90, as quais, dependendo do conteúdo celular, podem conduzir a expressão gênica ativada por GR numa direção tecido-específica. Depois da ligação do glicocorticóide e da dissociação das HSPs, este receptor pode ligar-se ao DNA e agir como um fator de transcrição

dimérico, aumentando ou diminuindo a expressão dos genes responsivos aos glicocorticóides (Holsboer e Barden, 1996).

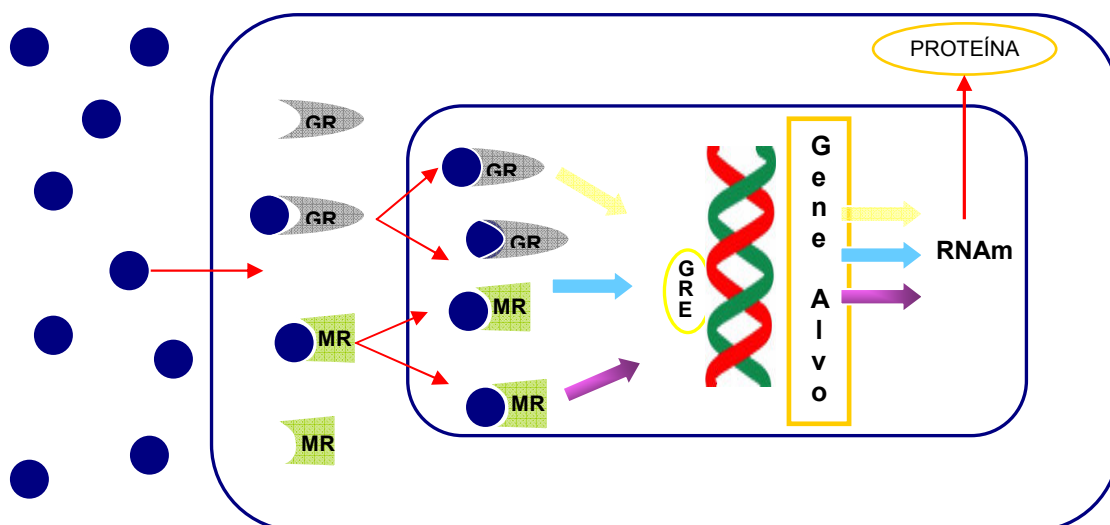


Figura 1: Um modelo dos receptores glicocorticóides (GR) e mineralocorticóides (MR), ligando-se aos elementos responsivos de glicocorticóides (GRE) na região regulatória de promotores de genes alvos (Holsboer e Barden, 1996).

Descoberto no final de 1960, o MR é um membro da superfamília de receptores esteróides de fatores de transcrição regulados por ligantes (Reul *et al.*, 2000; Gomez-Sanchez *et al.*, 2006). O MR tem afinidade similar para o mineralocorticóide aldosterona e pelos glicocorticóides cortisol e CORT, mas não para a dexametasona (DEXA), um glicocorticóide sintético que se liga aos GRs (Reul *et al.*, 2000; De Kloet, 2003; Gomez-Sanchez *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2006).

Estudos sobre a maturação cerebral mostraram que a DEXA pode causar prejuízos neuronais irreversíveis ou morte celular no estriado e no hipocampo. Por outro lado, enquanto a ocupação dos MRs confere neuroproteção, a ativação concomitante dos GRs e MRs, por altos níveis de

CORT, resulta em atrofia dendrítica transitória e dano sináptico (Oliveira *et al.*, 2006). Ao contrário da DEXA, o cortisol liga-se preferencialmente aos MRs do hipocampo e, somente em altas concentrações, por exemplo, nas situações de estresse, aos GRs (Holsboer, 1999).

Considerando a função cognitiva, estudos em animais demonstraram que o MR está envolvido na interpretação de informações novas, na recuperação da memória e no aprendizado visuoespacial. Além disso, a função do MR está alterada na depressão maior (DM), na qual foi associada aos déficits cognitivos (Otte *et al.*, 2007).

As funções desempenhadas pelo receptor tipo-I incluem a prevenção dos distúrbios da homeostase celular, o controle da sensibilidade do sistema em resposta ao estresse e a seleção da resposta comportamental. Os receptores tipo-II são responsáveis pelo controle do metabolismo energético, pelo armazenamento de informação, pela homeostase celular, pela inibição da resposta induzida pelo estresse e promovem a adaptação comportamental (De Kloet, 2003).

Os MRs e os GRs operam em duas modalidades de estresse. A primeira envolve ações rápidas, tal como nas respostas neuroendócrinas e simpáticas das reações de luta ou fuga, e é mediada pelos receptores CRH-1. Este sistema pode ter a participação dos neurônios CRHérgicos localizados na MCPA, no PVN, na amígdala, nos neurônios do LC e em outras células aminérgicas do tronco encefálico. Na periferia o córtex adrenal produz, entre outros hormônios, o cortisol, enquanto a medula secreta as catecolaminas, particularmente, a adrenalina, que também estão envolvidas com as respostas imediatas ao estressor. A segunda modalidade representa um sistema mais

lento, responsável pela recuperação e adaptação ao estresse, que parece ser ativado pela urocortina via receptores CRH-2 (De Kloet, 2003). Os peptídeos urocortina-II e III apresentam localizações diferentes do CRH e foram identificados como ligantes seletivos para o receptor CRH-2. A urocortina-I é sintetizada numa região discreta do mesencéfalo, o núcleo de Edinger-Westphal, e se liga a ambos receptores de CRH. A urocortina-II é encontrada no PVN e LC e a urocortina-III na área hipotalâmica rostral do PVN e nos núcleos do hipotálamo e medial da amígdala. Seus campos terminais localizam-se no hipotálamo e no tronco encefálico e são similares àqueles do receptor CRH-2 (Arborelius *et al.*, 2000; De Kloet, 2003).

Funções dos Corticosteróides

As glândulas adrenais possuem duas camadas de origem e funções diferentes; a porção interna (medula) provém do endoderma e produz principalmente adrenalina, mas também noradrenalina. A região externa (córtex) origina-se do mesoderma e sintetiza cortisol e andrógenos nas zonas fasciculada e reticular, respectivamente, e aldosterona na zona glomerulosa (Griffin e Ojeda, 1996; Molina, 2006).

A classe de hormônios denominados corticosteróides é formada pelos glicocorticóides e mineralocorticóides. O cortisol, também conhecido como hidrocortisona, é o principal glicocorticóide humano, enquanto a CORT é encontrada principalmente nos roedores (Griffin e Ojeda, 1996; Yu *et al.*, 2004; Molina, 2006). A estrutura básica desses esteróides é caracterizada pelo

núcleo ciclopentanoperidrofenantreno. As alterações na molécula do cortisol deram origem aos compostos glicocorticóides sintéticos, com propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas diferentes, mais potentes como antiinflamatórios, e com menor capacidade de retenção de sódio. A DEXA é um desses análogos, com ação glicocorticóide 30 vezes maior do que a CORT, porém com atividade mineralocorticóide quase nula. A aldosterona, por outro lado, é o mais importante mineralocorticóide, mas tem ação glicocorticóide mínima (Griffin e Ojeda, 1996; Molina, 2006).

Os glicocorticóides regulam processos homeostáticos e neurais relevantes para o metabolismo energético, crescimento, mecanismos inflamatórios, imunidade, humor e cognição. Devido aos seus efeitos centrais e periféricos, os níveis de corticosteróides no plasma estão sobre o rígido controle do eixo HHA (Gesing *et al.*, 2001; Mueller *et al.*, 2004). Esses hormônios também desempenham uma função importante na mediação da resposta de estresse e na sobrevivência de populações neuronais específicas, regulando a neurogênese e remodelando terminações dendríticas no hipocampo e em outras estruturas límbicas (Lindholm *et al.*, 1994; Metz *et al.*, 2005).

Devido à sua estrutura lipofílica, os glicocorticóides naturais podem atravessar facilmente a barreira hemato-encefálica e entrar no cérebro, onde influenciam inúmeras atividades, incluindo a cognição e a emoção, inclusive a ansiedade (Joëls *et al.*, 1991; Herrero *et al.*, 2006). Contudo, alguns corticosteróides sintéticos como a DEXA não atravessam a barreira devido à presença da glicoproteína-P 1a multidroga-resistente (GMDR) (*multidrug-resistant glycoprotein-P 1a*) que é expressa nas membranas apicais das células

endoteliais da barreira hemato-encefálica. Em baixas doses, a GMDR age como uma bomba, limitando a passagem de agentes xenobióticos, incluindo a DEXA, para o cérebro (Holsboer, 1999).

Os efeitos terapêuticos dos glicocorticóides naturais e de seus análogos sintéticos são determinados pela concentração da droga no tecido efetor, potência, meia-vida de eliminação e meia-vida das respostas biológicas (Tabela 1). Por exemplo, a afinidade do glicocorticóide sintético DEXA ao GR é sete vezes maior que aquela do cortisol ou CORT. Contudo, a DEXA é 150 vezes mais potente na supressão da função adrenal.

Tabela 1. Comparação das propriedades do cortisol e dexametasona (Wilson et al., 1998).

	CORTISOL	DEXA
Dose equipotente (mg)	20	0,75
Potência relativa glicocorticóide	1	20-50
Potência relativa mineralocorticóide	1	0
Meia-vida de eliminação (h)	1,5-2	3,5
Duração do efeito (h)	8-12	18-36

Os mineralocorticóides atuam ao nível dos túbulos distais do rim, aumentando a reabsorção de sódio para o plasma e a excreção urinária dos íons hidrogênio e potássio. Como consequência, ocorre a retenção de água, o aumento do volume sangüíneo e do débito cardíaco, o qual pode aumentar em até 10 a 20%. Adicionalmente, observa-se a elevação da resistência vascular sistêmica e pressão arterial (Griffin e Ojeda, 1996; Molina, 2006).

A deficiência de mineralocorticóides é normalmente consequência da destruição dos córtices adrenais, tal como na doença de Addison, na qual se observa sintomas da carência de mineralocorticóides (hipercalcemia, acidose, hipovolemia) e glicocorticóides (anorexia, fraqueza e perda de peso). A deficiência de mineralocorticóides pode resultar em hipotensão postural,

edemas, redução do débito urinário e redução do volume extracelular (Griffin e Ojeda, 1996; Molina, 2006).

O cortisol afeta várias funções celulares e fisiológicas envolvidas na homeostase; suprime a inflamação e certas reações imunes, inibe a secreção de vários hormônios e neuropeptídeos e induz a apoptose dos linfócitos. Por exemplo, o cortisol aumentado (hipercortisolismo) é freqüentemente encontrado em pacientes com DM, e a redução do cortisol (hipocortisolismo) foi observada no transtorno de estresse pós-traumático (TEPT) em ex-combatentes da Guerra do Golfo, na fadiga pós-infecção e na síndrome da fadiga crônica (Musselman e Nemeroff, 1996; Gupta *et al.*, 2007). Embora não se saiba se a desregulação do eixo seja um efeito primário ou secundário destes transtornos, existem evidências de que os transtornos relacionados ao estresse sejam influenciados por experiências adversas da vida precoce que afetam a arquitetura neural e a expressão gênica no cérebro. Eventos na infância como infecção severa, desnutrição, abuso físico, sexual ou emocional têm sido associados ao desenvolvimento de inúmeras enfermidades crônicas tardias (Gupta *et al.*, 2007).

O hormônio CORT também regula a transcrição dos genes responsivos no hipocampo dos roedores através dos GR e MR nucleares. Através de mecanismos genômicos já mencionados, o hormônio promove uma alteração lenta nas propriedades de células hipocampais, incluindo mudanças na sinalização hipocampal (Karst *et al.*, 2005).

Na clínica, a DEXA também é utilizada num teste combinado ao CRH (teste dexametasona/CRH), com o objetivo de diagnosticar disfunções do eixo HHA na síndrome de Cushing (hipersecreção de glicocorticóides) e nas

desordens afetivas (Holsboer, 1999; Keck *et al.*, 2002; Karssen *et al.*, 2005). Este teste baseia-se numa das diferenças mais importantes entre a CORT e DEXA, qual seja, no fato da última não atravessar a barreira hemato-encefálica, suprimindo o eixo apenas periféricamente (Holsboer, 1999).

Corticosteróides e estresse

A teoria de estresse de Hans Selye teve um grande impacto na medicina e, em particular, na psiquiatria (Selye, 1936; 1976). De fato, estudos clínicos e experimentais conduzidos nas últimas décadas implicam a resposta de estresse no desenvolvimento do transtorno do pânico (TP), DM e TEPT (Strohle e Holsboer, 2003). Embora a maior parte das questões apontadas por Selye permaneça sem resposta até os dias atuais (Selye, 1976), a marca de Selye foi o conceito da não-especificidade da ativação do eixo HHA que ocorre após a exposição de um organismo a uma variedade extraordinária de estressores, tanto físicos como psicológicos (Selye, 1976; Pacak *et al.*, 1998). A ativação do eixo HHA tornou-se, portanto, emblemática de estresse, e os hormônios do eixo, CRH, ACTH e cortisol, passaram a ser referidos como os “hormônios do estresse” (DeVries *et al.*, 2003). Contudo, estudos adicionais mostraram que outros eixos além do HHA, respondem ao estresse. Por exemplo, a prolactina é liberada consistentemente a uma variedade de estressores (Siegel *et al.*, 1980).

O conceito de inespecificidade proposto por Selye parece ser responsável pelo uso indiscriminado que se faz do termo “estresse” na

atualidade. A hipótese de inespecificidade supõe que variações na intensidade de diferentes estressores ativem os mesmos sistemas (adrenocorticais, simpatomedulares, imunes, etc) de forma proporcional à intensidade do estressor. Pacak e colaboradores (1998) testaram esta hipótese avaliando as respostas adrenocorticais e simpatomedulares em função da variação da magnitude de diversos estressores. Entretanto, este estudo mostrou que estressores diferentes (hemorragia, insulina, injeção subcutânea de formaldeído, frio ou imobilização) produzem padrões distintos de respostas. Adicionalmente, a variação da intensidade do estressor resultou em respostas adrenocorticais e simpatomedulares de magnitudes diferentes. Assim, o frio eliciu respostas maiores de noradrenalina, a insulina respostas maiores de epinefrina, e a hemorragia respostas reduzidas para ambas as catecolaminas. Por sua vez, a imobilização eliciu respostas acentuadas dos três hormônios. As taxas de variação das respostas também foram bastante distintas para os vários estressores. Estes e outros resultados sugerem que cada estressor tenha sua própria “assinatura” neuroendócrina (Pacak *et al.*, 1998).

A exposição prolongada do organismo aos estressores desenvolveria uma “síndrome geral de adaptação” caracterizada por hipertrofia das adrenais, ulceração gastrointestinal e involução timolinfática (Selye, 1976). A síndrome consistiria em 3 estágios das respostas do eixo HHA. O primeiro estágio, a ‘reação de alarme’ seria representada pela descarga maciça de hormônios adrenais. O estágio seguinte seria a ‘resistência’, onde a secreção de corticosteróides continuaria alta, porém estável, e o organismo se adaptaria ao estresse, com a conseqüente melhora ou desaparecimento dos sintomas. Caso o estímulo persista por um longo período, a síndrome evoluiria para o

'estágio de exaustão', na qual a hipófise e as adrenais esgotariam seus hormônios e o organismo perderia a capacidade de adaptação. Nesta condição de estresse severo, as defesas do organismo ficam comprometidas, havendo o colapso de órgãos e funções, como o do sistema imunológico e gastrointestinal (Gray, 1991).

Níveis de cortisol cronicamente elevados podem interferir na estrutura e função do hipocampo e, possivelmente, em outras áreas do cérebro, amplificando a sua vulnerabilidade a danos neurais e produzindo alterações de memória, aprendizado e cognição. Ao lado dos efeitos diretos causados pelos hormônios do estresse sobre a função do sistema nervoso, mudanças emocionais associadas ao estresse, como a ansiedade, também podem afetar a atividade motora e o desempenho, variando de acordo com a duração e tipo de estressor (Margis *et al.*, 2003; Metz *et al.*, 2005). Adicionalmente, o debilitamento do sistema imune pode facilitar o desenvolvimento de inúmeras doenças sistêmicas. Existem evidências, por exemplo, de que a ativação persistente do eixo na DM contribua para o desenvolvimento e progressão de alguns tipos de câncer (Reiche *et al.*, 2004).

Muitos autores se mantêm fiéis às concepções de Selye. Por exemplo, para Tsigos e Chrousos (2002) o sistema de estresse coordenaria respostas adaptativas do organismo aos estressores de qualquer espécie e compreenderia o sistema CRHérgico central, o sistema noradrenérgico do LC, o eixo hipófise-adrenal, o sistema simpático e até mesmo os seus efetores periféricos. Apesar da inclusão injustificada de efetores periféricos como parte do 'sistema de estresse', a ativação deste sistema conduziria a alterações comportamentais e periféricas que facilitariam os controles homeostáticos,

aumentando as possibilidades de sobrevivência. Os sistemas de CRH e do LC estimulariam a vigília e atenção. Por sua vez, o sistema β -endorfinérgico do hipotálamo estaria envolvido na analgesia e o sistema dopaminérgico mesocorticolímbico nos mecanismos de recompensa e antecipação (Tsigos e Chrousos, 2002). A referência a tipos de estresse envolvidos com recompensa é mais recente na investigação científica. Embora Selye (1936, 1956) em seus estudos iniciais tenha vinculado o estresse a emoções aversivas e nocivas à saúde, ele propôs nos últimos estudos dois tipos de estresse, quais sejam, o estresse 'agradável' (*eustress*) e o 'desagradável' (*distress*), o qual estaria relacionado à concepção do estressor 'nocivo' à saúde. Selye chegou a afirmar que 'o estresse é o sal da vida; poucas pessoas gostariam de viver uma vida sem correria, sem acertos, sem erros' (*stress is the salt of life; few people would like to live an existence of no runs, no hits, no errors*) (Selye, 1976). Portanto, em seus últimos estudos, Selye introduziu definições ambíguas que contradizem os conceitos iniciais que foram tão caros à medicina.

Mais recentemente, foram propostas novas abordagens do estresse. Por exemplo, Herman e Cullinan (1997) propõem que a integração da resposta neuroendócrina do estresse ocorre por meio de interações entre a circuitaria cerebral sensível aos estressores e os neurônios do PVN. Contudo, propuseram que enquanto os 'estressores fisiológicos' (*systemic stressors*) envolvidos nos distúrbios da homeostase ativam o PVN de forma quase imediata, provavelmente, através das projeções catecolaminérgicas do tronco encefálico a este núcleo, os 'estressores psicológicos' (*processive stressors*) necessitam ser interpretados por estruturas superiores dos circuitos límbicos prosencefálicos, principalmente, amígdala e núcleo do leito da estria terminal,

que têm conexões íntimas com o PVN. Os dados funcionais e neuroanatômicos sugerem que as doenças envolvidas com o controle inadequado do estresse envolvem a disfunção das vias do estresse psicológico (Herman e Cullinan, 1997).

