

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ESTER MAYUMI NINOMIYA

EFEITOS DE DROGAS GLICOCORTICÓIDES E MINERALOCORTICÓIDES EM
UM MODELO ANIMAL DE TRANSTORNO DE ESTRESSE PÓS-TRAUMÁTICO

CURITIBA

2009

ESTER MAYUMI NINOMIYA

EFEITOS DE DROGAS GLICOCORTICÓIDES E MINERALOCORTICÓIDES EM
UM MODELO ANIMAL DE TRANSTORNO DE ESTRESSE PÓS-TRAUMÁTICO

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Farmacologia, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador:

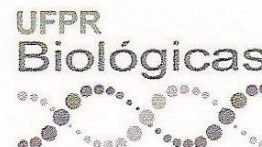
Prof. Dr. Roberto Andreatini

CURITIBA

2009



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em
Farmacologia



PARECER

A Comissão Examinadora de Dissertação de Mestrado "EFEITOS DE DROGAS GLICOCORTICÓIDES E MINERALOCORTICÓIDES EM UM MODELO ANIMAL DE TRANSTORNO DE ESTRESSE PÓS-TRAUMÁTICO" de autoria da pós-graduanda **ESTER MAYUMI NINOMIYA**, sob a orientação do Prof. Dr. Roberto Andreatini e composta pelos professores Prof. Dr. Silvio Marques Zanata (Dep. Patologia Básica - UFPR) e Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida Barbato Frazão Vital (Dep. Farmacologia - UFPR).

De acordo com o Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, a Pós-Graduanda foi A PROVADA. Para a devida publicação o trabalho deve sofrer as modificações sugeridas, que serão conferidas pela sua orientadora. Em Curitiba, 25 de março de 2009.

Prof. Dr. Roberto Andreatini
Presidente - Orientador - UFPR

Prof. Dr. Silvio Marques Zanata
Departamento de Patologia Básica - UFPR

Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida Barbato Frazão Vital
Departamento de Farmacologia - UFPR

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo amor e apoio.

À meu orientador, Prof. Dr. Roberto Andreatini, pela orientação durante todo este período.

À Prof. Dra. Edith Fanta, Prof. Dr. Silvio Zanata e Dra. Maria Marx, meus orientadores durante a graduação, que me ajudaram a chegar até aqui.

À Irinéia Baretta e Pamela Sabioni pela amizade e apoio. À Bruno Martynhack e Marcella Pereira pela amizade e ajuda nos experimentos.

Aos colegas de mestrado e doutorado pelos momentos de descontração.

Aos professores e funcionários do departamento de Farmacologia pela ajuda.

Aos funcionários do biotério do setor de Ciências Biológicas da UFPR.

Aos amigos.

Aos ratos, sem eles este trabalho não seria possível.

A todos que de alguma maneira tiveram alguma participação neste trabalho.

À CNPq pelo auxílio financeiro.

Muito obrigada!

You live you learn
You love you learn
You cry you learn
You lose you learn
You laugh you learn
You choose you learn
You ask you learn
You live you learn

A.M.

Nota Explicativa:

Dissertação apresentada em formato alternativo – artigo para publicação – conforme aceito pelas normas do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Paraná.

Constando de um artigo abordando os experimentos realizados e a discussão dos resultados. Este foi formatado conforme as normas propostas pela revista escolhida.

SUMÁRIO

Lista de Figuras e Tabelas	8
Resumo	9
1. Introdução	10
1.1 Transtorno de estresse pós-traumático (TEPT)	10
1.2 Modelos animais de TEPT	14
1.3 Memória e glicocorticóides	15
2. Objetivos	18
2.1 Objetivo geral	18
2.2 Objetivos específicos	18
3. Artigo: Effects of glucocorticoids and mineralocorticoids drugs in an animal model of post traumatic stress disorder	19
4. Conclusão	39
5. Referências Bibliográficas adicionais	40
6. Anexo	41
6.1 Experimento complementar: Doses elevadas de dexametasona previamente ao treinamento do medo condicionado	41

Lista de figuras e tabelas

Introdução

Tabela 1: Características centrais do TEPT de acordo com o DSMV - IV.....	12
---	----

Artigo

Figura 1: Effect of propranolol (10 mg/kg, s.c.) on freezing time of rats in contextual conditioned fear.....	26
Figura 2: Effect of dexamethasone (1 and 5 mg/kg, i.p.) on freezing time of rats in contextual conditioned fear.....	27
Figura 3: Effect of mifepristone (10 mg/kg, s.c.) on freezing time of rats in contextual conditioned fear.....	28
Figura 4: Effect of spironolactone (10 mg/kg, s.c.) before each test session on freezing time in contextual conditioned fear	29
Figura 5: Effect of spironolactone (10 mg/kg, s.c.) after test sessions on freezing time in contextual conditioned fear.....	30

Experimento complementar

Figura 1: Efeito da administração de dexametasona (5 e 10 mg/kg, i.p.) antes do condicionamento no tempo de imobilidade no medo condicionado contextual.....	42
--	----

Resumo

Pacientes com transtorno de estresse pós-traumático (TEPT) apresentam uma hiper memorização (ou uma dificuldade na extinção da memória) e déficits de memória. Foi demonstrado que os glicocorticóides desempenham um papel na memória, o que pode contribuir para mudanças na memória no TEPT. Já que o cortisol pode agir através os receptores mineralocorticóides ou glicocorticóides (MR e GR respectivamente), o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito de antagonistas MR (espironolactona) ou GR (mifepristona) e de agonista GR (dexametasona) na extinção do medo contextual condicionado, um modelo animal para o estudo do TEPT. Neste modelo, na sessão treino, ocorre um pareamento entre um estímulo aversivo (choque nas patas) e o contexto (caixa de choque). Nas sessões teste (24, 48 e 72 horas após a sessão treino), os animais são recolocados na caixa, sem o estímulo aversivo. Os animais exibem um comportamento de imobilidade que diminui com a subsequente re-exposição (extinção). O propranolol foi utilizado como um controle positivo. Os resultados mostraram que a espironolactona aumentou a extinção de uma memória aversiva, quando administrada antes da sessão teste, mas não após, indicando um efeito na evocação da memória aversiva. A dexametasona e mifepristona não tiveram efeito na extinção de uma memória de medo. O propranolol aplicado antes de cada sessão teste aumentou a extinção, indicando a validade do procedimento. Estes resultados indicam que os antagonistas MR podem ser uma opção no tratamento do TEPT.

Palavras-chave: memória aversiva, medo condicionado ao contexto, receptor glicocorticóide, receptor mineralocorticóide, TEPT.

1. Introdução

1.1 Transtorno de estresse pós-traumático (TEPT)

Transtorno de estresse pós-traumático (TEPT) é uma desordem de ansiedade precipitada por um evento traumático. Uma condição semelhante ao TEPT foi descrita em um estudo de 1871 com veteranos da guerra civil americana (Vieweg, 2006). Porém o termo TEPT e seu diagnóstico foram primeiramente citados apenas em 1980, na 3ª edição do manual Estatístico e Diagnóstico de Transtornos Mentais (DSM III), sendo classificada como uma desordem de ansiedade. Esta classificação permanece na DSM IV, embora tenha ocorrido uma nova definição de trauma, sendo considerado então evento traumático como todo aquele que envolve ameaça de morte ou sério dano ou ameaça à integridade física do indivíduo ou de outras pessoas (APA, 1994).

Vale a pena salientar que nem todos os indivíduos expostos a um evento traumático vêm a desenvolver o TEPT. Alguns fatores que podem ter um peso no desenvolvimento desta patologia são: como este trauma é percebido pelo indivíduo, se houve traumas anteriores e história de desordens psiquiátricas na família, especialmente a depressão (Hageman, 2001). Estudos epidemiológicos sobre o TEPT sugerem que adversidades na infância, como abuso físico ou psicológico, é um fator de risco para tal desordem (Imanaka *et al.*, 2006). Estudos realizados com roedores também demonstraram que adversidades no início do desenvolvimento, como isolamento neonatal, separação materna ou descuido materno, está associado com a vulnerabilidade ao estresse na adolescência e idade adulta (Imanaka *et al.*, 2006).

Em um estudo realizado por Imanaka e colaboradores (2006) foram avaliados os efeitos que o isolamento neonatal tem sobre diversos comportamentos semelhantes ao TEPT em ratos adultos expostos ao estresse prolongado único, um modelo animal de TEPT. Repetidos isolamentos neonatais aumentam o comportamento ansioso no labirinto em T assim como a imobilidade contextual em ratos expostos ao modelo de TEPT utilizado.

Ultimamente diversos trabalhos vêm sendo realizados a fim de determinar se existem genes envolvidos na predisposição de um indivíduo desenvolver tal patologia. Porém tendo em vista a complexidade desta desordem há uma grande

dificuldade em encontrar genes específicos que contribuam no desenvolvimento do TEPT. Estudos nesta área têm focado em genes do sistema serotoninérgico, dopaminérgico, de glicocorticóides, GABA, APO (apolipoproteína), NPY (neuropeptídeo Y) e BDNF (fator neurotrófico derivado do encéfalo) (Broekman *et al.*, 2007).

Os principais sinais do TEPT podem ser divididos em três grupos: a revivescência do evento traumático através de memórias intrusivas, flashbacks ou sonhos; esquiva de estímulos que lembram o trauma/ entorpecimento emocional; e hiperestimulação autonômica (hipervigilância, insônia, irritabilidade, sobressalto excessivo entre outros sinais) (Tabela 1). Estes sintomas devem durar mais de um mês após o trauma e ser severos o suficiente para interferir em importantes áreas da vida do indivíduo, como em aspectos sociais e ocupacionais. O TEPT é considerado crônico caso os sintomas persistam por três meses ou mais (Vieweg, 2006; APA, 1994).

