

**Abolição da imobilidade
de defesa induzida pela
estimulação aversiva em ratos
(*Rattus norvegicus albinus*)
(Mammalia, Rodentia)
com lesão do núcleo
mediano da rafe**

Helen T.P. Leite¹
Daniela A. Uga²
Katsumasa Hoshino³

**ABOLITION OF THE BEHAVIORAL
FREEZING INDUCED BY AVERSIVE
STIMULATION IN RATS, *Rattus
norvegicus albinus*, (MAMMALIA,
RODENTIA) WITH LESION IN THE
MEDIAN RAPHE NUCLEUS**

Abstract: Behavior is an evolutionary product and, at least, some disorders may affect different species through homologous etiological mechanisms. The present study evaluated the compulsive nature of the locomotor hyperactivity observed in rats with electrolytic lesion of the median raphe nucleus, a possible behavioral inhibition system postulated by the ethologists. The number of crossings of the median line of a wiremesh cage was counted during 10 minutes in lesioned (n=6) and controls (n=7) rats (baseline period). They were submitted during 30s to footshocks and crossings were

— Laboratório de Neurobiologia FC, UNESP, Bauru

¹. Acadêmica do curso de Psicologia, Faculdade de Ciências, Unesp, Campus de Bauru.

². Bolsista Pibic/CNPq, curso de Psicologia, Fac. Ciências, Unesp, Campus de Bauru.

³. Depto. C. Biológicas, Faculdade de Ciências, Unesp. Avenida Luiz E. Carrão Coube, s/n 17033-360 Bauru, S.P. - hoshino@dcb.fc.unesp.br

counted again. The number of crossings was higher in lesioned animals and did not reduce significantly after the aversive stimulation. Control animals showed long lasting behavioral freezing after shocks that resulted in significantly lower rates of crossings. It is concluded that such lesioned rats may be a valuable paradigm for studies on repetitive behavior disorders.

Key-words: Median raphe nucleus, lesion, hyperactivity, footshocks, freezing, compulsive disorders.

INTRODUÇÃO

Os distúrbios e transtornos mentais que afetam o comportamento se inserem em uma das áreas do conhecimento humano que ainda requer muita pesquisa para serem entendidos e, conseqüentemente, estabelecer terapias satisfatórias. TINBERGEN (1974), na cerimônia de recebimento do Prêmio Nobel, apontou a possibilidade de abordagem destes distúrbios como desajustes de comportamentos adaptativos naturais e enfatizou a contribuição a ser dada pela Etologia. Os comportamentos são produtos de uma história evolucionária e é atualmente reconhecido que os estudos etológicos usando diferentes espécies têm permitido avanços importantes na área das desordens de comportamento (NURNBERG *et al.*, 1997).

O transtorno obsessivo-compulsivo (TOC) é um distúrbio que se caracteriza pela intrusão freqüente de pensamentos indesejados, induzindo o portador a executar atos estereotipados para reduzir os níveis altos de ansiedade que tais pensamentos evocam (KAPLAN, 1997). O uso de drogas antidepressivas, cujos mecanismos de ação se baseiam no bloqueio da recaptação de serotonina nas sinapses centrais, tem mostrado sucesso no tratamento do TOC (GORMAN *et al.*, 1987; FINLEY *et al.*, 1994). O mecanismo de ação destes fármacos indica o envolvimento deste neurotransmissor na etiologia desta desordem (BILLET *et al.*, 1997; HANNA *et al.*, 1998). O núcleo mediano da rafe (NMR), localizado no tronco cerebral, é origem de um conjunto importante de fibras serotoninérgicas que se projetam cranialmente no cérebro (DAHSTROM & FUXE, 1964). Sua lesão promove uma hiperatividade locomotora em ratos (HOSHINO & SUGIZAKI, 1986). Estudos mais recentes

mostram que esta lesão aumenta a susceptibilidade ao pânico **que é, também, um distúrbio de ansiedade** (UGA *et al.*, 2000).

