



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

**EFEITOS DO HIPERTIREOIDISMO EM MODELOS  
EXPERIMENTAIS DE ANSIEDADE, PÂNICO E DEPRESSÃO  
EM RATOS**

Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas

**Monique Pereira do Nascimento**

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, 30 de agosto de 2010

Nascimento, Monique Pereira do

Efeitos do Hipertireoidismo em Modelos Experimentais de Ansiedade, Pânico e Depressão em Ratos.

Nascimento, M.P. – Vitória, 2010.

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. Hipertireoidismo, 2. Matéria Cinzenta Periaquedutal, 3. Ansiedade, 4. Pânico, 5. Depressão, 6. Estimulação Elétrica Intracraniana.

EFEITOS DO HIPERTIREOIDISMO EM MODELOS  
EXPERIMENTAIS DE ANSIEDADE, PÂNICO E DEPRESSÃO  
EM RATOS

Monique Pereira do Nascimento

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da 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  
Departamento de Ciências Fisiológicas – UFES*

---

*Prof. Dr. Francisco Silveira Guimarães  
Departamento de Farmacologia - FMRP-USP*

---

*Prof. Dra. Ana Paula Santana de Vasconcellos Bittencourt  
Departamento de Ciências Fisiológicas - UFES*

---

*Prof. Dr. Luiz Carlos Schenberg  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas  
Centro de Ciências da Saúde - Universidade Federal do Espírito Santo*

Vitória, 30 de agosto de 2010

## AGRADECIMENTOS

*Primeiramente agradeço a Deus, por guiar e abençoar a minha vida.*

*Aos meus pais, Elias e Goretti, agradeço pela confiança depositada em mim, o amor, dedicação e incentivo em todos esses longos anos de estudos que me permitiram alcançar muitas vitórias e concluir mais esta importante etapa. Dedico este trabalho a vocês.*

*Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Schenberg, por todo ensinamento e apoio fundamentais na realização deste trabalho, agradeço não apenas pela excelente orientação, mas também pelo exemplo de mestre e pesquisador.*

*Ao Prof. Dr. Sérgio Tufik, do Departamento de Psicobiologia da Escola Paulista de Medicina, e à Dra. Magda Bignotto, do Instituto do Sono, pela viabilização da dosagem indispensável dos hormônios da tireóide.*

*À prof. Dra. Ana Paula Bittencourt e ao Prof. Dr. Francisco Silveira Guimarães por terem aceitado o convite e participarem desta defesa de mestrado.*

*Aos colegas do laboratório, agradeço a amizade, as trocas de conhecimentos e as contribuições na realização dos experimentos.*

*À Vanessa Mendonça, obrigada pela amizade de anos e colaboração neste trabalho.*

*Às minhas amigas, que são parte da minha família, Bruna Malacarne, Luana Morellato, Larissa Molina, Magda Rossi, Vanessa Mendonça e Aline/Lara Ribeiro pela agradável e divertida convivência do lar (permanente ou não).*

*Ao Raul, meu amor, a pessoa certa na hora certa, obrigada por compreender minha ausência e sempre estar comigo, pela paciência, companheirismo e apoio nesse momento tão importante. Sem você teria sido mais difícil.*

*Aos meus irmãos, Murilo e Jean, e meus avós, pela feliz convivência em família.*

*A todos os meus amigos, obrigada por tornarem meus dias mais alegres e a vida mais divertida.*

*Às mestres e futuras mestres CQ Luana, Bruna, Débora, Magda, Vanessa, Aline, Cris e Camila que, apostando na capacidade de criar e transformar a realidade, com certeza, darão valiosas colaborações ao futuro do Brasil e do mundo.*

## ABREVIATURAS

- %EBA - porcentagem de entradas no braço aberto
- %EBF - porcentagem de entradas no braço fechado
- %TBA- porcentagem do tempo no braço aberto do LCE
- $\chi^2$  - chi-quadrado
- 5-HT - serotonina
- ACTH - corticotrofina
- ANOVA - análise de variância
- AP- ataques de pânico
- AR - arena (*open field*)
- CO<sub>2</sub> - dióxido de carbono
- D1 - deiodinase 1
- D2 - deiodianse 2
- D3 - deiodianse 3
- EBA - entradas no braço aberto do LCE
- EBF - entradas no braço fechado do LCE
- EIC – estimulação intracaraniana
- EP - erro padrão
- EPM - erro padrão da média
- GH - hormônio do crescimento
- HHA - hipotálamo-hipófise-adrenal
- HHT - eixo hipotálamo-hipófise-tireóide
- i.p. - intraperitoneal
- i.v. - intravenoso
- I<sub>50</sub> – intensidade mediana

IS - interação social

LC - locus ceruleus

LCE - labirinto-em-cruz elevado

LCR - líquido cefalorraquidiano

LTE - labirinto-em-T elevado

MCPA - matéria cinzenta periaquedutal

MCPAvl - matéria cinzenta periaquedutal ventrolateral

MCPD - matéria cinzenta periaquedutal dorsal

NDR - núcleo dorsal da rafe

NF - natação forçada

PKA - proteína quinase A

PKC – proteína quinase C

PKM2 – piruvato quinase M2

PNF - pré-teste da natação forçada

PreproTRH - peptídeo precursor do TRH

PRL - prolactina

PVN - núcleo paraventricular do hipotálamo

SAL - grupo salina

SNC - sistema nervoso central

T1 - monoiodotirosina

T2 - diiodotirosina

T3 - triiodotironina

T30 - grupo tratado com 30 µg/rato/dia

T3r - triiodotironina reversa

T4 - tiroxina

T4-L - tiroxina livre

T60 - grupo tratado com 60 µg/rato/dia

TAG - transtorno de ansiedade generalizada

TBA - tempo no braço aberto do LCE

TBF - tempo no braço fechado

TEPT - transtorno do estresse pós-traumático

TP - transtorno do pânico

TPC - tempo na plataforma central

TR - receptores tiroideanos

TRH - hormônio liberador da tireotrofina

TRH-DE - ectoenzima de degradação do TRH

TSH - tireotrofina

TSIs - imunoglobulinas estimulantes da tireóide



## ÍNDICE

<b>Abreviaturas</b> .....	v
<b>Resumo</b> .....	9
<b>Abstract</b> .....	11
<b>Revisão: Hormônios da tireóide e seus efeitos no comportamento</b> .....	13
1. Tireóide.....	13
1.1 Regulação do eixo hipotálamo-hipofisário-tireoidiano.....	14
1.2 Disfunções da tireóide.....	17
2. Efeitos dos hormônios da tireóide no SNC.....	21
3. Pânico, ansiedade e estresse.....	27
Objetivos.....	36
<b>Estudo I - Efeitos da tiroxina em modelos experimentais de ansiedade, pânico e depressão em ratos</b> .....	37
Resumo.....	38
Introdução.....	40
Metodologia.....	42
Resultados.....	46
Discussão.....	55
<b>Estudo II - Efeitos do hipertireoidismo experimental sobre os comportamentos de defesa induzidos pela estimulação da matéria cinzenta periaquedutal dorsal</b> .....	62
Resumo.....	63
Introdução.....	65
Metodologia.....	66
Resultados.....	72
Discussão.....	78
<b>Referências</b> .....	83

## RESUMO

**Efeitos do hipertireoidismo em modelos experimentais de ansiedade, pânico e depressão em ratos.** *Monique Pereira do Nascimento, Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES, Brasil.*

Observações clínicas e experimentais sugerem que 2/3 dos pacientes com doença tireoidiana apresentem distúrbios psiquiátricos. Contudo, os dados clínicos são bastante contraditórios. Assim, avaliamos os efeitos do hipertireoidismo experimental produzido pela administração de L-tiroxina (T4) sobre índices de atividade exploratória, ansiedade, pânico e depressão dos testes da arena (AR, *open field*), interação social (IS), natação forçada (NF), labirinto-em-cruz elevado (LCE) e labirinto-em-T elevado (LTE). Adicionalmente, avaliamos os efeitos destes tratamentos sobre os comportamentos de defesa induzidos pela estimulação elétrica da matéria cinzenta periaquedutal dorsal (MCPD), um modelo de ataque de pânico. Ratos Wistar machos (n=58) foram implantados com eletrodos na MCPD e, 5 dias após, estimulados com pulsos de intensidades crescentes (sessão-triagem). Os ratos que apresentaram galopes com intensidades inferiores a 70  $\mu$ A foram tratados por 10 dias (i.p.) com salina (controles), ou com 30  $\mu$ g/dia e 60  $\mu$ g/dia de T4 (grupos T30 e T60, respectivamente). Os efeitos agudos sobre as respostas de defesa da MCPD foram avaliados no mesmo dia da sessão-triagem, e os efeitos crônicos neste e nos outros testes, 10 dias após. Os níveis plasmáticos de T3 e T4 e os efeitos comportamentais de T4 foram avaliados por ANOVA seguida de testes-t para amostras independentes. Os efeitos sobre os comportamentos de defesa da MCPD foram avaliados por análise logística de limiares. As diferenças foram consideradas significantes para  $P < 0,05$ . Embora os grupos não tenham diferido quanto ao peso

final, eles apresentaram aumentos similares, porém, significantes, dos níveis plasmáticos de T3 e T4, em cerca de 60% e 50%, respectivamente. No LCE, houve um aumento significativo da porcentagem de entrada no braço aberto, sugerindo um efeito ansiolítico. Contudo, os índices de ansiedade não foram reduzidos nos testes de IS, AR e LTE. No conjunto, estes resultados sugerem que o sintoma de 'nervosismo' relatado por 99% dos pacientes com hipertireoidismo, sejam distintos da ansiedade dos modelos experimentais empregados neste estudo. Por outro lado, no teste da AR, a T4 aumentou as respostas de levantar, explorar, olfação e locomoção periférica, confirmando os dados clínicos de hiperatividade. Contrariamente, a T4 aumentou o tempo de imobilidade na NF, sugerindo um efeito pró-depressivo específico. Adicionalmente, embora a menor dose de T4 tenha reduzido a latência de fuga no LTE, sugerindo um efeito panicogênico, a administração aguda ou crônica da mesma dose causou aumentos significantes dos limiares de imobilidade, exoftalmia, trote, galope e salto no modelo de pânico por estimulação da MCPD, sugerindo um efeito panicolítico. O grupo T60 também apresentou aumentos significantes dos limiares de galope, tanto no tratamento agudo quanto no tratamento crônico. Embora os efeitos do hipertireoidismo sugiram que os modelos de pânico do LTE e da MCPD mobilizem mecanismos diferentes, os resultados não foram conclusivos, tal como ocorre na literatura clínica sobre a comorbidade destes transtornos. Por fim, como não houve perda de peso dos animais, nossos resultados sugerem que o hipertireoidismo leve cause hiperatividade e predisponha à depressão.

**Palavras-chaves:** Hipertireoidismo, Matéria Cinzenta Periaquedutal, Ansiedade, Pânico, Depressão, Estimulação Elétrica Intracraniana.

## ABSTRACT

**Effects of hyperthyroidism on experimental models of anxiety, panic and depression in rats.** *Monique Pereira do Nascimento, Federal University of Espírito Santo, Vitória, Brazil.*

Clinical and experimental observations suggest that 2/3 of patients with thyroid disease have psychiatric disorders. However, clinical data are very contradictory. We evaluated the effects of experimental hyperthyroidism produced by administration of L-thyroxine (T4) on indexes of exploratory activity, anxiety, panic and depression of the open field (OF), social interaction (SI), forced swimming (FS), elevated plus-maze (EPM) and elevated T-maze (ETM). Additionally, we evaluated the effects of these treatments on the defensive behaviors induced by electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray (DPAG), a model of panic attack. Male Wistar rats (n = 58) were implanted with electrodes in the DPAG, and five days later, stimulated with pulses of increasing intensities (screening session). Rat that had galloping with intensities below 70  $\mu$ A were treated for 10 days (i.p.) with saline (controls) or with 30  $\mu$ g/day and 60  $\mu$ g/day of T4 (T30 and T60 groups, respectively). The acute effects on the defense responses of the DPAG were assessed on the the same day of the screening session, and the chronic effects and other tests, after 10 days. Plasma levels of T3 and T4 and the behavioral effects of T4 were evaluated by ANOVA followed by t-tests for independent samples. Response accumulated frequencies of DPAG-evoked behaviors were subjected to the threshold logistic analysis. Differences were considered significant for P <0.05. Although the groups did not differ as to the final weight, they showed similar but significant increases in plasma levels of T3 and T4 in 60% and 50% respectively. In the EPM, there was a significant

increase in the percentage of open-arm entry, suggesting an anxiolytic effect. However, indexes of anxiety were not reduced in SI, OF and ETM. These results suggest that the symptom of 'nervousness' reported by 99% of patients with hyperthyroidism is distinct from the anxiety of animal models of this study. However, in the OF test, the T4 increased the rearing, exploration, olfaction and peripheral locomotion, confirming the clinical data of hyperactivity. In contrast, T4 increased the immobility time in FS suggesting a depression-like effect. On the other hand, although the lower dose of T4 reduced the escape latency in the ETM, suggesting a panic-like effect, either the acute or chronic administration of the same dose caused significant increases in the thresholds of immobility, exophthalmus, trotting, galloping and jumping in the model of panic by electrical stimulation of the DPAG, suggesting rather a panicolytic effect. The T60 group also showed significant increases in the thresholds of galloping in both the acute and chronic treatments. Although these data suggest that ETM and DPAG models of panic mobilize different mechanisms, the results were not conclusive regarding the effects of hyperthyroidism in panic attacks, as is often the case in clinical literature. Finally, because animals presented no weight loss, our results suggest that mild hyperthyroidism causes hyperactivity and predisposes individuals to depression.

**Keywords:** Hyperthyroidism, Periaqueductal Gray, Anxiety, Panic, Depression, Intracranial Electrical Stimulation.

# REVISÃO

## HORMÔNIOS DA TIREÓIDE E SEUS EFEITOS NO COMPORTAMENTO

### 1. *Tireóide*

A tireóide humana pesa de 15 a 20g e é constituída por 2 lóbulos conectados pelo istmo, lembrando a forma de uma borboleta. O istmo localiza-se à frente do terceiro e quarto arcos traqueais. Os lobos estendem-se acima até a metade da cartilagem tireóide e para baixo até o quinto e sexto arcos traqueais. A tireóide é irrigada pelas artérias tireóideas superiores, ramos das artérias carótidas externas, e as artérias tireóideas inferiores, ramos dos troncos tireocervicais.

A tireóide é formada por folículos tireoideanos, que são compostos por uma camada única de células epiteliais, as células foliculares que secretam várias proteínas, principalmente a tireoglobulina, que é precursora e armazenadora de hormônios tireoideanos. A organificação da tireoglobulina, mediada pela enzima iodinase, origina os precursores hormonais monoiodotirosina (T1) e diiodotirosina (T2), que se ligam formando os hormônios tiroxina (3,5,3',5'-tetraiodotironina, T4), a 3,5,3'-Triiodotironina (T3) e 3,3',5'-Triiodotironina (Triiodotironina reversa, T3r), todos estes são armazenados no colóide presente na luz do folículo (Guyton e Hall, 2006).

A tireóide se origina a partir do endoderma da faringe primitiva, o ducto tireoglosso. Seu desenvolvimento se inicia a partir do vigésimo quarto dia de gestação, e a síntese de tireoglobulina inicia-se no vigésimo nono dia de desenvolvimento. A partir do quadragésimo dia ela está devidamente posicionada.

Em torno da décima primeira e décima segunda semana a estrutura folicular está em condições de funcionamento e os hormônios tireóideos são produzidos normalmente.

### 1.1. *Regulação do eixo hipotálamo-hipofisário-tireoidiano*

A atividade da tireóide é regulada pelos fatores que determinam sua síntese, secreção e níveis sanguíneos de tireotrofina (TSH). O TSH é um heterodímero composto pelas subunidades  $\alpha$  e  $\beta$ . A subunidade  $\alpha$  é igual para o hormônio luteinizante, o hormônio estimulante do folículo e a gonadotrofina coriônica humana. A subunidade  $\beta$  confere especificidade para a molécula e se liga ao receptor de TSH nas células foliculares da tireóide. A produção e secreção do TSH são reguladas pelos hormônios tireoideanos, que exercem efeitos inibitórios sobre sua secreção, e pelo hormônio liberador da tireotrofina (TRH) que estimula sua síntese. Os hormônios tireoideanos inibem a secreção de TSH por uma via comum. De fato, a tiroxina (T4) necessita ser convertida em triiodotironina (T3) para ligar-se aos receptores nucleares dos tireotrófos hipofisários, inibindo a secreção de TSH.

O TRH é fundamental para a regulação do eixo hipotálamo-hipófise-tireóide (HHT). Secretado pelo núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) e regulado pelos níveis de hormônios tireoideanos, ele é sintetizado como um pró-hormônio, o pré-pró-TRH. Técnicas modernas mostraram que o TRH extra-hipotalâmico encontrado no cérebro, pâncreas, miocárdio, próstata, testículos, medula espinhal e adeno-hipófise é, em realidade, uma fração imunorreativa de sua molécula precursora onde o aminoácido histidina situa-se em posições diferentes daquela da molécula de TRH (Cruz e Nilni, 1996). Usando técnicas de

imunohistoquímica, Liao e colaboradores (1988) estudaram a localização do peptídeo pré-pró-TRH (178-199) em ratos. Eles observaram que corpos celulares localizados na parte parvocelular do PVN e na matéria cinzenta periaquedutal (MCPA) apresentavam imunorreatividade intensa para o peptídeo. Concentrações moderadas ou baixas foram observadas nos núcleos pré-ópticos, núcleos dorsomedial e ventromedial do hipotálamo, núcleo do nervo hipoglosso, núcleos da rafe e região perifornical. A marcação foi restrita aos corpos celulares dos neurônios. Da mesma forma, Ladram e colaboradores (1994) mostraram a presença dos peptídeos pré-pró-TRH em várias áreas do cérebro.

O pré-pró-TRH é uma proteína de 29 kda, com 5 cópias da sequência progenitora do TRH (Glp-His-Pro-Gly) separadas por peptídeos crípticos que tem a mesma estrutura em todas as espécies de vertebrados (Ladram *et al.*, 1994). Estes peptídeos estariam envolvidos em outros sistemas agindo como neuromoduladores e neurotransmissores. Estudos em ratos mostraram que o pré-pró-TRH(160-169), o pré-pró-TRH(178-199) e o próprio TRH são as principais formas de armazenamento das formas precursoras do TRH no hipotálamo e na medula espinhal, mas não no lobo olfatório onde o peptídeo mais encontrado é o pré-pró-TRH(172-199), mostrando que existem diferentes padrões de processamento do hormônio (Bulant *et al.*, 1988; Ladram *et al.*, 1994). O fragmento 160-169, também chamado de PsT10 e Ps4, também é capaz de estimular a síntese de betaTSH e a liberação de TSH, PRL e GH. Ps4 e receptores para Ps4 têm sido descritos em vários tecidos extra-hipofisários e outros sistemas endócrinos, principalmente no pâncreas e aparelho reprodutor masculino. Outro fragmento, 179-199, inibe a liberação da corticotrofina (ACTH) *in vivo* e *in vitro*, tanto basal quanto estimulada por TSH, e potencializa a inibição da liberação de ACTH pela dexametasona *in vitro*, sugerindo uma ação de



modulador da secreção de ACTH cuja relevância ainda não foi estabelecida (Nillni e Sevarino, 1999). Os corpos celulares dos neurônios produtores de TRH e peptídeos pró-TRH são densamente inervados por axônios contendo catecolaminas e neuropeptídeo-Y, sugerindo uma ação destes neurotransmissores na regulação da síntese dos primeiros. Axônios contendo somatostatina também contribuem para a regulação negativa da síntese do TRH. O TRH no sistema nervoso central é rapidamente inativado por uma peptidase denominada ectoenzima de degradação do TRH (TRH-DE). Ela é muito específica e não se conhece outro substrato para essa enzima. Em roedores, sua atividade é estimulada pelos hormônios tireoideanos e reduzida pelo estrogênio, o que sugere que possa atuar como elemento regulador da secreção de TSH (Scalon e Hall, 1995).

Vários neurotransmissores atuam como moduladores na síntese e secreção de TSH. A dopamina via receptores D2, e a somatostatina, inibem sua síntese e liberação. Ao contrário, a ativação adrenérgica tem ação estimulatória na síntese e secreção deste hormônio. A estimulação alfa-adrenérgica central aumenta a liberação de TSH em ratos, por facilitar a secreção de TRH (Larsen e Ingbar, 2003).

A secreção humana de TSH se dá em pulsos que ocorrem aproximadamente a cada 2 horas. A frequência e a amplitude das pulsações aumentam ao longo do dia, com acrofases no final da tarde e durante o sono. A concentração máxima de TSH pode ser medida entre 21:00 e 2:00 h. A secreção estimulada do TSH é máxima 20 a 30 minutos após a administração de TRH. O declínio é lento, havendo um retorno aos níveis basais somente 4 horas após os níveis dos hormônios tireoideanos alcançarem seu pico.

## 1.2. *Disfunções da tireóide*

As doenças tireoidianas são comuns na população, sendo mais frequentes em mulheres e em indivíduos com mais de 40 anos de idade. As doenças autoimunes são as causas mais comuns de transtornos tireoideanos. Dentre estas, a tireoidite de Hashimoto é a causa mais comum de hipotireoidismo com prevalência de 5 a 15% em mulheres e 1 a 5% em homens. Por outro lado, a doença de Graves é a causa mais comum de tireotoxicose e é causada por imunoglobulinas estimulantes da tireóide (*TSIs*) que se ligam aos mesmos receptores do TSH promovendo hipersecreção de hormônios. Respectivamente, homens e mulheres apresentam riscos de 1% e 5% de desenvolvimento da doença ao longo da vida. Ambas as doenças são transmitidas geneticamente e as disfunções tireoidianas afetam tanto os tecidos periféricos como o sistema nervoso central (SNC) (Scalon e Hall, 1995; Larsen e Ingbar, 2003).

### 1.2.1. *Hipotireoidismo*

O hipotireoidismo é uma síndrome clínica e bioquímica secundária à redução da produção dos hormônios tireoideanos quer seja por disfunção do eixo hipotálamo-hipofisário (secundária) ou da própria tireóide (primária). Os indivíduos com hipotireoidismo apresentam um amplo aspecto de manifestações clínicas que variam do quadro assintomático, diagnosticado por meio de testes de triagem, ao quadro de mixedema grave (Tabela 1).

Tabela 1. Sintomas e sinais do hipotireoidismo

	Sintomas	Sinais
Gerais	Frio excessivo, fadiga, aumento de peso e rouquidão	Hipotermia, obesidade leve
Sistema nervoso	Letargia, redução de memória e da capacidade de concentração e alteração da personalidade	Sonolência, fala lenta, redução da audição, ataxia, retardo dos reflexos tendinosos profundos e síndrome do túnel do carpo
Sistema muscular esquelético	Fraquezas, câimbras musculares e dor articular	
Sistema gastrointestinal	Náuseas e constipação	Aumento da língua e ascite
Sistema cardiorespiratório	Redução da tolerância ao exercício	Bradycardia, hipertensão arterial leve, derrame pleural e pericárdico
Sistema reprodutivo	Redução da libido e da fertilidade e alterações menstruais	Características secundárias normais
Pele e anexos	Pele seca, edema facial e queda de pêlos	Edema de face, mãos e tornozelos, edema periorbitário, palidez e pele amarelada

O hipotireoidismo é causado por doença tireoidiana primária em aproximadamente 98% dos casos. A dosagem de TSH é indispensável para o diagnóstico de hipotireoidismo, assim como para diferenciar o hipotireoidismo primário do secundário. Os níveis elevados de TSH associados à diminuição dos níveis séricos de T4 e tiroxina livre (T4-L) estabelecem o diagnóstico de hipotireoidismo primário, enquanto que o nível sérico de TSH normal ou diminuído associado à T4-L baixo estabelece o diagnóstico de hipotireoidismo secundário.

