

3

Estudo 1

Linhagens de animais com alta e baixa taxa da resposta de congelamento condicionado

3.1

Método

3.1.1

Sujeitos

Ratos albinos da cepa Wistar foram utilizados neste estudo. A matriz inicial destes animais foi obtida de um criador local (Fundação Oswaldo Cruz) em 1995 e desde então vêm sendo procriados no Biotério do Departamento de Psicologia da PUC-Rio. Os animais foram mantidos em um ambiente com temperatura e luminosidade controlada. A temperatura foi ajustada em torno de 22° C e as luzes ciclaram em um intervalo de 12 horas iluminado por 12 horas de escuro.

Os animais foram mantidos em grupos de 6 a 8 em caixas de polietileno medindo 31x38cm. As caixas foram forradas com serragem de madeira para coletar as fezes e urina dos animais. Os animais tiveram acesso *ad libitum* à água e comida

Treinos e testes comportamentais ocorreram sempre durante o período iluminado do ciclo. Cinco dias antes do início do experimento, todos os animais eram manuseados uma vez por dia por um período de dois minutos. Todos os protocolos experimentais empregados nestes estudos estiveram em conformidade com as Diretrizes Para o Emprego e o Cuidado de Animais de Laboratório desenvolvidas pelo Instituto Americano de Saúde (National Institutes of Health; publicação número 85-23, revisada em 1985).

3.1.2

Equipamentos

O treino e teste de condicionamento contextual aversivo foram realizados em uma caixa experimental quadrangular medindo 25 x 20 x 20 cm. Duas paredes laterais da caixa eram de alumínio e as restantes de acrílico. O assoalho da caixa experimental era composto por 15 barras de metal distando 1.5 cm entre si, permitindo a administração de choques elétricos através de um gerador de choque com misturador de voltagem (AVS, SCR04 São Paulo). Uma interface com oito canais (Insight, Ribeirão Preto) acoplada a um micro computador permitiu a apresentação deste estímulo aversivo.

A caixa experimental era sempre limpa imediatamente antes que o animal fosse colocado no seu interior com uma solução de hidróxido de amônio (1%). Este procedimento teve como objetivo eliminar possíveis influências que a urina e as fezes deixadas na caixa por um animal pudessem influenciar o comportamento do animal seguinte. A caixa experimental estava encerrada dentro de uma câmara de isolamento acústico feita de compensado de madeira e revestida por Eucatex acústico. Uma lâmpada vermelha de 25W instalada no teto da câmara de isolamento acústico permitiu a observação do animal por meio de uma microcâmera instalada no seu interior e conectada a uma placa de captura de vídeo instalada em uma sala adjacente. Um programa de leitura de imagens (Winfast) permitiu a gravação eletrônica das sessões de testes experimentais. Uma ventoinha instalada na câmara de isolamento acústico permitiu a apresentação contínua de um ruído branco de 78dB (escala A).

3.1.3

Procedimento

Com objetivo de se produzir uma linhagem de animais com alta taxa de congelamento condicionado (CAC – Cariocas com Alto Congelamento) e outra linhagem com baixa taxa de congelamento condicionado (CBC - Cariocas com baixo Congelamento), 120 ratos (60 machos e 60 fêmeas) constituíram a geração inicial (S0) para a produção destas duas linhagens.

Cada animal foi submetido a um procedimento de condicionamento contextual aversivo. Neste procedimento, o animal era colocado no interior da caixa experimental por oito minutos. Ao término deste período, três choques de 1 mA com duração de um segundo cada eram apresentados com um intervalo de 20 segundos entre choques. Após a apresentação do último choque, o animal permanecia por mais dois minutos, terminando assim a sessão de treino. Cerca de 24 horas após, teve início a sessão de teste. Nesta sessão, o animal era recolocado na caixa experimental por oito minutos. Nenhum choque era apresentado e a resposta de congelamento durante todo este período era registrada por meio de um procedimento de amostragem de tempo. A cada dois segundos, um observador avaliava se o animal apresentava uma postura de congelamento, definida como a ausência total de qualquer movimento, exceto aqueles necessários para a respiração. A concordância entre observadores com relação a registro desta resposta em nosso laboratório é de 0,98.