A comorbidade clínica da síndrome do pânico e TOC é alta (PERNA *et al.*, 1995). Isto sugere que a hiperatividade locomotora dos ratos com lesão no NMR seja de natureza compulsiva, principalmente pela sua característica repetitiva, sem causa ambiental justificável. O presente estudo objetivou avaliar se a hiperatividade locomotora induzida em ratos pela lesão eletrolítica do NMR tem características compulsivas. Este objetivo parece justificável, pois, são poucos os paradigmas existentes para o estudo experimental do TOC (SZECHTAMAN *et al.*, 1997; CAMPBELL *et al.*, 1999). Comparou-se, para tanto, os parâmetros da inibição comportamental, induzida por choques elétricos aplicados nas patas, de um grupo de ratos com hiperatividade locomotora induzida pela lesão do NMR e em um grupo de animais controles.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 18 ratos machos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) com pesos entre 300 e 359 gramas e 3 a 4 meses de idade. Onze animais foram submetidos à lesão eletrolítica do NMR, sendo selecionados 6 com hiperatividade locomotora indicativa da lesão correta. Sete animais (3 com lesão fictícia do NMR e 4 animais normais) foram utilizados como controles.

Os animais foram pesados, a quantidade de pentobarbital sódico (Hypnol, Lab. Cristália) necessária para uma dose de 40 mg/kg foi calculada, preparada e, finalmente, injetada intraperitonealmente. Após a perda do reflexo postural, injetou-se anestésico local (Xilocaína 2% com vasoconstrictor) no subcutâneo cranial e efetuou-se a tricotomia. Após a perda do reflexo córneo-palpebral, fez-se incisão longitudinal na pele do crânio e a tábua óssea exposta pela remoção do tecido conjuntivo. Abriu-se o meato auricular pela parte interna e, por aí, fixou-se o animal no aparelho estereotáxico. Marcou-se o local da passagem do eletrodo de coagulação e se fez a trepanação. A ponta do eletrodo de níquel-cromo (0,12 mm de diâmetro e sem isolamento em 0,8 a 1,0 mm da ponta) foi

posicionada nas coordenadas A: 2,0 e 3,0; H: + 1,6 mm (a partir do meato auricular) e L: 0,0 (aferido na sutura sagital) do Atlas Estereotáxico de PAXINOS & WATSON (1985), usando-se inserção oblíqua de 30° em relação ao plano vertical coronal. Eletrocoagulou-se o tecido em volta da ponta dos eletrodos usando-se corrente DC de 4 mA por 15 segundos. Os animais foram suturados e devolvidos às suas gaiolas para a recuperação pós-operatória. Os mesmos procedimentos, exceto a passagem da corrente eletrocoagulante, foram usados para a lesão fictícia. Os animais controles, sem lesão, foram sorteados do mesmo grupo de animais submetidos à cirurgia.

Após recuperação pós-operatória de 1 a 3 meses, os animais de ambos os grupos foram observados individualmente para contagem do número de vezes que cruzavam, andando, a linha mediana de uma gaiola de grades metálicas (24x30x24 cm), em um período de 10 minutos. O animal foi transferido para uma gaiola de Skinner (FUNBECC), onde se aplicou choque elétrico de polaridade reversível nas patas, usando-se a intensidade 7 da escala do aparelho. Os animais foram devolvidos às gaiolas para repetição da contagem da atividade locomotora nos 10 minutos subsequentes. Uma nova recontagem foi feita do vigésimo ao trigésimo minuto após o choque. Toda esta seqüência foi feita no período diurno, em laboratório, com temperatura ambiente semi-controlada e luz artificial.

Os dados quantitativos foram analisados com uso do teste de Mann-Whitney nos casos de comparações entre grupos diferentes. O teste de Wilcoxon foi usado no caso de comparações de dados do mesmo grupo. O nível de significância foi estabelecido em 0,05 em ambos os casos.