No quadro de hipotireoidismo distúrbios cognitivos, mudanças de humor, irritabilidade, psicose, desatenção, comprometimento da memória,

percepção prejudicada, paranóia e alucinações visuais podem se desenvolver. Contudo, a depressão é o sintoma mais comum e pode vir acompanhada de ansiedade e insônia (Whybrow e Bauer, 2000b).

### 1.2.2. Hipertireoidismo

O termo hipertireoidismo se aplica às doenças caracterizadas por hiperfunção da glândula tireóide, enquanto o termo tireotoxicose refere-se às manifestações clínicas e bioquímicas do excesso tissular de hormônios, independentemente da etiologia. Depois da doença de Graves, que compreende 60 a 80% dos casos, o bócio nodular tóxico, adenoma tóxico e tireoidites são as principais causas de tireotoxicose.

As conseqüências clínicas da tireotoxicose refletem o resultado final dos efeitos de quantidades excessivas dos hormônios tireoideanos em praticamente todos os órgãos e tecidos. O diagnóstico do hipertireoidismo é geralmente clínico. Nervosismo, intolerância ao calor, perda de peso associado com aumento de apetite, sudorese, palpitações e diarreias são freqüentes. Existe uma variedade de sintomas neuropsiquiátricos decorrentes da tireotoxicose, a labilidade emocional é comum e as alterações mentais que ocorrem podem ser tão extremas que chegam à psicose (Tabela 2). Os sintomas incluem ainda ansiedade, disforia, agitação, comprometimento da memória e dificuldade de concentração. Estudos mostraram a prevalência de desordens de ansiedade em aproximadamente 60% dos pacientes e de depressão entre 31 e 69% (Kathol e Delahunt, 1986; Trzepacz *et al.*, 1988).

A associação da história clínica, avaliação laboratorial e captação de iodo radioativo são importantes para o diagnóstico do hipertireoidismo. Em relação à

avaliação laboratorial, o nível sérico de TSH encontra-se baixo ou indetectável, com exceção dos casos de adenoma hipofisário secretor de TSH, ou daqueles com síndrome de resistência aos hormônios tireoideanos.

Tabela 2. Sintomas e sinais do hipertireoidismo

Sintomas	Sinais
Intolerância ao calor	Aumento da temperatura corporal
Fraqueza / fadiga	Hiperidrose
Palpitações	Fraqueza muscular
Dificuldade respiratória	Taquicardia e fibrilação atrial
Nervosismo	Tireomegalia
Perda de peso	Taquipnéia
Rouquidão	Tremores
Queda de cabelos	Onicólise
Alterações do ciclo menstrual	Alopecia, cabelos finos e brilhantes
Disfagia	Oligomenorréia

### 1.2.3. Hipertireoidismo subclínico

É definida pela combinação de concentrações baixas ou não detectáveis do TSH a valores normais de T4-L. Da mesma forma os pacientes são geralmente assintomáticos, mas existem relatos mostrando efeitos adversos sobre a qualidade de vida (Romaldini *et al.*, 2004).

#### 1.2.4. Hipotireoidismo subclínico

É uma disfunção caracterizada por aumento nos valores de TSH com concentrações normais de T4-L, na ausência de sintomas clínicos manifestos. Contudo, tem sido sugerida a associação deste com depressão e doença do pânico, sendo demonstrada a melhora dos pacientes, com tratamento antidepressivo, apenas após restabelecimento do eutireoidismo (Romaldini *et al.*, 2004).

#### 2. Efeitos dos hormônios da tireóide no SNC

Existem evidências de que os hormônios tireoideanos exerçam funções importantes no SNC. Uma delas é a presença de receptores nucleares para T3 amplamente distribuídos no cérebro de ratos adultos, apresentando alta densidade em áreas filogeneticamente recentes, tais como a amígdala e hipocampo, e baixa densidade no cerebelo e tronco encefálico (Bauer e Whybrow, 2002). Outra evidência consiste nos processos distintos no cérebro e tecidos periféricos para deiodinação dos hormônios tireoideanos. Foram identificadas três tipos de deiodinases, com pesos moleculares semelhantes (entre 28 e 32 kDa), incluindo as deiodinases tipo 1 (D1), tipo 2 (D2) e tipo 3 (D3). Essas enzimas são responsáveis pela formação de T3, o metabólito biologicamente mais ativo, e pela inativação tanto de T4 quanto de T3. Ambas, D1 e D2, catalizam a deiodinação de T4 gerando T3. Porém, a primeira é predominante nos tecidos periféricos e a T3r é seu substrato preferencial, convertendo T4 em T3 com pouca eficiência. Já a D2 tem maior afinidade por T4, sendo a enzima de maior eficiência na formação de T3. Em contraste, D3 é a maior conversora de T4 em T3r e T2 e, conseqüentemente, é a

principal inativadora de hormônios tireóideos. A D1 também degrada T3 e T4 formando T3r e T2.

Ao contrário dos tecidos periféricos, a D2 e D3 são as formas predominantes no SNC e apresentam distribuições regionais e celulares específicas. Adicionalmente, as concentrações dos hormônios no cérebro são equimolares, diferentemente dos tecidos periféricos no qual a concentração de T4 é maior que a concentração de T3 (Van Doorn *et al.*, 1985). A distribuição das deiodinases é específica em cada tipo de tecido. Em humanos, os níveis mais elevados de expressão da D1 são encontrados no fígado, rim, tireóide e hipófise. No cérebro, a D2 é encontrada em várias regiões, e é majoritariamente expressa em células gliais, nos tanicitos do terceiro ventrículo e em astrócitos em todo o cérebro mas, mais intensamente no neocórtex, gânglio basal e hipocampo. A D2 também está presente na hipófise, tireóide, placenta e músculos cardíaco e esquelético (Meyer, 2007; Lechan e Toni, 2002). Vale ressaltar que não há produção de deiodinase no PVN, dessa forma, a deiodinação do T4 deve ocorrer em outros locais do cérebro, dos quais o T3 é transportado ao PVN, provavelmente através do líquido cefalorraquidiano (LCR) ou glia adjacente (Lechan e Toni, 2002). A D3 tem influência especial nos períodos embrionários e pós-natal, protegendo o organismo de alterações hormonais da tireóide quando os hormônios tiroideanos exercem um papel essencial para o processo de diferenciação de vários tecidos e órgãos, dessa forma a D3 apresenta os níveis de expressão mais altos em tecidos fetais humanos e de roedores, na placenta, útero gravídico e vasos umbilicais. Na vida adulta, a D3 é expressa predominantemente no sistema nervoso central e pele.

Aproximadamente 80% da T3 do cérebro é produzida localmente pela conversão de T4 pela D2, e a síntese desta enzima é estimulada em situações de

baixa de hormônios tireoideanos, preservando a concentração de T3 cerebral (Guadaño-Ferraz *et al.*, 1999).

Os hormônios tireoideanos entram no cérebro rapidamente quando injetados na corrente sanguínea. A transtiretina é uma das proteínas séricas transportadoras de T4 e representa entre 10 e 25% das proteínas do líquido LCR. A afinidade do T4 pela transtiretina é de 39,3% comparado com 1,4% para o T3, demonstrando certa especificidade no transporte de T4 para o cérebro (Hatterer, 1993). Foi observado que pacientes deprimidos apresentam uma redução dos níveis de transtiretina, bem como uma redução da deiodinação de T4 em T3, diminuindo a biodisponibilidade central de T3 (Sintzel *et al.*, 2004).

Os hormônios tireoideanos também têm funções metabólicas no SNC. De fato, Constant e colaboradores (2001) observaram que nos indivíduos hipotireoideos há uma redução generalizada do fluxo sanguíneo e da extração de glicose do cérebro, indicando a redução na atividade cerebral. Estes hormônios também parecem exercer funções cognitivas. De fato, déficits de atenção, memória e execução de tarefas foram observados tanto em pacientes com hipotireoidismo não tratado (Constant *et al.*, 2005) como naqueles que foram adequadamente tratados com T4 (Wekking *et al.*, 2005). Contudo, Baldini e colaboradores (1997) apresentaram evidências de que o tratamento com T4 reduz o déficit de memória em mulheres com hipotireoidismo subclínico.

Os estudos mostram que quase todos os indivíduos com diagnóstico clínico de disfunção tireoidiana apresentam distúrbios psiquiátricos que usualmente regredem com a correção do estado alterado da tireóide, confirmando a participação do eixo hipotálamo-hipófise-tireóide (HHT) na modulação do comportamento (Whybrow, 1995).



De fato, estudos de ressonância magnética e tomografia por emissão positrônica mostraram que o cérebro de adultos com hipotireoidismo e, particularmente, o lobo frontal, respondem aos hormônios da tireóide (Smith e Ain, 1995; Silverman *et al.*, 2001). Estes dados fornecem uma base biológica para os sinais neurológicos e disfunções psiquiátricas associados aos distúrbios da tireóide (Bauer e Whybrow, 2002).

Apesar da associação amplamente difundida das disfunções da tireóide e transtornos psiquiátricos, os mecanismos neuroquímicos responsáveis por estas alterações permanecem obscuros. Por exemplo, Reis-Lunardelli e colaboradores (2007a,b) correlacionaram os efeitos comportamentais do hipertireoidismo à alteração funcional de vias somatossensoriais do córtex parietal envolvidas no processamento espacial. Esta hipótese baseou-se na observação de que a atividade  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPásica no córtex parietal foi aumentada em 30% nos ratos com hipertireoidismo subclínico, mas não foi alterada nos ratos tratados cronicamente com T4 (Reis-Lunardelli *et al.*, 2007a,b). Em contraste, no último grupo a atividade  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPásica do hipocampo foi inibida em 57%. Os autores sugerem que o aumento da atividade  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPásica do córtex parietal melhora o processamento da informação espacial no hipertireoidismo subclínico. Estes dados ressaltam o efeito diferenciado de diversos graus de hipertireoidismo em regiões distintas do cérebro.

Os efeitos do hipertireoidismo também foram relacionados ao funcionamento anormal do sistema purinérgico, uma vez que eles são reduzidos pela administração de N6-ciclopentiladenosina, um agonista do receptor A1 (Bruno *et al.*, 2006). Contudo, como o sistema purinérgico regula outros neurotransmissores, incluindo a dopamina e o glutamato, estes também poderiam

estar envolvidos nas respostas comportamentais do hipertireoidismo. Além disso, os efeitos excitatórios destes hormônios (Aszalós, 2007; Bahls *et al.*, 2007) podem estar associados à sua habilidade de bloquear receptores GABA<sub>A</sub> em cérebros adultos (Martin *et al.*, 1996).

Os hormônios da tireóide também podem exercer efeitos centrais pela alteração da neurotransmissão noradrenérgica que é reconhecidamente implicada nos transtornos de estresse (Bunevicius e Prange, 2010; Bauer e Whybrow, 2002).

Outros estudos relacionam os efeitos da administração de T3 ou T4 ao aumento dos níveis de 5HT no cérebro (Gur *et al.*, 1999; Brochet *et al.*, 1985; Sintzel *et al.*, 2004; Bauer *et al.*, 2005; Atterwill, 1981; Bahls, 2004). A importância do sistema serotoninérgico nos transtornos psiquiátricos cresceu enormemente nos últimos anos devido à eficácia comprovada dos inibidores seletivos da recaptação de serotonina no tratamento da depressão, pânico, transtorno obsessivo-compulsivo e ansiedade. De fato, sabe-se que doses apropriadas de T3 potencializam a ação de drogas antidepressivas cuja ação repousa na inibição, seletiva ou não, da recaptação de 5HT (Sintzel *et al.*, 2004). Em revisão recente, Bauer e colaboradores (2005) relataram que ratos com hipotireoidismo apresentam tanto o aumento da taxa de renovação (*turn over*) de 5HT quanto a redução dos níveis centrais do neurotransmissor e da densidade dos seus receptores no córtex cerebral. Adicionalmente, o tratamento com os hormônios tireoideanos elevou as concentrações de 5HT e aumentou a densidade dos receptores 5HT<sub>2</sub> do estriado, hipocampo e córtex cerebral em ratos tireoidectomizados. Estes dados mostram que os hormônios tireoideanos interferem na neurotransmissão serotoninérgica e na ação dos antidepressivos. Portanto, o efeito destes hormônios nos transtornos

psiquiátricos também dependerá do estado funcional dos sistemas neuroquímicos de cada paciente.

A disfunção da tireóide também resulta em alterações da expressão gênica de inúmeras proteínas e, particularmente, de D2, a principal geradora de T3 intracerebral. Sabe-se que o hipertireoidismo reduz a síntese da D2 (Lechan e Toni, 2002; Guadaño-Ferraz *et al.*, 1999). Burmeister e colaboradores (1997) mostraram que o tratamento com T4, por 2 semanas, de ratos com hipotireoidismo, está associado a alterações pós-transcricionais que afetam a atividade cortical de D2 sem alteração dos níveis de RNAm. Contudo, a administração de T3 na dose de 50 µg/100g por 4 dias promoveu uma diminuição do RNAm desta enzima. No mesmo sentido, a administração de doses baixas do mesmo hormônio (0,25-3 µg/100g/dia) produziu uma diminuição dose-dependente do RNAm da D2 cortical, mas pouca ou nenhuma mudança na atividade de D2. Concluindo, os hormônios da tireóide podem interferir com a regulação da atividade de D2, via mecanismos pré- ou pós-transcricionais, dependendo das concentrações presentes destes hormônios.

Apesar dos relatos da literatura sugerirem que 2/3 dos pacientes com doença tireoideana apresentem distúrbios psiquiátricos, tais como ataques de pânico, ansiedade, depressão, fobias e transtorno compulsivo, esta associação ainda é controversa (Scanlon e Hall, 1995). Não obstante, num estudo prospectivo onde foram avaliados 254 pacientes com hipo e hipertireoidismo clínicos ou subclínicos, compensados ou não, os pacientes com hipotireoidismo não-compensado apresentaram um risco até sete vezes maior de desenvolvimento de alterações de humor que os eutireoideanos (Larisch *et al.*, 2004). Não obstante, ao invés dos sintomas depressivos, Constant e colaboradores (2005) observaram sintomas mais acentuados de ansiedade nos pacientes com hipotireoidismo. Simon

e colaboradores (2002) avaliaram 169 pacientes com distúrbios psiquiátricos, 92 com síndrome do pânico, 29 com ansiedade generalizada e 48 com fobia social. Exceto para o grupo com transtorno de ansiedade generalizada, no qual 10,4% dos indivíduos apresentaram disfunção tireoideana, os resultados não indicaram um aumento da incidência de doenças tireoideanas em relação à população geral. No mesmo sentido, Sait Gönen e colaboradores (2004) aplicaram escalas de avaliação de ansiedade em 85 pacientes com hipo e hipertireoidismo subclínico e concluíram que os pacientes portadores de doenças tireoideanas subclínicas apresentavam mais ansiedade que os controles.

Notavelmente, estudos recentes apresentaram fortes indícios de distúrbios tireoideanos em pacientes com transtorno do estresse pós-traumático (TEPT). Estudos que avaliaram a função tireoideana de ex-combatentes da II Guerra Mundial e Vietnã mostraram que esses indivíduos apresentavam níveis de T3, T3-L, T4-L e TSH maiores que os indivíduos controles normais, sugerindo uma hiperfunção do eixo HHT. Contudo, o hipertireoidismo clínico raramente foi encontrado (Mason *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1999; Karlovic *et al.*, 2002; Vieweg *et al.*, 2006). Recentemente, Friedman e colaboradores (2005) avaliaram o eixo HHT em mulheres com TEPT que sofreram abuso sexual na infância e adolescência, mesmo quando não preenchiam os critérios de TEPT. Eles observaram que as pacientes com TEPT apresentavam T3 elevado, TSH baixo e relação T3/T4-L aumentada, mostrando uma conversão aumentada de T4 em T3. Em adição, mulheres com TEPT e depressão apresentavam níveis de T3 menores e de TSH mais elevados que as mulheres sem depressão. Estes dados sugerem a participação do eixo HHT na consolidação da memória traumática.

### 3. Pânico, ansiedade e estresse

Os fundamentos da nosologia atual dos transtornos de ansiedade podem ser encontrados na classificação original de Sigmund Freud das 'neuroses de ansiedade' (*Angstneuroses*). Freud emvidou esforços consideráveis na separação dos transtornos de ansiedade da depressão maior e de uma ampla gama de condições psiquiátricas denominadas à época de 'neurastenias'. De fato, nos '*Estudos sobre a Histeria*' (1895), Freud já distinguia duas síndromes fundamentais, quais sejam, a 'expectativa ansiosa' ou 'apreensão' (*ängstlich*), que ele considerava a forma predominante do transtorno de ansiedade, e uma síndrome menos freqüente, porém igualmente importante, que ele denominou 'ataque de ansiedade' (*Ängstanfall*). 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 '*a ansiedade 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 combinados à '*alguma parestesia....[ou] um distúrbio de uma ou mais funções somáticas, tais como a respiração, atividade cardíaca, inervação vasomotora e atividade glandular*'. Eventualmente, Freud distinguiu estes ataques das fobias, do transtorno obsessivo-compulsivo ('*neurose obsessiva*') e transtorno do estresse pós-traumático ('*neurose comum*'), dentre outras condições psiquiátricas. As descrições clínicas de Freud da 'expectativa ansiosa' e do 'ataque de ansiedade' são extremamente similares 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, abandonada após o divórcio profundo entre psicanálise e medicina. Como consequência, os transtornos de ansiedade continuaram sendo diagnosticados como neurastenias até meados do século passado. Em particular, o TP recebeu uma variedade estonteante de nomes, incluindo neurose de ansiedade, reação de ansiedade, neurastenia, 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 sofrer uma alteração dramática após a publicação do influente estudo de Donald Klein mostrando que o TAG e o TP respondiam a classes diferentes de medicamentos (Klein, 1964). Assim, enquanto a '*expectativa ansiosa*' era convenientemente tratada por ansiolíticos (barbitúricos, meprobamato e clordiazepóxido) e doses baixas de sedativos (fenotiazinas), os ataques de pânico somente eram atenuados 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' na medida em que eles eram precipitados pela infusão endovenosa de lactato de sódio em pacientes predispostos aos ataques espontâneos de pânico, mas não em voluntários normais. Em realidade, Cohen e White (1951) já haviam mostrado que os ataques de pânico podiam ser precipitados por hiperventilação em 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), mas não no exercício ou na atmosfera ambiente (*apud* Klein, 1993). Estudos posteriores forneceram provas numerosas das propriedades panicogênicas do lactato de sódio e CO<sub>2</sub>, bem como de outros agentes (Graeff *et*

*al.*, 2005). A sensibilidade específica às drogas e a existência de marcadores fisiológicos do TP sugeriram a existência de um circuito cerebral disparando de forma não-adaptativa. Não obstante, o TP somente seria incluído na classificação dos transtornos de ansiedade da Associação Psiquiátrica Norte-americana um século após as observações pioneiras de Freud (APA, 1980).

Atualmente, o TP é considerado como uma síndrome distinta tanto do TAG quanto dos demais transtornos de ansiedade. Contudo, os pacientes de TP queixam-se freqüentemente de ‘ansiedade antecipatória’, isto é, o temor de desamparo na eventualidade de um AP, condição que pode agravar-se em ‘agorafobia’ incapacitante. Conseqüentemente, a presença da ansiedade antecipatória tem sido um complicador adicional dos estudos clínicos sobre os mecanismos neurais dos AP (Graeff *et al.*, 2005).

Por outro lado, as respostas produzidas pela estimulação elétrica ou química da MCPA têm sido propostas como um modelo de AP (Gentil, 1988; Jenck *et al.*, 1995; Deakin e Graeff, 1991; Schenberg *et al.*, 2001). De fato, muitos anos atrás Nashold e colaboradores (1969) conduziram um estudo meticuloso mostrando que a estimulação intracraniana de humanos com eletrodos cronicamente implantados no teto do mesencéfalo produzia ansiedade, pânico, terror e sentimentos de morte iminente acompanhados por sinais neurológicos e respostas viscerais que reproduzem os sintomas cardinais dos AP. A localização dos eletrodos por raios-X mostrou que os sítios eficazes encontravam-se na metade dorsal da MCPA (MCPD), mas não em sua metade ventral ou nas estruturas adjacentes do teto do mesencéfalo (Nashold *et al.*, 1969). Mais recentemente, estudos com tomografia por emissão positrônica mostraram que o pólo do lobo temporal, a ínsula, o cerebelo e o teto do mesencéfalo eram ativados

durante os AP induzidos por lactato (Reiman *et al.*, 1989). Contudo, numa retratação publicada poucos anos mais tarde, colaboradores daquele estudo mostraram que a ativação dos pólos frontais dos lobos temporais foi, em realidade, um artefato devido às alterações do fluxo sanguíneo dos músculos faciais durante a tomografia (Drevets *et al.*, 1992). Desta forma, a MCPD pode participar dos AP induzidos por lactato.

Em ratos, enquanto a estimulação da MCPD com estímulos de baixa magnitude, elétricos ou químicos, produz uma reação de congelamento caracterizada por imobilidade tensa e exoftalmia (protrusão do globo ocular e abertura máxima das pálpebras), estímulos mais intensos dão origem a um comportamento vigoroso de fuga compreendendo galopes e saltos de 1 m/s e 50 cm de altura, respectivamente (Bittencourt *et al.*, 2004; Schenberg *et al.*, 2005). Estes comportamentos são acompanhados por padrões distintos de respostas cardiovasculares e respiratórias e, menos freqüentemente, micção e defecação, que ocorrem em cerca de 50% dos ratos, apenas (Schenberg *et al.*, 1993; Bittencourt *et al.*, 2004). Mais importante, a resposta de galope induzida pela estimulação da MCPD do rato foi seletivamente atenuada pelos panicolíticos clinicamente eficazes, fluoxetina e clomipramina, administrados em doses e regimes similares aos empregados na terapia do TP (Schenberg *et al.*, 2001, 2002; Vargas *et al.* 2001). Ao contrário, o galope foi facilitado pelos panicógenos pentilenotetrazol, ioimbina e colecistocinina (Schenberg *et al.*, 2001; Jenck *et al.*, 1995; Bertoglio *et al.*, 2007). Contrariamente, os comportamentos de defesa induzidos por estimulação elétrica da MCPD não foram afetados por tratamentos ineficazes no TP, incluindo a administração aguda de antidepressivos e benzodiazepínicos (Schenberg *et al.*, 2001; Vargas e Schenberg, 2001) e



tratamentos agudo e crônico (10 dias) de buspirona (Schenberg e Vargas, resultados não publicados).

Conseqüentemente, embora as respostas defensivas induzidas por estimulação da MCPD do rato tenham sido indistintamente propostas como um modelo experimental de AP (Gentil, 1988; Jenck *et al.*, 1995; Deakin e Graeff, 1991), as evidências farmacológicas sugerem que o galope seja a resposta mais representativa dos AP (Schenberg *et al.*, 2001).

Notavelmente, o TP também difere dos transtornos de estresse. A marca fundamental da teoria do estresse de Hans Selye (1936, 1950) é o conceito de inespecificidade da 'reação de alarme', isto é, a ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) que se segue à exposição aguda do organismo a uma variedade enorme de estressores, tanto físicos quanto psicológicos. Estudos posteriores mostraram que outros eixos hipotalâmico-hipofisários também respondem ao estresse. Particularmente, demonstrou-se que a prolactina (PRL) é consistentemente liberada em resposta a um grande número de estressores (Neill, 1970; Siegel *et al.*, 1980; Dijkstra *et al.*, 1992). Conseqüentemente, a demonstração da ausência de ativação do eixo HPA após o estresse psicológico inquestionável de um AP aparece como um dos fatos mais intrigantes da psiquiatria contemporânea (Liebowitz *et al.*, 1984, Levin *et al.*, 1987; Hollander *et al.* 1989a,b; Woods *et al.*, 1987a,b). Mais importante, esta característica fornece uma pista preciosa para a compreensão do substrato neural dos ataques de pânico. De fato, numa revisão sobre este tópico Graeff e colaboradores (2005) concluíram que nem os ataques de pânico da vida real, nem aqueles precipitados por panicógenos naturais (lactato e CO<sub>2</sub>) ativam o eixo HPA. Contrariamente, panicógenos não-seletivos que produzem ansiedade antecipatória (ou que estimulam o hipotálamo e a hipófise diretamente)

ativam o eixo HPA. Neste sentido, estudos recentes de nosso laboratório mostraram que os 'hormônios do estresse' ACTH, corticosterona e PRL não são alterados pelas respostas intensas de ativação emocional e exercício físico da reação de defesa induzida por estimulação da MCPD (Schenberg et al., 2008). Estes resultados são indícios convincentes do envolvimento da MCPD na produção dos AP.

