



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

**Efeitos do dióxido de carbono e cianeto de potássio
sobre os limiares das respostas de defesa induzidas pela
estimulação elétrica da matéria cinzenta periaqueductal
dorsal de ratos**

Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas

Fagna Giacomini Schimitel

Orientador:
Prof. Dr. Luiz Carlos Schenberg

Vitória, ES

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

Vitória, 28 de agosto de 2009

Schimitel, Fagna Giacomini

Efeitos do Dióxido de Carbono e Cianeto de Potássio sobre os Limiares das Respostas de Defesa Induzidas pela Estimulação Elétrica da Matéria Cinzenta Periaquedutal Dorsal de Ratos.

Schimitel, F.G. – Vitória, 2009.

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

Orientador: Prof. Dr. Luiz C. Schenberg

1. Transtorno do Pânico, 2. Matéria Cinzenta Periaquedutal, 3. Dióxido de Carbono, 4. Cianeto de Potássio, 5. Comportamento de Defesa, 6. Estimulação Elétrica.

**EFEITOS DO DIÓXIDO DE CARBONO E CIANETO DE POTÁSSIO
SOBRE OS LIMIARES DAS RESPOSTAS DE DEFESA INDUZIDAS
PELA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DA MATÉRIA CINZENTA
PERIAQUEDUTAL DORSAL DE RATOS**

Fagna Giacomini Schimitel

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

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Luiz Carlos Schenberg – Orientador, UFES

Prof. Dr. Frederico Guilherme Graeff, - USP - RP

Prof. Dra. Karla Nívea Sampaio, – UFES.

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

Vitória, 28 de agosto de 2009

AGRADECIMENTOS

À força maior, por guiar o meu caminho;

aos meus pais, Marlene e Jovelino, por tudo que fazem por mim;

ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz C. Schenberg, por ter me acolhido e feito tudo para que este trabalho fosse realizado da melhor maneira possível. Você será para sempre o meu exemplo de Mestre;

ao Prof. Dr. Frederico G. Graeff e à Profa. Dra. Carla N. Sampaio, por terem aceitado o nosso convite e por tornarem essa defesa mais rica em conhecimento;

ao meu amor, Bruno, pelo companheirismo, carinho, paciência e por todo amor;

aos meus sobrinhos e afilhados, Guilherme, Lucca, Clara e Mateus, por fazerem de mim uma tia muito feliz;

aos meus irmãos e cunhados, Fabio e Fabiane, Kenya e Carlyson, pelo prazer de viver em família;

à Ana Neide, por ter me ensinado a rotina do laboratório com muita paciência;

à Débora e Gabriela, por terem me ajudado na realização dos experimentos;

às companheiras de laboratório, pelas trocas de experiência e conselhos;

às minhas amigas: Luciana, Miriam, Lorena, Renata e Helena; por tantas alegrias em tão pouco tempo;

ao meu amigo Patrick; por me incentivar desde o início;

ao Professor Nian, pela colaboração nos cortes histológicos ...

... agradeço a todos vocês por terem acreditado em mim, até mesmo nos momentos em que eu mesma duvidava.

Muito obrigada!!!

“Nós, cientistas, acreditamos que o que nós e nossos semelhantes fizermos ou deixarmos de fazer nos próximos anos determinará o destino de nossa civilização. E consideramos nossa tarefa explicar incansavelmente essa verdade, ajudar as pessoas a perceber tudo o que está em jogo, e trabalhar, não para contemporizar, mas para aumentar o entendimento e conseguir, finalmente, a harmonia entre os povos e nações de diferentes pontos de vista”.

Albert Einstein

ABREVIATURAS

Ca²⁺ - cálcio

CCK – colecistocinina

CEUA – comitê de ética no uso de animais

CO₂ – dióxido de carbono

DE₅₀ – dose efetiva 50

DEF – defecação

DSM – Manual Diagnóstico e Estatístico de Desordens Mentais

EP – erro padrão

E.V. – endovenoso

EXO – exoftalmia

GABA – ácido gama aminobutírico

GLP – galope

H⁺ - ácido

HDM – núcleo dorsomedial do hipotálamo

5HT - serotonina

I₅₀ – intensidade 50

IC – intervalo de confiança

I.M. – intramuscular

IMO – imobilidade

I.P. – intraperitoneal

K⁺ - potássio

KCN – cianeto de potássio

LC – lócus cerúleo

M₅₀ – mediana

MCPA – matéria cinzenta periaquedutal

MCPAd – matéria cinzenta periaquedutal dorsal

MCPAdl – matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral

MCPAl – matéria cinzenta periaquedutal lateral

MCPAvl – matéria cinzenta periaquedutal ventrolateral

Mg²⁺ - magnésio

MIC – micção

MRI – imagem por ressonância magnética

N₂ – nitrogênio

NaCl – cloreto de sódio

NDR – núcleo dorsal da rafe

NMDA – ácido N-metil D-aspártico

NTS – núcleo do trato solitário

O₂ – oxigênio

PCO₂ – pressão parcial de dióxido de carbono no sangue

PO₂ – pressão parcial de oxigênio no sangue

PET – tomografia por emissão positrônica

SLT – salto

TAG – transtorno de ansiedade generalizada

pH – potencial hidrogeniônico

TASK – Tandem acid sensitive potassium channel

TP – transtorno do pânico

TRT – trote

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	vi
RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	4
REVISÃO: ATAQUES DE PÂNICO E ALARME DE SUFOCAMENTO.....	7
1 Transtorno do Pânico.....	8
1.1 <i>Modelo Teórico de Deakin & Graeff</i>	12
1.2 <i>Teoria do Alarme Falso de Sufocamento</i>	15
2 Respiração e Pânico.....	18
3 Resolvendo o Quebra-Cabeça.....	35
4 Referências.....	37
RESULTADOS EXPERIMENTAIS.....	53
1 Objetivo Geral.....	54
2 Objetivos Específicos.....	54
3 Introdução.....	56
4 Materiais e Métodos.....	60
4.1 <i>Animais</i>	61
4.2 <i>Eletrodo</i>	61
4.3 <i>Implantação dos Eletrodos</i>	62
4.4 <i>Canulação da Veia Jugular</i>	63
4.5 <i>Calibração da Concentração de Dióxido de Carbono na Câmara Gasosa</i>	64
4.6 <i>Protocolo Experimental</i>	64
4.6.1 <i>Experimento 1: Efeitos do CO₂ sobre os limiares dos comportamentos de defesa induzidos por estimulação elétrica da MCPAd</i>	64

4.6.2	<i>Experimento 2: Efeitos comportamentais da administração endovenosa de KCN.....</i>	65
4.6.3	<i>Experimento 3: Efeitos do KCN sobre os limiares dos comportamentos de defesa induzidos por estimulação elétrica e lesão eletrolítica da MCPAd.....</i>	65
4.7	Registros Comportamentais.....	66
4.8	Histologia.....	68
4.9	Estatística.....	69
4.9.1	<i>Determinação das curvas de resposta à estimulação elétrica e ao KCN.....</i>	69
4.9.2	<i>Análise dos efeitos da lesão da MCPAd sobre as respostas ao KCN.....</i>	71
5	RESULTADOS.....	72
5.1	Calibração da Câmara Gasosa.....	73
5.2	Efeitos Comportamentais do CO ₂	74
5.3	Efeitos Comportamentais do KCN.....	74
5.4	Efeitos do CO ₂ sobre os Limiares dos Comportamentos de Defesa Induzidos por Estimulação Elétrica da MCPAd.....	76
5.5	Efeitos do KCN sobre os Limiares dos Comportamentos de Defesa Induzidos por Estimulação Elétrica da MCPAd.....	78
5.6	Hierarquia das Respostas de Defesa ao KCN e Estimulação Elétrica na Presença ou Ausência do CO ₂	80
5.7	Efeitos da Lesão Eletrolítica da MCPAd sobre as Respostas Eliciadas pela Injeção Endovenosa de KCN.....	82
6	DISCUSSÃO.....	83
7	REFERÊNCIAS.....	92
8	ANEXOS.....	98

ÍNDICE DE FIGURAS

1	Curso temporal da concentração de CO ₂ infundido por 15 e 30 s, com ou sem o acionamento do sistema de exaustão.....	73
2	Curvas dose-resposta à injeção endovenosa de KCN.....	75
3	Medianas das respostas de defesa (\pm I.C. 95%) produzidas pela injeção endovenosa de KCN.....	76
4	Efeitos do CO ₂ sobre os limiares das respostas de defesa induzidas por estimulação elétrica da MCPAd.....	77
5	Efeitos da injeção de KCN (20 μ g/ 0,1 ml) sobre os limiares das respostas de defesa induzidas por estimulação elétrica da MCPA.....	79
6	Hierarquia das respostas de defesa em sessão controle, KCN, KCN com estímulo elétrico.	81
7	Efeitos comportamentais do KCN (80 μ g/0,1 ml, E.V.) em ratos intactos e ratos com lesão eletrolítica da MCPAd.	82
8	Rato na câmara gasosa para estimulação elétrica na presença de CO ₂ ..	99
9	Rato na arena para estimulação elétrica com infusão de KCN.....	100
10	Rato com cânula e cabo de estimulação.....	101
11	Disposição das gaiolas para acomodação dos ratos no biotério.....	102

ÍNDICE DE TABELAS

1	Comparação das curvas de probabilidade de resposta ao KCN.....	75
2	Efeitos das concentrações de 8% e 13% de CO ₂ sobre os limiares das respostas de defesa induzidas por estimulação da MCPAd.....	78

RESUMO

Os ataques de pânico são precipitados pela infusão de lactato de sódio (0,5 M, E.V.) ou inalação de dióxido de carbono (CO₂ 5%) em pacientes com transtorno de pânico. Contudo, estes agentes são inócuos em indivíduos sadios. Com base nestas e outras evidências, sugeriu-se que os ataques de pânico sejam devidos a um alarme falso de sufocamento. Por outro lado, os comportamentos de defesa produzidos pela estimulação da matéria cinzenta periaquedutal dorsal (MCPAd) têm sido propostos como modelos de ataque de pânico. Observações casuais também mostraram que doses subletais de cianeto de potássio (KCN) produzem respostas similares às respostas de fuga do rato. Portanto, este estudo verificou os efeitos comportamentais do CO₂ e KCN, tanto isoladamente quanto combinados à estimulação ou lesão da MCPAd. Primeiramente, realizou-se a análise dos efeitos comportamentais do estímulo elétrico (0-60 μ A), CO₂ (0-13%) e KCN (10-80 μ g, E.V.), isoladamente. Em seguida, as respostas de defesa à estimulação elétrica da MCPAd foram avaliadas na presença de CO₂ (8% ou 13%) ou durante a infusão de KCN (20 μ g, 30 s, E.V.). Os efeitos do CO₂ e KCN foram comparados aos controles estimulados em atmosfera normal ou injetados com salina (E.V.). No dia seguinte ao teste com KCN ou salina, a MCPAd foi lesionada por corrente anódica e, 24 h após, os ratos foram injetados com uma dose elevada, porém, subletal, de KCN (80 μ g). Curvas intensidade e dose-efeito foram avaliadas por análise logística de limiares e testes do χ^2 da razão de verossimilhanças. Os efeitos do KCN antes e após a lesão da MCPAd foram analisados pelo χ^2 de Pearson. A exposição isolada ao CO₂ produziu somente uma imobilidade hiporreativa. Em contraste, o KCN produziu todas as respostas

de defesa. Por outro lado, enquanto o CO₂ aumentou os limiares de exoftalmia, imobilidade, trote e galope induzidos pela estimulação da MCPAd, o KCN facilitou o trote e o galope. A lesão da MCPAd aboliu as respostas ao KCN de imobilidade, galope e salto e causou a atenuação acentuada do trote, exoftalmia e defecação. Estes resultados apóiam o envolvimento da MCPAd em um mecanismo de alarme de sufocamento.

Palavras-chave: Transtorno do pânico, Matéria Cinzenta Periaquedutal, Dióxido de Carbono, Cianeto de Potássio, Comportamento de Defesa, Estimulação Elétrica.

ABSTRACT

Panic attacks are precipitated by either the infusion of sodium lactate (0.5 M, I.V.) or the inalação inhalation of carbon dioxide (CO₂ 5%) by patients with panic disorder, but not healthy volunteers or patients with psychiatric disorders other than panic. Accordingly, it was suggested that panic attacks are the misfiring of a suffocation alarm system. On the other hand, the defensive behaviors produced by electrical stimulation of the dorsal half of the periaqueductal gray matter (DPAG) have been proposed as a model of panic attacks. Anecdotal observations also showed that intravenous injections of sublethal doses of potassium cyanide (KCN) produce behaviors akin to the defensive behaviors of the rat. Therefore, the present study examined first the behavioral effects of electrical stimulation of DPAG (0-60 μ A), CO₂ (0-13%) and KCN (10-80 μ g, I.V.). DPAG-evoked defensive behaviors were then evaluated in the presence of 8% or 13%CO₂ or during the infusion of a low dose of KCN (20 μ g, 30 s, I.V.). CO₂ and KCN effects were compared to controls in room air or infused with saline (I.V.). The day after the KCN and saline sessions, the DPAG was subjected to an electrolytic lesion and, 24 h after that, the rats were injected with a high but sublethal dose of KCN (80 μ g). Intensity- and dose-response curves were evaluated by logistic threshold analysis and likelihood ratio χ^2 tests. KCN effects before and after lesions of DPAG were assessed by Pearson's χ^2 . The exposure to CO₂ produced only an state of hyporeactive immobility. In contrast, KCN produced all defesive responses of the rat. On the other hand, while the CO₂ increased the thresholds of DPAG-evoked exophthalmus, immobility, trotting and galloping, KCN produced a significant reduction in the thresholds of trotting and galloping. DPAG lesions abolished KCN-

evoked responses of immobility, galloping and jumping and produced a marked attenuation of do trotting, exophthalmus and defecation. These results support the involvement of DPAG in a suffocation alarm system.

Keywords: Panic Disorder, Periaqueductal Gray Matter, Carbone Dioxide, Potassium Cyanide, Defesive Behaviors, Electrical Stimulation.

REVISÃO

ATAQUES DE PÂNICO E ALARME DE SUFOCAMENTO

1. TRANSTORNO DO PÂNICO

Os fundamentos da nosologia contemporânea dos transtornos de ansiedade podem ser encontrados na classificação original das 'neuroses de ansiedade' (*Angstneurose*) de Sigmund Freud. Ele distinguiu estes transtornos da depressão maior e de uma ampla variedade de condições mal definidas denominadas à época de 'neuroastenias'. De fato, em escritos tão precoces quanto os *'Estudos Seleccionados sobre a Histeria'* (1895), Freud já distinguia duas síndromes fundamentais, quais sejam, a 'expectativa ansiosa' (*Angstliche*), que ele considerava a forma predominante do transtorno de ansiedade, e uma síndrome menos freqüente, porém igualmente importante, que ele denominou 'ataque de ansiedade' (*Angstanfall*). De acordo com sua descrição, a expectativa ansiosa era *'um quantum de ansiedade livre e flutuante que controlava a escolha das idéias por antecipação'*. Em contraste, no ataque de ansiedade esta *'irrompia repentinamente na consciência sem ter sido eliciada por qualquer idéia'*. Freud ressaltou que estes ataques podiam manifestar-se tanto como *'um sentimento puro de ansiedade'* quanto pela combinação da ansiedade com *'a interpretação mais próxima do término da vida, tal como a idéia de morte súbita ou da perda da razão'*, ou combinada a *'alguma parestesia . [ou]... distúrbio de uma ou mais funções somáticas, tais como a respiração, atividade cardíaca, inervação vasomotora e atividade glandular'*. Freud distinguiu estes ataques das fobias, do

transtorno obsessivo-compulsivo (*'neurose obsessiva'*) e do transtorno de estresse pós-traumático (*'neurose comum'*), entre outras condições. A *'expectativa ansiosa'* e o *'ataque de ansiedade'* são praticamente idênticos aos diagnósticos contemporâneos do transtorno de ansiedade generalizada (TAG) e transtorno do pânico (TP), respectivamente (APA, 1994).

Presumivelmente, a herança clínica de Freud foi, em grande medida, esquecida após o divórcio profundo entre psicanálise e medicina. Assim, enquanto os transtornos de ansiedade continuaram a ser diagnosticados como neuroastenias até meados do século passado, o TP recebeu uma variedade enorme de nomes, incluindo neurose de ansiedade, reação de ansiedade, neuroastenia, astenia neurocirculatória, neurose vasomotora, taquicardia nervosa, síndrome de esforço, síndrome de Da Costa, coração de soldado e coração irritável, entre outros (Pitts e McClure, 1967). Este cenário começou a alterar-se após a publicação do estudo influente de Donald Klein (1964) mostrando que o TAG e o TP respondiam a classes diferentes de drogas. Klein mostrou que enquanto a *'expectativa ansiosa'* era tratada por ansiolíticos (barbitúricos, meprobamato e clordiazepóxido) e doses baixas de sedativos (fenotiazinas), os ataques de pânico eram tratados pela administração crônica do antidepressivo tricíclico imipramina.

Ao redor da mesma época, Pitts e McClure (1967) demonstraram que os ataques de pânico tinham *'marcadores fisiológicos'*, uma vez que eles podiam ser precipitados pela infusão endovenosa de lactato de sódio em pacientes predispostos aos ataques espontâneos de pânico, mas não em voluntários normais. Na realidade, Cohen e White (1951) já haviam mostrado que

os ataques de pânico podiam ser precipitados por hiperventilação a 5% de dióxido de carbono (CO₂), mas não no exercício ou na ventilação ambiente (Klein, 1993b). Posteriormente, mostrou-se que a ioimbina, um antagonista alfa-2 adrenérgico, também induz pânico em mais de dois terços dos pacientes de TP, principalmente após administração endovenosa (Charney et al., 1984). Contudo, a infusão de ioimbina também provocou o aumento da ansiedade em pessoas normais, tal como ocorre com a cafeína, colecistocinina (CCK) e inúmeras drogas com ação panicogênica (Klein, 1993b).

Os ataques de pânico são episódios agudos de medo, ou sensação similar, que ocorrem de forma recorrente e na ausência de qualquer ameaça identificável. Eles caracterizam-se por uma experiência súbita de intenso estresse, pensamentos catastróficos e ansiedade severa, que se desenvolvem rapidamente, atingindo um pico em aproximadamente 10 min. Os principais sintomas dos ataques de pânico na clínica são taquicardia (Freedman et al., 1985; Stein et al., 1992; Reclin et al., 1994), alterações cardíacas e respiratórias (Goetz et al., 1994), dificuldade em respirar, sensação de sufocamento, dor no tórax, suor, vertigem, tremores, desejo de fuga e sensação de morte iminente. Em alguns relatos inclui-se o receio de não poder controlar os esfíncteres vesical e anal (Cassano e Savino, 1993; Goetz et al, 1994). A descrição clínica de Freud para o “ataque de ansiedade” já incluía 10 dos 13 sintomas necessários para o diagnóstico do TP quando este foi introduzido Manual de Diagnóstico e Estatística de Desordens Mentais (DSM-III-R) (Frances et al, 1993).

A partir desses e de outros fatos, duas teorias foram propostas para esclarecer as bases neurais do TP: A primeira delas, proposta por Deakin & Graeff

(1991), baseia-se na prescrição dos inibidores de recaptção da serotonina (5HT) para uma ampla gama de transtornos psiquiátricos, incluindo o TAG e o TP, mas também, o transtorno obsessivo compulsivo e a depressão. Brevemente, a teoria propõe que a 5HT facilita a ansiedade por uma ação na amígdala, mas inibe os ataques de pânico por uma ação na matéria cinzenta periaquedutal (MCPA). Adicionalmente, propõe que a depressão ocorre pela subregulação de receptores 5HT_{1A} do hipocampo, produzindo uma disfunção no 'sistema de resiliência' que tem por função separar as tarefas do dia-a-dia dos eventos aversivos. Segundo a teoria de Deakin & Graeff (1991), a MCPA seria um centro de coordenação de reflexos defensivos a predadores ou outros estímulos nocivos, como dor ou anóxia. Esta teoria sugere que os ataques de pânico são estados similares ao medo a uma ameaça proximal, tal como a reação da presa face ao predador. A teoria também sugere a evolução do sistema serotonérgico como um sistema especializado no controle de situações aversivas. A segunda teoria, proposta por Klein (1993a, b), baseia-se nas características clínicas dos ataques de pânico e na sensibilidade exagerada dos pacientes de pânico ao CO₂ e lactato. A teoria postula que os ataques de pânico seriam devidos ao disparo inadequado de um sistema de alarme de sufocamento, produzindo os ataques espontâneos em ambiente, ou ataques induzidos por infusão de lactato ou concentrações moderadas de CO₂. Devido à alta comorbidade dos ataques de pânico com ansiedade de separação, Klein e Preter (2007) propuseram recentemente que o elo comum entre asfixia e relações parentais reside nos mecanismos opióides endógenos. Contudo, Shekhar e colaboradores (1996) apresentaram evidências que o núcleo dorsomedial do hipotálamo (HDM) seja o responsável pelo

desencadeamento dos ataques de pânico ao lactato. Eles sugeriram que a disfunção crônica da neurotransmissão GABAérgica do HDM é responsável pelo TP, uma vez que simula parte de seus aspectos comportamentais, cardiovasculares e respiratórios. É importante notar, no entanto, que os comportamentos analisados por Shekhar são modelos mais adequados do TAG que do TP.