Nos pacientes com hiperatividade do eixo HHA, tal como ocorre na maioria dos pacientes com DM, a redução na expressão ou na sensibilidade dos GRs tem sido postulada como a causa de uma retroalimentação deficiente que subjacente à hiperatividade e redução da responsividade do eixo aos novos estressores (Ridder *et al.*, 2005). A sensibilidade reduzida aos efeitos inibitórios dos glicocorticóides na ausência de uma redução da expressão do GR, pode ser um componente essencial dos transtornos relacionados ao estresse. Glicocorticóides elevados, juntamente com aumento do glutamato e liberação do óxido nítrico, têm sido considerados elementos centrais da apoptose e de danos estruturais da glia e neurônios hipocampais e corticais encontrados nos transtornos depressivos (Pekary, 2006). A desregulação dos GRs dos macrófagos resulta no aumento da liberação de leucotrienos e citocinas que também têm sido aventados como a causa de um tipo de depressão denominada “comportamento de enfermo”, uma condição característica dos pacientes com câncer ou infecções virais crônicas, como hepatites B ou C, tratados com citocinas (Leonard, 2001; Pekary, 2006).

As ações dos glicocorticóides na resposta ao estresse são de dois tipos: permissivas ou protetivas. Na atividade permissiva, os esteróides controlam a atividade basal do eixo HHA, ajustam o seu limiar de resposta ao estresse e normalizam sua resposta ao estressor. No modo supressivo (ou protetor), a ação dos glicocorticóides capacita o organismo para lidar, adaptar-

se ou recuperar-se do estresse. As potentes ações antiinflamatórias e imunossupressivas, o redirecionamento do metabolismo para atender as demandas energéticas, a inibição do crescimento e das funções reprodutoras fazem parte das condições protetoras. As ações permissivas ocorrem em concentrações fisiológicas reduzidas de esteróides e são majoritariamente mediadas pelos MRs. Em contraste, suas ações supressivas manifestam-se nas concentrações elevadas do estresse, sendo mediadas pelos GRs (Buckingham, 2000).

Corticosteróides e ansiedade

Os fundamentos da nosologia dos transtornos de ansiedade foram desenvolvidos por Sigmund Freud, em colaboração com Joseph Breuer, nos '*Estudos Seleccionados sobre a Histeria*' (1895). Freud denominou os transtornos de ansiedade 'neuroses de angústia' (*Angstneuroses*) e separou-as das neurastenias que incluíam uma ampla variedade de distúrbios, inclusive, transtornos do humor como a DM (melancolia). Em sua descrição sobre as neuroses de angústia, Freud notou que irritabilidade, aumento da preocupação com a saúde (hipocondria) e ansiedade generalizada, que ele denominava 'expectativa ansiosa' (*anxious expectation*), eram os sintomas mais evidentes destes pacientes. Freud descreveu a expectativa ansiosa como um 'quantum de ansiedade livre e flutuante (*quantum of freely floating anxiety*) que controla a escolha das idéias por antecipação'. Pessoas atormentadas por este tipo de ansiedade antecipam o pior de qualquer evento, interpretando cada acontecimento como um mau presságio. Na concepção de Freud (1895; 1920),

a expectativa ansiosa era o sintoma mais essencial dentre os transtornos de ansiedade. Esta síndrome corresponde ao transtorno de ansiedade generalizada da psiquiatria contemporânea (APA, 1994).

A ansiedade é um transtorno psiquiátrico que também existe como estado emocional em condições normais ou fisiológicas de ameaça (File, 1992). A ansiedade tem valor adaptativo e pode ser considerada como uma evolução da reação de “fuga ou luta”. Para lidar com estas alterações os animais usam uma de quatro estratégias defensivas básicas que são: imobilidade, fuga, ataque defensivo e submissão (Blanchard e Blanchard, 1988). A ‘escolha’ de uma estratégia particular tem relação com vários fatores, tais como as características do ambiente/predador, distância do estímulo ameaçador e experiência prévia com o estímulo e/ou ambiente (Graeff e Zangrossi, 2002). De forma similar ao medo, a ansiedade protege o indivíduo de danos físicos ou psicológicos futuros. No entanto, a ansiedade patológica é desproporcional à ameaça e pode originar comportamentos inadequados como a esquivas fóbica ou paralisia (inibição, congelamento), fazendo com que o indivíduo perca toda e qualquer iniciativa para lidar com a situação (Salomé *et al.*, 2006).

Existem várias teorias sobre as bases neurais da ansiedade. Segundo Gray (1981) a ansiedade é decorrente da ativação do ‘sistema de inibição comportamental’. Este seria formado, basicamente, pelo sistema septo-hipocampal e seus aferentes serotoninérgicos e noradrenérgicos, mas também pelas vias e estruturas associadas, assim como, pelo circuito de Papez (subiculum → corpos mamilares → tálamo anterior → córtex cingulado → subiculum), a área entorrinal (que fornece aferências neocorticais para o

hipocampo) e o córtex pré-frontal (que se projeta para área entorrinal e giro cingulado).

O sistema de inibição comportamental seria ativado pelos seguintes estímulos: punição (apresentação de um estímulo aversivo), frustração (remoção do reforço), novidade (situações desconhecidas) e estímulos inatos aversivos (odor de predador, locais elevados, etc). A ativação deste sistema geraria respostas de inibição comportamental, aumento na vigilância e aumento da atenção (Gray 1981; Gray e McNaughton, 2000). As drogas ansiolíticas inibiriam o sistema de inibição comportamental. Este modelo está ilustrado na Figura 2.

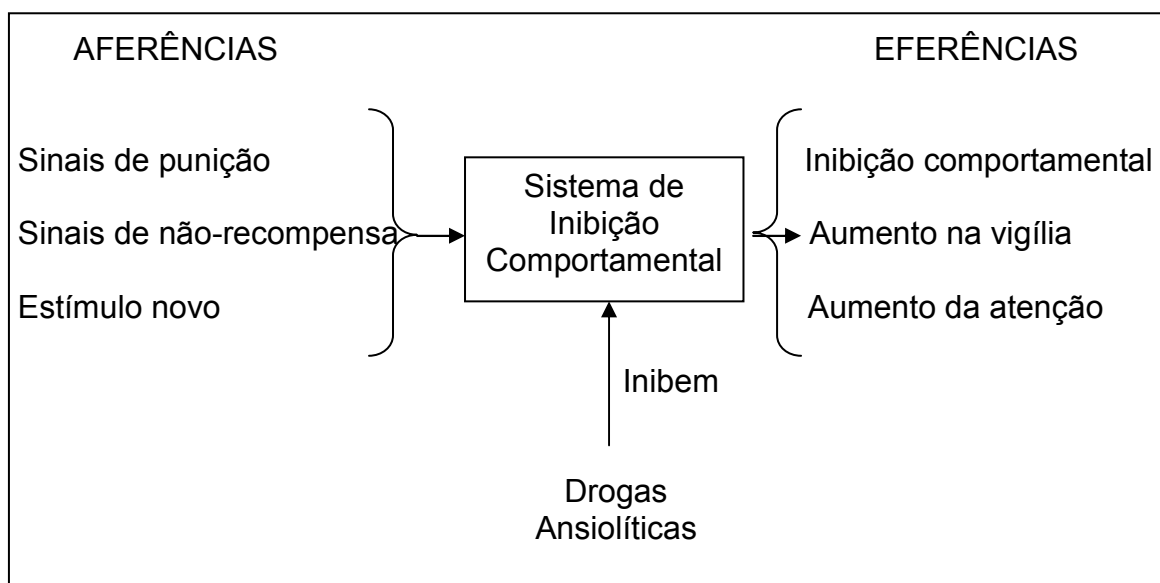


Figura 2: Sistema de Inibição Comportamental (Gray, 1981).

De acordo com Gray (1981), o sistema septo-hipocampal compara a situação presente à esperada, funcionando em dois modos, quais sejam, 'verificação' (*checking mode*) ou 'controle' (*control mode*). Se o estímulo atual corresponder às expectativas, o sistema septo-hipocampal funcionará no 'modo verificação' dando prosseguimento aos comportamentos em curso

(alimentar, exploratório, etc) comandados por diversas estruturas cerebrais. Se, ao contrário, o estímulo atual for diferente do esperado, ou se for um estímulo aversivo, o sistema septo-hipocampal passará a funcionar no 'modo controle', assumindo o comando do comportamento, inibindo os comportamentos em curso e aumentando a atenção aos estímulos ambientais. A última resposta - o aumento do estado de alerta - seria devida às fibras monoaminérgicas ascendentes do LC e núcleos da rafe que se projetam para o sistema septo-hipocampal e outras estruturas. O programa motor em execução durante a detecção do 'erro' ficaria registrado, sendo executado com maior restrição em ocasiões futuras nas quais o sistema septo-hipocampal exerceria sua função de verificação e comparação de maneira mais rigorosa (Gray 1981; Gray e McNaughton, 2000). Tal como as drogas ansiolíticas, as lesões hipocampais atenuam os comportamentos relacionados à ansiedade. Adicionalmente, o hipocampo apresenta uma atividade elétrica característica em situações aversivas, de 7 a 14 Hz (ritmo teta hipocampal), que é atenuada ou abolida pelos ansiolíticos (Gray 1981; Gray e McNaughton, 2000). De fato, estudos recentes com lesões hipocampais apresentaram evidências convincentes do processamento da ansiedade pelo hipocampo ventral, mas não dorsal, de ratos, aumentando a exploração dos braços abertos do labirinto-em-cruz elevado (LCE) e bloqueando o aumento da CORT à alta luminosidade (Kjelstrup *et al.*, 2002). É importante notar que os ratos com lesões do hipocampo ventral não apresentaram déficits de aprendizagem no labirinto aquático de Morris, indicando que os resultados não foram devidos a disfunções de aprendizado ou orientação espacial. Por fim, como o hipocampo é o principal alvo de corticosteróides no cérebro, Herrero e colaboradores

(2006) investigaram se a expressão hipocampal de MR e GR difere em ratos de alta e baixa ansiedade e se estes receptores estão relacionados à exploração diferencial dos braços do LCE. Estes autores observaram que os ratos com baixa ansiedade têm uma expressão maior de MR do hipocampo e que a densidade destes receptores apresentou uma correlação direta com o tempo gasto nos braços abertos no LCE. Ao contrário, os ratos de alta ansiedade apresentaram uma expressão maior de GR e menor de MR que os ratos de baixa ansiedade (Herrero *et al.*, 2006). Os estudos de Kjelstrup e colaboradores (2002) sugerem que a inibição pelo hipocampo da resposta de estresse do eixo HHA (Sapolsky *et al.*, 1984) seja devida ao hipocampo dorsal, mas não ventral. No mesmo sentido, outros estudos sugerem que o hipocampo tenha uma função estimulatória do eixo durante o estresse a um ambiente novo, à restrição, ou ao contexto/condicionamento aversivo (Herman *et al.*, 2005).

Por sua vez, LeDoux (2000) propõe que a amígdala seria a estrutura responsável pelo processamento dos estímulos aversivos condicionados, inclusive, medo e/ou ansiedade, uma vez que sua lesão abole as respostas de congelamento e hipertensão a um som previamente pareado a um choque. LeDoux (2000) também mostrou que enquanto a resposta pressora podia ser seletivamente abolida por lesão do hipotálamo, o congelamento o era pela lesão da MCPA. Não obstante, o mesmo autor também mostrou que as lesões da amígdala que abolem a resposta de congelamento a um som previamente pareado a um choque não têm efeitos sobre a supressão induzida por choque do comportamento alimentar (Amorapanth *et al.*, 1999). Kjelstrup e colaboradores (2002) corroboraram estes dados, mostrando que ratos com

lesões da amígdala evitam os braços abertos do LCE de forma tão acentuada quanto os controles. Os últimos estudos fornecem evidências do processamento distribuído da ansiedade por vários sistemas cerebrais, dentre os quais se destaca o hipocampo ventral na inibição comportamental do conflito, e a amígdala no medo associado ao condicionamento Pavloviano. Por fim, existem evidências que as informações aversivas sobre contexto e localização sejam codificadas no hipocampo. Em particular, a aversão condicionada ao contexto é abolida por lesão do hipocampo, mas não da amígdala (Deakin e Graeff, 1991).

Por outro lado, acredita-se que a amígdala exerça uma influência excitatória sobre o eixo HHA mediante projeções diretas ou indiretas, via núcleo do leito da estria terminal, ao PVN (Herman *et al.*, 2005). De fato, a estimulação da amígdala aumenta a atividade do eixo HHA (Dunn e Whitener, 1986) e lesões extensas ou restritas dos núcleos central ou medial da amígdala, reduzem a secreção pós-estresse de ACTH e/ou CORT (Feldman *et al.*, 1994, Dayas e Day, 2002). Os efeitos estimulatórios do eixo HHA são consistentes com as outras funções da amígdala, incluindo a ativação das respostas autonômicas e o seu envolvimento no medo e ansiedade (LeDoux, 2000, Herman *et al.*, 2005). A influência da amígdala sobre o eixo HHA parece depender de núcleos específicos e do tipo de estressor. Assim, a amígdala medial apresenta uma intensa imunorreatividade à proteína *c-fos* após os estresses de restrição, natação, exposição ao predador e interação social, mas uma imunorreatividade consideravelmente menor após a injeção de β -interleucina 1, hipóxia ou hemorragia (Figueiredo *et al.*, 2003). Em contraste, o núcleo central da amígdala respondeu, preferencialmente, aos estímulos

inflamatório e hemodinâmico, tanto que as lesões desta estrutura atenuaram a ativação do eixo HHA pela β -interleucina 1, mas não pela restrição (Dayas *et al.*, 1999). De fato, Prewitt e Herman (1997) já haviam mostrado que as lesões deste núcleo não afetavam as respostas ao estresse agudo de restrição, quais sejam, aumento da secreção de CORT e ACTH, aumento da expressão de RNAm de CRH e do número de neurônios do PVN que expressam a AVP, e indução da proteína c-FOS na região parvocelular do PVN. Estas lesões também não tiveram efeito algum sobre as respostas do estresse crônico por aplicação de choques imprevisíveis, tais como involução do timo, hipertrofia das adrenais e aumento da expressão de CRH e dos respectivos neurônios no PVN.

A amígdala também parece estar relacionada ao TEPT, um dos principais transtornos de ansiedade (Adamec *et al.*, 1999). Adamec e colaboradores (2007) estudaram o papel dos GR e MR, bem como dos receptores β -noradrenérgicos, na consolidação dos efeitos ansiogênicos tardios do estresse ao predador, um modelo de TEPT. Estes autores mostraram que o propranolol bloqueia os efeitos tardios ansiogênicos do estresse ao predador em vários modelos de ansiedade (LCE, prancha com furos, caixa claro-escuro e teste de interação social). O bloqueio do receptor GR com mifepristona foi ineficaz. Entretanto, a combinação da mifepristona com uma dose ineficaz de propranolol aboliu os efeitos tardios ansiogênicos do estresse em todos os testes, sugerindo o sinergismo dos receptores β -adrenérgicos e GR. Surpreendentemente, o bloqueio dos MR com espironolactona preveniu a consolidação dos efeitos ansiogênicos em todos os testes, exceto na caixa claro/escuro. Em contraste, o pós-tratamento com clordiazepóxido não teve

efeitos significantes sobre as conseqüências do estresse ao predador, tal como ocorre nos pacientes portadores de TEPT (Adamec *et al.*, 2007). Estes resultados sugerem a influência dos glicocorticóides e mineralocorticóides na consolidação dos efeitos tardios do estresse, presumivelmente, envolvendo os núcleos da amígdala.

Diversos neurotransmissores têm sido implicados nos mecanismos da ansiedade. Em particular, existem evidências da participação do LC, o principal núcleo noradrenérgico do SNC, nos comportamentos e respostas associadas ao medo e ansiedade (Charney *et al.*, 1990; Gray e McNaughton, 2000). As projeções noradrenérgicas do LC estão presentes em todo o córtex cerebral, incluindo o hipocampo e múltiplas estruturas subcorticais, abrangendo a amígdala, tálamo e o PVN, podendo modular estados emocionais e atividade do eixo HHA. Sabe-se, por exemplo, que a ativação elétrica ou farmacológica (iombina) do LC causa ansiedade e que a lesão bilateral desta estrutura diminui a ocorrência natural das respostas de medo em macacos (Charney *et al.*, 1990). Contudo, a estimulação do LC de humanos implantados com eletrodos permanentes não causou sinal algum de ansiedade, durante ou após o estímulo (Libet e Gleason, 1994). Estes resultados devem ser analisados com cautela uma vez que se referem à estimulação isolada do LC. De fato, embora o LC não pareça ser responsável pela produção de ansiedade, isoladamente, ele pode ser importante, ou mesmo fundamental, no processamento da ansiedade em outras estruturas, cumprindo uma função 'permissiva' na expressão desta emoção. De fato, os estímulos estressantes ou o medo produzem um aumento rápido e vigoroso da atividade do LC (Charney *et al.*, 1990). Adicionalmente, embora a administração

periférica de maprotilina (10 mg/kg), um inibidor seletivo da recaptção de noradrenalina, não tenha tido efeitos sobre os comportamentos de defesa induzidos pela estimulação da MCPA, estes foram fortemente atenuados pela administração intracerebroventricular (i.c.v.) da mesma dose do antidepressivo (Lugon, 2006). Por outro lado, a ansiedade patológica produz respostas autonômicas, em particular, palpitações e hiperventilação, que poderiam resultar numa ativação anormal do LC, precipitando os ataques de pânico, cujos mecanismos discutiremos adiante (Charney *et al.*, 1990; Sullivan *et al.*, 1999).

A ansiedade também poderia ser um produto de disfunções inerentes do eixo HHA. Embora a desregulação do eixo nos transtornos do humor seja amplamente reconhecida, a influência do eixo nos transtornos de ansiedade permanece obscura. Não obstante, existem evidências de que tanto o CRH quanto a AVP, um poderoso liberador de ACTH, contribuam para o controle dos comportamentos relacionados à ansiedade. Neste sentido, é importante ressaltar que a CORT regula seletivamente o RNAm do CRH do núcleo central da amígdala de ratos (Boyle *et al.*, 2006). Adicionalmente, Corodimas e colaboradores (1994) verificaram que as altas doses de CORT potencializam a resposta de congelamento a um estímulo auditivo que foi previamente pareado a um choque. Estas observações são consistentes com a hipótese de que as altas concentrações de CORT prevalentes nas situações de estresse potencializem a ansiedade (Adamec *et al.*, 2007).