RESULTADOS

Os ratos se mostraram extremamente hiperativos nos primeiros dias subseqüentes à lesão. Eles andavam continuamente, com breves interrupções em certos locais da gaiola, onde emitiam exploração olfativa por dois a cinco segundos e retomavam a marcha imediatamente. A hiperatividade mostrou reduzir-se progressivamente nos dias subseqüentes sem nenhuma intervenção programada. Ciclos diurnos de sono e alimentação normais mostraram estar normalizados 30 dias após a lesão. Apesar desta aparente normalização, os animais exibiram alta hiperatividade quando mantidos em situações novas ou em ambientes ansiogênicos, tais como locais elevados, presença de conspecíficos ou barulhos excessivos.

Os ratos lesados apresentaram uma linha de base (antes do choque) com um total de 333 cruzamentos, com média (\pm desvio-padrão) de $55,5 \pm 22,8$ cruzamentos/rato que correspondeu a $5,6 \pm 0,9$ cruzamentos/minuto. Os animais do grupo controle apresentaram um total de 87 cruzamentos, correspondendo respectivamente a $12,4 \pm 5,3$ cruzamentos/rato e a $1,2 \pm 0,4$ cruzamentos/minuto, não havendo diferenças notáveis entre os animais com lesão fictícia e animais controles. O teste de Mann-Whitney mostrou que a média apresentada pelos animais lesados foi significativamente maior que a dos controles ($p < 0,05$).

Os animais lesados apresentaram um total de 430 cruzamentos nos dois períodos de contagem após o choque elétrico nas patas, perfazendo uma média individual de $71,7 \pm 34,0$ cruzamentos/rato e $3,6 \pm 0,8$ cruzamentos/minuto. Os controles apresentaram um total de 17 cruzamentos/rato, correspondentes a $2,4 \pm 4,0$ cruzamentos/rato e $0,1 \pm 0,2$ cruzamentos/minuto. Todos os animais lesados reiniciaram a marcha no primeiro minuto após a experiência estressante do choque elétrico nas patas. Tal fato foi observado em apenas 2 animais do grupo controle. Os animais controles permaneceram geralmente imóveis em um dos cantos da gaiola, acordados, em postura de expectativa e acompanhando visualmente o que ocorria no ambiente (padrão denominado de imobilidade, congelamento comportamental ou "freezing"). Três animais do grupo con-

trole permaneceram neste estado e não apresentaram nenhum cruzamento nos dois períodos de observação após os eletrochoques. As latências médias para o primeiro cruzamento foram de um minuto em todos os animais lesados e $6,1 \pm 3,9$ minutos nos controles. O teste de Mann-Whitney revelou significância nas diferenças de todos os parâmetros dos animais lesados em comparação aos respectivos dados obtidos nos controles. A Figura 1 mostra as frequências cumulativas, minuto por minuto, dos cruzamentos feitos pelos animais lesados e seus controles. O baixo número de cruzamentos nos controles revela a imobilidade após o estresse, enquanto o alto número de cruzamentos nos animais lesados mostra a ausência deste tolhimento comportamental.

A comparação do número de cruzamentos feitos pelos animais controles após a estimulação aversiva mostrou redução significativa em relação à contagem feita na linha de base (teste de Wilcoxon, $p < 0,005$). A comparação similar feita nos animais lesados mostrou também uma redução ligeira e progressiva, entretanto, sem significância estatística.

