

9

Experimento 3

Avaliação Comportamental do Pânico em Modelos Animais em duas linhagens: Carioca Alto Congelamento e Carioca Baixo Congelamento.

9.1

Sujeitos

Animais geneticamente selecionados para alto (CAC) e baixo (CBC) congelamento dentro do paradigma de medo contextual foram obtidos de acordo com procedimento descrito em trabalho feito anteriormente em nosso laboratório (Gomes e Landeira-Fernandez, 2008). De forma resumida, ratos albinos foram colocados numa caixa experimental de acrílico transparente. Cinco minutos depois, três choques nas patas randomizados e não sinalizados (0.7mA, 1s de duração) foram feitos com intervalos de 20s entre eles. Três minutos após o último choque, o animal era retirado da caixa experimental e colocado de volta a sua gaiola viveiro. Aproximadamente 24hs depois da sessão de treino, o animal era recolocado na mesma caixa experimental para uma sessão teste de 8 min sem a apresentação de choque nas patas. O presente estudo empregou 7 machos CAC e 7 machos CBC da nona geração com maiores (CAC) e menores (CBC) níveis de congelamento. Todos os 14 animais foram empregados como procriadores no programa de procriação seletiva antes de iniciarem o experimento.

Os animais foram colocados em grupos de cinco a sete indivíduos de acordo com sua linhagem respectiva, em gaiola viveiro (18 x 31 x 38 cm³) com acesso a água e comida ad libitum. A temperatura da sala era controlada (24 ± 1°C), com ciclo de claro e escuro de 12h/12h (07:00-19:00h). O experimento foi conduzido durante a fase clara do ciclo. Os animais tinham 6 meses de vida no início do experimento. Os procedimentos experimentais foram desenvolvidos de acordo com a sociedade brasileira de neurociência e comportamento, que se baseia no United States National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (revisado em 1996).

9.2

Cirurgia

Todos os 14 animais foram implantados com uma cânula guia direcionada a MCPD. Os animais receberam uma anestesia de tribromoetanol (250mg/kg, i.p.). Após o efeito da mesma, os animais eram afixados ao exteriorotáxico (David Kopf, Tujunga, CA) e injetados localmente com lidocaína (20mg/ml). As coordenadas que foram utilizadas para implantação da cânula guia tiveram lambda como ponto de referência, de acordo com o atlas do cérebro do rato de Paxinos e Watson (1986): Antero/posterior, +2.3mm; Medial/lateral, -1.7mm; Dorsal/Ventral, -4.5mm. A cânula guia foi fixada ao crânio do animal com uma resina acrílica e 1 mini parafuso de aço inoxidável. Um mini estilete com o mesmo comprimento da cânula guia foi introduzido na mesma para prevenir possível obstrução.

9.3

Material

O experimento 3 foi conduzido na mesma caixa experimental (25 x 20 x 20 cm³) do experimento 1.

9.4

Procedimento

Sete dias após a cirurgia, os dois grupos de animais (CAC e CBC) foram colocados na caixa experimental, já tendo passado por 3 dias de manipulação (3 minutos cada animal) seguidos. Cinco minutos depois, os limiares de congelamento e fuga foram determinados através de um estimulador elétrico (insight equipamentos, Brasil), a corrente elétrica foi conduzida através de um fio ligado a uma peça de eletrodo móvel (PlasticsOne Inc) conectada a uma cânula guia e direcionada a MCPD. A estimulação cerebral (AC, 60Hz, 15s) foi apresentada em intervalos de 1 min com intensidade da corrente iniciando a partir de 5μA e aumentando 5μA a cada nova tentativa. O limiar de congelamento foi

operacionalmente definido como a menor intensidade de corrente a produzir não observância de movimento com exceção da respiração, acompanhada de pelo menos duas respostas autonômicas: defecação, piloereção, exoftalmia e micção. A intensidade da corrente que produzisse comportamentos de corrida e pulos foi considerada o limiar de fuga. A estimulação elétrica da MCPD era interrompida quando o limiar para o comportamento de fuga era atingido. Para investigar o comportamento de congelamento que se iniciava após o término da estimulação elétrica da MCPD para o limiar de fuga, os animais permaneciam na caixa experimental por mais 8 min sem qualquer estimulação. Durante este período, o comportamento de congelamento era avaliado a cada 2s por um observador treinado.