A quantidade total da resposta de congelamento durante a sessão de teste foi empregada como critério para o cruzamento dos animais. Os 10 machos e 10 fêmeas com a maior taxa de congelamento condicionado, assim como os 10 machos e 10 fêmeas com menor taxa de congelamento condicionado foram selecionados para darem início às linhagens CAC e CBC, respectivamente. Das 10 famílias CAC nasceram 76 animais, enquanto que as 10 famílias CBC deram origem a 71 animais. Estes animais foram a primeira geração de filhotes de nosso procedimento de criação (S1). O mesmo procedimento foi usado para a produção de duas novas gerações de animais selecionados (S2 e S3). As 10 famílias com alto ou baixo congelamento eram escolhidas depois de todos os animais de uma dada geração ser fenotipados. Cruzamentos sempre ocorreram dentro de cada linhagem. Uma exceção ocorreu em S2, quando uma fêmea advinda da linhagem CBC com a maior taxa de congelamento condicionado cruzou com um macho da linhagem CAC, também com uma altíssima taxa de congelamento condicionado. Pares de cruzamentos Irmãos-Irmãs foram evitados para se reduzir endogamia, o que poderia levar a uma redução na taxa de fertilidade dos animais, além de alterações no desenvolvimento das linhagens selecionadas devido ao chamado “drift” genético (Falconer & MacKay, 1996).

Entre 6 e 8 dias após o nascimento, cada filhote de cada linhagem recebia um corte em uma das orelhas com objetivo de designar a sua linhagem (CAC –

cutelo na orelha direita; CBC – corte na orelha esquerda). Um segundo sistema de marcação, realizado através da ablação de um ou mais dedos das patas do animal também foi realizado durante este período. A Figura 1 apresenta uma ilustração deste sistema de marcação.