1.1. Modelo Teórico de Deakin & Graeff

O Modelo de Deakin & Graeff correlaciona de um lado, a defesa potencial ou distal, amígdala e ansiedade antecipatória ou generalizada, e de outro lado, defesa proximal, matéria cinzenta periaquedutal dorsal (MCPAd) e pânico. Este modelo propõe que a 5HT desempenhe um papel duplo, favorecendo os circuitos da ansiedade na amígdala, mas inibindo os circuitos do pânico na MCPAd (Deakin e Graeff, 1991).

Os resultados obtidos com testes de conflito em animais de laboratório indicaram que a 5HT aumenta a ansiedade, enquanto que na estimulação aversiva da matéria cinzenta periaquedutal (MCPA), a 5HT parece ter um papel ansiolítico. Para resolver esta contradição, sugeriu-se que os estados emocionais determinados pelos dois paradigmas são diferentes (Graeff, 2004). Portanto, Deakin e Graeff (1991) propuseram que a 5HT atue por três vias diferentes no TP, no TAG e na depressão. A primeira via é do núcleo dorsal rafe (NDR) periventricular projetando-se para o hipotálamo medial e MCPA. Nestas estruturas centrais do sistema de defesa cerebral, a 5HT inibiria os comportamentos de luta ou fuga eliciados por estímulos incondicionais agudos

como dor, asfixia ou ameaça proximal. Estas reações defensivas podem ser relacionadas ao TP. A segunda via segue do NDR para a amígdala e para o córtex pré-frontal. Os autores sugerem que esta via facilite a ansiedade antecipatória determinada por estímulos agudos que prevêem alguma consequência nociva ou aversiva. Este tipo de ansiedade estaria relacionado ao TAG. A terceira via origina-se no núcleo mediano da rafe e afeta principalmente o hipocampo. Nesta estrutura, a 5HT realçaria os processos neurais que permitem ao animal adaptar-se (resiliência) a uma situação ou estímulos estressantes crônicos. A falha deste processo de resiliência resultaria em depressão.

Alternativamente, Shekhar e colaboradores (1996) propuseram que a disfunção crônica da neurotransmissão inibitória do HDM seja a anormalidade responsável pelo desencadeamento dos ataques de pânico. De fato, além da taquicardia, taquipnéia e hipertensão, a ativação do HDM por microinjeção de ácido caínico ou bicuculina promove aumentos na atividade locomotora que se assemelham à resposta de fuga (Bailey e DiMicco, 2001; Shekhar et al., 2002; Zaretskaia et al., 2002; de Menezes et al., 2006). O aumento da locomoção é, no entanto, modesto e inconsistente (de Menezes et al., 2006), havendo inclusive, relatos negativos após a microinjeção de bicuculina no HDM (Shekhar e DiMicco, 1987). Contudo, Alves (2007) demonstrou que as respostas de fuga somente são eliciadas por estimulação da divisão compacta do HDM. Por outro lado, as respostas cardiovasculares e respiratórias eliciadas pela bicuculina foram bloqueadas por lesão dos terminais catecolaminérgicos do HDM ou pelo tratamento prévio com os panicolíticos imipramina e clonazepam (Shekhar, 1994). Adicionalmente, tanto o susto potencializado pelo medo (Shekhar et al., 1994)

quanto o bloqueio dos receptores GABA-A do HDM (Shekhar et al., 2002) promovem o aumento significativo dos níveis extracelulares de norepinefrina desta região, sugerindo que a liberação aumentada de norepinefrina possa ser um indutor importante da resposta de pânico (Shekhar, 1994; Shekhar e Katner, 1995; Shekhar et al., 2002).

Presumivelmente, a inconsistência das respostas comportamentais à estimulação química do HDM levou Shekhar e colaboradores a utilizar bombas osmóticas para induzir uma disfunção GABAérgica do HDM mediante a microinfusão crônica de alilglicina, um inibidor da síntese do ácido gama-aminobutírico (GABA) (Shekhar et al., 1996, 2006; Shekhar e Keim, 1997, 2000; Johnson e Shekhar, 2006). Segundo estes autores, os ratos assim tratados apresentaram respostas semelhantes ao pânico quando foram infundidos, por via endovenosa, com uma solução de lactato de sódio (0,5 M; 10 ml/kg) similar àquela que precipita ataques de pânico em pacientes. Contudo, além das respostas autonômicas, estes autores somente quantificaram os efeitos do lactato no teste da interação social, usualmente, um modelo de TAG. Estas respostas foram bloqueadas por microinjeções de antagonistas de receptores do ácido N-metil D-aspártico (NMDA) no HDM (Johnson e Shekhar, 2006), ou de tetrodotoxina, um bloqueador de canais de sódio, no órgão vasculoso da lâmina terminal (Shekhar e Keim, 1997). Ao contrário, a administração de tetrodotoxina no órgão subfornicial não teve efeito algum sobre as respostas cardiovasculares induzidas pela injeção endovenosa de lactato. Por fim, a microinjeção de lactato no órgão vasculoso da lâmina terminal dos ratos tratados com alilglicina eliciu respostas cardiovasculares e atividade locomotora de forma mais robusta que no órgão

subfornicial. Conseqüentemente, Shekhar e Keim (1997) propuseram que as projeções do órgão vasculoso da lâmina terminal ao HDM constituem o sistema de detecção do lactato no cérebro. Estudos mais recentes do mesmo grupo implicam os receptores de angiotensina II do HDM na patofisiologia do TP, uma vez que a injeção local de angiotensina II em ratos propensos ao pânico resultou em aumentos dose-dependentes da pressão arterial, frequência cardíaca e respiratória, de forma similar às respostas à infusão de lactato. Estes efeitos foram antagonizados pela microinjeção prévia de saralasin, um antagonista de receptores de angiotensina II, no HDM (Shekhar et al., 2006). Em todo evento, estudos ainda mais recentes destes autores mostraram que as respostas induzidas por lactato em ratos propensos ao pânico dependem da integridade funcional da MCPA (Da Silva et al., 2003, 2006; Villela et al., 2009).

1.2 Teoria do Alarme Falso de Sufocamento

Em uma revisão abrangente, Klein (1993b) examinou inúmeras condições que facilitam ou inibem os ataques de pânico, desde o CO₂ e lactato a doenças raras como a 'maldição de Ondine' (hipoventilação congênita), na qual os indivíduos são incapazes de detectar o aumento da PCO₂ durante o sono. Klein (1993b) examinou o transtorno do pânico quanto à sintomatologia e estímulos desencadeadores, hiperventilação dos pacientes, assim como na histeria de massa, no pânico durante o relaxamento e sono, no transtorno pré-menstrual, gravidez, parto, doença pulmonar, ansiedade de separação e farmacoterapia. Klein (1993a, b) sugeriu a existência de um sistema de alarme de sufocamento e que a hipersensibilidade ao CO₂ apresentada pelos pacientes de pânico seria

devida a uma interpretação fisiológica incorreta deste sistema, o qual dispararia de forma não-adaptativa, produzindo um alarme falso de sufocamento.

Esta possibilidade passou a ser aventada após a demonstração de Pitts e McClure (1967) e de outros autores que os ataques de pânico podem ser precipitados pela infusão endovenosa de lactato de sódio em pacientes que apresentam ataques de pânico espontâneos, mas não em pessoas normais. A injeção de lactato produz alcalose metabólica periférica acompanhada por hipercapnia cerebral e acidose respiratória. A fisiologia ensina que temos de respirar menos na vigência de alcalose metabólica, numa tentativa de reduzir o pH pela retenção de CO₂. Contudo, observa-se hiperventilação na infusão de lactato, tanto em pacientes de pânico quanto em indivíduos sadios. Embora o lactato não atravesse a barreira hemato-encefálica, o CO₂, seu metabólito final, atravessa. Esta possibilidade é consistente com a observação de que a infusão de lactato promove o aumento no fluxo cerebral (Reiman et al., 1989), um achado notável em vista das poucas substâncias que têm este efeito além do CO₂ (Klein, 1993a). Portanto, postulou-se inicialmente que o lactato produzia um estado de hipercapnia central que desencadeava o ataque de pânico. Contudo, demonstrou-se posteriormente que o d-lactato, um isômero que não é metabolizado em mamíferos, também produz ataques de pânico. Para explicar este fenômeno, Klein (1993a,b) sugeriu que o sistema de alarme de sufocamento não diferencia os isômeros pois jamais foi exposto ao d-lactato no curso da evolução. Klein (1993,a,b) propôs, portanto, que o sistema de alarme de sufocamento pode ser deflagrado tanto pelo CO₂ quanto pelo lactato, diretamente. Corroborando esta hipótese, Johnson e colaboradores (2008) mostraram que o lactato atravessa as

áreas pérvias da barreira hematoencefálica localizadas nas regiões periventriculares (organum vasculosum lamina terminalis, órgão subfornicial, área póstrema). Adicionalmente, o lactato de sódio racêmico é um indutor mais potente de pânico que o CO₂ ou o bicarbonato de sódio (metabólito intermediário do lactato). É possível que esta diferença de potência seja devida ao fato do lactato racêmico induzir pânico por dois mecanismos, quais sejam, conversão do lactato a CO₂ e efeito farmacológico direto de estimulante da respiração (Klein, 1993a).

Dispnéia, respiração rápida e hiperventilação são as manifestações respiratórias relatadas com maior frequência por pacientes com TP. Portanto, Klein (1993a) propôs que o ataque de pânico é constituído de três etapas: a primeira é o disparo do sistema de alarme de sufocamento, provocando a sensação de falta de ar e aumento do volume corrente, como se houvesse havido um aumento da PCO₂. Se o sistema continua recebendo sinais de asfixia, ocorre a segunda etapa, desencadeando as respostas comportamentais de um ataque de pânico. Por fim; a terceira etapa consiste num aumento na frequência respiratória que persiste mesmo após o término dos eventos comportamentais do ataque de pânico (Klein, 1993a).

Alguns estudos apresentaram evidências da hipersensibilidade fisiológica dos pacientes de pânico ao CO₂ (Gorman et al., 1988; Fishman, 1994; Pain et al., 1988). Assim, comparados aos controles sadios e aos pacientes que não responderam ao CO₂, pacientes que tiveram ataques de pânico induzidos por CO₂ apresentaram aumentos maiores do volume corrente respiratório durante a inalação do gás antes do ataque de pânico (Gorman et al., 1988). Embora estes resultados não tenham sido corroborados por outros pesquisadores (Woods et al.,

1986; Roth et al., 1992), estudos posteriores mostraram que pacientes tratados com panicolíticos, tanto serotoninérgicos como noradrenérgicos, são menos sensíveis ao CO₂ que os pacientes não-tratados (Gorman et al., 1997).

2 RESPIRAÇÃO E PÂNICO

O ritmo básico da respiração é gerado no complexo pré-Bötzinger do bulbo sendo subseqüentemente formatado, modificado e transmitido aos neurônios pré-motores bulbo-espinhais, os quais transmitem o padrão respiratório resultante aos neurônios motores espinhais que controlam os músculos respiratórios (Feldman et al., 2003; Feldman e Del Negro, 2006). A rede respiratória do tronco cerebral continuamente recebe informação quimioaférente sobre os níveis arteriais de PO₂, PCO₂ e pH e ajusta a saída motora respiratória, assegurando a ventilação apropriada dos pulmões em várias condições ambientais e fisiológicas.

As informações quimioaférentes em mamíferos originam-se primariamente dos quimiorreceptores localizados nos corpos carotídeos e no tronco cerebral (Nattie, 1999; Feldman et al., 2003; Lahiri et al., 2006; Kumar, 2007). As células do tipo 1 do corpo carotídeo são os principais elementos de quimiossensibilidade periférica. Estas células detectam alterações nos níveis arteriais de PO₂, PCO₂ e pH que são transmitidas ao nervo sinusal carotídeo e aos centros respiratórios do tronco cerebral, evocando mudanças adaptativas na ventilação. Por sua vez, os quimiorreceptores do tronco cerebral estão localizados, principalmente, na superfície ventral bulbar ou em suas proximidades, e monitoram alterações de PCO₂ e pH (Loeschcke, 1982; Mulkey et al., 2004).

Contudo, também foram identificadas regiões quimiossensíveis em outros distritos do tronco cerebral (Nattie, 1999; Putman et al., 2004).

Os canais de K^+ do tipo TASK (*tandem acid sensitive potassium channels*) têm sido propostos como mediadores importantes de vários aspectos do controle quimiossensível periférico da respiração. Os canais TASK-1 e TASK-3 podem formar canais homodiméricos ou heterodiméricos (Czirják e Enyedi, 2002; Berg et al., 2004). As correntes TASK são inibidas por pH ácido e hipóxia e ativadas em pH alcalino (Duprat et al., 1997; Kim et al., 2000; Rajan et al., 2000; Lewis et al., 2001; Buckler et al., 2000, 2007). Os homodímeros TASK-1 operam em pH próximo a 7,4, respondendo a variações de 0,5 unidade (Duprat et al., 1997). Por sua vez, o canal TASK-3 é inibido por condições mais ácidas (Rajan et al., 2000). Notavelmente, os genes TASK são expressos em todas as regiões centrais quimiossensíveis ao CO_2 , incluindo áreas do bulbo ventrolateral, núcleos da rafe e lócus cerúleo (Talley et al., 2001; Bayliss et al., 2001; Washburn et al., 2002, 2003). Pela falta de inibidores específicos para estes canais, ainda não se sabe como os canais TASK-1 e TASK-3 contribuem com a função do corpo carotídeo e o controle da ventilação. Porém, Trapp e colaboradores (2008), utilizando camundongos com “knock-out” destes canais, sugeriram que os canais TASK-1 não contribuem para a quimiossensibilidade respiratória central, mas parecem ser essenciais para a sensibilidade periférica, tanto de CO_2/pH quanto O_2 .

Apesar dos quimiorreceptores periféricos e centrais monitorarem os gases do sangue/cérebro continuamente, os ataques de pânico ocorrem apenas esporadicamente e são extremamente raros em pessoas saudáveis. Por outro

lado, como os ataques de pânico ocorrem em ar ambiente, a hipótese do alarme falso de sufocamento (Klein, 1993a, b; Preter e Klein, 2007) presume a relativa independência dos quimiorreceptores, periféricos ou centrais, e o sistema de alarme de sufocamento. A dissociação destes mecanismos nos pacientes de pânico pode explicar a ocorrência de ataques de pânico em ar ambiente ou em níveis apenas moderados de hipercapnia (5% ou 7% de CO₂) que são inócuos em indivíduos saudáveis. A hipótese de Klein ainda prevê que os efetores dos ataques de pânico, ou seja, as respostas do sistema de alarme de sufocamento, sejam ativadas pelos níveis de hipóxia e hipercapnia que produzem manifestações características da sensação de falta de ar ou “fome por ar” em indivíduos normais ou pacientes de pânico. Na verdade, enquanto Moosavi e colaboradores (2003) apresentaram evidências que a hipercapnia e a hipóxia têm potência equivalente de produzir “fome por ar” em indivíduos normais com atividade ventilatória similar, Beck e colaboradores (1999, 2000) mostraram que pacientes de pânico respondem com aumento dos sintomas tanto para hipercapnia quanto hipóxia normocápnica. Estes dados apoiam a presença de um sistema de alarme de sufocamento único dotado de capacidade para integrar os principais sinais respiratórios (H⁺/CO₂, O₂) e, possivelmente, os níveis cerebrais de lactato de sódio assim como de gases tóxicos. Inversamente, estudos conduzidos em sujeitos tanto curarizados quanto quadriplégicos sugeriram que as aferências mecanorreceptoras desempenham uma função menor na produção da “fome por ar” (Banzett et al., 1989; Gandevia et al., 1993). Contudo, tem sido extremamente difícil separar o sistema de alarme de sufocamento dos centros respiratórios que controlam a eupnéia.

A respiração está sob o controle de uma rede disseminada envolvendo estruturas desde o bulbo caudal até aquelas do hipotálamo, sistema límbico e córtex. Enquanto as últimas estruturas estão mais provavelmente envolvidas em aspectos voluntários, emocionais e termorreguladores da respiração, as informações primárias dos quimiorreceptores alcançam o bulbo via aferentes do glossofaríngeo que terminam nas regiões comissural e caudal do núcleo do trato solitário (NTS) (Finley e Katz, 1992; Chitravanshi e Sapru, 1995). Dentre vários alvos (Ricardo e Koh, 1978), o NTS envia projeções que ativam neurônios pré-motores do grupo respiratório ventral do bulbo, aumentando a atividade do nervo frênico (Chitravanshi et al., 1994). Entretanto, o controle respiratório depende também de neurônios colinérgicos quimiossensíveis da superfície ventral do bulbo que monitoram o pH e os níveis de CO₂ do fluido cerebroespinal (Pappenheimer et al., 1965; Schlaefke, 1981; Loeschcke, 1982).

Todavia, sensações de falta de ar e “fome por ar” são, mais provavelmente, processadas por estruturas supra-bulbares, as quais são ativadas por hipóxia e hipercapnia. Conseqüentemente, tem sido sugerido que a fome por ar advém de descargas corolárias dos núcleos respiratórios bulbares conduzidas para as estruturas supra-pontinas (Moosavi et al., 2004). Este modelo prediz que o desenvolvimento da sensação de falta de ar e da “fome por ar” seria paralelo à atividade central respiratória tanto para hipóxia quanto para hipercapnia. Como a resposta respiratória à hipóxia sustentada causa um aumento ventilatório agudo seguido por um lento declínio da ventilação durante um pouco mais de 5 min, a hipótese da descarga corolária foi testada comparando o curso temporal da “fome por ar” durante hipóxia isocapnica sustentada em indivíduos saudáveis ventilados

mecanicamente ao curso temporal da resposta ventilatória dos mesmos indivíduos em testes com respiração livre (Moosavi et al., 2004). Os dados mostraram que durante a hipóxia sustentada de indivíduos ventilados mecanicamente, o aumento inicial na “fome por ar” é seguido por um declínio progressivo refletindo o modelo bifásico da resposta respiratória reflexa. O desencontro da atividade respiratória bulbar e do processamento (corolário) prosencefálico poderia, portanto, ser a causa do disparo falso do sistema de alarme de sufocamento (Klein, 1993a,b; Preter e Klein, 2007). Entretanto, como isso acontece? Dentre várias possibilidades, a dissociação destes sistemas poderia ser devida ao mau funcionamento dos núcleos supra-bulbares, os quais participam ou modulam o sistema de alarme de sufocamento. De fato, experimentos realizados tanto em preparações *in vivo* quanto *in vitro* mostraram que o lócus cerúleo (LC), a MCPA, os núcleos da rafe e o hipotálamo posterior possuem neurônios intrinsecamente sensíveis tanto à hipóxia como hipercapnia (Dillon e Walldrop, 1992; Coates et al., 1993; Ryan e Waldrop, 1995; Pineda e Aghajanian, 1997; Kramer et al., 1999). Conseqüentemente, embora não possamos descartar o funcionamento anormal de nenhuma estrutura respiratória, incluindo quimiorreceptores periféricos e centrais, a disfunção dos sensores supra-bulbares parece ser a causa mais provável da sensibilidade incomum dos pacientes de pânico ao CO₂ e lactato. Em qualquer evento, ainda não sabemos por que estes núcleos tornam-se tão sensíveis nestes pacientes. Finalmente, como os sensores de gases e o sistema de alarme de sufocamento estão continuamente interagindo, a hipótese de Klein ainda prevê que os ataques de pânico poderiam ser facilitados ou inibidos por manobras respiratórias (hipercapnia e hipóxia, respiração compassada,

hiperventilação ativa, lactato) ou drogas que agem na respiração (opioides, progesterona, hormônios tireoidianos, agentes colinérgicos, etc). Além de várias evidências neste sentido (Klein, 1993b), Battaglia e Ogliari (2005) mostraram que a ansiedade e hiperventilação de pacientes de pânico expostos ao CO₂ são consistentemente bloqueadas por uma única dose de um agente antimuscarínico que cruza a barreira hematoencefálica (biperideno), mas não são alteradas por agentes de ação periférica (pirenzepina). Contudo, enquanto o processamento distribuído do monitoramento gasoso sanguíneo/cerebral na eupnéia e a detecção de sufocamento no ataque de pânico são bastante intuitivos, a detecção do sufocamento e os ataques de pânico poderiam ser executados tanto por um sistema único quanto por sistemas separados. Em todo caso, as estruturas de defesa do cérebro posicionadas no cruzamento do tráfico das informações respiratórias bulbares e prosencefálicas estão numa posição estratégica para desencadear o ataque de pânico.

