

Discussão

O presente trabalho apresenta dois estudos experimentais nos quais se investigaram a possibilidade de se estabelecer linhagens de ratos com alta (CAC) e baixa (CBC) taxa de resposta de congelamento a estímulos contextuais previamente associados a choques elétricos, bem como a participação do complexo amigdalóide sobre esta resposta de congelamento nestas duas linhagens. No primeiro experimento, estabeleceu-se uma estratégia de seleção bi-direcional, utilizando-se como critério os extremos fenotípicos da resposta de congelamento. A análise destes dados ao longo de quatro gerações indicou uma ausência de diferença comportamental entre os grupos nas primeiras gerações. Gradativamente, estas diferenças foram surgindo, tornando-se claras após o nascimento da terceira geração.

Diversas linhagens já foram estabelecidas para se estudar as bases genéticas de diferentes aspectos da emocionalidade. Algumas destas linhagens foram selecionadas a partir de respostas inatas que animais apresentam a um campo aberto (Broadhurst, 1957) ou ao labirinto em cruz elevado (Liebsch e colaboradores, 1998). Outros modelos selecionaram animais com alta e baixa emocionalidade a partir de processos de aprendizagem como, por exemplo, a resposta de esquiva ativa (Bignami, 1965). Além destes modelos, outras linhagens foram também desenvolvidas com o objetivo de delinear geneticamente outras desordens psiquiátricas. Por exemplo, as linhagens HAP (High Alcohol Preferring) e LAP (Low Alcohol Preferring) (Chester e colaboradores, 2003) foram desenvolvidas para o estudo do alcoolismo.

Recentemente, Ponder e colaboradores (2007) utilizaram a resposta de congelamento condicionada como critério de seleção para a criação de linhagens de camundongos. Além do congelamento ao contexto, estes autores observaram também o mesmo padrão da resposta de congelamento a um estímulo condicionado discreto, no caso um som. Neste estudo (Ponder e colaboradores, 2007), a diferenciação da resposta de congelamento entre as duas linhagens de animais já pôde ser observada a partir da primeira geração, tornando-se extremamente acentuada nas gerações subseqüentes. Dessa forma, é possível que

a diferenciação da resposta de congelamento seja mais rápida em camundongos em relação a ratos albinos utilizados no presente trabalho. De uma forma geral, os dados revelam que o medo condicionado é um traço altamente hereditário e pode ser rápida e bidirecionalmente selecionado após algumas gerações. Entretanto, deve-se notar que, apesar da maior rapidez em se desenvolver linhagens com alta e baixa taxa de congelamento com camundongos, o uso do rato oferece algumas vantagens, principalmente no que se referem à maior facilidade em se estudar variáveis fisiológicas e comportamentais, devido principalmente ao seu maior tamanho (Jacob & Kwitek, 2001).

Nesse sentido, a presente dissertação constitui a primeira tentativa de empregar a resposta de congelamento a estímulos ambientais previamente associados a choques elétricos como critério de seleção bidirecional em ratos. O emprego da resposta de congelamento para avaliar processos emocionais aprendidos parece ser uma medida mais interessante em relação à resposta de esquiva ativa. A esquiva ativa é uma forma complexa forma de aprendizagem que envolve a aquisição tanto de uma resposta de medo condicionada quanto uma resposta operante. A interação entre estes dois processos pode interferir com a medida de processos emocionais mediados pela aprendizagem associativa. Por exemplo, manipulações que diminuem o medo condicionado como a redução da intensidade do choque, ou o uso de drogas ansiolíticas, aumentam a aquisição de uma resposta de esquiva ativa. Por outro lado, a resposta de congelamento é uma medida mais direta e proeminente de medo condicionado, já que não envolve a aquisição de uma resposta operante. A resposta de congelamento é uma função da intensidade do choque, depende da associação entre estímulos condicionados e incondicionados, e é sensível a uma série de manipulações que interferem com sua força associativa.