Com relação à memória do paciente com TEPT, muitas vezes observa-se um quadro contraditório: ao mesmo tempo em que apresenta um aumento da consolidação e da evocação de detalhes do evento traumático, o paciente também pode apresentar amnésia com relação ao trauma ou a eventos anteriores ou posteriores a ele (Van Praag, 2004).

Esta patologia, juntamente com as fobias, é a desordem de ansiedade mais comum (De Quervain e Margraf, 2008). Estas desordens têm um grande impacto no bem-estar do paciente e na saúde pública, tendo em vista sua alta prevalência – em torno de 8% durante a vida (Vieweg, 2006) – sua cronicidade e debilitação (De Quervain e Margraf, 2008).

Alguns estudos populacionais apontam para uma maior prevalência de TEPT em mulheres quando comparado com os homens. Na pesquisa nacional de comorbidade a prevalência encontrada de TEPT foi de 7,8%, porém mulheres apresentavam duas vezes mais chances de ter sofrido desta patologia: 10,4% vs 5,0% (Nemeroff *et al.*, 2006). Entretanto, os mecanismos para esta diferença entre os sexos permanecem incertos, eles podem envolver diferenças do tipo de trauma sofrido e respostas a este trauma.

TABELA 1- CARACTERÍSTICAS CENTRAIS DO TEPT DE ACORDO COM O DSMV – IV (1994)

Tríade Sintomática apresentada pelos pacientes com TEPT		
Revivescência do trauma	Esquiva/ entorpecimento emocional	Hiperestimulação autonômica
Lembranças intrusivas	Esforço para evitar pensamentos e sentimentos relacionados ao trauma	Insônia
Pesadelos traumáticos	Esforço para evitar atividades, locais ou pessoas associadas com o trauma	Irritabilidade
Flashbacks dissociativos	Redução do interesse nas atividades	Dificuldade em concentrar-se
Sofrimento psíquico evocado por estímulos relacionados ao trauma	Sensação de distanciamento em relação a outras pessoas	Hipervigilância
Reatividade fisiológica evocada por estímulos relacionados ao trauma	Restrição da expressão afetiva	Resposta de sobressalto exagerada
	Sentimento de um futuro abreviado	

Fonte: Adaptado de Figueira e Mendlowicz, 2003.

Em um trabalho realizado por Louvart e colaboradores (2006) foram estudadas as diferenças comportamentais e fisiológicas de ratos machos e fêmeas expostos a um modelo de estresse pós-traumático de lembretes situacionais (“*situational reminders*”). Este modelo induziu mudanças duradouras no comportamento e neuroendocrinologia em ratos. Alterações centrais no eixo HPA foram observadas tanto em ratos macho quanto nas fêmeas, porém alterações periféricas duradouras do eixo HPA foram observadas apenas em fêmeas. As fêmeas apresentaram um aumento do *feedback* negativo do eixo HPA a resposta ao estresse. Ratos de ambos os sexos apresentaram retenção do evento traumático, porém demonstraram diferentes respostas comportamentais ao contexto aversivo.

Existe uma coexistência de outros distúrbios psiquiátricos com o TEPT. As patologias co-mórbidas mais freqüentes são os transtornos de humor, principalmente a depressão, os transtornos de ansiedade, como por exemplo o transtorno obsessivo-compulsivo, transtornos dissociativos e transtornos de personalidade (Filho e Sougey, 2001). Somado a estes distúrbios é comum observar também o abuso de substâncias psicoativas.

O estresse pós-traumático envolve diversos sistemas neurais. Segundo Nemeroff e colaboradores (2006) tal desordem deve provavelmente envolver interações entre o tálamo, hipocampo (que está envolvido na memória de curto prazo e provavelmente no medo contextual), amígdala (que está envolvida nas respostas de medo condicionado), cíngulo posterior, córtex motor e parietal (que estão envolvidos no processamento visuo-espacial) e o córtex medial pré-frontal (que se acredita extinguir respostas subcorticais mais primitivas).

Alguns trabalhos apontam para um distúrbio no sistema nervoso autônomo e no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (eixo HPA) em pacientes com tal desordem (Kohda *et al.*, 2007). Com relação aos distúrbios no eixo HPA, alguns estudos mostram que pacientes com TEPT apresentam nível aumentado do hormônio liberador de corticotrofina (CRH), maior supressão de cortisol com dexametasona, aumento de receptores a glicocorticóides em linfócitos e resposta aumentada de cortisol a estressores (Bremner *et al.*, 2004).

Alguns estudos de neuroimagem em pacientes com TEPT mostram um volume reduzido do hipocampo (Gilbertson *et al.*, 2007). Porém existem resultados negativos nesta área. Embora os trabalhos com atrofia hipocampal e TEPT não sejam consistentes esta parece ter um papel na patofisiologia desta desordem. Embora ainda não tenha sido claramente determinado se o menor volume hipocampal é uma condição pré-existente ao TEPT ou uma consequência desta patologia (Sala *et al.*, 2004), em um estudo realizado por Gilbertson e colaboradores (2007) com gêmeos monozigóticos em que apenas um deles desenvolveu TEPT, foi constatada uma diminuição no volume hipocampal, independente da presença do transtorno.

A terapêutica do estresse pós-traumático inclui o tratamento de sinais e sintomas da desordem e de comorbidades. Os tratamentos farmacológicos utilizados atualmente incluem antidepressivos, principalmente os inibidores da recaptação da serotonina, ansiolíticos, como os benzodiazepínicos, e drogas estabilizadoras do humor (Vieweg, 2006).

Alguns estudos clínicos utilizaram o propranolol no tratamento deste transtorno (Pitman *et al.*, 2002; Vaiva *et al.*, 2003). Após um evento estressante adrenalina e noradrenalina são liberadas no organismo. Existem evidências que mostram que o sistema adrenérgico desempenha um papel na memória, agindo sobre a consolidação de uma memória aversiva (Berlau e Mc Gaugh, 2006).

Acredita-se que um estado prolongado de ativação do sistema adrenérgico aumentaria o risco para o TEPT, através de um aumento da consolidação da memória relacionada ao trauma (Vaiva *et al.*, 2003). Portanto a administração de propranolol, um antagonista β adrenérgico, após um evento traumático poderia apresentar um efeito preventivo no desenvolvimento desta patologia. Nestes estudos o tratamento com o propranolol apresentou resultados bastante interessantes (Pitman *et al.*, 2002; Vaiva *et al.*, 2003).

1.2 Modelos animais de TEPT

Modelos animais são ferramentas bastante úteis para estudar os mecanismos moleculares e a patofisiologia de desordens psiquiátricas, além de auxiliar no desenvolvimento de novos tratamentos farmacológicos.

No caso do TEPT existem alguns modelos animais que já foram propostos, sendo que o condicionamento de medo Pavloviano fornece um dos melhores modelos em roedores de desordens de ansiedade, incluindo o TEPT (Cai *et al.*, 2006). Neste paradigma de medo condicionado, um estímulo condicionado, por exemplo, um contexto (no nosso caso uma caixa de esquivas inibitória), é pareado com um estímulo incondicionado, um choque, por exemplo. Quando o animal é novamente exposto ao contexto (estímulo condicionado) o animal exibe respostas de medo condicionado, como a imobilidade (Pamplona *et al.*, 2006).

Alguns estudos indicam que a memória de medo contextual formada em ratos durante um choque de alta intensidade pode ser qualitativamente e quantitativamente semelhante à memória traumática em TEPT (Abrari *et al.*, 2007), pois existem diversas similaridades na expressão de medo em pacientes que sofrem de distúrbios de ansiedade, como o TEPT e a fobia, e a expressão de medo condicionado em animais (Pamplona *et al.*, 2006).

Um outro modelo animal de TEPT foi proposto por Pynoos e colaboradores (1996). Este modelo consiste em expor repetidamente o animal a lembretes situacionais do evento traumático, neste caso um choque nas patas. Estes lembretes situacionais visavam replicar a situação que ocorre em humanos, na qual o paciente é freqüentemente confrontado com lembranças do trauma, mas não ao evento traumático. Após a exposição do animal ao lembrete situacional (caixa iluminada,

durante 1 minuto por semana, por seis semanas) foram testadas a atividade exploratória dos animais em um ambiente neutro, a atividade exploratória em um labirinto em cruz elevado e a resposta a um estímulo auditivo. Estes testes tinham como objetivo avaliar as manifestações comportamentais da ansiedade e hiperestimulação, ambos sinais observados em pacientes com TEPT. Animais que receberam o choque e foram expostos aos lembretes situacionais apresentaram inicialmente um aumento na locomoção e um aumento de magnitude do reflexo ao estímulo sonoro.

O modelo animal para o estudo do TEPT proposto por Khoda e colaboradores (2007) consiste em expor o animal a um estresse prolongado único. Este estresse consiste de duas horas de imobilização, seguido por 20 minutos de natação e anestesia por éter como descrito por Liberzon e colaboradores. Após a exposição dos animais ao estresse prolongado único foi investigada a atividade do eixo HPA destes animais (teste de supressão pela dexametasona e dosagem de corticosterona plasmática) e respostas a certos testes comportamentais (resposta a estímulo acústico, labirinto aquático de Morris, condicionamento de medo contextual, teste de discriminação de medo e teste “*flinch jump*”). Animais que tinham sido expostos ao estresse prolongado único apresentaram um aumento da inibição da atividade do eixo HPA, uma característica observada em pacientes com TEPT. Após o estresse prolongado único também foi observado um aumento da resposta a um estímulo acústico, uma piora na memória espacial no labirinto aquático de Morris e aumento na memória de medo contextual. No geral, o estresse prolongado provocou mudanças comportamentais similares às descritas no TEPT.