Estudos de neuroimagem de hipercapnia podem fornecer informações importantes sobre as principais estruturas do sistema de alarme de sufocamento. Apesar de eventuais diferenças metodológicas, estes estudos foram realizados com registros de imagem por ressonância magnética (MRI) e tomografia por emissão positrônica (PET) de estruturas suprapontinas em voluntários normais que apresentaram sensações definidas de sufocamento, falta de ar ou fome por ar durante inalação de CO₂ (Corfield et al., 1995; Brannan et al., 2001; Liotti et al., 2001). Particularmente, Brannan e colaboradores (2001), realizaram um estudo detalhado que contrastou PET da hipercapnia (8% CO₂ / 92% O₂) com aquelas de inalação de oxigênio (9% N₂ / 91% O₂). Contudo, ao

contrário de um pequeno número de estruturas, os dados revelaram a ativação de um vasto conjunto de estruturas tanto corticais quanto subcorticais em um ou ambos os lados do cérebro. Aumentos significantes no fluxo sanguíneo/cerebral regional foram encontrados na ponte, MCPA, tegmento mesencefálico, hipotálamo, amígdala e região periamigdalárica sublenticular, hipocampo e áreas parahipocámpicas, córtex cingulado anterior subgenicular, giro fusiforme, giro temporal medial, insula anterior, pulvinar, putâmem/caudato e vários sítios no cerebelo mediano e lateral. Os autores salientaram que o LC, a área parabraquial e o NDR também podem ter sido ativadas. Em contraste, observaram desativações significantes no córtex cingulado anterior dorsal, córtex cingulado posterior e córtex pré-frontal lateral. De todo modo, estes dados mostram que as estruturas neurais ativadas durante ataques de pânico induzidos por lactato ou CCK constituem somente um pequeno subgrupo da extensa rede associada à sensação de falta de ar ou fome por ar. Na verdade, as estruturas ativadas tanto na hipercapnia quanto no ataque de pânico foram somente o córtex cingulado subgenicular anterior, insula, hipotálamo, MCPA, cerebelo medial e, possivelmente, o LC. É importante notar que a área parabraquial não foi ativada nem no ataque de pânico induzido por lactato, nem por CCK.

Vale mencionar, no entanto, que Liotti e colaboradores (2001) observaram a ativação do córtex temporopolar, corroborando o estudo pioneiro de PET em ataques de pânico induzidos por lactato (Reiman et al., 1989). Como Liotti e colaboradores (2001) empregaram MRI acoplada a PET, seus resultados tornam improvável a ativação do córtex temporopolar por aumento do fluxo sanguíneo extracerebral, como foi proposto por outros autores (Drevets et al., 1992; Benkelfat

et al., 1995; Javanmard et al., 1999). Contudo, é importante notar que os últimos autores somente realizaram tomografia de ataques de pânico induzidos por CCK. Portanto, o estudo de Liotti e colaboradores (2001) reacende a polêmica questão da ativação do córtex temporopolar nos ataques de pânico induzidos por lactato e sugerem que esta ativação possa ser devida à conversão do lactato ao CO₂. Entretanto, a ativação do córtex temporopolar parece ser menos específica que aquela da região da insula/clastrum. Realmente, enquanto o córtex temporopolar e o giro parahipocampal foram ativados também durante a ansiedade antecipatória tanto em indivíduos saudáveis quanto em pacientes de pânico (Reiman et al., 1989), a região da insula/clastrum foi especificamente ativada nos ataques de pânico induzidos por lactato e CCK.

Como o sinal da PET é uma função do fluxo sanguíneo cerebral regional, a propriedade vasodilatadora do CO₂ e do lactato de sódio é um grande inconveniente nestes estudos (Corfield et al., 1995; Gorman et al., 2000). Na verdade, o único estudo de PET de um ataque de pânico espontâneo (realizado num único paciente) levanta uma preocupação fundamental na medida em que não foram observadas ativações. Ao contrário, somente foram registradas desativações nos córtices orbitofrontal direito, pré-límbico, temporal anterior e cíngulo anterior (Fischer et al., 1998).

Por outro lado, como a expressão da proteína c-fos não depende do fluxo sanguíneo cerebral regional, os estudos em animais que utilizaram esta técnica tanto na hipóxia quanto hipercapnia são controles promissores dos dados correspondentes de PET em humanos. Infelizmente, no entanto, enquanto os estudos PET focalizaram estruturas supra-pontinas, os estudos de c-fos foram,

muitas vezes, restritos aos níveis pontinos e bulbares (Erickson e Milhorn, 1994; Haxhiu et al., 1996; Hirooka et al., 1997; Teppema et al., 1997). Contudo, alguns estudos estenderam as análises até o mesencéfalo de ratos anestesiados (Teppema et al., 1997) ou mesmo até o diencéfalo de ratos acordados (Berquin et al., 2000). Todavia, em contraste com a curta exposição a graus moderados de hipercapnia (8%) dos estudos de PET em humanos, os estudos de c-fos empregaram exposições longas a graus moderados tanto de hipóxia (9-11%) quanto hipercapnia (5-8%) (Larnicol et al., 1994; Berquin et al., 2000) ou graus acentuados de hipercapnia (15%) (Teppema et al., 1997). Os últimos autores também examinaram ativações cerebrais de ratos expostos à hipercapnia hiperóxica (60% O₂ / 15% CO₂ / 25% N₂). Portanto, os protocolos experimentais dos estudos de c-fos e PET também foram completamente diferentes. Finalmente, é importante lembrar que a técnica de c-fos marca a despolarização de neurônios tanto excitatórios quanto inibitórios.

De todo modo, Berquin e colaboradores (2000) mostraram que graus moderados de hipóxia (8% O₂) produziram aumentos significantes na imunorreatividade para c-fos no NTS caudal e comissural e em neurônios parapiramidais situados imediatamente acima da superfície ventral bulbar. Em adição, Teppema e colaboradores (1997) também relataram uma marcação significativa nos grupos ventrolaterais do bulbo, incluindo os grupos adrenérgicos C1 e noradrenérgicos A1, após a exposição a graus similares de hipóxia (9% O₂) (as células marcadas foram encontradas principalmente nos núcleos ventrolaterais rostral e caudal e nenhuma no núcleo paragigantocelular lateral). O NTS também foi ativado por 5% (Berquin et al., 2000) e 15% CO₂ (Teppema et al., 1997).

Entretanto, o número de células marcadas no bulbo rostroventrolateral após exposição a 15% CO₂ foi quase 2,5 vezes maior que as observadas no grupo de 9% O₂, corroborando a conhecida sensibilidade destes neurônios à hipercapnia (Mitchell e Hebert, 1974). Notavelmente, a adição de 60% O₂ a 15% CO₂ reduziu o número de células imunorreativas de forma significativamente tanto no NTS quanto no bulbo rostroventrolateral (Teppema et al., 1997). Ratos hipercápnicos também apresentaram uma coluna de células bastante superficial na superfície ventral do bulbo (0-100 μm de profundidade), que não foi observada em ratos hipóxicos (Teppema et al., 1997). Estes neurônios são parte do núcleo retrotrapezóide e podem corresponder ao grupo celular paraolivar de Berquin e colaboradores (2000).

Neurônios da superfície ventral do bulbo são, provavelmente, os sensores caudal e rostral de H⁺ / CO₂ primeiramente sugeridos por Loeschcke e colaboradores (1958). De fato, Loeschcke (1982) ressaltou que as mudanças de pH da superfície ventral do bulbo de gatos produzem “*um aumento máximo de ventilação ... em duas áreas, uma medial à raiz vagal e a outra medial à raiz hipoglossal, mas lateral às pirâmides*”. Surpreendentemente, as áreas pré-Bötzinger/ventrolateral do bulbo que parecem ter uma função crítica na ritmogênese respiratória (Feldman et al., 2003) somente foram ativadas por níveis elevados de hipercapnia (15%) (Teppema et al., 1997).

Na ponte dorsolateral, a divisão externa do núcleo parabraquial lateral e núcleo Kölliker-Fuse foram ativadas tanto pela hipercapnia como hipóxia (Teppema et al., 1997; Berquin et al., 2000). Embora estas áreas possam

pertencer ao “centro pneumotáxico”, este foi classicamente associado ao núcleo parabraquial medial (Bertrand et al., 1974; Vibert et al., 1976; Hugelin, 1977). Assim, os subnúcleos parabraquiais lateral e medial poderiam processar entradas diferentes, a saber, informação pulmonar vinda de receptores de estiramento (Feldman et al., 1976) e informação quimiorreceptora vinda do NTS (Herbert et al., 1990).

Notadamente, estruturas mesencefálicas que não fazem parte dos núcleos respiratórios clássicos do tronco cerebral mostraram aumentos significantes de imunoreatividade c-fos. Particularmente, as colunas dorsolateral e ventrolateral da MCPA, bem como o LC e núcleo subcerúleo, foram intensamente corados por graus moderados tanto de hipóxia quanto hipercapnia. Contudo, apesar do alto número de células marcadas na coluna dorsolateral da MCPA (MCPAdl) de ratos na hipóxia, os valores não foram estatisticamente significantes (Berquin et al., 2000). Mais importante, neurônios marcados com c-fos do LC de ratos hipercápnicos foram duplamente corados com tirosina hidroxilase (Teppema et al., 1997). Estes achados corroboram o experimento *in vitro* que mostra que neurônios do LC são sensíveis ao CO₂ (Pineda e Aghajanian, 1997). Notavelmente, no entanto, o LC não foi corado em ratos hipóxicos (Teppema et al., 1997; Berquin et al., 2000).

Rostralmente, Berquin e colaboradores (2000) encontraram aumentos significantes de imunoreatividade c-fos nos núcleos hipotalâmicos paraventricular, supraóptico e dorsomedial, bem como no hipotálamo posterior e numa área ventrolateral que se estendia dos núcleos mamilares até a área retroquiasmática (zona hipotalâmica ventral). Todavia, nem o aumento na

imunoreatividade para c-fos no núcleo paraventricular de ratos hipóxicos (184%), nem no núcleo supraóptico de ratos hipercapnicos (460%), alcançou significância estatística. Enquanto as ativações dos núcleos hipotalâmico paraventricular, supraóptico e hipotálamo dorsomedial estão provavelmente envolvidos nas respostas do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal ao CO₂ (Raff et al., 1983, 1984; Kaye et al., 2004), a ativação do hipotálamo posterior é particularmente importante na medida que ele abriga neurônios sensíveis à hipóxia e hipercapnia que se projetam para a MCPA (Ryan e Waldrop, 1995). Na verdade, os últimos autores sugeriram que a MCPA e a área parabraquial podem ser relés fundamentais entre o hipotálamo posterior e neurônios bulbares envolvidos na resposta ventilatória tanto na hipóxia quanto hipercapnia. Finalmente, cabe enfatizar que a hipóxia e a hipercapnia produziram resultados similares tanto em gatos (Larnicol et al., 1994), que têm hábitos exclusivamente 'aeróbicos', quanto em ratos (Berquin et al., 2000) que têm hábitos subterrâneos e alta tolerância ao CO₂. Em realidade, as espécies somente diferiram na ausência da expressão de c-fos no núcleo retrotrapezóide dos ratos hipóxicos.

Assim, devido em parte ao diferente foco dos estudos de hipercapnia com PET (suprapontino) e c-fos (tronco cerebral), as áreas ativadas comuns compreenderam apenas o hipotálamo posterior, a MCPA, a área parabraquial e, possivelmente, o LC. Entretanto, em contraste com os estudos de hipercapnia com PET e ataques de pânico induzidos experimentalmente, as ativações do cerebelo medial não foram relatadas em estudos com c-fos. Como mencionamos, muitas destas áreas apresentaram neurônios quimiossensíveis ao H⁺/CO₂ e/ou O₂. De fato, Coates e colaboradores (1993) mostraram que a atividade do nervo

frênico foi marcadamente aumentada por microinjeções de acetazolamida em várias regiões do tronco cerebral de ratos anestesiados, paralisados, servo-ventilados e gatos vagotomizados e glomectomizados. Locais sensíveis foram encontrados em torno de 800 μm da superfície ventrolateral bulbar, e nas proximidades do NTS e LC. A medida do pH tecidual, através de micropipetas de vidro, foi compatível com a pressão parcial final de CO_2 (*end-tidal* PCO_2) de aproximadamente 36 Torr. Os autores concluíram que os quimiorreceptores centrais estão distribuídos em muitas localizações do tronco cerebral, todos numa distância de 1,5 mm da superfície interior e exterior do tronco cerebral.

A sensibilidade do hipotálamo posterior para hipóxia e hipercapnia também foi apoiada por whole-cell patch-clamp e registros extracelulares de preparações de fatias cerebrais (Dillon e Waldrop, 1992). Os registros extracelulares mostraram que a hipóxia estimulou mais de 80% dos neurônios numa forma dose-dependente. Em adição, mais que 80% das células excitadas por hipóxia retiveram esta resposta durante bloqueio sináptico. Em contraste, a hipercapnia aumentou a frequência de descarga em somente 22% dos neurônios. Similarmente, os registros whole-cell patch-clamp mostraram que, enquanto a hipóxia produziu uma despolarização e/ou aumento da frequência em 76% dos neurônios, a hipercapnia somente produziu estes efeitos em 35% dos neurônios. Estes resultados sugerem que subpopulações separadas de neurônios hipotalâmicos caudais são sensíveis a hipóxia e hipercapnia. Ryan e Waldrop (1995) demonstraram adicionalmente que os neurônios do hipotálamo posterior que se projetam para a MCPA são sensíveis tanto à hipóxia (53%) quanto

hipercapnia (27%). Finalmente, Kramer e colaboradores (1999) mostraram em fatias cerebrais do rato que a maioria dos neurônios da MCPA (39 de 53) responde a hipóxia. Destes, 92% responderam à hipóxia com aumento na frequência de disparo. Notavelmente, neurônios sensíveis a hipóxia nas regiões dorsolateral/lateral aumentaram a frequência de disparo numa extensão maior que aqueles localizados na região ventrolateral. Estes neurônios retiveram a resposta à hipóxia após perfusão tecidual com uma solução de baixa concentração de cálcio (Ca^{2+}) e alta de magnésio (Mg^{2+}) para bloqueio da transmissão sináptica. Uma proporção muito menor de neurônios (7/33) respondeu à hipercapnia.

Embora a MCPA não é necessária para a ritmogênese respiratória, a estimulação dessa estrutura é conhecida há muito tempo pelos seus efeitos proeminentes sobre a respiração. De fato, no primeiro estudo publicado com a técnica de estimulação elétrica da MCPA, Sachs (1911) relatou que dentre todas as regiões estimuladas do tálamo e mesencéfalo, a MCPA foi a região que produziu as respostas respiratórias mais pronunciada, sendo *“indubitavelmente ... um centro respiratório”*. Estas observações pioneiras foram corroboradas pelo extenso mapeamento das respostas respiratórias induzidas por estimulação elétrica do tronco cerebral (Kabat, 1936). Mais recentemente, Hayward e colaboradores (2003) mostraram que a estimulação química da MCPA afeta predominantemente a frequência respiratória, reduzindo a duração tanto da inspiração quanto da expiração. Estes efeitos foram provavelmente mediados por projeções excitatórias da MCPAd para a área parabraquial (centro pneumotáxico). De fato, enquanto o grupo respiratório ventral do bulbo é reconhecido por sua influência no volume corrente, o centro pneumotáxico controla predominantemente

a frequência respiratória (Cohen, 1979). Na verdade, Hayward e Castellanos (2003) mostraram que a estimulação química da MCPA produz um aumento seletivo da imunoreatividade para a proteína c-fos no núcleo parabraquial lateral. Entretanto, as microinjeções neste núcleo com muscimol (5 mM), um agonista de receptores GABA-A, produziu uma atenuação acentuada da resposta respiratória evocada pela estimulação da MCPAd (-90%) e frequência cardíaca (-72%), enquanto a resposta pressora foi menos atenuada (-57%). O bloqueio bilateral dos receptores glutamatérgicos do núcleo parabraquial lateral também produziu uma atenuação acentuada dos aumentos da frequência respiratória (-65%) e cardíaca (-53%) evocados pela estimulação da MCPAd, mas uma redução apenas modesta na resposta pressora (-34%). Estes resultados apóiam a função importante do núcleo parabraquial lateral nos componentes respiratórios e cardíacos dos comportamentos de defesa induzidos pela estimulação da MCPAd (Hayward et al., 2004; Zhang et al., 2007). A covariação das respostas rítmicas respiratórias e cardíacas é mais provavelmente devida aos efeitos inibitórios bastante conhecidos da atividade respiratória central sobre os motoneurônios cardíacos vagais (Lopes e Palmer, 1978).

A despeito das evidências mencionadas que implicam a MCPA, a área parabraquial lateral, o LC e o hipotálamo posterior no sistema de alarme de sufocamento, os pacientes de pânico poderiam apresentar uma disfunção respiratória em qualquer nível dos circuitos respiratórios, incluindo os quimiorreceptores centrais e periféricos. Embora o papel das informações periféricas nos comportamentos defensivos permaneça incerto, estudos em gatos decerebrados sugeriram há muito tempo que a ativação dos barorreceptores inibe

os comportamentos de falsa-ira (Bartorelli et al., 1960), enquanto a ativação dos quimiorreceptores têm um efeito facilitador (Bizzi et al., 1961). De fato, Franchini e Krieger (1993) mostraram que a estimulação seletiva dos quimiorreceptores carotídeos com doses subletais de cianeto de potássio (KCN) (30 µg/Kg) produz comportamentos defensivos que se assemelham aos evocados pela estimulação elétrica ou química da MCPAdl. O envolvimento dos quimiorreceptores arteriais na resposta ao KCN foi claramente demonstrado pela ausência das respostas respiratórias induzidas pelo KCN em ratos com desnervação sino-aórtica. Os autores também mencionam que a desnervação aboliu os efeitos comportamentais. Reciprocamente, Hilton e Joels (1965) já haviam mostrado que a estimulação elétrica das áreas de defesa da MCPA e hipotálamo facilita as respostas ventilatórias ao KCN e dinitrofenol. De fato, Hayward e colaboradores (2002) mostraram que enquanto a estimulação dos quimiorreceptores carotídeos induz a expressão de proteína c-fos em toda extensão das colunas dorsais da MCPA, a estimulação dos barorreceptores marcou somente os distritos caudais das colunas dorsomedial e lateral. Este padrão é similar àquele induzido por hipóxia sistêmica (Berquin et al., 2000). Finalmente, como Hayward e colaboradores (2002) conduziram seus experimentos em ratos anestesiados com uretana, seus resultados dificilmente poderiam ser secundários a alterações do estado emocional. Conseqüentemente, estes dados sugerem a sensibilidade seletiva da MCPAd à hipóxia. Adicionalmente, Hayward e colaboradores (2002) mostraram que menos de 10% dos neurônios da MCPA caudal que expressaram c-fos após injeções de KCN foram retrogradamente marcados com injeções na região A5 da ponte que medeia o componente pressor do reflexo quimiorreceptor

(Guyenet e Koshiya, 1995). Em geral, estes resultados apoiam a facilitação pelos quimiorreceptores dos comportamentos defensivos mediados pela MCPAd e vice-versa, a facilitação pela MCPAd da resposta ventilatória do reflexo quimiorreceptor.

As respostas cardiovasculares e respiratórias evocadas pela MCPAd têm sido classicamente associadas aos ajustes autonômicos nos comportamentos defensivos (Carobrez et al., 1983; Schenberg et al., 1983; Lovick, 1992; Bandler et al., 1994). Os efeitos da estimulação da MCPAd sobre a respiração foram estudados em maior detalhe por Paydarpar e Eldridge (1987). Estes autores examinaram a facilitação induzida pela MCPAd da atividade do nervo frênico em gatos adultos anestesiados por uretana-cloralose que foram submetidos a vagotomia e desnervação sino-aórtica e mantidos em PCO_2 constante (30-35 Torr) por meio de um ventilador servo-controlado. Estes autores mostraram que a estimulação elétrica da MCPAd com intensidades supralimiais produz apneusis inspiratória. Entretanto, estimulações breves (1 s) com estímulos limiares aplicados em tempos variados do ciclo respiratório invariavelmente reiniciou o ciclo tanto na fase inspiratória ou expiratória. Depois de reiniciado, o ritmo respiratório apresentou cofase constante, ou seja, o intervalo entre o ciclo reinicializado e o começo do próximo ciclo respiratório. Houve, no entanto, um estímulo único (singularidade do oscilador respiratório) que resultou numa cofase de duração imprevisível (duração aleatória da cofase). Esta seria a resposta esperada na dispnéia, o primeiro sintoma do ataque de pânico (Klein, 1993b; Preter e Klein, 2007). Além disso, apesar do ritmo respiratório freqüentemente reiniciar com fases inspiratória e expiratória normais após cofases imprevisíveis,

Paydarphar e Eldridge (1987) mostraram em um gato anestesiado com pentobarbital que os estímulos aplicados em intervalos críticos e intensidades apropriadas resultaram numa apneusis inspiratória com duração equivalente a 3 ciclos respiratórios. Este padrão de resposta é similar àquele observado depois da lesão do centro pneumotáxico (Cohen, 1979). Estes dados mostram que as estimulações sutis da MCPAd são capazes de produzir episódios prolongados de dispnéia, que são típicos dos ataques de pânico.