Corticosteróides e depressão

A hiperfunção do eixo HHA tem sido aventada como uma das causas fundamentais da DM. A hipótese da hiperfunção do eixo HHA baseia-se na observação de que os pacientes portadores de DM apresentam um número maior de pulsos secretórios de ACTH, níveis mais elevados de CRH no líquido e de cortisol no plasma e na urina. Adicionalmente, eles apresentam uma densidade elevada de neurônios secretores de CRH no sistema límbico e uma redução dos sítios de ligação deste hormônio no córtex frontal, presumivelmente, devido a mecanismos de subregulação. Estas evidências foram corroboradas avaliando-se a função do eixo HHA previamente suprimido por DEXA durante a recuperação espontânea ou na resposta ao CRH (Holsboer, 1984, 2000; Musselman e Nemeroff, 1996; Erhardt *et al.*, 2006).

A hipersecreção de glicocorticóides na DM é acompanhada pela atenuação da retroalimentação negativa do eixo HHA, sugerindo a subregulação dos GRs centrais. Entretanto, a sensibilidade destes receptores retorna à normalidade após o tratamento da DM (Leonard *et al.*, 2001). A hipersecreção de glicocorticóides também está associada a respostas pró-imunes expressas tanto pela secreção excessiva de citocinas pró-inflamatórias, prostaglandinas e óxido nítrico, quanto pelo aumento da atividade das proteínas hepáticas da fase aguda, sugerindo uma hipofunção dos GRs dos macrófagos. Como consequência, há uma redução do efeito imunossupressor dos glicocorticóides.

Erhardt e colaboradores (2006) mostraram que os pacientes de DM que apresentam resistência à DEXA têm uma resposta maior de cortisol ao CRH, constituindo um subgrupo com desregulação profunda do eixo HHA, a qual tem sido descrita como o processo fisiopatológico primário da DM (Holsboer, 2000). Como a DM é considerada uma condição de estresse crônico, Erhardt e colaboradores (2006) sugeriram que o fenômeno de não-supressão à administração de DEXA também é devido à subregulação dos GRs do PVN e outras estruturas, tais como a hipófise anterior, atenuando os mecanismos retroalimentação negativa.

Estes achados também sugerem que o CRH tenha uma função modulatória importante na ansiedade pois, além desta ser um dos sintomas centrais dos pacientes com depressão, existe uma alta comorbidade entre transtornos de ansiedade e depressão. Em adição, os transtornos de ansiedade geralmente precedem o desenvolvimento da depressão, sugerindo a existência de características fisiopatológicas comuns. De fato, ambas as condições são vistas como alterações relacionadas ao estresse, sugerindo a desregulação do eixo HHA (De Kloet *et al.*, 2005). Por fim, a ansiedade e o estresse crônicos, bem como os eventos traumatizantes da infância, tais como a ansiedade de separação (privação materna), também foram aventados como causas da depressão e da ansiedade patológica (Herman *et al.*, 1995, Durand *et al.*, 1998, Plotsky *et al.*, 1998, Bertram e Hanson, 2002, Matthews, 2002, Maccari *et al.*, 2003, Neumann, 2003, Genest *et al.*, 2004, Slotten *et al.*, 2006).

A depressão apresenta alta comorbidade com o TP (Figura 3) (Ballenger, 1998; Johnson e Lydiard, 1998; Erhardt *et al.*, 2006). Adicionalmente, Schreiber e colaboradores (1996) mostraram que tanto os

pacientes com DM quanto aqueles com TP apresentam hiperfunção basal do eixo HHA no teste DEXA/CRH. Contudo, embora as respostas do cortisol dos pacientes com TP tenham sido maiores que as dos controles sadios, elas foram menores que as apresentadas pelos pacientes com DM. Recentemente, Erhardt e colaboradores (2006) corroboraram a hiperresponsividade do eixo HHA nos pacientes com DM e TP. Contudo, estes autores não observaram

		Diagnóstico aos 30 anos de idade (%)	
Pacientes com DM aos 20 anos de idade	→	TP	7
		TP+DM	15
		DM	39
		Sem Diagnóstico	40

Figura 3. Comorbidade da depressão maior (DM) com o transtorno de pânico (TP) de 75 pacientes portadores de DM que foram acompanhados por 10 anos a partir dos 20 anos de idade (Montgomery, 1993).

diferenças significantes entre os dois grupos de pacientes. Como os pacientes com DM e TP apresentaram diferenças acentuadas na severidade dos sintomas depressivos, mas a mesma hiperresponsividade do eixo HHA, os sintomas mais severos dos depressivos não podem ser explicados pela disfunção do eixo, isoladamente, devendo ser atribuídos ao papel diferenciado do estresse nos dois tipos de transtorno (Holsboer, 2000; De Kloet *et al.*, 2005). Portanto, as causas subjacentes à hiperresponsividade no teste DEXA/CRH nos pacientes com pânico e DM podem ser diferentes para os pacientes de DM e TP.

Por fim, Deakin e Graeff (1991) propuseram que os níveis plasmáticos elevados de cortisol sob condições de estresse crônico

subregulariam os receptores 5-HT_{1A} do hipocampo, desorganizando um 'sistema de resiliência comportamental' (*behavior resilience system*) que teria por função dissociar os eventos aversivos das tarefas do dia-a-dia. Este sistema seria basicamente composto pelas projeções do núcleo mediano da rafe ao hipocampo. Esta hipótese baseia-se na observação de que a densidade dos receptores 5-HT_{1A} do hipocampo é aumentada pela adrenalectomia e sua taxa de renovação reduzida pela CORT (Beigon *et al.*, 1985, De Kloet *et al.*, 1986). Este mecanismo poderia ter um papel proeminente no desenvolvimento da depressão associada ao estresse psicossocial crônico (Deakin e Graeff, 1991).

Corticosteróides e Ataques de Pânico

Além da 'expectativa ansiosa', Breuer e Freud (1895) descreveram outro transtorno de ansiedade, menos freqüente, porém, igualmente importante. Neste transtorno, que ele denominou 'ataques de angústia', a ansiedade irrompia repentinamente na consciência sem ter sido provocada por nenhuma idéia. Segundo Freud estes ataques poderiam se manifestar como ansiedade 'pura', sem qualquer pensamento associado, ou como uma sensação de perda da razão ou morte iminente. Notou ainda que os pacientes comumente enfatizavam distúrbios físicos e psicológicos, principalmente respiratórios e cardíacos. Os outros sintomas incluíam suor, tremor, vertigem, diarreia, insônia e pavor. Freud também sugeriu que as fobias simples eram associadas à expectativa ansiosa e a agorafobia aos ataques de

angústia. Os ataques de angústia correspondem aos ataques de pânico da psiquiatria contemporânea.

A despeito da distinção freudiana entre neurose crônica (expectativa ansiosa) e aguda (ataques de angústia), os transtornos de ansiedade continuaram a ser classificados, até meados do século passado, como neurastenias (Graeff e Guimarães, 1999). A reintrodução do transtorno de pânico na psiquiatria decorreu do estudo pioneiro de Donald Klein (1964) que mostrou que a ansiedade generalizada e os ataques de pânico têm sensibilidade farmacológica específica. Não obstante, o TP somente foi reconhecido como entidade nosológica 16 anos após, quando foi incluído no Manual de Estatística e Diagnóstico da Associação Psiquiátrica Norteamericana, o DSM-III (APA, 1980).

Segundo o DSM-III, o pânico, ou a ansiedade episódica paroxística, é um estado emocional recorrente, ou persistente, no qual a ansiedade patológica desempenha o papel fundamental. O TP é uma síndrome tripartite caracterizada pela ocorrência de ataques espontâneos de pânico, ansiedade antecipatória e esquiva fóbica (agorafobia). A característica central do transtorno é o ataque espontâneo, ou seja, episódios agudos de medo, ou emoção similar, que ocorrem de forma recorrente na ausência de qualquer ameaça identificável. Geralmente são precedidos por ansiedade crescente (ansiedade antecipatória), podendo resultar em esquiva fóbica das situações que os favorecem (pânico situacional). Os sintomas característicos são sudorese, dispnéia, sensação de sufocação, palpitação ou taquicardia, desconforto ou dor torácica, náusea ou dor abdominal, vertigem, desfiguração da realidade, despersonalização, receio de fazer algo fora do controle ou de

ficar louco, medo de morrer, sensação de dormência nas mãos, rubor ou calafrios. Os relatos também incluem o desejo de fuga da situação imediata e a “resposta de congelamento”. Além disso, também há relatos de receio de urinar ou defecar durante o ataque (Cassano e Savino, 1993; Goetz *et al.*, 1994).

O DSM-IV adiciona que os ataques de pânico também podem ocorrer em outros transtornos de ansiedade (como depressão, fobias e TEPT), podendo ser espontâneos ou induzidos pela exposição a objetos fóbicos (como sangue) ou situações que os predisõem (como altura). Ressalta, no entanto, que os ataques espontâneos constituem o elemento central do diagnóstico do TP. Por sua vez, os ataques de pânico situacional estão relacionados à expectativa do paciente de sentir-se mal em um determinado local ou contexto. Essa ansiedade é gradual, flutuante e crescente, até que o indivíduo se confronte com a situação temida, podendo então, o ataque de pânico, ser desencadeado (Gentil e Lotufo-Neto, 1996).

Os humanos, assim como outras espécies, apresentam comportamentos distintos se a ameaça está próxima ou distante. O pânico assemelha-se ao estado emocional do medo a uma ameaça proximal. Caracteriza-se por respostas comportamentais e viscerais que ocorrem diante de ameaças explícitas, sendo deflagrado por situações de perigo com alternativas reduzidas de escape. As respostas induzidas pela estimulação intracraniana do sistema de defesa têm sido associadas ao medo a ameaças proximais e aos ataques de pânico, principalmente, aquelas produzidas por estimulação da metade dorsal da MCPA (MCPAd) (Gentil, 1988; Graeff, 1990; Deakin e Graeff, 1991; Vargas e Schenberg, 2001).

Nashold e colaboradores (1969) realizaram uma descrição extremamente cuidadosa das sensações e sinais neurológicos evocados pela estimulação do teto do mesencéfalo em voluntários implantados com eletrodos crônicos. Os pacientes com eletrodos na MCPAd, mas não no tegmento lateral adjacente, relataram que a estimulação causava intenso desconforto, ansiedade severa, pânico, terror, 'medo de morrer' (*scare to death*) e que eles não tolerariam sua repetição. Além disto, relataram dispnéia, exoftalmia, sentimento de calor ou frio, sensações vesicais, urgência de evacuação, sensações de vibração da cabeça, face ou peito e dor difusa nas regiões centrais do corpo (cabeça, pescoço, peito e abdômen). Em particular, relataram uma sensação de asfixia referida à caixa torácica. Por outro lado, embora a dor no peito fosse sentida na região 'próxima ao coração', ela não era acompanhada de alterações na frequência cardíaca.

Estudos mais recentes de tomografia por emissão positrônica (PET) dos ataques de pânico induzidos por infusão endovenosa de lactato de sódio demonstraram que o teto do mesencéfalo, compreendendo a MCPAd e as camadas profundas do colículo superior, e o pólo rostral do lobo temporal foram as principais estruturas ativadas (Reiman *et al.*, 1989). Contudo, estudos posteriores com tomografia por ressonância magnética (MRI) mostraram que a ativação do lobo temporal foi, em realidade, devida à alterações do fluxo extracraniano (Drevets *et al.*, 1992). A comparação dos ataques de pânico em humanos com a estimulação das respostas eliciadas pela estimulação elétrica da MCPAd de homens e ratos está ilustrada na Tabela 2 .

Deakin e Graeff (1991) propuseram que os ataques de pânico são análogos à síndrome de defesa provocada por estímulos aversivos

incondicionados agudos, tais como dor e estímulos inatos de medo, que causam ativação autonômica, analgesia e reflexos comportamentais que incluem, à medida da aproximação da ameaça, congelamento, fuga e agressão defensiva. Esta síndrome pode ser evocada pela ativação elétrica ou química de um sistema neuronal no cérebro que compreende a MCPA, hipotálamo medial e amígdala. As respostas comportamentais e autonômicas da reação de defesa expressam um estado emocional aversivo uma vez que a ativação da MCPA motiva o comportamento de desligar o estímulo, inibe as respostas em curso, facilita o escape de um estímulo elétrico aplicado à pata do animal e age como um estímulo incondicionado aversivo no condicionamento Pavloviano e de aversão ao contexto (DiScala *et al.*, 1987; Graeff, 1990).

De fato, estudos farmacológicos do nosso laboratório sugerem que o galope induzido por estimulação da metade dorsal da MCPA seja a resposta que melhor representa o ataque de pânico. Particularmente, o galope foi acentuadamente atenuado pela administração crônica de clomipramina (5-10 mg/kg/dia por 21 dias) e virtualmente abolido por um tratamento similar com fluoxetina (1 mg/kg/dia por 21 dias), um inibidor seletivo da recaptação de 5HT. Em contraste, a administração crônica de maprotilina (MPT, 10 mg/kg/dia por 21 dias), um inibidor seletivo da recaptação de noradrenalina desprovido de ação antipânico, causou aumentos seletivos dos limiares da resposta de imobilidade. Tal como ocorre na clínica, a administração aguda destes antidepressivos e do diazepam (1,8 mg/kg) foi ineficaz, não tendo nenhum efeito sobre os comportamentos de congelamento ou fuga induzidos pela estimulação da MCPA (Schenberg *et al.*, 2001; 2002; Vargas e Schenberg, 2001).

Tabela 2: Isomorfismo dos ataques de pânico e das respostas induzidas por estimulação da MCPAd em homens e ratos. Abreviações: n.d. – não disponível, n.o. – resposta não observada (referências veja o texto).

	Ataques de pânico espontâneos ou induzidos por lactato em homens	Estimulação da MCPAd em homens	Estimulação da MCPAd em ratos
Sensações/ Comportamento	“bloqueio do andar” desejo de fugir intenso desconforto ansiedade severa pânico, terror sensação de morte iminente medo de ficar louco medo de perder o controle	n.d. interrupção do estímulo intenso desconforto ansiedade severa pânico, terror “medo de morrer” n.d. n.d.	congelamento fuga aversão --- --- --- ---
Respostas Autonômicas	taquipnéia hiperventilação dispnéia sensação de asfixia taquicardia ¹ hipertensão urgência de esvaziamento da bexiga peristalse n.d. sudorese n.d.	n.d. hiperventilação apnéia respiração profunda taquicardia n.d. urgência de esvaziamento da bexiga n.d. exoftalmia n.d. piloereção	taquipnéia hiperventilação n.o. respiração profunda taquicardia hipertensão micção defecação exoftalmia n.d. n.o.
Respostas Endócrinas	ausência de resposta da prolactina ausência de resposta do ACTH ausência de resposta do cortisol	n.d. n.d. n.d.	ausência de resposta da prolactina ausência de resposta do ACTH ausência de resposta da corticosterona
Respostas Neurológicas/ Parestesias	sensação de tremor dor torácica sensação de calor/frio tonteira n.d. n.d.	sensação de vibração dor torácica e no coração sensação de calor/frio n.d. entorpecimento dor facial medial	--- --- --- --- --- ---
Áreas cerebrais estimuladas ou ativadas	MCPAd, camadas profundas do colículo superior, amígdala (PET) ²	MCPAd e teto adjacente (0-5mm lateral ao aqueduto) (raio-X)	MCPAd, camadas profundas do colículo superior

¹Estudos recentes parecem contradizer o consenso anterior acerca da resposta taquicárdica. ²Tomografia por emissão positrônica. Retratação posterior de um dos autores sugere que a ativação do pólo rostral do lobo temporal tenha sido um artefato devido aos movimentos mandibulares (Drevets *et al.*, 1992).

Recentemente, Mobbs e colaboradores (2007) apresentaram evidências contundentes do envolvimento da MCPA na ameaça proximal. Estes autores utilizaram ressonância magnética funcional (fMRI) para investigar a influência da proximidade da ameaça em humanos num paradigma de esquiva ativa no qual os voluntários eram perseguidos num labirinto por um predador virtual dotado da habilidade de perseguir, capturar e infligir dor (1 ou 3 choques aplicados aos dedos do indivíduo). Estes autores mostraram que a aproximação do predador virtual deslocava a atividade do córtex pré-frontal ventromedial e amígdala basolateral para a amígdala central e MCPA. Esta mudança foi máxima na antecipação da dor intensa (3 choques). Além do mais, o aumento da atividade da MCPA associado à iminência do ataque correlacionou-se com o aumento do medo e com a redução da confiança de escape.

Surpreendentemente, apesar da natureza extremamente aversiva dos ataques de pânico, não foram demonstradas respostas significantes de cortisol, ACTH e prolactina após ataques de pânico situacionais (Woods *et al.*, 1987) ou induzidos por infusão endovenosa de lactato de sódio (Liebowitz *et al.*, 1985; Hollander *et al.*, 1989; Kellner *et al.*, 1998). Não obstante, níveis mais elevados de cortisol, assim como valores maiores de frequência cardíaca, foram observados imediatamente antes da infusão de lactato nos pacientes de pânico, refletindo níveis mais elevados de ansiedade antecipatória (Liebowitz *et al.*, 1985; Coplan *et al.*, 1998).

De forma similar, estudos de nosso laboratório mostraram que os comportamentos de congelamento e fuga evocados pela estimulação elétrica da MCPAd de ratos não são acompanhados da ativação do eixo HHA e do

aumento da secreção de prolactina (Silva, 2003). Portanto, nem os ataques de pânico, nem a reação de defesa induzida por estimulação da MCPAd, podem ser considerados como uma reação de estresse. De fato, numa revisão recente sobre este tópico, Graeff e colaboradores (2005) concluíram que enquanto os ataques de pânico naturais ou provocados por agentes panicogênicos seletivos, tais como o lactato de sódio e dióxido de carbono (CO₂), não são acompanhados pela ativação do eixo HHA, os panicogênicos inespecíficos, tais como os agonistas do receptor tipo-B da colecistocinina (CCK), elevam os hormônios de estresse na presença ou ausência de ataques de pânico, sugerindo a ativação do eixo HHA por via indireta (aférentes vagais) ou direta (estimulação do PVN), tal como foi demonstrado por Kamilaris e colaboradores (1992). Por outro lado, embora o antagonista benzodiazepínico flumazenil não eleve o nível dos hormônios de estresse, ele não é um agente panicogênico consistente. Agentes farmacológicos que produzem ansiedade em pacientes de pânico e em voluntários saudáveis elevam o nível dos hormônios de estresse, entre estes o antagonista α 2-adrenérgico ioimbina, os agentes serotoninérgicos 1-(m-clorofenil)piperazina (mCPP) e fenfluramina, bem como a cafeína. Portanto, ao contrário da ansiedade antecipatória, o ataque de pânico não parece ativar o eixo HHA. Devido à natureza altamente aversiva tanto dos ataques de pânico quanto da estimulação da MCPAd, a explicação mais razoável para a ausência de resposta hormonal seria a inibição ativa do eixo HHA. Os resultados sobre o efeito dos agentes panicogênicos em relação ao eixo, estão resumidos na Tabela 3.