1.3 Memória e glicocorticóides

Glicocorticóides são hormônios esteroidais sintetizados pelo córtex das glândulas adrenais. Sua liberação no organismo segue um ritmo circadiano. A ativação do eixo HPA ocorre através de mudanças na homeostase do organismo e também através de perturbações no ambiente externo, como dor, aversão a predadores e condicionamento de medo (Herman *et al.*, 2005).

Durante um evento estressante o eixo HPA é estimulado e ocorre a liberação de glicocorticóides no organismo. Neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo

integram informações relevantes ao estresse; uma vez estimulados estes neurônios liberam o hormônio liberador de corticotrofina (CRH), que por sua vez estimula a síntese e liberação de adenocorticotrofina (ACTH) pela hipófise. O ACTH então estimula a síntese e liberação de corticosteróides pela adrenal (Buckingham, 2006).

Entre os corticosteróides sintetizados pela adrenal encontram-se os glicocorticóides, cortisol nos seres humanos, em pequenas quantidades corticosterona também, e corticosterona nos ratos. O glicocorticóide é capaz de afetar a memória ao agir sobre diferentes regiões do cérebro, especialmente em estruturas do sistema límbico.

Os glicocorticóides se ligam a receptores nucleares: receptores mineralocorticóides (tipo I ou MR) e glicocorticóides (tipo II ou GR). No cérebro o receptor MR é capaz de ligar com alta afinidade os glicocorticóides naturais além de ligar a aldosterona e progesterona. Sua localização é predominante em estruturas límbicas, notavelmente no hipocampo, amígdala e córtex pré-frontal (De Kloet, 2008). O receptor GR é muito expresso em diversas regiões do cérebro (Herman *et al.*, 2005) e é capaz de se ligar a glicocorticóides naturais e sintéticos (De Kloet, 2008).

A ação da corticosterona no cérebro é principalmente genômica, com ação de 15 a 30 minutos após ativação, podendo durar de 1 hora a dias. Após a ligação do ligante ao receptor há a formação de dímeros. Estes dímeros se ligam ao DNA, podendo aumentar o mecanismo de transcrição, ao se ligar a elementos de resposta a glicocorticóides no DNA próximo a regiões promotoras, ou inibir a expressão de genes, ligando a fatores de transcrição e proteínas de ativação (Datson *et al.*, 2008). Estudos mais recentes descrevem uma forma de receptor MR de membrana com menor afinidade pelos glicocorticóides que os MR intracelulares (Joëls *et al.*, 2007).

Existem evidências que mostram que os glicocorticóides desempenham um papel na memória, e que este papel depende da fase da memória que está sendo estudada (Roosendaal, 2002). Em um trabalho realizado por Thompson e colaboradores (2003) ratos tratados com corticosterona antes do condicionamento de medo apresentaram uma melhora na memória para este evento; porém o mesmo tratamento 24 horas após o condicionamento de medo não teve efeito na retenção da memória.

Em trabalho Abrari e colaboradores (2007) observaram que a aplicação de corticosterona logo após a reativação da memória de medo reduziu a expressão

subseqüente desta memória. Já no estudo de Tronel e Alberini (2007), a memória na esquiva inibitória foi interrompida ao bloquear receptores de glicocorticóides, utilizando a mifepristona, logo após a sua evocação.

Ainda, em trabalho sobre a extinção da memória, Yang *et al.* (2006) mostraram que o agonista glicocorticóide dexametasona, quando aplicado antes de cada teste de extinção, facilitou a extinção do medo condicionado no paradigma de reação de sobressalto potencializada.

Estes trabalhos nos dão uma idéia do quão diferente pode ser o papel dos glicocorticóides nas diferentes fases de memória. Vale a pena lembrar que os glicocorticóides, as doses e vias de administração foram diferentes nos trabalhos e que o paradigma utilizado também diferiu de trabalho para trabalho.

Estudos pré-clínicos apontam os glicocorticóides como um potencial tratamento farmacológico no TEPT, tendo em vista o seu papel na memória e a dificuldade da extinção de uma memória aversiva em alguns pacientes com tal transtorno. Porém há apenas um estudo clínico piloto que foi realizado utilizando o glicocorticóide como um medicamento para o tratamento de tal patologia.

Neste estudo piloto, realizado por Aerni e colaboradores (Aerni *et al.*, 2004), observou-se que uma pequena dose diária de cortisol é capaz de reduzir os sintomas cardinais do TEPT. Pacientes tratados com pequenas doses de cortisol (10 mg/ dia) apresentaram redução de pelo menos 38% em um dos sintomas da memória traumática avaliado. Este estudo foi duplo cego, cruzado e placebo-controlado, porém uma grande limitação deste estudo é o pequeno número de pacientes (apenas três).

No presente estudo procuramos avaliar o papel da dexametasona (agonista glicocorticóide), mifepristona (antagonista do receptor GR) e espironolactona (antagonista do receptor MR) na extinção de uma memória aversiva. Utilizamos o propranolol como um controle positivo para corroborar a validade do procedimento.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da manipulação farmacológica dos MR e GR na memória de medo condicionado ao contexto em ratos.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar o efeito do propranolol, um antagonista β adrenérgico, na extinção do medo condicionado ao contexto.

Avaliar o efeito da dexametasona, um agonista glicocorticóide, na extinção do medo condicionado ao contexto.

Avaliar os efeitos dos antagonistas dos receptores GR e MR, mifepristona e espironolactona respectivamente, na extinção do medo condicionado ao contexto.

3. Artigo: Effects of glucocorticoids and mineralocorticoid drugs in an animal model of post traumatic stress disorder

Ester Mayumi Ninomiya¹, Bruno Jacson Martynhack¹, Cláudio da Cunha¹, Roberto Andreatini^{1,*}

¹Laboratório de Fisiologia e Farmacologia do Sistema Nervoso Central, Departamento de Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Centro Politécnico

*Corresponding author

Laboratório de Fisiologia e Farmacologia do Sistema Nervoso Central

Departamento de Farmacologia

Setor de Ciências Biológicas

Universidade Federal do Paraná

Centro Politécnico C.P. 19031

81540-990 Curitiba - PR - Brazil

Phone: 55(41)33611716

Fax: 55(41)32262042

E-mail: randreatini@ufpr.br

Abstract

Patients with post-traumatic stress disorder (PTSD) exhibit a combination of memory intensification (or extinction impairment) and memory deficits. Glucocorticoids have a role in memory formation, and they may contribute to memory changes in PTSD. Since cortisol may act through mineralocorticoid or glucocorticoid receptors (MRs and GRs, respectively), the objective of the present study was to evaluate the effect of MR (spironolactone) or GR (mifepristone) antagonists, as well as a GR agonist (dexamethasone), on the extinction of contextually conditioned fear, an animal model of PTSD. Propranolol was used as a positive control and, as expected, propranolol administered before a test session increased memory extinction. The results showed that spironolactone also increased the extinction of an aversive memory, although neither dexamethasone treatment nor mifepristone were found to have any effect. These results indicate that MR antagonists may be an option for the treatment of PTSD.

Key Words: contextual fear memory, glucocorticoid receptor, mineralocorticoid receptor, PTSD

1. Introduction

Post-traumatic stress disorder (PTSD) is an anxiety disorder precipitated by a traumatic event. Its main symptoms include the re-experience of the traumatic event through intrusive memories and flashbacks, avoidance and emotional numbing, various manifestations of hyper-arousal, anxiety, sleeping problems, and irritability (American Psychiatric Association, 2000; De Quervain and Margraf, 2008; Hageman et al., 2001). Regarding the cognitive state, a patient suffering from PTSD can present a mixture of hyper-memorization, such as memories of the traumatic event that cannot be forgotten, and memory deficits, such as amnesia of the trauma or of events anterior or posterior to the trauma (Van Praag, 2004). Alternatively, it has been proposed that there is a deficit of extinction of fear memories (Cammara et al., 2007).

PTSD is also a stress-related mental disorder. The hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis and its associated glucocorticoids significantly influence an individual's response to stress (Jurueña et al., 2004). Glucocorticoids may be released during a stressful moment and bind to glucocorticoid (GR) or mineralocorticoid (MR) receptors. GRs are expressed in several regions of the brain, and they can bind both natural and synthetic glucocorticoids (De Kloet et al., 2008). Characteristically, GRs have a low affinity for corticosterone and are occupied primarily during stress and the circadian peak (Khaksari et al., 2007). In the brain, MRs are capable of binding natural glucocorticoids but not some synthetic glucocorticoids (e.g., dexamethasone). It is located mostly in limbic structures, such as the hippocampus, amygdala and prefrontal cortex. (De Kloet et al., 2008). Unlike GRs, MRs have a high affinity for corticosterone and are almost saturated under basal conditions (Khaksari et al., 2007). GRs and MRs are nuclear receptors, and they both mediate genomic actions of glucocorticoids. However, the existence of low-affinity membrane MRs that mediate the initial phase of a stress response has recently been proposed (Joëls et al., 2008). As they bind to their receptors, glucocorticoids produce physiological and behavioural responses that enable an adaptive response to stress (Buckingham, 2006). One neuroendocrinologic characteristic observed in this pathology is the enhanced inhibition of the HPA axis (Kohda et al., 2007). Other changes include higher levels of CRF (corticotropin releasing factor), higher cortisol suppression with dexamethasone, elevated levels of

glucocorticoid receptors in lymphocytes, and an augmented cortisol response to stressors (Bremner et al., 2004).