3. RESOLVENDO O QUEBRA-CABEÇA

Estudos ainda não publicados de nosso laboratório mostraram que a exposição de ratos ao CO₂ isolado produz somente um estado de imobilidade hiporreativa. Em contraste, o KCN produziu todas as respostas de defesa, inclusive o salto que foi apresentado por um animal apenas. No mesmo sentido, o CO₂ aumentou os limiares das respostas de exoftalmia, imobilidade, trote e galope induzidos pela estimulação da MCPAd, enquanto o KCN causou reduziu os limiares de todas as respostas mas, principalmente, da imobilidade, trote e galope. Por fim, a lesão eletrolítica da MCPAd aboliu as respostas ao KCN de imobilidade, galope e salto e causou uma atenuação pronunciada do trote, exoftalmia e defecação. Estes resultados apóiam o envolvimento da MCPAd num mecanismo de alarme de sufocamento.

De acordo com os resultados em humanos sadios, a hipercapnia não causou nenhuma resposta típica de defesa nos ratos Wistar. Ao contrário, os ratos mantiveram-se imóveis, porém, de olhos abertos, descartando efeitos hipnóticos. Adicionalmente, apesar de evidências relacionando a MCPAd aos ataques de

pânico, a exposição de ratos às concentrações de 8 e 13% de CO₂ inibiu os comportamentos de defesa evocados pela estimulação desta estrutura. Contudo, a hipercapnia promove uma ativação acentuada de sítios caudais da MCPAvI cuja estimulação (elétrica ou química) produz imobilidade hiporreativa (Carrive, 1993; Morgan e Carrive, 2001). Portanto, a imobilidade hiporreativa evocada pela MCPAvI é compatível com a ativação predominante desta estrutura durante hipercapnia. Este padrão é oposto àquele induzido pelo KCN ou pela estimulação da MCPAd.

Conforme mencionamos, a hipercapnia ativa a matéria cinzenta periaquedutal lateral (MCPAl), a MCPAvI e o NDR (Berquin et al., 2000). Por outro lado, a atividade neuronal da MCPAd é inibida pela estimulação da MCPAvI e NDR (Lovick, 1992). Existem evidências que estes efeitos são mediados, ao menos em parte, pelas projeções serotoninérgicas do NDR à MCPAd (Sena et al., 2003; Pobbe e Zangrossi, 2005). A ativação da MCPAvI e do NDR pelo CO₂ poderia, portanto, antagonizar as repostas defensivas decorrentes da ativação da MCPAl pela informação quimiorreceptora periférica. Contrariamente, como a hipóxia ativa apenas a MCPAd, o KCN elicia todos os comportamentos de defesa do rato. De acordo com este modelo, a disfunção das projeções inibitórias da MCPAvI ou do NDR à MCPAl, desmascararia os efeitos excitatórios do CO₂ na última estrutura, resultando nos ataques de pânico em pacientes com este transtorno.

4. REFERÊNCIAS

- APA (1994) Diagnostic and statistical manual for mental disorders (DSM-IV). American Psychiatric Association Press, Washington DC.
- Alves ACA (2007) Funções comportamentais das divisões compacta e difusa do núcleo dorsomedial do hipotálamo de ratos. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória.
- Bailey TW, DiMicco JA (2001) Chemical stimulation of the dorsomedial hypothalamus elevates plasma ACTH in conscious rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 280: R8-R15.
- Bandler R, Shipley MT (1994) Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray: modules for emotional expression? *Trends in Neuroscience* 17: 379-389.
- Banzett RB, Lansing RW, Reid MB, Adams L, Brown R (1989) "Air hunger" arising from increased PCO₂ in mechanically ventilated quadriplegics. *Resp Physiol* 76: 53-67.
- Bartorelli C, Bizzi E, Libretti A, Zanchetti A (1960) Inhibitory control of sinocarotid pressoreceptive afferents on hypothalamic autonomic activity and sham rage behavior. *Arch Ital Biol* 98: 308-326.
- Battaglia M, Ogliari A (2005) Anxiety and panic: from human studies to animal research and back. *Neurosci Biobehav Rev* 29: 169-179.
- Bayliss DA, Talley EM, Sirois JE, Lei Q (2001) TASK-1 is a highly modulated pH-sensitive 'leak' K⁺ channel expressed in brainstem respiratory neurons. *Respir Physiol* 129: 159-174.

- Beck JG, Ohtake PJ, Shiperd JC (1999) Exaggerated anxiety is not unique to CO₂ in panic disorder: a comparison of hypercapnic and hypoxic challenges. *J Abnorm Pshycol* 108: 473-482.
- Beck JG, Shipherd JC, Ohtake P (2000) Do panic symptom profiles influence response to a hypoxic challenge in patients with panic disorder? A preliminary report. *Psychosom Med* 62: 678-683.
- Benkelfat C, Bradwejn J, Meyer E, Ellenbogen M, Milot S, Gjedde A, Evans A (1995) Functional neuroanatomy of CCK sub 4-induced anxiety in normal healthy volunteers. *Am J Pshychiatry* 152(8): 1180-1184.
- Berg AP, Talley EM, Manger JP, Bayliss DA (2004) Motoneurons express heteromeric TWIK-related acid-sensitive K⁺ (TASK) channels containing TASK-1 (KCNK3) and TASK-3 (KCNK9) subunits. *J Neurosci* 24: 6693-6702.
- Berquin P, Bodineau L, Gros F, Larnicol N (2000) Brainstem and hypothalamic areas involved in respiratory chemoreflexes: a Fos study in adults rats. *Brain Res* 857: 30-40.
- Bertrand F, Hugelin A, Vibert JF (1974) A stereologic model pneumotaxic oscillator based on spatial and temporal distributions on neuronal bursts. *J Neurophysiol* 37: 91-107.
- Bizzi E, Libretti A, Malliani A, Zanchetti A (1961) Reflex chemoceptive excitation of diencephalic sham rage behavior. *Am J Physiol* 200: 923-926.
- Brannan S, Liotti M, Egan G, Shade R, Madden L, Robillard R, Abplanalp B, Stofer K, Denton D, Fox PT (2001) Neuroimaging of cerebral activations and deactivations associated with hypercapnia and hunger for air. *Proceedings*

of the National Academy of Sciences of the United States of America 98: 2029-2034.

Buckler KJ (2007) TASK-like potassium channels and oxygen sensing in the carotid body. *Respir Physiol Neurobiol* 157: 55-64.

Buckler KJ, Willians BA, Honore E (2000) An oxygen-, acid- and anaesthetic-sensitive TASK-like background potassium channel in rat arterial chemoreceptor cells. *J Physiol* 525: 135-142.

Carobrez AP, Schenberg LC, Graeff FG (1983) Neuroeffector mechanisms of the defense reaction in the rat. *Physiol Behav* 31:439-444.

Carrive P (1993) The periaqueductal gray and defensive behavior: functional representation and neuronal organization. *Behav Brain Res* 58: 27-47.

Cassano GB; Savino M (1993) Symptomatology of panic disorder: an attempt to define the panic-agoraphobic spectrum phenomenology. In: *The psychopharmacology of panic* (Montgomery SA), Oxford University Press, New York, 38-57.

Charney DS, Heninger GR, Breier A (1984) Noradrenergic function in panic anxiety: effects of yohimbine in health subjects and patients with panic disorder. *Arch Gen Psychiat* 41:751-763.

Chitravanshi VC, Sapru HN (1995) Chemoreceptor-sensitive neurons in commissural subnucleus of nucleus tractus solitarius of the rat. *Am J Physiol* 268: R851-R858.

Chitravanshi VC, Kachroo A, Sapru HN (1994). A midline area in the nucleus commissuralis of NTS mediates the phrenic nerve responses to carotid chemoreceptor stimulation. *Brain Res* 662: 127-133.

- Coates EL, Li A, Nattie EE (1993) Widespread sites of brainstem ventilatory chemoreceptors. *J Appl Physiol* 75: 5-14.
- Cohen MI (1979) Neurogenesis of the respiratory rhythm in the mammal. *Physiol Rev* 59: 1105-1173.
- Cohen ME, White PD (1951) Life situations, emotions and neurocirculatory asthenia (anxiety neurosis, neurasthenia, effort syndrome). *Proceedings Association Res Nervous Mental Disease*. 13: 335-357.
- Corfield DR, Fink GR, Ramsay SC, Murphy K, Harty HR, Watson JDG, Adams L, Frackowiak RSJ, Guz A (1995) Evidence for limbic system activation during CO₂-stimulated breathing in man. *J Physiology* 488: 77-84,
- Czirják G, Enyedi P (2002) Formation of functional heterodimers between the TASK-1 and TASK-3 two-pore domain potassium channel subunits. *J Biol Chem* 277: 5426-5432.
- da Silva LG, de Menezes RC, dos Santos RA, Campagnole-Santos MJ, Fontes MA (2003) Role of periaqueductal gray on the cardiovascular response evoked by disinhibition of the dorsomedial hypothalamus. *Brain Res* 984: 206-214.
- da Silva LG, Jr., Menezes RC, Villela DC, Fontes MA (2006) Excitatory amino acid receptors in the periaqueductal gray mediate the cardiovascular response evoked by activation of dorsomedial hypothalamic neurons. *Neuroscience* 139: 1129-1139.
- de Menezes RC, Zaretsky DV, Fontes MA, DiMicco JA (2006) Microinjection of muscimol into caudal periaqueductal gray lowers body temperature and

attenuates increases in temperature and activity evoked from the dorsomedial hypothalamus. *Brain Res* 1092: 129-137.

Deakin JFW, Graeff FG (1991) 5-HT and mechanisms of defense. *J Psychopharmacol* 5: 305-315.

Dillon GH, Walldrop TG (1992) In vitro responses of caudal hypothalamic neurons to hypoxia and hypercapnia. *Neuroscience* 51: 941-950.

Drevets WC, Videen TO, MacLeod AK, Haller JW, Raichle ME (1992) PET Images of blood flow changes during anxiety: Correction. *Science* 256: 1696.

Duprat F, Lesage F, Fink M, Reyes R, Heurteaux C, Lazdunski M (1997) TASK, a human background K^+ channel to sense external pH variations near physiological pH. *EMBO J* 16: 5464-5471.

Erickson JT, Milhorn DE (1994) Hypoxia and electrical stimulation of the carotid sinus nerve induce Fos-like immunoreactivity within catecholaminergic and serotonergic neurons of the rat brainstem. *J Comp Neurol* 348(2): 161-182.

Feldman JL, Gautier H (1976) Interaction of pulmonary afferents and pneumotaxic center in control of respiratory pattern in cats. *J Neurophysiology* 31: 31-44.

Feldman JL, Mitchell GS, Nattie EE (2003) Breathing: rhythmicity, plasticity, chemosensitivity. *Annual Review of Neuroscience* 26: 239-266.

Feldman JL, Del Negro CA (2006) Looking for inspiration: new perspectives on respiratory rhythm. *Nat Rev Neurosci* 7: 232-242.

Finley JC, Katz DM (1992) The central organization of carotid body afferent projections to the brainstem of the rat. *Brain Res* 572: 108-116.

- Fischer H, Andersson JLR, Furmark T, Fredrikson M (1998) Brain correlates of an unexpected panic attack: a human positron emission tomographic study. *Neuroscience Letters* 251: 137-140.
- Fishman SM, Carr DB, Beckett A, Rosenbaum JF (1994) Hypercapnic ventilatory response in patients with panic disorder before and after alprazolam treatment and in pre-and postmenstrual women. *J Psychiatr Res* 28: 165-170.
- Frances A, Miele GM, Widiger TA, Pincus HA, Manning D, Davis WW (1993) The classification of panic disorders: from Freud to DSM-IV. *J Psychiatr Res* 27:3-10.
- Franchini KG, Krieger EM (1993) Cardiovascular responses of conscious rats to carotid body chemoreceptor stimulation by intravenous KCN. *J Auton Nerv Syst* 42: 63-70.
- Freedman RR, Ianni P, Ettedgui E, Puthezhath N (1985) Ambulatory monitoring of panic disorder. *Arch Gen Psychiatry* 42: 244-248.
- Freud S (1895) On the right to separate from neurasthenia a definite symptom-complex as 'anxiety neurosis' (Angstneurose). In: *The major works of Sigmund Freud, great books of western world Encyclopedia Britannica, London, 1978.*
- Gandevia SC, Killian K, McKenzie DK, Crawford M, Allen GM, Gorman RB, Hales JP (1993) Respiratory sensations, cardiovascular control, kinaesthesia and transcranial stimulation during paralysis in humans. *J Physiology* 470: 85-107.

- Goetz RR, Klein DF, Gorman JM (1994) Consistencies between recalled panic and lactate-induced panic. *Anxiety* 1: 31-36.
- Gorman JM, Fyer MR, Goetz R, Askanazi J, Liebowitz MR, Fyer AJ, Kinney J, Klein DF (1988) Ventilatory physiology of patients with panic disorder. *Arch Gen Psychiatry* 45(1): 31-39 [erratum in: *Arch Gen Psychiatry* (1991) 48(2):181].
- Gorman JM, Browne ST, Papp LA, Martinez J, Welkowitz L, Coplan JD, Goetz RR, Kent J, Klein DF (1997) Effect of antipanic treatment on response to carbon dioxide. *Biol Psychiatry* 42(11): 982-991.
- Gorman JM, Kent JM, Sullivan GM, Coplan JD (2000) Neuroanatomical hypothesis of panic disorder, revised. *Am J Psychiatry* 157(4): 493-505.
- Graeff FG (2004) Serotonin, the periaqueductal gray and panic. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 28: 239-259.
- Graeff, FG, Garcia-Leal C, Del-Ben CM, Guimarães FS (2005) Does the panic attack activate the hypothalamic-pituitary-adrenal axis? *An Acad Bras Cienc* 77: 477-491.
- Guyenet PG, Koshiya N (1995) Working model of the sympathetic chemoreflex in rats. *Clinical and Experimental Hypertension* 17: 167-179.
- Haxhiu MA, Yung K, Erokwu B, Cherniack NS (1996) CO₂-induced c-fos expression in the CNS catecholaminergic neurons. *Respir Physiol* 105: 35-45.
- Hayward LF, Von Reitzentstein M (2002) c-Fos expression in the midbrain periaqueductal gray after chemoreceptor and baroreceptor activation. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 283: H1975-H1984.

- Hayward LF, Castellanos M (2003) Increased c-fos expression in select lateral parabrachial subnuclei following chemical versus electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray in rats. *Brain Res* 974: 153-166.
- Hayward LF, Swartz CL, Davenport PW (2003) Respiratory responses to activation or disinhibition of the dorsal periaqueductal gray in rats. *J Applied Physiology* 94:913-922.
- Hayward LF, Castellanos M, Davenport PW (2004) Parabrachial neurons mediate dorsal periaqueductal gray evoked respiratory responses in the rat. *J Applied Physiology* 96: 1146-1154.
- Herbert H, Moga MM, Saper CB (1990) Connections of the parabrachial nucleus with the nucleus of the solitary tract and the medullary reticular formation in the rat. *J Comp Neurol* 293: 540-580.
- Hilton SM, Joels N (1965) Facilitation of chemoreceptor reflexes during the defense reaction. *J Physiol* 176: 20-22.
- Hirooka Y, Polson JW, Potts PD, Dampney RA (1997) Hypoxia-induced Fos expression in neurons projecting to the pressor region in the rostral ventrolateral medulla. *Neuroscience* 80: 1209-1224.
- Hugelin A (1977) Anatomical organization of bulbopontine respiratory oscillators. *Fed Proc* 36: 2390-2394.
- Javanmard M, Shlik J, Kennedy SH, Vaccarino FJ, Houle S, Bradwejn J (1999) Neuroanatomic correlates of CCK-4-induced panic attacks in healthy humans: a comparison of two time points. *Biol Psychiatry* 45: 872-882.

- Johnson PL, Shekhar A (2006) Panic-prone state induced in rats with GABA dysfunction in the dorsomedial hypothalamus is mediated by NMDA receptors. *J Neurosci* 26: 7093-7104.
- Johnson PL, Truitt WA, Fitz SD, Lowry CA, Shekhar A (2008) Neural pathways underlying lactate-induced panic. *Neuropsychopharmacology* 33: 2093-2107.
- Kabat H (1936) Electrical stimulation of points in the forebrain and midbrain: the resultant alterations in respiration. *J Comp Neurol* 64: 187-208.
- Kaye J, Buchanan F, Kendrick A, Johnson P, Lowry C, Bailey J, Nutt D, Lightman S (2004) Acute carbon dioxide exposure in healthy adults: evaluation of a novel means of investigating the stress response. *J Neuroendocrinol* 16: 256-264.
- Kim Y, Bang H, Kim D (2000) TASK-3, a new member of the tandem pore K⁺ channel family. *J Biol Chem* 275: 9340-9347.
- Klein DF (1964) Delineation of two drug-responsive anxiety syndromes. *Psychopharmacology* 5: 397-408.
- Klein DF (1993a) Panic may be a misfiring suffocation alarm. In: *The psychopharmacology of panic* (Montgomery SA). Oxford University Press, New York, 67-73.
- Klein DF (1993b) False suffocation alarms, spontaneous panics, and related conditions. An integrative hypothesis. *Arch Gen Psychiatry* 50: 306-317.
- Kramer JM, Nolan PC, Waldrop TG (1999) In vitro responses of neurons in the periaqueductal gray to hypoxia and hypercapnia. *Brain Res* 835: 197-203.

- Kumar P (2007) Sensing hypoxia in the carotid body: from stimulus to response. *Essays Biochem* 43: 43-60.
- Lahiri S, Roy A, Baby SM, Hoshi T, Semenza GL, Prabhakar NR (2006) Oxygen sensing in the body. *Prog Biophys Mol Biol* 91: 249-286.
- Larnicol N, Wallois F, Berquin P, Gros F, Rose D (1994) C-fos-like immunoreactivity in the cat's neuraxis following moderate hypoxia or hypercapnia. *J Physiol* 88: 81-88.
- Liotti M, Brannan S, Egan G, Shade R, Madden L, Abplanalp B, Robillard R, Lancaster J, Zamarripa FE, Fox PT, Denton D. (2001) Brain responses associated with consciousness of breathlessness (air hunger). *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 98 (4): 2035-2040.
- Lewis A, Hartness ME, Chapman CG, Fearon IM, Meadows HJ, Peers C, Kemp PJ (2001) Recombinant hTASK1 is an O₂-sensitive K⁺ channel. *Biochem Biophys Res Commun* 285: 1290-1294.
- Loeschcke HH (1982) Central chemosensitivity and the reaction theory. *J Physiol* 332: 1-24.
- Loeschcke HH, Koepchen HP, Gertz KH (1958) Über den einfluss von wasserstoffionenkonzentration und CO₂-druck im liquor cerebrospinalis auf die Atmung. *Pflügers Arch* 266: 565-585.
- Lopes OU, Palmer JF (1978) Mechanisms of hypothalamic control of cardiac component of sinus nerve reflex. *Quart J Exp Physiol* 63: 231-254.
- Lovick TA (1992) Inhibitory modulation of the cardiovascular defence response by the ventrolateral periaqueductal grey matter in rats. *Experimental Brain Res* 89: 133-139.

- Mitchell RA, Herbert DA (1974) The effect of carbon dioxide on the membrane potential of medullary respiratory neurons. *Brain Res* 75: 345-349.
- Moosavi SH, Golestanian E, Binks AP, Lansing RW, Brown R, Banzett RB (2003) Hypoxic and hypercapnic drives to breathe generate equivalent levels of air hunger in humans. *J Appl Physiol* 94: 141-154.
- Moosavi SH, Banzett RB, Butler JP (2004) Time course of air hunger mirrors the biphasic ventilatory response to hypoxia. *J Appl Physiol* 97: 2098-2103.
- Morgan MM, Carrive P (2001) Activation of the ventrolateral periaqueductal gray reduces locomotion but not mean arterial pressure in awake, freely moving rats. *Neuroscience* 102: 905-910.
- Mulkey DK, Stornetta RL, Weston MC, Simmons JR, Parker A, Bayliss DA, Guyenet PG (2004) Respiratory control by ventral surface chemoreceptor neurons in rats. *Nat Neurosci* 7: 1360-1369.
- Mulkey DK, Talley EM, Stornetta RL, Siegel AR, West GH, Chen X, Sen N, Mistry AM, Guyenet PG, Bayliss DA (2007) TASK channels determine pH sensitivity in select respiratory neurons but do not contribute to central respiratory chemosensitivity. *J Neurosci* 27: 14049-14058.
- Nattie E (1999) CO₂, brainstem chemoreceptors and breathing. *Prog Neurobiol* 59: 299-331.
- Pain MCF, Biddle N, Tiller JWG (1988) Panic disorder, the ventilatory response to carbon dioxide and respiratory variables. *Psychosom Med* 50: 541-548.
- Pappenheimer JR, Fencel V, Heisey SR, Held D (1965) Role of cerebral fluids in control of respiration as studied in unanaesthetized goats. *Am J Physiol* 208: 436-450.