Num recente trabalho, Brush (2003), utilizando ratos da linhagem “Syracuse”, destacou a diferença entre desempenho e aprendizagem em processos emocionais em ratos. Segundo o autor, embora os ratos da linhagem “Syracuse Low Avoidance”, apresentassem uma menor taxa de respostas de esquiva ativa em relação seus pares da linhagem “Syracuse High Avoidance”, estes resultados se inverteram quando avaliados através da resposta de esquiva passiva, que certamente envolve uma postura de congelamento. Estes dados apontam para a

importância da resposta de congelamento na performance de uma resposta adquirida através de condicionamento aversivo.

O desenvolvimento de linhagens de ratos com alta e baixa taxa de congelamento condicionado reside na possibilidade de se desenvolver um modelo animal próximo a transtornos de ansiedade em seres humanos. De acordo com Anagnostaras e colaboradores (1999), os transtornos de ansiedade geralmente compartilham causas ambientais e genéticas. As causas ambientais são os fatores de risco e as situações particulares que as pessoas vivenciam todos os dias. Além destas causas, diversas evidências indicam a existência de predisposições genéticas para o desenvolvimento de tais transtornos, embora seja necessária a experiência traumática para a eclosão do distúrbio.

Desta forma, o uso de linhagens selecionadas, como as desenvolvidas em nosso laboratório, se torna um importante instrumento para se estudar a influência de variáveis genéticas em distúrbios de ansiedade. Uma das vantagens de se utilizar linhagens de animais selecionadas através de características extremas do fenótipo é a de permitir com que uma série de variáveis biológicas, tais como respostas neurofisiológicas, quantidade de neurotransmissores, assim como genotipagens, possam ser realizadas através de técnicas cada vez mais avançadas.

Além disso, o uso de cruzamentos sucessivos de animais selecionados em relação a um determinado padrão fenotípico, como foi feito realizado neste primeiro estudo, possibilita que alelos de vários genes se tornem fixados pela população. Ou seja, todos os indivíduos de uma mesma linhagem tendem a carregar os mesmos alelos de determinados genes relevantes para o traço selecionado. Esta fixação ocorre para todos os genes que são relevantes para o traço característico que está em investigação. Embora não tenha sido o objetivo desta dissertação, esta característica específica de linhagens selecionadas também poderá ser considerada para estudos futuros.

No segundo experimento deste trabalho, foram feitas lesões extensivas no complexo amigdalóide em ratos das linhagens CAC e CBC desenvolvidas no primeiro estudo. O impacto destas lesões na amígdala sobre a resposta condicionada de congelamento foi proporcionalmente igual entre os grupos CAC e CBC, uma vez que a lesão produziu uma redução em torno de 60% da resposta de congelamento. Estes resultados são importantes, uma vez que indicam que o

complexo amigdalóide participa de forma similar no condicionamento aversivo nestas duas linhagens de animais.

Deve-se observar que a porcentagem de congelamento condicionado do grupo CAC que sofreram lesões no complexo amigdalóide apresentaram uma porcentagem significativamente maior em relação ao grupo CBC. Desta forma, embora o complexo amigdalóide tenha produzido efeitos similares entre as duas linhagens, é possível que outras estruturas neurais associadas à circuitaria neural responsável por reações emocionais exerçam efeitos diferenciados entre as linhagens CAC e CBC. Dentre estas estruturas, destacam-se o hipocampo e a matéria cinzenta periaquedutal, que possuem importante participação no condicionamento contextual aversivo. Desta forma, estudos futuros são necessários para que se possa investigar a participação destas estruturas no controle da resposta de congelamento nestas duas linhagens.