It has been demonstrated that glucocorticoids have an important role in aversive memory, an effect that depends of the memory phase in question (Rooszendaal, 2002; Roozendal et al., 2006). In studies using conditioned fear, Thompson et al. (2003) showed that rats treated with corticosterone before fear conditioning exhibited improvements in memory. Roozendal and co-workers reported that systemic or intra-amygdala infusions of GR, but not of MR, antagonists impair memory consolidation of the inhibitory avoidance task in rats (Quirarte et al., 1997). On the other hand, they reported that glucocorticoids appeared to impair memory retrieval (De Quervain et al., 1998). Abrari et al. (2008) observed that corticosterone administration after the reactivation of a fear memory reduced the expression of this memory, while Tronel and Alberini (2007) observed that memory of the inhibitory avoidance task was interrupted by blocking GRs immediately after memory reactivation. It appears that MRs also play a role in memory, since MR blockage prevents corticosterone-induced impairment of memory retrieval (Khaksari et al., 2007).

These pre-clinical studies point to glucocorticoids as a potential pharmacological treatment for PTSD. However there is only one clinical study using a glucocorticoid as a treatment for this pathology. A small pilot study (n=3 patients with PTSD) showed that a small daily dose of cortisol could reduce the frequency or intensity of feelings associated with a traumatic event (Aerni et al., 2004).

PTSD involves several neural systems (Nemeroff et al., 2006), including the hippocampus. A reduction of hippocampal volume has been observed in patients with PTSD, although negative results have also been described (Gilbertson et al., 2007). Additionally, it is unclear if a smaller hippocampus is a pre-existing characteristic or a consequence of this pathology, especially given that high levels of glucocorticoids have been associated with hippocampal alterations and/or lesions (Guimarães et al., 1993; Haynes et al., 2001; Sala et al., 2004).

Given the complexity of this disorder, it is difficult to reproduce all PTSD aspects in an animal model. Nonetheless, several models have been previously proposed, and among these models, fear conditioning in rodents can help to study some memory aspects of PTSD. Fear conditioning is induced in laboratory animals by pairing a neutral (conditioned) stimulus, such as a context, with a fear-inducing

(unconditioned) stimulus, such as a foot shock. Presentation of the context in which the conditioning stimulus occurred causes a stereotypical response in the animal that includes fear responses and a glucocorticoid response (Pamplona et al., 2006; Tronel and Alberini, 2007). In the case of rats, crouching behaviour is typically used as a fear index (Blanchard and Blanchard, 1969; Pamplona et al., 2006).

The objective of this study was to evaluate the effects of dexamethasone (a synthetic glucocorticoid agonist), mifepristone (a GR antagonist), and spironolactone (a MR antagonist) on the extinction of a fearful memory in rats. We hypothesised that glucocorticoid manipulations would impact the extinction of aversive memories, and therefore prove useful for the treatment of PTSD. Since memory extinction is related to the process of learning (Cammарota et al., 2007), an effect resulting from administration of a drug before a retrieval test could be due to either impairment of memory retrieval or to an increase in memory consolidation, that is, the new association between the cue (context) and the absence of the unconditioned stimulus (foot shock). Thus, when a drug effect is detected following pre-test administration, it is important to evaluate the drug's effect following post-test administration as well.

2. Experimental procedures

2.1. Animals

Adult male Wistar rats weighing between 220 and 300 g were used. The animals were kept in plastic cages (41 x 32 x 16.5 cm), five rats per cage, with food and water available *ad libitum*. They were maintained in a temperature-controlled room ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$) with a 12h light/dark cycle (lights on at 7 am). The behavioural experiments were conducted during the light phase of the cycle (between 9 am and 2 pm). All experiments and procedures were performed according to the guidelines of animal care established by the UFPR Ethics Committee on the Use of Animals (protocol number 349).

2.2. Drugs and treatment

DL-propranolol (Sigma) was dissolved in 0.9% NaCl (saline) and administered subcutaneously at a dose of 10 mg/kg. Dexamethasone disodium phosphate (Hipolabor) was also dissolved in saline and administered intraperitoneally (i.p.) in

two different doses: 1 and 5 mg/kg. Mifepristone (Sigma) was dissolved in propylene glycol and administered subcutaneously at a dose of 10 mg/kg. Spironolactone (Sigma) was also dissolved in propylene glycol, and administered subcutaneously (s.c.) at a dose of 10 mg/kg. All drugs were administered at a constant volume of 1.0 ml/kg.

2.3. Contextual fear conditioning

The conditioning chamber consisted of a box with dimensions of 26 x 31.5 x 21 cm (Insight, Brazil). Three sides of the box were made of steel, while the fourth side was made of Plexiglas, which allowed for the behavioural analysis of the animal. The inferior side of the box consisted of metallic rods connected to an electrical source. An electric foot shock was delivered through this device.

Contextual fear conditioning (training session) was conducted as described by Pamplona et al. (2006): the rats were placed in the conditioning chamber for three minutes, before receiving a 1 second electric foot shock of 1.5 mA. The animals remained in the box for one minute after the shock, before being returned to their home cages. During three consecutive days, the animals were re-exposed to the conditioning chamber without receiving the shock (test sessions). Their memory of both the traumatic event (the shock) and the context was analyzed.

The freezing behaviour of each animal was used to index memory, following non-reinforced re-exposures to the context (test sessions). An animal was considered frozen when it presented a stereotypical crouching position with complete immobility, except for breathing movements. To evaluate the effect of each drug on memory extinction, the animals were treated with the drug of interest before each re-exposure (test sessions). Exceptions include the 5th experiment, in which animals were dosed after test sessions 1 and 2. Propranolol, a beta-blocker that showed some clinical efficacy in PTSD patients as well as in pre-clinical animal models of PTSD was used as a positive control.

Five related treatment protocols were devised to compare the memory effects of selected GR and MR drugs against vehicle controls. In Experiment 1, we evaluated the effect of propranolol on fear memory extinction by treating animals with DL-propranolol (10 mg/kg, s.c.) or saline solution 20 minutes before each extinction session. Experiment 2 examined the effect of dexamethasone in a similar fashion, by treating the animals with dexamethasone (1.0 or 5.0 mg/kg, i.p.) or saline solution 20

minutes before each re-exposure to the conditioning chamber. Experiment 3 studied the effect of mifepristone, a GR antagonist, on the extinction of a fear memory. In this case, the animals were treated with mifepristone (10 mg/kg, s.c.) or propylene glycol one hour before each extinction session. Experiment 4 evaluated the effect of spironolactone, a MR antagonist, on fear memory extinction by treating the animals with spironolactone (10 mg/kg, s.c.) or propylene glycol one hour before each extinction session. Experiment 5 was similar to Experiment 4, except in terms of dose timing: the animals were treated with spironolactone (10 mg/kg, s.c.) or propylene glycol, but this time the doses were given 1 to 5 minutes after test sessions 1 and 2. In this way, it was possible to study the effects of this drug on the consolidation of new learning.

2.4. Data analysis

Results were statistically analysed using two-way ANOVA with treatment type as the independent factor and session number as the dependent factor. After establishing significant differences by ANOVA, differences between groups were evaluated by post hoc Student's t-test or one-way ANOVA followed by the Newman-Keuls test. The accepted level of significance for the tests was $p \leq 0.05$. All statistical analyses were performed using Statistica 5.5 software.

3. Results

3.1. Experiment 1: Effects of propranolol on the extinction of a contextual fear memory

The effects of propranolol (10 mg/kg, s.c.) on the extinction of a fear memory are represented on Fig.1. Two-way ANOVA indicated significant differences corresponding to treatment type [$F(1,18)=6.17$, $p < 0.02$] and session number [$F(2,36)=17.53$, $p < 0.001$]. There was also a significant treatment x session interaction [$F(2,36)=5.18$, $p < 0.01$]. Student's t-test showed that propranolol reduced freezing time in test sessions 1 [$t(18)=2.948$, $p < 0.001$] and 2 [$t(18)= 2.463$, $p < 0.03$] but not in session 3 [$t(18)= 0.887$, NS]. One-way ANOVA showed a decrease in freezing time in the vehicle group [$F(2,18)= 17.844$, $p < 0.0001$] but not in propranolol group

[$F(2,18)= 2.261$, NS]. In the vehicle group, there was a significant decrease from the 1st session to the 2nd and 3rd sessions (both $p < 0.001$).

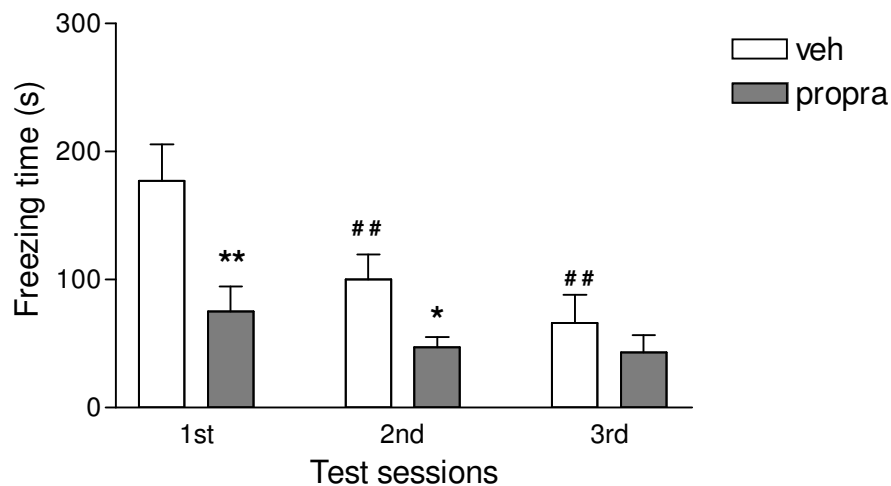


Fig. 1 Effect of propranolol (10 mg/kg, s.c.) on the extinction of contextual fear memory in rats. Propranolol (propra) or its vehicle (veh) were administered 20 minutes before each extinction test (test session). Data represent mean + SEM of freezing time (n=10/group). * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ as compared to the vehicle (veh) in the same extinction session; ## $P < 0.05$ as compared to the 1st extinction session with the same treatment protocol.