- Paydarfar D, Eldridge FL (1987) Phase resetting and dysrhythmic responses of the respiratory oscillator. *Am J Physiol* 252:55-62.
- Pineda J, Aghajanian GK (1997) Carbon dioxide regulates the tonic activity of locus coeruleus neurons by modulating a proton- and polyamine-sensitive inward rectifier potassium current. *Neuroscience* 77(3): 723-743.
- Pitts FN, McClure JN (1967) Lactate metabolism in anxiety neurosis. *New Engl J Med* 277: 1329-1336.
- Pobbe RL, Zangrossi H, Jr. (2005) 5-HT(1A) and 5-HT(2A) receptors in the rat dorsal periaqueductal gray mediate the antipanic-like effect induced by the stimulation of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus. *Psychopharmacology* 183: 314-321.
- Preter M, Klein DF (2007) Panic, suffocation false alarms, separation anxiety and endogenous opioids. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry*.
- Putnam RW, Filosa JA, Ritucci NA (2004) Cellular mechanisms involved in CO₂ and acid signaling in chemosensitive neurons. *Am J Physiol Cell Physiol* 287: C1493-C1526.
- Raff H, Shinsako J, Keil LC, Dallman MF (1983) Vasopressin, ACTH, and blood pressure during hypoxia induced at different rates. *Am J Physiol* 245: E489-E493.
- Raff H, Shinsako J, Dallman MF (1984) Renin and ACTH responses to hypercapnia and hypoxia after chronic carotid chemodervation. *Am J Physiol* 247: R412-R417.

- Rajan S, Wischmeyer E, Xin Liu G, Preisig-Müller R, Daut J, Karschin A, Derst C (2000) TASK-3, a novel tandem pore domain acid-sensitive K⁺ channel. An extracellular histidine as pH sensor. *J Biol Chem* 275: 16650-16657.
- Rechlin T; Weis M; Spitzer A; Kaschka WP (1994) Are affective disorders associated with alterations of heart rate variability? *J Affect Disord* 32: 271-275.
- Reiman EM, Raichle ME, Robins E, Mintun MA, Fusselman MJ, Fox PT (1989) Neuroanatomical correlates of lactate-induced anxiety attack. *Arch Gen Psychiatry* 46: 493-500.
- Ricardo JA, Koh ET, (1978) Anatomical evidence of direct projections from the nucleus of the solitary tract to the hypothalamus, amygdala, and other forebrain structures in the rat. *Brain Res* 153: 1-26.
- Roth WT, Margraf J, Ehlers A, Taylor CB, Maddock RJ, Davies S (1992) Stress test reactivity in panic disorder. *Arch Gen Psychiatry* 49: 301-310.
- Ryan JW, Waldrop TG (1995) Hypoxia sensitive neurons in the caudal hypothalamus project to the periaqueductal gray. *Resp Physiol* 100: 185-194.
- Sachs E (1911) On the relation of the optic thalamus to respiration, circulation, temperature, and the spleen. *J Exp Med* 14: 408-440.
- Schenberg LC, De Aguiar JC, Graeff FG (1983) GABA modulation of the defense reaction induced by brain electrical stimulation. *Physiol Behav* 31: 429-437.
- Schlaefke ME (1981) Central chemosensitivity – a respiratory drive. *Rev Physiol Biochem Pharmac* 90: 171-244.

- Sena LM, Bueno C, Pobbe RL, Andrade TG, Zangrossi H, Jr., Viana MB (2003) The dorsal raphe nucleus exerts opposed control on generalized anxiety and panic-related defensive responses in rats. *Behav Brain Res* 142: 125-133.
- Shekhar A (1994) Effects of treatment with imipramine and clonazepam on an animal model of panic disorder. *Biol Psychiatry* 36: 748-758.
- Shekhar A, DiMicco JA (1987) Defense reaction elicited by injection of GABA antagonists and synthesis inhibitors into the posterior hypothalamus in rats. *Neuropharmacology* 26: 407-417.
- Shekhar A, Katner JS, Rusche WP, Sajdyk TJ, Simon JR (1994) Fear-potentiated startle elevates catecholamine levels in the dorsomedial hypothalamus of rats. *Pharmacol Biochem Behav* 48: 525-529.
- Shekhar A, Katner JS (1995) Dorsomedial hypothalamic GABA regulates anxiety in the social interaction test. *Pharmacol Biochem Behav* 50: 253-258.
- Shekhar A, Keim SR, Simon JR, McBride WJ (1996) Dorsomedial hypothalamic GABA dysfunction produces physiological arousal following sodium lactate infusions. *Pharmacol Biochem Behav* 55: 249-256.
- Shekhar A, Keim SR (1997) The circumventricular organs form a potential neural pathway for lactate sensitivity: implications for panic disorder. *J Neurosci* 17: 9726-9735.
- Shekhar A, Katner JS, Sajdyk TJ, Kohl RR (2002) Role of norepinephrine in the dorsomedial hypothalamic panic response: an in vivo microdialysis study. *Pharmacol Biochem Behav* 71: 493-500.

- Shekhar A, Johnson PL, Sajdyk TJ, Fitz SD, Keim SR, Kelley PE, Gehlert DR, DiMicco JA (2006) Angiotensin-II is a putative neurotransmitter in lactate-induced panic-like responses in rats with disruption of GABAergic inhibition in the dorsomedial hypothalamus . *J Neurosci* 26: 9205-9215.
- Stein MB, Tancer ME, Uhde TW (1992) Heart rate and plasma norepinephrine responsivity to orthostatic challenge in anxiety disorders. Comparison of patients with panic disorder and social phobia and normal control subjects. *Arch Gen Psychiatry* 49: 311-317.
- Talley EM, Solorzano G, Lei Q, Kim D, Bayliss DA (2001) CNS distribution of members of the two-pore-domain (KCNK) potassium channel family. *J Neurosci* 21: 7491-7505.
- Teppema LJ, Veening JG, Kranenburg A, Dahan A, Berkenbosch A, Olivier C (1997) Expression of c-fos in the rat brainstem after exposure to hypoxia and to normoxic and hyperoxic hypercapnia. *J Comp Neurol* 388(2): 169-190.
- Trapp S, Aller MI, Wisden W, Gourine AV (2008) A role for TASK-1 (KCNK3) channels in the chemosensory control of breathing. *J Neurosci* 28(35): 8844-8850.
- Vibert JF, Bertrand F, Denavit-Saubié M, Hugelin A (1976) Three dimensional representation of bulbo-pontine respiratory networks architecture from unit density maps. *Brain Res* 114: 227-244.
- Villela DC, da Silva LG,Jr., Fontes MA (2009) Activation of 5-HT receptors in the periaqueductal gray attenuates the tachycardia evoked from dorsomedial hypothalamus. *Auton Neurosci* 148: 36-43.

- Washburn CP, Sirois JE, Talley EM, Guyenet PG, Bayliss DA (2002) Serotonergic raphe neurons express TASK channel transcripts and a TASK-like pH- and halothane-sensitive K⁺ conductance. *J Neurosci* 22: 1256-1265.
- Washburn CP, Bayliss DA, Guyenet PG (2003) Cardiorespiratory neurons of the rat ventrolateral medulla contain TASK-1 and TASK-3 channel mRNA. *Respir Physiol Neurobiol* 138: 19-35.
- Woods SW, Charney DS, Lake J, Goodman WR, Redmond DE, Heninger GR (1986) Carbon dioxide sensitivity in panic anxiety. *Arch Gen Psychiatry* 43: 900-909.
- Zaretskaia MV, Zaretsky DV, Shekhar A, DiMicco JA (2002) Chemical stimulation of the dorsomedial hypothalamus evokes non-shivering thermogenesis in anesthetized rats. *Brain Res* 928: 113-125.
- Zhang W, Hayward LF, Davenport PW (2007) Respiratory responses elicited by rostral versus caudal dorsal periaqueductal gray stimulation in rats. *Auton Neurosci* 134: 45-54.

RESULTADOS EXPERIMENTAIS

EFEITOS DO DIÓXIDO DE CARBONO E CIANETO DE POTÁSSIO SOBRE OS LIMIARES DAS RESPOSTAS DE DEFESA INDUZIDAS PELA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DA MATÉRIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL DORSAL DE RATOS

1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo verificou se o modelo de ataques de pânico por estimulação da MCPAd é sensível à hipóxia ou hipercapnia, estabelecendo novos paralelos com a clínica.

2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Verificar os efeitos do dióxido de carbono sobre os limiares dos comportamentos de defesa induzidos por estimulação elétrica da matéria cinzenta periaquedutal dorsal.
2. Verificar as respostas comportamentais de ratos à hipóxia induzida por doses subletais de cianeto de potássio.
3. Verificar os efeitos do cianeto de potássio sobre os limiares dos comportamentos de defesa induzidos por estimulação elétrica da matéria cinzenta periaquedutal dorsal.

4. Verificar os efeitos da lesão eletrolítica da matéria cinzenta periaqueducal dorsal sobre as respostas comportamentais à administração endovenosa de doses subletais de cianeto de potássio.

3 INTRODUÇÃO

Tanto a infusão de lactato de sódio (0,5 M, E.V.) quanto a inalação de dióxido de carbono (CO₂ 5%) precipitam ataques de pânico em pacientes predispostos a estes ataques, sendo inócuos em indivíduos sadios (Pitts e McClure, 1967; Klein, 1993a,b; Preter e Klein, 2007). Adicionalmente, pacientes com transtorno de pânico (TP) apresentam respiração irregular, incluindo hiperventilação durante os ataques e ansiedade aumentada à inalação de CO₂ (Gorman et al., 1997). O TP também apresenta alta comorbidade com doenças respiratórias, tais como a asma e doença pulmonar obstrutiva crônica (Preter e Klein, 2007). Pacientes que apresentam ataques de pânico ao CO₂ são, no entanto, um subconjunto dos pacientes que respondem ao lactato (Klein, 1993b).

Tendo em vista estes e outros fatos, Klein (1993a) propôs uma teoria baseada na hipersensibilidade dos pacientes ao lactato e CO₂, na qual ele sugere que os ataques de pânico sejam devidos a um alarme falso de sufocamento. A teoria do alarme falso de sufocamento postula a existência de um 'sistema de alarme' que monitora as informações sobre o perigo iminente de sufocamento, deflagrando as respostas comportamentais adequadas à situação. Este alarme produziria um repentino desconforto respiratório seguido por uma breve hiperventilação, pânico e desejo de fuga. A hipersensibilidade dos pacientes de pânico ao CO₂ e lactato seria, portanto, interpretada como uma anormalidade do monitor de sufocamento.

A dificuldade de interpretação dos estudos clínicos constitui um forte ensejo para o desenvolvimento de um modelo experimental de ataque de pânico em animais. Neste sentido, as repostas à estimulação elétrica da matéria cinzenta periaquedutal (MCPA) têm sido propostas como um modelo experimental de

ataque de pânico (Gentil, 1988; Deakin e Graeff, 1991; Jenck et al., 1995; Schenberg et al., 2001). De fato, Nashold e colaboradores (1969) mostraram que a estimulação intracraniana do teto do mesencéfalo de humanos produz ansiedade, pânico, terror e sentimentos de morte iminente acompanhados por sinais neurológicos e respostas viscerais que reproduzem os sintomas cardinais dos ataques de pânico. A localização dos eletrodos por raio-X mostrou que os sítios eficazes encontravam-se na metade dorsal da MCPA (MCPAd).

Em ratos, a estimulação da MCPAd com estímulos de baixa magnitude produz uma reação de imobilidade tensa e exoftalmia. Em contraste, estímulos mais intensos produzem comportamento de fuga compreendendo galopes e saltos (Bittencourt et al., 2004; Schenberg et al., 2005). Mais importante, a resposta de galope é seletivamente atenuada por antidepressivos em doses e regime de administração similares aos empregados na terapia do TP (Schenberg et al., 2001, 2002; Vargas e Schenberg, 2001). Conseqüentemente, o galope foi sugerido como a resposta mais representativa dos ataques de pânico (Schenberg et al., 2001).

Por outro lado, estudos com imunoistoquímica da proteína c-fos mostraram que a atividade da MCPA de ratos e gatos é alterada na anóxia, hipóxia, hiperóxia ou hipercapnia (Teppema et al., 1997; Berquin et al., 2000;). Em adição, Hayward e Von Reitzenstein (2002) verificaram que o KCN ativa a MCPAd, indicando a participação desta estrutura nos respostas, tanto comportamentais quanto viscerais, à hipóxia. Contudo, enquanto o KCN produz a ativação da MCPAd, o CO₂ ativa os distritos caudais da MCPA ventrolateral (MCPAvl). Estes dados sugerem que a MCPA possa ser o monitor de

sufocamento que é disparado erroneamente durante os ataques de pânico (Klein, 1993b; Preter e Klein, 2007). Conseqüentemente, o presente estudo examinou os efeitos comportamentais da inalação de CO₂ e infusão de KCN, um modelo de hipóxia citotóxica (Sato et al., 1991; Barros et al., 2002), tanto isoladamente quanto combinados à estimulação elétrica ou à lesão da MCPAd.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos albinos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) (n = 60), machos, pesando entre 230 e 260 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 (25 x 15 x 30 cm) e assoalho coberto com jornal e maravalha. Os ratos tinham livre acesso à água e comida e eram mantidos em ambiente com ciclo de iluminação de 12 h (luzes acessas às 6:00 h) e temperatura controlada (20-25°C). Os experimentos e cuidados com os animais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais desta universidade (CEUA-UFES).

4.2 ELETRODO

Os eletrodos eram confeccionados com um fio de aço inoxidável (Califórnia Fine Wire Company, Grover City, CA, EUA) de 250 µm de diâmetro externo e isolado em toda extensão, exceto na secção transversal de sua extremidade. Um outro fio de aço inoxidável, não isolado, servia como eletrodo indiferente. Os eletrodos eram soldados a um soquete de circuito integrado (Celis, BCPT 50, São Paulo, SP, Brasil).

4.3 IMPLANTAÇÃO DOS ELETRODOS

Os animais eram anestesiados com hidrato de cloral (400 mg/kg, I.P.) e fixados num aparelho estereotáxico (David Kopf, Tujunga, EUA) com o bregma e lambda no mesmo plano. A perda de temperatura corporal era minimizada envolvendo-se o animal com uma manta. Em seguida, após a infusão subcutânea com 0,2 ml Lidocaína (1%, CEME, São Paulo, SP) e a exposição da calota craniana a altura do lambda, procedia-se à raspagem, limpeza e secagem da área. Em seguida, eram feitos 4 orifícios com o auxílio de uma broca odontológica, 2 nos ossos parietais e 2 no interparietal, para fixação de pequenos parafusos de aço inoxidável que serviam de âncora para a prótese cirúrgica. Com o auxílio de uma broca adiamantada (KG Sorensen 1016, São Paulo, SP), realizava-se uma trepanação ao nível do lambda e expunha-se o cérebro à altura do seio venoso. O eletrodo era então dirigido à região dorsolateral da MCPA de acordo com as coordenadas: 7,6 mm posterior ao bregma, 0,5 mm lateral ao plano sagital e 4,5 mm a partir da superfície do seio venoso, tendo-se o cuidado de afastar o seio venoso durante a introdução do eletrodo para evitar a ruptura do mesmo. Para superar a resistência à penetração do eletrodo no cérebro, fazia-se uma pequena incisão na dura-máter com auxílio de uma agulha hipodérmica. Após a implantação do eletrodo ativo, o eletrodo indiferente era soldado a um dos parafusos e o campo cirúrgico era preenchido com resina acrílica autopolimerizável (JET, São Paulo, BRI) para formar uma prótese sólida. Um tubo plástico com 2,0 cm de altura e 1,0 cm de diâmetro ao redor da região cirúrgica servia de proteção do eletrodo. Ao término da cirurgia os animais receberam

tratamento profilático com 24.000 UI de penicilina-G benzatina (I.M.) e eram mantidos em placa aquecida à 30° C até a recuperação.

4.4 CANULAÇÃO DA VEIA JUGULAR

Os animais eram anestesiados com hidrato de cloral (400 mg/kg, I.P.) e colocados em posição supina numa mesa cirúrgica com os membros fixados. Em seguida, realizava-se uma tricotomia ao nível do pescoço, do lado direito do animal. Uma incisão de aproximadamente 1,5 cm permitia a localização e acesso à veia jugular externa. Após a dissecação e isolamento do vaso, realizava-se um pequeno orifício na veia para introdução de um cateter de silastic preenchido com solução de salina e heparina (5.000 UI/0,25 ml, Cristália, São Paulo, SP). O cateter era, então, conduzido até o átrio direito e fixado com linha de algodão. Por fim, a extremidade livre do cateter era conduzida por meio de um trocáter sob a pele da região dorsal e exposta ao nível da nuca. Após a sutura das incisões, os animais eram mantidos numa placa aquecida à 30°C até a recuperação da anestesia.

4.5 CALIBRAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE DIÓXIDO DE CARBONO NA CÂMARA GASOSA

A câmara de gás consistia num cilindro de acrílico transparente, com 60 cm de altura e diâmetro, provido de tampa e exaustor para renovação de ar. A câmara estava conectada a um cilindro de CO₂ à pressão de 60 bar. Uma válvula permitia a administração do CO₂, à pressão de vapor e fluxo nominal de 27 l/min. Após a administração do CO₂ por 15 e 30 s, as concentrações da câmara eram medidas pelo analisador de gás Testoryt (Confor Instrumentos de Medição Ltda, São Paulo, Brasil). As medidas eram repetidas após 0,5; 1; 2; 3; 4 e 5 min, utilizando ou não o sistema de exaustão.

4.6 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

4.6.1 Experimento 1: Efeitos do CO₂ sobre os limiares dos comportamentos de defesa induzidos por estimulação elétrica da MCPAd. Cinco dias após a cirurgia de implantação do eletrodo, os ratos (n=20) eram colocados numa câmara gasosa situada numa sala com som atenuado e temperatura controlada (23-25°C) e conectados a um estimulador de onda senoidal (60 Hz) de corrente constante (FDV, Ribeirão Preto, SP, BR). Os estímulos eram monitorados através de um osciloscópio (Hitachi-Denshi, Malásia) e aplicados por meio de um conector giratório de mercúrio que permitia a livre movimentação dos animais. Após um período de habituação de 10 min, os ratos eram submetidos a sessões de

estimulação em atmosfera normal ou após a administração de CO₂ por 15 ou 30 s. As sessões eram realizadas em intervalos de 24 h, segundo um desenho balanceado. Estímulos de 30 s de duração eram aplicados em intensidades crescentes, em passos de 5 µA, até a produção das respostas de galope e/ou salto ou a corrente máxima de 60 µA. O intervalo entre estímulos foi de 2 min até a apresentação da primeira resposta de defesa e, subsequentemente, de 5 min. Após o término de cada estímulo, o sistema de exaustão era acionado para renovação do ar.

4.6.2 Experimento 2: Efeitos comportamentais da administração endovenosa de KCN. No dia seguinte à cirurgia de implantação da cânula jugular, os animais (n=20) eram colocados numa arena de acrílico transparente, com 60 cm de altura e diâmetro, situada numa sala com som atenuado e temperatura controlada (23-25 °C). Após um período de habituação de 10 min, o KCN era administrado por meio de uma cânula de polietileno (PE10, Clay Adams, EUA) de 80 cm de comprimento, suspensa sobre a arena, permitindo a livre movimentação do animal. Os ratos eram administrados diariamente com uma única dose de KCN (Cromoline Química Fina Ltda, São Paulo, SP, BR). Doses de 10, 20, 40, 80 ou 160 µg foram administradas no volume de 0,1 ml, segundo desenho balanceado, registrando-se os comportamentos apresentados pelo animal. Ao término desse experimento os animais eram sacrificados com 1,5 doses de hidrato de cloral.

4.6.3 Experimento 3: Efeitos do KCN sobre os limiares dos comportamentos de defesa induzidos por estimulação elétrica e lesão eletrolítica da MCPAd. Ratos

(n=20) que apresentaram a resposta de galope com intensidades menores que 60 μ A na sessão-controle foram submetidos a canulação da veia jugular. No dia seguinte, os animais eram conectados a um estimulador elétrico e a uma bomba de infusão (Insight, Ribeirão Preto, SP, BR) e colocados na arena de estimulação. Após a habituação, os ratos eram submetidos à estimulação da MCPAd simultaneamente à infusão com salina ou com uma dose de KCN próxima à DE_{50} do trote (20 μ g/ 0,1 ml/ 30 s, E.V.). As estimulações foram realizadas em intervalos de 10 min. As infusões de salina e KCN foram realizadas nos mesmos animais em ordem balanceada em intervalos de 24 h. Um dia após a última estimulação, o rato era anestesiado e conectado ao lesionador (FDV, Modelo LE3, Ribeirão Preto, SP, BR) para lesão eletrolítica da MCPAd por meio de corrente anódica (1 mA, 5 s). No dia seguinte à lesão, os ratos eram administrados com uma dose de KCN 40% maior que a DE_{50} da resposta de galope (80 μ g/ 0,1ml, E.V.), registrando-se comportamentos durante 1 min.