Outro efeito observado no segundo experimento desta dissertação foi a persistência do congelamento condicionado entre os ratos que não sofreram as lesões no complexo amigdalóide. Na segunda sessão de extinção, que ocorreu cerca de um mês após a primeira testagem com choques, observou-se que os níveis de congelamento se mantiveram comparáveis em relação à primeira sessão de extinção. De fato, diversas evidências sugerem que a amígdala desempenhe um papel mnemônico permanente no condicionamento aversivo. Gale e colaboradores (2004), por exemplo, testaram a participação da porção basolateral do complexo amigdalóide no armazenamento de memórias aversivas durante o tempo de vida de um rato. Para isso eles utilizaram um intervalo de 16 meses (que consta de boa parte do tempo de vida de um rato) entre o primeiro treino e o teste de extinção.

A circuitaria neural responsável pelo medo contextual condicionado envolve informações sensoriais multimodais que chegam à porção basolateral da amígdala através de projeções diretas provenientes do hipocampo. De fato, a Potenciação de Longo Prazo tem sido observada através desta via amigdalóide-hipocampal (Maren e Fanselow, 1995). Mais ainda, projeções ascendentes serotoninérgicas do núcleo mediano da rafe para o hipocampo parece fazer também parte desta via que regula o medo condicionado ao contexto. A porção ventral do córtex medial pré-frontal (Resstel e colaboradores, 2006) e o córtex perirrinal (Bucci e colaboradores, 2000) também estão envolvidos na regulação do medo condicionado. Projeções diretas provenientes destas áreas corticais para o

hipocampo e para o complexo basolateral da amígdala fornecem um processamento polimodal de informação sensorial de nível mais elevado. O fluxo de informações que percorre a região da amígdala envolve projeções tanto do complexo basolateral quanto da parte central da amígdala, que por sua vez constitui a principal porta de saída de informações da amígdala. Projeções eferentes da região central da amígdala para o tronco cerebral e para áreas hipotalâmicas dão origem a reações autonômicas e comportamentais distintas, envolvidas neste tipo de condicionamento. A saída motora da resposta de congelamento condicionada está relacionada às vias eferentes da região central da amígdala para a porção ventral da matéria cinzenta periaquedutal, que por sua vez possui projeções para grupos de neurônios motores na corda espinhal.

Os resultados do segundo experimento confirmam que a região amigdalóide desempenha um papel primordial no condicionamento contextual aversivo. Apesar de diferentes vias também participarem do processamento de estímulos potencialmente aversivos, os dados sugerem que todos eles convergem para a amígdala. Infelizmente, os resultados do presente estudo não clarificaram que outras estruturas cerebrais, que participam destes circuitos neurais, possam desempenhar um papel diferencial na aquisição e expressão dos diferentes níveis de congelamento condicionado induzidos pelo nosso programa de criação seletiva. Desta forma, estudos futuros são necessários para investigar com maior clareza a contribuição de cada uma destas estruturas subjacentes ao condicionamento contextual aversivo nestas duas linhagens de animais.

Um fato interessante observado nos dois experimentos deste trabalho foi a maior taxa de congelamento de machos em relação às fêmeas tanto na linhagem CAC como na CBC. Por esta razão, ratos machos foram utilizados na segunda parte do segundo experimento que investigou a participação do complexo amigdalóide sobre a resposta de congelamento nestas duas linhagens. Segundo Steimer & Driscoll (2005), a grande maioria dos estudos experimentais que envolvem ansiedade e estresse em roedores utilizam animais machos. Basicamente, esta preferência está ligada aos efeitos negativos que variações fisiológicas e comportamentais que as fêmeas apresentam devido ao ciclo reprodutivo. Tais variações estão ligadas a flutuações nos níveis dos hormônios estrogênio e progesterona.

Observa-se que fêmeas, como por exemplo, ratas da linhagem “Roman High Avoidance”, são mais ativas e menos ansiosas na fase do proestro (fase que antecede a fase fértil) em comparação com fêmeas desta mesma linhagem na fase diestro (não-fértil). Além disso, hormônios ligados ao sexo também podem influenciar no desempenho cognitivo, associados à aprendizagem (Steimer & Driscoll, 2005).