3.2. Experiment 2: Effects of dexamethasone on the extinction of a contextual fear memory

Dosing with dexamethasone did not significantly impact freezing time during the extinction sessions, as shown in Fig. 2. Two-way ANOVA showed significant differences between extinction sessions [$F(2,70)= 20.571$, $p < 0.001$] but not between treatment types [$F(2,35)= 0.179$, NS], nor was there a significant treatment x session interaction [$F(4,75)= 1.186$, NS]. One-way ANOVA showed a significant difference between sessions for the vehicle [$F(2,36)= 16.605$, $p < 0.0001$], dexamethasone 1 [$F(2,18)= 9.457$, $p < 0.01$] and dexamethasone 5 [$F(2,18)= 11.649$, $p < 0.0001$] treatment protocols. Post hoc analysis indicated significant differences in freezing time among all extinction sessions for the vehicle and dexamethasone 5 groups (all

$p < 0.05$). In the dexamethasone 1 group, there are significant decreases in freezing time between the 2nd and 3rd sessions as compared to the 1st session (both $p < 0.01$).

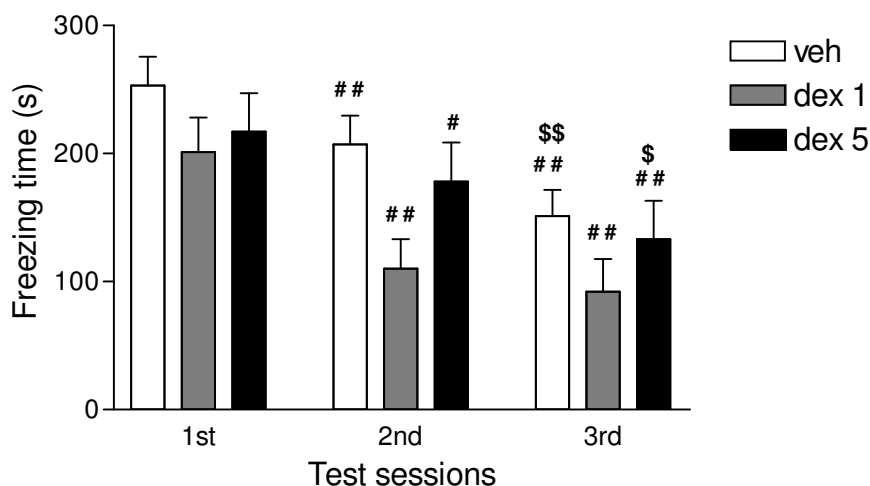


Fig. 2 - Effect of dexamethasone (1 and 5 mg/kg, i.p.) on the extinction of contextual fear memory in rats. Dexamethasone (dex) or its vehicle (veh) were administered 20 minutes before each extinction test (test session). Data represent mean + SEM of freezing time (veh n=20, dex 1 n=9, dex 5 n=10). # $P < 0.05$ and ## $P < 0.01$ as compared to the 1st extinction session with the same treatment; \$ $P < 0.05$ and \$\$ $P < 0.01$ as compared to the 2nd extinction session with the same treatment.

3.3. Experiment 3: Effects of mifepristone, a GR antagonist, on the extinction of a contextual fear memory

The effects of mifepristone (10 mg/kg, s.c.) on the extinction of a fear memory are shown in Fig. 3. Once again, two-way ANOVA showed a significant difference between extinction sessions [$F(2,36)=18.408$, $p < 0.001$] but not between treatment types [$F(1,18)=0.243$, NS], nor was there a significant treatment x session interaction [$F(2,36) = 2.266$, NS]. One-way ANOVA showed a significant difference between sessions for both the vehicle [$F(2,18)= 5.577$, $p < 0.02$] and mifepristone [$F(2,18)= 23.787$, $p < 0.0001$] groups. Post hoc analysis indicated a significant decrease in freezing time between the 2nd and 3rd sessions as compared to the 1st session for the vehicle treatment group (both $p < 0.03$). In the mifepristone group, the freezing time differed among all three extinction sessions (all $p < 0.01$).

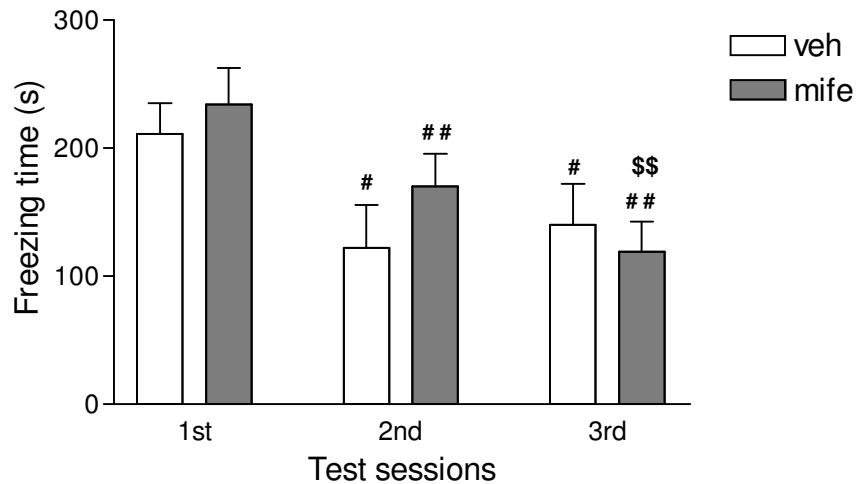


Fig. 3 Effect of mifepristone (10 mg/kg, s.c.) on the extinction of contextual fear memory in rats. Mifepristone (mife) or its vehicle (veh) were administered 1 hour before each test session (spaced over three consecutive days). Data represent mean + SEM of freezing time (n=10/group). # $P < 0.05$ and ## $P < 0.01$ as compared to the 1st session with the same treatment; \$\$ $P < 0.01$ as compared to the 2nd session with the same treatment.

3.4. Experiment 4: Effects of spironolactone, a MR antagonist, on the extinction of a contextual fear memory – administration before each test session

The effects of pre-test session spironolactone administration (10 mg/kg, s.c.) on the extinction of a fear memory are shown in the Fig. 4. Two-way ANOVA indicated significant differences between both treatment types [$F(1,18)=6.867$, $p < 0.02$] and session numbers [$F(2,36)=19.432$, $p < 0.001$], without a significant treatment x session interaction [$F(2,36)= 0.805$, NS]. Student's t-test showed that spironolactone reduced freezing time in session 2 [$t(18)= 3.039$, $p < 0.01$] and session 3 [$t(18)=2.180$, $p < 0.05$], but not in session 1 [$t(18)= 0.909$, NS]. One-way ANOVA showed a significant difference between sessions for both the vehicle [$F(2,18)= 7.136$, $p < 0.01$] and spironolactone [$F(2,18)= 15.672$, $p < 0.001$] groups. Post hoc tests show that there is a significant decrease in freezing time between the 3rd session and the first two sessions within the vehicle group (both $p < 0.05$). In the

spironolactone group, there is also a significant decrease between the 3rd and 2nd sessions as compared to the 1st session (both $p < 0.001$).

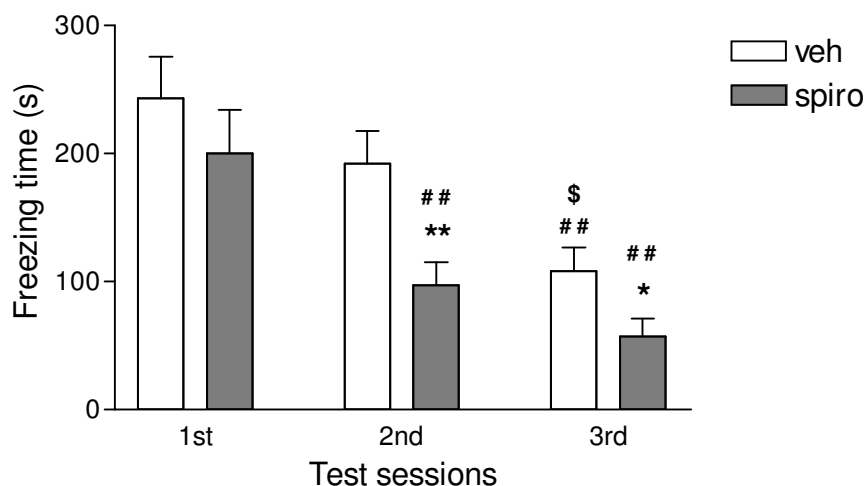


Fig. 4 Effect of pre-test session spironolactone (10 mg/kg, s.c.) administration on the extinction of contextual fear memory in rats. Spironolactone (spiro) or its vehicle (veh) were administered 1 hour before each extinction test (test session). Data represent mean + SEM of freezing time ($n=10$ / group). * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ as compared to the vehicle (veh) in the same test session. ## $P < 0.01$ as compared to the 1st session with the same treatment; \$ $P < 0.05$ as compared to the 2nd session with the same treatment.