Adicionalmente, a estimulação elétrica e química da matéria cinzenta periaqueductal ventrolateral (MCPAvl) inibe a atividade neuronal na MCPD (Lovick, 1991) e produz um comportamento de imobilidade hiporreativa (Depaulis *et al.*, 1994; Morgan e Carrive, 2001). A MCPAvl também abriga a principal população de neurônios extra-hipotalâmicos que sintetizam o hormônio TRH (Liao *et al.*, 1988). Notavelmente, enquanto o TRH também é sintetizado nos núcleos caudais da rafe e na região parapiroamidal do bulbo (Yang *et al.*, 1999; Nillni e Sevarino, 1999), o processamento completo do peptídeo precursor do TRH (prepro-TRH) aos peptídeos TRH-similares e ao próprio TRH só foi demonstrado nos núcleos paraventricular e preóptico do hipotálamo e na MCPAvl (Nillni e Sevarino, 1999). Particularmente, os neurônios TRHérgicos da MCPAvl projetam-se para o núcleo parafascicular do tálamo, MCPD, camadas profundas do colículo superior e para uma região próxima ao núcleos de Barrington e locus coeruleus (Mihaly *et al.*, 2001). Estas projeções são notáveis uma vez que estas áreas foram implicadas em um ou vários componentes dos comportamentos defensivos. De forma mais notável, a MCPD e as camadas profundas do colículo têm um papel crucial na organização dos comportamentos defensivos, conforme demonstrado por estudos de lesão (Blanchard *et al.*, 1981), estimulação (Bandler *et al.*, 1985; Dean *et al.*, 1989; Depaulis *et al.*, 1992; Bittencourt *et al.*, 2004, 2005; Schenberg *et al.*, 2005) e

imunoistoquímica para proteína c-fos (Canteras *et al.*, 1999; Dielenberg *et al.*, 2001). Por outro lado, enquanto o núcleo parafascicular do tálamo parece estar envolvido no processamento emocional da dor (Harte *et al.*, 2005), o núcleo de Barrington é, reconhecidamente, o principal controlador da micção e defecação, respostas que são tradicionalmente associadas ao medo e ansiedade (Blok e Holstege, 1988; Valentino *et al.*, 2000). Estes achados estão de acordo com evidências eletrofisiológicas, imunoistoquímicas e de tracejamento de vias neuronais que mostraram que a MCPD envia projeções ao núcleo de Barrington, locus coeruleus e regiões próximas a estas áreas (Levine *et al.*, 1990; Ennis *et al.*, 1991; Luppi *et al.*, 1995; Sandkuhler e Herdegen, 1995; Valentino *et al.*, 2000).

Embora Donald Klein (1964), no artigo pioneiro que lançou as bases da terapêutica da síndrome do pânico, já houvesse relatado o caso de um paciente que passou a apresentar ataque de pânico durante terapia com T4, a literatura sobre transtorno do pânico e distúrbios da tireóide é bastante reduzida.

Não obstante, estudos recentes de nosso laboratório mostraram que administrações agudas de TRH que reproduzem a elevação dos níveis deste hormônio no hipotireoidismo, atenuam os comportamentos de defesa induzidos por estimulação elétrica da MCPD (Siqueira *et al.*, 2010a). Em particular, o TRH causou aumentos expressivos dos limiares das respostas de imobilidade, trote, galope, salto e exoftalmia. Estes limiares retornaram aos valores basais 24 horas após a administração do hormônio. Em outro estudo, Siqueira e colaboradores (2010b) avaliaram os efeitos do hipotireoidismo induzido por metimazol sobre os mesmos comportamentos de defesa, bem como sobre a exploração do labirinto-em-cruz elevado (LCE), um modelo de ansiedade generalizada. Os dados mostraram que os limiares de defesa da MCPD são significativamente aumentados após 10 dias de

tratamento com metimazol. Aumentos expressivos foram observados para exoftalmia, imobilidade, trote, galope, salto, defecação e micção. O efeito no LCE foi, no entanto, variável, aumentando a exploração no braço aberto (ansiólise) no 5º dia de tratamento e sem alterações no 10º dia de tratamento. Os resultados de ambos experimentos sugerem a modulação inibitória da MCPD pelo sistema TRHérgico.

No conjunto, os últimos estudos sugerem que os neurônios TRHérgicos da MCPAvI poderiam ser modulados pelos níveis plasmáticos dos hormônios da tiróide, modulando os comportamentos de defesa eliciados pela estimulação da MCPD e, conseqüentemente, os AP.

## **OBJETIVOS**

Em vista dos dados freqüentemente contraditórios da literatura clínica sobre os efeitos do hipertireoidismo nos transtornos do humor e da ansiedade, os estudos que seguem avaliaram os efeitos do hipertireoidismo experimental sobre o comportamento de ratos em modelos experimentais de ansiedade, pânico e depressão (Estudo I) e sobre os limiares dos comportamentos de defesa produzidos por estimulação da MCPD (Estudo II), um modelo experimental de AP.

## **ESTUDO I**

# **EFEITOS DA TIROXINA EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE ANSIEDADE, PÂNICO E DEPRESSÃO EM RATOS**

### **Colaboradores:**

Vanessa Mendonça de Alvarenga

Prof. Dr. Sérgio Tufik

Dra. Magda Bignotto

**Apoio financeiro:** CNPq

## RESUMO

O “nervosismo” é o sintoma predominante do hipertireoidismo, sendo relatado por 99% dos pacientes. As doenças da tireóide também têm sido associadas a estados ansiosos, ataques de pânico, depressão, fobias e transtorno obsessivo-compulsivo. Os dados clínicos são, no entanto, bastante contraditórios. Portanto, o presente estudo avaliou os efeitos do hipertireoidismo experimental em ratos nos testes da arena (AR), interação social (IS), natação forçada (NF), labirinto-em-cruz elevado (LCE) e labirinto-em-T elevado (LTE). Ratos Wistar machos adultos foram tratados por 10 dias (i.p.) com salina (n=20, grupo controle) ou com L-tiroxina (T4) nas doses de 30 µg/dia (n=18, grupo T30) e 60 µg/dia (n=20, grupo T60). Os níveis plasmáticos de T3 e T4 e os efeitos comportamentais de T4 foram avaliados por ANOVA seguida de testes-t para amostras independentes. As diferenças em relação ao grupo controle foram consideradas significantes para  $P < 0,05$ . Os grupos T30 e T60 não diferiram quanto ao peso final ou níveis plasmáticos de T3 e T4, que foram aumentados em cerca de 60% e 50%, respectivamente. Não obstante, eles diferiram quanto aos testes comportamentais, indicando efeitos cerebrais diferenciados destes tratamentos. No teste da AR, a T4 aumentou as respostas de levantar, explorar, olfação e locomoção periférica, confirmando os relatos clínicos de hiperatividade. Contrariamente, a T4 aumentou o tempo de imobilidade na NF, sugerindo um efeito específico pró-depressivo. Nos outros testes somente foram observados efeitos para a menor dose de T4. Assim, embora os ratos tratados com a menor dose de T4 não tenham diferido quanto ao número de entradas no braço fechado, ou quanto à porcentagem do tempo de exploração no braço aberto do LCE, houve um aumento significativo da porcentagem de entrada no braço aberto, sugerindo um efeito

ansiolítico. Não obstante, os índices de ansiedade não foram alterados nos testes de IS, AR e LTE. Portanto, nossos dados sugerem que o sintoma de ‘nervosismo’ relatado por pacientes com hipertireoidismo sejam distintos da ansiedade dos modelos animais empregados neste estudo. Por outro lado, a latência de fuga no LTE foi reduzida pela menor dose de T4, sugerindo um efeito panicogênico. Nossos resultados sugerem que o hipertireoidismo leve facilite o transtorno de pânico e a depressão.

**Palavras-chaves:** Tireóide, Hipertireoidismo, Ansiedade, Pânico, Depressão, Labirinto-Em-Cruz Elevado, Labirinto-Em-T Elevado, Interação Social, Open Field, Natação Forçada.



## INTRODUÇÃO

Observações clínicas e experimentais sugerem a influência do eixo hipotálamo-hipófise-tireóide (HHT) nos transtornos psiquiátricos. De fato, estudos demonstraram que a maior parte dos indivíduos com diagnóstico clínico de disfunção tireoideana apresenta distúrbios mentais que usualmente regredem com a correção do estado alterado da tireóide (Whybrow, 1995).

Um dos achados mais importantes que corrobora a ação dos hormônios tireoideanos no cérebro e, portanto, afeta seu funcionamento, é a presença de receptores nucleares no cérebro de ratos adultos (Oppenheimer *et al*, 1974). Especificamente, os receptores nucleares para T3 (triiodotironina), hormônio tireoideano com maior atividade biológica, são amplamente distribuídos no cérebro de ratos adultos, apresentando as maiores densidades em regiões cerebrais filogeneticamente recentes, tais como amígdala e hipocampo, e densidade reduzidas no tronco encefálico e cerebelo (apud Lechan e Toni, 2002).

O hipotireoidismo em adultos acarreta distúrbios cognitivos, mudanças de humor, irritabilidade, psicose, desatenção e comprometimento da memória. Contudo, a depressão é o sintoma mais comum e que pode vir acompanhada de ansiedade e insônia. Por outro lado, o hipertireoidismo acarreta prejuízo da percepção, paranóia, alucinações visuais, alterações de humor, ansiedade, distúrbios cognitivos, disforia, agitação e dificuldade de concentração, irritação, insônia, fraqueza e desânimo. Estes estudos também mostraram que a prevalência de ansiedade e depressão em pacientes com hipertireoidismo chega a atingir 60% e 69%, respectivamente (Kathol e Delahunt, 1986; Trzepacz *et al.*, 1988; Whybrow e Bauer, 2000b).

Como função primordial, os hormônios tireoideanos regulam a transcrição de um grande número de genes, tendo, inclusive, participação na regulação da neurotransmissão serotoninérgica cortical e na regulação central noradrenérgica e GABAérgica (Atterwill, 1981; Bahls, 2004). Tais evidências sugerem que as alterações do comportamento devidas à disfunção da tireóide devem-se a anormalidades catecolaminérgicas e serotoninérgicas. De fato, a síntese de serotonina (5HT) está diminuída no hipotireoidismo e elevada no hipertireoidismo em ratos (Atterwill, 1981; Bahls, 2004).

Notavelmente, embora os relatos da literatura sugiram que 2/3 dos pacientes com doença tireoideana apresentam distúrbios psiquiátricos, incluindo ataques de pânico, ansiedade, depressão, fobias e transtorno compulsivo, a comorbidade destas condições ainda é controversa (Scanlon e Hall, 1995). Não obstante, num estudo prospectivo onde foram avaliados 254 pacientes com hipo e hipertireoidismo, clínicos ou subclínicos, compensados ou não, os pacientes com hipotireoidismo não-compensado apresentaram um risco até sete vezes maior de desenvolvimento de alterações de humor que os eutireoideanos (Larisch *et al.*, 2004). Simon e colaboradores (2002) avaliaram 169 pacientes com distúrbios psiquiátricos, 92 com síndrome do pânico, 29 com ansiedade generalizada e 48 com fobia social. Exceto para o grupo com transtorno de ansiedade generalizada, no qual 10,4% dos indivíduos apresentaram disfunção tireoideana, os resultados não indicaram um aumento da incidência de doenças tireoideanas em relação à população geral. No mesmo sentido, Sait Gönen e colaboradores (2004) aplicaram escalas de avaliação de ansiedade em 85 pacientes com hipo e hipertireoidismo subclínico e concluíram que os pacientes portadores de doenças tireoideanas subclínicas apresentavam mais ansiedade que os controles.

Assim, a influência dos hormônios tireoideanos nos transtornos comportamentais ainda é controversa (apud Bauer e Whybrow, 2002). Tendo em vista a importância e os dados clínicos contraditórios sobre a comorbidade das doenças da tireóide e transtornos psiquiátricos, o presente estudo investigou os efeitos do hipertireoidismo experimental sobre o comportamento de ratos em modelos de ansiedade, pânico e depressão.

## **METODOLOGIA**

*Animais.* Foram utilizados ratos Wistar albinos, machos (n=58), pesando cerca de 250 g, fornecidos pelo biotério da Universidade Federal do Espírito Santo. Os procedimentos do presente estudo seguiram as normas de conduta ética de pesquisa em animais da Sociedade Brasileira de Neurociência e Comportamento.

*Tratamentos.* Os animais foram tratados com salina (grupo SAL, n=20) ou L-tiroxina (T4) nas doses de 30 µg/rato/dia (grupo T30, n=18) ou 60 µg/rato/dia (grupo T60, n=20). As drogas foram administradas por via intraperitoneal, entre 13-16h, ao longo de 10 dias.

*Protocolo experimental.* Os testes para verificação dos efeitos comportamentais da T4 foram conduzidos a partir do 10º dia de tratamento. Inicialmente, a metade dos animais de cada grupo foi submetida ao labirinto-em-cruz elevado (LCE), e a outra metade ao labirinto-em-T elevado (LTE). Imediatamente após, os animais foram submetidos ao teste de arena (AR). No 11º dia todos os animais foram submetidos ao teste de interação social (IS) e, imediatamente após, ao pré-teste da natação

forçada (PNF). O teste da natação forçada (NF) foi conduzido no 12º dia. As respectivas doses de cada tratamento continuavam a ser aplicadas, diariamente, ao fim dos testes. Os ratos eram sacrificados após a NF e o sangue era coletado para dosagem dos níveis plasmáticos de T3 e T4. Todos os testes foram realizados numa sala com atenuação sonora e luminosidade controlada (44 lux) (Tabela 1).

*Teste do Labirinto-em-cruz elevado.* O LCE baseia-se na aversão natural dos roedores aos espaços abertos. O LCE era feito de madeira com revestimento de fórmica e situava-se a 70 cm do assoalho. O equipamento tinha 4 braços perpendiculares de 50 cm de comprimento e 10 cm de largura, dos quais 2 braços opostos tinham paredes de 40 cm de altura (braços fechados) e os outros 2 uma borda de apenas 1 cm de altura (braços abertos). Os braços comunicavam-se por uma plataforma central (10 x10 cm). Os ratos eram colocados na plataforma central voltados para o braço fechado e eram observados durante 5 minutos, registrando-se o tempo de exploração no braço aberto (TBA), tempo no braço fechado (TBF) e tempo na plataforma central (TPC) e o número de entradas nos braços abertos (EBA) e braços fechados (EBF). A percentagem de entradas no braço aberto (%EBA) e percentagem de tempo no braço aberto (%TBA) foram calculados como  $EBA/(EBA+EBF)$  e  $TBA/(TBA+TBF)$ , respectivamente.

*Teste do Labirinto-em-T elevado.* O LTE é um equipamento obtido pelo fechamento de um dos braços fechados do LCE. Os ratos são avaliados quanto ao aprendizado da esQUIVA inibitória ou no desempenho numa resposta inata de fuga. No treino da esQUIVA inibitória, o rato é colocado na extremidade do braço fechado por três vezes

Tabela 1. Protocolo experimental. IS- interação social, LCE – labirinto-em-cruz elevado, LTE – labirinto-em-T elevado, AR – arena, PNF – pré-teste de natação forçada, NF – teste de natação forçada.

Grupos	Dias 1-9	Dia 10	Dia 11	Dia 12			
SAL	Salina	1/2 LCE 1/2 LTE	AR	IS	PNF	NF	coleta de sangue
T30	30 µg/dia de T4	1/2 LCE 1/2 LTE	AR	IS	PNF	NF	coleta de sangue
T60	60 µg/dia de T4	1/2 LCE 1/2 LTE	AR	IS	PNF	NF	coleta de sangue

sucessivas (esquivas 1-3), em intervalos de 30 segundos, registrando-se o tempo de permanência no braço fechado para cada tentativa. A aprendizagem da esquiva inibitória é expressa pelo aumento da duração da esquiva ao longo das tentativas. Após o treino de esquiva, o animal é colocado na extremidade do braço aberto por três vezes sucessivas (fugas 1-3), em intervalo de 30 segundos, registrando-se a latência da fuga para cada tentativa. O tempo de 300 segundos é estabelecido como limite tanto para a duração da esquiva como para a latência de fuga.

*Teste da Arena.* Neste teste o rato era colocado numa arena quadrada (1m<sup>2</sup>), com o assoalho dividido em 49 espaços de 14 cm x 14 cm, dos quais 9 compunham uma área central e 40 compunham uma área periférica. O rato era filmado por 5 minutos. Os comportamentos de levantar, autolimpeza, olfação, imobilidade, exploração (investigar o ambiente), cruzamentos (atravessar de um lado a outro da arena passando pela área central), locomoção (número de espaços invadidos) periférica (peritaxia) e central (centrotaxia) foram quantificados *off-line* pela análise dos filmes.

*Teste da Natação Forçada.* O teste da natação forçada (NF) foi conduzido num cilindro de 25 cm de diâmetro por 65 cm de altura, com coluna de água de 50 cm.

Na sessão pré-teste (PNF) os ratos eram colocados no cilindro por 15 min. No dia seguinte (NF), os ratos eram colocados no cilindro durante 5 minutos, registrando-se o tempo de natação. O comportamento de natação foi definido como movimentos de superfície, mergulhos ou tentativas de escalar as paredes do cilindro. Na imobilidade o animal permanecia praticamente imóvel, apresentando apenas pequenos movimentos para manter a cabeça fora da água.

*Teste da Interação social (IS).* O teste da IS era realizado com dois ratos, dos quais somente o rato tratado era analisado. Os ratos eram colocados numa arena cilíndrica de acrílico transparente com 60 cm de diâmetro e altura e filmados por 10 min. O assoalho da arena tinha um círculo central de 30 cm de diâmetro e um anel periférico com 15 cm de largura. Os comportamentos foram quantificados *off-line* através da análise dos filmes, de acordo com sua frequência ou duração. Só foram registrados os seguintes comportamentos:

*Centrotaxia* - tempo de permanência na área central da arena.

*Peritaxia* - tempo de permanência no anel periférico.

*Exploração* – frequência dos comportamentos de farejar e de movimentos de locomoção.

*Levantar* - postura ereta com extensão das patas posteriores.

*Investigar* - interagir e cheirar o outro rato.

*Seguir* - o rato tratado segue o outro rato.

*Autolimpeza* - Postura ereta sobre as patas posteriores flexionadas, acompanhada da manipulação repetitiva e seqüencial dos pêlos da cabeça, tronco e genitálias, usando as patas dianteiras ou a boca.

*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.

*Coleta de sangue.* Ao final dos experimentos os animais eram sacrificados com sobredose de anestésico (hidrato de cloral) e eram coletadas amostras de sangue para análise dos níveis plasmáticos de tireotrofina (TSH) e dos hormônios tireoideanos T3 e T4. As amostras eram centrifugadas a 4°C e o plasma era mantido a -20°C até ser enviado para dosagem dos hormônios no Departamento de Psicobiologia da EPM-UNIFESP. Contudo, até o momento só foi possível realizar os ensaios para T3 e T4.

*Análise estatística.* Os níveis plasmáticos de T3 e T4 e os efeitos comportamentais de T4 nos testes de LCE, AR, IS e NF foram avaliados por ANOVA seguida de testes-t para grupos independentes. E os efeitos do LTE foram avaliados por ANOVA para medidas repetidas seguida de testes-t. As diferenças em relação aos controles foram consideradas significantes para  $P < 0,05$ .

## **RESULTADOS**

*Efeitos da T4 sobre o desempenho dos ratos no labirinto-em-cruz elevado.* Somente foi observada diferença estatística significativa para %EBA ( $F_{2,25}=5,5$ ;  $P < 0,01$ ), não havendo diferenças para EBA ( $F_{2,25}=2,41$ ;  $P < 0,11$ ), EBF ( $F_{2,25}=0,47$ ;  $P < 0,63$ ) ou %TBA ( $F_{2,25}=1,60$ ;  $P < 0,22$ ) (Fig.1). As comparações pareadas mostraram que a

%EBA do grupo T30 foi maior que aquela dos grupos SAL ( $P<0,003$ ) e T60 ( $P<0,05$ ). O grupo T60 não diferiu do grupo SAL em nenhum dos itens avaliados.

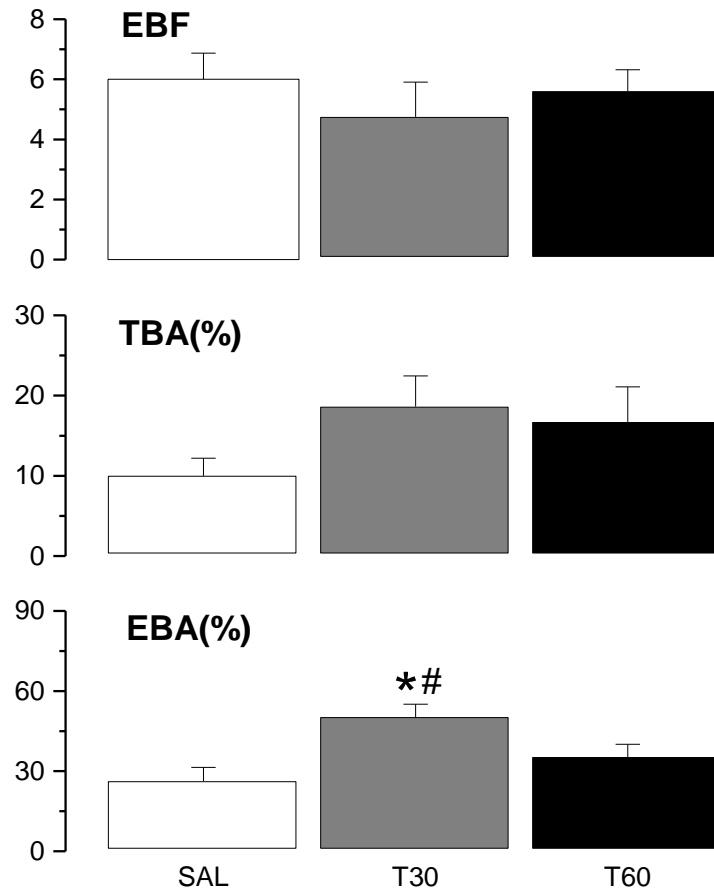


Fig. 1. Efeitos da L-tiroxina sobre o desempenho de ratos no labirinto-em-cruz elevado. EBF – número de entradas no braço fechado, %TBA – porcentagem do tempo nos braços abertos, %EBA – porcentagem de entradas nos braços abertos, T30 – grupo tratado com 30  $\mu\text{g}$  de T4, T60 – grupo tratado com 60  $\mu\text{g}$  de T4, SAL – grupo salina, \* e #  $P<0,05$ , diferenças significantes em relação aos grupos SAL e T60, respectivamente.

*Efeitos do T4 sobre o desempenho dos ratos no labirinto-em-T elevado.* A duração da esquia inibitória apresentou aumentos significantes ao longo das 3 exposições ao LTE ( $F_{2,50}=27,6$ ;  $P<0,0001$ ). Contudo, não foram observadas interações significantes entre tratamentos e exposições ao LTE. De forma similar, as latências de fuga sofreram aumentos significantes ao longo das 3 exposições ( $F_{2,50}=16,4$ ;



$P < 0,0001$ ). Também foram detectadas diferenças marginais entre os tratamentos ( $F_{4,50} = 2,18$ ,  $P < 0,08$ ). Em particular, as latências de fuga da terceira exposição foram estatisticamente diferentes ( $F_{2,25} = 3,68$ ;  $P < 0,04$ ). As comparações pareadas mostraram que o grupo T30 apresentou latências inferiores na terceira exposição comparadas àquelas dos grupos SAL ( $P < 0,04$ ) e grupo T60 ( $P < 0,01$ ) (Fig. 2).