Tabela 3. Ação de agentes panicogênicos sobre o eixo HHA (Graeff *et al.*, 2005).

Agente Panicogênico	Número de estudos	Atividade do eixo HHA
Lactato	10	Inalterada
CO ₂	4	Inalterada
CCK-4	7	Ativada
	1	Inalterada
Pentagastrina	3	Ativada
	1	Inalterada
Flumazenil	3	Inalterada
loimbina	3	Ativada
mCPP	7	Ativada
	1	Inalterada
Fenfluramina	4	Ativada
Cafeína	2	Ativada

Contudo, embora o eixo HHA não pareça ser ativado nem nos ataques espontâneos de pânico, nem na estimulação da MCPAd, situações estressantes poderiam predispor o indivíduo a estes ataques, alterando o funcionamento da MCPAd. De fato, em pacientes livres de medicação, Schreiber e colaboradores (1996) revelaram diferenças significantes na função do eixo HHA dos pacientes com TP e DM. Assim, embora a atividade do eixo HHA dos pacientes com TP tenha sido maior que a dos controles, ela foi menor que aquela dos pacientes de DM. No entanto, Erhardt e colaboradores (2006) não observaram diferenças quando este estudo foi replicado em pacientes medicados com antidepressivos. Estes autores sugeriram que a diferença entre os dois estudos tenha sido devida à conhecida ação dos antidepressivos sobre o eixo HHA (Holsboer, 2000). De fato, o tratamento com antidepressivos é acompanhado por uma atenuação na desregulação do eixo HHA que,

freqüentemente, precede a atenuação dos sintomas depressivos. Em adição, Erhardt e colaboradores (2006) sugeriram que no TP, as estruturas cerebrais envolvidas na hiperatividade, percepção de estímulos externos e internos e julgamento cognitivo podem ter uma importância primária na regulação do eixo HHA. Neste contexto, a amígdala, o hipocampo e o córtex pré-frontal teriam uma maior significância neste transtorno que na depressão, na qual os distúrbios do eixo HHA e dos mecanismos de retroalimentação ao nível hipotalâmico seriam mais importantes.

Por outro lado, em estudo anterior do nosso laboratório verificamos que enquanto a imobilidade induzida por estimulação da MCPAD era facilitada 3 h após a injeção intraperitoneal (IP) de DEXA, a micção era marcadamente inibida por este glicocorticóide. Embora a DEXA não atravessasse a barreira hemato-encefálica em condições normais, estes efeitos poderiam ter sido causados tanto por uma ação central deste glicocorticóide favorecida pelo aumento da permeabilidade da barreira na região do eletrodo quanto pela supressão periférica do eixo HHA. O presente estudo complementou estes experimentos, analisando os efeitos da administração i.c.v. deste glicocorticóide e da CORT sobre a reação de defesa. Os efeitos destes glicocorticóides no LCE, um equipamento utilizado para a detecção de efeitos ansiolíticos, também foram examinados. Os resultados são apresentados no estudo a seguir.

REFERÊNCIAS

- Adamec, R., Burton, P., Shallow, T., Budgell, J. (1999). Unilateral block of NMDA receptors in the amygdala prevents predator stress-induced lasting increases in anxiety-like behavior and unconditioned startle--effective hemisphere depends on the behavior. *Physiol Behav* 65, 739-751.
- Adamec, R., Muir, C., Grimes, M., Pearcey, K. (2007). Involvement of noradrenergic and corticoid receptors in the consolidation of the lasting anxiogenic effects of predator stress. *Behavioural Brain Research* 179, 192-207.
- Aguilera, G., Rabadan-Diehl, C. (2000). Vasopressinergic regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: implications for stress adaptation. *Regulatory Peptides* 96, 23-29.
- Amorapanth, P., Nader, K., Ledoux, J. E. (1999). Lesions of periaqueductal gray dissociate-conditioned freezing from conditioned suppression behavior in rats. *Learn Mem* 6,491-499.
- APA (1980). *DSM-III: Diagnostic and statistical manual for mental disorders of american psychiatric association*. Third edition. American Psychiatric Press Washington, DC.
- APA (1994). *DSM-IV: Diagnostic and statistical manual for mental disorders of american psychiatric association*. Fourth edition. American Psychiatric Press Washington, DC.
- Arborelius, L., Skelton, K. H., Thirvikraman, K.V., Plotsky, P.M., Schulz, D.W., Owens, M.J. (2000). Chronic administration of the selective corticotropin-releasing factor 1 receptor antagonist CP-154, 526: behavioral, endocrine

and neurochemical effects in the rat. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics* 294, 588-597.

Ballenger JC (1998). Comorbidity of panic and depression: implications for clinical management. *Int Clin Psychopharmacol* 13 Suppl 4:S13-7.:S13-S17.

Beigon, A., Rainbow, T.C., McEwen, B.S. (1985). Corticosterone modulation of neurotransmitter receptors in rat hippocampus: a quantitative autoradiographic study. *Brain Res* 332, 309-314.

Bertram, C.E., Hanson, M.A. (2002). Prenatal programming of postnatal endocrine responses by glucocorticoids. *Reproduction* 124, 459-467.

Bhatnagar, S., Viau, V., Chu, A., Soriano, L., Meijer, O. C., Dallman, M.F. (2000). A cholecystinin-mediated pathway to the paraventricular thalamus is recruited in chronically stressed rats and regulates hypothalamic-pituitary-adrenal function. *The Journal of Neuroscience* 20(14), 5564–5573.

Bitran, D., Shiekh, M., Dowd, J. A., Dugan, M. M., Renda, P. (1998). Corticosterone is permissive to the anxiolytic effect that results from the blockade of hippocampal mineralocorticoid receptors. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 60(4), 879–887.

Blanchard, D.C., Blanchard, R.J. (1988). Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. *Ann Rev Psychol* 39, 43-68.

Bowers, L. K., Swisher, C. B., Behbehani, M. M. (2003). Membrane and synaptic effects of corticotropin-releasing factor on periaqueductal gray neurons of the rat. *Brain Research* 981, 52–57.

- Boyle, M.P., Kolber, B. J., Vogt, S.K., Wozniak, D.F., Muglia, L.J. (2006). Forebrain glucocorticoid receptors modulate anxiety-associated locomotor activation and adrenal responsiveness. *The Journal of Neuroscience* 26(7), 1971–1978.
- Buckingham, J. C. (2000). Glucocorticoids, Role in stress, *Encyclopedia of stress*. Volume 2. Academic Press, George Fink. New York, 261-269.
- Cassano, G.B., Savino, M. (1993). Symptomatology of panic disorder: an attempt to define the panic-agoraphobic spectrum phenomenology, *The Psychopharmacology of Panic* (S.A. Montgomery, editor). New York, Oxford University Press, 38-57.
- Charney, D. S., Woods, S. W., Nagy, L. M., Southwick, S. M., Krystal, J. H., Heninger, G. R. (1990). Noradrenergic function in panic disorder. *J Clin Psychiatry* 51(12), 5-11.
- Cleare, A. J. (2003). The neuroendocrinology of chronic fatigue syndrome. *Endocrine Reviews* 24(2), 236–252.
- Coplan, J.D., Goetz, R., Klein, D.F., Papp, L.A., Fyer, A.J., Liebowitz, M.R., Davis, S.O., Gorman, J.M. (1998). Plasma cortisol concentrations preceding lactate-induced panic: psychological, biochemical, and physiological correlates. *Arch Gen Psychiat* 55, 130-136.
- Corodimas, K. P., LeDoux, J. E., Gold, P. W, Schulkin J. (1994). Corticosterone potentiation of conditioned fear in rats. *Ann NY Acad Sci* 746, 392-393.
- Dayas, C.V., Buller, K.M., Day, T.A. (1999). Neuroendocrine responses to an emotional stressor: evidence for involvement of the medial but not the central amygdale. *Eur J Neurosci* 11, 2312–2322.

- Dayas, C.V., Day, T.A. (2002). Opposing roles for medial and central amygdala in the initiation of noradrenergic cell responses to a psychological stressor. *Eur J Neurosci* 15, 1712-1718.
- Deakin, J.F.W., Graeff, F.G. (1991). 5-HT and mechanisms of defense. *J Psychopharmacol* 5, 305-315.
- De Kloet, E.R. (2003). Hormones, brain and stress. *Endocrine Regulations* 37, 51–68.
- De Kloet, E.R., Joels, M., Holsboer, F. (2005). Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci* 6, 463-475.
- De Kloet, E.R., Sybesma, H., Reul, M.H.M. (1986). Selective control by corticosterone of serotonin receptor capacity in raphe-hippocampal system. *Neuroendocrinology* 42, 513-521.
- DeVries, A.C., Glasper, E.R., Detillion, C.E. (2003). Social modulation of stress responses. *Physiology & Behavior* 79, 399– 407.
- Di-Scala, G., Mana, M.J., Jacobs, W.J., Phillips, A.G. (1987). Evidence of Pavlovian conditioned fear following electrical stimulation of the periaqueductal grey in the rat. *Physiol Behav* 40, 55-63.
- Drevets, W.C., Videen, T.Q., MacLeod, A.K., Haller, J.W., Raichle, M.E. (1992). PET images of blood flow changes during anxiety: correction. *Science* 256, 1696.
- Dunn, J.D. & Whitener, J. (1986). Plasma corticosterone responses to electrical stimulation of the amygdaloid complex: cytoarchitectonic specificity. *Neuroendocrinology* 42, 211-217.
- Durand M., Sarrieau A., Aguerre S., Mormede P., Chaouloff F. (1998). Differential effects of neonatal handling on anxiety, corticosterone

response to stress, and hippocampal glucocorticoid and serotonin (5-HT) 2A receptors in Lewis rats. *Psychoneuroendocrinology* 23, 323-335.

Erdeljan, P., MacDonald, J. F., Matthews, S. G. (2001). Glucocorticoids and serotonin alter glucocorticoid receptor (GR) but not mineralocorticoid receptor (MR) mRNA levels in fetal mouse hippocampal neurons, in vitro. *Brain Research* 896, 130-136.

Erhardt, A., Ising, M., Unschuld, P.G., Kern, N., Lucae, S., Pütz, B., Uhr, M., Binder, E.B., Holsboer, F., Keck, M.E. (2006). Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system in patients with panic disorder. *Neuropsychopharmacology* 1-8.

Feldman, S., Conforti, N., Weidenfeld, J. (1994). Differential effect of amygdaloid lesions of CRF-41, ACTH and corticosterone responses following neural stimuli. *Brain Res* 658, 21-26.

Ferreira, Z. S., Fernandes, P. A. C. M., Duma, D., Assreuy, J., Avellar, M. C. W., Markus, R. P. (2005). Corticosterone modulates noradrenaline-induced melatonin synthesis through inhibition of nuclear factor kappa B. *J Pineal Res* 38, 182–188.

Figueiredo, H.F., Bodie, B.L., Tauchi, M., Dolgas, C.M., Herman, J.P. (2003). Stress integration after acute and chronic predator stress: differential activation of central stress circuitry and sensitization of the hypothalamopituitary- adrenocortical axis. *Endocrinology* 144, 5249– 5258.

File, S.E. (1992). Behavioral detection of anxiolytic action. *Experimental approaches to anxiety and depression* (J.M. Elliott, D.J.Heal and C.A.Marsden, editores), Copyright© by John Wiley & Sons Ltda.

- Freud, S. (1895). On the right to separate from neurasthenia a definitely symptom-complex as anxiety neurosis (Angstneurose). Great books of the western world (M.J. Adler editor associated), Encyclopedia Britannica, 1978.
- Freud, S. (1920). Twenty-fifth lecture of general introduction to psychoanalysis. Great books of the western world (M.J. Adler editor associated), Encyclopedia Britannica, 1978.
- Genest, S.E., Gulemetova R., Laforest S., Drolet G., Kinkead R. (2004). Neonatal maternal separation and sex-specific plasticity of the hypoxic ventilatory response in awake rat. *J Physiol* 554, 543-557.
- Gentil, V. & Lotufo-Neto, F. (1996). Pânico, fobias e obsessões. Editora da Universidade de São Paulo, 2ª ed, 142-145.
- Gesing, A., Bilang-Bleuel, A., Droste, S.K., Linthorst, A.C.E., Holsboer, F., Reul, J.M.H.M. (2001). Psychological stress increases hippocampal mineralocorticoid receptor levels: involvement of corticotropin-releasing hormone. *The Journal of Neuroscience* 21(13), 4822–4829.
- Goetz, R.R, Klein, D.F., Gorman, J.M. (1994). Consistencies between recalled panic and lactate-induced panic. *Anxiety* 1, 31-36.
- Gomez-Sanchez, C.E., Rodriguez, A.F., Romero, D.G., Estess, J., Warden, M.P., Gomez-Sanchez, M.T., Gomez-Sanchez, E.P. (2006). Development of a panel of monoclonal antibodies against the mineralocorticoid receptor. *Endocrinology* 147(3), 1343-1348.
- Graeff, F.G. (1990). Brain defence systems and anxiety. In Roth, M., Burrows, G.D., Noyes, R (eds). *Handbook of anxiety*. Vol.3. Elsevier Science Publishers, Amsterdam pp. 307-354.

- Graeff, F.G. & Guimarães, F.S. (1999). Medicamentos ansiolíticos. Fundamentos de psicofarmacologia (Graeff, F.G., Guimarães, F.S., editores) São Paulo: Editora Atheneu, 123-160.
- Graeff, F.G. & Zangrossi, H.J. (2002). Animal models of anxiety disorders. Biological psychiatry (D'haenen H., Den Boer J.A., Willner P., editores), John Wiley & Sons, Ltda (capítulo XIX).
- Gray, J. (1981). Anxiety as a paradigm case of emotion. *British Medical Bulletin* 37(2), 193-197.
- Gray, J. (1991). *The psychology of fear and stress*, Cambridge University Press, Cambridge.
- Gray, J. A., McNaughton, N. (2000). *The Neuropsychology of Anxiety*. Second edition. Oxford University Press. New York.
- Griffin, J.E., Ojeda, S.R. (1996). *Textbook of Endocrine Physiology*. Third edition. Oxford University Press. New York.
- Gupta, S., Aslakson, E., Gurbaxani, B. M., Vernon, S. D. (2007). Inclusion of the glucocorticoid receptor in a hypothalamic pituitary adrenal axis model reveals bistability. *Theoretical Biology and Medical Modelling* 4(8), 1-12.
- Gutman, D.A., Owens, M.J., Skelton, K.H., Thiruvikraman, K.V., Nemeroff, C. B. (2003). The corticotropin-releasing factor receptor antagonist R121919 attenuates the behavioral and endocrine responses to stress. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics* 304, 874-880.
- Herman, J.P., Cullinan, W.E., Morano, M.I., Akil, H., Watson, S.J. (1995). Contribution of the ventral subiculum to inhibitory regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *J Neuroendocrinol* 7, 475-482.

- Herman, J.P., Cullinan, W.E. (1997). Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo–pituitary–adrenocortical axis. *Trends Neurosci* 20, 78–84.
- Herman, J.P., Dolgas, C. M., Carlson, S.L. (1998). Ventral subiculum regulates hypothalamo-pituitary-adrenocortical and behavioural responses to cognitive stressors. *Neuroscience* 86(2), 449-459.
- Herman, J.P., Ostrander, M.M., Mueller, N.K., Figueiredo, H. (2005). Limbic system mechanisms of stress regulation: hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 29, 1201 – 1213.
- Herrero, A.I., Sândi, C., Venero, C. (2006). Individual differences in anxiety trait are related to spatial learning abilities and hippocampal expression of mineralocorticoid receptors. *Neurobiology of Learning and Memory* 86, 150–159.
- Holsboer, F. (1999). The rationale for corticotrophin-releasing hormone receptor (CRH-R) antagonists to treat depression and anxiety. *Journal of Psychiatric Research* 33, 181-214.
- Holsboer, F. (2000). The corticosteroid receptor hypothesis of depression. *Neuropsychopharmacology* 23, 477-501.
- Holsboer, F., Barden, N. (1996). Antidepressants and hypothalamic-pituitary-adrenocortical regulation. *Endocrine Reviews* 17(2), 187-205.
- Holsboer F, Haack D, Gerken A, Vecsei P (1984). Plasma dexamethasone concentrations and differential suppression response of cortisol and corticosterone in depressives and controls. *Biol Psychiatry* 19, 281-291.

- Hollander, E., Liebowits, M.R., Gorman, J.M., Cohen, B., Fyer, A., Klein, D.F. (1989). Cortisol and sodium lactate-induced panic. *Arch Gen Psychiat* 46, 135-140.
- Johnson MR, Lydiard RB (1998) Comorbidity of major depression and panic disorder. *J Clin Psychol* 54, 201-210.
- Joëls, M., Heslen, W., De Kloet, E. R. (1991). Mineralocorticoid hormones suppress serotonin-induced hyperpolarization of rat hippocampal CA1 neurons. *The Journal of Neuroscience* 11(8), 2288-2294.
- Kalin NH, Sherman JE, Takahashi LK (1988) Antagonism of endogenous CRH systems attenuates stress-induced freezing behavior in rats. *Brain Res* 457, 130-135.
- Kalin NH, Takahashi LK (1990) Fear-motivated behavior induced by prior shock experience is mediated by corticotropin-releasing hormone systems. *Brain Res* 509, 80-84.
- Kalin, N.H., Takahashi, L.K., Chen, F.L. (1994). Restraint stress increases corticotropin-releasing hormone mRNA content in the amygdala and paraventricular nucleus. *Brain Res* 656, 182-186.
- Kalman, B.A., Spencer, R.L. (2002). Rapid corticosteroid-dependent regulation of mineralocorticoid receptor protein expression in rat. *BrainEndocrinology* 143(11), 4184-4195.
- Kamilaris, T.C., Johnson, E.O., Calogero, A.E., Kalogeras, K.T., Bernardini, R., Chrousos, G.P., Gold, P.W. (1992). Cholecystokinin-octapeptide stimulates hypothalamic-pituitary-adrenal function in rats: role of corticotropin releasing hormone. *Endocrinology* 130, 1764-1774.