3.5. Experiment 5: Effects of spironolactone, a MR antagonist, on the extinction of a contextual fear memory – administration after test sessions 1 and 2

The effects of post-session spironolactone administration (10 mg/kg, s.c.) on the extinction of a fear memory are shown in Fig. 5. Two-way ANOVA indicated a significant difference between sessions [$F(2,34)=4.706$, $p < 0.02$], but not between treatment types [$F(1,17)=0.311$, NS], nor was there a significant treatment x session interaction [$F(2,34)= 1.869$, NS]. Post hoc analysis showed a significant effect within the vehicle treated group [$F(2,16)= 6.401$, $p < 0.01$] with a significant difference between the 1st and 3rd extinction sessions ($p < 0.01$). No significant difference between test sessions was found in the spironolactone group [$F(2,16)= 0.322$, NS].

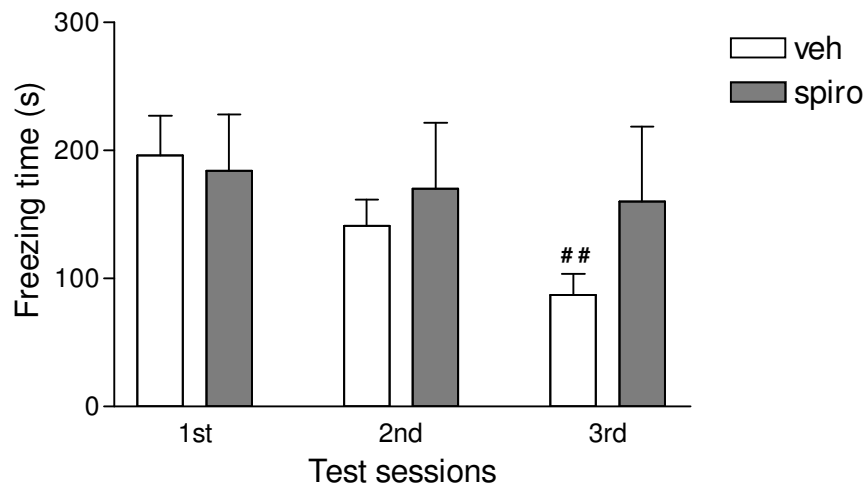


Fig. 5 Effect of post-session spironolactone administration (10 mg/kg, s.c.) on the extinction of contextual fear memory in rats. Spironolactone (spiro) or its vehicle (veh) were administered immediately after the 1st and 2nd extinction tests (test sessions). Data represent mean + SEM of freezing time (n=10/ group). ## P< 0.01 as compared to the 1st session with the same treatment.

4. Discussion

The main finding of the present study is that spironolactone, when administered prior to a test session, reduced the freezing time of contextually fear-conditioned animals. This indicates that spironolactone, and perhaps other MR antagonists, increase the extinction of aversive memories. This effect was not observed when the drug was administered after the test session, which suggests that the drug does not function by enhancing the consolidation of new learning.

GRs and MRs seem to have different roles in memory and behavior. GRs seem to be involved in the consolidation of recently acquired information, while MRs are involved in the interpretation of environmental stimuli and the selection of an appropriate response (Oitzl and de Kloet, 1992; Khaksari et al., 2007). Using a water-maze with hidden platform procedure, Oitzl and de Kloet (1992) observed that MR blockage with spironolactone (administered before session 2) decreased the time spent in the platform quadrant during a free swim trial (session 3). These authors proposed that MR blockage may change the appraisal of an aversive and frightening environment. Thus, it is possible that the blocking of MRs interfered with the

interpretation of the context in which fear conditioning took place, thereby decreasing the freezing time throughout the experiment. On the other hand, as cited above, spironolactone blocked the corticosterone-induced impairment of memory retrieval in rats subjected to a water-maze (Khaksari et al., 2007). This study, however, did not detect a relationship between the amount of time spent in the platform quadrant and previous spironolactone treatment. Previous clinical studies with PTSD patients have attempted to detect changes in MR function within the HPA axis, using either spironolactone (Kellner et al., 2002) or metyrapone, an inhibitor of synthesis of glucocorticoids, in combination with fludocortisone, an agonist of MRs (Otte et al., 2006). Our results do not contradict these findings, since a MR antagonist administered prior to an extinction session would be acting upon the retrieval of an aversive memory. This could conceivably occur without requiring a change in HPA axis activity. On the other hand, it appears that MR blockage prior to conditioning did not interfere with contextual fear expression (Cordero and Sandi, 1998). It is interesting that MR blockage may also exert an anxiolytic effect (Kellner and Wiedemann, 2008), which can be an additional consequence of spironolactone administered to PTSD patients. Since intracellular MRs are already nearly activated at basal corticosterone levels, the effect of a MR antagonist in a stress situation may be mediated by membrane MRs, which have a low affinity for corticosterone and exhibit a rapid non-genomic effect (Joëls et al., 2008; Khaksari et al., 2007; Kellner and Wiedemann, 2008).

An alternative hypothesis would be an indirect effect of MRs blockage—for instance, an increase in corticosterone levels (Kellner and Wiedemann, 2008), leading to a decrease in fear memory retrieval, or an increase the consolidation of new learning, resulting in more rapid memory extinction (Cai et al., 2006). However, we found that neither dexamethasone nor mifepristone had a significant impact in the extinction of an aversive memory, which argues against this hypothesis. Nevertheless, these latter results were contrary to what we expected, since the literature suggests that glucocorticoids are involved in the formation of fear memories, and also participate in the consolidation, retrieval and extinction of conditioned fear (Yang et al., 2006). Indeed, Yang et al. (2006) showed that systemic injection of dexamethasone facilitated the extinction of conditioned fear in a dose dependent manner, an effect that is blocked by the intra-amygdala administration of mifepristone. On the other hand, it is in line with the finding that dexamethasone (0.3

– 3.0 mg/kg) did not reverse the effect of adrenalectomy in the forced extinction of passive avoidance behavior (Bohus and de Kloet, 1981). However, it is important to point out that the paradigms used in these studies to evaluate memory extinction were different. For instance, Yang et al. (2006) employed the fear-potentiated startle method with light presentation in the extinction session, as well as a lower dexamethasone dose range (0.1 – 1.0 mg/kg) than in the present study. Along these lines, Cordero and Sandi (1998) showed that a number of procedural variables, such as shock intensity, have an effect on contextual fear conditioning. Donley et al. (2005) also found that the peripheral administration of mifepristone (10-30 mg/kg) prior to contextual fear conditioning did not affect acquisition or retention trials conducted 24h later; however, local administration of the same drug to the basolateral amygdala or ventral hippocampus decreased freezing behaviour within the retention trial. Moreover, in the study of Yang et al. (2006) cited above, intra-amygdala administration of mifepristone blocked the extinction of that kind of conditioned fear. Using inhibitory avoidance procedure, Taubenfeld et al. (2009) reported an impairment of aversive memory retrieval following systemic administration of mifepristone (30-120 mg/kg). However, this effect was only seen at a moderate shock intensity (0.9 mA). At a higher shock intensity (1.2 mA), aversive memory retrieval did not respond to mifepristone (30-120 mg/kg). This finding closely matches our present results.

We found that propranolol, a β -receptor antagonist, also increased the extinction of an aversive memory. It has been shown that the adrenergic system plays a role in memory consolidation, and it has been proposed that a prolonged adrenergic activation could increase the risk for PTSD by increasing fear conditioning and over-consolidation of a traumatic memory (Vaiva et al., 2003). Our result is in accordance with clinical and pre-clinical studies with propranolol and PTSD. In a pilot study, Pitman et al. (2002) suggested that propranolol, administered after a traumatic event, might have a preventive effect on the development of PTSD. In this double-blind, placebo-controlled study, patients were treated for 10 days (initiated within 6h after the trauma) with 40 mg of orally administered propranolol or placebo. It showed a reduction in the proportion of patients exhibiting a high physiological response to mental imagery (internal cues to traumatic event). However, probably due to small sample size, no significant difference between groups was found in PTSD scales. In another clinical study with a small sample size, Vaiva et al. (2003) observed that

patients who refused treatment with propranolol produced higher PTSD scores than patients treated with 40 mg of propranolol for 7 days, initiated shortly after the trauma. Pre-clinical studies with other animal models of PTSD also ascribe a positive effect to propranolol. Kroon and Carobrez (2009) found that propranolol attenuates the expression of conditioned fear in an olfactory fear-conditioning model that uses coffee odour as a conditioned stimulus. Similarly, Do Monte et al. (2008) showed that propranolol also impairs the contextual fear conditioning of rats to a predator odor (cat), at a dose and schedule (10 mg/kg, s.c., 30 min before test) that prevents dopamine-induced tachycardia. Except for timing, this protocol is largely identical to that used in the present study. It has also been shown that the blocking of β receptors by propranolol after training could have an amnesic effect (Cahill, 2000). Thus, these results reinforce the pharmacological validity of the animal model used here.

In conclusion, the present study found that a MR antagonist increased extinction of a contextual fear memory in rats, which suggests that this approach can be useful for treating PTSD. Since the current pharmacological treatments for PTSD have several shortcomings (Cammarota et al., 2007; De Quervain et al., 2008), the development of novel drugs is a clinical need.

Acknowledgments

E.M.N. was the recipient of a student graduate fellowship from CNPq; R.A. and C.C. are recipients of research fellowships from CNPq. The present study was supported by a CNPq grant. The authors would like to thank Mrs. Silvia N. Cordazzo for her technical assistance.

References

Abrari, K., Rashidy-Pour, A., Semnanian, S., Fathollahi, Y. (2008) Administration of corticosterone after memory reactivation disrupts subsequent retrieval of a contextual conditioned fear memory: Dependence upon training intensity. *Neurobiol. Learn. Mem.* 89,178-184.

Aerni, A., Traber, R., Hock, C., Roozendaal, B., Schelling, G., Papassotiropoulos, A., Nitsch, R.M., Schnyder, U., De Quervain, D.J.-F. (2004) Low-dose cortisol for symptoms of posttraumatic stress disorder. *Am. J. Psychiatry* 161, 1488-1490.