As médias das 3 latências de fuga também foi estatisticamente diferente para os tratamentos ( $F_{2,25} = 3,79$ ;  $P < 0,04$ ) (Fig. 3). As comparações pareadas mostraram que a latência média do grupo T30 foi significativamente inferior às médias dos grupos salina ( $P < 0,01$ ) e T60 ( $P < 0,05$ ).

*Efeitos do T4 sobre o desempenho dos ratos no teste da arena.* Os tratamentos tiveram efeitos significantes sobre as respostas de levantar ( $F_{2,55} = 4,55$ ;  $P < 0,02$ ), explorar ( $F_{2,55} = 5,35$ ;  $P < 0,008$ ), olfação ( $F_{2,55} = 8,11$ ;  $P < 0,0008$ ) e peritaxia ( $F_{2,55} = 4,38$ ;  $P < 0,02$ ), mas apenas um efeito marginal sobre a imobilidade ( $F_{2,55} = 2,93$ ;  $P < 0,06$ ) (Fig.4-5). As comparações pareadas mostraram que o grupo T30 diferiu do grupo SAL quanto aos comportamentos de levantar ( $P < 0,02$ ), explorar ( $P < 0,003$ ), olfação ( $P < 0,0002$ ) e peritaxia ( $P < 0,01$ ), que foram aumentados. De maneira semelhante, o grupo T60 apresentou aumentos da frequência das respostas de levantar ( $P < 0,01$ ), explorar ( $P < 0,02$ ), olfação ( $P < 0,02$ ) e peritaxia ( $P < 0,01$ ). Contrariamente, a imobilidade ( $P < 0,02$ ) foi diminuída (Figs. 4-5).

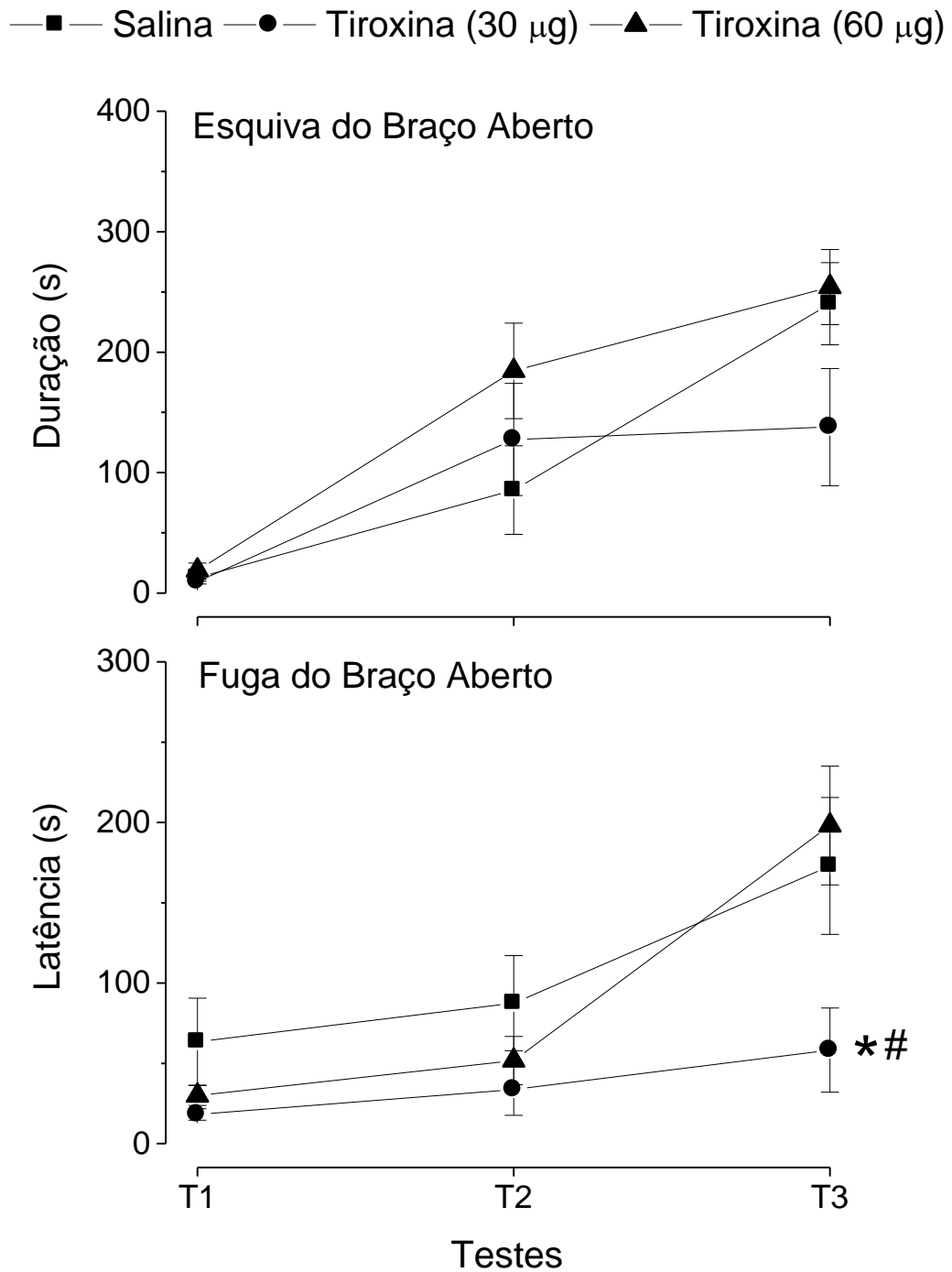


Fig. 2. Efeitos da L-tiroxina sobre o desempenho de ratos no labirinto-em-T elevado. T30 – grupo tratado com 30 $\mu$ g/dia de T4, T60 – grupo tratado com 60 $\mu$ g/dia de T4, SAL – grupo salina (NaCl 0,9%, i.p.), \* e # P<0,05, diferenças significantes em relação aos grupos SAL e T60, respectivamente.

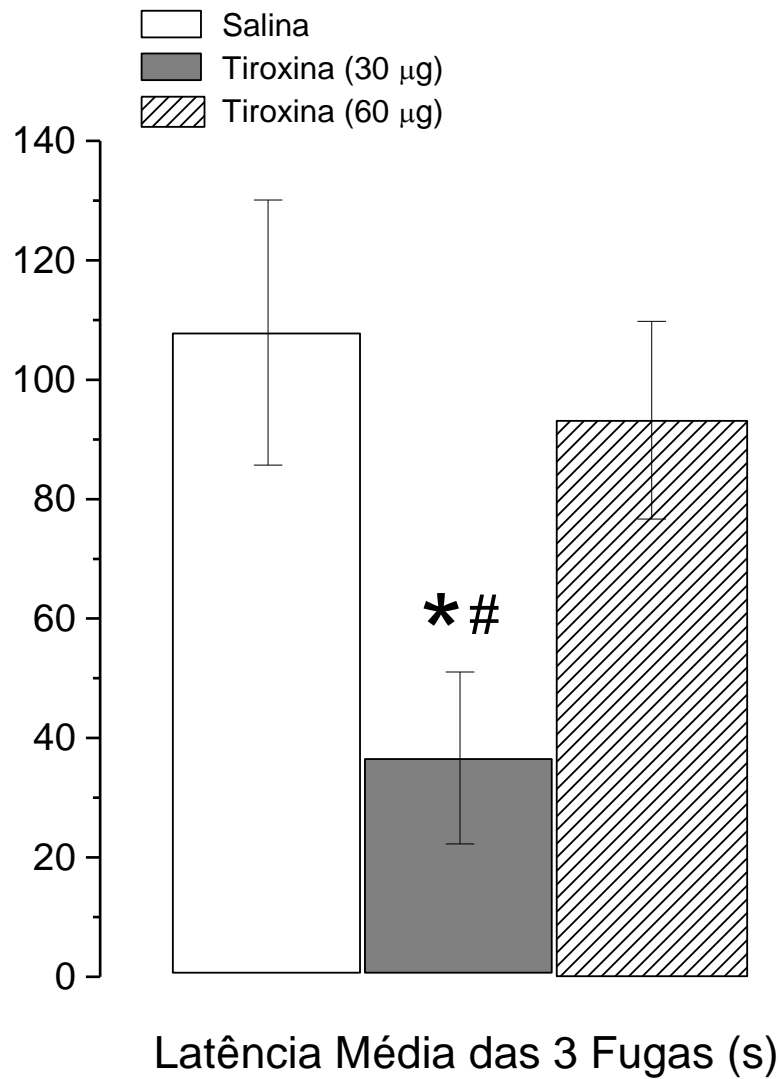


Fig. 3. Efeitos da L-tiroxina sobre a latência média das 3 fugas no labirinto-em-T elevado. T30 – grupo tratado com 30 µg/dia de T4, T60 – grupo tratado com 60 µg/dia de T4, SAL – grupo salina (NaCl 0,9%, i.p.), \* e #  $P < 0,05$ , diferenças significantes em relação aos grupos SAL e T60, respectivamente.

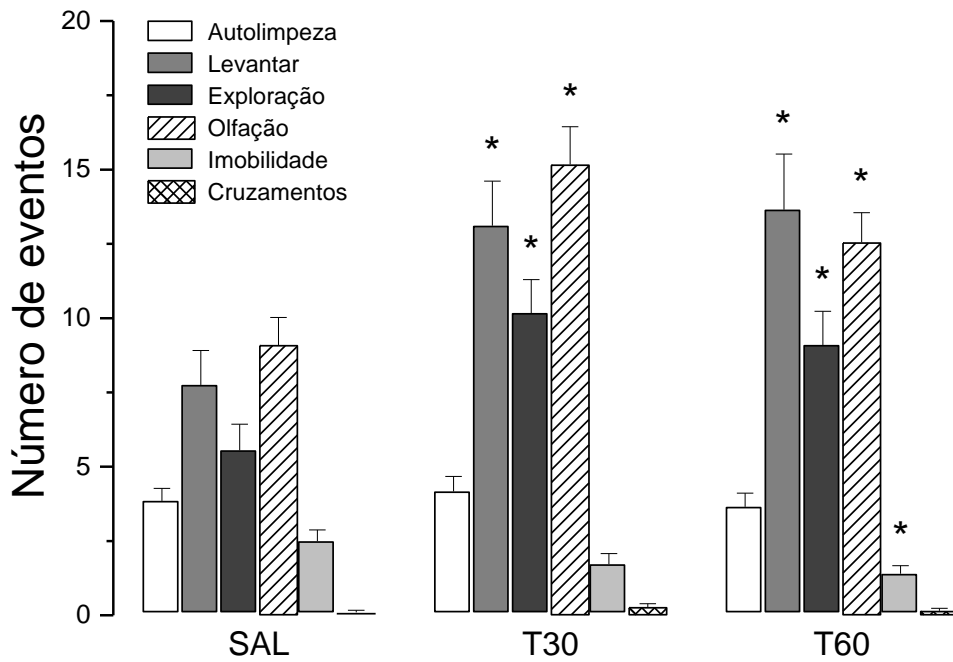


Fig. 4. Efeitos da L-tiroxina sobre o desempenho de ratos na arena. T30 – grupo tratado com 30µg/dia de T4, T60 – grupo tratado com 60µg/dia de T4, SAL – grupo salina (NaCl 0,9%, i.p.), \*  $P < 0,05$ , diferenças significantes em relação aos grupos SAL (ANOVA para grupos independentes seguida de testes t para grupos independentes).

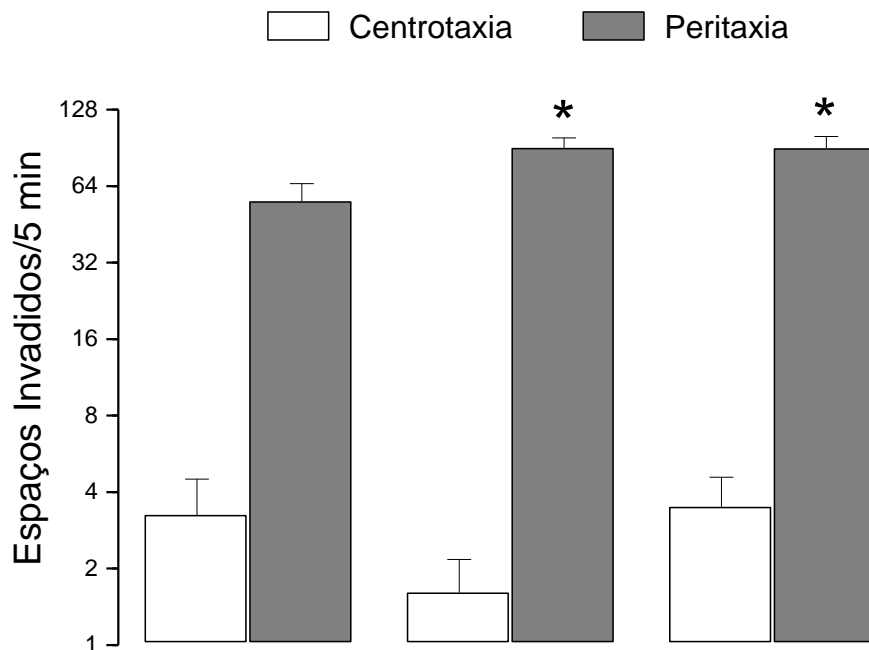


Fig. 5. Efeitos da L-tiroxina sobre a atividade locomotora de ratos na arena. T30 – grupo tratado com 30 µg/dia de T4, T60 – grupo tratado com 60 µg/dia de T4, SAL – grupo salina (NaCl 0,9%, i.p.), \*  $P < 0,05$ , diferenças significantes em relação aos grupos SAL ANOVA para grupos independentes). Ordenada em escala logarítmica.

*Efeitos da T4 sobre o desempenho dos ratos na natação forçada.* Os grupos diferiram estatisticamente ( $F_{2, 54} = 3,28$ ;  $P < 0,05$ ). Comparado ao grupo SAL, houve um aumento significativo do tempo de flutuação do grupo T30 ( $P < 0,04$ ) e do grupo T60 ( $P < 0,03$ ) (Fig. 6).

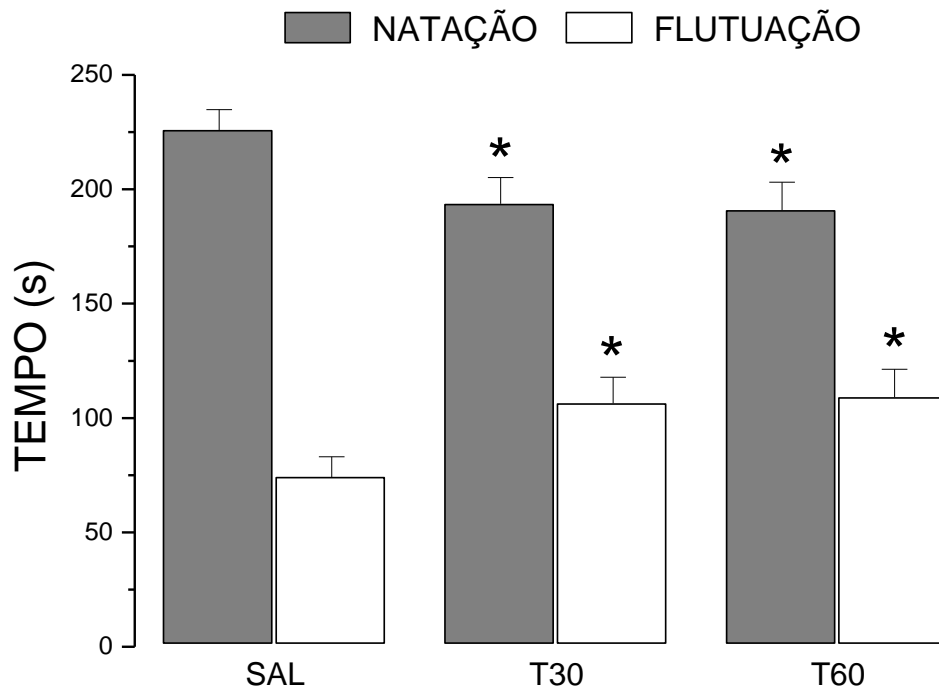


Fig. 6. Efeitos da L-tiroxina sobre o desempenho de ratos na natação forçada. T30 – grupo tratado com 30  $\mu\text{g}/\text{dia}$  de T4, T60 – grupo tratado com 60  $\mu\text{g}/\text{dia}$  de T4, SAL – grupo salina (NaCl 0,9%, i.p.), \*  $P < 0,05$ , diferenças significantes em relação aos grupos SAL (análise de variância para grupos independentes).

*Efeitos da T4 sobre o desempenho dos ratos no teste de interação social.* Dentre as respostas do teste de interação social, apenas o comportamento de ‘seguir’ apresentou significância marginal ( $F_{2,54}=2,61$ ;  $P < 0,08$ ). A comparação pareada também sugere um comportamento de seguir aumentado do grupo T60 ( $P < 0,03$ ) (Fig. 7).

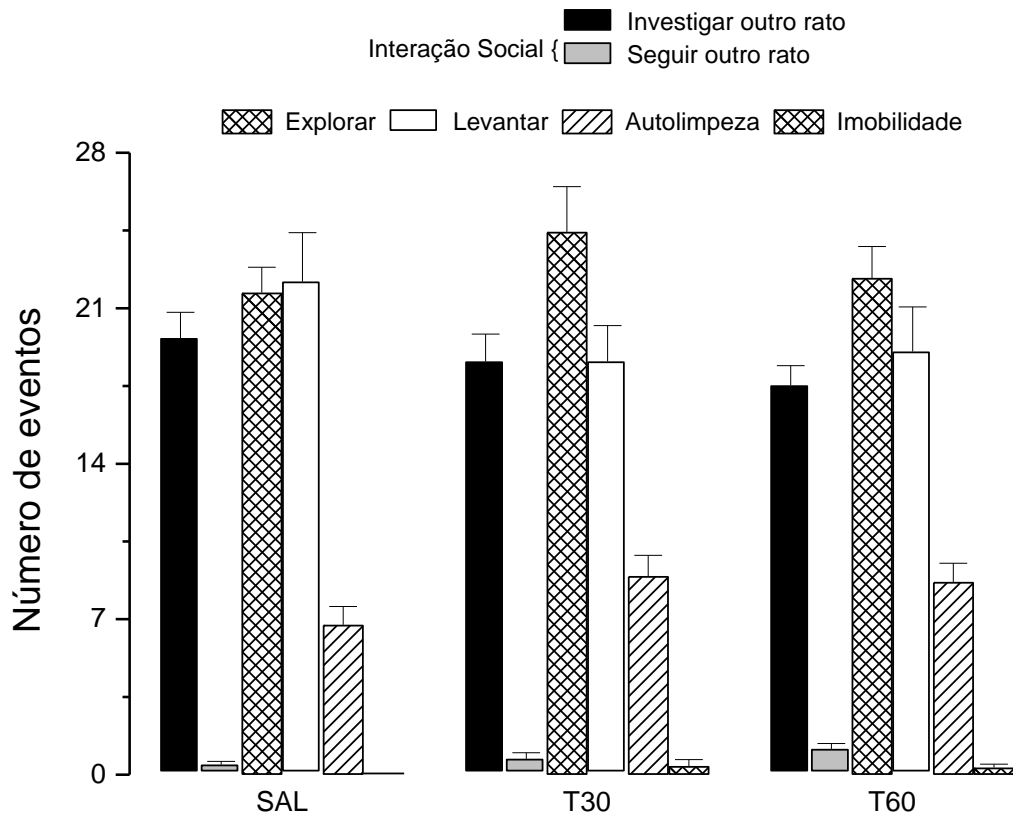


Fig. 7. Efeitos da L-tiroxina sobre o desempenho de ratos na interação social. T30 – grupo tratado com 30 $\mu$ g/dia de T4, T60 – grupo tratado com 60 $\mu$ g/dia de T4, SAL – grupo salina (NaCl 0,9%, i.p.)

*Efeitos do tratamento exógeno de T4 sobre os níveis plasmáticos de T3 e T4.* Os grupos diferiram quanto aos níveis plasmáticos de T3 ( $F_{2,54} = 11,34$ ;  $P > 0,0001$ ) e T4 ( $F_{2,54} = 7,66$ ;  $P > 0,001$ ). Comparado ao grupo SAL, o grupo T30 apresentou níveis plasmáticos significativamente maiores de T3 ( $P < 0,0002$ ) e T4 ( $P < 0,002$ ). Da mesma forma, o grupo T60 apresentou aumentos significantes dos níveis plasmáticos de T3 ( $P < 0,0001$ ) e T4 ( $P < 0,001$ ) (Tabela 2).

Tabela 2. Níveis plasmáticos de T3 e T4 dos grupos tratados com salina (SAL) ou T4 nas doses diárias de 30 µg (T30) ou 60 µg (T60) por rato, ao longo de 10 dias.

Tratamento	T3 (ng/dl)	T4 (µg/dl)
SAL	55,12 ± 1,88	8,27 ± 0,37
T30	90,69* ± 6,13	12,36* ± 0,93
T60	90,38* ± 8,45	12,46* ± 1,14

Dados expressos por média ± EPM. \* P<0,05 diferença significativa em relação ao grupo SAL.

*Efeitos do tratamento com T4 sobre o peso dos animais.* Houve ganho significativo do peso ao longo do experimento ( $F_{2,63} = 188,5$ ;  $P < 0,0001$ ). Porém, não houve efeitos do tratamento sobre o ganho de peso (Tabela 3).

Tabela 3 – Peso dos animais (g) de cada grupo de estudo ao longo do tratamento crônico com L-tiroxina. T30 – grupo tratado com 30µg/dia de T4, T60 – grupo tratado com 60µg/dia de T4, SAL – grupo salina (NaCl 0,9%)

Tratamento	Dia 1	Dia 10
SAL	268,5 ± 2,71	315,6 ± 4,09
T30	268,0 ± 4,94	310,1 ± 4,79
T60	271,1 ± 5,65	313,8 ± 6,28

Dados expressos por média ± EPM. Dia 1 – início do tratamento, Dia 10 – término do tratamento.

## DISCUSSÃO

O tratamento com T4 aumentou a atividade espontânea na AR (um índice de hiperatividade), facilitou a resposta de fuga no LTE (um efeito pró-pânico), e aumentou o tempo de imobilidade na NF (um efeito pró-depressão). Como não foram observadas diferenças significantes na atividade espontânea no LCE (EBF), o aumento na %EBA com a menor dose de T4 também sugere uma leve ação ansiolítica. Também houve um pequeno aumento na %TBA que, no entanto, não alcançou significância estatística. Embora os efeitos no LCE indiquem uma redução da ansiedade, esta não foi alterada nos testes de IS, AR ou LTE. Também não foi observado nenhum comportamento agressivo, nem na IS, nem na captura dos ratos pelo experimentador, que sugerisse um aumento da irritabilidade secundário aos níveis mais elevados de ansiedade. No conjunto nossos dados sugerem que o sintoma de 'nervosismo' (*nervousness*) relatado por 99% dos pacientes com hipertireoidismo, bem como os estados de 'apreensão' (*apprehension*), 'labilidade emocional' (*emotional lability*) e 'irritabilidade' (*irritability*) (Larsen *et al.*, 1998) sejam distintos da ansiedade gerada nos modelos animais empregados neste estudo.

Por outro lado, a hiperatividade na AR concorda tanto com os estudos experimentais (Bruno *et al.*, 2006; Redei *et al.*, 2001; Sala-Roca *et al.*, 2002) quanto com a 'agitação' visível dos pacientes com hipertireoidismo (Whybrow *et al.*, 1969; Bauer e Whybrow, 2002; Bruno *et al.*, 2006).

No LTE houve uma redução significativa da latência de fuga no grupo T30 sugerindo o efeito panicogênico desta dose. Este resultado confirma a associação que se faz do transtorno do pânico com alterações da função



tireoideana, principalmente, do hipertireoidismo (Gloger *et al.*, 2001; Fardella *et al.*, 2000; Placidi *et al.*, 1998).

