

## **4**

### **Estudo 2**

#### **Participação do complexo amigdalóide no controle da resposta condicionada de congelamento nas linhagens CAC e CBC**

##### **4.1**

##### **Método**

###### **4.1.1**

###### **Sujeitos**

O presente estudo empregou uma nova geração (S4) da linhagem CAC e CBC. Esta nova geração foi produzida a partir de S3 seguindo-se exatamente o mesmo procedimento descrito anteriormente. Além destas duas linhagens, foram também utilizados 48 ratos (24 machos e 24 fêmeas) do grupo controle. Este grupo não passou por nenhuma seleção genética.

###### **4.1.2**

###### **Equipamento**

O presente estudo utilizou os mesmos equipamentos empregados no estudo anterior.

###### **4.1.3**

###### **Procedimento**

Ao atingirem três meses de idade, 73 animais da linhagem CAC (46 machos e 27 fêmeas) bem como 78 animais da linhagem CBC (33 machos e 46 fêmeas) foram submetidos ao procedimento de condicionamento contextual aversivo. Este procedimento apresentou algumas mudanças em relação ao

procedimento utilizado no estudo anterior. Neste novo procedimento, cada animal era colocado na caixa experimental e três minutos após, três choques elétricos de 1 mA com duração de 1 segundo cada foram apresentados com um intervalo de 20 segundos entre eles. Um minuto após o último choque, o animal era retirado da caixa experimental, retornando para sua caixa viveiro. Cerca de 24 horas após, o animal era recolocado na caixa experimental por quatro minutos sem que qualquer estímulo fosse apresentado. A resposta de congelamento foi observada durante os quatro minutos da sessão de teste exatamente da forma descrita anteriormente. Calculado na média desta resposta 24 machos e 24 fêmeas com a maior taxa de congelamento, bem como 24 machos e 24 fêmeas com a menor taxa de congelamento, foram acasalados entre si, evitando a formação de pares consangüíneos..

Os 48 pares de animais permaneceram acasalando por uma semana. Ao final deste período, todos os ratos machos (24 CAC, 24 CBC ) foram reagrupados em novas caixas viveiros, permanecendo por um outro período de três semanas de ambientação. Após este período, metade dos animais das linhagens CAC e CBC foram submetidos a uma cirurgia estereotáxica com objetivo de destruir o complexo amigdalóide bilateralmente. A outra metade destes dois grupos de animais recebeu lesões falsas.

Cerca de uma semana após a cirurgia, todos os animais foram expostos a um novo procedimento de condicionamento contextual aversivo. A resposta de congelamento foi registrada durante os três minutos iniciais da sessão de treino, que antecediam a apresentação dos choques elétricos, bem como aos quatro minutos da sessão de teste.

#### 4.1.4

#### **Procedimentos Cirúrgicos**

Para se perfazer as lesões eletrolíticas no complexo amigdalóide, os animais foram anestesiados com Tribromoetanol (250mg/kg) e fixados no aparelho estereotáxico (David Kopf, Tujunga, CA). Cada animal foi lesionado através da inserção de um eletrodo, implantado a 3 mm acima da amígdala, recebendo desta forma lesões eletrolíticas bilaterais. Utilizando-se bregma como referência as coordenadas utilizadas foram: AP – 3.2mm, ML 4.2mm, DV 5.8mm.

O ângulo do braço estereotáxico foi de 90°. Utilizando-se um lesionador, percorreu-se uma corrente de 5mA, com duração de 20 segundos, para se perfazer as lesões. Os animais que receberam as lesões falsas (sham) passaram pelos mesmos procedimentos, com a exceção de que nenhuma corrente foi apresentada.

#### 4.1.5

##### **Histologia**

Ao final do experimento, todos os animais foram sacrificados através de uma dose específica de Hidrato de Cloral (1ml/100g). Os animais foram perfundidos cardiacamente com salina e formol (4%) contendo potássio de ferrocianeto (1%). Os cérebros foram extraídos e guardados numa solução de formol (10%) com sacarose (20%), por pelo menos uma semana. Após este tempo, os cérebros foram seccionados através de um criostato, formando-se fatias com espessura de 50um e a cada três, uma fatia foi montada em lâminas preparadas para a coloração cresil violeta. Desenhos da região correspondente à área cerebral afetada pela lesão foram feitos com auxílio de um Atlas de cérebro de rato (Paxinos & Watson, 1986).