4.7 REGISTROS COMPORTAMENTAIS

Os comportamentos dos animais eram avaliados por observação direta do experimentador, posicionado a aproximadamente 50 cm da câmara de gás ou da arena de estimulação. As respostas limiáres, isto é, aquelas emitidas com as menores intensidades de corrente e doses de KCN, eram registradas de modo binário, como 'emitidas' ou 'não', independentemente de sua frequência ou duração durante a estimulação ou injeção de KCN. Os comportamentos

defensivos eram registrados de acordo com o etograma abaixo (Bittencourt et al., 2004).

- Dormir – Postura horizontal com olhos fechados e sem atividade olfativa, e com relaxamento muscular indicado pelo rebaixamento do tronco, cabeça e pescoço e pela flexão dos membros.
- Repouso – Postura horizontal com olhos abertos ou semi-abertos, atividade olfativa reduzida e relaxamento muscular indicado pelo rebaixamento do tronco e pela flexão dos membros, e/ou rebaixamento da cabeça e pescoço. Com a cabeça erguida o rato assume uma “postura de esfinge”.
- Olfação – Jorros de atividade olfativa indicada pelo movimento do focinho e vibrissas.
- Esquadrinhar – Exploração visuo-motora do ambiente caracterizada por movimentos laterais da cabeça, geralmente, acompanhados de olfação.
- Autolimpeza – Postura ereta sobre as patas posteriores flexionadas (“rato sentado”), acompanhada da manipulação repetitiva e seqüencial dos pêlos da cabeça, tronco e genitálias, usando as patas dianteiras ou a boca.
- Levantar – Postura ereta com extensão das patas posteriores.
- Marcha – Locomoção lenta do animal com movimentos de apoio e balanço em oposição de fase das patas contralaterais.

Imobilidade Tensa (IMO) – Cessar brusco de todos os movimentos, exceto da respiração, freqüentemente acompanhado, da extensão dos membros, elevação do tronco, orelhas e pescoço e, às vezes, da cauda, indicando o aumento do tônus muscular. O cessar brusco das atividades podia resultar em posturas anômalas.

Trote (TRT) – Locomoção rápida do animal ao longo do perímetro da arena (peritaxia) mantendo o padrão da marcha.

Galope (GLP) – Locomoção muito rápida ao longo do perímetro da arena, alternando movimentos de apoio e projeção dos membros anteriores e posteriores.

Saltos (SLT) – Impulso vertical ou oblíquo em direção à borda da arena.

Exoftalmia (EXO) – Abertura máxima dos olhos que assume a forma esférica e cor brilhante, presumivelmente, devida a uma maior entrada de luz.

Defecação (DEF) – Eliminação de fezes.

Micção (MIC) – Eliminação de urina.

4.8 HISTOLOGIA

Ao término da estimulação os animais eram anestesiados por via intraperitoneal com hidrato de cloral (400 mg/kg) e perfundidos por via intracardíaca através de uma bomba peristáltica (Masterflex CE, Barrington, IL, EUA), com 200 ml de solução salina (NaCl 0,9%) seguidos por 200 ml de solução de formaldeído (10%). Os ratos eram decapitados e as cabeças eram

armazenadas em formaldeído por, no mínimo, 5 dias, para a moldagem do trato do eletrodo. Em seguida, os cérebros eram removidos e mantidos em solução de formaldeído por mais 5 dias. Após isto, os cérebros eram preparados em blocos mesencefálicos, seccionados num vibrátomo (Vibratome, EUA) em fatias com 80 µm de espessura, estendidos em lâminas gelatinizadas, desidratados em baixa temperatura (38°C), corados com vermelho neutro (Sigma, EUA) e montados com DPX (Aldrich Chemical Company, Milwaukee, EUA). Os cortes foram analisados em baixo aumento com o auxílio de um microscópio (Nikon Eclipse 80i, Japão) e câmera lúcida (Nikon Y-IDT, Japão). Os sítios estimulados e as lesões foram registrados em diagramas coronais do atlas do cérebro do rato (Paxinos e Watson, 1998).

4.9 ESTATÍSTICA

4.9.1 Determinação das curvas de resposta à estimulação elétrica e ao KCN: As curvas intensidade e dose-resposta foram obtidas pelo ajuste logístico das freqüências acumuladas das respostas limiaries em função do logaritmo da intensidade de corrente ou da dose de KCN, de acordo com o modelo:

$$P(y_{ij}|x_{ij}) = [1 + \exp(-(\alpha_j + \beta_j x_{ij}))]^{-1}$$

onde P é a probabilidade esperada da resposta y_{ij} para um dado estímulo x_{ij} , α_j é o intercepto e β_j a inclinação da j ésima curva de KCN (comparação entre as curvas das respostas comportamentais ao KCN) ou da estimulação da MCPAd (comparação entre as curvas controle, CO₂ 8% e CO₂ 13%). Ajustes logísticos

significantes foram avaliados pelo χ^2 de Wald ($\chi^2_w = [\beta/EP]^2$), onde EP é o erro padrão de β_j . As curvas intensidade-resposta ou dose-resposta foram parametrizadas por meio de variáveis indicadoras (0 e 1) e comparadas através de testes de coincidência por razão de verossimilhanças, para locação ou paralelismo das regressões. As regressões foram comparadas pela diferença dos desvios de verossimilhança do modelo completo (k parâmetros) e dos modelos reduzidos ($k-r$ parâmetros), proporcionando valores de χ^2 com r graus de liberdade (χ^2_r). Os χ^2_r testes gerais de locação e paralelismo, assim como o χ^2 de Wald, foram considerados significantes ao nível de 5%. Os χ^2_r dos testes pareados de locação e paralelismo (1 g.l.) foram considerados significantes ao nível de 5% segundo o critério de Bonferroni. O ajuste por máxima verossimilhança foi realizado pelo procedimento "Logistic" do programa SAS (SAS®, Cary, EUA).

As medianas ($M_{50} = I_{50}$ ou DE_{50}) assim como seus respectivos erros padrões (EP) e o intervalo de confiança (IC95%) foram computados pelas fórmulas que se seguem:

$$\text{Log}(M_{50}) = -\alpha/\beta$$

$$M_{50} = 10^{-\alpha/\beta}$$

$$\text{EP}\{\text{Log}(M_{50})\} = \{[\text{Var}(\alpha) - 2(\alpha/\beta)\text{Cov}(\alpha, \beta) + (\alpha/\beta)^2\text{Var}(\beta)] / \beta^2\}^{1/2}$$

$$\text{EP}(M_{50}) = M_{50}\{\text{EP}[\text{Log}(M_{50})]\}$$

$$\text{IC95\%}(M_{50}) = M_{50} \pm 1,96\{\text{EP}(M_{50})\}$$

onde as variâncias (Var) e covariâncias (Cov) dos parâmetros foram obtidas pela matriz estimada de covariância do procedimento Logistic. A descrição detalhada destes métodos pode ser encontrada em Collett (2003).

4.9.2 Análise dos efeitos da lesão da MCPAd sobre as respostas ao KCN: As proporções dos ratos que apresentaram uma dada resposta antes e após a lesão da MCPAd foram comparadas pelo χ^2 de Pearson. As diferenças foram consideradas significantes para $P < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 CALIBRAÇÃO DA CÂMARA GASOSA

A calibração mostrou que 15 e 30 s após a abertura da válvula, o CO_2 da câmara atingia os valores de 8% e 13%, respectivamente. Adicionalmente, o acionamento do sistema de exaustão por apenas 2 min era suficiente para a exaustão de todo CO_2 . Todavia, com o sistema de exaustão desligado, a concentração do CO_2 manteve-se praticamente estável durante 5 min (Fig.1).

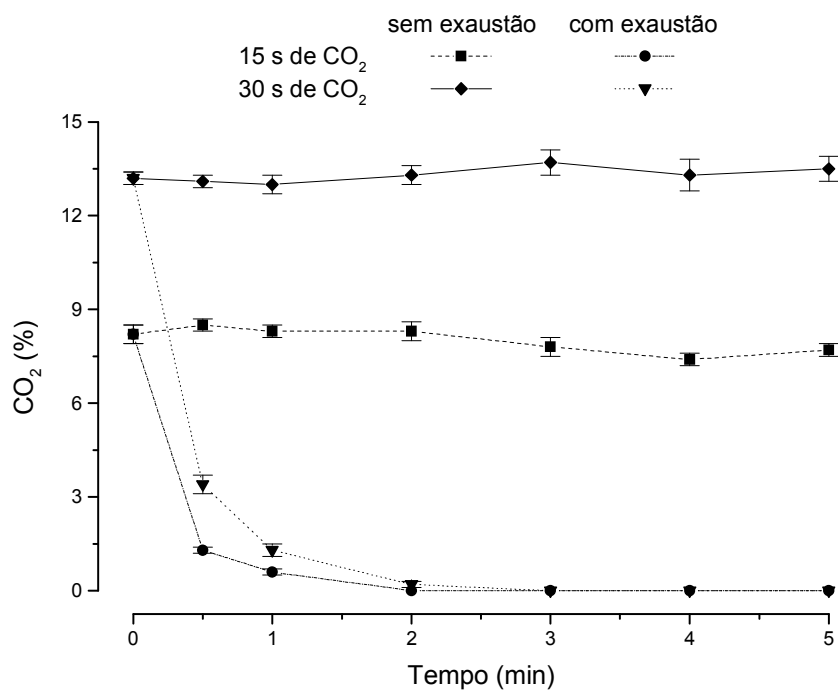


Figura 1. Curso temporal da concentração de CO_2 infundido por 15 e 30 s, com ou sem o acionamento do sistema de exaustão.

5.2 EFEITOS COMPORTAMENTAIS DO CO₂

Um grupo de 20 animais foi observado durante 1 min numa atmosfera de 13% de CO₂. Ao invés de respostas defensivas, os ratos permaneceram em repouso, com um aparente relaxamento muscular, conforme indicado pelo rebaixamento do tronco, cabeça e cauda. Contudo, permaneceram de olhos abertos durante todo procedimento. Ao final da exposição ao CO₂, os ratos apresentaram uma recuperação rápida dos comportamentos espontâneos.

5.3 EFEITOS COMPORTAMENTAIS DO KCN

Embora transientes, o KCN eliciou as respostas de defesa usualmente descritas para o rato e outras espécies. Efeitos dose-dependentes significantes foram observados para exoftalmia ($P < 0,05$) e, de forma mais clara, imobilidade ($P < 0,0001$), defecação ($P < 0,0001$), micção ($P < 0,005$), trote ($P < 0,0001$) e galope ($P < 0,0001$) (Fig.2). Contudo, a resposta de salto foi produzida em um rato apenas.

As curvas de limiares das respostas ao KCN foram acentuadamente diferentes ($\chi^2 = 98,9$; 5 g.l., $P < 0,0001$). Tal como observamos na estimulação elétrica e química da MCPAd, a exoftalmia foi eliciada nas menores doses, diferindo significativamente do trote, defecação e galope (Figs.2-3, Tabela 1). Em contraste, o galope foi eliciado com as maiores doses, apresentando DE₅₀ maior

que todas as outras respostas (Fig.3, Tabela 1). As medianas de trote e defecação também foram maiores que aquela da micção (Fig. 3, Tabela 1).

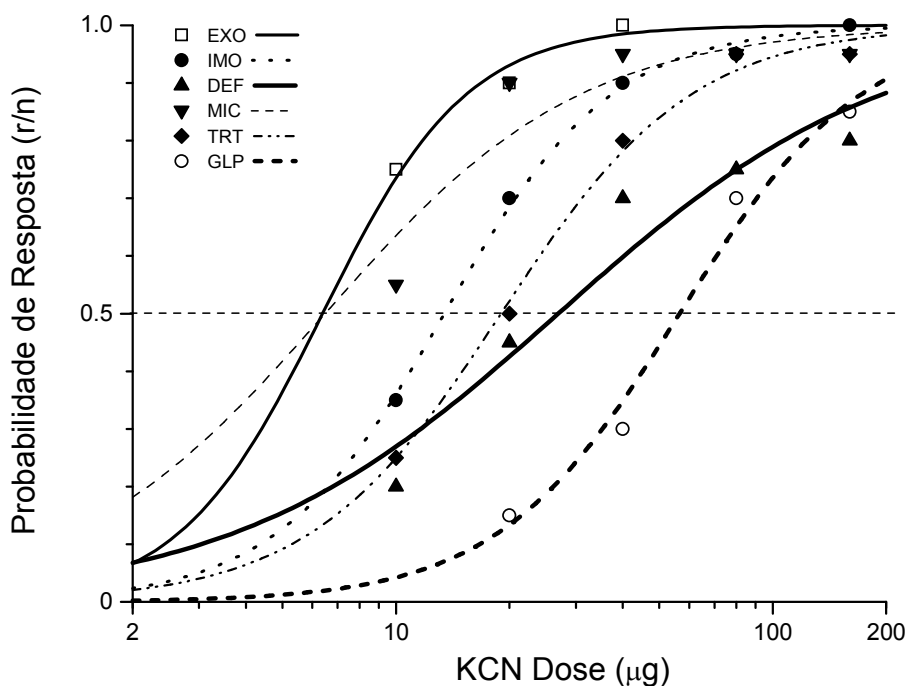


Figura 2. Curvas dose-resposta à injeção endovenosa de KCN. As curvas representam as funções logísticas das freqüências acumuladas das respostas limiaries em função do logaritmo da dose de KCN. Abscissa em escala logarítmica.

Tabela 1. Comparação das curvas de probabilidade de resposta ao KCN. Os valores representam o χ^2 da razão de verossimilhanças e probabilidades associadas das comparações pareadas (1 g.l).

	Imobilidade	Trote	Defecação	Galope
Exoftalmia		23,7 P<0,0001	32,9 P<0,0001	55,0 P<0,0001
Micção	11,7 P<0.0001	12,3 P<0,0005	21,5 P<0,0001	50,7 P<0,0001
Imobilidade			8,3 P<0,005	34,8 P<0,0001
Trote				22,0 P<0,0001
Defecação				11,3 P<0,001

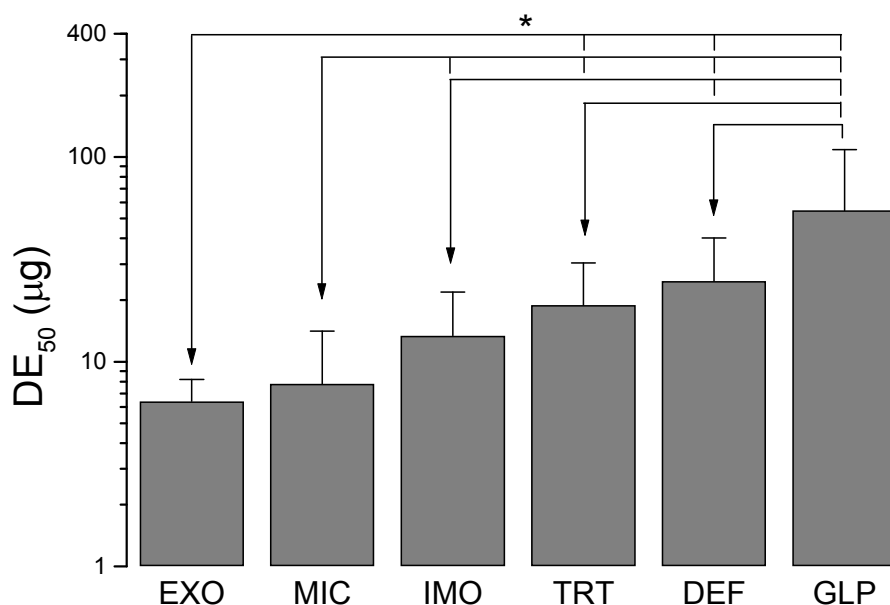


Figura 3. Medianas das respostas de defesa (\pm l.C.95%) produzidas pela injeção endovenosa de KCN. * $P < 0,05$; diferenças significativas em relação à DE_{50} indicada pela seta (teste do χ^2 da razão de verossimilhança para locação, critério de Bonferroni). Ordenada em escala logarítmica.

5.4 EFEITOS DO CO₂ SOBRE OS LIMIARES DOS COMPORTAMENTOS DE DEFESA INDUZIDOS POR ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DA MCPAd

As curvas de probabilidade de resposta na ausência ou durante a exposição ao CO₂ nas concentrações de 8% e 13% foram estatisticamente diferentes para a exoftalmia ($\chi^2=9,1$; 2 g.l., $P < 0,01$), imobilidade ($\chi^2=13,6$; 2 g.l., $P < 0,001$), defecação ($\chi^2=41,8$; 2 g.l., $P < 0,0001$), micção ($\chi^2=30,6$; 2 g.l., $P < 0,0001$), trote ($\chi^2= 18,8$; 2 g.l., $P < 0,001$) e galope ($\chi^2=48,4$; 2 g.l., $P < 0,001$).

Contudo, as curvas diferiram apenas marginalmente para a resposta de salto ($\chi^2=5,6$; 2 g.l., $P<0,06$).

A comparação pareada mostrou que embora o CO₂ tenha produzido um aumento significativo dos limiares de imobilidade, trote e galope, os limiares de defecação foram marcadamente facilitados na concentração de 8% ($\Delta I_{50}=-53\%$) e os limiares de micção nas concentrações de 8% ($\Delta I_{50}=-69\%$) e 13% ($\Delta I_{50}=-54\%$) (Fig. 4, Tabela 2). Por sua vez, a exoftalmia somente foi facilitada pelo CO₂ 13% e a resposta de salto não foi alterada por nenhuma das concentrações.

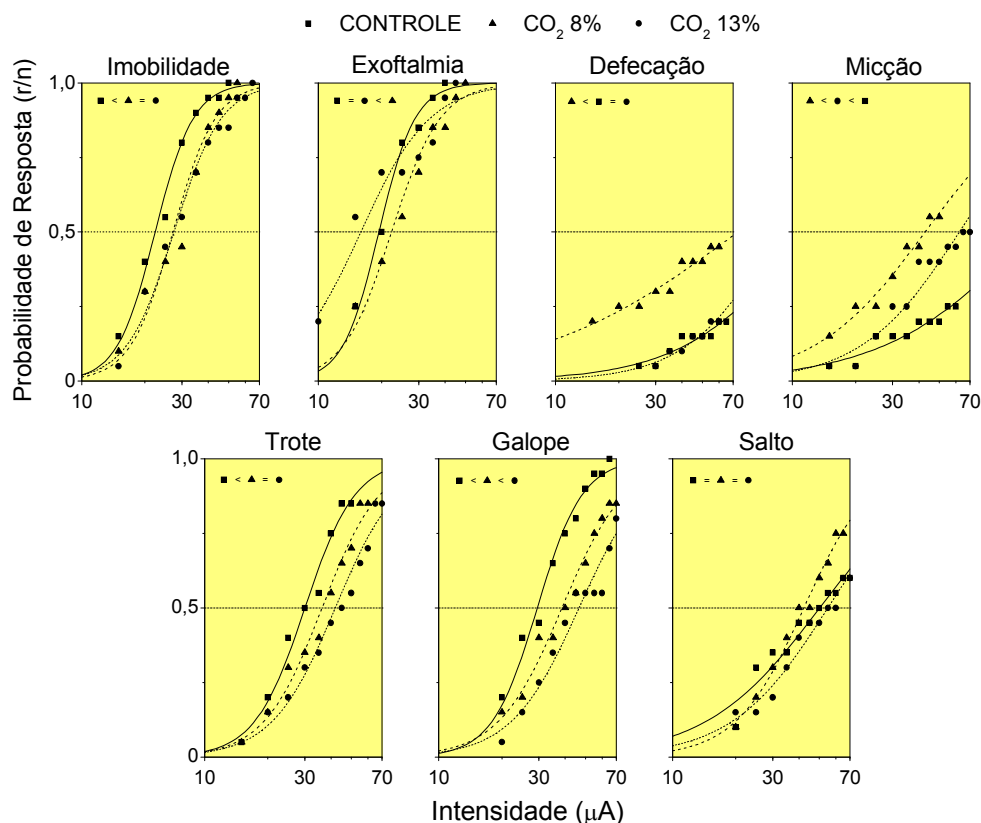


Figura 4. Efeitos do CO₂ sobre os limiares das respostas de defesa induzidas por estimulação elétrica da MCPAd. As curvas de probabilidade representam as funções logísticas das frequências acumuladas de resposta em função do logaritmo da intensidade. As desigualdades indicam diferenças significantes de locação (teste do χ^2 da razão de verossimilhanças, critério de Bonferroni para $P<0,05$).