Por sua vez, o teste da NF (Porsolt, 1977) é um dos mais utilizados para a avaliação pré-clínica da atividade antidepressiva de fármacos (Gersner *et al.*, 2009). Neste teste, o aumento do tempo de natação indica um efeito antidepressivo e vice-versa. Apesar da hiperatividade observada na AR, o tempo de imobilidade na NF foi aumentado em ambos os grupos, indicando um efeito específico pró-depressivo da T4.

O teste da IS foi desenvolvido 25 anos atrás como o primeiro teste de ansiedade que usou comportamentos etologicamente relevantes e o comportamento natural do rato como variáveis dependentes (File e Seth, 2003). Na IS, a variável dependente é o tempo gasto por pares de ratos machos em comportamentos de interação ativa, vale dizer, cheirar, seguir ou limpar o parceiro. O aumento da IS na ausência do aumento concomitante da atividade motora é indicativo de efeito ansiolítico, enquanto o decréscimo da IS na ausência de uma redução concomitante da atividade motora indica um efeito ansiogênico (File e Seth, 2003). Os resultados de IS não apresentaram diferenças significantes, mas apenas uma tendência de aumento do comportamento de 'seguir' no grupo T60. Contudo, a arena utilizada para a realização deste teste foi menor que a utilizada em outros trabalhos (Sams-Dodd, 1994; File e Seth, 2003), o que pode ter comprometido os resultados.

Como não houve diferença entre o peso dos ratos tratados e não-tratados, o hipertireoidismo do presente estudo pode ser considerado como um quadro leve, afastando uma influência relevante de efeitos metabólicos nas respostas comportamentais. Portanto, os efeitos foram provavelmente devidos às ações centrais dos tratamentos. Por outro lado, como não houve diferença entre os

níveis plasmáticos de T3 e T4 dos grupos T30 e T60, os efeitos não lineares das doses de T4 devem ser atribuídos aos níveis cerebrais mais elevados de T3 e T4 nos ratos tratados com 60 µg/dia. Em todo caso, os efeitos observados sugerem que níveis distintos de hipertireoidismo afetem os sintomas psiquiátricos de forma diferenciada.

Reis-Lunardelli e colaboradores (2007b) também não observaram efeitos no LCE após um tratamento crônico com T4 (25 µg/100g por 14 dias, i.p.) bastante similar ao do grupo T60. Contudo, o tratamento sub-crônico (500 µg/kg/dia por 3 dias) teve um efeito similar ao do nosso estudo, aumentando o número de entradas no braço aberto (Reis-Lunardelli et al., 2007a). Embora limitados, os efeitos 'ansiolíticos' no LCE deste e do presente estudo podem estar relacionados ao hipertireoidismo subclínico.

Nossos resultados também corroboram as observações de Redei e colaboradores (2001) que mostraram que a administração de T3 aumenta a imobilidade de ratos Wistar no teste da NF. Não obstante, apesar dos inúmeros estudos sobre a comorbidade das doenças da tireóide e depressão, os dados epidemiológicos são controversos. Assim, enquanto alguns estudos sugerem um risco maior de depressão tanto no hipotireoidismo quanto no hipertireoidismo (Demet *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2003), Engum e colaboradores (2002) relataram uma incidência diminuída de depressão e ansiedade em pacientes com hipotireoidismo num estudo que correlacionou traços emocionais e níveis séricos de hormônios da tireóide em 30.589 indivíduos. Contrariamente, outros autores relataram índices maiores de depressão nos pacientes com hipertireoidismo (Baumgartner *et al.*, 1988; Demet *et al.*, 2002; Kirkegaard *et al.*, 1990, 1991). Em particular, Kirkegaard e colaboradores (1990, 1991) encontraram taxas aumentadas de T4 em 30% dos

pacientes com depressão e concentrações aumentadas de T4-L no líquido cefalorraquidiano (LCR) que voltaram aos níveis normais após o tratamento da depressão. Estes autores sugeriram que um grau relativo de hipertireoidismo está associado à depressão e que a redução dos níveis cerebrais de T4 seriam necessária para uma resposta adequada aos antidepressivos. Eles também sugeriram que o aumento de T4 na depressão deve-se ao aumento da secreção do hormônio liberador de tireotrofina (TRH) pelos níveis circulantes elevados de cortisol, resultando numa hiperfunção da tireóide (Bahls, 2004). De fato, Bruhn e colaboradores (1996) mostraram que a exposição dos neurônios do hipotálamo de fetos de ratos aos glicocorticóides aumenta a expressão de TRH. A hipercortisolemia da depressão parece ser devida à redução da inibição do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) pelo hipocampo (Jackson e Asamoah, 1999). Enquanto alguns autores sugerem que a hipercortisolemia dos pacientes depressivos seja devida a uma sinalização deficiente congênita dos receptores de glicocorticóides (Holsboer, 2000), outros propõem que ela seja o resultado de condições prolongadas de estresse (Deakin e Graeff, 1991). No último caso, a elevação dos níveis de cortisol causaria a sub-regulação dos receptores  $5HT_{1A}$  do hipocampo e, conseqüentemente, a depressão (Deakin e Graeff, 1991). Como o TRH é secretado pelo PVN, sua secreção também poderia ser aumentada pela inibição do feedback negativo do hipocampo, resultando no aumento dos níveis de T4. Os efeitos pró-depressão de T4 no teste da NF sugerem que, ao lado do cortisol, este hormônio possa ser um fator adicional no desenvolvimento da depressão.

Embora o registro de índices maiores de depressão em pacientes hipertireoideos (Baumgartner et al., 1988; Kirkegaard *et al.*, 1990, 1991; Demet et al., 2002) concorde com os resultados da NF, Larish e colaboradores (2004)

relataram um risco 7 vezes maior de depressão em pacientes com hipotireoidismo. De fato, alguns autores sugerem que a depressão possa ser devida a uma deficiência cerebral de hormônios da tireóide (Bauer e Whybrow, 1988; Sintzel *et al.*, 2004). Em particular, Sintzel e colaboradores (2004) sugerem que ao invés da redução da produção de TSH ou TRH, o “hipotireoidismo central” seria devido às concentrações menores de transtiretina, a proteína responsável pelo transporte de T4 para o SNC.

Outros estudos relacionaram a administração de T3 ou T4 tanto ao aumento dos níveis cerebrais de 5HT (Gur *et al.*, 1999; Brochet *et al.*, 1985; Sintzel *et al.*, 2004; Bauer *et al.*, 2005; Atterwill, 1981; Bahls, 2004), quanto aos efeitos de bloqueio da função GABAérgica (Aszalós, 2007; Bahls *et al.*, 2007; Martin *et al.*, 1996). De fato, sabe-se que doses apropriadas de T3 potencializam a ação de antidepressivos (Sintzel *et al.*, 2004). Como a administração isolada de T4 teve um efeito pró-depressivo na NF, os efeitos antidepressivos deste hormônio devem ser estritamente dependentes do tratamento com os antidepressivos. Assim, o efeito dos hormônios da tireóide nos transtornos psiquiátricos dependerá do estado funcional dos sistemas neuroquímicos de cada paciente.

O sistema TRHérgico também está alterado nas doenças da tireóide, podendo mediar inúmeros efeitos comportamentais. Contudo, Rondeel e colaboradores (1988; 1990) mostraram que enquanto o hipertireoidismo induzido por administração de T4 (10 µg/100g/dia, por 8 dias) resulta numa diminuição de 45% da liberação de TRH no sistema porta-hipofisário, o hipotireoidismo induzido por metimazol não teve efeito algum sobre os níveis porta-hipofisários de TRH, mesmo quando os níveis de T3 e T4 foram reduzidos em cerca de 80% e os níveis de TSH foram aumentados em cerca de 20 vezes. Estes resultados indicam que o aumento

da secreção de TSH no hipotireoidismo deve-se a efeitos mediados pelos tireotrófos da hipófise. Eles também mostram efeitos diferenciados dos neurônios TRHérgicos do PVN a estas condições.

Em adição, Szuba e colaboradores (2005) observaram um efeito antidepressivo notável, de início rápido e de 2 semanas de duração, após uma única injeção de TRH (i.v.) em 60% dos pacientes com depressão maior. De forma similar, Bunevicius e colaboradores (1993) mostraram que a administração de TRH produz uma melhora do estado emocional de pacientes com depressão, sem alteração dos níveis de TSH e hormônios tireoideanos. Embora Pekari e colaboradores (2001) também tenham observado efeitos antidepressivos do TRH em ratos, eles só foram observados quando o hormônio foi administrado por via intratecal. Os últimos autores creditaram a ação antidepressiva do TRH e de peptídeos correlatos a uma inibição potente da expressão de GSK-3 $\beta$ , uma enzima que fosforila a taurina e que parece estar implicada no transtorno bipolar (Pekari *et al.*, 2006).

Corroborando os efeitos panicogênicos do hipertireoidismo no LTE, estudos recentes do nosso laboratório sugerem que a elevação dos níveis de TRH presente no hipotireoidismo tenha efeitos panicolíticos. De fato, Siqueira e colaboradores (2010a) mostraram que a administração periférica de doses baixas de TRH (1  $\mu$ g/kg, i.p.) atenuou os comportamentos de defesa induzidos por estimulação elétrica da matéria cinzenta periaquedutal dorsal (MCPD), um modelo experimental de ataques de pânico (Deakin e Graeff, 1991; Jenck *et al.*, 1995; Schenberg *et al.*, 2001, 2008; Vargas e Schenberg, 2001). Em outro estudo, Siqueira e colaboradores (2010b) avaliaram os efeitos do hipotireoidismo induzido por metimazol (0,6 mg/dia/10 dias, i.p.). De forma similar, os comportamentos de defesa da MCPD foram atenuados de forma acentuada e duradoura pelo hipotireoidismo. Estes

estudos sugerem uma ação panicolítica do TRH compatível com os efeitos panicogênicos de T4 no LTE.

De fato, o transtorno do pânico também tem sido associado às alterações da função tireoideana. Mais frequentemente, os estudos tem mostrado uma associação com o hipertireoidismo (Gloger *et al.*, 2001; Placidi *et al.*, 1998). Contudo, embora as concentrações basais de T3, T4, T4-L e TSH são freqüentemente normais em pacientes com transtorno de pânico (Stein *et al.*, 1988; Yeragani *et al.*, 1987; Munjack *et al.*, 1988; Lesser *et al.*, 1987), Fishman e colaboradores (1985) observaram a supressão do TSH (níveis sanguíneos inferiores a 0,5 mUI/ml) em 22% dos pacientes de pânico. De forma similar, Fardella e colaboradores (2000) encontraram níveis mais elevados de T4-L nos indivíduos com transtorno de pânico.

Por outro lado, os dados contraditórios da clínica podem ser explicados pela heterogeneidade das amostras, pela condição dos pacientes (doença clínica ou subclínica), pelo uso de diversas escalas de avaliação de ansiedade e depressão, pela ansiedade e depressão secundárias à doença tireoideana, ou pelas estratégias diversas, vale dizer, enquanto alguns avaliaram os índices hormonais de pacientes psiquiátricos, outros avaliaram traços ansiosos e depressivos de pacientes não-psiquiátricos com disfunção da tireóide, ou simplesmente correlacionaram traços emocionais com níveis séricos da população em geral.

Embora estes fatores sejam eliminados (ou controlados) no hipertireoidismo experimental, os modelos experimentais nem sempre correspondem à realidade clínica. Em todo caso, nosso estudo e os dados da literatura sugerem que o hipertireoidismo possa ser um fator predisponente dos transtornos do pânico e da depressão.

## **ESTUDO II**

# **EFEITOS DO HIPERTIREOIDISMO EXPERIMENTAL SOBRE OS COMPORTAMENTOS DE DEFESA INDUZIDOS PELA ESTIMULAÇÃO DA MATÉRIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL DORSAL**

### **Colaboradores:**

Vanessa Mendonça de Alvarenga

Prof. Dr. Sérgio Tufik

Dra. Magda Bignotto

**Apoio financeiro:** CNPq

## RESUMO

Os transtornos de humor e ansiedade, incluindo os ataques de pânico (AP), podem ser influenciados por disfunções do eixo hipotálamo-hipófise-tireóide. Por outro lado, os comportamentos de defesa induzidos pela estimulação da matéria cinzenta periaquedutal dorsal (MCPD) têm sido associados aos AP. Estudos anteriores mostraram que a elevação dos níveis de hormônio liberador da tireotrofina, uma condição do hipotireoidismo, bem como o hipotireoidismo induzido por metimazol, atenuam de forma acentuada estes comportamentos. Reciprocamente, o hipertireoidismo experimental facilitou a resposta de fuga no labirinto-em-T elevado (LTE), um modelo de ataque de pânico. Portanto, o presente estudo avaliou os efeitos do hipertireoidismo experimental por administração de L-tiroxina (T4) sobre os limiares da reação de defesa da MCPD. Ratos Wistar machos (n=58) foram implantados com eletrodos na MCPD e, 5 dias após, estimulados com pulsos de intensidades crescentes (sessão-triagem). Os ratos que apresentaram galopes com intensidades inferiores a 70  $\mu$ A foram tratados por 10 dias com salina (grupo controle), ou 30 e 60  $\mu$ g/dia de T4 (i.p.) (grupos T30 e T60, respectivamente). Os efeitos agudos foram avaliados no mesmo dia da primeira dose de tratamento e os efeitos crônicos 10 dias após. Os efeitos foram avaliados por análise logística de limiares e testes de  $\chi^2$  da razão de verossimilhanças. O hipertireoidismo foi confirmado por ANOVA dos níveis plasmáticos de T3 e T4. As diferenças foram consideradas significantes para  $P < 0,05$  (critério de Bonferroni). Comparados ao grupo controle, os ratos tratados apresentaram aumentos significantes, porém, similares, dos níveis plasmáticos de T3 e T4. No grupo T30, o tratamento agudo causou aumentos dos limiares de trote (26,7%), galope (54,9%) e salto (33,1%), e o



tratamento crônico dos limiares de imobilidade (50,2%), exoftalmia (36,4%), trote (43,9%), galope (71,5%) e salto (57,7%). No grupo T60, foram observados aumentos seletivos expressivos dos limiares de galope, tanto no tratamento agudo (27%) quanto crônico (77,7%). Os resultados deste e dos estudos anteriores sugerem que os modelos de ataque de pânico da MCPD e do LTE sejam diferentes. Estes resultados também sugerem que os AP sejam inibidos tanto no hipertireoidismo quanto no hipotireoidismo, corroborando os achados aparentemente contraditórios dos estudos epidemiológicos. Por fim, apesar de ambos, T3 e TRH, agirem inibindo as respostas de defesa eliciadas pela MCPD, este efeito pode ser mediado por mecanismos bastante diferentes ao nível desta estrutura.

**Palavras-chaves:** Tireóide, Matéria Cinzenta Periaquedutal, Reação de Defesa, Ataque de Pânico

## INTRODUÇÃO

As alterações emocionais, cognitivas e do humor que acompanham as doenças da tireóide sugerem que os transtornos psiquiátricos possam estar relacionados à disfunção do eixo hipotálamo-hipófise-tireóide (HHT) (Mason, 1968; Wang e Mason, 1999; Friedman *et al.*, 2005). De fato, em sua descrição original do hipertireoidismo, Graves (1835) já havia incluído sintomas tanto somáticos (hiperventilação, tremores e dores precordiais,) como emocionais (*apud* Fishman *et al.*, 1985). Estas observações foram amplamente confirmadas pela demonstração que o 'nervosismo' (*nervousness*) é o sintoma predominante do hipertireoidismo, sendo relatado por 99% dos pacientes (Larsen *et al.*, 1998). Contudo, os estudos epidemiológicos mostram, mais freqüentemente, uma correlação dos transtornos psiquiátricos com doenças da tireóide em geral, e não quadros psiquiátricos particulares (Placidi *et al.*, 1998; Rogers *et al.*, 1994; Lesser *et al.*, 1987; Matuzas *et al.*, 1987; Raj and Sheehan, 1987; Carta *et al.*, 2002). Assim, as doenças da tireóide têm sido propostas como fatores tanto predisponentes quanto causais de vários transtornos psiquiátricos, podendo ter uma influência proeminente em sua terapia.

Por outro lado, as causas e fatores predisponentes do transtorno de pânico (TP) permanecem desconhecidas. Contudo, no estudo pioneiro que lançou as bases farmacológicas da terapia do pânico, Donald Klein (1964) já havia relatado o caso de um paciente cujos AP começaram durante a terapia de hipotireoidismo. Embora existam vários estudos que não encontraram correlação alguma entre transtorno do pânico e doença da tireóide, presente ou antecedente (Stein e Uhde, 1988, 1989; Munjack e Palmer, 1988; Kent *et al.*, 1999; Noyes *et al.*, 1992; Gloger *et al.*, 1997; Chiovato *et al.*, 1998), Fardella e colaboradores (2000) apresentaram

evidências de que o hipertireoidismo e hipotireoidismo estão correlacionados ao pânico e depressão, respectivamente. De fato, Fishman e colaboradores (1985) observaram a supressão do TSH (níveis sanguíneos inferiores a 0,5 mUI/ml) em 22% dos pacientes de pânico. Ao contrário, Kikuchi e colaboradores (2005) sugeriram que o pânico está correlacionado com o hipotireoidismo. Estes dados contraditórios ensejam estudos experimentais em condições mais controladas.

Por outro lado, a estimulação elétrica e química da metade dorsal da matéria cinzenta periaquedutal (MCPD) produz comportamentos de defesa que têm sido propostos como um modelo de ataque de pânico (Gentil, 1988; Deakin e Gaeff, 1991; Schenberg *et al.*, 2001). Estudos anteriores mostraram que a elevação dos níveis do hormônio liberador da tireotrofina (TRH), uma condição do hipotireoidismo, bem como o hipotireoidismo induzido por metimazol, atenuam estes comportamentos de forma acentuada (Siqueira *et al.*, 2010a,b). De forma recíproca, a fuga no labirinto-em-T elevado (LTE), outro modelo de ataque de pânico, foi facilitada no hipertireoidismo experimental (Estudo I). Portanto, o presente estudo examinou se os comportamentos de defesa eliciados pela MCPD também são alterados pelo hipertireoidismo experimental produzido pela administração aguda e crônica de L-tiroxina (T4) em ratos.

## **METODOLOGIA**

*Animais.* Foram utilizados ratos Wistar albinos, machos (n=58), pesando cerca de 250 g, fornecidos pelo biotério da Universidade Federal do Espírito Santo. Os procedimentos do presente estudo seguiram as normas de conduta ética de pesquisa em animais da Sociedade Brasileira de Neurociência e Comportamento.

*Cirurgia de Implantação dos Eletrodos.* Os eletrodos foram confeccionados com um fio de aço inoxidável de 5 mm de comprimento e 0,25 mm de diâmetro, isolados em toda extensão exceto na seção transversal de sua extremidade (California Fine Wire, EUA). Os fios foram soldados em soquetes de dois pinos confeccionados a partir de um barramento para microcomputador (BCPT 50, Celis, SP). Um dos pinos era conectado ao eletrodo ativo e o outro a um fio de aço não isolado que, soldado a um parafuso de fixação da prótese, servia de eletrodo indiferente. Para a cirurgia, os ratos foram anestesiados com 400 mg/kg (i.p.) de hidrato de cloral e fixados ao aparelho estereotáxico. Após a tricotomia da calvária, removia-se uma pequena área de pele e tecidos subcutâneos, expondo-se a calota craniana. A seguir, realizava-se uma trepanação com uma broca odontológica adiamantada e introduzia-se o eletrodo por meio de uma pequena incisão na dura-máter. Sempre que necessário, afastava-se o seio venoso, evitando sua ruptura e hemorragia. O eletrodo era implantado na MCPD de acordo com as seguintes coordenadas em relação ao bregma: AP= -7,6 mm, L= -0,5 mm e V= -4,3 mm (Paxinos e Watson, 1998). Após a fixação do eletrodo, preenchia-se o campo cirúrgico com resina acrílica autopolimerizável de secagem rápida e colocava-se um tubo de plástico com ganchos ao redor dos mesmos para protegê-los e para fixação do cabo de estimulação. Após o procedimento cirúrgico os ratos eram colocados em gaiolas individuais e mantidos no biotério do laboratório com livre acesso à água e comida além de temperatura e iluminação controladas (25°C e ciclo claro-escuro de 12 h, luzes acesas às 6:00 h).

*Estimulação Intracraniana.* Após um período de recuperação cirúrgica de no mínimo 5 dias, os ratos eram conectados ao cabo de estimulação e colocados numa arena

de acrílico transparente com 50 cm de diâmetro e altura. Os estímulos eram aplicados por meio de um estimulador de pulsos senoidais de corrente constante (FDV, Ribeirão Preto, SP) e monitorados por meio de um osciloscópio (Hitashi Denshi, Taiwan). Na primeira sessão de estimulação (sessão de triagem), pulsos de intensidades crescentes eram aplicados à MCPD, em intervalos de 5 min, até a eliciação da resposta de galope ou até a intensidade máxima de 70  $\mu\text{A}$ , selecionando-se os ratos que apresentaram a resposta de galope com intensidades inferiores a 70  $\mu\text{A}$ . Este protocolo foi utilizado para todas as sessões de estimulação. As respostas comportamentais foram registradas por observação direta do experimentador com o auxílio de uma planilha com os itens do etograma que se segue:

*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.

*Olfacção* - Jorros de atividade olfativa indicada pelo movimento do focinho e vibrissas.

*Esquadrinhar* - Exploração viso-motora do ambiente caracterizada por movimentos laterais da cabeça, geralmente acompanhados de olfacção.

*Autolimpeza* - Postura ereta sobre as patas posteriores flexionadas, 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* - Cessar brusco de todos os movimentos, exceto da respiração, frequentemente acompanhado da extensão dos membros, elevação do tronco, orelhas e pescoço e, às vezes, da cauda, indicando um aumento do tônus muscular. O cessar brusco das atividades pode resultar em posturas anômalas.

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

*Galope* - Locomoção muito rápida ao longo do perímetro da arena, alternando movimentos de apoio e projeção dos membros anteriores e posteriores.

*Saltos* - Impulso vertical ou oblíquo em direção à borda da arena.

*Exoftalmia* - Abertura máxima dos olhos que assume a forma esférica e cor brilhante, presumivelmente, devida a uma maior entrada de luz.

*Defecação* - Eliminação de fezes.

*Micção* - Eliminação de urina.

*Grupos de tratamento.* Os ratos considerados positivos, ou seja, aqueles que apresentaram a resposta de galope na sessão de triagem com intensidades inferiores a 70  $\mu\text{A}$  eram selecionados para as etapas seguintes do experimento. Os animais foram tratados com salina (grupo SAL, n=20) ou L-tiroxina (T4) nas doses de 30  $\mu\text{g}/\text{rato}/\text{dia}$  (grupo T30, n=18) ou 60  $\mu\text{g}/\text{rato}/\text{dia}$  (grupo T60, n=20). As drogas eram administradas por via intraperitoneal (i.p.), entre 13-16h.

*Teste do efeito agudo.* No mesmo dia da triagem (dia 1, ver tabela 1), os ratos recebiam a primeira dose do tratamento, 30 minutos após os animais eram

submetidos novamente à estimulação intracraniana da MCPD, como na sessão triagem, para observação de alterações nos limiares da resposta de defesa ocasionadas pelo efeito agudo do tratamento com T4.

*Teste do efeito crônico.* A partir do 2º dia do experimento, diariamente uma dose era aplicada na dosagem correspondente a cada grupo, durante 10 dias. No 11º dia todos os animais eram submetidos novamente à estimulação intracraniana da MCPD, como na sessão triagem, para observação de alterações nos limiares da resposta de defesa ocasionadas pelo efeito crônico do tratamento.

Tabela 1. Protocolo experimental (após recuperação cirúrgica). EIC – estimulação intracraniana.