- Karszen, A.M., Meijer, O.C., Berry, A., Piñol, R.S., De Kloet, E.R. (2005). Low doses of dexamethasone can produce a hypocortico steroid state in the brain. *Endocrinology* 8, 1-34.
- Karst, H., Berger, S., Turiault, M., Tronche, F., Schütz, G, Joëls, M. (2005). Mineralocorticoid receptors are indispensable for nongenomic modulation of hippocampal glutamate transmission by corticosterone. *PNAS* 102(52), 19204–19207.
- Keck, M. E., Wigger, A., Welt, T., Müller, M. B., Gesing, A. Ph.D., Reul, J. M. H. M., Holsboer, F., Landgraf, R., Neumann, I. D. (2002). Vasopressin mediates the response of the combined dexamethasone/CRH test in hyper-anxious rats: implications for pathogenesis of affective disorders. *Neuropsychopharmacology* 26(1), 94-105.
- Kellner, M., Knautd, K., Jahn, H., Holsboer, F., Wiedemann, K. (1998). Atrial natriuretic hormone in lactate-induced panic attacks: mode of release and endocrine and pathophysiological consequences. *J. Psychiat Res* 32, 37-48.
- Kitchener, P., Blasi, F.D., Borrelli, E., Piazza, P.V. (2004). Differences between brain structures in nuclear translocation and DNA binding of the glucocorticoid receptor during stress and the circadian cycle. *European Journal of Neuroscience* 19, 1837-1846.
- Kjelstrup, K.G.; Tuvnes, F.A.; Steffenach, H.A.; Murison, R.; Moser, E.I.; Moser, M.B. (2002). Reduced fear expression after lesions of the ventral hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 10825-10830.

- Leonard, B.E. (2001). The immune system, depression and the action of antidepressants. *Prog Neuro-Psychopharmacol & Biol Psychiat* 25, 767-780.
- Libet, B., Gleason, C.A. (1994). The human locus coeruleus and anxiogenesis. *Brain Res* 634,178-180.
- Liebowitz, M.R., Gorman, J.M., Fyer, A.J., Levitt, M., Dillon, D., Levy, G., Appleby, I.L., Anderson, S., Palij, M., Davies, S.O. (1985). Lactate provocation of panic attacks. II Biochemical and physiological findings. *Arch Gen Psychiat* 42, 709-719.
- Lindholm, D., Castrén, M., Hengerer, B., Leingartner, A., Castrén, E., Thoenen, H. (1994). Glucocorticoids and neurotrophin gene regulation in the nervous system. *Annals New York Academy of Sciences* 746, 195-203.
- Lugon, A.B. (2006). Participação do sistema noradrenérgico central nos comportamentos de defesa produzidos por estimulação elétrica da matéria cinzenta periaquedutal de ratos. Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES, Brasil.
- Maccari, S., Darnaudery, M., Morley-Fletcher, S., Zuena, A.R., Cinque, C., Van, R.O. (2003). Prenatal stress and long-term consequences: implications of glucocorticoid hormones. *Neurosci Biobehav Rev* 27, 119-127.
- Margis, R., Picon, P., Cosner, A. F., Silveira, R. O. (2003). Relação entre estressores, estresse e ansiedade. *R Psiquiatr RS* 25, 65-74.
- Martins, A.P., Marras, R.A., Guimarães, F.S. (1997). Anxiogenic effect of corticotropin-releasing hormone in the dorsal periaqueductal grey. *Neuroreport* 8 (16) 3601-3604.

- Martins, A.P., Marras, R.A., Guimarães, F.S. (2000). Anxiolytic effect of a CRH receptor antagonist in the dorsal periaqueductal gray. *Depression and anxiety* 12, 99-101.
- Matthews, S.G. (2002). Early programming of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Trends Endocrinol Metab* 13, 373-380.
- Metz, G.A., Jadavji, N.M., Smith, L.K. (2005). Modulation of motor function by stress: a novel concept of the effects of stress and corticosterone on behavior. *European Journal of Neuroscience* 22, 1190–1200.
- Mikics, E., Barsy, B., Barsvári, B., Haller, J. (2005). Behavioral specificity of non-genomic glucocorticoid effects in rats: effects on risk assessment in the elevated plus-maze and the open-field. *Hormones and Behavior* 48, 152 – 162.
- Mizoguchi, K., Ishige, A., Aburada, M., Tabira, T. (2003). Chronic stress attenuates glucocorticoid negative feedback: involvement of the prefrontal cortex and hippocampus. *Neuroscience* 119, 887–897.
- Mizoguchi, K., Yuzurihara, M., Ishige, A., Sasaki, H., Chui, D., Tabira, T. (2001). Chronic stress differentially regulates glucocorticoid negative feedback response in rats. *Psychoneuroendocrinology* 26, 443–459.
- Mobbs, D., Petrovic, P., Marchant, J.L., Hassabis, D., Weiskopf, N. (2007). When fear is near: threat imminence elicits prefrontal–periaqueductal gray shifts in humans. *Science* 317, 1079-1083.
- Molina, P. E. (2006). *Endocrine Physiology*. Second edition. McGraw-Hill, New York.
- Mormède, P., Andanson, S., Aupérin, B., Beerda, B., Guémené, D., Malmkvist, J., Manteca, X., Manteuffel, G., Prunet, P., Reenen, C. G. V., Richard, S.,

- Veissier, I. (2007). Exploration of the hypothalamic–pituitary–adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. *Physiology & Behavior* 1-23.
- Mueller, N.K., Dolgas, C.M., Herman, J. P. (2004). Stressor-selective role of the ventral subiculum in regulation of neuroendocrine stress responses. *Endocrinology* 145 (8), 3763-3768.
- Musselman, D.L., Nemeroff, C.B. (1996). Depression and endocrine disorders: focus on the thyroid and adrenal system. *The British Journal of Psychiatry* 168 (30) 123-128.
- Neumann, I.D. (2003). Brain mechanisms underlying emotional alterations in the peripartum period in rats. *Depress Anxiety* 17, 111-121.
- Oliveira, M., Bessa, J. M., Mesquita, A., Tavares, H., Carvalho, A., Silva, R., Pêgo, J. M., Cerqueira, J.J., Palha, J.A., Almeida, O. F. X., Sousa, N. (2006). Induction of a hyperanxious state by antenatal dexamethasone: a case for less detrimental natural corticosteroids. *Biol Psychiatry* 59, 844–852.
- Ostrander, M. M., Ulrich-Lai, Y. M., Choi, D. C., Richtand, N. M., Herman, J. P. (2006). Hypoactivity of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis during recovery from chronic variable stress. *Endocrinology* 147(4), 2008–2017.
- Otte, C., Moritz, S., Yassouridis, A., Koop, M., Madrischewski, A. M., Wiedemann, K., Kellner, M. (2007). Blockade of the mineralocorticoid receptor in healthy men: effects on experimentally induced panic symptoms, stress hormones, and cognition. *Neuropsychopharmacology* 32, 232–238.

- Pacak, K., Palkovits, M., Yadid, G., Kvetnansky, R., Kopin, I. J., Goldstein, D. S. (1998). Heterogeneous neurochemical responses to different stressors: a test of Selye's doctrine of nonspecificity. *Am J Physiol* 275, R1247–R1255.
- Palkovits, M. (1987). Organization of the stress response at the anatomical level. *Prog Brain Res* 72, 47-55.
- Pekary, A.E., Stevens, S.A., Sattin, A. (2006). Rapid modulation of TRH and TRH-like peptide levels in rat brain and peripheral tissues by corticosterone. *Neurochemistry International* 48, 208-217.
- Plotsky, P.M., Owens, M.J., Nemeroff, C.B. (1998). Psychoneuroendocrinology of depression: Hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Psychiatr Clin North Am* 21, 293-307.
- Prewitt, C.M., Herman, J.P. (1997). Hypothalamo-Pituitary-Adrenocortical Regulation Following Lesions of the Central Nucleus of the Amygdala. *Stress* 1, 263-280.
- Real, J. M. H. M., Gesing, A., Droste, S., Stec, I. S. M., Weber, A., Bachmann, C., Bilang-Bleuel, A., Holsboer, F., Linthorst, A. C. E. (2000). The brain mineralocorticoid receptor: greedy for ligand, mysterious in function. *European Journal of Pharmacology* 405, 235-249.
- Reiche, E. M. V., Nunes, S. O. V., Morimoto, H. K. (2004). Stress, depression, the immune system, and cancer. *The Lancet Oncology* 5, 617-625.
- Reiman, E.M., Raichle, M.E., Robis, E., Mintun, M.A., Fusselman, M.J., Fox, P.T., Price, J.L., Hackman, K.A. (1989). Neuroanatomical correlates of a lactate-induced anxiety attack. *Arch Gen Psychiat* 46, 493-500.
- Reul, J.M.H.M., Gesing, A., Droste, S., Stec, I.S.M., Weber, A., Bachmann, C., Bilang-Bleueul, A., Holsboer, F., Linthorst, A.C.E. (2000). The brain

mineralocorticoid receptor: greedy for ligand, mysterious in function.
European Journal of Pharmacology 405, 235-249.

Reul, J.M.H.M. & De Kloet, E.R. (1985). Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology* 117, 2505–2512.

Ridder, S., Chourbaji, S., Hellweg, R., Urani, A., Zacher, C., Schmid, W., Zink, M., Hortnagl, H., Flor, H., Henn, F.A., Schutz, G., Gass, P. (2005). Mice with genetically altered glucocorticoid receptor expression show altered sensitivity for stress-induced depressive reactions. *The Journal of Neuroscience*, 25(26), 6243– 6250.

Salomé, N., Viltart, O., Lesage, J., Landgraf, R., Vieau, D., Laborie, C. (2006). Altered hypothalamo–pituitary–adrenal and sympatho-adrenomedullary activities in rats bred for high anxiety: central and peripheral correlates. *Psychoneuroendocrinology* 31, 724–735.

Sapolsky, R.M.; Krey, L.C.; McEwen, B.S. (1984). Glucocorticoid-sensitive hippocampal neurons are involved in terminating the adrenocortical stress response. *Proc Natl Acad Sci USA* 81, 6174-6177.

Schenberg, L.C., Bittencourt, A.S., Sudré, E.C.M., Vargas, L.C. (2001). Modeling panic attacks. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 25, 647-659.

Schenberg, L.C., Capucho, L.B., Vatanabe, R.O., Vargas, L.C. (2002). Acute effects of clomipramine and fluoxetine on dorsal periaqueductal grey-evoked unconditioned defensive behaviours of the rat. *Psychopharmacology* 159, 138–144.

- Schreiber, W., Lauer, C.J., Krumrey, K., Holsboer, F., Krieg, J.C. (1996). Dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system in panic disorder. *Neuropsychopharmacology* 15, 7-15.
- Slotten, H.A., Kalinichev, M., Hagan, J.J., Marsden, C.A., Fone, K.C. (2006). Long-lasting changes in behavioural and neuroendocrine indices in the rat following neonatal maternal separation: gender-dependent effects. *Brain Res* 1097, 123-132.
- Selye, H. (1936). A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature* 138, 32.
- Selye, H. (1956). *The stress of life*, New York, McGraw-Hill.
- Selye, H. (1976). Forty years of stress research: principal remaining problems and misconceptions. *Can. Med. Assoc. J.* 115, 53-56.
- Siegel, R. A., Conforti, N., Chowers, I. (1980). Neural pathways mediating the prolactin secretory response to acute neurogenic stress in the male rat. *Brain Res* 198, 43-53.
- Strohle, A., Holsboer, F. (2003). Stress responsive neurohormones in depression and anxiety. *Pharmacopsychiatry* 36, S207-S214.
- Tilbrook, A. J., Clarke, I. J. (2006). Neuroendocrine mechanisms of innate states of attenuated responsiveness of the hypothalamo-pituitary adrenal axis to stress. *Frontiers in Neuroendocrinology* 27, 285–307.
- Tsigos, C., Chrousos, G. P. (2002). Hypothalamic–pituitary–adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *Journal of Psychosomatic Research* 53, 865– 871.

- Vargas, L.C., Schenberg, L.C. (2001). Long-term effects of clomipramine and fluoxetine on dorsal periaqueductal gray-evoked innate defensive behaviours of the rat. *Psychopharmacology* 155, 260-268.
- Vargas, L.C. (2002). Modelando os ataques de pânico: psicofarmacologia dos comportamentos defensivos inatos induzidos por estimulação elétrica da matéria cinzenta periaqueductal dorsal de ratos. Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES, Brasil.
- Wilson, J.D., Foster, D.W., Kronenberg, H.M., Larsen, P.R. (1998). *Williams textbook of endocrinology*, W.B. Saunders Company, Philadelphia.
- Woods, S.W., Charney, D.S., McPherson, C.A., Gradman, A.H., Heninger, G.R. (1987). Situational panic attacks: behavioral, physiologic and biochemical characterization. *Arch Gen Psychiat* 44, 365-375.
- Yu, I. T., Lee, S. H., Lee, Y. S., Son, H. (2004). Differential effects of corticosterone and dexamethasone on hippocampal neurogenesis in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 317, 484-490.
- Zink, M., Hortnagl, H., Flor, H., Henn, F. A., Schütz, G., Gass, P. (2005). Mice with genetically altered glucocorticoid receptor expression show altered sensitivity for stress-induced depressive reactions. *J. Neurosci.* 25(26), 6243– 6250.

OBJETIVOS

O estudo a seguir apresentou os seguintes objetivos:

1. Avaliar os efeitos da administração central de DEXA e CORT, sobre os limiares da reação de defesa induzida por estimulação elétrica da MCPAd.
2. Analisar os efeitos da DEXA e da CORT, no LCE, um aparelho utilizado para detectar os efeitos ansiolíticos.

Objetivo de Publicação: Neuropsychocrinology (impacto 4,8).

RESULTADOS

**EFEITOS DA DEXAMETASONA E DA
CORTICOSTERONA SOBRE OS LIMIARES DA REAÇÃO
DE DEFESA INDUZIDOS PELA ESTIMULAÇÃO
ELÉTRICA DA MATÉRIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL
DE RATOS**

Tathiana Corrêa Rangel

Pesquisa apoiada por CNPq e CAPES.

INTRODUÇÃO

A teoria de estresse de Hans Selye teve um grande impacto na medicina e, em particular, na psiquiatria (Selye, 1936; 1976). De fato, estudos clínicos e experimentais conduzidos nas últimas décadas implicam a resposta de estresse no desenvolvimento do transtorno do pânico (TP), depressão maior (DM) e transtorno de estresse pós-traumático (TEPT) (Strohle e Holsboer, 2003). Embora a maior parte das questões apontadas por Selye permaneça sem resposta até os dias atuais (Selye, 1976), a marca de Selye foi o conceito da não-especificidade da ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) à exposição do organismo a uma variedade extraordinária de estressores, tanto físicos como psicológicos (Selye, 1976; Pacak *et al.*, 1998).

Surpreendentemente, apesar da natureza extremamente aversiva dos ataques de pânico, não foram demonstradas respostas significantes nos 'hormônios do estresse', cortisol, corticotrofina (ACTH) e prolactina, após ataques de pânico situacionais (Woods *et al.*, 1987) ou induzidos por infusão endovenosa de lactato de sódio (Liebowitz *et al.*, 1985; Hollander *et al.*, 1989; Kellner *et al.*, 1998). Não obstante, valores mais elevados de cortisol, assim como de frequência cardíaca, foram observados no período imediatamente anterior à infusão de lactato nos pacientes de pânico, refletindo níveis mais elevados de ansiedade antecipatória (Liebowitz *et al.*, 1985; Coplan *et al.*, 1998).

Não obstante, Schreiber e colaboradores (1996) observaram diferenças significantes na atividade basal do eixo HHA em pacientes não-medicados portadores de TP e DM. Assim, embora a atividade do eixo dos

pacientes com TP tenha sido maior que a dos controles, ela foi menor que aquela dos pacientes de DM. Por outro lado, Erhardt e colaboradores (2006) não observaram diferenças entre pacientes de DM e TP medicados com antidepressivos. Estes autores sugeriram que as diferenças entre os dois estudos foram devidas à conhecida ação dos antidepressivos sobre o eixo HHA (Holsboer, 2000). De fato, o tratamento com antidepressivos é acompanhado pela atenuação da desregulação do eixo HHA que, freqüentemente, precede a melhora nos sintomas depressivos. Em adição, Erhardt e colaboradores (2006) sugeriram que enquanto a DM é ocasionada por um distúrbio primário nas estruturas que regulam o eixo HHA (hipotálamo paraventricular, hipófise e adrenal), o TP seria o resultado de disfunções nas estruturas cerebrais envolvidas na hiperatividade, na percepção de estímulos externos e internos e no julgamento cognitivo, repercutindo secundariamente na regulação do eixo HHA. Neste contexto, a amígdala, o hipocampo e o córtex pré-frontal teriam uma importância maior neste transtorno que na depressão.

Estudos farmacológicos do nosso laboratório sugerem, no entanto, que o galope induzido pela estimulação da metade dorsal da matéria cinzenta periaquedutal (MCPAd) seja a resposta que melhor representa o ataque de pânico. Particularmente, o galope foi acentuadamente atenuado pela administração crônica de clomipramina (5-10 mg/kg/dia por 21 dias) e virtualmente abolido por um tratamento similar com fluoxetina (1 mg/kg/dia por 21 dias), um inibidor seletivo da recaptção de serotonina (5HT). Em contraste, a administração crônica de maprotilina (MPT, 10 mg/kg/dia por 21 dias), um inibidor seletivo da recaptção de noradrenalina desprovido de ação antipânico, somente causou aumentos dos limiares da resposta de imobilidade. Tal como

ocorre na clínica, a administração aguda destes antidepressivos e do diazepam (1,8 mg/kg) foi ineficaz, não tendo efeito algum sobre os comportamentos de congelamento ou fuga induzidos pela estimulação da MCPAd (Schenberg *et al.*, 2001; 2002; Vargas e Schenberg, 2001). Mais importante, estudos de nosso laboratório mostraram que os comportamentos de congelamento e fuga evocados pela estimulação elétrica da MCPAd de ratos não são acompanhados da ativação do eixo HHA e do aumento da secreção de prolactina (Silva, 2003). Portanto, nem os ataques de pânico, nem a reação de defesa induzida por estimulação da MCPAd, devem ser considerados como reações de estresse.

Embora o eixo HHA não pareça ser ativado nem nos ataques espontâneos de pânico, nem na estimulação da MCPAd, situações estressantes poderiam predispor o indivíduo a estes ataques. De fato, estudos anteriores de nosso laboratório mostraram que enquanto a imobilidade induzida por estimulação da MCPAd foi facilitada 3 h após a injeção IP de dexametasona (DEXA), a micção foi marcadamente inibida por este glicocorticóide (Vargas, 2002). A estrutura lipofílica dos glicocorticóides naturais facilita a passagem pela barreira hemato-encefálica e, conseqüentemente, suas ações no cérebro (Joëls *et al.*, 1991; Herrero *et al.*, 2006). Contrariamente, a DEXA e seus análogos sintéticos, não atravessam a barreira devido à presença da glicoproteína-P 1a multidroga-resistente (GMDR) (*multidrug-resistant glycoprotein-P 1a*) que é expressa nas membranas apicais das células endoteliais da barreira hemato-encefálica (Holsboer, 1999). Portanto, os efeitos daquele estudo parecem ter sido devidos à supressão periférica do eixo HHA e conseqüente redução dos níveis circulantes de CORT.