Tabela 2: Efeitos das concentrações de 8% e 13% de CO₂ sobre os limiares das respostas de defesa induzidas por estimulação da MCPAd, *ns* – não significante.

Resp	Grupo	I ₅₀ ±EP (µA)	ΔI ₅₀ (%)	CTRL vs CO ₂		CO ₂ 8% vs CO ₂ 13%	
				χ ²	P<	χ ²	P<
IMO	CTRL	22,4±0,2					
	8%	27,1±0,2	21	9,4	0,005		
	13%	27,5±0,3	23	11,5	0,001	0,2	<i>ns</i>
EXO	CTRL	19,4±0,2					
	8%	22,3±0,3	15	5,8	0,05		
	13%	15,9±0,4	-18	0,3	<i>ns</i>	7,1	0,01
DEF	CTRL	156,7±37,6					
	8%	73,6±8,9	-53	32,5	0,001		
	13%	114,3±25,7	-27	0	<i>ns</i>	25,4	0,001
MIC	CTRL	136,4±30,0					
	8%	42,7±1,4	-69	28,3	0,001		
	13%	62,2±1,7	-54	9,3	0,005	9,3	0,005
TRT	CTRL	30,0±0,1					
	8%	36,2±0,1	21	6,3	0,01		
	13%	41,9±0,3	39	17,7	0,001	3,8	<i>ns</i>
GLP	CTRL	29,4±0,3					
	8%	38,6±0,3	31	19,2	0,001		
	13%	46,5±0,3	58	47,7	0,001	6,5	0,01
SLT	CTRL	50,2±0,6					
	8%	42,2±0,0	-16	1,9	<i>ns</i>		
	13%	54,9±0,9	9	1,0	<i>ns</i>	5,9	0,05

5.5 EFEITOS DO KCN SOBRE OS LIMIARES DOS COMPORTAMENTOS DE DEFESA INDUZIDOS POR ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DA MCPAd

O KCN facilitou as respostas de exoftalmia, imobilidade, defecação, trote, galope e salto (Fig. 5). Contudo, a redução dos limiares somente foi estatisticamente significativa para as respostas de trote ($\chi^2= 7,8$; 1 g.l., $P<0,01$) e galope ($\chi^2= 4,5$; 1 g.l., $P<0,05$), alcançando significância apenas marginal para a imobilidade ($\chi^2= 3,2$; 1 g.l., $P<0,07$).

Embora o KCN e o CO₂ tenham reduzido os limiares respectivos da micção espontânea e evocada, o KCN causou um aumento marginalmente significativo dos limiares da micção evocada por estímulo elétrico ($\chi^2 = 3,6$; 1 g.l., $P < 0,06$).

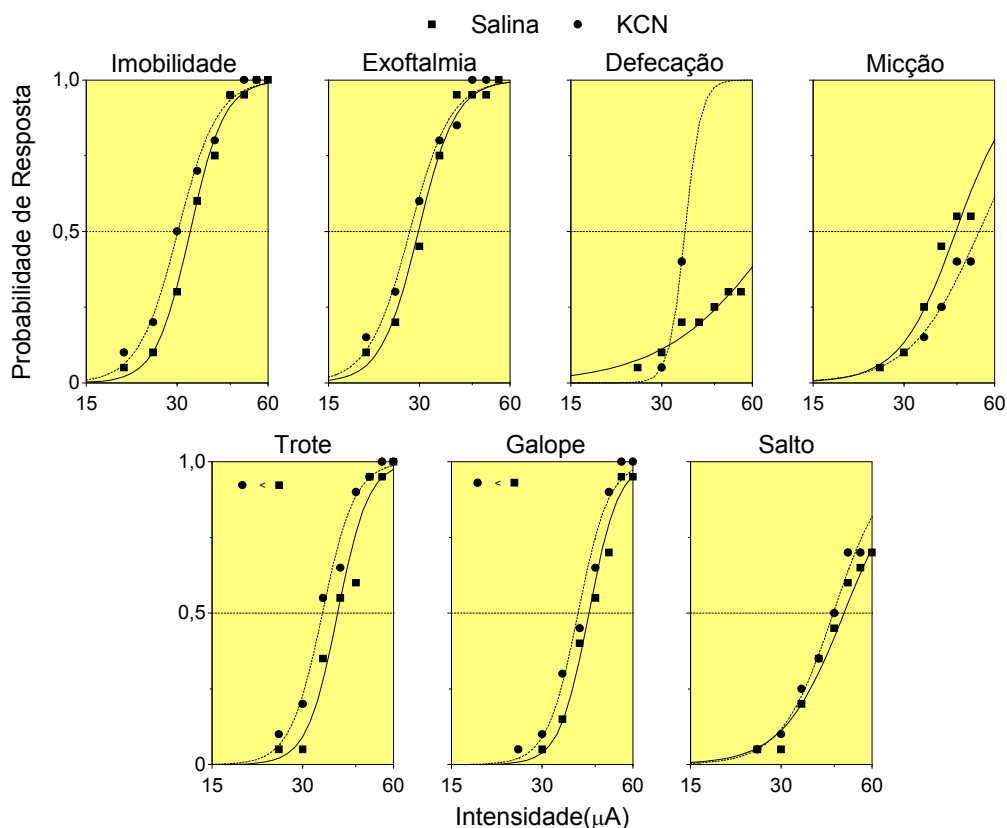


Figura 5. Efeitos da injeção de KCN (20 µg/ 0,1 ml) sobre os limiares das respostas de defesa induzidas por estimulação elétrica da MCPAd. As desigualdades indicam diferenças significantes para $P < 0,05$ (teste do χ^2 da razão de verossimilhanças para locação das curvas).

No caso da defecação, o KCN produziu a resposta em apenas 8 ratos, 1 na intensidade de 30 µA e os outros 7 em 35 µA. Portanto, não foi possível o ajuste significativo da regressão logística, bem como a obtenção de

estimativas consistentes da I_{50} e a comparação das respostas ao KCN com aquelas do grupo salina (Fig. 5).

5.6 HIERARQUIA DAS RESPOSTAS DE DEFESA AO KCN E ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DO CO_2

A despeito da semelhança das respostas à estimulação elétrica e ao KCN, os repertórios apresentaram diferenças importantes de hierarquia. Estas diferenças estão representadas pela razão das medianas de cada resposta ($M_{50}=I_{50}$ ou DE_{50}) e a mediana da exoftalmia ($M_{50}Exo$) (Fig. 6). Comparados aos ratos com estimulação elétrica isolada da MCPAd (CTRL), os ratos expostos ao CO_2 (CO_2 8%+EE) ou infundidos com KCN (KCN+EE) apresentaram uma redução acentuada na amplitude dos limiares medianos, a qual passou de 8 para aproximadamente 2 vezes o limiar da exoftalmia. (Fig. 6). Estes efeitos foram mais pronunciados no grupo KCN+EE e devidos, principalmente, à redução dos limiares de defecação, micção e salto.

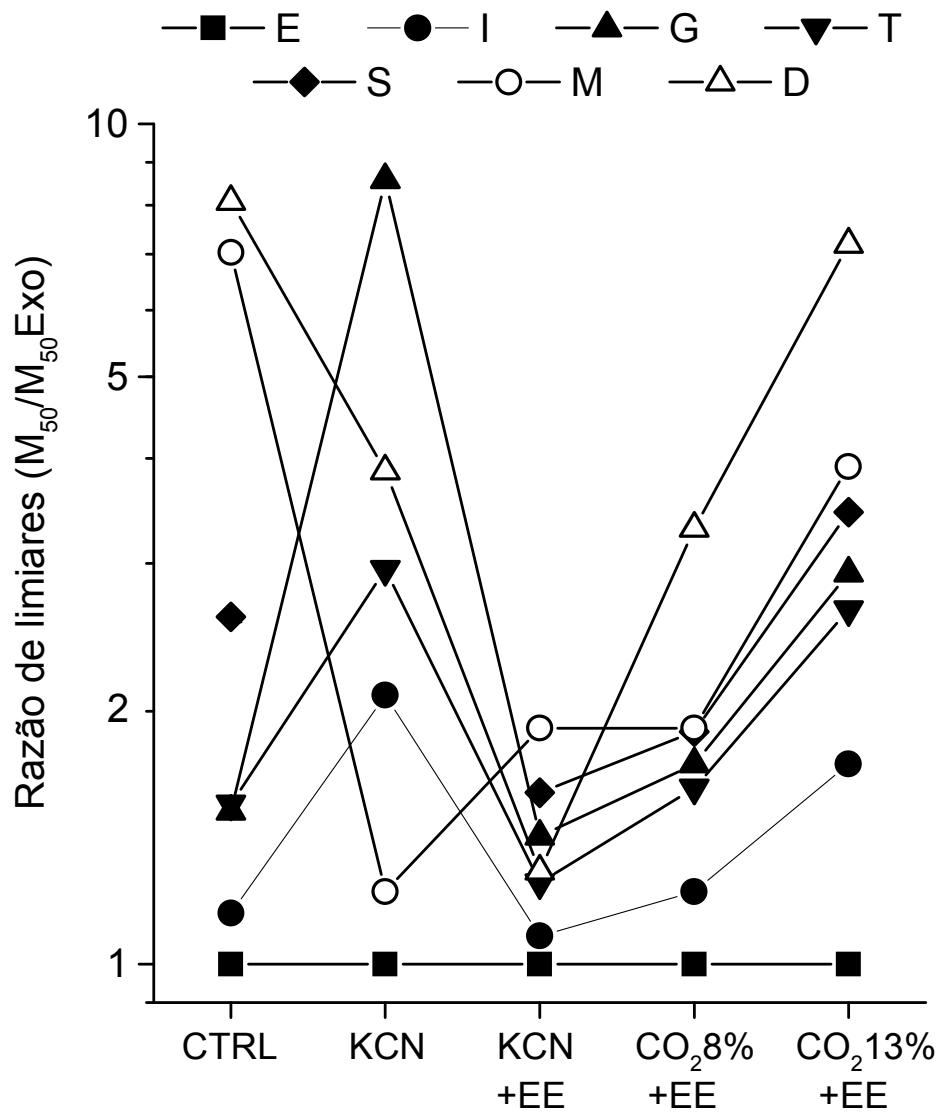


Figura 6: Hierarquia das respostas de defesa em sessão controle, KCN, KCN com estímulo elétrico, CO₂ 8% com estímulo elétrico e, CO₂ 13% com estímulo elétrico. Razão dos valores medianos das respostas pelo valor mediano da exoftalmia.

5.7 EFEITOS DA LESÃO ELETROLÍTICA DA MCPAd SOBRE AS RESPOSTAS ELICIADAS PELA INJEÇÃO ENDOVENOSA DE KCN

Os eletrodos de lesão eletrolítica localizaram-se majoritariamente nos distritos caudais das colunas dorsolateral e lateral da MCPA. Em contraste à apresentação de imobilidade, galope e salto em 55%, 35% e 30% dos ratos injetados com a dose de 80 µg de KCN (Experimento 2), estas respostas não foram apresentadas no grupo com lesão eletrolítica da MCPAd (Fig. 7). Adicionalmente, enquanto o trote foi apresentado por 70% dos ratos intactos, ele foi apresentado por um rato (5%) apenas do grupo lesionado. Por fim, a exoftalmia e a defecação também foram atenuadas significativamente. A micção foi reduzida pela lesão, entretanto, não apresentou significância estatística.

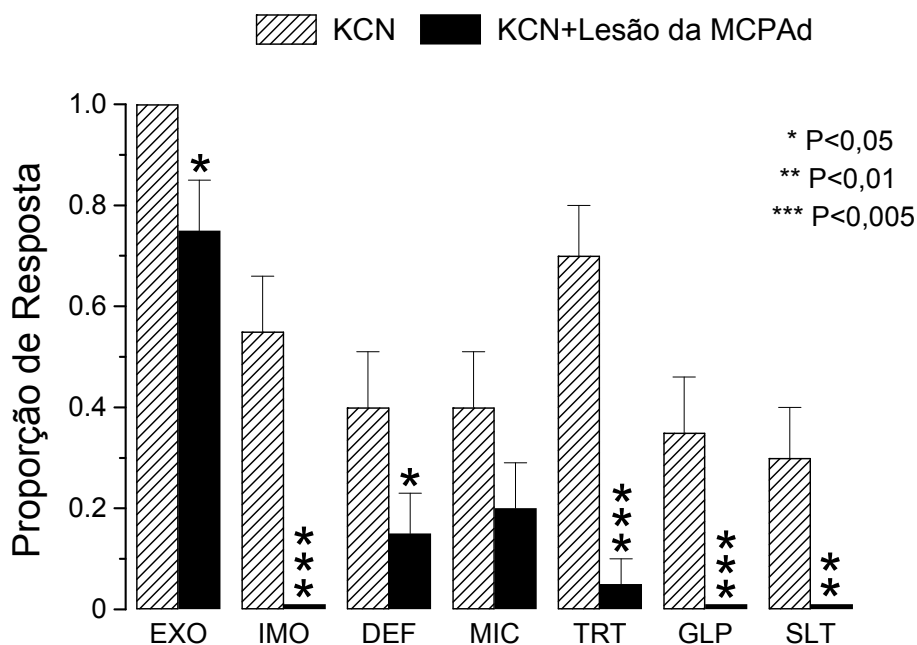


Figura 7: Efeitos comportamentais do KCN (80 µg/0,1 ml, E.V.) em ratos intactos e ratos com lesão eletrolítica da MCPAd. Asteriscos indicam diferenças significantes em relação ao grupo intacto (χ^2 de Pearson).

6 DISCUSSÃO

Os ratos expostos ao CO₂ (13%) permaneceram em repouso, com rebaixamento da cabeça, tronco e cauda, indicativos de relaxamento muscular. Todavia, ficaram com os olhos abertos durante todo o período de exposição ao CO₂, tornando improvável a produção de efeitos hipnóticos. Embora não tenhamos feito registros fisiológicos, observamos a clara alteração da atividade respiratória, tal como foi classicamente descrita por vários autores (Banzett et al., 2000; Liotti et al., 2001; Moosavi et al., 2003). Ao final da exposição, os ratos recuperaram a atividade espontânea rapidamente. Técnicas de imunistoquímica para expressão da proteína c-fos demonstraram, em ratos anestesiados, que a exposição às concentrações de 8, 10 e 15% de CO₂ causa a ativação de uma região restrita da MCPAVI caudal, ao nível do núcleo látero-dorsal do tegmento (Teppema et al., 1997). Resultados similares foram obtidos por Berquin e colaboradores (2000) com uma concentração ainda menor de CO₂ (5%). Notavelmente, preparações *in vitro* de fatias da MCPA mostraram que seus neurônios são sensíveis à hipóxia e, em grau bem menor, à hipercapnia (Kramer et al., 1999). A maioria dos neurônios testados (39 de 53) respondeu a hipóxia, dos quais 92% responderam com um aumento na frequência de disparo. Neurônios das regiões dorsolateral/lateral aumentaram a frequência de disparo em grau maior que os neurônios localizados na região ventrolateral. Todos os neurônios testados (n=6) também responderam à hipóxia após a perfusão do tecido com solução de baixa concentração de Ca²⁺ e alta concentração de Mg²⁺ para o bloqueio clássico da transmissão sináptica. Contudo, poucos neurônios (7/33) responderam à hipercapnia. Estes achados indicam que os neurônios da MCPA têm uma responsividade inerente à hipóxia e hipercapnia (Kramer et al.,

1999). Não obstante, o número pequeno de neurônios sensíveis à hipercapnia pode ter sido devido à utilização de regiões da MCPA mais rostrais que aquelas ativadas nos estudos *in vivo* (Teppema et al., 1997, Berquin et al., 2000). Curiosamente, os comportamentos eliciados pelo CO₂ foram similares à imobilidade hiporreativa induzida pela estimulação da MCPAvl (Morgan e Carrive, 2001). Portanto, embora os ratos do nosso estudo não tenham sido testados quanto à reatividade a estímulos padronizados, as evidências acima sugerem que o comportamento dos ratos à exposição de CO₂ pode ser equivalente à imobilidade hiporreativa descrita por Morgan e Carrive (2001).

Tal como ocorreu com o CO₂, o KCN também causou o aumento visível da atividade respiratória. Em contraste, as doses subletais de KCN eliciaram todas as respostas de defesa naturais ou eliciadas por estimulação da MCPAd do rato, inclusive o salto que foi apresentado por um animal apenas. Estas respostas foram produzidas de forma dose-dependente, em ordem similar às respostas produzidas pela estimulação elétrica ou química da MCPAd com intensidades e doses crescentes. Porém, os limiares relativos da micção e defecação foram muito inferiores aos limiares respectivos dos outros tipos de estimulação. Observações casuais já haviam mencionado a produção dos comportamentos de 'alerta e fuga' pelo KCN (Franchini e Krieger, 1993). Contudo, as respostas de defesa ao KCN ainda não haviam sido quantificadas. Por outro lado, Hayward e Von Reitzenstein (2002) mostraram que injeções repetidas de KCN (90 µg/ kg, E.V.) aumentavam a expressão da proteína c-fos em todas as colunas da MCPA, mas, principalmente, nas colunas dorsal e lateral dos distritos caudais desta estrutura. Os dados do nosso estudo e de outros

autores sugerem, portanto, que a MCPAd seja ativada pelo KCN. Esta ativação pode ocorrer por via direta ou indireta mediante as aferências dos quimiorreceptores. Neste sentido, é importante notar que a MCPA troca conexões profusas com o NTS (Bandler e Tork, 1987).

Surpreendentemente, o CO₂ causou uma inibição consistente da maioria dos comportamentos de defesa eliciados pela estimulação elétrica da MCPAd. Nossos resultados foram, portanto, contrários aos que seriam esperados em vista da alta sensibilidade dos pacientes de pânico ao CO₂ (Klein, 1993b; Gorman et al., 1997; Biber e Alkin, 1999). As únicas exceções foram a micção e a defecação cujos limiares foram reduzidos pelo CO₂. Os aumentos dos limiares podem ter sido devidos à ativação direta da MCPAvl pelo CO₂ e a conseqüente inibição das respostas de defesa evocadas pela estimulação da MCPAd. De fato, Lovick e colaboradores (2000) mostraram que a estimulação da MCPAvl inibe a atividade neuronal da MCPAd. Consistente com esta hipótese, Berquin e colaboradores (2000) observaram a mesma proporção de neurônios marcados para proteína c-fos nas divisões dorsal e ventral da MCPA após a exposição dos ratos ao CO₂. É possível, portanto, que a MCPAvl e a MCPAd sejam ativadas pelo CO₂ de forma direta e indireta, via quimiorreceptores, respectivamente.

Contrariamente, o KCN reduziu os limiares da maioria das respostas de defesa mas, principalmente, do trote e galope. O KCN também produziu o aumento abrupto da freqüência da resposta de defecação na intensidade de 35 µA. Nesta intensidade a defecação ocorreu em 40% dos ratos, uma proporção que só seria atingida na intensidade de 70 µA na ausência do KCN. Contudo, não foi possível o ajuste significativo da curva estímulo-resposta

com 2 proporções apenas. Ao contrário do CO₂, o KCN aumentou os limiares da micção de forma leve, porém, significativa. Estas diferenças podem ter sido devidas à representação diferenciada da resposta de micção nas regiões dorsais e ventrais da MCPA (Bittencourt et al., 2004, Valentino et al., 2000) ou às ações diferenciadas do CO₂ e KCN nos mecanismos eferentes da micção, em particular, no núcleo de Barrington (Kuipers et al., 2006; Blok e Holstege, 1998).

Por fim, os resultados do experimento com lesão eletrolítica na MCPAd sugerem a participação desta estrutura nas respostas ao KCN, uma vez que os principais comportamentos de defesa (galope, salto e imobilidade) foram abolidos no grupo lesionado e os outros fortemente atenuados. Contudo, a lesão eletrolítica pode ter destruído fibras de passagem. Assim, a replicação deste experimento com lesão neuroseletiva por injeção de aminoácido excitatório é fundamental para a demonstração efetiva da participação da MCPA na mediação das respostas de defesa ao KCN. Em adição, embora Franchini e Krieger (1993) tenham analisado as respostas cardio-respiratórias ao KCN em ratos com desnervação sinoaórtica, as respostas comportamentais não foram quantificadas nestes ratos. Portanto, a análise das respostas ao KCN em animais desnervados também pode oferecer informações importantes quanto à participação da MCPA nas respostas de defesa à hipóxia.