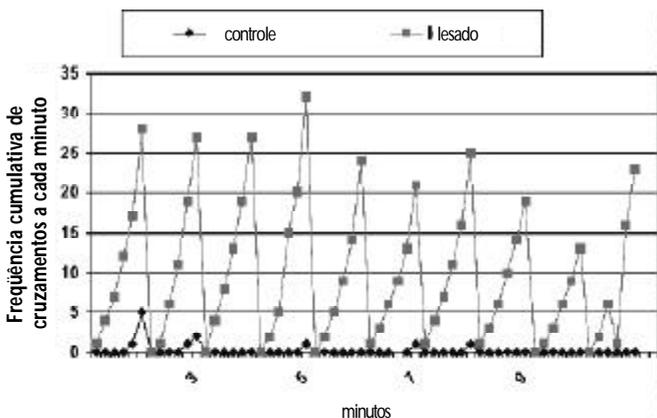


Figura 1. Atividade locomotora após estimulação aversiva em ratos com lesão no núcleo mediano da Rafe e em seus controles. Atividade locomotora medida pelo número de cruzamentos da linha média de uma gaiola. O número de cruzamentos dos animais de cada grupo, em cada minuto após a aplicação de eletrochoque nas patas por 30 segundos, foram ordenados e somados cumulativamente para a feitura do gráfico. O número total de minutos sem cruzamentos nos animais lesados (6) é significativamente menor que o observado nos controles (53), assim como, o número total de cruzamentos (quadrado, $p < 0,05$).

DISCUSSÃO

O resultado principal de nosso estudo mostra que os animais com lesão crônica do NMR não apresentaram a inibição comportamental natural após experiência aversiva estressante. Esta imobilidade pode ser classificada como defensiva, uma vez que é expressa por um estado de alerta intenso, justificável pela imprevisibilidade e incontrolabilidade dos choques elétricos recebidos anteriormente. Pode-se dizer, portanto, que a atividade locomotora dos animais lesados tem uma força motivacional que suplanta a emissão de uma resposta natural de defesa. A atividade compulsiva denota a emissão irresistível de atos contrários à vontade ou razão (DORLAND, 1972). É possível, portanto, interpretar-se a hiperatividade estudada como sendo compulsiva, desde que se afaste a possibilidade da mesma se tratar de um automatismo motor, tal como ocorre no balismo ou na coréia. A observação de que os animais lesados apresentam comportamentos indiferenciáveis daqueles observados nos normais, quando mantidos em suas gaiolas-viveiro, indica que a hiperatividade não é um automatismo motor. A hiperatividade, por outro lado, manifesta-se quando os animais são submetidos a situações ou manipulações ansiogênicas (DE PAULA *et al.*, 2000). O declínio do número total de cruzamentos com a repetição das observações após o estresse indica habituação, fato pouco comum em automatismos motores.

O alto número de cruzamentos observados na linha de base dos animais lesados reforça, também, a conclusão de que a hiperatividade tem possivelmente natureza compulsiva. É fato bastante conhecido que ambientes novos induzem ansiedade, ocasionando aumento concomitante dos comportamentos compulsivos. Nossos dados mais recentes mostram que os ratos com este tipo de lesão emitem comportamento de conferência de altura repetitivamente (UGA & HOSHINO, 2000). A conferência é um dos padrões de compulsão mais freqüentes em humanos. Isto sugere que a lesão do NMR facilita a emissão compulsiva de comportamentos, inclusive, da locomoção que foi avaliada no presente estudo.

A imobilidade de alerta (congelamento) foi o padrão comportamental predominante nos animais controles após a

aplicação dos eletrochoques nas patas. Esta imobilidade é expressão de um padrão de comportamento defensivo, gerado por um estado de ansiedade elevada (GRAEFF, 1994). A ausência desta imobilidade no rato com lesão no NMR pode, portanto, levar a supor que estes animais perderam a ansiedade com a lesão. Isto permite deduzir, por extensão, que a hiperatividade estudada não se trata de compulsão equivalente àquelas do TOC, visto que este transtorno é um distúrbio de ansiedade, como classifica o DSM-IV. Esta suposição é, entretanto, insustentável. Ela se baseia na suposição errônea de que a ansiedade só se manifesta através da imobilidade comportamental. A ansiedade é um estado emocional que prepara os organismos para os eventos iminentes que requerem alto gasto energético, particularmente para a luta ou fuga nas situações de defesa anti-predatória (GRAEFF, 1994). A imobilidade de alerta ou expectativa é apenas um estágio deste processo de defesa. A hiperatividade para a procura de um meio para fugir da situação potencialmente perigosa é, portanto, perfeitamente compatível em um estado de ansiedade aumentada. É perfeitamente admissível que níveis elevados de ansiedade induzam a hiperatividade locomotora, tal como a observada nos animais lesados após a experiência aversiva. Estudos de nossos laboratórios demonstram que o aumento da ansiedade por administração de cafeína, ou pela administração de lactato hipertônico, induz aumento da hiperatividade locomotora em ratos com lesão do NMR (DE PAULA *et al.*, 2000; MONTANHER *et al.*, 2000). Esta dualidade de expressão comportamental da ansiedade explica porque ANDRADE (1997) chegou a conclusões conflitantes. Esta autora observou que a lesão promovia aumento do tempo de permanência dos ratos nos braços abertos do labirinto em cruz elevado (efeito ansiolítico da lesão), enquanto os mesmo animais mostraram redução das passagens no sentido escuro (efeito ansiogênico da lesão).