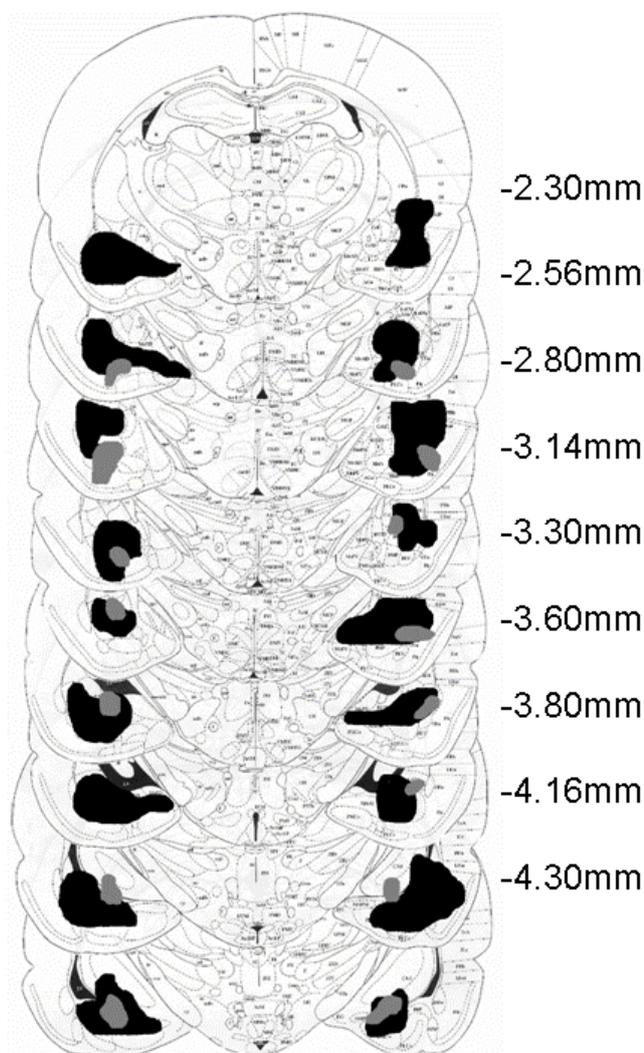
A fim de permitir a comparação da região afetada pela lesão e corrigir eventuais encolhimentos causados pela preparação histológica, os cortes histológicos foram montados em lâminas e sobrepostos em um micro-projetor sobre a estrutura correspondente do Atlas. A magnificação foi ajustada até que a estrutura projetada e a encontrada no Atlas se igualem. Desenhos da região correspondente à área cerebral afetada pela lesão foram feitos na devida escala. A extensão da perda celular e cromatólise foram estimadas através da multiplicação das divisões do Atlas nos sentidos anterior-posterior, medial-lateral e ventral-dorsal. Dados obtidos com lesões incorretas foram excluídos da análise estatística.

## 4.2

### Resultados

Dentre os 48 animais utilizados neste experimento, 14 morreram ao longo do experimento (1) ou apresentaram lesões fora da área do complexo amígdaloide (13).

A figura 4 apresenta uma composição de desenhos histológicos demonstrando áreas representativas das menores e maiores lesões na amígdala. Análises histológicas das lesões eletrolíticas bilaterais na amígdala indicaram que elas tenderam a ser simétricas, e danificaram grande parte das porções basolateral, central e lateral desta estrutura.