American Psychiatric Association (2000) *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, 4th.ed., APA Press, Washington DC. Text Revision.

Blanchard, R.J. and Blanchard, C. (1969) Crouching as an index of fear. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 67, 370-375.

Bohus, B. and De Kloet, E.R. (1981) Adrenal steroids and extinction behavior: antagonism by progesterone, deoxycorticosterone and dexamethasone of a specific effect of corticosterone. *Life Sci.* 28, 433-40.

Bremner, J.D., Vythilingam, M., Vermetten, E., Afzal, N., Nazeer, A., Newcomer, J.W., Charney, D.S. (2004) Effects of dexamethasone on declarative memory function in posttraumatic stress disorder. *Psychiatry Res.* 129, 1-10.

Buckingham, J.C. (2006) Glucocorticoids: exemplars of multi-tasking. *Br. J. Pharmacol.* 147, S258–S268.

Cahill, L., Pham, C.A., Setlow, B. (2000) Impaired memory consolidation in rats produced with β -adrenergic blockade. *Neurobiol. Learn. Mem.* 74, 259-266.

Cai, W.H., Blundell, J., Han, J., Greene, R.W., Powell, C.M. (2006) Postreactivation glucocorticoids impair recall of established fear memory. *J. Neurosci.* 26, 9560-9566.

Cammarota, M., Bevilaqua, L.R., Vianna, M.R., Medina, J.H., Izquierdo, I. (2007) The extinction of conditioned fear: structural and molecular basis and therapeutic use. *Rev. Bras. Psiquiatr.* 29, 80-5.

Cordero, M.I. and Sandi, C. (1998) A role for brain glucocorticoid receptors in contextual fear conditioning: dependence upon training intensity. *Brain Res.* 786, 11-7.

De Kloet, E.R., De Jong, I.E.M., Oitzl, M.S. (2008) Neuropharmacology of glucocorticoids: focus on emotion, cognition and cocaine. *Eur. J. Pharmacol.* 585: 473-482.

De Quervain, D.J.F. and Margraf, J. (2008) Glucocorticoids for the treatment of post-traumatic stress disorder and phobias: A novel therapeutic approach. *Eur. J. Pharmacol.* 583, 365-371.

De Quervain, D.J.F., Roozendaal, B., Mc Gaugh, J.L. (1998) Stress and glucocorticoids impair retrieval of long-term spatial memory. *Nature* 394, 787-790.

Do Monte, F.H.M., Canteras, N.S., Fernandes, D., Assreuy, J., Carobrez, A.P. (2008) New perspectives on β -adrenergic mediation of innate and learned fear responses to predator odor. *J. Neurosci.* 28, 13296-13302.

Donley, M.P., Schulkin, J., Rosen, J.B. (2005) Glucocorticoid receptor antagonism in the basolateral amygdala and ventral hippocampus interferes with long-term memory of contextual fear. *Behav. Brain Res.* 164, 197-205.

Gilbertson, M.W., Williston, S.K., Paulus, L.A., Lasko, N.B., Gurvits, T.V., Shenton, M.E., Pitman, R.K., Orr, S.P. (2007) Configural cue performance in identical twins discordant for posttraumatic stress disorder: theoretical implications for the role of hippocampal function. *Biol. Psychiatry* 62, 513-520.

Guimarães, F.S., Del Bel, E.A., Padovan, C.M., Mendonça Neto, S., Titze de Almeida, R. (1993) Hippocampal 5-HT receptors and consolidation of stressful memories. *Behav. Brain Res.* 58: 133-139.

Hageman, I., Andersen, H.S., Jorgensen, M.B. (2001) Post-traumatic stress disorder: a review of psychobiology and pharmacotherapy. *Acta Psychiatr. Scand.* 104, 411-422.

Haynes, L.E., Griffiths, M.R., Hyde, R.E., Barber, D.J., Mitchell, I.J. (2001) Dexamethasone induces limited apoptosis and extensive sublethal damage to specific subregions of the striatum and hippocampus: implications for mood disorders. *Neuroscience* 104, 57-69.

Joëls, M., Karst, H., De Rijk, R., De Kloet, E.R. (2008) The coming out of the brain mineralocorticoid receptor. *Trends Neurosci.* 31, 1-7.

Juruena, M.F., Cleare A.J., Pariante, C.M. (2004) The hypothalamic pituitary adrenal axis, glucocorticoid receptor function and relevance to depression. *Rev. Bras. Psiquiatr.* 26, 189-201.

Kellner, M., Baker, D.G., Yassouridis, A., Bettinger, S., Otte, C., Naber, D., Wiedemann, K. (2002) Mineralocorticoid receptor function in patients with posttraumatic stress disorder. *Am. J. Psychiatry* 159, 1938-1940.

Kellner, M. and Wiedemann, K. (2008) Mineralocorticoid receptors in brain, in health and disease: possibilities for new pharmacotherapy. *Eur. J. Pharmacol.* 583: 372-378.

Khaksari, M., Rashidy-Pour, A., Vafei, A.A. (2007) Central mineralocorticoid receptors are indispensable for corticosterone-induced impairment of memory retrieval in rats. *Neuroscience* 149, 729-738.

Kohda, K., Harada, K., Kato, K., Hishino, A., Motohashi, J., Yamaji, T., Morinobu, S., Matsuoka, N., Kato, N. (2007) Glucocorticoid receptor activation is involved in producing abnormal phenotypes of single-prolonged stress rats: a putative post-traumatic stress disorder model. *Neuroscience* 148, 22-33.

Kroon, J.A.V. and Carobrez, A.P. (2009) Olfactory fear conditioning paradigm in rats: Effects of midazolam, propranolol or scopolamine. *Neurobiol. Learn. Mem.* 91: 32-40.

Nemeroff, C.B., Bremner, J.D., Foa, E.B., Mayberg, H.S., North, C.S., Stein, M.B. (2006) Posttraumatic stress disorder: A state-of-the-science review. *J. Psychiatr. Res.* 40, 1-21.

Oitzl, M.S. and De Kloet, E.R. (1992) Selective corticosteroid antagonists modulate specific aspects of spatial orientation learning. *Behav. Neurosci.* 106, 62-71.

Otte, C., Muhtz, C., Daneshkhan, S., Yassouridis, A., Kiefer, F., Wiedmann, K., Kellner, M. (2006) Mineralocorticoid receptor function in posttraumatic stress disorder after pretreatment with metyrapone. *Biol. Psychiatry* 60, 784-787.

Pamplona, F.A., Prediger, R.D.S., Pandolfo, P., Takahashi, R.N. (2006) The cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 facilitates the extinction of contextual fear memory and spatial memory in rats. *Psychopharmacology* 188, 641-649.

Pitman, R.K., Sanders, K.M., Zusman, R.M., Healy, A.R., Cheema, F., Laski, N.B., Cahill, L., Orr, S.P. (2002) Pilot Study of Secondary Prevention of Posttraumatic Stress Disorder with Propranolol. *Biol. Psychiatry* 51, 189-142.

Quirarte, G.L., Roozendaal, B., Mc Gaugh, J.L. (1997) Glucocorticoid enhancement of memory storage involves noradrenergic activation in the basolateral amygdala. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 14048-14053.

Roozendaal, B. (2002) Stress and memory: opposing effects of glucocorticoids on memory consolidation and memory retrieval. *Neurobiol. Learn. Mem.* 78, 578-595.

Roozendaal, B., Okuda, S., De Quervain, D.J.F., Mc Gaugh, J.L. (2006) Glucocorticoids interact with emotion-induced noradrenergic activation in influencing different memory functions. *Neuroscience* 138, 901-910.

Sala, M., Perez, J., Soloff, P., Ucelli Di Nemi, S., Caverzasi, E., Soares, J.C., Brambilla, P. (2004) Stress and hippocampal abnormalities in psychiatric disorders. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 14, 393-405.

Taubenfeld, S.M., Riceberg, J.S., New, A.S., Alberini, C.M. (2009) Preclinical assessment for selectively disrupting a traumatic memory via postretrieval inhibition of glucocorticoid receptors. *Biol. Psychiatry* 65(3):249-57.

Thompson, B.L., Erickson, K., Schulkin, J., Rosen, J.B. (2003) Corticosterone facilitates retention of contextually conditioned fear and increases CRH mRNA expression in the amygdala. *Behav. Brain Res.* 149, 209-215.

Tronel, S. and Alberini, C.M. (2007) Persistent disruption of a traumatic memory by postretrieval inactivation of glucocorticoid receptors in the amygdala. *Biol. Psychiatry* 62, 33-39.

Vaiva, G., Ducrocq, F., Jezequel, K., Averland, B., Lestavel, P., Brunet, A., Marmar, C.R. (2003) Immediate treatment with propranolol decreases posttraumatic stress disorder two months after trauma. *Biol. Psychiatry* 54, 947-949.

Van Praag, H.M. (2004) The cognitive paradox in posttraumatic stress disorder: a hypothesis. *Prog. Neuropsychopharmacol Biol. Psychiatry* 28, 923-935.

Yang, Y.L., Chao, P.K., Lu, K.T. (2006) Systemic and intra-amygdala administration of glucocorticoid agonist and antagonist modulate extinction of conditioned fear. *Neuropsychopharmacology* 31, 912-924.

4. Conclusão

Nosso estudo demonstrou que a espironolactona, um antagonista MR, foi capaz de aumentar a extinção de uma memória aversiva em ratos testados em um modelo animal de TEPT. Porém animais tratados com a dexametasona e mifepristona não apresentaram alteração na extinção de uma memória de medo. Estes resultados corroboram com a idéia de que os receptores GR e MR desempenham diferentes papéis na memória.