Grupos	Dia 1		Dias 2-10	Dia 11	Dia 12
SAL	EIC-Triagem	EIC-Agudo	Salina	EIC-Crônico	coleta de sangue
T30	EIC-Triagem	EIC-Agudo	30 µg/dia de T4	EIC-Crônico	coleta de sangue
T60	EIC-Triagem	EIC-Agudo	60 µg/dia de T4	EIC-Crônico	coleta de sangue

*Coleta de sangue.* Ao final dos experimentos, os ratos eram anestesiados com uma sobredose de hidrato de cloral e submetidos a uma toracotomia, durante a qual as amostras de sangue (1,5 ml) eram coletadas por punção cardíaca. A seguir, os ratos eram perfundidos por via cardíaca com 150 ml de solução salina (0,9%) seguida de 150 ml de formaldeído (10%) com auxílio de uma bomba peristáltica (Masterflex, EUA). As amostras de sangue eram centrifugadas a 4°C e o plasma era mantido a -20°C até ser enviado para dosagem dos hormônios de T3, T4 e TSH no Departamento de Psicobiologia da EPM-UNIFESP. Por sua vez, as cabeças eram

armazenadas em solução de formaldeído por um período mínimo de 5 dias. Após isto, os cérebros eram removidos e seccionados num vibrátomo (Vibratome, EUA) em cortes coronais com 60  $\mu\text{m}$  de espessura. Os cortes eram estendidos em lâminas gelatinizadas, desidratados em baixa temperatura (39°C), corados com vermelho neutro (Sigma, EUA) e montados com DPX (Sigma, EUA). Os sítios estimulados foram verificados por microscopia de baixo aumento (Nikon, Eclipse 50i, Japão).

*Análise estatística.* As curvas de probabilidade de resposta foram obtidas pelo ajuste logístico das frequências acumuladas das respostas limiaries em função do logaritmo da intensidade de corrente para as sessões com salina ou doses de T4, agudas e crônicas, 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  $x_{ij}$ ,  $\alpha_j$  é o intercepto e  $\beta_j$  a inclinação da *jésima* curva de intensidade-resposta para as drogas e dias do tratamentos. Ajustes logísticos significantes foram avaliados pelo  $\chi^2$  de Wald ( $\chi^2_w = [\beta/EP_\beta]^2$ ), onde  $EP_\beta$  é o erro padrão de  $\beta_j$ . As curvas intensidade-resposta dos tratamentos farmacológicos foram parametrizadas por meio de variáveis indicadoras (0 e 1) e comparadas pela razão dos desvios de verossimilhança do modelo completo ( $k$  parâmetros) e dos modelos reduzidos ( $k-r$  parâmetros), proporcionando valores de  $\chi^2$  com  $r$  graus de liberdade ( $\chi^2 r$ ) para comparações de locação ou paralelismo das regressões. Os  $\chi^2 r$  dos testes gerais de locação e paralelismo, assim como o  $\chi^2$  de Wald, foram considerados significantes ao nível de 5 %. Os  $\chi^2 r$  dos testes pareados de locação e paralelismo (1 g.l.) foram considerados significantes segundo o critério de 5 % de Bonferroni. O ajuste por



máxima verossimilhança foi realizado pelo procedimento “Logistic” do programa SAS (SAS<sup>®</sup>, Cary, EUA). As medianas ( $I_{50}$ ) assim como os respectivos erros padrões (EP) e o intervalo de confiança (IC 95 %) foram computados pelas fórmulas que se seguem:

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

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

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

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

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

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). Os efeitos dos tratamentos foram apresentados como variações percentuais das  $I_{50}$  em relação à sessão de triagem.

As variação do peso dos animais ao longo dos tratamentos foi avaliada por ANOVA para medidas repetidas seguidas de testes-t pareados.

Os níveis plasmáticos de T3 e T4 foram analisados por ANOVA seguida de testes-t para amostras independentes.

## RESULTADOS

*Sítios estimulados.* Os eletrodos dos ratos cuja estimulação na sessão triagem eliciou as respostas de defesa com intensidades inferiores a 70  $\mu\text{A}$  localizaram-se majoritariamente nas colunas dorsolateral e lateral da MCPA (Fig. 1).

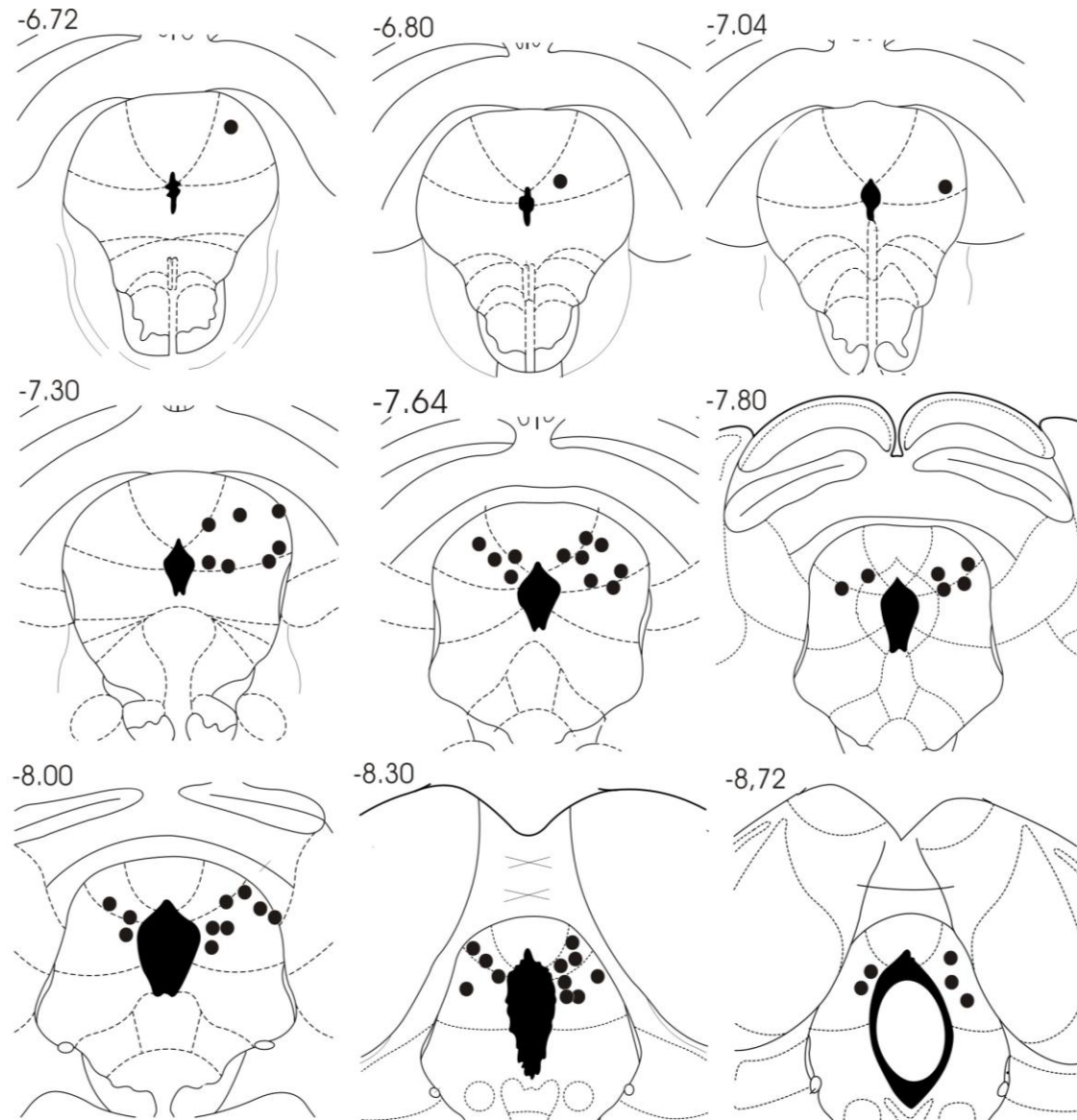


Fig. 1. Sítios de estimulação da MCPA. Os números referem-se às coordenadas antero-posteriores do atlas do cérebro do rato de Paxinos e Watson (1998).

*Efeitos do tratamento com T4 sobre o peso dos animais.* Houve ganho significativo do peso ao longo do experimento ( $F_{2,63} = 188.5$ ;  $P < 0,0001$ ). Porém, não houve efeitos do tratamento sobre o ganho de peso (tabela 2).

Tabela 2 – Peso dos animais (g) de cada grupo de estudo ao longo do tratamento crônico com L-tiroxina. T30 – grupo tratado com 30µg/dia de T4, T60 – grupo tratado com 60µg/dia de T4, SAL – grupo salina (NaCl 0,9%)

Tratamento	Dia da cirurgia	Dia 1	Dia 10
SAL	266,8 ± 3,86	268,5 ± 2,71	315,6 ± 4,09
T30	267,0 ± 3,20	268,0 ± 4,94	310,1 ± 4,79
T60	256,4 ± 6,22	271,1 ± 5,65	313,8 ± 6,28

Dados expressos por média (g) ± EPM. Dia 1 – início do tratamento, Dia 10 – término do tratamento.

*Efeitos do tratamento exógeno de T4 sobre os níveis plasmáticos de T3 e T4.* Os grupos diferiram quanto aos níveis plasmáticos de T3 ( $F_{2,54} = 11,01$ ;  $P > 0,0001$ ) e T4 ( $F_{2,54} = 9,35$ ;  $P > 0,0003$ ). Comparado ao grupo SAL, o grupo T30 apresentou níveis plasmáticos significativamente maiores de T3 ( $P < 0,0002$ ), e T4 ( $P < 0,0007$ ). Da mesma forma, o grupo T60 apresentou aumentos significantes dos níveis plasmáticos de T3 ( $P < 0,0001$ ) e de T4 ( $P < 0,0003$ ) (tabela 3).

Tabela 3 - Níveis plasmáticos de T3 e T4 dos grupos tratados com salina (SAL) ou T4 nas doses diárias de 30 µg (T30) ou 60 µg (T60) por rato, ao longo de 10 dias.

Tratamento	T3 (ng/dl)	T4 (µg/dl)
SAL	55,60 ± 1,93	7,87 ± 0,33
T30	90,69* ± 6,13	12,36* ± 0,93
T60	90,38* ± 8,45	12,46* ± 1,14

Dados expressos por média ± EPM. \*  $P < 0,05$  diferença significativa em relação ao grupo SAL.

*Efeito do tratamento com T4 sobre os limiares das respostas de defesa.* Os limiares dos comportamentos de defesa dos ratos tratados com T4 sofreram aumentos consideráveis tanto comparados ao grupo SAL (Fig.2) quanto à sessão-triangem

(Fig.3). Os efeitos foram mais pronunciados para a menor dose de T4 (30 µg). Contudo, não foram observados efeitos de T4 sobre a micção.

As curvas de limiares dos tratamentos agudos foram estatisticamente diferentes para as respostas de galope ( $\chi^2= 27,8$ ; 2 g.l.;  $P<0,0001$ ), trote ( $\chi^2= 8,7$ ; 2 g.l.;  $P<0,01$ ) e salto ( $\chi^2= 17,8$ ; 2 g.l.;  $P<0,0001$ ), e dos tratamentos crônicos para imobilidade ( $\chi^2= 13,8$ ; 2 g.l.;  $P<0,001$ ), exoftalmia ( $\chi^2= 11,1$ ; 2 g.l.;  $P<0,005$ ), trote ( $\chi^2= 6,9$ ; 2 g.l.;  $P<0,03$ ) e salto ( $\chi^2= 18,9$ ; 2 g.l.;  $P<0,0001$ ).

Comparados aos limiares do grupo SAL, os limiares de defesa do grupo T30 foram significativamente aumentados pela administração aguda de T4 para as respostas de trote ( $\Delta= 26,7\%$ ;  $\chi^2= 9,5$ ; 1 g.l.;  $P<0,002$ ), galope ( $\Delta= 54,9\%$ ;  $\chi^2= 28,9$ ; 1 g.l.;  $P<0,0001$ ) e salto ( $\Delta= 33,1\%$ ;  $\chi^2= 19,1$ ; 1 g.l.;  $P<0,0001$ ). Também foram observados aumentos significantes dos limiares de defesa do grupo T30 após o tratamento crônico com T4 para as respostas de imobilidade ( $\Delta= 50,2\%$ ;  $\chi^2= 9,1$ ; 1 g.l.;  $P<0,003$ ), exoftalmia ( $\Delta= 36,4\%$ ;  $\chi^2= 8,4$ ; 1 g.l.;  $P<0,004$ ), trote ( $\Delta= 43,9\%$ ;  $\chi^2= 6,8$ ; 1 g.l.;  $P<0,009$ ), galope ( $\Delta= 71,5\%$ ;  $\chi^2= 26,3$ ; 1 g.l.;  $P<0,0001$ ) e salto ( $\Delta= 57,7\%$ ;  $\chi^2= 17,5$ ; 1 g.l.;  $P<0,0001$ ) (Figs.2-3).

Comparados aos limiares do grupo SAL, os limiares de defesa do grupo T60 somente foram aumentados para resposta de galope, tanto no tratamento agudo ( $\Delta= 27\%$ ;  $\chi^2= 8,5$ ; 1 g.l.;  $P<0,004$ ) quanto crônico ( $\Delta= 77,7\%$ ;  $\chi^2= 29,5$ ; 1 g.l.;  $P<0,0001$ ). Comparados ao grupo SAL, não foram observados efeitos significantes de T4 sobre as respostas de micção e defecação.

Também houve diferenças significantes entre os grupos tratados com T4. Assim, o grupo T30 apresentou limiares mais elevados que T60 para as respostas de galope ( $\Delta= 48,2\%$ ;  $\chi^2= 6,9$ ; 1g.l.;  $P<0,01$ ) no tratamento agudo e para as respostas de imobilidade ( $\Delta= 36,5\%$ ;  $\chi^2= 11,1$ ; 1g.l.;  $P<0,001$ ), exoftalmia ( $\Delta=$

27,6%;  $\chi^2= 8,2$ ; 1g.l.;  $P<0,004$ ), micção ( $\Delta= 29\%$ ;  $\chi^2= 9$ ; 1g.l.;  $P<0,005$ ) e salto ( $\Delta= 46,4\%$ ;  $\chi^2= 10,8$ ; 1g.l.;  $P<0,001$ ) no tratamento crônico (Fig. 2).

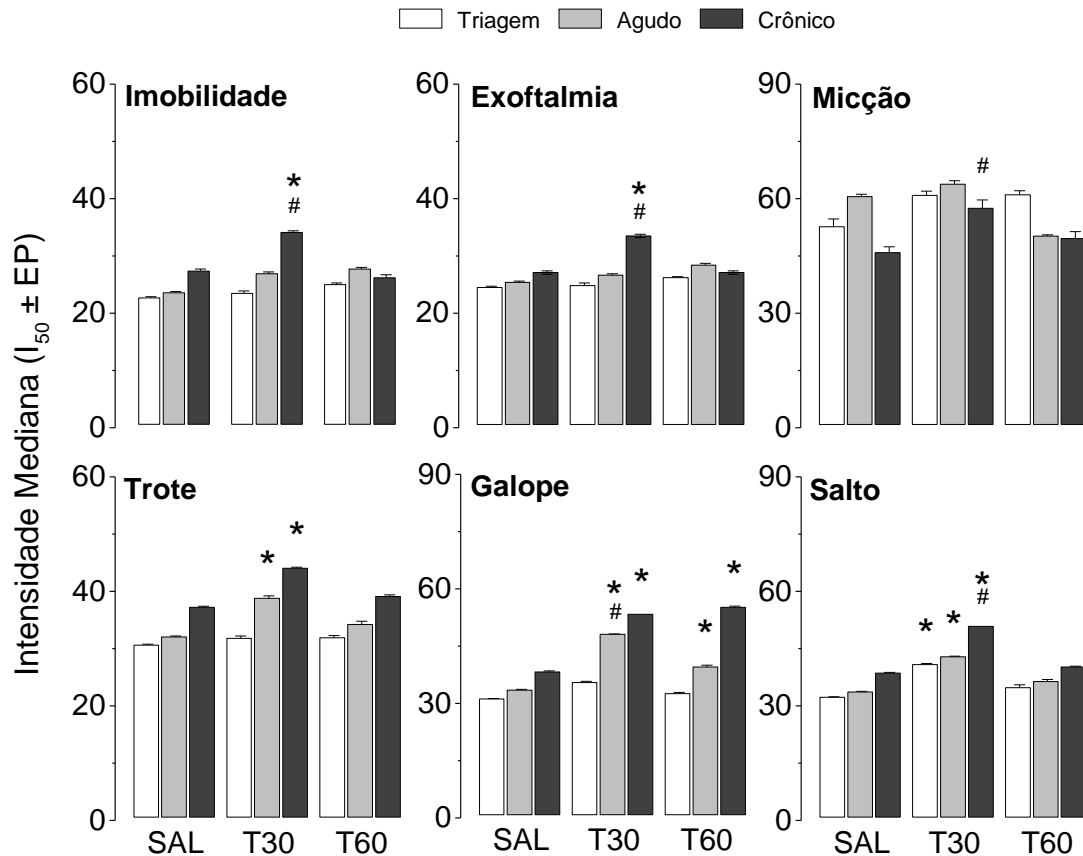


Fig. 2. Efeitos da administração de T4 (30  $\mu\text{g}/\text{rato}/\text{dia}$  ou 60  $\mu\text{g}/\text{rato}/\text{dia}$ , i.p.) ou salina (NaCl 0,9%, i.p.) sobre a intensidade mediana limiar ( $I_{50\pm EP}$ ,  $\mu\text{A}$ ) das respostas de defesa induzidas por estimulação da matéria cinzenta periaquedutal. As medianas foram estimadas por análise logística de limiares. \*  $P<0,05$ , diferenças significantes em relação à sessão respectiva do grupo SAL. #  $P<0,05$ , diferenças significantes em relação à sessão respectiva do grupo T60.

Também foram observadas diferenças significantes entre sessões do grupo SAL para as respostas de imobilidade ( $\chi^2= 8,5$ ; 2 g.l.;  $P<0,01$ ), trote ( $\chi^2= 11,4$ ; 2 g.l.;  $P<0,005$ ), galope ( $\chi^2= 11,8$ ; 2 g.l.;  $P<0,005$ ) e salto ( $\chi^2= 13,0$ ; 2 g.l.;  $P<0,005$ ); entre sessões do grupo T30 para imobilidade ( $\chi^2= 18,9$ ; 2 g.l.;  $P<0,0001$ ), exoftalmia

( $\chi^2 = 11,8$ ; 2 g.l.;  $P < 0,005$ ), trote ( $\chi^2 = 17$ ; 2 g.l.;  $P < 0,0005$ ), galope ( $\chi^2 = 37,9$ ; 2 g.l.;  $P < 0,0001$ ) e salto ( $\chi^2 = 10,3$ ; 2 g.l.;  $P < 0,01$ ); e entre sessões do grupo T60 para trote ( $\chi^2 = 14,5$ ; 2 g.l.;  $P < 0,001$ ), galope ( $\chi^2 = 69,7$ ; 2 g.l.;  $P < 0,0001$ ) e salto ( $\chi^2 = 14,5$ ; 2 g.l.;  $P < 0,001$ ).

Comparados aos limiares da sessão-triagem, o tratamento crônico com salina causou aumentos leves, porém significantes, dos limiares de imobilidade ( $\Delta =$

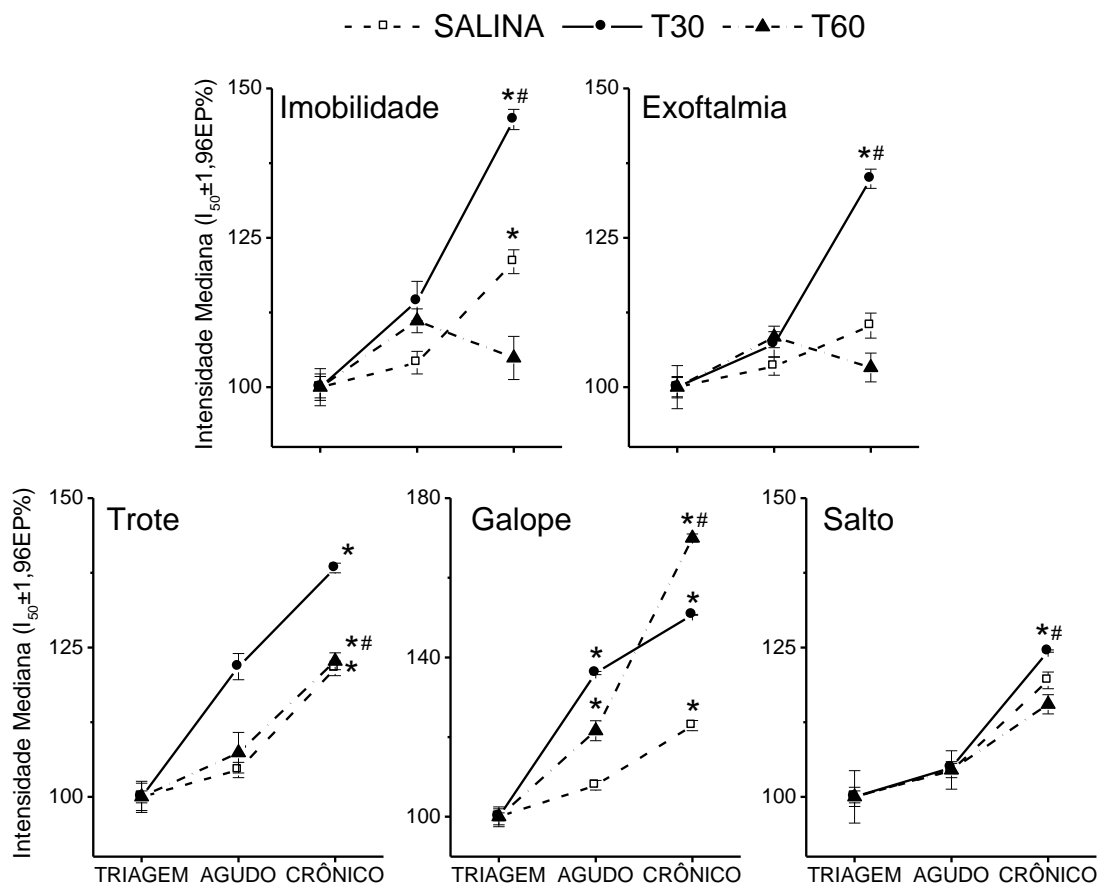


Fig. 3. Efeitos percentuais da administração de T4 (30 µg/rato/dia ou 60 µg/rato/dia, i.p.) ou salina (NaCl 0,9%, i.p.) sobre a intensidade mediana limiar e respectivo intervalo de confiança ( $I_{50} \pm 1,96EP\%$ ) das respostas de defesa induzidas por estimulação da matéria cinzenta periaquedutal. As medianas foram estimadas por análise logística de limiares. As barras verticais representam os intervalos de confiança expressos como porcentagens das respectivas medianas ( $[IC/I_{50}] \times 100$ ) \*  $P < 0,05$ , diferenças significantes em relação à sessão-triagem do respectivo tratamento. #  $P < 0,05$ , diferenças significantes em relação à sessão com administração aguda do respectivo tratamento.

21%;  $\chi^2= 7,6$ ; 1 g.l.;  $P<0,01$ ), trote ( $\Delta= 21\%$ ;  $\chi^2= 9,4$ ; 1 g.l.;  $P<0,005$ ) e galope ( $\Delta= 23\%$ ;  $\chi^2= 10,2$ ; 1 g.l.;  $P<0,001$ ) (Fig.3). Enquanto o tratamento agudo com 30  $\mu\text{g}$  de T4 causou aumentos marginais nos limiares de trote ( $\Delta= 20\%$ ) e aumentos moderados nos limiares de galope ( $\Delta= 36\%$ ;  $\chi^2= 16,0$ ; 1 g.l.;  $P<0,0001$ ), o tratamento agudo com 60  $\mu\text{g}$  de T4 causou aumentos apenas leves dos limiares de galope ( $\Delta= 21\%$ ;  $\chi^2= 16,0$ ; 1 g.l.;  $P<0,0001$ ). Também foram observados efeitos leves sobre os limiares de salto ( $\Delta= 24\%$ ;  $\chi^2= 9,1$ ; 1 g.l.;  $P<0,005$ ) após o tratamento crônico com 30  $\mu\text{g}$  de T4. Em contraste, o último tratamento causou aumentos acentuados nos limiares de imobilidade ( $\Delta= 45\%$ ;  $\chi^2= 16,6$ ; 1 g.l.;  $P<0,0001$ ), exoftalmia ( $\Delta= 35\%$ ;  $\chi^2= 8,9$ ; 1 g.l.;  $P<0,005$ ), trote ( $\Delta= 38\%$ ;  $\chi^2= 16,3$ ; 1 g.l.;  $P<0,0001$ ) e, principalmente, galope ( $\Delta= 69\%$ ;  $\chi^2= 36,5$ ; 1 g.l.;  $P<0,0001$ ). Por fim, o tratamento crônico com 60  $\mu\text{g}$  de T4 causou aumentos significantes nos limiares de trote ( $\Delta= 23\%$ ;  $\chi^2= 14,7$ ; 1 g.l.;  $P<0,0001$ ) e, principalmente, galope ( $\Delta= 70\%$ ;  $\chi^2= 71,0$ ; 1 g.l.;  $P<0,0001$ ).