Estudos anteriores já haviam mostrado que as estimulações da MCPA e regiões adjacentes resultam tanto em apneusis inspiratória como no aumento da frequência respiratória, dependendo dos parâmetros de estimulação e da fase do ciclo respiratório em que o estímulo foi aplicado (Paydarfar e Eldridge, 1987). Mais recentemente Zhang e colaboradores (2005, 2007)

observaram que a estimulação elétrica da MCPAd causa o aumento significativo na frequência respiratória devido ao encurtamento dos tempos de inspiração e expiração, resultando na redução da PCO_2 . Todavia, o efeito da estimulação elétrica foi mais pronunciado sobre o tempo de expiração, o qual manteve-se reduzido mesmo após o término do estímulo. Observou-se também que a estimulação elétrica da MCPAd causa alterações eletromiográficas imediatamente após a estimulação, resultando num aumento da atividade do diafragma e do músculo abdominal que persiste mesmo após o término do estímulo. Contudo, como o último músculo não participa da expiração eupnéica, sua contração pode estar associada ao esforço de defecação e não à respiração propriamente dita. A atividade do nervo frênico também aumentou desde o primeiro ciclo respiratório após o estímulo. Os autores sugerem que as alterações respiratórias pós-estímulo podem ser devidas à neuroplasticidade de curta-duração das eferências da MCPAd (Zhang et al., 2005, 2007). A persistência da atividade respiratória após o término da estimulação da MCPA é notável em vista dos estudos clássicos nos quais a hiperventilação mecânica é seguida por uma clara pausa respiratória, supostamente, devida à redução da PCO_2 (Eldridge, 1977). Contudo, Eldridge (1977) já havia notado que a hiperpnéia produzida por estimulação do nervo carotídeo persiste por um período significativo após o término do estímulo. Este fenômeno também é perceptível após a interrupção do exercício muscular, no qual se observa uma atenuação gradual da hiperpnéia. Os estudos de Eldridge e colaboradores sugerem que o mecanismo de manutenção da atividade respiratória situa-se na ponte ou mesencéfalo. (Eldridge, 1977; Paydarfar e Eldridge, 1987). Paydarfar e Eldridge (1987) já haviam mostrado que

a estimulação da MCPA em momentos distintos do ciclo respiratório provoca o reinício (resetting) previsível do ciclo nas fases inspiratória ou expiratória. Porém, existe um momento único na transição inspiratória-expiratória no qual o reinício do ciclo é imprevisível, podendo se dar tanto na inspiração ou expiração. Portanto, estes autores mostraram que além da apneusis inspiratória e da hiperventilação, a estimulação da MCPA também pode produzir respiração irregular (dispnéia). Dispnéia, respiração rápida e hiperventilação são as manifestações respiratórias mais relatadas por pacientes com TP. Para explicar este fato, Klein (1993a) propôs que o ataque de pânico é constituído de três etapas: a primeira é o disparo do sistema de alarme de sufocamento, provocando a sensação de falta de ar e aumento do volume corrente, como se houvesse havido um aumento da PCO_2 . Se o sistema continua recebendo sinais de asfixia, ocorre a segunda etapa desencadeando as respostas comportamentais de um ataque de pânico. Por fim; a terceira etapa consiste num aumento na frequência respiratória que persiste mesmo após o término dos eventos comportamentais do ataque de pânico (Klein, 1993a).

Em nosso estudo, a exposição ao CO_2 não produziu nenhuma resposta típica de defesa. Embora a tolerância dos ratos ao CO_2 possa ser uma característica das espécies com hábitos subterrâneos, seres humanos sadios também não respondem ao CO_2 . Contudo, admitindo-se que as respostas de defesa induzidas pela estimulação da MCPAd sejam um modelo consistente dos ataques de pânico, esperava-se que a hipercapnia facilitasse estas respostas de forma ainda mais clara que a facilitação dos ataques de pânico nos pacientes em condições de repouso. Os resultados que eram esperados para o CO_2 foram, no

entanto, obtidos na hipóxia citotóxica do KCN. Embora a hipercapnia, a hipóxia e o KCN ativem os quimiorreceptores periféricos (células glomerulares tipo-1) via o aumento da concentração citosólica de Ca^{2+} , eles fazem-no por mecanismos diferentes. Assim, enquanto os primeiros promovem o aumento do Ca^{2+} citosólico mediante a inibição de canais de K^+ TASK-1 e a conseqüente despolarização dos quimiorreceptores, o último libera o Ca^{2+} de depósitos intracelulares e de mitocôndrias (Trapp et al., 2008, Biscoe e Duchon, 1989). Embora estes estímulos compartilhem mecanismos similares ao nível dos quimiorreceptores, eles podem, por outro lado, despolarizar as aferências do NTS em graus diferentes. Em todo caso, nossos dados sugerem que as respostas de fuga são mais importantes na hipóxia que na hipercapnia. A alta sensibilidade dos pacientes de pânico ao CO_2 é dificilmente explicada por diferenças ao nível dos quimiorreceptores, uma vez que os ataques espontâneos de pânico ocorrem apenas esporadicamente e em condições normais de PO_2 e PCO_2 . Estes fatos tornam improváveis diferenças tanto ao nível dos quimiorreceptores quanto na qualidade da informação aferente dos pacientes de pânico e indivíduos sadios. De fato, os pacientes de pânico têm impulsos de fuga quando são expostos a concentrações apenas moderadas de CO_2 , indicando a similaridade dos mecanismos subjacentes à hipóxia e hipercapnia. Portanto, ao invés de perguntar sobre as diferenças entre hipóxia e hipercapnia, talvez seja mais adequado perguntar porque os ratos Wistar e os indivíduos sadios não respondem ao CO_2 . Conforme mencionado, a ausência de respostas típicas de defesa na hipercapnia pode ser devida à ativação da MCPAvI e conseqüente inibição dos circuitos de fuga da MCPAd. De fato, enquanto o CO_2 ativa as

colunas lateral e ventrolateral da MCPA (Berquin et al., 2000), o KCN não ativa a última coluna (Hayward e Von Reitzenstein, 2002). Dentre várias possibilidades, esta interpretação também está baseada na observação de que o CO₂ e a estimulação da MCPAvI causam imobilidade hiporreativa. Estes resultados também sugerem que a imobilidade seja o melhor comportamento de defesa mais adequado à hipercapnia que a resposta fuga. Presumivelmente, seria contraproducente ao organismo consumir o pouco oxigênio que lhe resta na condição de hipercapnia. Portanto, nossos resultados sugerem que os pacientes de pânico apresentam uma disfunção das projeções da MCPAvI para a MCPAd, respondendo ao CO₂ como se tivessem sido expostos à hipóxia ou KCN.

7 REFERÊNCIAS

- Bandler R, Tork I (1987) Midbrain periaqueductal grey region in the cat has afferent and efferent connection with solitary tract nuclei. *Neurosci Lett* 74: 1-6.
- Banzett RB, Garcia RT, Moosavi SH (2000) Simple contrivance “clamps” end-tidal PCO₂ and PO₂ despite rapid changes in ventilation. *J Appl Physiol* 88: 1597-1600.
- Barros RC, Bonagamba LG, Okamoto-Canesin RM, Branco LG, Machado BH (2002) Cardiovascular responses to chemoreflex activation with potassium cyanide or hypoxic hypoxia in awake rats. *Auton Neurosci* 97: 110-115.
- Berquin P, Bodineau L, Gros F, Larnicol N (2000) Brainstem and hypothalamic areas involved in respiratory chemoreflexes: a Fos study in adults rats. *Brain Res* 857: 30-40.
- Biber B, Alkin T (1999) Panic Disorder Subtypes: Differential Responses to CO₂ Challenge. *Am J Psychiatry*. 156: 739-744.
- Biscoe TJ, Duchon MR (1989) Electrophysiological responses of dissociated type I cells of the rabbit carotid body to cyanide. *J Physiol* 413: 447-468.
- Bittencourt AS, Carobrez AP, Zamprogno LP, Tufik S, Schenberg LC (2004) Organization of single components of defensive behaviors within distinct columns of periaqueductal gray matter of the rat: role of N-methyl-D-aspartic acid glutamate receptors. *J Neuroscience* 125: 71-89.
- Blok BF, Holstege G (1998) The central nervous system control of micturition in cats and humans. *Behav Brain Res* 92: 119-125.
- Collett D (2003) Modelling binary data. Chapman and Hall/CRC, Florida.

- Deakin JFW, Graeff FG (1991) 5-HT and mechanisms of defense. *J Psychopharmacol* 5: 305-315.
- Eldridge FL (1977) Maintenance of respiration by central neural feedback mechanisms. *Fed Proc* 36: 2400-2404.
- Franchini KG, Krieger EM (1993) Cardiovascular responses of conscious rats to carotid body chemoreceptor stimulation by intravenous KCN. *J Auton Nerv Syst* 42: 63-70.
- Gentil V (1988) The aversive system, 5-HT and panic attacks. In: *Animal Models of Psychiatric Disorders* (Simon P, Soubrié P, Wildlocher D, ed), Karger, Basel 142-145.
- Gorman JM, Browne ST, Papp LA, Martinez J, Welkowitz L, Coplan JD, Goetz RR, Kent J, Klein DF (1997) Effect of antipanic treatment on response to carbon dioxide. *Biol Psychiatry* 42: 982-991.
- Hayward LF, Von Reitzenstein M (2002) c-Fos expression in the midbrain periaqueductal gray after chemoreceptor and baroreceptor activation. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 283: H1975-H1984.
- Jenck F, Moreau JL, Martin JR (1995) Dorsal periaqueductal gray-induced aversion as a simulation of panic anxiety: elements of face and predictive validity. *Psychiatry Res* 57: 181-191.
- Klein DF (1993a) Panic may be a misfiring suffocation alarm. In: *The psychopharmacology of panic* (Montgomery SA). Oxford University Press, New York, 67-73.
- Klein DF (1993b) False suffocation alarms, spontaneous panics, and related conditions. An integrative hypothesis. *Arch Gen Psychiatry* 50: 306-317.

- Kramer JM, Nolan PC, Waldrop TG (1999) In vitro responses of neurons in the periaqueductal gray to hypoxia and hypercapnia. *Brain Res* 835: 197-203.
- Küipers R, Mouton LJ, Holstege G (2006) Afferent projections to the pontine micturition center in the cat. *J Comp Neurol* 494: 36-53.
- Liotti M, Brannan S, Egan G, Shade R, Madden L, Abplanalp B, Robillard R, Lancaster J, Zamarripa FE, Fox PT, Denton D. (2001) Brain responses associated with consciousness of breathlessness (air hunger). *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 98 (4): 2035-2040.
- Lovick TA, Parry DM, Stezhka VV, Lumb BM (2000) Serotonergic transmission in the periaqueductal gray matter in relation to aversive behaviour: morphological evidence for direct modulatory effects on identified output neurons. *Neuroscience* 95: 763-772.
- Moosavi SH, Golestanian E, Binks AP, Lansing RW, Brown R, Banzett RB (2003) Hypoxic and hypercapnic drives to breathe generate equivalent levels of air hunger in humans. *J Appl Physiol* 94: 141-154.
- Morgan MM, Carrive P (2001) Activation of the ventrolateral periaqueductal gray reduces locomotion but not mean arterial pressure in awake, freely moving rats. *Neuroscience* 102: 905-910.
- Nashold Jr. BS, Wilson WP, Slaughter DG (1969) Sensations evoked by stimulation in the midbrain of man. *J Neurosurg* 30: 14-24.
- Paxinos G, Watson C (1998) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 2 ed, San Diego: Academic Press.
- Paydarfar D, Eldridge FL (1987) Phase resetting and dysrhythmic responses of the respiratory oscillator. *Am J Physiol* 252:55-62.

- Pitts FN, McClure JN (1967) Lactate metabolism in anxiety neurosis. *New Engl J Med* 277: 1329-1336.
- Preter M, Klein DF (2007) Panic, suffocation false alarms, separation anxiety and endogenous opioids. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry*.
- Sato M, Ikeda K, Yoshizaki K, Koyano H (1991) Response of cytosolic calcium to anoxia and cyanide in cultured glomus cells os newborn rabbit carotid body. *Brain Res* 551: 327-330.
- Schenberg LC, Bittencourt AS, Sudré EC, Vargas LC (2001) Modeling panic attacks. *Neurosci Biobehav Rev* 25: 647-659.
- Schenberg LC, Capucho LB, Vatanabe RO, Vargas LC (2002) Acute effects of clomipramine and fluoxetine on dorsal periaqueductal grey-evoked unconditioned defensive behaviours of the rat. *Psychopharmacology* 159: 138-144.
- Schenberg LC, Póvoa RMF, Costa ALP, Caldellas AV, Tufik S, Bittencourt AS (2005) Functional specializations within the tectum defense systems of the rat *Neurosci Biobehav Rev* 29: 1279-1298.
- Teppema LJ, Veening JG, Kranenburg A, Dahan A, Berkenbosch A, Olivier C (1997) Expression of c-fos in the rat brainstem after exposure to hypoxia and to normoxic and hyperoxic hypercapnia. *J Comp Neurol* 388(2): 169-190.
- Trapp S, Aller MI, Wisden W, Gourine AV (2008) A role for TASK-1 (KCNK3) channels in the chemosensory control of breathing. *J Neurosci* 28(35): 8844-8850.
- Valentino RJ, Kosboth M, Colflesh M, Miselis RR (2000) Transneuronal Labeling

From the Rat Distal Colon: Anatomic Evidence for Regulation of Distal Colon Function by a Pontine Corticotropin-Releasing Factor System. *J Comp Neurol* 417: 399-414.

Vargas LC, Schenberg LC (2001) Long-term effects of clomipramine and fluoxetine on dorsal periaqueductal grey-evoked innate defensive behaviours of the rat. *Psychopharmacology* 155: 260-268.

Zhang W, Hayward LF, Davenport PW (2005) Respiratory muscle responses elicited by dorsal periaqueductal gray stimulation in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 289: R1338-R1347.

Zhang W, Hayward LF, Davenport PW (2007) Respiratory responses elicited by rostral versus caudal dorsal periaqueductal gray stimulation in rats. *Auton Neurosci* 134: 45-54.

8 ANEXOS



Figura 8. Rato na câmara gasosa para estimulação elétrica na presença de CO_2 . O rato encontra-se com o cabo de estimulação que faz a ligação com o conector giratório e o gerador de corrente. Observador posicionado a direita para manuseio do aparelho e preenchimento da planilha.

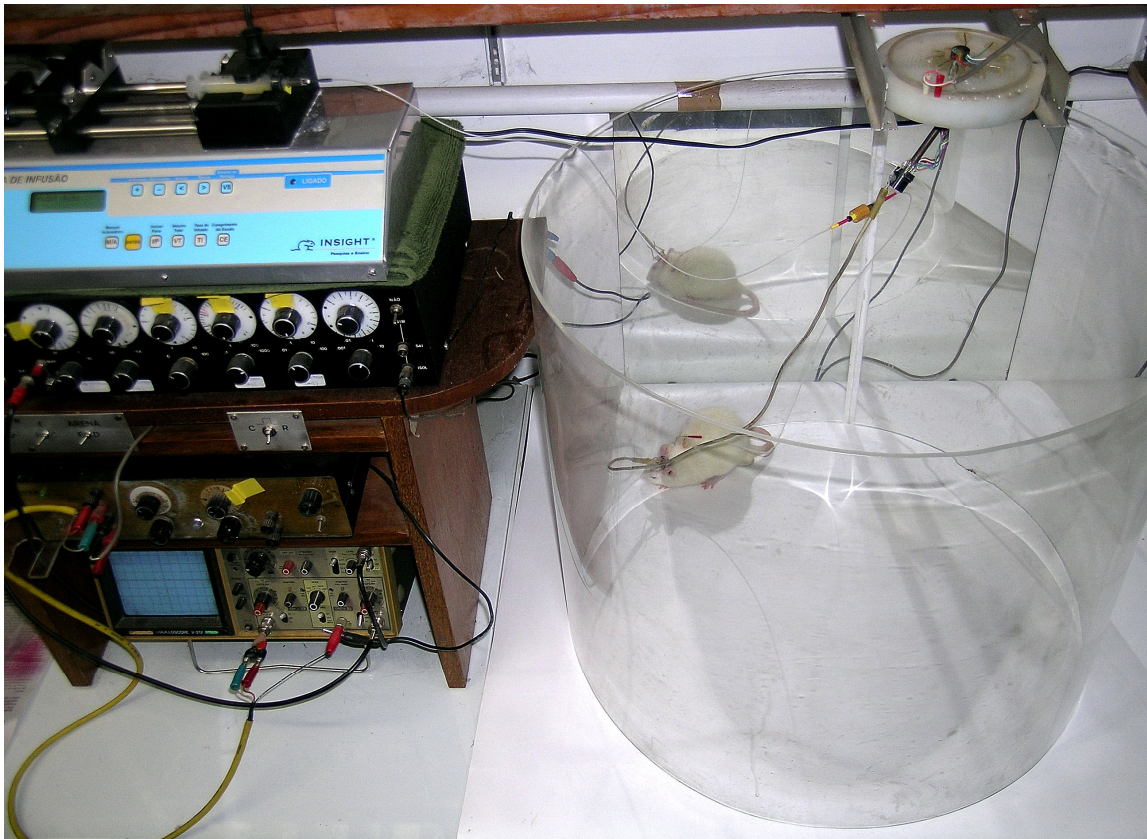


Figura 9: Rato na arena para estimulação elétrica com infusão de KCN. O animal encontra-se com o cabo de estimulação que faz a ligação com conector giratório, e ao mesmo tempo, com a cânula de polietileno que faz a ligação entre a bomba de microinfusão e a cânula da veia jugular.

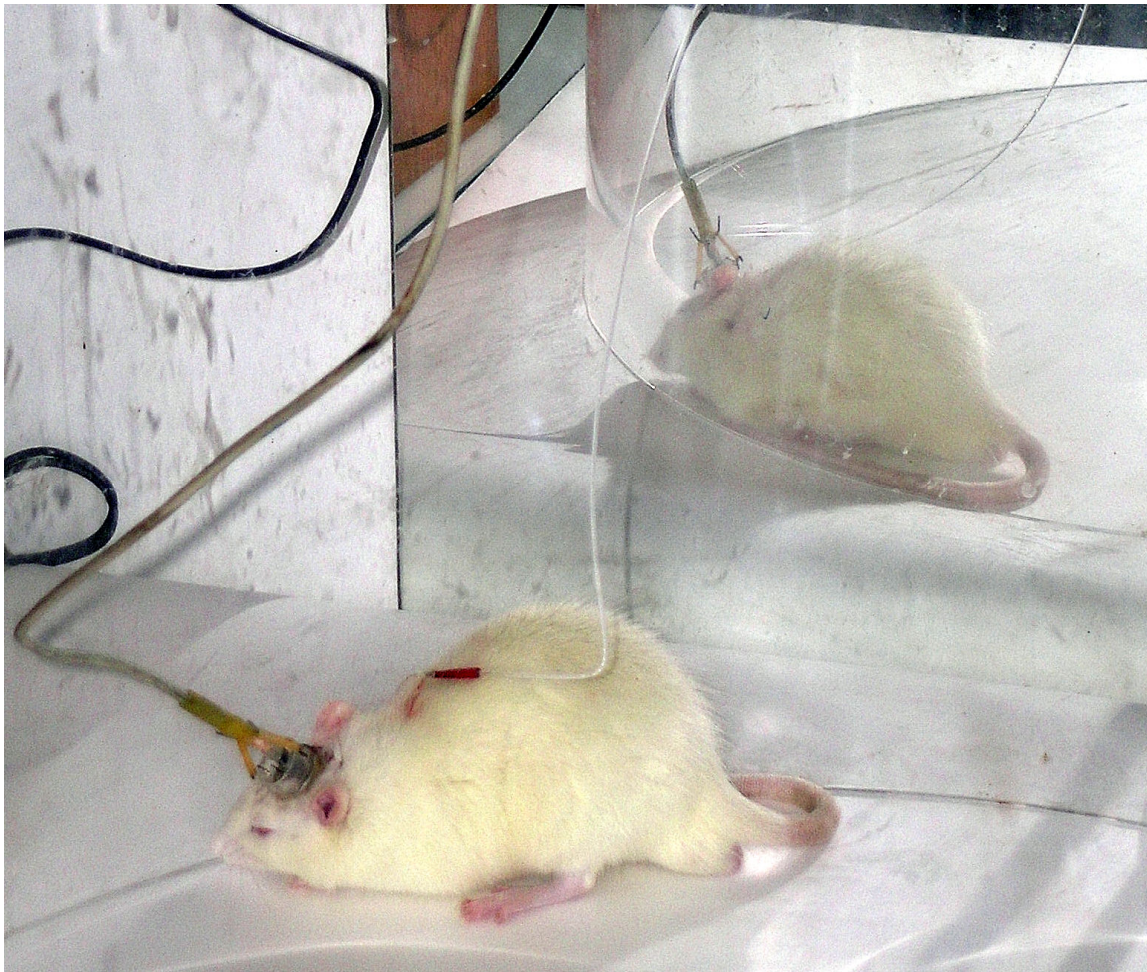


Figura 10: Rato com cânula e cabo de estimulação. O animal encontra-se com o cabo conectado ao eletrodo e cânula de polietileno adaptada à cânula da veia jugular.



Figura 11: Disposição das gaiolas para acomodação dos ratos no biotério. Animais com livre acesso a água e alimentação.