Foi testados também o efeito da espironolactona pré e pós-teste com o objetivo de avaliar seu efeito na extinção de uma memória aversiva e se este efeito era devido a uma ação na evocação ou na consolidação de um novo aprendizado. Nossos resultados mostraram que a espironolactona aumentou a extinção de uma memória de medo contextual. Porém, quando aplicada após as sessões teste não apresentou efeito algum em comparação com o controle; ou seja aparentemente a espironolactona não apresentou um efeito na consolidação do novo aprendizado (na caixa não é recebido mais choque).

O propranolol foi nosso controle positivo, animais que foram tratados com esta droga também apresentaram um aumento na extinção de uma memória aversiva. O propranolol serviu para validar o modelo experimental utilizado para nossas condições experimentais. Nossos resultados com o propranolol também reforçaram a validade farmacológica do modelo utilizado para o estudo do TEPT e apoiaram a idéia de que o sistema noradrenérgico desempenha um papel importante no medo e memória dos animais.

O tratamento de TEPT com antagonistas MR poderia ser interessante na terapêutica desta desordem. Como destacado por Kellner e Wiedmann (2008), os MRs localizados no cérebro poderiam ser um alvo interessante no tratamento farmacológico de desordens psiquiátricas que envolvam uma disfunção do hipocampo ou alterações na função do eixo HPA, o que é observado no TEPT. Portanto são necessários estudos adicionais para melhor compreender o papel do MR no cérebro e seu envolvimento em algumas desordens.

5. Referências Bibliográficas adicionais

BERLAU, D.J. e Mc GAUGH, J.L. Enhancement of extinction memory consolidation: The role of the noradrenergic and GABAergic systems within the basolateral amygdala. **Neurobiology of Learning and Memory** 2006; 86: 123-132.

BROEKMAN, B.F.P.; OLFF, M.; BOER, F. The genetic background to PTSD. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews** 2007; 31: 348-362.

DATSON, N.A.; MORSINK, W.C.; MEIJER, O.C.; De KLOET, E.R. Central corticosteroid actions: Search for gene targets. **European Journal of Pharmacology** 2008; 583: 272-289.

FIGUEIRA, I. e MENDLOWICZ, M. Diagnóstico do transtorno de estresse pós-traumático. **Rev Bras Psiquiatr** 2003; 25:12-16.

FILHO, J.W.S.C. e SOUGEY, E.B. Transtorno de estresse pós-traumático: formulação diagnóstica e questões sobre comorbidade. **Rev Bras Psiquiatr** 2001; 23(4): 221-228.

HAYNES, L.E.; GRIFFITHS, M.R.; HYDE, R.E.; BARBER, D.J.; MITCHELL, I.J. Dexamethasone induces limited apoptosis and extensive sublethal damage to specific subregions of the striatum and hippocampus: implications for mood disorders. **Neuroscience** 2001; 104: 57-69.

HERMAN, J.P.; OSTRANDER, M.M.; MUELLER, N.K.; FIGUEIREDO, H. Limbic system mechanisms of stress regulation: Hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry** 2005; 29: 1201-1213.

IMANAKA, A.; MORINOBU, S.; TOKI, S.; YAMAWAKI, S. Importance of early environment in the development of post-traumatic stress disorder-like behaviors. **Behavioural Brain Research** 2006; 173: 129-137.

LOUVART, H.; MACCARI, S.; LESAGE, J.; LÉONHARDT, M.; DICKES-COOPMAN, A.; DARNAUDÉRY, M. Effects of a single footshock followed by situational reminders on HPA axis and behavior in the aversive context in male and female rats. **Psychoneuroendocrinology** 2006; 31: 92-99.

PYNOOS, R.S.; RITZMANN, R.F.; STEINBERG, A.M.; GOENJIAN, A.; PRISECARU, I. A behavioral animal model of posttraumatic stress disorder featuring repeated exposure to situational reminders. **Biol Psychiatry** 1996; 39: 129-134.

VIEWEG, W.V.R.; JULIUS, D.A.; FERNANDEZ, A.; BEATTY-BROOKKS, M.; HETTEMA, J.M.; PANDURANGI, A. K. Posttraumatic Stress Disorder: Clinical Features, Pathophysiology, and Treatment. **The American Journal of Medicine** 2006; 119:383-390.

6. Anexo

6.1 Experimento complementar: Doses elevadas de dexametasona previamente ao treinamento do medo condicionado

Foi observada uma redução do volume hipocampal em pacientes com TEPT, embora resultados negativos também tenham sido encontrados. Entretanto não se sabe ao certo se esta redução do volume hipocampal predispõe ao TEPT, ou seja, antecede ao trauma, ou é uma consequência do trauma, contribuindo para a patofisiologia da desordem (Sala *et al.*, 2004).

Foi descrito anteriormente que altas doses de dexametasona, um glicocorticóide sintético com ação agonista em GR, provoca uma lesão hipocampal (Haynes *et al.*, 2001). É possível que a redução do volume hipocampal observada no TEPT poderia estar relacionada com níveis elevados de cortisol em resposta ao evento estressante.

O presente estudo foi realizado para avaliar o efeito de uma lesão hipocampal, provocada por altas doses de dexametasona, na aquisição e extinção do medo condicionado ao contexto. Os animais utilizados são da mesma procedência dos utilizados nos outros experimentos e submetidos à um protocolo experimental semelhante ao dos experimentos anteriores. O condicionamento e sessões testes foram realizados como descrito anteriormente, porém os animais foram tratados 48 horas antes do treinamento do medo condicionado. Todas as análises comportamentais foram realizadas entre as 9 e 14 horas.

Drogas

Fosfato dissódico de dexametasona (Hipolabor): doses de 5 e 10 mg/kg, diluídas em solução salina.

Todas as drogas foram administradas por via intraperitoneal (ip) em volume constante de 1 ml/kg.

Resultados

O efeito do tratamento prévio com a dexametasona (48 horas antes do condicionamento contextual de medo) na extinção de uma memória aversiva é mostrado na Fig. 1. ANOVA de duas vias indicou um efeito significativo para a sessão [$F(2,70) = 20,571$, $p < 0,0001$], mas não um efeito para o tratamento [$F(2,70) = 0,179$, NS] ou interação entre tratamento e sessão [$F(4,70) = 1,186$, NS]. ANOVA de uma via mostrou um efeito significativo da sessão para o grupo veículo [$F(2,18) = 32,383$, $p < 0,0001$], mas não para os grupos dexametasona [dex 5: $F(2,18) = 2,310$, NS; dex 10: $F(2,18) = 3,480$, $p = 0,052$]. Análise pós hoc mostrou que há uma diferença significativa entre as três sessões teste (todos $p < 0,001$).

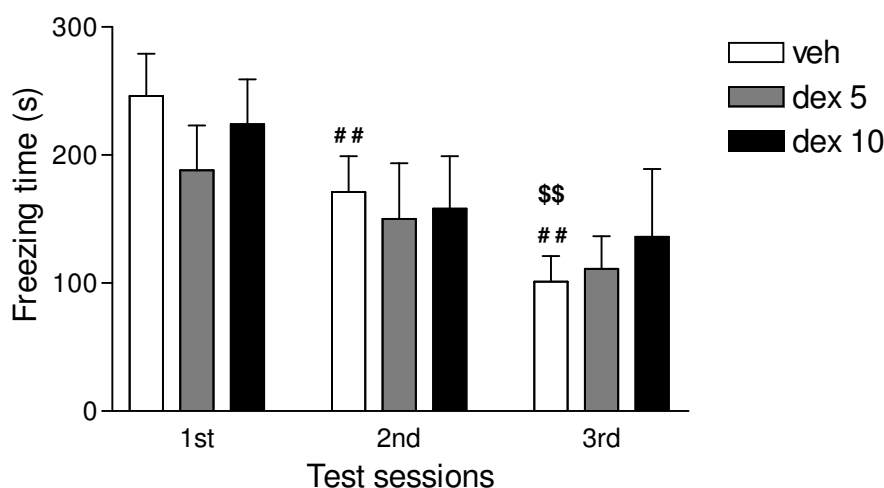


FIGURA 1. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE DEXAMETASONA (5 E 10 MG/KG, I.P.) ANTES DO CONDICIONAMENTO NO TEMPO DE IMOBILIDADE NO CONDICIONAMENTO DE MEDO CONTEXTUAL.

Dexametasona (dex) ou veículo (veh) foram administrados 48 horas antes do condicionamento, não foi feito tratamento antes do teste de extinção (sessões teste). Dados representam média + SEM, veh $n=20$, dex 5 $n=10$, dex 10 $n=10$. ## $p < 0,01$ comparado com primeira sessão com mesmo tratamento, \$\$ $p < 0,01$ comparado com segunda sessão com mesmo tratamento.

Discussão

Não foi observado um claro efeito de altas doses de dexametasona na aquisição e extinção de uma memória aversiva. Nossa hipótese era de que altas

doses de dexametasona, que foram previamente associadas com lesão hipocampal, iriam mimetizar o estado prévio de alguns pacientes com TEPT. Porém nossos resultados mostraram que altas doses de dexametasona administradas antes do condicionamento de medo não afetaram o tempo de imobilidade durante as sessões teste quando comparado com o grupo controle, embora ratos tratados com dexametasona não apresentaram uma redução da imobilidade com o passar do experimento, diferente do que foi observado nos ratos controle. Portanto, em uma primeira análise, os resultados não apoiam a idéia de que altos níveis de glicocorticóides induzido por um estresse prévio contribuiriam para a patofisiologia de TEPT e aumentaria a probabilidade de seu desenvolvimento.