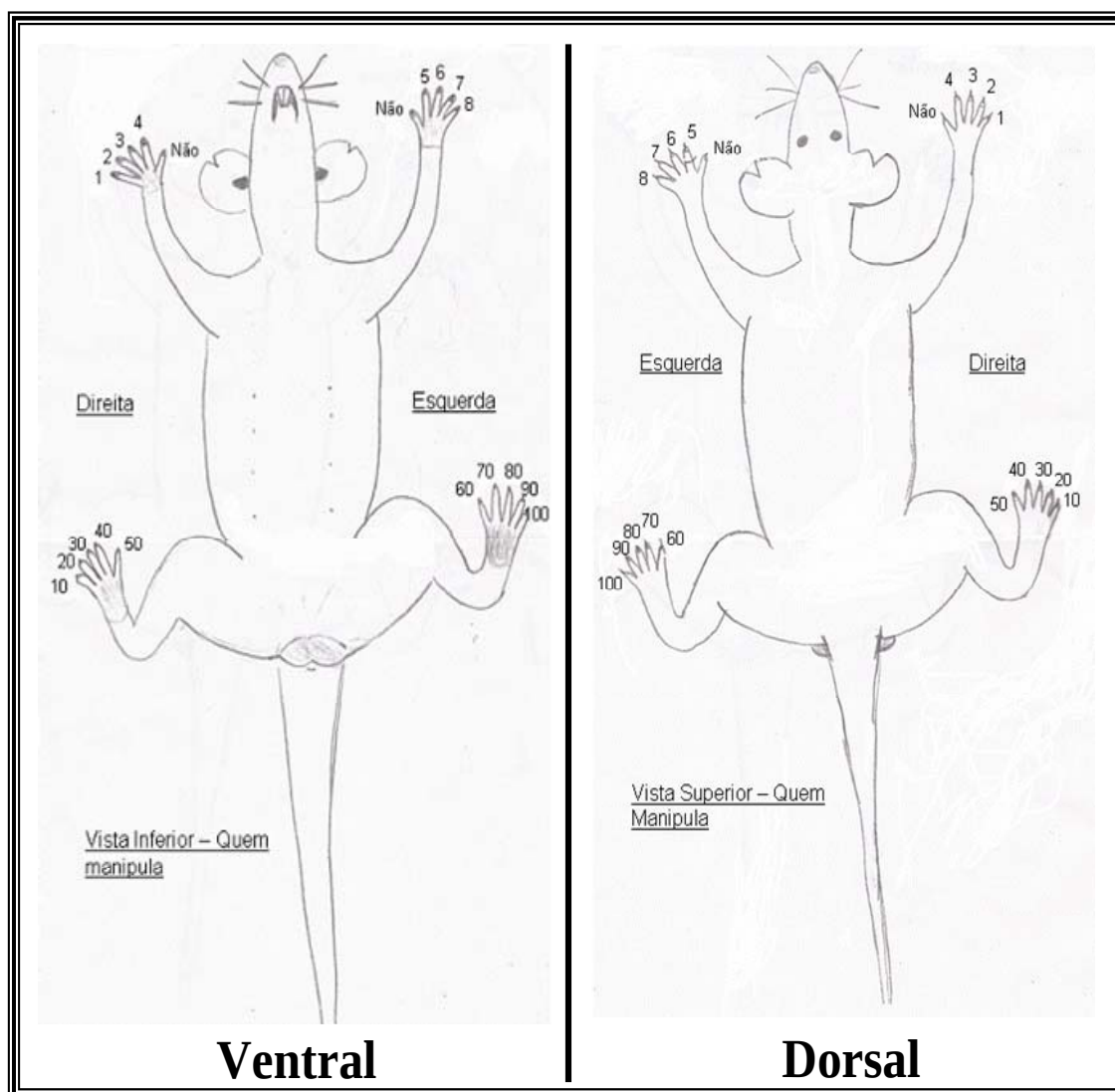


Figura 1: Ilustração de um sistema de marcação animal por meio da ablação de dedos.

3.2

Resultados

A Tabela 1 apresenta a distribuição dos 488 animais utilizados das gerações S1, S2 e S3 utilizados neste estudo. A distribuição destes animais permaneceu relativamente constante ao longo das diferentes gerações e em relação aos machos e fêmeas de ambas as linhagens. Essa hipótese foi confirmada estatisticamente. Uma análise com o teste chi-quadrado revelou uma ausência de qualquer diferença significativa entre os 12 grupos (chi-quadrado=0,58; $p>0,7$)

Tabela 1: Distribuição do número de machos e fêmeas das linhagens selecionadas com alto ou baixo congelamento condicionado pelas 3 gerações selecionadas (S1, S2 e S3).

Selected generation	High Freezing		Low Freezing		Total
	Male	Female	Male	Female	
S1	37	39	34	37	147
S2	37	35	37	34	143
S3	34	45	42	37	158
Total	108	119	113	108	448

A Figura 2 apresenta um rato em uma postura de congelamento durante a sessão de teste. Esta resposta se caracteriza pelo fato do animal apresentar uma ausência total de movimentos exceto pequenas alterações na região médio-ventral necessárias para a respiração. Por via de regra, o animal apresenta uma postura relativamente arqueada de seu dorso. Em outras situações, pode-se também observar uma resposta de congelamento quando o animal fica em pé com as patas traseiras (rearing).



Figura 2: Rato demonstrando a resposta de congelamento, na caixa de condicionamento do laboratório de Neurociência do Comportamento da PUC-Rio.

A resposta de congelamento condicionado foi analisada através de uma análise de variância de três vias (ANOVA). O primeiro fator, com três níveis, estava relacionado com o número da geração (S1, S2, S3). O segundo fator, com dois níveis, estava relacionado com a linhagem (CAC e CBC). Finalmente, o terceiro fator, também com dois níveis, estava relacionado com o sexo dos animais (macho ou fêmea). Esta análise revelou a ausência de uma interação de três vias ($F(2,448)=0.17$; $p>0.8$). Não foram encontradas interações de duas vias entre sexo e geração selecionada ($F(2,448)=0.28$; $p>0.7$) e entre sexo e linhagem ($F(1,448)=7.55$; $p<0.001$). A ANOVA ainda revelou uma interação de duas vias entre as linhagens dentre as três diferentes gerações ($F(2, 448)=7.55$; $p<0.001$). Finalmente, um efeito principal do sexo ($F(1,448)=13.10$; $p<0.001$) e linhagem ($F(1,448)=14.77$; $p<0.001$) foi também detectado.

O fato do sexo dos animais ter apresentado um efeito significativo na ausência de qualquer interação com as diferentes gerações ou linhagens indica a importância desta variável neste estudo. De uma forma geral, ratos machos congelaram 59.9% (+/- 2.03) enquanto que as fêmeas congelaram 50.9% (+/- 1.90).

Um teste t de student indicou uma diferença significativa entre estes dois grupos ($t(446) = 3,24$; $p < 0.01$).