Contudo, eles também poderiam ter sido devidos a uma ação central da DEXA favorecida pelo aumento da permeabilidade na região do eletrodo. Por fim, os efeitos inibitórios da DEXA sobre a micção podem ter sido causados pela inibição direta da motilidade da bexiga, de forma similar ao que foi observado nos estudos *in vitro* com íleo isolado de cobaia (Persico et al., 1991; Morat et al., 1987). Não obstante, a administração periférica de DEXA não teve efeitos sobre a defecação induzida por estimulação da MCPAD e experimentos *in vivo* sugerem que os glicocorticóides aumentam a motilidade gastrointestinal (Calignano et al., 1992).

Por outro lado, os glicocorticóides têm afinidade por dois tipos de receptores, o receptor mineralocorticóide (MR) ou tipo-I, que apresenta a mesma afinidade por glicocorticóides e mineralocorticóides, e o receptor glicocorticóide (GR) ou tipo-II, que apresenta baixa afinidade por mineralocorticóides (Erdeljan et al. 2001; Gesing et al., 2001; Kalman e Spencer, 2002; Boyle et al., 2006). Destes, a DEXA tem alta afinidade pelo tipo-II (GR) e a corticosterona (CORT), predominantemente, pelo tipo I (MR) (De Kloet, 2003). As diferenças de afinidade e distribuição no sistema nervoso central sugerem que o receptor tipo-I, de alta afinidade, esteja envolvido nas concentrações baixas de glicocorticóides da atividade basal do eixo HHA, enquanto o receptor tipo-II, de baixa afinidade, seja responsável pela modulação do eixo em presença dos altos níveis de glicocorticóides no estresse (Holsboer e Barden, 1996).

Portanto, o presente estudo analisou os efeitos da administração central de DEXA e CORT, drogas com afinidades distintas para os receptores de glicocorticóides I e II, sobre os limiares da reação de defesa induzida por

estimulação elétrica da MCPAd, um modelo de ataque de pânico. Os efeitos da DEXA e CORT no labirinto-em-cruz elevado (LCE), um modelo de ansiedade generalizada, também foram examinados para fins de comparação.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais.

Foram utilizados ratos albinos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), machos, pesando entre 240 e 290 g, fornecidos pelo biotério do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, da Universidade Federal do Espírito Santo. Os animais eram mantidos em gaiolas individuais com paredes de vidro (25x15x30 cm) e assoalho coberto com jornal e maravalha. As gaiolas eram colocadas em ambiente com ciclo de iluminação de 12 h (luzes acesas às 6:00) e temperatura controlada (20-25°C). Os ratos tinham acesso livre à água e comida.

Cirurgia.

Os animais eram anestesiados com cetamina (100 mg/kg, IP) e xilazina (10 mg/kg, IP) e tratados com 12000 UI de benzilpenicilina procaína e 4000 UI de benzilpenicilina potássica (IP). Em seguida eram fixados num aparelho estereotáxico (David Koff, USA) e realizava-se a tricotomia da parte superior da cabeça e uma infusão de 0,2 ml de solução de lidocaína no tecido subcutâneo. Após a exposição, raspagem e secagem da calota craniana, realizava-se 3 orifícios, com o auxílio de uma broca odontológica, no ossos

frontal e parietal para a fixação de pequenos parafusos de aço inoxidável que serviam de âncora para a prótese cirúrgica.

Em seguida, realizava-se o orifício para implantação da cânula-guia no ventrículo lateral direito (VL). A cânula-guia era confeccionada com um segmento de agulha hipodérmica com 12 mm de comprimento e 0,7 mm de diâmetro externo. As coordenadas de implantação com relação ao bregma foram de 3,8 mm ântero-posterior e 4,7 mm lateral e, verticalmente, 6,2 mm abaixo da superfície do córtex. Após a implantação da cânula, ela era soldada a um dos parafusos e fixada com resina acrílica autopolimerizável (JET, São Paulo, Brasil). Em seguida, procedia-se à trepanação da região do lâmbda com o auxílio de uma broca adiamantada (KG Sorensen 1016).

Os eletrodos eram confeccionados com um fio de aço inoxidável (Califórnia Fine Wire Company, Grover City, EUA) de 250 µm de diâmetro externo, isolado em toda extensão exceto na seção transversal de sua extremidade. Um outro fio de aço inoxidável, não isolado, servia de eletrodo indiferente e era soldado a um dos parafusos de fixação. Os eletrodos eram soldados aos pinos de um soquete de circuito integrado (Celis, BCPT, São Paulo, Brasil) que permitia a conexão com o cabo de estimulação elétrica.

O eletrodo da MCPA era implantado utilizando-se o lâmbda (confluência dos seios sagital e lateral) como referência das coordenadas ântero-posterior e lateral e a superfície do córtex como referência da coordenada vertical. Os eletrodos eram implantados 0,7 mm lateral e 4,3 mm vertical à altura do lâmbda (AP=0).

Após a implantação dos mesmos, o campo cirúrgico era preenchido com resina acrílica autopolimerizável, unindo-se o eletrodo, cânula-

guia e parafusos numa prótese sólida. Um tubo plástico de 1 cm de altura e diâmetro era cortado ao meio e aplicado sobre a prótese para proteção do eletrodo.

Durante a cirurgia, a hipotermia era evitada envolvendo-se o animal numa flanela. Ao término da cirurgia os animais eram alojados em gaiolas individuais e mantidos sobre uma placa térmica (36°C) até sua completa recuperação e transferência ao biotério.

Estimulação intracraniana (EIC).

A EIC era conduzida num ambiente com som atenuado e temperatura controlada (23-25 °C). A estimulação elétrica era realizada por meio de um conector giratório de mercúrio que permitia a livre movimentação dos animais. Os ratos eram estimulados com pulsos senoidais (0-90 μ A, 60 Hz, 30 s) de intensidades crescentes, em passos de 5 μ A, aplicados em intervalos de 5 min. Os estímulos eram gerados por um estimulador de corrente alternada (Marseillan, 1977) e monitorados por meio de um osciloscópio (V-121 Hitachi-Denshi, Malásia).

Os comportamentos eram classificados de acordo com um etograma (Schenberg *et al.*, 2000). As respostas limiares, quais sejam, aquelas emitidas com a menor intensidade de corrente, eram registradas de modo binário, como 'emitidas' ou 'não', independentemente de sua frequência ou duração num único período de estimulação.

Nas intensidades baixas, a estimulação produzia um comportamento de congelamento (*freezing behavior*) caracterizado por

imobilidade tensa, abertura total dos olhos (exoftalmia) e paralisia das vibrissas (mistacioplegia). As intensidades mais elevadas produziram comportamentos de fuga caracterizados por trotes, galopes e saltos. Embora menos freqüentemente, os ratos também apresentaram respostas de defecação ou micção.

Avaliação do desempenho no labirinto-em-cruz elevado (LCE).

O LCE situava-se numa sala de 10 m², com atenuação sonora, luminosidade de 6,5 lux e um exaustor que permitia a ventilação do ambiente. O LCE era feito de madeira revestida com fórmica branca e possuía 4 braços de 50 cm de comprimento e 10 cm de largura, montados perpendicularmente, formando uma plataforma central de 10 cm² em sua interseção. Dois braços opostos eram circundados por paredes de 40 cm de altura (braços fechados) e os outros 2 por uma borda de 1 cm de altura (braços abertos). O labirinto situava-se 70 cm acima do assoalho.

Os comportamentos eram registrados por 2 observadores situados cerca de 60 cm do LCE. Inicialmente, o rato era colocado numa arena de acrílico transparente com 60 cm de diâmetro e altura, onde permanecia por 5 min para se habituar ao ambiente. Em seguida, ele era transportado para a plataforma central do labirinto e posicionado com a face voltada para o braço aberto. O tempo e a freqüência de entradas (invasão de um braço com as 4 patas) nos braços abertos e fechados (mas não da plataforma central) eram registrados por 5 min. Se o rato saltasse ou caísse dos braços abertos, ele era recolocado no braço em que estava explorando.

Administração intracerebroventricular (i.c.v.)

A DEXA (9α -fluor- 16α -metilprednisolona, Decadron[®], Prodome, Campinas, Brasil) foi dissolvida em água destilada e injetada no ventrículo lateral na dose de $0,8 \mu\text{g}/15 \mu\text{L}$. Considerando-se o peso médio do cérebro em cerca de 2 g, esta dose foi similar à utilizada no estudo anterior com administração periférica da DEXA (Vargas, 2002). O corticosteróide era microinjetado manualmente, numa velocidade aproximada de 2 s, por meio de uma agulha de injeção de comprimento igual ao da cânula-guia e 0,3 mm de diâmetro externo. A agulha era acoplada a uma microseringa de 100 μL (Hamilton 710-N, Reno, NV, EUA) por meio de um tubo de polietileno (PE10, Clay Adams, EUA) estirado sob calor. A microseringa era preenchida com mercúrio que, além de imiscível, facilitava na visualização do deslocamento do menisco. A CORT (Sigma, St. Louis, MO, EUA) foi preparada da mesma maneira na dose de $40 \mu\text{g} / 15 \mu\text{L}$. Os ratos administrados com CORT e salina (NaCl 0,9%, $15 \mu\text{L}$) foram tratados de forma similar.

Protocolo experimental

Cinco dias após a cirurgia, os ratos eram colocados numa arena de acrílico transparente com 60 cm de diâmetro e altura e conectados ao cabo de estimulação. Depois de um período de habituação de 10 minutos, os ratos eram submetidos à primeira sessão de estimulação (Dia-1, sessão de triagem). Os ratos que apresentaram a resposta de galope com intensidade igual ou

inferior a 85 μ A foram selecionados para os experimentos com administração i.c.v. de CORT, DEXA (n=20) ou salina (n=10). Os efeitos das drogas sobre os limiares da reação de defesa foram avaliados no Dia 2, 15 min e 3 h após sua administração, e no Dia 3 após um intervalo de 24 h. Os testes do LCE também foram realizados no Dia 2, 1,5 h após a administração das drogas. O experimento seguiu um protocolo balanceado de 2 etapas separadas por um intervalo de 5 dias (*washout*). Assim, dos 20 ratos administrados com glicocorticóides, 10 ratos foram tratados com CORT na primeira etapa e DEXA na segunda, invertendo-se os tratamentos para os demais. Contudo, a administração de salina foi realizada em apenas 10 ratos, agrupando-se as sessões (triagem, 15 min, 3 h, 24 h) das duas etapas para fins de análise estatística. Desta forma, cada animal do grupo salina foi testado em duplicata. O delineamento experimental está ilustrado na Tabela 1.

Tabela 1. Protocolo experimental. Foram administrados 10 ratos por etapa. Contudo, ao contrário dos grupos CORT e DEXA, no qual os 20 ratos foram diferentes, os ratos do grupo SAL foram administrados em duplicata.

Etapas	Dias	Hora do Dia			
		9:00	9:15	11:30	12:00
1 ^a	1	EIC			
	2	CORT/DEXA/SAL	EIC	LCE	EIC
	3	EIC			
Intervalo	4-7	<i>WASHOUT</i>			
2 ^a	8	EIC			
	9	DEXA/CORT/SAL	EIC		EIC
	10	EIC	Sacrifício		

Histologia.

Ao término dos experimentos, injetava-se 5 µl de azul de Evans para marcar o sítio da injeção. Em seguida, os animais eram anestesiados com 1,5 doses anestésicas de hidrato de cloral (600 mg/kg IP, Isofar, Rio de Janeiro, Brasil) e perfundidos, seqüencialmente, com 200 ml das soluções de NaCl (0,9 %) e formaldeído (10 %). A perfusão era realizada por via transcardíaca, no fluxo de 35 ml/min, por meio de uma bomba peristáltica (Cole Parmer, Masterflex C/L, mod. 77120-70, Barrington, IL, EUA).

Os ratos eram decapitados e suas cabeças mantidas em formaldeído (10 %) por 10 dias. Em seguida, os cérebros eram removidos e preparados para microtomia, descartando-se os ratos cuja injeção foi externa ao ventrículo lateral. Em seguida, os cérebros eram seccionados num vibrátomo (Vibratome Série 1000 Plus, St. Louis, MO, EUA) em cortes coronais de 100 µm de espessura. Os cortes eram montados em lâminas previamente gelatinizadas, desidratados em estufa de baixa temperatura (38°C), corados com vermelho neutro (Sigma, EUA) e montados com DPX (Aldrich Chemical Company, EUA). Os sítios estimulados foram identificados com o auxílio de uma câmera lúcida e microscopia de baixa magnitude (Nikon, Eclipse, Japão) e registrados em diagramas coronais do atlas do cérebro de rato de Paxinos e Watson (1986).

Análise estatística.

As variáveis do LCE foram submetidas à análise de variância (ANOVA). Os efeitos dos tratamentos sobre os limiares da reação de defesa foram avaliados por análise logística de limiares (Bittencourt *et al.*, 2004). Para isto, as curvas de probabilidade das respostas limiares foram obtidas pelo ajuste logístico das freqüências acumuladas de resposta. Regressões significantes foram avaliadas pelo χ^2 de Wald. As curvas de limiares pré- e pós-droga dos grupos DEXA, CORT e salina foram comparadas por testes de razão de verossimilhanças. A descrição abrangente dos métodos de regressão logística pode ser encontrada em outros estudos (Bittencourt *et al.*, 2004; Collett, 2003). As diferenças foram consideradas significantes para o nível descritivo de 5% (critério de Bonferroni).

RESULTADOS

Sítios estimulados ou microinjetados.

Os sítios estimulados localizaram-se principalmente na MCPA (24/30, 80%). Destes, a maioria localizou-se na coluna dorsolateral (12/30, 40%) e os demais na dorsomedial (9/30, 30%) e lateral (3/30, 10%), mas também nas camadas profundas do colículo superior (5/30, 16,6%) e na comissura do colículo superior (1/30, 3,3%) (Fig. 1).

Efeitos da administração central de salina.

Comparado à sessão pré-droga, o grupo controle apresentou um aumento significativo do limiar de micção 15 min após a administração da salina ($\Delta I_{50}=12,3\%$; $\chi^2=6,49$; g.l. 1; $P<0,01$) (Fig. 2, Tab. 2). Contudo, houve uma virtual abolição das respostas de defecação, 15 min e 3 h após a injeção de salina, e da micção 3 h após este tratamento. Após 24 h, os limiares de defecação retornaram aos níveis basais, mas os de imobilidade apresentaram um aumento leve, porém significativo ($\Delta I_{50}=13,5\%$; $\chi^2=5,73$; g.l. 1; $P<0,05$). Em contraste, os limiares de micção permaneceram significativamente elevados ($\Delta I_{50}=42,2\%$; $\chi^2=16,30$; g.l. 1; $P<0,0001$) (Fig. 2, Tab. 2).

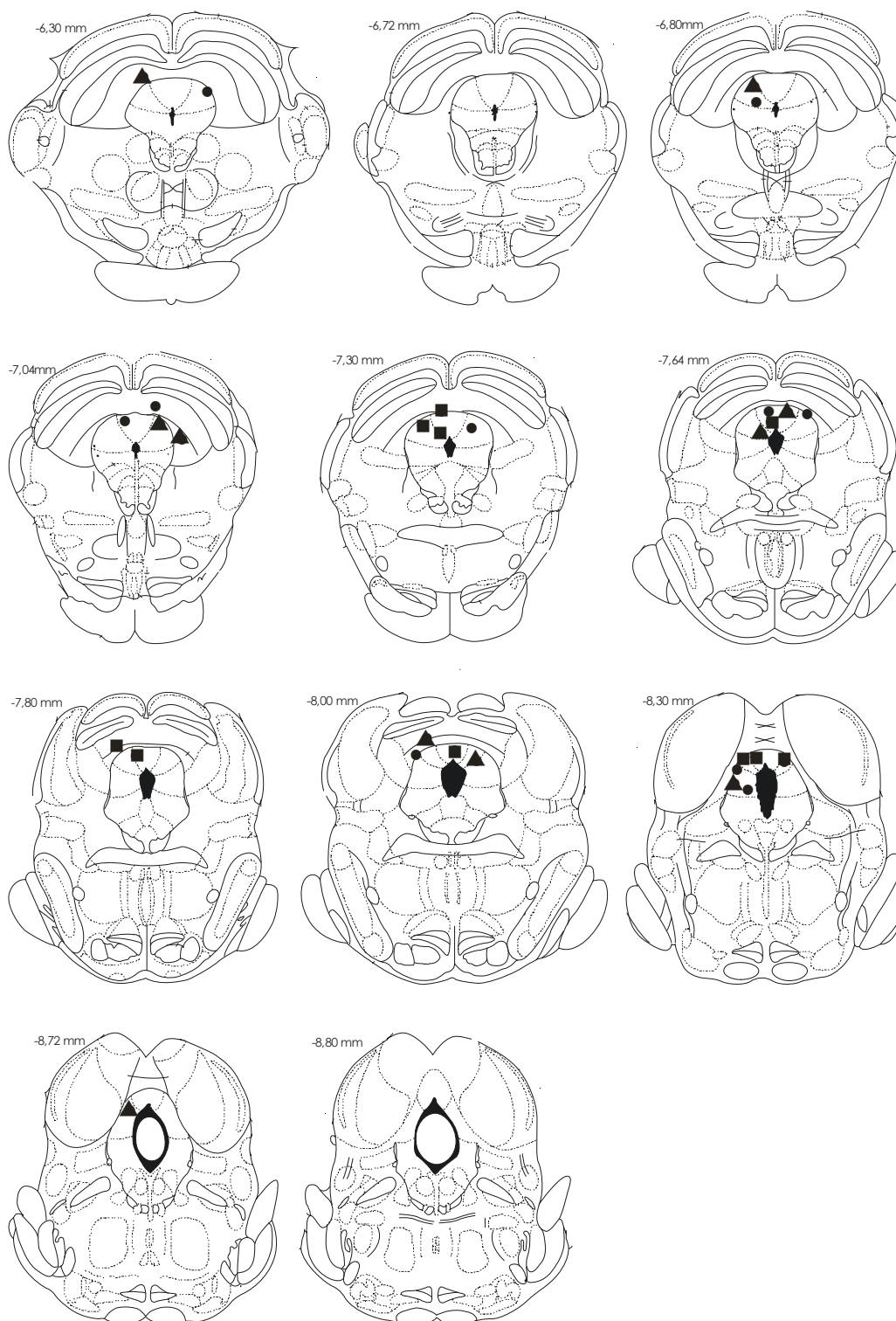


Figura 1. Sítios de estimulação dos ratos tratados por via intracerebroventricular com dexametasona ($0,8 \mu\text{g} / 15 \mu\text{L}$) (triângulos), corticosterona ($40 \mu\text{g} / 15 \mu\text{L}$) (quadrados) ou salina ($\text{NaCl } 0,9\%$, $15 \mu\text{L}$) (círculos). Os diagramas foram extraídos do atlas do cérebro do rato de Paxinos e Watson (1986). Os números representam as coordenadas ântero-posteriores em relação ao bregma.