## DISCUSSÃO

A administração aguda de T4 causou a atenuação moderada, porém significativa, da resposta de galope nas doses de 30 e 60  $\mu\text{g}$ . Por sua vez, o tratamento crônico com 30  $\mu\text{g}$  de T4 causou o aumento acentuado dos limiares de imobilidade, exoftalmia, trote e, principalmente, galope, mas a atenuação apenas leve da resposta de salto. O tratamento crônico com 60  $\mu\text{g}$  de T4 somente atenuou as respostas de trote e galope. Contudo, enquanto os limiares do trote sofreram aumentos leves equiparáveis aos do grupo controle, os limiares de galope foram acentuadamente aumentados por 60  $\mu\text{g}$  de T4. De fato, o galope foi a única resposta

afetada de forma dose-dependente pela T4. Por fim, as respostas de defecação e micção não foram afetadas de forma significativa.

Como não houve diferença entre o peso dos ratos tratados e não-tratados ao final dos experimentos, o hipertireoidismo foi aparentemente leve, tornando improvável a influência de efeitos metabólicos severos ('fraqueza') nas respostas comportamentais. Portanto, a atenuação dos comportamentos de defesa foi, provavelmente, devida a ações centrais da T4. Por outro lado, como não houve diferença dos níveis plasmáticos de T3 e T4 nos grupos T30 e T60, as diferenças comportamentais destes tratamentos devem ser atribuídas a níveis mais elevados de T3 e T4 no SNC dos ratos tratados com a maior dose de T4. Em todo caso, os efeitos observados sugerem que as variações nos níveis de hormônios da tireóide afetam de forma diferenciada os sintomas psiquiátricos.

Embora as respostas defensivas induzidas por estimulação da MCPD tenham sido indistintamente propostas como um modelo experimental de AP (Gentil, 1988; Jenck *et al.*, 1995; Deakin e Graeff, 1991), as evidências farmacológicas sugerem que o galope seja a resposta mais representativa desta condição (Schenberg *et al.*, 2001). De fato, o galope induzido pela estimulação da MCPD do rato foi seletivamente atenuado por fluoxetina em doses e regime similares aos empregados na terapia do TP (Schenberg *et al.*, 2001, 2002, Vargas *et al.* 2001). Ao contrário, o galope foi facilitado pelos panicógenos pentilenotetrazol, ioimbina e colecistocinina (Schenberg *et al.*, 2001; Jenck *et al.*, 1995; Bertoglio *et al.*, 2007), mas não foi afetado pelas drogas ineficazes na terapia do pânico. No mesmo sentido, a resposta natural de fuga dos roedores também apresenta perfil farmacológico compatível com aquele dos AP (Blanchard *et al.*, 2003).



No conjunto, os resultados do presente estudo sugerem que os AP estejam atenuados no hipertireoidismo leve ou moderado. Estes resultados são intrigantes uma vez que a administração periférica de doses baixas do hormônio liberador da tireotrofina (TRH), cuja secreção está aumentada no hipotireoidismo, produziu uma atenuação igualmente acentuada dos comportamentos de defesa induzidos pela estimulação da MCPD (Siqueira *et al.*, 2010a). Adicionalmente, em outro estudo, Siqueira e colaboradores (2010b) mostraram que o hipotireoidismo induzido por metimazol causa uma atenuação acentuada dos comportamentos de defesa induzidos pela estimulação da MCPD, a qual persiste por vários dias após a suspensão do tratamento. Estes resultados sugerem tanto uma ação panicolítica do TRH quanto a atenuação dos AP no hipotireoidismo. É importante notar, por outro lado, que estes estudos não abarcam os efeitos do hipertireoidismo e hipotireoidismo severos. Adicionalmente, resta saber se o TRH e os hormônios da tireóide têm ações inibitórias diretas na MCPD.

A atenuação dos comportamentos de defesa tanto no hipotireoidismo quanto no hipertireoidismo sugere o envolvimento de mecanismos distintos, porém, sinérgicos, de sinalização inter e intracelular ao nível da MCPD. Receptores de TRH são amplamente distribuídos no SNC e são encontrados em níveis moderados em toda extensão da MCPD, mas também no núcleo dorsal da rafe e camadas profundas do colículo superior (Mantyh e Hunt, 1985; Manaker *et al.*, 1985). Por outro lado, Mihaly e colaboradores (2001) mostraram que os neurônios TRHérgicos da matéria cinzenta periaquedutal ventrolateral (MCPAvl) enviam eferências para a MCPD, camadas profundas do colículo superior e ao locus ceruleus, regiões que têm sido implicadas na execução dos comportamentos de defesa (Schenberg *et al.*, 2005). Como a estimulação da MCPAvl inibe os neurônios da MCPD (Lovick, 1991),

estes efeitos poderiam ser mediados por projeções serotonérgicas do núcleo dorsal da rafe (Stezhka e Lovick, 1997), ou TRHérgicas da MCPAVl, ou ainda, por projeções indiretas dos núcleos magno e obscuro da rafe (Schenberg e Lovick, 1995) que também apresentam imunorreatividade para peptídeos pró-TRH (Liao *et al.*, 1990).

Conseqüentemente, Siqueira e colaboradores (2010a,b) sugeriram que os neurônios TRHérgicos da MCPAVl e de outras áreas do cérebro poderiam ser modulados pelos níveis circulantes dos hormônios da tireóide, atenuando ou facilitando os AP no hipotireoidismo ou hipertireoidismo, respectivamente. O presente estudo mostra, no entanto, que a lógica da reciprocidade dos efeitos hormonais nem sempre se aplica. De fato, Rondeel e colaboradores (1990) já haviam mostrado que embora o hipertireoidismo induzido por administração de T4 resulte numa redução de 45% do TRH porta-hipofisário, o hipotireoidismo induzido por metimazol que causou uma redução de 80% dos níveis de hormônios da tireóide e um aumento de 20 vezes nos níveis de tireotrofina (TSH), não teve efeito algum sobre a liberação de TRH pelo PVN. Assim, embora os neurônios TRHérgicos da MCPAVl possam exercer a modulação inibitória da MCPD, eles não parecem ser afetados pelo hipertireoidismo.

Na hipófise, o TRH exerce seus efeitos através de receptores de membrana que levam à ativação da adenilciclase e de uma cascata de fosforilação que resulta na produção de TSH. Contudo, o TRH também parece exercer a função de neurotransmissor e neuromodulador no cérebro (Bauer e Whybrow, 2002). Em contraste, os hormônios da tireóide, principalmente o T3, exercem seus efeitos através da interação com receptores de alta afinidade (receptores tiroideanos ou TRs) localizados no núcleo das células-alvo. A interação do T3 com os receptores

nucleares leva à ativação, ou inibição, da expressão gênica. Apesar do amplo consenso sobre a ação transcricional dos hormônios da tireóide, vários efeitos são observados no prazo de minutos, tal como foi observado nos tratamentos agudos do presente estudo, tornando improvável a ação nuclear. Estes dados sugerem que os hormônios da tireóide também possam exercer ações extranucleares, ou não-genômicas que têm tido importância crescente nos últimos anos (Nunes, 2003). Dentre as ações extra-nucleares foram citadas alterações no transporte de solutos pela membrana plasmática ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ , glicose, aminoácidos), alterações na atividade de algumas ATPases ( $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina-ATPase e  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase) e efeitos sobre a atividade de fosfoquinasas protéicas (PKC, PKA, PKM2) (Davis e Davis, 1996). Portanto, apesar de ambos, T3 e TRH, agirem inibindo as respostas de defesa eliciadas pela MCPD, este efeito pode ser mediado por mecanismos bastante diferentes ao nível desta estrutura.

Por outro lado, é importante notar que estudos clínicos e experimentais relacionam a administração de T3 e/ou T4 ao aumento dos níveis de 5HT no cérebro (Gur *et al.*, 1999; Brochet *et al.*, 1985; Sintzel *et al.*, 2004; Bauer *et al.*, 2005; Atterwill, 1981; Bahls, 2004). Evidências experimentais sugerem que o comportamento de defesa da MCPD seja modulado pela serotonina (Graeff, 2004; Deakin e Graeff, 1991). Portanto, os efeitos inibitórios sobre a reação de defesa da MCPD observados neste estudo também podem ter ocorrido pelo aumento da transmissão serotoninérgica nesta estrutura.

Portanto, embora os resultados deste e dos estudos de Siqueira e colaboradores (2010a,b) sejam aparentemente contraditórios, eles fornecem uma base experimental para as informações clínicas igualmente contraditórias sobre a comorbidade do TP e doenças da tireóide.

## REFERÊNCIAS

- APA. 1980, 1994. DSM-III: Diagnostic and Statistical Manual for Mental Disorders of American Psychiatric Association. Third Edition (American Psychiatric Press Washington, DC).
- Aszalós, Z. 2007. Some neurologic and psychiatric complications in endocrine disorders: the thyroid gland. *Orv Hetil.* 148(7):303-10.
- Atterwill, C.K., 1981. Effect of acute and chronic tri-iodothyronine (T3) administration to rats on central 5-HT and dopamine-mediated behavioural responses and related brain Biochemistry. *Neuropharmacology*, 131-144.
- Bahls, Saint-Clair., Carvalho, G.A.C. 2004. The relation between thyroid function and depression: a review. *Rev Bras Psiquiatr.* 26 (1): 41-9.
- Bahls, Saint-Clair., Carvalho, G.A.C., Boeving, A.J. 2007. SSRI antidepressant effects on thyroid hormones *Bras Psiquiatr.* 56(4): 290-295.
- Baldini, I.M., Vita, A., Mauri, M.C., Amodei, V., Carrisi, M., Bravin, S., Cantalamessa, L., 1997. Psychopathological and cognitive features in subclinical hypothyroidism. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 21(6):925-35.
- Balon R, Pohl R, Yeragani VK, Ramesh C, Glitz DA (1991) The changes of thyroid hormone during pharmacological treatment of panic disorder patients. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 15:595-600.
- Bandler, R., Depaulis, A., Vergnes, M., 1985. Identification of midbrain neurones mediating defensive behaviour in the rat by microinjections of excitatory amino acids, *Behav. Brain Res.* 15, 107-119.
- Bauer, M., London, E.D., Rasgon, N., Berman, S.M., Frye, M.A., Altshuler, L.L., Mandelkern, M.A., Bramen, J., Voytek, B., Woods, R., Mazziotta, J.C.,

- Whybrow, P.C., 2005. Supraphysiological doses of levothyroxine alter regional cerebral metabolism and improve mood in bipolar depression. *Molecular Psychiatry*, 10, 456–469.
- Bauer, M., Whybrow, P.C., 2002. Thyroid hormone, brain, and behavior. In: Pfaff, D.W., Arnold, A.P., Etgen, A.M., Fahrbach, S.E., Rubin, R.T. *Hormones, Brain and Behavior*. Academic Press, San Diego. 239–264.
- Bauer, M.S., Whybrow, P.C. 1988. Thyroid hormones and the central nervous system in affective illness: interactions that may have clinical significance. *Integr Psychiatry*;6:75-100.
- Baumgartner, A., Gräf, K.J., Kürten, I., Meinhold, H. 1988. The hypothalamic-pituitary-thyroid axis in psychiatric patients and healthy subjects. *Psychiatry Res*;24:271-332.
- Bell CJ, Malizia AL, Nutt DJ (1999) The neurobiology of social phobia. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 249 Suppl 1:S11-8.:S11-S18.
- Bertoglio, L.J., de Bortoli, V., Zangrossi Jr., H., 2007. Cholecystokinin- 2 receptors modulate freezing and escape behaviors evoked by the electrical stimulation of the rat dorsolateral periaqueductal gray. *Brain Res*. 1156, 133-138.
- Bittencourt, A.S., Carobrez, A.P., Zamprogno, L.P., Tufik, S., Schenberg, L.C. 2004. Organization of single components of defensive behaviors within distinct columns of periaqueductal gray matter of the rat: role of N-methyl-D-aspartic acid glutamate receptors. *J Neuroscience* 125: 71-89.
- Bittencourt, A.S., Nakamura-Palacios, E.M., Mauad, H., Tufik, S., Schenberg, L.C., 2005. Organization of electrically and chemically evoked defensive behaviors within the deeper collicular layers as compared to the periaqueductal gray matter of the rat, *Neuroscience*. 133, 873-892.

- Blanchard, C., Willians, G., Lee, M.C., Blanchard, R., 1981. Taming of wild *Rattus norvegicus* by lesions of the mesencephalic central gray, *Physiol. Psychol.* 9, 157-163.
- Blanchard, D.C., Griebel, G., Blanchard, R.J., 2003. The Mouse Defense Test Battery: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic, *Eur. J. Pharmacol.* 463, pp. 97-116.
- Blok, B.F., Holstege, G. 1998. The central nervous system control of micturition in cats and humans. *Behav Brain Res* 92: 119-125.
- Brochet, D., Martin, P., Soubrie, P., Simon, P. 1985. Effects of triiodothyronine on the 5-hydroxytryptophan-induced head twitch and its potentiation by antidepressants in mice. *Eur J Pharmacol.* 19;112(3):411-4.
- Bruhn, T.O., Rondeel, J.M.M., Bolduc, T.G., Luo, L-G., Jackson, I.M.D. 1996. Induction of thyrotropin-releasing hormone gene expression in cultured fetal diencephalic neurons by differentiating agents. *Endocrinol*;137:572-9.
- Bruno, A.N., Fontella, F.U., Bonan, C.D., Barreto-Chaves, M.L., Dalmaz, C., Sarkis, J.J., 2006. Activation of adenosine A(1) receptors alters behavioral and biochemical parameters in hyperthyroid rats. *Behav Brain Res.* 167(2):287-94.
- Bulant, M., Delfour, A., Vaudry, H., Nicolas, P., 1988. Processing of thyrotropin-releasing hormone prohormone (pro-TRH) generates pro-TRH-connecting peptides. Identification and characterization of prepro-TRH-(160-169) and prepro-TRH-(178-199) in the rat nervous system. *J Biol Chem.* 15;263(32):17189-96.
- Bunevicius, R., Matulevicius, V., 1993. Short-lasting behavioural effects of thyrotropin-releasing hormone in depressed women: results of placebo-controlled study. *Psychoneuroendocrinology.* ;18(5-6):445-9.

- Bunevicius, R., Prange A.J. 2010. Thyroid disease and mental disorders: cause and effect or only comorbidity? *Curr Opin Psychiatry*. 23(4):363-8.
- Burmeister, L. A., Pachucki, J., and St. Germain, D. L.,1997. Thyroid hormones inhibit type 2 iodothyronine deiodinase in the rat cerebral cortex by both pre- and posttranslational mechanisms. *Endocrinology* 138, 5231-5237.
- Canteras, N.S., Goto, M., 1999. Fos-like immunoreactivity in the periaqueductal gray of rats exposed to a natural predator, *NeuroReport* 10, 413-418.
- Carobrez, A.P., Bertoglio, L.J., 2005. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neurosci Biobehav Rev* 29: 1193-1205.
- Carta MG, Hardoy MC, Boi MF, Mariotti S, Carpiniello B, Usai P (2002) Association between panic disorder, major depressive disorder and celiac disease: a possible role of thyroid autoimmunity. *J Psychosom Res* 53:789-793.
- Chiovato L, Marino M, Perugi G, Fiore E, Montanelli L, Lapi P, Cavaliere R, Ciampi M, Patronelli A, Placidi G, Placidi GF, Cassano GB, Pinchera A (1998) Chronic recurrent stress due to panic disorder does not precipitate Graves' disease. *J Endocrinol Invest* 21:758-764.
- Cohen, M.E., White, P.D. 1951. Life situations, emotions and neurocirculatory asthenia: anxiety neurosis, neurasthenia, effort syndrome. *Proceedings Association Res Nervous Mental Disease*. 13: 335-357.
- Collett, D. 2003. *Modelling binary data*. Chapman and Hall/CRC, Florida.
- Constant, E.L., Adam, S., Seron, X., Bruyer, R., Seghers, A., Daumerie, C., 2005. Anxiety and depression, attention, and executive functions in hypothyroidism. *J Int Neuropsychol Soc*. 11(5):535-44.

- Constant, E.L., de Volder, A.G., Ivanoiu, A., Bol, A., Labar, D., Seghers, A., Cosnard, G., Melin, J., Daumerie, C., 2001. Cerebral blood flow and glucose metabolism in hypothyroidism: a positron emission tomography study. *J Clin Endocrinol Metab.* 86(8):3864-70.
- Corrigan MH, Gillette GM, Quade D, Garbutt JC (1992) Panic, suicide, and agitation: independent correlates of the TSH response to TRH in depression. *Biol Psychiatry* 31:984-992.
- Cruz, I.P., Nillni, E.A., 1996. Intracellular sites of prothyrotropin-releasing hormone processing. *J Biol Chem.* Sep 13;271(37):22736-45.
- Danilo, G., Gloger, S., Valdivieso, S., Ivelic, J., Fardella, C. 2004. Mood disorders, psychopharmacology and thyroid hormones. *Rev. Med. Chil*, Nov;132(11):1413-24.
- Davis, P.J., Davis, F.B., 1996. Nongenomic actions of thyroid hormone. *Thyroid* 6(5):497-504.
- Deakin, J.F.W., Graeff, F.G. 1991. 5HT and mechanisms of defence. *J Psychopharmacol* 5:305–15.
- Dean, P., Redgrave, P., Westby, G.W., 1989. Event or emergency? Two response systems in the mammalian superior colliculus, *Trends Neurosci.* 12, 137-147.
- Demet, M.M., Ozmen, B., Deveci, A., Boivada, S., Adiguzel, H., Aydemir, O., 2002. Depression and anxiety in hyperthyroidism. *Arch. Med. Res.* 33, 552-556.
- Depaulis, A., Keay, K.A., Bandler, R., 1992. Longitudinal neuronal organization of defensive reactions in the midbrain periaqueductal gray region of the rat, *Exp. Brain Res.* 90, 307-318.



- Depaulis, A., Keay, K.A., Bandler, R., 1994. Quiescence and hyporeactivity evoked by activation of cell bodies in the ventrolateral midbrain periaqueductal gray of the rat, *Exp. Brain Res.* 99, 75-83.
- Dielenberg, R.A., Hunt, G.E., McGregor, I.S., 2001. "When a rat smells a cat": the distribution of Fos immunoreactivity in rat brain following exposure to a predatory odor, *Neuroscience.* 104, 1085-1097.
- Dijkstra, H., Tilders, F. J. H., Hiehle, M. A., Smelik, P. G. 1992. Hormonal reactions to fighting in rat colonies prolactin rises during defence, not during offence. *Physiology and Behavior* 51, 961-968.
- Drevets, W.C., Videen, T.Q., MacLeod, A.K., Haller, J.W., Raichle, M.E., 1992. PET images of blood flow changes during anxiety: correction. *Science.* 19;256(5064):1696.
- Engum, A., Bjoro, T., Mykletun, A., Dahl, A.A. 2002. An association between depression, anxiety and thyroid function--a clinical fact or an artifact. *Acta Psychiatr Scand.* 06(1):27-34.
- Ennis, M., Behbehani, M.M., Shipley, M.T., Van Bockstaele, E.J., Aston-Jones, G., 1991. Projections from the periaqueductal gray to the rostromedial pericoerulear region and nucleus locus coeruleus: anatomic and physiologic studies, *J. Comp. Neurol.* 306, 480-494.
- Fardella, C., Gloger, S., Figueroa, R., Santis, R., Gajardo, C., Salgado, C., Barroilhet, S., Foradori, A., 2000. High prevalence of thyroid abnormalities in a Chilean psychiatric outpatient population. *J. Endocrinol. Invest.* 23, 102-106.
- File, S.E., Seth, P. 2003. A review of 25 years of the social interaction test. *Eur J Pharmacol.* Feb 28;463(1-3):35-53.

- Fishman, S.C., Sheehan, M.B., Carr, D.B., 1985. Thyroid indices in panic disorder. *J. Clin. Psychiatry* 46, 432-433.
- Fossey, M.D., Lydiard, R.B., Ballenger, J.C., Laraia, M.T., Bissette, G., Nemeroff, C.B. 1993. Cerebrospinal fluid thyrotropin-releasing hormone concentrations in patients with anxiety disorders. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* 5(3):335-7.
- Freud, S. 1895. On the right to separate from neurasthenia a definite symptom-complex as anxiety neurosis (Angstneurose). Em: Freud, *Great Books of the Western world* (MJ Adler editor asociado), *Encyclopedia Britannica*, (1978).
- Friedman, M. J.; Wang, S.; Jalowiec, J. E.; McHugo, G. J. McDonagh-Coyle. 2005. Thyroid hormone alterations among women with posttraumatic stress disorder due to childhood sexual abuse. *Biol. Psychiat.*, 57: 1186-1192.
- Gentil, V., 1988. The aversive System, 5-HT and panic attacks. Em: *Animal Models of Psychiatric Disorders*, editado por Simon, P., Soubrié, P. & Wildlocher, D., pp. 142-145 (Karger, Basel).
- Gersner, R., Gordon-Kiwkowitz, M., Zangen, A. 2009. Automated behavioral analysis of limbs' activity in the forced swim test. *J Neurosci Methods.* 180(1):82-6. Epub 2009 Mar 20.
- Gillette, G.M., Garbutt, J.C., Quade, D.E. 1989. TSH response to TRH in depression with and without panic attacks. *Am J Psychiatry.* 146(6):743-8.
- Gloger S, Fardella C, Santis R, Bitran J (1997) Relevance of the thyroid function assessment in psychiatric patients. *Rev Med Chil* 125:1351-1356.
- Gloger, S., Fardella, C., Gajardo, C., Figueroa, R., Salgado, C., Santis, R., Barroilhet, S. 2001. Panic disorder and hyperthyroidism. Report of 2 cases. *Rev Med Chil.* 129(2):187-90.

- Graeff, F.G. 2004. Review. Serotonin, the periaqueductal gray and panic  
Neuroscience and Biobehavioral Reviews. 28 239–259.
- Graeff, F.G., Garcia-Leal, C., Del-Ben, C.M., Guimarães, F.S. 2005. Does the panic  
attack activate the hypothalamic-pituitary-adrenal axis? *An Acad Bras Cienc* 77:  
477-491.
- Graves, R.J., 1835. Newly observed affection of the thyroid. *London Medical and  
Surgical Journal*. 7:515.
- Guadaño-Ferraz, A., Escámez, M.J., Rausell, E., Bernal, J., 1999. Expression of  
Type 2 Iodothyronine Deiodinase in Hypothyroid Rat Brain Indicates an  
important Role of Thyroid Hormone in the Development of Specific Primary  
Sensory Systems. *The Journal of Neuroscience*. 19(9):3430–3439.
- Gur, E., Lerer, B., Newman, M.E. 1999. Chronic clomipramine and triiodothyronine  
increase serotonin levels in rat frontal cortex in vivo: relationship to serotonin  
autoreceptor activity. *J Pharmacol Exp Ther*. 288(1):81-7.
- Guyton, Arthur C. & Hall, John E. *Textbook of medical physiology* 11<sup>th</sup> edition. 2006.
- Handley, S.L., Mithani, S., 1984. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and  
antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. *Naunyn  
Schmiedebergs Arch Pharmacol* 327: 1-5.
- Harte, S.E., Kender, R.G., Borszcz, G.S., 2005. Activation of 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>7</sub>  
receptors in the parafascicular nucleus suppresses the affective reaction of rats  
to noxious stimulation, *Pain*. 113, 405-415.
- Hatterer, J.A., Herbert, J., Hidaka, C., Roose, S.T., Gorman, J.M., 1993. CSF  
Transthyretin in patients with depression. *Am J Psychiatry*;150:813-5.

