

3

Metodologia

3.1

Animais

Os animais selecionados para este experimento foram obtidos no biotério do Laboratório de Neuropsicologia Clínica e Experimental da PUC-Rio, sob temperatura de 22 °C e luminosidade controlada, com ciclos claro/ escuro alternados a cada 12 horas e este trabalho foi realizado durante o período de luminosidade clara.

De seis a oito dias depois do nascimento, os animais foram marcados com amputação de um dedo de cada pé. Depois de o animal completar 21 dias, os animais foram separados por sexo em grupos de seis em gaiolas de polietileno com medidas de 18x31x38 cm, os animais tiveram acesso *ad libitum* à água e comida.

Os experimentos foram realizados com ratos Wistar (n =27), machos, com peso entre 250 e 350 g. Uma semana antes do início do experimento, todos os animais foram manuseados uma vez por dia por um período de 2 minutos para cada um. Os experimentos foram todos conduzidos segundo as normas da SBNeC (Sociedade Brasileira de Neurociência e Comportamento).

3.2

Cirurgia

Os animais foram escolhidos ao acaso e divididos em 4 grupos: lesão no HD (n=8), controle HD (n=6), lesão no HV (n=7) e controle HV (n=6). Estes animais foram anestesiados com xylazina e ketamina intraperitonealmente na concentração de (0,1mg/100g) para ambas drogas, também receberam uma associação antibiótica de largo espectro (Pentabiótico, Fontoura- Wyeth-Brasil), 0,2 ml via intramuscular, a fim de prevenir possíveis infecções. Após a anestesia e a dose de pentabiótico, os animais foram afixados em um aparelho estereotáxico (David Kopf, Tujunga, CA). Uma assepsia local com álcool iodado, seguido de anestesia subcutânea local (lidocaína) foi ministrada.

Com o crânio fixo na horizontal, usando como referência (Paxino e Watson 1986) foram utilizadas as seguintes coordenadas para a realização da lesão eletrolítica bilateral: **HD**, (AP = -2,8 mm; ML = +/-1,8; DV = - 3,8 mm ventral) e para o **HV**, (AP = -5,2 mm; ML = +/-5,3 Mm; DV = - 6,0mm ventral). Esta lesão foi realizada através da inserção de um eletrodo, utilizando-se um lesionador percorreu-se uma corrente de 5 mA, com duração de 20 seg.

Os animais controles passaram pelo mesmo procedimento a exceção de que nenhuma corrente foi passada. Depois da lesão eletrolítica, um eletrodo unilateral foi implantado na **MCPD**, (AP = +2,3 mm; ML = -1,7 mm; DV = -4,5 mm) sem inclinação em relação ao plano sagital. O eletrodo foi afixado ao crânio com um parafuso e com acrílico dental.

3.3

Equipamento.

Os testes comportamentais foram realizados em uma caixa experimental quadrangular medindo 25 x 20 x 20 cm. Duas paredes eram de alumínio e as outras duas de acrílico. A base da caixa tinha 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 8 canais (Insight, Riberão Preto) conectada a um micro computador, permitiu a apresentação dos choques elétricos. Esta caixa experimental estava em isolamento acústico. No teto desta caixa experimental foi instalado um conector elétrico ligado a duas saídas. A primeira saída estava ligada a um estimulador, gerador de corrente senoidal de 60 Hz e constante (Marseillan, 1977), o qual permitia a estimulação elétrica da MCPD. A corrente elétrica aplicada foi monitorada através de um osciloscópio conectado a um estimulador (Insight, Riberão Preto). A outra saída do conector estava ligada a um cabo flexível que se encaixava nos pólos do eletrôdo implantado no cérebro do animal. Permitindo a passagem da corrente elétrica. Uma lâmpada vermelha de 25 W foi instalada no teto da câmara de isolamento acústico o que permitia a observação dos animais durante os testes comportamentais através de um monitor. A sala onde foram realizados os experimentos possuía um extrator que produzia um ruído de fundo constante.