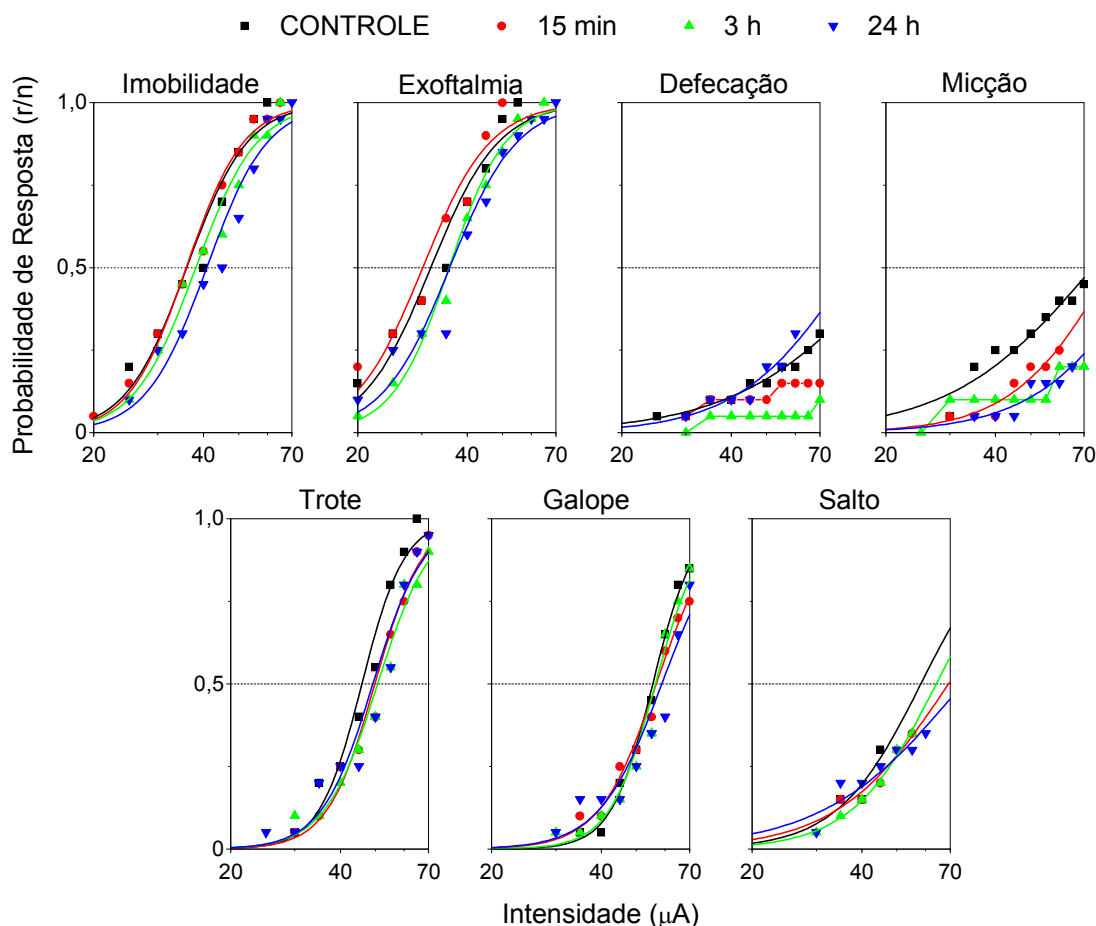


Figura 2. Efeitos da administração intracerebroventricular de salina (NaCl 0,9%, 15 μ L, i.c.v.) sobre os limiares das respostas de defesa induzidas por estimulação da matéria cinzenta periaquedutal. As curvas sigmoidais de representam as funções de distribuição de probabilidade da sessão-controle (Dia 1) e das sessões realizadas 15 min (Dia 2), 3 h (Dia 2) e 24 h (Dia 3) após o tratamento. As curvas foram ajustadas segundo o modelo logístico e comparadas por testes de χ^2 da razão de verossimilhanças. As linhas tracejadas indicam as diferenças significantes em relação à sessão-controle ($P < 0,05$, critério de Bonferroni). O ajuste dos comportamentos representados por linha-e-símbolo não alcançou significância estatística. – número de animais que apresentaram a resposta, n – número total de ratos estimulados.

Efeitos da administração central de DEXA.

Comparado à sessão pré-droga, observou-se um aumento discreto nos limiares de defecação ($\Delta I_{50} = 22\%$; $\chi^2 = 7,59$; g.l. 1; $P < 0,01$) e galope ($\Delta I_{50} = 17\%$; $\chi^2 = 7,28$; g.l.1; $P < 0,01$) 15 min após a administração da DEXA (Fig.

3, Tab. 2). Por outro lado, enquanto os limiares de galope foram moderadamente aumentados 24 h após a administração da droga ($\Delta I_{50}=31\%$; $\chi^2=13,7$; g.l. 1; $P<0,0005$), os limiares de salto sofreram uma redução pequena, porém, significativa ($\Delta I_{50}= -17\%$; $\chi^2=8,03$; g.l. 1; $P<0,005$) (Fig. 3, Tab. 2). Por outro lado, a defecação foi praticamente abolida 24 h após a administração de DEXA.

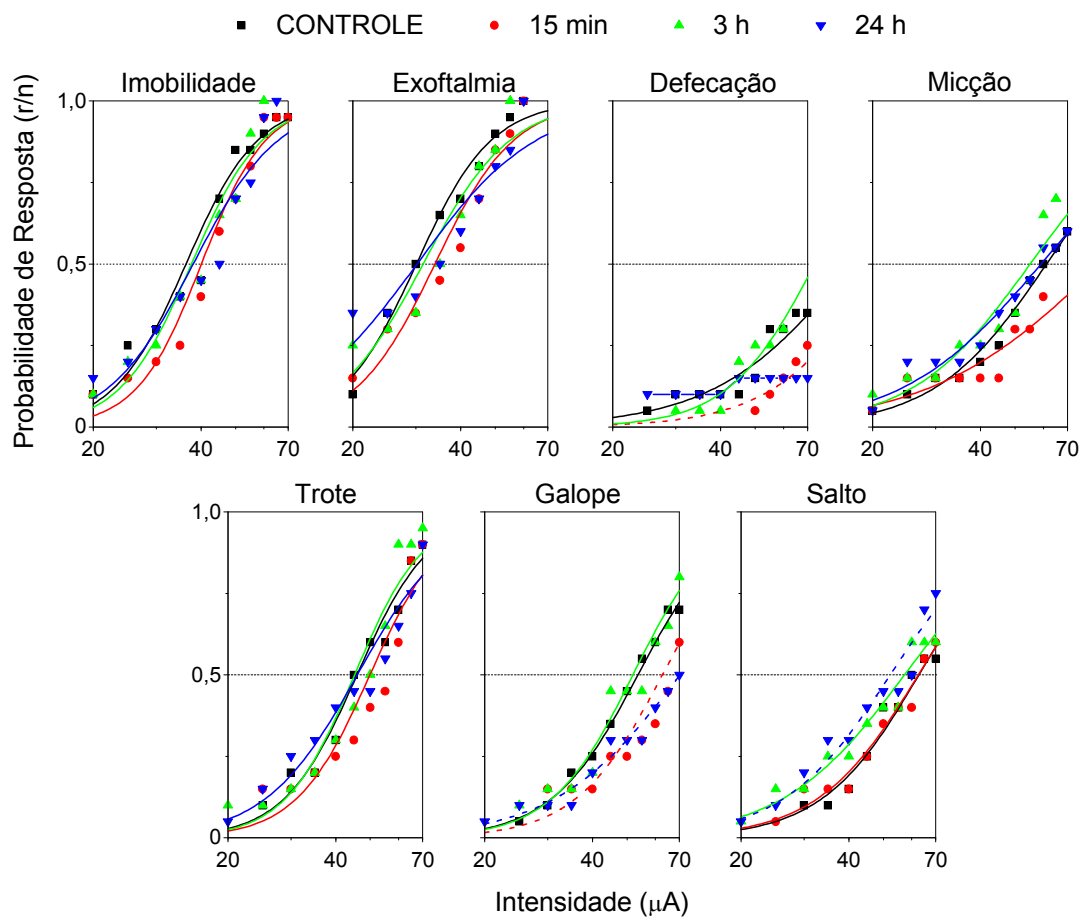


Figura 3. Efeitos da administração central de dexametasona (DEXA, $0,8 \mu\text{g} / 15 \mu\text{L}$, i.c.v.) sobre os limiares das respostas de defesa induzidas por estimulação da matéria cinzenta periaquedutal. Demais detalhes como na Fig.2.

Efeitos da administração central de CORT.

O tratamento com administração i.c.v. de CORT causou uma redução moderada dos limiares de micção ($\Delta I_{50} = -29\%$; $\chi^2 = 14,56$; g.l. 1; $P < 0,0001$) e um aumento leve, porém altamente significativo, dos limiares de galope ($\Delta I_{50} = 18\%$; $\chi^2 = 12,96$; g.l. 1; $P < 0,0005$) 15 min após sua administração (Fig.4, Tab.2). Os limiares de galope permaneceram levemente aumentados 3 h após a administração da CORT ($\Delta I_{50} = 14\%$; $\chi^2 = 6,6$; g.l. 1; $P < 0,0005$). Adicionalmente, houve uma redução dos limiares de defecação ($\Delta I_{50} = -24,6\%$; $\chi^2 = 6,5$; g.l. 1; $P < 0,01$) e salto ($\Delta I_{50} = -14,3\%$; $\chi^2 = 6,39$; g.l. 1; $P < 0,01$) (Fig. 4, Tab. 2). Os limiares retornaram aos valores basais 24 h após a administração da CORT.

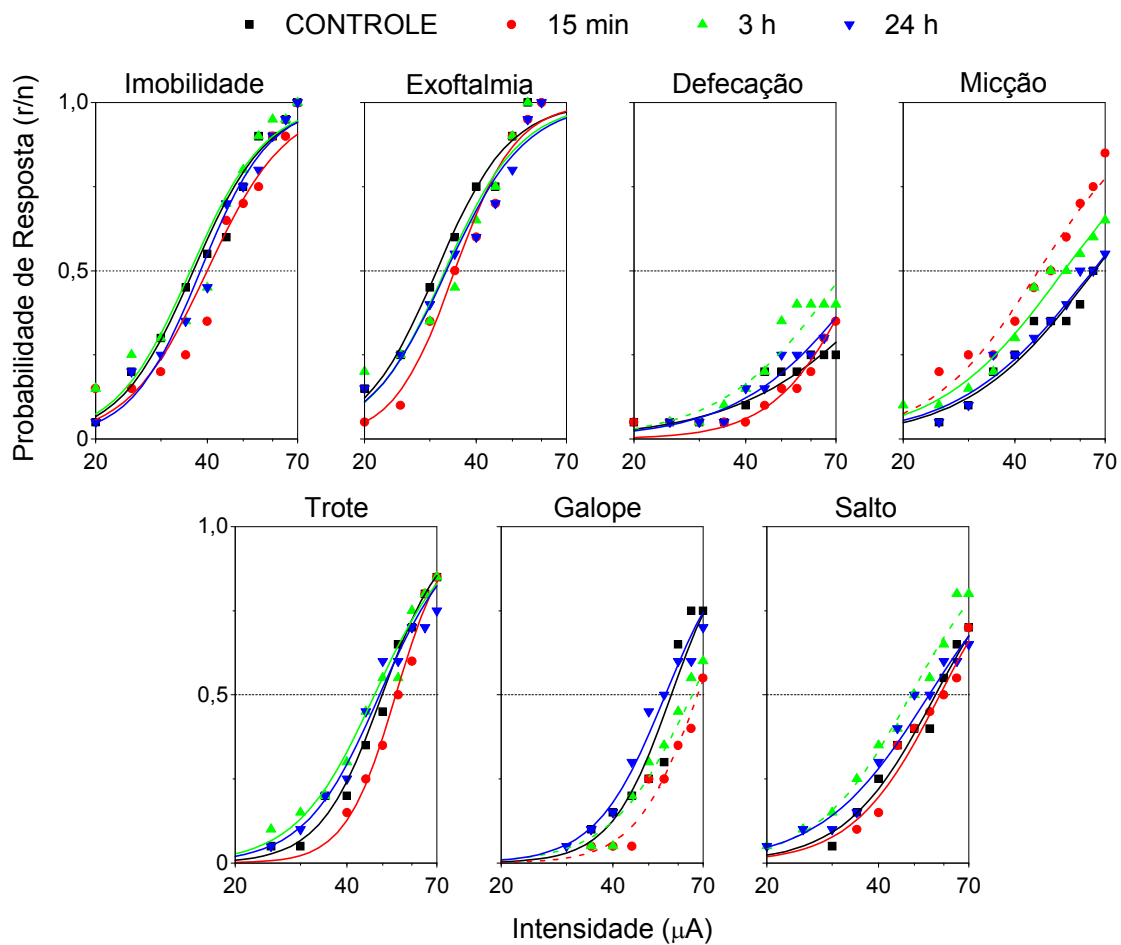


Figura 4. Efeitos da administração central de corticosterona (CORT, $40 \mu\text{g} / 15 \mu\text{L}$, i.c.v.) sobre os limiares das respostas de defesa induzidas por estimulação da matéria cinzenta periaquedutal. Demais detalhes como na Fig.2.

Tabela 2. Efeitos da administração central de dexametasona (DEXA, 0,8 µg /15 µL), corticosterona (40 µg /15 µL) ou salina (SAL, NaCl 0,9%, 15µL) sobre os limiares medianos da reação de defesa ($I_{50} \pm EP$, µA) induzida por estimulação elétrica da matéria cinzenta periaquedutal dorsal. * $P < 0,05$, diferenças significantes em relação à sessão pré-droga (Dia 1) (χ^2 da razão de verossimilhanças, critério de Bonferroni). EXO – exoftalmia, IMO – imobilidade, TRT – trote, GLP – galope, SLT – salto, MIC – micção, DEF – defecação. n.e. – valores não-estimáveis devido à baixa frequência de resposta e ausência de ajuste significativo.

Resposta	Droga	Dia 1		Dia 2		Dia 3	
		Pré-droga	15 min	3 horas	24 h		
EXO	SAL	31,7±0,2	30,2±0,2	35,7±0,2	35,8±0,2		
	DEXA	30,1±0,2	33,9±0,2	31,4±0,2	30,2±0,2		
	CORT	31,3±0,1	35,0±0,1	32,9±0,1	33,3±0,2		
IMO	SAL	36,0 ±0,2	35,9±0,2	38,1±0,2	40,8±0,2*		
	DEXA	36,3±0,2	40,1±0,2	37,6±0,1	38,1±0,1		
	CORT	36,7±0,1	40,0±0,1	36,0±0,2	38,3±0,1		
TRT	SAL	45,9±0,1	49,8±0,1	50,7±0,1*	49,2±0,1		
	DEXA	45,9±0,2	49,8±0,1	45,2±0,1	46,0±0,1		
	CORT	49,8±0,1	54,2±0,1	47,5±0,1	49,0±0,1		
GLP	SAL	55,4±0,0	56,7±0,0	56,4±0,0	58,7±0,2		
	DEXA	53,6±0,1	62,8±0,2*	51,9±0,1	70,3±0,7*		
	CORT	57,5±0,1	67,7±0,4*	65,4±0,2*	55,5±0,0		
SLT	SAL	58,1±7,8	69,3±6,8	64,1±3,4	75,8±6,6		
	DEXA	62,8± 0,3	62,6±0,3	57,2±0,2	52,2±0,1*		
	CORT	57,0±0,1	58,6±0,1	48,9±0,1*	54,8±0,1		
MIC	SAL	74,0±3,5	83,1±7,8*	n.e.	105,3±16,1*		
	DEXA	61,2±0,8	86,6±9,1	55,0±0,9	59,0±1,1		
	CORT	65,5±2,3	46,3±0,1*	54,2±0,5	64,8±0,9		
DEF	SAL	109,6±12,4	n.e.	n.e.	85,4±9,0		
	DEXA	92,8±4,6	113,5±9,4*	73,3±4,4	n.e.		
	CORT	108,3±10,7	81,6±2,7	74,3±2,1*	87,8±45,7		

Efeitos dos tratamentos sobre o desempenho no labirinto-em-cruz elevado (LCE).

Nenhum dos tratamentos realizados teve efeitos significantes sobre os valores percentuais de exploração dos braços aberto e fechado. Contudo, os tratamentos tiveram um efeito significativo sobre a exploração da plataforma central ($F_{2,27} = 4,15$; $P < 0,03$). Comparado ao grupo salina, estes efeitos foram devidos, principalmente, à redução significativa da exploração da plataforma central pela CORT ($\Delta = -63\%$, $t = 2,84$, $P < 0,01$). Uma redução menor, porém, marginalmente significativa ($\Delta = -23\%$, $t = 1,80$, $P < 0,08$) também foi observada após a administração de DEXA (Tab. 3).

Tabela 3. Efeitos da administração central de dexametasona (DEXA, 0,8 μg /15 μL), corticosterona (CORT, 40 μg /15 μL) ou salina (SAL, NaCl 0,9%, 15 μL) sobre o desempenho no LCE. Os valores representam a média \pm EPM. * $P < 0,01$, diferenças significantes em relação ao grupo SAL. EBA – entrada no braço aberto, TBA – tempo no braço aberto, EBF – entrada no braço fechado, TBF – tempo no braço fechado, PC – plataforma central.

Droga	EBA	TBA	EBF	TBF	PC
SAL	4,2 \pm 0,8	58,8 \pm 9,3	4,4 \pm 1,0	164 \pm 20,0	77,7 \pm 14,8
DEXA	4,5 \pm 1,2	67,7 \pm 16,1	3,3 \pm 1,0	172 \pm 24,0	59,9 \pm 10,2
CORT	4,1 \pm 1,1	112 \pm 29,5	3,8 \pm 1,0	159 \pm 29,0	29,1 \pm 10,7*

DISCUSSÃO

Exceto pela exoftalmia, os tratamentos produziram efeitos sobre todas as respostas de defesa induzidas pela estimulação elétrica da MCPAd do rato. Contudo, estes efeitos diferiram quanto ao tratamento, direção e sessão de estimulação. Embora a salina tenha causado aumentos discretos dos limiares de trote ($\Delta I_{50}=11\%$) e imobilidade ($\Delta I_{50}=14\%$) nas sessões realizadas 3 e 24 h após sua administração, os glicocorticóides não tiveram efeito algum sobre estas respostas.