A conclusão de que a hiperatividade locomotora observada nos ratos com lesão do NMR se trata possivelmente de manifestação compulsiva leva à consideração de que ela pode ser um paradigma experimental promissor para o estudo do TOC. Para isto, no entanto, é necessário preencher-se outros critérios, tais como o de preditividade (controle da hiperatividade com drogas eficazes no tratamento do TOC) e

de homologia (envolvimento de mecanismos neuroquímicos e neurofisiológicos equivalentes).

O fato dos animais com lesão no NMR apresentarem alta hiperatividade locomotora é fato conhecido (HOSHINO & SUGIZAKI, 1986). Isto confere a possibilidade do sistema serotoninérgico do NMR ser um sistema de inibição geral do comportamento (GRAY, 1982). Este sistema serotoninérgico, além do mais, parece ser o substrato anatômico do sistema geral de inibição da ação, postulado por Lorenz (CUNHA, 1983). A desafferentação súbita deste sistema parece promover a hiperatividade inicial e sua redução progressiva parece se dever a um rearranjo na quantidade de neurotransmissores e receptores em outros sistemas centrais. O reaparecimento da hiperatividade em ambientes novos, tal como observada no presente estudo, ou em outras situações ansiogênicas, parece indicar que um mecanismo central gerador de ansiedade está sob controle inibitório do NMR em condições normais. De fato, KAPLAN (1997) aponta o envolvimento do sistema dopaminérgico na origem do TOC. O mesmo envolvimento é apontado nos comportamentos compulsivos de ratos (RAMASUBBU *et al.*, 2000; CAMPBELL *et al.*, 1999; SZECHTMAN *et al.*, 1998). Estes dados parecem oferecer oportunidade para a investigação do critério de homologia no paradigma experimental que o presente trabalho apresenta.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Profa. Silvana Romani a valiosa revisão do texto, principalmente no tocante ao português.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, T.G.C.S. 1997. **Participação do núcleo mediano da rafe na modulação de respostas comportamentais, viscerais, endócrinas e imunológicas, frente a estímulos aversivos.** Tese de doutoramento. FFCL, Universidade de S. Paulo, Ribeirão Preto. 246p.