As diferenças sexuais nos testes de ansiedade com roedores foram inicialmente postuladas com base em observações no campo aberto. Neste modelo os ratos machos mostram menor atividade locomotora e maiores taxas de defecação do que as fêmeas. Tais resultados são tradicionalmente interpretados como um indicativo de que os machos são mais “ansiosos” e “medrosos” do que as fêmeas. Entretanto um número alternativo de explicações (como o metabolismo, por exemplo) pode influenciar nas diferenças encontradas nas taxas de defecação e ambulação. Testes feitos com três outros modelos animais de ansiedade (interação social, o labirinto em cruz elevado e o teste de conflito de Vogel) também indicam diferenças sexuais. No entanto, as diferenças variaram através dos testes, com as fêmeas demonstrando menos ansiedade no labirinto em cruz elevado, e sendo mais ansiosas no teste de conflito de Vogel. Blanchard e colaboradores (1991) forneceram evidências de que as fêmeas são mais ansiosas do que os machos em situações de perigo potencial, como a presença de um gato ou somente o odor dele (para uma revisão ver Palanza, 2001).

Sugere-se que estas diferenças possam estar relacionadas ao dimorfismo sexual observado na anatomia e fisiologia do hipocampo. De fato, estudos eletrofisiológicos observaram que ratos machos que adquirem um medo condicionado mais rapidamente do que as fêmeas também mostram uma magnitude maior da Potenciação de Longo Prazo nas sinapses do giro dentado da formação hipocampal (Maren e colaboradores, 1994). Desta forma, é possível que as diferenças sexuais marcantes observadas no presente estudo estejam associadas com uma magnitude maior na Potenciação de Longo Prazo no hipocampo do rato macho, em comparação com as fêmeas.

Finalmente, deve-se reconhecer que vários aspectos relacionados ao presente processo de seleção genética, tais como a intensidade do choque elétrico, ainda carecem de maior investigação. No presente trabalho, utilizou-se uma intensidade de 1mA. É possível que esta intensidade tenha sido excessiva,

especialmente porque foram empregados três choques com intervalos de 20 segundos. Testagens com diferentes intensidades seriam necessárias para investigar essa questão de forma sistemática e verificar qual a intensidade ideal de choques para produzir uma dissociação mais rápida da resposta de congelamento.

Deve-se reconhecer também que existe a possibilidade de que a dissociação da resposta de congelamento entre as linhagens CAC e CBC esteja relacionada não a processos emocionais mais sim a fenômenos sensoriais associados ao processo dos choques elétricos. É possível que a linhagem CAC tenha desenvolvido uma maior sensibilidade dolorosa a choques elétricos ao passo que a linhagem CBC uma menor sensibilidade a este estímulo aversivo. Nesse sentido, seria interessante avaliar a reação que estes animais exibem durante a apresentação de choques elétricos. Está é uma tarefa complexa, uma vez que estas reações são de difícil quantificação e tem uma duração muito rápida, uma vez que a duração do choque elétrico é de apenas um segundo.

Uma avaliação indireta desta possível crítica relacionada a aspectos sensoriais entre as linhagens CAC e CBC seria a de testar estas duas linhagens em outros modelos animais de ansiedade. Nesse sentido, estudos já estão sendo feitos em nosso laboratório, utilizando-se o labirinto em cruz elevado e o campo aberto com objetivo de verificar se as linhagens CAC e CBC apresentam comportamentos diferenciados nestes dois modelos de ansiedade. Mais ainda, estas mesmas linhagens deverão também ser testadas em outros modelos não relacionados com ansiedade, como por exemplo, o labirinto aquático de Morris. Se, de fato, as linhagens CAC e CBC foram selecionadas exclusivamente com base em processos emocionais, então espera-se que ambas as linhagens apresentem desempenhos similares neste modelo animal relacionado com memória espacial.