3.4

Eletrodo

O eletrodo foi feito de aço inoxidável (160 μm de diâmetro e 13,5 mm de comprimento), isolado exceto nas seções transversas das extremidades. A estimulação elétrica da MCPD ocorreu a partir da seção transversa distal do eletrodo. O eletrodo podia ser conectado a um pino macho e então conectado a um soquete no final de um cabo elétrico flexível e usado para a estimulação elétrica cerebral. Também se utilizou uma cânula unilateral que foi implantada na MCPD do animal para permitir a passagem de corrente elétrica para a MCPD.



Figura 3: Eletrodo e cânula

3. 5

Procedimento

3.5.1

Dia 1 - Congelamento e fuga induzida pela estimulação elétrica da Matéria cinzenta periaquedutal dorsal e congelamento pós-fuga.

Sete dias após a cirurgia, cada animal foi colocado dentro da caixa experimental por um período de 5 minutos para habituação. Depois disso, a estimulação elétrica da MCPD foi apresentada através do eletrôdo implantado nesta área (AC, 60 Hz, 15 s). O intervalo entre os estímulos elétricos foi de 1 minuto e a intensidade da corrente foi iniciada com 10 0mA e aumentada gradualmente em 5 mA. O limiar de congelamento foi operacionalmente definido como a menor intensidade de corrente necessária para produzir imobilidade geral motora (resposta de congelamento) e, seguido a este limiar, se buscou o limiar de fuga, ou seja, a menor intensidade de corrente utilizada para produzir o comportamento de corrida ou saltos (resposta de fuga). Animais com um limiar de fuga maior de 150 mA foram descartados do experimento.

Depois de coletar tanto o limiar de congelamento como o de fuga, se prosseguiu a medir o congelamento pós fuga por um período de 12 minutos. A resposta foi registrada através de um procedimento de amostragem de tempo. A cada dois segundos, o experimentador marcou o comportamento do animal quando estava em congelamento ou quando mostrava atividade motora. Uma solução de amônia foi utilizada para limpar a caixa experimental depois de retirar cada animal.

3.5.2

Dia 2 - Condicionamento Contextual Aversivo

Passadas 24 horas da estimulação elétrica, cada animal foi colocado na mesma caixa experimental por um período de 5 minutos para habituação. Depois do período de habituação, se deu início a apresentação dos estímulos aversivos, consistentes em três choques (0.6 mA) com intervalos de 20 segundos entre cada choque.

Todos os animais foram submetidos ao condicionamento ao contexto com a função de verificar as lesões eletrolíticas tanto no hipocampo dorsal e ventral. O congelamento pós-choque foi medido durante 3 minutos através do mesmo procedimento utilizado para medir o congelamento pós fuga no Dia 1. Depois da sessão de teste, os animais retornaram para o biotério e foram postos na mesma gaiola onde estavam anteriormente.

3.5.3

DIA 3 - Teste ao contexto

Cerca de 24 horas após o condicionamento contextual aversivo, o animal é recolocado na mesma caixa experimental por um período de 12 minutos. Nenhuma apresentação de choque é administrada durante estes 12 minutos e o comportamento de congelamento é registrado da mesma maneira que se registrou o congelamento pós- fuga no dia 1. Depois da sessão de teste, os animais retornaram para o biotério e foram postos na mesma gaiola donde estavam anteriormente.