Após o experimento, os animais eram sacrificados com hidrato de cloral. O cérebro perfundido com solução salina (0.9%) seguido de solução de formalina (10%), removido e colocado numa solução de formalina com sacarose. Para a histologia, o cérebro era congelado a -20° num criostato e cortes de $55\mu\text{m}$ eram feitos para localizar a posição do eletrodo de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (1986). Apenas os dados de animais nos quais a ponta do eletrodo se localizava dentro da MCPD foram incluídos na análise estatística. Os animais que não seguiram estes critérios foram devidamente descartados.

9.5

Resultados

Uma primeira ANOVA de duas vias de medidas repetidas foi utilizada para avaliar as diferenças nos limiares aversivos (congelamento e fuga) entre os animais CAC e CBC. Uma segunda ANOVA de duas vias de medidas repetidas foi também utilizada para avaliar as diferenças nos animais CAC, CBC e CPF durante 8 minutos de análise a que os mesmos foram submetidos. Para os dados significativos da ANOVA foi utilizado o teste de Newman Keuls como post hoc. Valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Análises histológicas das partes cerebrais indicaram que todas as pontas dos eletrodos estavam localizadas dentro da MCPD. O grupo utilizado no trabalho final ficou estabelecido desta forma: CAC, $n = 7$; CBC, $n = 7$. Os sítios

representativos da estimulação elétrica da MCPD são mostrados na figura 13. abaixo.

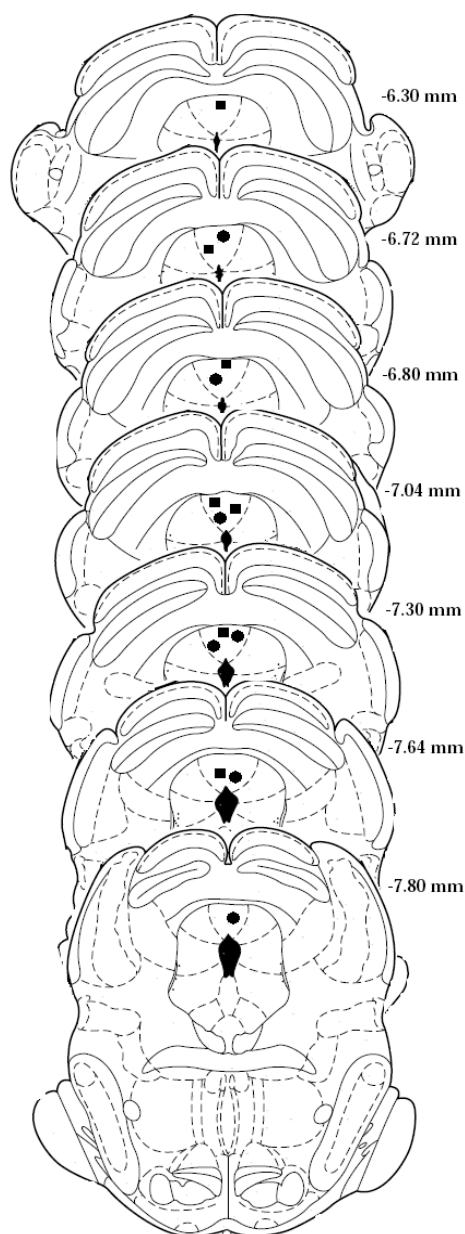


Figura 13. Composição dos eletrodos de estimulação dentro da MCPD. De acordo com o atlas de Paxinos e Watson (1986), os números do lado direito de cada prancha indicam a distancia em milímetros de bregma. Animais CAC são representados por círculos e animais CBC são representados por quadrados.

Como visto anteriormente (Oliveira, Nobre, Brandão e Landeira-Fernandez, 2004), as respostas de congelamento e fuga induzidas pela estimulação elétrica da MCPD ocorreram de maneira gradual. Assim que a intensidade da corrente aplicada na MCPD era aumentada, os animais paravam repentinamente, ficavam imóveis e com frequência urinavam e defecavam. Em maiores intensidades, este comportamento de congelamento dava lugar a reações vigorosas de corridas e pulos. A resposta de fuga terminava assim que a estimulação elétrica na MCPD era desligada. A figura 14. mostra a média ($\pm$ SEM) do limiar de corrente elétrica necessária para acionar os comportamentos de congelamento e

fuga em animais CAC e CBC. A primeira ANOVA de duas vias de medidas repetidas revelou um efeito principal nas linhagens ($F[1,12] = 5.42, p < 0.05$) e limiar aversivo ($F[1,12] = 234.37, p < 0.0001$). Nenhuma interação entre limiares aversivos e linhagem foi encontrada ($F[1,12] = 0.37, p > 0.5$). A análise post hoc indicou que os animais CAC apresentaram um limiar de congelamento e fuga mais alto do que os animais CBC (Ambos $p < 0.05$).