- Hofmann PJ, Nutzinger DO, Kotter MR, Herzog G (2001) The hypothalamic-pituitary-thyroid axis in agoraphobia, panic disorder, major depression and normal controls. *J Affect Disord* 66:75-77.
- Hollander, E. et al. 1989a. Cortisol and sodium lactate-induced panic. *Arch. Gen. Psychiatry* 46, 135-140.
- Hollander, E. et al. 1989b. Prolactin and sodium lactate-induced panic. *Psychiatry Res.* 28, 181-191.
- Holsboer,F., 2000. The corticosteroid receptor hypothesis of depression, *Neuropsychopharmacology.* 23, pp. 477-501.
- Jackson, I.M.D., Asamoah, E.O. 1999. Thyroid function in clinical depression: insights and uncertainties. *Thyroid Today*;22(2):1-11.
- Jenck, F., Moreau, J.L., Martin, J.R., 1995. Dorsal periaqueductal gray-induced aversion as a simulation of panic anxiety: elements of face and predictive validity. *Psychiatry Res.* 57, 181—191.
- Karlovic, D., Kozaric-Kovacic, D., Kocijan-Hercigonja, D., 2002. Elevation of serum total triiodotironine in Croatian veterans with combat-related post-traumatic stress disorder. *Milit. Med.*, 167: 846-849.
- Kathol, R. G., and Delahunt, J. W. 1986. The relationship of anxiety and depression to symptoms of hyperthyroidism using operational criteria. *Gen. Hosp. Psychiatry.* 8, 23-28.
- Kent GN, Stuckey BG, Allen JR, Lambert T, Gee V (1999) Postpartum thyroid dysfunction: clinical assessment and relationship to psychiatric affective morbidity. *Clin Endocrinol (Oxf)* 51:429-438.

- Kikuchi, M., Komuro, R., Oka, H., Kidani, T., Hanaoka, A., Koshino, Y. 2005. Relationship between anxiety and thyroid function in patients with panic disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 29(1):77-81.
- Kirkegaard, C., Faber, J. 1991. Free thyroxine and 3,3',5'-triiodothyronine levels in cerebrospinal fluid in patients with endogenous depression. *Acta Endocrinol*;124:166-72.
- Kirkegaard, C., Faber, J. 1998. The role of thyroid hormones in depression. *Eur J Endocrinol*;138:1-9.
- Kirkegaard, C., Korner, A., Faber, J. 1990. Increased production of thyroxine and inappropriately elevated serum thyrotropin levels in endogenous depression. *Biol Psychiatry*;27:472-6.
- Klein, D. 1993. Panic may be a misfiring suffocation alarm. *Psychopharmacology of Panic*. Montgomery, S. A. (ed.), pp. 67-73 (Oxford University Press, New York).
- Klein, D.F. 1964. Delineation of two drug-responsive anxiety syndromes. *Psychopharmacology* 5: 397-408.
- Ladram, A., Bulant, M., Delfour, A., Montagne, J.J., Vaudry, H., Nicolas, P., 1994. Modulation of the biological activity of thyrotropin-releasing hormone by alternate processing of pro-TRH. *Biochimie*. 3-4:320-8. Review.
- Larisch, R., Kley, K., Nikolaus, S., Sitte, W., Franz, M., Hautzel, H., Tress, W., Muller, H.W., 2004. Depression and anxiety in different thyroid function states. *Horm. Metab. Res.* 36, 650—653.
- Larsen, P.R., Davis, T.F., Hay, I.D., 1998. The thyroid gland. In: Wilson, J.D.; Foster, D.W.; Kronenberg, H.M.; Larsen, P.R. (Ed.). *Williams Textbook of Endocrinology*. 9<sup>th</sup> ed. Philadelphia: WB Saunders. p.389-515.

- Larsen, P.R., Ingbar, S.H., 2003. The thyroid gland. In: Wilson, J.D., Foster, D.W. (Eds.), *Williams Textbook of Endocrinology*. W.B. Saunders Company, Philadelphia, pp. 357-487
- Lechan, R.M., Kakucska, I. 1992. Feedback regulation of thyrotropin-releasing hormone gene expression by thyroid hormone in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Ciba Found Symp*; 168: 144-58.
- Lechan, R.M., Toni, R., 2002. Thyroid hormones in neural tissue. In: Pfaff, D.W., Arnold, A.P., Etgen, A.M., Fahrbach, S.E., Rubin, R.T. *Hormones, Brain and Behavior*. Academic Press: San Diego, p.157-238.
- Lee, I.T., Sheu, W.H., Liao, Y.J., Lin, S.Y., Lee, W.J., Lin, C.C., 2003. Relationship of stressful life events, anxiety and depression to hyperthyroidism in an Asian population. *Horm. Res.* 60, 247-251.
- Lesser, I.M., Rubin, R.T., Lydiard, R.B., Swinson, R., Pecknold, J., 1987. Past and current thyroid function in subjects with panic disorder. *J. Clin. Psychiatry* 48, 473-476.
- Levin, A.P., Doran, A.R., Liebowitz, M.R., Fyer, A.J., Gorman, J.M., Klein, D.F., Paul, S.M., 1987. Pituitary adrenocortical unresponsiveness in lactate-induced panic. *Psychiatry Res.* 21: 23-32.
- Levine, E.S., Litto, W.J., Jacobs, B.L., 1990. Activity of cat locus coeruleus noradrenergic neurons during the defense reaction, *Brain Res.* 531, 189-195.
- Liao, N., Bulant, M., Nicolas, P., Vaudry, H., Pelletier, G., 1988. Immunocytochemical distribution of neurons containing a peptide derived from thyrotropin-releasing hormone precursor in the rat brain. *Neurosci. Lett.* 85, 24-28.

- Liao, N., Bulant, M., Nicolas, P., Vaudry, H., Pelletier, G., 1990. Immunoelectron microscopic localization of thyrotropin-releasing hormone (TRH) precursor in the rat raphe nuclei. *Peptides*. 11(2):397-400.
- Liebowitz, M.R., Fyer, A.J., Gorman, J.M., Dillon, D., Appleby, I.L., Levy, G., Anderson, S., Levitt, M., Palij, M., Davies, S.O., 1984. Lactate provocation of panic attacks. I. Clinical and behavioral findings. *Arch Gen Psychiatry*. 41: 764-770.
- Lovick, T.A., 1991. Interactions between descending pathways from the dorsal and ventrolateral periaqueductal gray matter in the rat. In: Depaulis, A., Bandler, R. (Eds.), *The Midbrain Periaqueductal Gray Matter*. Plenum Press, New York, pp. 101-120.
- Luppi, P.H., Aston-Jones, G., Akaoka, H., Chouvet, G., Jouviet, M., 1995. Afferent projections to the rat locus coeruleus demonstrated by retrograde and anterograde tracing with cholera-toxin B subunit and Phaseolus vulgaris leucoagglutinin, *Neuroscience* 65, 119-160.
- Manaker, S., Winokur, A., Rostene, W.H., Rainbows, T.C. 1985. Autoradiographic localization of thyrotropin-releasing hormone receptors in the rat central nervous system. *The Journal of Neuroscience* Vol. 5, p. 167-174.
- Mantyh, P.W., Hunt, S.P. 1985. Thyrotropin releasing hormone (TRH) receptors localization by light microscopic autoradiography in rat brain using [<sup>3</sup>H][3-methyl-<sup>2</sup>TRH] as the radioligand. *The Journal of Neuroscience*. Vol. 5, No. 2, pp. 551-561.
- Martin, J.V., Williams, D.B., Fitzgerald, R.M., H.K., Vonvoigtlander, P.F. 1996. Thyroid hormonal modulation of the binding and activity of the GABA<sub>A</sub> receptor complex of brain. *Neuroscience*, Aug; 73(3):705-13.

- Mason, J., Weizman, R., Laor, N., Wang, S., Schujovitsky, A., Abramovitz, P., Feiler, D., Charney, D., 1996. Serum triiodothyronine elevation in Israeli combat veterans with posttraumatic stress disorder: across-cultural study. *Biol. Psychiat.*, 39: 835-838..
- Mason, J.W.A., 1968. Review of psychoendocrine research on pituitary-thyroid system. *Psychosom. Med.*, 30: 666-681.
- Matuzas W, Al-Sadir J, Uhlenhuth EH, Glass RM (1987) Mitral valve prolapse and thyroid abnormalities in patients with panic attacks. *Am J Psychiatry* 144:493-496.
- Meyer, E.L.S., Márcia S.W., MAIA, A.L. 2007. Expressão das iodotironinas desiodases nas neoplasias tireoideanas. *Arq Bras Endocrinol Metab* vol.51, n.5, pp. 690-700.
- Mihaly, E., Legradi, G., Fekete, C., Lechan, R.M., 2001. Efferent projections of ProTRH neurons in the ventrolateral periaqueductal gray. *Brain Res.* 919, 185-197.
- Morgan, M.M., 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.
- Munjack, D.J., Palmer, R., 1988. Thyroids hormones in panic disorder, panic disorder with agoraphobia, and generalized anxiety disorder. *J. Clin. Psychiatry* 49, 229-231.
- Nashold Jr., B.S., Wilson, W.P., Slaughter, D.G., 1969. Sensations evoked by stimulation in the midbrain of man. *J. Neurosurg.* 30, 14-24.
- Neill, J.D. 1970. Effects of "stress" on serum prolactin and luteinizing hormone levels during the estrous cycle of the rat. *Endocrinology* 87, 1192-1197.



- Nilni, E.A., Lee, A., Legradi, G., Lechan, R.M. 2002. Effect of precipitated morphine withdrawal on post-translational processing of prothyrotropin releasing hormone (proTRH) in the ventrolateral column of the midbrain periaqueductal gray. *J Neurochem.* 80(5):874-84.
- Nilni, E.A., Sevarino, K.A., 1999. The biology of pro-thyrotropinreleasing hormone-derived peptides. *Endocr. Rev.* 20, 599-648.
- Noyes R, Jr., Woodman C, Garvey MJ, Cook BL, Suelzer M, Clancy J, Anderson DJ (1992) Generalized anxiety disorder vs. panic disorder. Distinguishing characteristics and patterns of comorbidity. *J Nerv Ment Dis* 180:369-379.
- Nunes, M.T., 2003. Hormônios Tiroideanos: Mecanismo de Ação e Importância Biológica. Revisão. *Arq Bras Endocrinol Metab* vol 47 n 6.
- Ogawa,N., Yamawaki,Y., Kuroda,H., Ofuji,T., Itoga,E., Kito,S., 1981. Discrete regional distributions of thyrotropin releasing hormone (TRH) receptor binding in monkey central nervous system, *Brain Res.* 205, 169-174.
- Oppenheimer, J. H., Schwartz, H. L., and Surks, M. I., 1974. Tissue differences in the concentration of triiodothyronine nuclear binding sites in the rat: Liver, kidney, pituitary, heart, brain, spleen, and testis. *Endocrinology (Baltimore)* 95,897-903.
- Paxinos, G., Watson, C., 1998. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, San Diego.
- Pedersen CA (1999) Postpartum mood and anxiety disorders: a guide for the nonpsychiatric clinician with an aside on thyroid associations with postpartum mood. *Thyroid* 9:691-697.
- Pekary, A.E., Sattin, A. 2001. Regulation of TRH and TRH-related peptides in rat brain by thyroid and steroid hormones. *Peptides.* 22(7):1161-73.

- Pekary, A.E., Stevens, S.A., Sattin, A., 2006. Rapid modulation of TRH and TRH-like peptide levels in rat brain and peripheral tissues by corticosterone. *Neurochem Int.* 48(3):208-17.
- Perello, M., Friedman, T., Paez-Espinosa, V., Shen, X., Stuart, R.C., Nillni, E.A. 2006. Thyroid hormones selectively regulate the posttranslational processing of prothyrotropin-releasing hormone in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Endocrinology*; 147: 2705-16.
- Pitts, F.N., McClure, J.N., 1967. Lactate metabolism in anxiety neurosis. *New Engl J Med.* 277: 1329-1336.
- Placidi, G.P., Boldrini, M., Patronelli, A., Fiore, E., Chiovato, L., Perugi, G., Marazziti, D. 1998. Prevalence of psychiatric disorders in thyroid diseased patients. *Neuropsychobiology.* 38(4):222-5.
- Raj A, Sheehan DV (1987) Medical evaluation of panic attacks. *J Clin Psychiatry* 48:309-313.
- Redei, E.E., Solberg, L.C., Kluczynski, J.M., Pare, W.P., 2001. Paradoxical hormonal and behavioral responses to hypothyroid and hyperthyroid states in the Wistar-Kyoto rat. *Neuropsychopharmacology*, Jun;24(6):632-9.
- Reiman, E.M., Raichle, M.E., Robins, E., Mintun, M.A., Fusselman, M.J., Fox, P.T., Price, J.L., Hackman, K.A. 1989. Neuroanatomical correlates of a lactate-induced anxiety attack. *Arch Gen Psych* 46, 493-500.
- Reis-Lunardelli, E.A., Castro, C.C., Bavaresco, C., Coitinho, A.S., Trindade, L.S.S., Perrenoud, M.F., Roesler, R., Sarkis, J.J.F., Wyse, A.T.S., Izquierdo, I., 2007b. Effects of Thyroid Hormones on Memory and on Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase Activity in Rat Brain. *Current Neurovascular Research*, 4, 184-193.

- Reis-Lunardelli, E.A., Ramirez, M.R., Castro, C.C., Coitinho, A.S., Bavaresco, C., Trindade, L.S., Perrenoud, M.F., Wyse, A.T.S., Sarkis, J.J.F., Izquierdo, I. 2007a. Effects of an Acute Treatment with L- thyroxine on Memory, Habituation, Danger Avoidance, and on Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity in Rat Brain. *Current Neurovascular Research*, 4, 259-267.
- Rogers MP, White K, Warshaw MG, Yonkers KA, Rodriguez-Villa F, Chang G, Keller MB (1994) Prevalence of medical illness in patients with anxiety disorders. *Int J Psychiatry Med* 24:83-96.
- Romaldini, J.H., Sgarbi, J.A., Farah, C.S., 2004. Disfunções Mínimas da Tiróide: Hipotireoidismo Subclínico e Hipertireoidismo Subclínico. *Arq Bras Endocrinol Metab*. Vol. 48, n.1.
- Rondeel, J.M., de Greef, W.J., Visser, T.J. 1990. Effect of thyroid status on release of hypothalamic thyrotropin-releasing hormone. *Horm Metab Res Suppl*. 23:1-4.
- Rondeel, J.M., de Greef, W.J., van der, S.P., Karels, B., Klootwijk, W., Visser, T.J., 1988. Effect of thyroid status and paraventricular area lesions on the release of thyrotropin-releasing hormone and catecholamines into hypophysial portal blood, *Endocrinology*. 123, 523-527.
- Sait Go'nen, M., Kisakol, G., Cilli, A.S., Dikbas, O., Gungor, K., Inal, A., Kaya, A., 2004. Assessment of anxiety in subclinical thyroid disorders. *Endocr. J.* 51, 311-315.
- Sala-Roca, J., Martí-Carbonell, M.A., Garau, A., Darbra, S., Balada, F. 2002. Effects of chronic dysthyroidism on activity and exploration. *Physiol Behav*. Sep; 77(1):125-33.

- Sams-Dodd, F. 1994. Automation of the social interaction test by a video-tracking system: behavioural effects of repeated phencyclidine treatment. *Journal of Neuroscience Methods* 59 (1995) 157-167.
- Sandkuhler, J., Herdegen, T., 1995. Distinct patterns of activated neurons throughout the rat midbrain periaqueductal gray induced by chemical stimulation within its subdivisions, *J. Comp Neurol.* 357, 546-553.
- Scanlon, M.F., Hall, R., 1995. Thyrotropin-Releasing Hormone: basic and clinical aspects. In: DeGroot, LJ et al. *Endocrinology*. 3 ed. Philadelphia, PA: W. B. Saunders. p.192-207.
- Schenberg, L.C., Bittencourt, A.S., Sudré, E.C., Vargas, L.C. 2001. Modeling panic attacks. *Neurosci Biobehav Rev* 25: 647-659.
- Schenberg, L.C., De Aguiar, J.C., Graeff, F.G. 1983. GABA modulation of the defense reaction induced by brain electrical stimulation. *Physiol Behav* 31: 429-437.
- Schenberg, L.C., Lovick, T.A., 1995. Attenuation of the midbrain-evoked defense reaction by selective stimulation of medullary raphe neurons in rats. *Am. J. Physiol.* 269, R1378-R1389.
- Schenberg, L.C., Póvoa, R.M.F., Costa, A.L.P., Caldellas, A.V., Tufik, S., Bittencourt, A.S. 2005. Functional specializations within the tectum defense systems of the rat *Neurosci Biobehav Rev* 29: 1279-1298.
- Siegel, R.A., Conforti, N., Chowers, I., 1980. Neural pathways mediating the prolactin secretory response to acute neurogenic stress in the male rat. *Brain Res.* 198:43-53.

- Silverman, D.H.S., Lombardi, C.A., Lu, C.S., Whybrow, P.C., Czernin, J., Phelps, M.E., Bauer, M., 2001. Effect of thyroid disease on brain metabolism in patients with dementia symptoms. *Nucl. Med.* 42, suppl; 225p.
- Simon, N.M., Blacker, D., Korbly, N.B., Sharma, S.G., Worthington, J.J., Otto, M.W., Pollack, M.H., 2002. Hypothyroidism and hiperthyroidism in anxiety disorders revisited: new data and literature review. *J. Affect. Dis.* 69, 209-217.
- Sintzel, F., Mallaret, M., Bougerol, T. 2004. Potentializing of tricyclics and serotoninergics by thyroid hormones in resistant depressive disorders. *Encephale* 30(3):267-75.
- Siqueira, C.C., Rossoni, R.R., Schenberg, L.C. 2010a. Dorsal periaqueductal gray matter-evoked panic-like behaviors are markedly inhibited by a low peripheral dose of thyrotropin releasing hormone. *Psychoneuroendocrinology.* 35(2):262-71.
- Siqueira, C.C., Rossoni, R.R., Tiengo, A.N., Tufik ,S., Schenberg, L.C. 2010b. Methimazole-induced hypothyroidism inhibits the panic-like behaviors produced by electrical stimulation of dorsal periaqueductal gray matter of rats. *Psychoneuroendocrinology.* 35(5):706-16.
- Smith, C.D., and Ain, K.B. 1995. Brain metabolism in hypothyroidism studied with 31p magnetic-resonance spectroscopy. *Lancet* 345,619-620.
- Stein MB, Uhde TW (1988) Routine screening of thyroid indices in patients with panic attacks. *J Clin Psychiatry* 49:204-205.
- Stein MB, Uhde TW (1989) Autoimmune thyroiditis and panic disorder. *Am J Psychiatry* 146:259-260.
- Stein, M.B., Uhde, T.W. 1988. Thyroid indices in panic disorder. *Am J Psychiatry.* 145(6):745-7.

- Stein, M.B., Uhde, T.W., 1991. Endocrine, cardiovascular, and behavioral effects of intravenous protirelin in patients with panic disorder, *Arch. Gen. Psychiatry* 48, 148-156.
- Stezhka, V.V., Lovick, T.A., 1997. Projections from dorsal raphe nucleus to the periaqueductal grey matter: studies in slices of rat midbrain maintained in vitro. *Neurosci Lett.* 11;230(1):57-60.
- Szuba, M.P., Amsterdam, J.D., Fernando, A.T., Gary, K.A., Whybrow, P.C., Winokur, A., 2005. Rapid antidepressant response after nocturnal TRH administration in patients with bipolar type I and bipolar type II major depression. *J Clin Psychopharmacol.* 25(4):325-30.
- Trzepacz, P.T., McCue, M., Klein, I., Levey, G.S., Greenhouse, J. 1988. A psychiatric and neuropsychological study of patients with untreated Graves' disease. *Gen. Hosp. Psychiatry* 10, 49-55.
- Tsuruo, Y., Hökfelt, T., Visser, T. 1987. Thyrotropin releasing hormone (TRH)-immunoreactive cell groups in the rat central nervous system. *Exp Brain Res.*;68(1):213-7.
- Valentino, R.J., Kosboth, M., Colflesh, M., Miselis, R.R., 2000. Transneuronal labeling from the rat distal colon: anatomic evidence for regulation of distal colon function by a pontine corticotropin-releasing factor system, *J. Comp. Neurol.* 417, 399-414.
- Van den Berg, H., Dagnelie, P.C., Van Staveren, W.A. 1988. Vitamin B-12 and seaweed. *Lancet* 30,i: 242-243.
- Van Doorn, J., Roelfsema, F., van der Heide, D., 1985. Concentrations of thyroxine and 3,5,3'-triiodothyronine at 34 different sites in euthyroid rats as determined by an isotopic equilibrium technique. *Endocrinology.* 117(3):1201-8.

- Vargas, L.C., Marques, T.A., Schenberg, L.C., 2000. Micturition and defensive behaviors are controlled by distinct neural networks within the dorsal periaqueductal gray and deep gray layer of the superior colliculus of the rat. *Neurosci Lett.* Feb 11;280(1):45-8.
- Vargas, L.C., Schenberg, L.C. 2001. Long-term effects of clomipramine and fluoxetine on dorsal periaqueductal grey-evoked innate defensive behaviours of the rat. *Psychopharmacology.* 155: 260-268.
- Vieweg, W.V., Julius, D.A., Fernandez, A., Beatty-Brooks, M., Hettema, J.M., Pandurangi, A.K., 2006. Posttraumatic stress disorder: clinical features, pathophysiology, and treatment. *Am J Med.* 119(5):383-90.
- Wang, S.; Mason, J. 1999. Elevations of serum T3 levels and their association symptoms in World War II veterans with combat-related posttraumatic stress disorder: Replication of findings in Vietnam combat veterans. *Psychosom. Med.*, 61. 131-138.
- Wekking, E.M., Appelhof, B.C., Fliers, E., Schene, A.H., Huyser, J., Tijssen, J.G., Wiersinga, W.M., 2005. Cognitive functioning and well-being in euthyroid patients on thyroxine replacement therapy for primary hypothyroidism. *Eur J Endocrinol.* 153(6):747-53.
- Whybrow, E. C., 1995. Sex differences in thyroid axis function: Relevance to affective disorder and its treatment. *Depression.* 3, 33-42.
- Whybrow, P.C., and Bauer, M., 2000b. Behavioral and psychiatric aspects of hypothyroidism. In "Werner & Ingbar's The Thyroid: A Fundamental and Clinical Text" (L. E. Braverman and R. D. Utiger, eds.), 8th ed., pp. 837-842. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.

- Whybrow, P.C., Prange, A.J., Treadway, C.R. 1969. Mental changes accompanying thyroid gland dysfunction. *Arch Gen Psychiatry* 20:48–63.
- Woods, S. W., Charney, D. S., Goodman, W. K., Henninger, G. R. 1987b. Carbon dioxide-induced anxiety: behavioral, physiologic and biochemical effects of carbon dioxide in patients with panic disorder and healthy subjects. *Arch. Gen. Psychiat.* 45, 43-52.
- Woods, S. W., Charney, D. S., McPherson, C. A., Gradman, A. H. Heninger, G. R. 1987a. Situational panic attacks. Behavioral, physiologic, and biochemical characterization. *Arch. Gen. Psychiatry.* 44, 365-375.
- Yang, H., Yuan, P., Wu, V., Tache, Y., 1999. Feedback regulation of thyrotropinreleasing hormone gene expression by thyroid hormone in the caudal raphe nuclei in rats, *Endocrinology.* 140, 43-49.
- Yeragani, V.K., Rainey, J.M., Pohl, R., Ortiz, A., Weinberg, P., Gershon, S., 1987. Thyroid hormone levels in panic disorder. *Can J Psychiatry.* Aug;32(6):467-9.