

## 5.

### **Experimento1: Efeito do condicionamento contextual de medo na resposta de pulos e corridas induzida pela microinjeção de NMDA na matéria cinzenta periaquedutal dorsal**

#### 5.1.

##### **Materiais e Métodos**

##### 5.1.1.

##### **Animais**

Foram utilizados 26 ratos albinos machos, experimentalmente ingênuos em torno de 3 a 4 meses de idade pesando 250-300 gr foram utilizados como sujeitos experimentais. Uma semana antes do início do experimento, todos os animais foram manuseados uma vez por dia. A temperatura ambiente do biotério foi mantida em torno de 22° C. As luzes do biotério foram mantidas num intervalo de 12 horas iluminado por 12 horas de escuro. Os treinos e testes ocorreram durante o período iluminado do ciclo. Os experimentos foram todos conduzidos segundo as normas da SBNeC (Sociedade Brasileira de Neurociência e Comportamento).

##### 5.1.2.

##### **Equipamento**

Foi utilizado o campo aberto com a função de quantificar as respostas de saltos e corridas emitidas pelo animal através da ação do NMDA na MCPD; utilizou-se também uma grade de choque randomizada localizada no próprio campo aberto para induzir choques nas patas, para elevação da ansiedade do animal e para o condicionamento de medo ao contexto. O comportamento dos animais foi observado através de um sistema de câmera interna, suas imagens passadas e gravadas diretamente no computador. Para microinjeção foi utilizada uma seringa Hamilton de 5.0 µl, tubo de polietileno (PE50 e PE10) para condução do NMDA e uma agulha gengival (13.5mm) para ser introduzida na cânula guia.

### 5.1.3.

#### Drogas

Foi utilizado o pentilenotetrazol (*Sigma, USA*). Antes da injeção, o PTZ foi diluído em água destilada e injetado intraperitonealmente (i.p.) e NMDA (*Sigma, St. Louis, USA*).

### 5.1.4.

#### Cirurgia

Cada animal foi anestesiado com tribromoetanol intraperitonealmente na concentração de 25 mg/kg, recebendo uma associação antibiótica de largo espectro (Pentabiotico, Foutoura-Wyeth-Brasil), 0.2ml intramuscular, a fim de prevenir possíveis infecções. Após a anestesia, os animais foram afixados em um aparelho exteriorotáxico (*Harvard Apparatus*). Uma assepsia local com álcool iodado, seguido de anestesia subcutânea local (lidocaina) foi ministrada, o calvário exposto e o periósteo removido com auxílio de tesoura e pinça. Uma solução de água oxigenada seguida de aquecimento por um secador de cabelo comum facilitou a visualização de lambda. Com o crânio fixo na horizontal, usando o ponto interaural como referência (Paxinos e Watson.,1986) , a cânula guia era inserida na MCPD (AP = +2.3 mm; DV = -4.5 mm e ML = -1.7 mm). Uma cânula guia com o comprimento de 12,5 mm foi afixada ao crânio com acrílico dental. Para a microinjeção foi utilizada uma agulha gengival cujo comprimento foi 1 mm maior do que aquele da cânula guia.

### 5.1.5.

#### Procedimento

Os ratos foram submetidos a cirurgia para o implante da cânula e depois de seis dias eram divididos em quatro grupos (choque – salina; choque – NMDA; não choque – salina; não choque – NMDA) e treinados na caixa de condicionamento ao contexto. Durante a fase de condicionamento do medo ao contexto, os animais eram colocados em uma caixa de condicionamento, e, depois de dez minutos de habituação, se dava início à apresentação dos estímulos

aversivos, consistentes em quatro choques (1.0 mA, 1s), com intervalo de vinte segundos entre cada choque.

Depois do condicionamento, os ratos eram deixados por 6 horas na gaiola habitat. Passado esse período, dava-se início à segunda fase, na qual era realizada a microinjeção (0.3  $\mu$ l) de NMDA (15mg/kg) ou salina. Imediatamente após a aplicação, os sujeitos eram colocados na caixa de condicionamento e suas respostas de fuga (número e tempo de corridas e número de pulos) eram registradas, utilizando uma câmera.

## 5.2.

### Resultados Comportamentais

#### -Frequência de corridas

A Tabela 1. ilustra, de forma clara, a mediana dos resultados obtidos nos comportamentos de correr e pular dos ratos tratados. O teste de *Kruskal-Wallis* mostrou uma diferença geral entre os grupos,  $H(3) = 15,0$  ;  $P = 0,002$  para frequência de corrida. O teste de Mann Whitney mostrou que os ratos tratados com NMDA correram mais que os ratos que receberam injeção de salina. O mesmo teste também mostrou que os sujeitos submetidos ao condicionamento correram menos que os ratos que não foram submetidos. Finalmente, o teste mostrou que os ratos que foram tratados com NMDA e que receberam o condicionamento correram menos que os ratos que foram submetidos ao mesmo tratamento, mas não receberam o condicionamento ( $P < 0,05$ ).

#### -Tempo de corridas

O teste *Kruskal-Wallis* mostrou uma diferença geral no tempo de corrida entre os grupos,  $H(3) = 15,0$  ;  $P = 0,002$ .

#### -Frequência de pulos

O teste de *Kruskal-Wallis* mostrou uma diferença geral na frequência de pulos entre os grupos,  $H(3) = 10,77$  ;  $P = 0,013$ .

Tabela 1. Mediana dos comportamentos de correr e pular de ratos tratados com injeção intracerebral de NMDA (0,3 µl) e salina (0,3 µl).

Tratamento	Condicionamento ao contexto	
	Ausente	Presente
<b>Frequência de corridas</b>		
Salina Intracerebral	0,0 (0-0)	0,0 (0,0)
NMDA Intracerebral	1,5 (0-6)	0,0 (0-0)
<b>Frequência de pulos</b>		
Salina Intracerebral	0,0 (0-0)	0,0 (0-0)
NMDA Intracerebral	3,5 (0-25)	0,0 (0-7)
<b>Tempo gasto correndo (s)</b>		
Salina Intracerebral	0,0 (0-0)	0,0 (0-0)
NMDA Intracerebral	9,5 (0-68)	0,0 (0-0)