- BILLETT, E.A.; M.A. RICHTER; N. KING; A. HEILS; K.P. LESCH; J.L. KENNEDY. 1997. Obsessive-compulsive disorder, response to serotonin reuptake inhibitors and the serotonin transporter gene. **Molecular Psychiatry**, **2**: 403-406.
- CAMPBELL, K.M., L. DE LECCA; D.M. SERYNSE; M.G. CARON; M.J. MCGRATH; S.B. SPARBER; SUN LY & F.H. BURTON. 1999. OCD-like behaviors caused by a neuropotentiating transgene targeted to cortical and limbic D1+ neurons. **Journal of Neurosciences**, **19**: 5044-5053.
- CUNHA, W.H.A. 1983. Introdução ao desenvolvimento histórico e aos princípios básicos da etologia. **Anais do I Encontro de Etologia**, Jaboticabal, S.P., p.1-33.
- DAHLSTROM A. & K. FUXE. 1964. Evidence for the existence of monoaminergic neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in cell bodies of brain stem neurons. **Acta Physiologica Scandinavica**, **64** (suppl. 232): 1-55.
- DE PAULA, H.M.G.; D.A. UGA & K. HOSHINO. 2000. Hiperatividade locomotora em ratos com lesão do núcleo mediano da rafe: um modelo experimental de compulsão? **Resumos da XV Reunião Anual da FESBE**, p. 182.
- DORLAND. 1972. **Dicionário de Ciências Médicas**. Merlo e cols (Eds), El Ateneo, Buenos Aires. 1736p.
- FINLEY, P.R. 1994. Selective serotonin reuptake inhibitors: pharmacologic profiles and potential therapeutic distinctions. **Annals of Pharmacotherapy**, **28**: 1359-1369.
- GORMAN, J.M.; M.R. LIEBOWITZ; A.J. FYER; D. GOETZ; R.B. CAMPEAS; M.R. FYER; S.O. DAVIES & D.F. LEIN. 1987. An open trial of fluoxetine in the treatment of panic attacks. **Journal of Clinical Psychopharmacology**, **7**: 329-332.
- GRAEFF, F.G. 1994. Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviors and related emotions in mammals. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, **27**: 811-829.
- GRAY, J.Á. 1982. **The neuropsychology of anxiety**. New York, Oxford University Press. 236p.
- HANNA G.L.; J.A. HIMLE; G.C. CURTIS; D.Q. KORAM; J.V. WEELE; B.L. LEVENTHAL & E.H. COOK JR. 1998. Serotonin transporter and seasonal variation in blood serotonin in families with obsessive-compulsive disorder.

- Neuropsychopharmacology**, **18**: 102-111.
- HOSHINO, K. & M. SUGIZAKI. 1986. Ulcerogenic effect of the lesion of the median raphe nucleus in fasted rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, **19**: 123-130.
- KAPLAN, H.I. 1997. **Compêndio de psiquiatria: ciência do comportamento e psiquiatria clínica**. Artes Médicas, Porto Alegre. 1169p.
- MONTANHER, A.R. & K. HOSHINO. 2000. Efeito do lactato de sódio hipertônico na locomoção compulsiva de ratos induzida pela lesão eletrolítica da região do núcleo mediano da rafe. **Anais de Etologia**, **18**: 131.
- NURNBERG, H.G.; S.S KEITH & D.M. PAXTON. 1997. Consideration of the relevance of ethological animal models for human repetitive behavioral spectrum disorders. **Biological Psychiatry**, **41**: 226-229.
- PAXINOS, G. & C. WATSON. 1985. The rat brain in stereotaxic coordinates. **Academic Press, Sidney**. 264p.
- RAMASUBBU, R.; A. RAVIDRAN & Y. LAPIERRE. 2000. Serotonin and dopamine antagonism in obsessive-compulsive disorder: effect of atypical antipsychotic drugs. **Pharmacopsychiatry**, **33**: 236-238.
- SZECHTMAN, E.H.; W. SULIS & D. EILAN. 1998. Quinpirole induces compulsive checking behavior in rats: a potential animal model of obsessive-compulsive disorder (OCD). **Behavioral Neurosciences**, **112**: 1475-1485.
- TINBERGEN, N. 1974. Ethology and Stress Diseases. **Science**, **185**: 20-26, 1974.
- UGA, D.A.; H.M.G. DE PAULA & K. HOSHINO. 2000. Hiperatividade locomotora da lesão do n. mediano da rafe e susceptibilidade ao pânico da crise audiogênica em ratos. **Resumos da XV Reunião Anual da FESBE**, p. 120.
- UGA, D.A. & K. HOSHINO. 2000. Inspeção e altura em ratos com lesão dos núcleos interpeduncular e mediano da rafe como manifestação compulsiva de conferência. **Anais de Etologia**, **18**: 128.

Recebido: 05/03/01

Aceito: 25/01/02