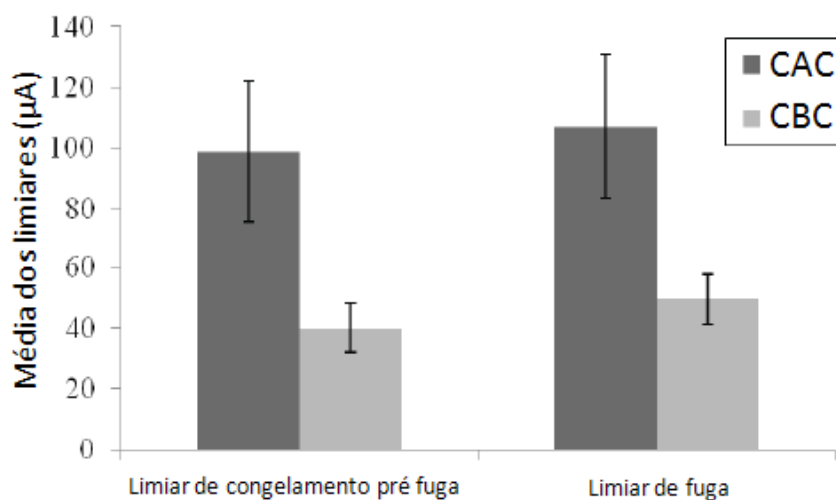


Figura 14. Média ($\pm$ SEM) dos limiares de congelamento e fuga determinados através do procedimento de estimulação elétrica da MCPD em duas linhagens (CAC; CBC)

A figura 15. mostra a média ($\pm$ SEM) de porcentagem de tempo que os animais CAC e CBC tiveram de CPF após o término da estimulação elétrica na MCPD. A segunda ANOVA de duas de medidas repetidas vias utilizando medidas repetidas mostrou efeito significativo da linhagem ($F[1,12] = 12.10, p < 0.005$), nenhum efeito de tempo ($F[1,12] = 2.18, p > 0.1$) ou interação entre as linhagens dos animais durante os 8 minutos de CPF ($F[1,12] = 0.34, p > 0.5$) foi encontrado.

A análise post hoc indicou que os animais CAC mostraram uma frequência maior de CPF comparado com os animais CBC durante os 8 minutos de análise (todos $p < 0.05$). Devido ao fato dos animais CAC requererem um limiar de corrente maior que dos CBC para eliciar a resposta de fuga, é possível que as diferenças entre estes dois grupos no comportamento de congelamento, que ocorre exatamente após a reação de fuga eliciada pela estimulação elétrica da MCPD, pode ser devido a diferenças nos limiares das correntes entre CAC e CBC. De forma a testar esta possibilidade, uma análise de covariância (ANCOVA) usando o parâmetro de limiar de fuga da MCPD como fator covariante foi feita. Os

resultados desta análise indicaram uma confirmação de efeito na linhagem ($F[1,12] = 9.34$, $p = 0.01$), um efeito no tempo ($F[1,12] = 8.47$, $p = 0.01$) e nenhuma interação entre as linhagens dos animais durante o período de 8 minutos de CPF ($F[1,12] = 0.55$, $p > 0.4$) foi encontrada.

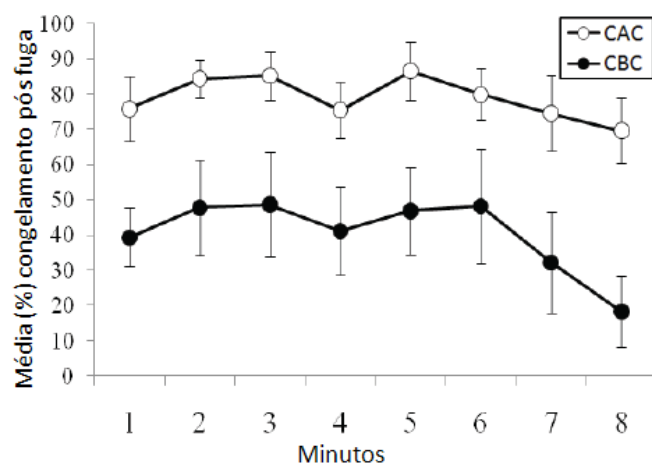


Figura 15. Média ($\pm$ SEM) dos limiares de congelamento dos animais CAC e CBC durante o período de 8 minutos após a interrupção da estimulação elétrica aplicada na MCPD para eliciação do comportamento de fuga.