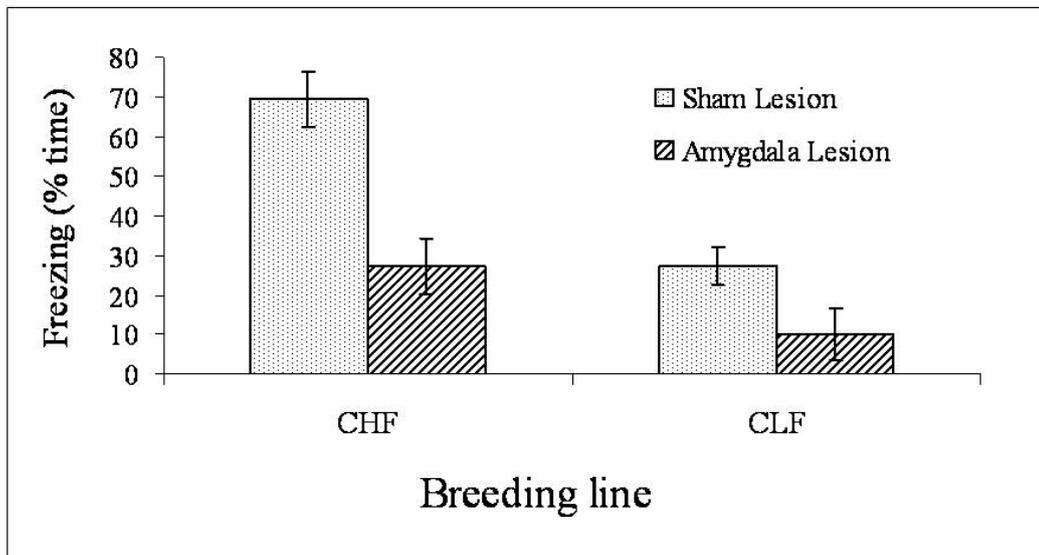


**Figura 4:** Composição das seções coronais, adaptada do Atlas Paxinos e Watson (1986). Números indicam a distância em milímetros de bregma. As menores lesões estão indicadas em cinza e as maiores em preto.

### 4.2.1

#### Análise Comportamental

A figura 5 mostra a porcentagem média de tempo gasto na resposta de congelamento para animais lesionados ou sham durante os 3 minutos de intervalo que precedem a segunda sessão de treino. Estes resultados foram analisados por uma ANOVA 2x2. O primeiro fator, com dois níveis, foi relacionado com o tipo de lesão (amígdala ou sham). O segundo fator, com três níveis, foi relacionado com as duas linhagens selecionadas (CAC e CBC). A ANOVA revelou uma ausência de uma interação significativa entre estes dois fatores ( $F(1,35)=3.1$ ;  $p>0.05$ ) e um efeito significativo principal da lesão ( $F(1,35)= 18.0$ ;  $p<0.001$ ) e linhagem selecionada ( $F(1,35)= 17.9$ ;  $p<0.001$ ). Comparações par-a-par indicaram que animais da linhagem CAC congelaram mais que os animais da linhagem CBC, e que lesões na amígdala nestes dois grupos causaram uma redução nas suas respostas de congelamento condicionado (todos os  $p$ 's  $<0.01$ ). Animais da linhagem CAC com lesões no complexo amigdalóide apresentaram mais congelamento condicionado dos que animais lesionados do grupo CBC ( $p=0.05$ ). Além disso, apesar das lesões no complexo amigdalóide serem capazes de diminuir o condicionamento contextual aversivo tanto no grupo CAC quanto no CBC, animais lesionados da linhagem CAC apresentaram significativamente mais congelamento condicionado comparados aos animais CBC. A diferença média das porcentagens entre animais lesionados e animais sham em cada linhagem foi calculada de forma a estimar o efeito das lesões no complexo amigdalóide no congelamento condicionado em cada uma destas linhagens. Esta é uma análise importante, já que animais sham do grupo CAC apresentaram uma porcentagem maior de congelamento condicionado em relação aos animais sham do grupo CBC. Estas análises revelaram que lesões no complexo amigdalóide levaram a redução de 60.6% na linhagem CAC e 63.0% na linhagem CBC.



**Figura 5:** Porcentagem média do tempo de congelamento condicionado durante os 3 minutos da sessão de teste das linhagens Carioca Alto (CAC) e Carioca Baixo (CBC) congelamento.