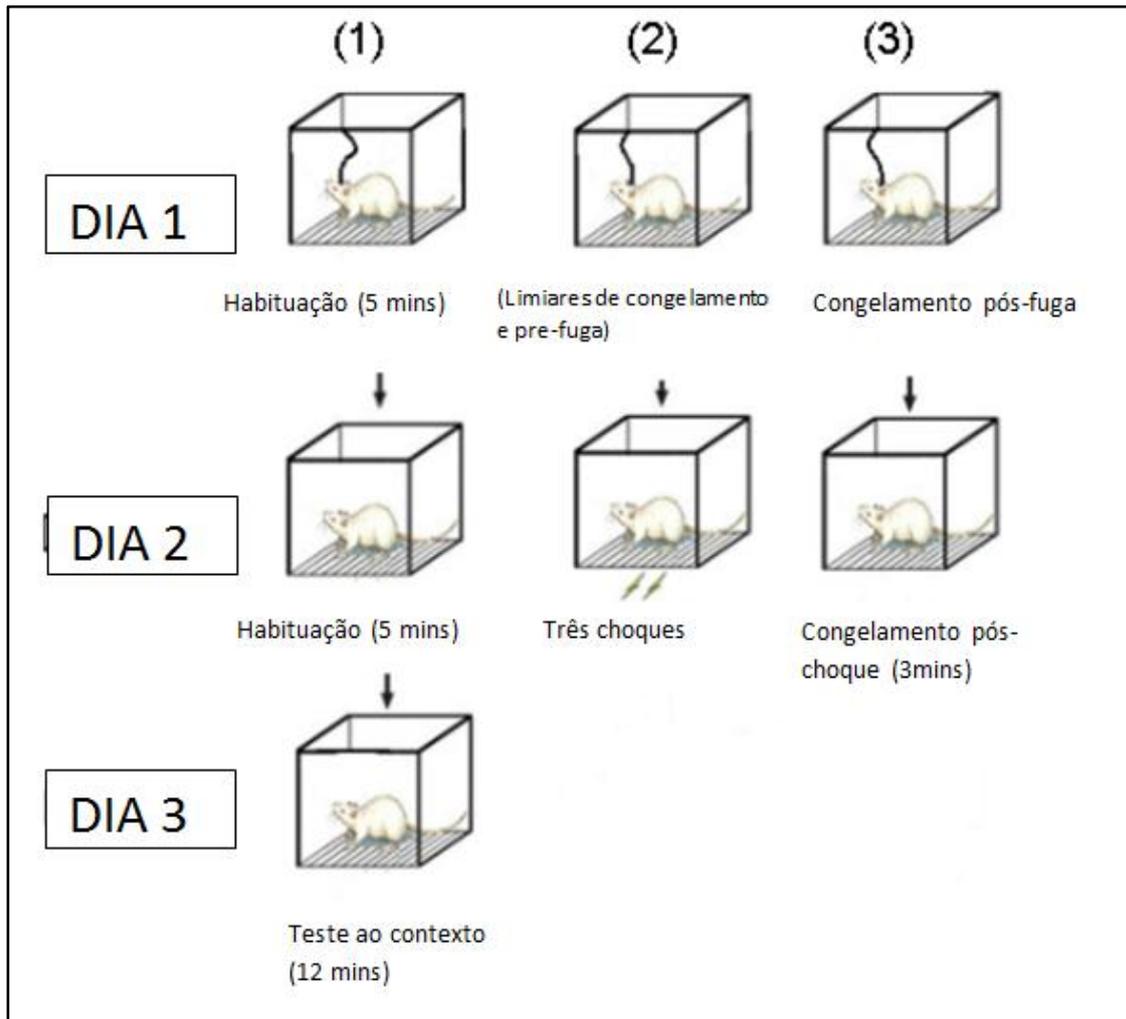


Figura: 4 Procedimento. **Dia 1:** (1) O animal foi colocado na caixa experimental por um período de 5 minutos. (2) O animal foi estimulado eletricamente na MCPD e foram coletados os limiars de congelamento pré-fuga e fuga. (3) Depois de achar os limiars, o congelamento pós-fuga foi coletado por um período de 12 minutos. **Dia 2:** (1) 24 horas após a estimulação da MCPD, cada animal foi colocado na mesma caixa por 5 minutos e foram apresentados 3 choques com intervalos de 20 segundos. O congelamento pós-choque foi medido da mesma maneira como o congelamento foi medido no dia 1. **Dia 3:** (1) 24 horas após a apresentação dos choques, o animal foi recolocado na mesma caixa experimental e o comportamento de congelamento foi medido por um período de 12 minutos