Surpreendentemente, no entanto, os limiares de defecação e micção aumentaram acentuadamente após a administração de salina. Em particular, a defecação foi virtualmente abolida 15 min e 3 h após a sua administração. Os limiares da micção também sofreram aumentos significantes, porém menos acentuados ($\Delta I_{50}=12\%$), 15 min após a administração. Entretanto, tal como a defecação, a micção foi praticamente abolida 3 h após o tratamento. No dia seguinte, os limiares de micção permaneceram significativamente elevados ($\Delta I_{50}=42\%$), enquanto os da defecação retornaram aos valores basais. Estes resultados devem ser aceitos com cautela uma vez que o grupo salina foi formado pelo agrupamento dos dados de apenas 10 ratos testados em duplicata. Portanto, os resultados deste grupo podem ter sofrido um viés devido aos experimentos repetidos em um número pequeno de ratos.

Por outro lado, os glicocorticóides tiveram efeitos agudos opostos sobre estas respostas. Com relação à micção, enquanto a DEXA não teve efeito algum, a CORT causou uma redução significativa dos limiares 15 min

($\Delta I_{50} = -29\%$) e, ainda que não significativa, 3 h após sua administração ($\Delta I_{50} = -17\%$). Como os efeitos da CORT ocorreram imediatamente após sua administração (15 min), eles não podem ser imputados nem a ações periféricas, nem à inibição central do eixo HHA. Assim, a diferença nos efeitos destes glicocorticóides sobre a micção parece ser atribuída à sua ação diferencial sobre os receptores tipo-I (MR) e II (GR).

Os limiares de defecação foram significativamente aumentados 15 min após a administração de DEXA ($\Delta I_{50} = 22\%$), retornando aos valores basais 3 h após o tratamento. Em contraste, a CORT apresentou efeitos apenas facilitatórios sobre a defecação, atingindo significância estatística 3 h após sua administração ($\Delta I_{50} = -31\%$). Tal como discutido para a micção, as diferenças dos efeitos agudos destes glicocorticóides sobre a defecação também podem ser atribuídas às afinidades distintas pelos receptores tipo-I e II.

Por outro lado, como os limiares de defecação já haviam se normalizado e 3 h após a administração de DEXA, o bloqueio tardio desta resposta no dia seguinte sugere a supressão central do eixo HHA, com a conseqüente redução dos níveis plasmáticos de CORT. Contudo, evidências da literatura sugerem que a redução da CORT levaria a uma facilitação da defecação, uma vez que os esteróides inibem as contrações do íleo isolado, induzidas por estimulação elétrica ou acetilcolina, e potencializam os efeitos constipantes dos opióides (Morat et al., 1987; Persico et al., 1991). Por outro lado, estudos clínicos sugerem que o eixo HHA de pacientes com a síndrome do cólon irritável possa ser tanto hiperativo (Dinan et al., 2006) quanto hipoativo (Böhmelt et al., 2005). Adicionalmente, a diarreia característica desta síndrome

correlacionou-se com os percentis dos pacientes de maior ou menor atividade do eixo HHA (Karling *et al.*, 2007).

Em todo caso, diferentemente do estudo prévio sobre os efeitos da administração periférica de DEXA na reação de defesa (Vargas, 2002), não foi observada a inibição da micção 3 h após a administração central deste glicocorticóide. Como a CORT i.c.v. facilitou a micção, e a DEXA ip inibiu, é possível que o último efeito tenha sido devido à redução dos níveis plasmáticos de CORT pela supressão periférica do eixo HHA. Tampouco foi observada a facilitação da imobilidade 3 e 24 h após a injeção IP de DEXA. Todavia, devido à extensa ligação dos esteróides às proteínas plasmáticas, nem sempre há uma correspondência entre os efeitos centrais e periféricos.

Independentemente destes mecanismos, é importante notar que a matéria cinzenta periaquedutal (MCPA) é a única fonte mesencefálica das aferências do núcleo de Barrington, a principal estrutura de controle da motilidade da bexiga e do cólon (Blok e Holstege, 1998; Valentino *et al.*, 2000). De fato, estudos de estimulação elétrica focal por variação de frequência sugerem que a defecação seja primariamente induzida pela estimulação da MCPA lateral adjacente ao aqueduto (Bittencourt *et al.*, 2004). A MCPA também envia eferências para os dendritos rostrais do locus cerúleo (LC) (Ennis *et al.*, 1991; Luppi *et al.*, 1995). O LC e o núcleo de Barrington têm conexões recíprocas e enviam projeções para os neurônios parassimpáticos lumbo-sacrais (Nadelhaft *et al.*, 1992; Luppi *et al.*, 1995; Valentino *et al.*, 1996, 2000). Portanto, estas estruturas podem estar envolvidas nos efeitos centrais dos glicocorticóides sobre a defecação e micção.

Por outro lado, como a salina não teve efeito algum sobre as respostas de galope e saltos, os efeitos dos glicocorticóides parecem ter sido devidos a uma ação genuinamente farmacológica. Estes efeitos foram, no entanto, apenas leves ou moderados. Os efeitos mais consistentes foram observados 15 min após a administração das drogas, quando ambos os glicocorticóides produziram aumentos pequenos, porém virtualmente idênticos e significantes, nos limiares de galope ($\Delta I_{50}=17$ e 18%), sem alteração dos limiares de salto. Portanto, os efeitos sobre o galope parecem ter sido devidos à estimulação do receptor tipo-II (GR) que apresenta afinidade para ambos os glicocorticóides. Os efeitos dos glicocorticóides 3 e 24 h após sua administração não apresentaram a mesma consistência. À primeira vista, os efeitos opostos da CORT sobre o galope (inibição) e salto (facilitação) poderiam ser explicados por uma ação em receptores distintos. Contudo, enquanto os limiares de galope permaneceram elevados 3 h após a administração de CORT ($\Delta I_{50}=14\%$), eles retornaram aos valores basais no grupo DEXA. Adicionalmente, embora a CORT não tenha alterado a resposta de salto aos 15 min, esta resposta foi facilitada 3 h após sua administração ($\Delta I_{50}= -15\%$). Portanto, a facilitação do salto só pode ser explicada pelo desenvolvimento de efeitos tardios, diferentes dos observados 15 min após a administração da CORT. Os efeitos do dia seguinte foram mais consistentes que aqueles da 3ª sessão de estimulação (3 h), uma vez que só ocorreram nos ratos tratados com DEXA, um glicocorticóide de ação prolongada. Nestes ratos, houve um aumento dos limiares de galope ($\Delta I_{50}=31\%$) e a redução nos limiares de salto ($\Delta I_{50}= -17\%$). Estes efeitos podem ter sido devidos à supressão central do eixo HHA. Contudo, como a CORT inibiu o galope aos 15 min, a redução

dos seus níveis plasmáticos deveria ter facilitado a resposta. Portanto, como a DEXA não facilitou o salto 15 min após sua administração, uma possível explicação seria o desenvolvimento de efeitos tardios que facilitaram o salto às expensas da resposta de galope.

Por fim, nem a CORT, nem a DEXA, alteraram os parâmetros relevantes do LCE, quais sejam, os valores percentuais do tempo dispendido e do número de entradas nos braços abertos. Estes resultados afastam efeitos tanto ansiolíticos quanto ansiogênicos dos glicocorticóides neste equipamento e contradizem os efeitos ansiogênicos de altas doses de CORT (10,0 mg/kg) no paradigma de medo condicionado (Corodimas *et al.*, 1994).

Em todo caso, os resultados da administração aguda (15 min) sugerem que a CORT tenha efeitos apenas leves ou moderados sobre o galope, micção e defecação, sendo inibitória da primeira resposta e facilitatória das demais. Estudos farmacológicos de nosso laboratório sugerem que o galope seja a resposta que melhor represente os ataques de pânico (Vargas e Schenberg, 2001; Schenberg *et al.*, 2001, 2002). Portanto, os resultados deste estudo não sugerem a facilitação dos ataques espontâneos de pânico pela ativação do eixo HHA em condições de estresse.

REFERÊNCIAS

- Bittencourt, A.S., Carobrez, A.P., Zamprogno, L.P., Tufik, S., Schenberg, L.C. (2004). Organization of single components of defensive behaviors within distinct columns of periaqueductal gray matter of the rat: role of N-metil-D-aspartic acid glutamate receptors. *Neuroscience* 125, 71-89.
- Blok, B.F., Holstege, G. (1998). The central nervous system control of micturition in cats and humans. *Behav Brain Res* 92, 119-125.
- Böhmelt, A.H., Nater, U.M., Franke, S., Hellhammer, D.H., Ehlert, U. (2005). Basal and stimulated hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in patients with functional gastrointestinal disorders and healthy controls. *Psychosom. Med.* 67(2), 288-94.
- Boyle, M.P., Kolber, B. J., Vogt, S.K., Wozniak, D.F., Muglia, L.J. (2006). Forebrain glucocorticoid receptors modulate anxiety-associated locomotor activation and adrenal responsiveness. *The Journal of Neuroscience* 26(7), 1971–1978.
- Calignano, A., Capasso, A., Persico, P., Mancuso, F., Sorrentino, L. (1992). Dexamethasone modifies morphine-, atropine-, verapamil-induced constipation in mice. *Gen Pharmacol* 23(4), 753-756.
- Collett D (2003). *Modelling Binary Data*, Chapman and Hall, London.
- Coplan, J.D., Goetz, R., Klein, D.F., Papp, L.A., Fyer, A.J., Liebowitz, M.R., Davis, S.O., Gorman, J.M. (1998). Plasma cortisol concentrations preceding lactate-induced panic: psychological, biochemical, and physiological correlates. *Arch Gen Psychiat* 55, 130-136.

- Corodimas, K. P., LeDoux, J. E., Gold, P. W., Schulkin J. (1994). Corticosterone potentiation of conditioned fear in rats. *Ann NY Acad Sci* 746, 392-393.
- De Kloet, E.R. (2003). Hormones, brain and stress. *Endocrine Regulations* 37, 51–68.
- Dinan, T.G., Quigley, E.M., Ahmed, S.M., Scully, P., O'Brien, S., O'Mahony, L., O'Mahony, S., Shanahan, F., Keeling, P.W. (2006). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysregulation in irritable bowel syndrome: plasma cytokines as a potential biomarker? *Gastroenterology* 130(2), 304-311.
- Ennis, M., Behbehani, M.M., Shipley, M.T., Van Bockstaele, E.J., Aston-Jones, G. (1991). Projections from the periaqueductal gray to the rostromedial pericoerulear region and nucleus locus coeruleus: anatomic and physiologic studies. *J Comp Neurol* 306, 480-494.
- Erdeljan, P., MacDonald, J. F., Matthews, S. G. (2001). Glucocorticoids and serotonin alter glucocorticoid receptor (GR) but not mineralocorticoid receptor (MR) mRNA levels in fetal mouse hippocampal neurons, in vitro. *Brain Research* 896, 130-136.
- Erhardt, A., Ising, M., Unschuld, P.G., Kern, N., Lucae, S., Pütz, B., Uhr, M., Binder, E.B., Holsboer, F., Keck, M.E. (2006). Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system in patients with panic disorder. *Neuropsychopharmacology* 1-8.
- Gesing, A., Bilang-Bleuel, A., Droste, S.K., Linthorst, A.C.E., Holsboer, F., Reul, J.M.H.M. (2001). Psychological stress increases hippocampal mineralocorticoid receptor levels: involvement of corticotropin-releasing hormone. *The Journal of Neuroscience* 21(13), 4822–4829.

- Herrero, A.I., Sândi, C., Venero, C. (2006). Individual differences in anxiety trait are related to spatial learning abilities and hippocampal expression of mineralocorticoid receptors. *Neurobiology of Learning and Memory* 86, 150–159.
- Hollander, E., Liebowits, M.R., Gorman, J.M., Cohen, B., Fyer, A., Klein, D.F. (1989). Cortisol and sodium lactate-induced panic, *Arch Gen Psychiat* 46, 135-
- Holsboer, F. (1999). The rationale for corticotrophin-releasing hormone receptor (CRH-R) antagonists to treat depression and anxiety. *Journal of Psychiatric Research* 33, 181-214.
- Holsboer, F. (2000). The corticosteroid receptor hypothesis of depression. *Neuropsychopharmacology* 23, 477-501.
- Holsboer, F., Barden, N. (1996). Antidepressants and hypothalamic-pituitary-adrenocortical regulation. *Endocrine Reviews* 17(2), 187-205.
- Joëls, M., Heslen, W., De Kloet, E. R. (1991). Mineralocorticoid hormones suppress serotonin-induced hyperpolarization of rat hippocampal CA1 neurons. *The Journal of Neuroscience* 11(8), 2288-2294.
- Kalman, B.A., Spencer, R.L. (2002). Rapid corticosteroid-dependent regulation of mineralocorticoid receptor protein expression in rat. *BrainEndocrinology* 143(11), 4184-4195.
- Karling, P., Norrback, K.F., Adolfsson, R., Danielsson, A. (2007). Gastrointestinal symptoms are associated with hypothalamic-pituitary-adrenal axis suppression in healthy individuals. *Scand J Gastroenterol* 14, 1-8.

- Kellner, M., Knautd, K., Jahn, H., Holsboer, F., Wiedemann, K. (1998). Atrial natriuretic hormone in lactate-induced panic attacks: mode of release and endocrine and pathophysiological consequences. *J. Psychiat Res* 32, 37-48.
- Liebowitz, M.R., Gorman, J.M., Fyer, A.J., Levitt, M., Dilon, D., Levy, G., Appleby, I.L., Anderson, S., Palij, M., Davies, S.O. (1985). Lactate provocation of panic attacks. II Biochemical and physiological findings. *Arch Gen Psychiat* 42, 709-719.
- Luppi, P.H., Aston-Jones, G., Akaoka, H., Chouvet, G., Jouviet, M. (1995). Afferent projections to the rat locus coeruleus demonstrated by retrograde and anterograde tracing with cholera-toxin B subunit and Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. *Neuroscience* 65, 119-160.
- Morat, P., Khalid, B.A., Merican, Z., Iddid, S.Z., Alias, A.K. (1987). The effect of corticosteroid pretreatment in vivo on the contraction of guinea-pig ileum and duodenum. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 14(1), 33-38.
- Nadelhaft, I., Vera, P.L., Card, J.P., Miselis, R.R. (1992). Central nervous system neurons labeled following the injection of pseudorabies virus into the rat urinary bladder. *Neurosci Lett* 143, 271-274.
- Pacak, K., Palkovits, M., Yadid, G., Kvetnansky, R., Kopin, I. J., Goldstein, D. S. (1998). Heterogeneous neurochemical responses to different stressors: a test of Selye's doctrine of nonspecificity. *Am J Physiol* 275, R1247–R1255.
- Paxinos, G., Watson, C. (1986). *The rat brain*. Second edition, Academic press, San Diego.

- Persico, P., Capasso, A., Calignano, A., Sorrentino, L. (1991). The action of dexamethasone on electrically-induced contractions of guinea-pig isolated ileum. *Gen Pharmacol* 22(2), 319-322.
- Schenberg LC, Marçal LPA, Seeberger F, Barros MR, Sudré ECM (2000). L-type calcium channels selectively control the defensive behaviors induced by electrical stimulation of dorsal periaqueductal gray and overlying collicular layers. *Behav Brain Res* 111, 175-185.
- Schenberg, L.C., Bittencourt, A.S., Sudré, E.C.M., Vargas, L.C. (2001). Modeling panic attacks. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 25, 647-659.
- Schenberg, L.C., Capucho, L.B., Vatanabe, R.O., Vargas, L.C. (2002). Acute effects of clomipramine and fluoxetine on dorsal periaqueductal grey-evoked unconditioned defensive behaviours of the rat. *Psychopharmacology* 159, 138–144.
- Schreiber, W., Lauer, C.J., Krumrey, K., Holsboer, F., Krieg, J.C. (1996). Dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system in panic disorder. *Neuropsychopharmacology* 15, 7-15.
- Selye, H. (1936). A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature* 138, 32.
- Selye, H. (1976). Forty years of stress research: principal remaining problems and misconceptions. *Can. Med. Assoc. J.* 115, 53-56.
- Silva, S.R. (2003). Neuroendocrinologia da reação de defesa induzida por estimulação da matéria cinzenta periaqueductal de ratos wistar e selvagens: uma resposta incomum de 'estresse' similar aos ataques de pânico. Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES, Brasil.

- Strohle, A., Holsboer, F. (2003). Stress responsive neurohormones in depression and anxiety. *Pharmacopsychiatry* 36, S207-S214.
- Valentino, R.J., Chen, S., Zhu, Y., Aston-Jones, G. (1996). Evidence for divergent projections to the brain noradrenergic system and the spinal parasympathetic system from Barrington's nucleus. *Brain Res* 732, 1-15.
- Valentino, R.J., Kosboth, M., Colflesh, M., Miselis, R.R. (2000). Transneuronal labeling from the rat distal colon: anatomic evidence for regulation of distal colon function by a pontine corticotrophin-releasing factor system. *J Comp Neurol* 417, 399-414.
- Vargas, L.C. (2002). Modelando os ataques de pânico: psicofarmacologia dos comportamentos defensivos inatos induzidos por estimulação elétrica da matéria cinzenta periaquedutal dorsal de ratos. Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES, Brasil.
- Vargas, L.C., Schenberg, L.C. (2001). Long-term effects of clomipramine and fluoxetine on dorsal periaqueductal gray-evoked innate defensive behaviours of the rat. *Psychopharmacology* 155, 260-268.
- Wilson, J.D., Foster, D.W., Kronenberg, H.M., Larsen, P.R. (1998). *Williams textbook of endocrinology*, W.B. Saunders Company, Philadelphia.
- Woods, S.W., Charney, D.S., McPherson, C.A., Gradman, A.H., Heninger, G.R. (1987). Situational panic attacks: behavioral, physiologic and biochemical characterization. *Arch Gen Psychiat* 44, 365-375.

CONCLUSÕES

As principais conclusões destes estudos foram:

- A administração central de glicocorticóides causou respostas generalizadas sobre os limiares das respostas de defesa.
- As respostas dos limiares de defesa do grupo salina podem ter sofrido um viés devido aos experimentos repetidos em um número pequeno de ratos.
- A diferença nos efeitos da CORT e DEXA sobre a micção e defecação parece ser atribuída à sua ação diferencial sobre os receptores tipo-I e II.
- Como a administração central de CORT facilitou a micção, e a administração periférica de DEXA inibiu, é possível que o último efeito tenha sido devido à redução dos níveis plasmáticos de CORT pela supressão periférica do eixo HHA.
- Nenhum dos glicocorticóides administrados alterou os valores percentuais do tempo dispendido e do número de entradas nos braços abertos do LCE, afastando os efeitos tanto ansiolíticos quanto ansiogênicos destes glicocorticóides.
- Os efeitos da DEXA e CORT não sugerem a facilitação dos ataques espontâneos de pânico pela ativação do eixo HHA em condições de estresse.