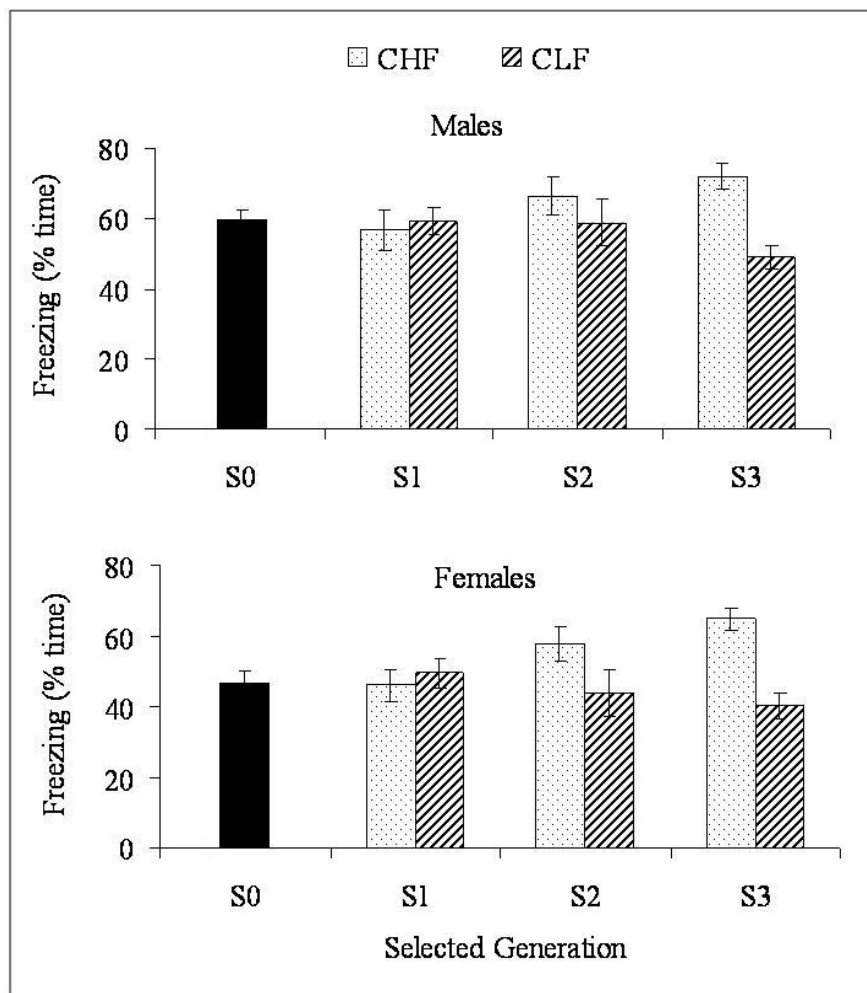


Figura 3: Porcentagem média do tempo de congelamento de animais provenientes das linhagens selecionadas com alta (CAC) e baixa (CBC) taxa de congelamento em relação à matriz inicial (S0) e as três gerações seguintes (S1, S2 e S3).

A figura 3 representa a média ($\pm$ SEM) da porcentagem de tempo gasto na postura de congelamento em machos (parte de cima) e fêmeas (parte de baixo) durante a sessão de teste da população original (S0) assim como nas três gerações selecionadas (S1, S2 e S3) para alto (CAC) e baixo (CBC) congelamento condicionado. Comparações pareadas com o teste t de student entre CAC e CBC foram feitas para cada geração selecionada entre machos e fêmeas. Estas análises

permitiram identificar em qual geração as duas linhagens de ratos machos e fêmeas apresentaram uma diferença confiável no congelamento condicionado. De fato, machos não apresentaram nenhuma diferença significativa na primeira (S1) e na segunda (S2) gerações ($t(69)=0.37$; $p>0.7$ and $t(72)=10.92$; $p>0.3$, respectivamente). Entretanto, uma diferença confiável entre as linhagens CAC e CBC de ratos machos foi detectada na terceira (S3) geração ($t(74)=4.47$; $p<0.001$). Este mesmo padrão foi observado entre as fêmeas. Uma diferença confiável observada com CAC e CBC entre as fêmeas foi detectada em S3 ($t(80) = 5.31$, $p < 0.001$) mas não em S1 ($t(74)=0.55$; $p>0.5$ ou em S2 ($t(67)=0.92$; $p>0.3$). Desta forma, a criação selecionada resultou numa dissociação consistente do congelamento condicionado tanto em machos quanto em fêmeas na terceira geração selecionada.