

7

Experimento 1

Efeito de Lesões eletrolíticas no Córtex Cingulado Anterior Rostral na Analgesia Condicionada e no Comportamento de Defesa eliciado pela Estimulação Elétrica da MCPD.

7.1

Sujeitos

Os sujeitos foram 20 machos wistar entre 200 e 340g. Os animais foram colocados em grupos de cinco a sete indivíduos em gaiola viveiro (18 x 31 x 38 cm³) com acesso a água e comida ad libitum. A temperatura da sala era controlada ($24 \pm 1^\circ\text{C}$), com ciclo de claro e escuro de 12h/12h (07:00-19:00h). O experimento foi conduzido durante a fase clara do ciclo. Os 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).

7.2

Cirurgia

Todos os 26 animais foram implantados com uma cânula guia direcionada a MCPD com coordenadas similares ao experimento 1. Após a implantação da cânula guia, foram efetuadas lesões eletrolíticas bilaterais no córtex cingulado anterior rostral (CCAr) de 13 animais (grupo experimental). A lesão eletrolítica foi aplicada através de um lesionador elétrico (insight equipamentos, Brasil), a corrente elétrica (1mA, 20s de duração) para a lesão foi conduzida através de um fio conectado a uma peça de eletrodo (PlasticsOne Inc) direcionada a MCPD. As coordenadas que foram utilizadas para lesão eletrolítica tiveram lambda como ponto de referência, de acordo com o atlas do cérebro do rato de Paxinos e Watson (1986): Antero/posterior, +2.7mm; Medial/lateral, $\pm 0.5\text{mm}$; Dorsal/Ventral, +2.2mm. O grupo controle da lesão eletrolítica teve

procedimento cirúrgico idêntico, porém nenhuma corrente elétrica para lesão foi acionada e conduzida pelo eletrodo.

7.3

Material

O experimento foi conduzido numa caixa experimental (25 x 20 x 20 cm³) e a mesma colocada dentro de uma caixa antirruído. Uma luz vermelha (25W) foi colocada no interior da caixa antirruído, uma câmera foi colocada atrás da caixa experimental para captar o comportamento do animal num monitor que fora instalado fora da sala experimental. Um miniventilador foi afixado dentro da caixa antirruído, provendo assim um ruído branco de 78dB.

7.4

Procedimento

Sete dias após a cirurgia, os dois grupos de animais (lesados e não lesados) 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 10μA 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 12 min sem qualquer estimulação. Durante este período, o

comportamento de congelamento era avaliado a cada 2s por um observador treinado.

No segundo dia, cada rato foi colocado numa caixa experimental de acrílico transparente. Cinco minutos depois, três choques nas patas randomizados, não sinalizados (1mA, 1s de duração) e de severidade pequena (Fanselow, 1984) 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. A caixa experimental era limpa antes e depois de cada animal adentrá-la com 5% de uma solução de amônia, para retirar qualquer marca residual de cheiro, urina ou fezes.

No terceiro dia, a sensibilidade à dor (analgesia condicionada) foi medida com o teste de formalina (Dubuisson e Dennis, 1977; Fanselow, 1984). Para cada rato foi dada uma injeção (sc) de .05ml de formalina a 15% sob a superfície dorsal da pata direita traseira do animal. Após a injeção de formalina, o animal era recolocado na mesma caixa experimental para uma sessão teste de 60 min. Um observador cego para as condições de tratamento (grupo lesado/grupo não lesado) marcou cada comportamento do animal dentro das categorias seguintes: (a) congelamento - foi definido como ausência de movimento corporal com exceção do necessário para respiração; (b) pata levantada - foi definido como um movimento no qual o animal levanta ou mantém a pata tratada próxima ao corpo; (c) pata lambida - foi definido como qualquer lambida ou contato da pata tratada com a boca do animal; (d) atividade - foi definido como qualquer outra atividade locomotora. Pata levantada e pata lambida foram colocadas dentro de uma única categoria: comportamento recuperativo para fins de uma primeira análise. Em seguida pata levantada foi colocada na categoria de congelamento para fins de segunda análise.

7.5

Resultados

Uma primeira ANOVA de duas vias de medidas repetidas foi utilizada para avaliar as diferenças nos limiares aversivos (congelamento e fuga) dos animais lesados e não lesados. Uma segunda ANOVA de duas vias de medidas repetidas foi também utilizada para avaliar as diferenças no CPF entre os animais

lesados, não lesados e os 12 minutos de análise a que os mesmos foram submetidos. Para os dados significativos da segunda 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: Lesados, $n = 10$; Não lesados, $n = 10$.

A figura 5. mostra a média ($\pm$ SEM) do limiar de corrente elétrica necessária para acionar os comportamentos de congelamento e fuga em animais lesados e não lesados. A primeira ANOVA de duas vias de medidas repetidas revelou um efeito principal para os limiares aversivos ($F[1,18] = 42.27$, $p < 0.0001$), mas não para os grupos lesados e não lesados ($F[1,18] = 0.01$, $p = 0.92$). Nenhuma interação entre limiares aversivos e os grupos foi encontrada ($F[1,18] = 0.02$, $p = 0.91$).

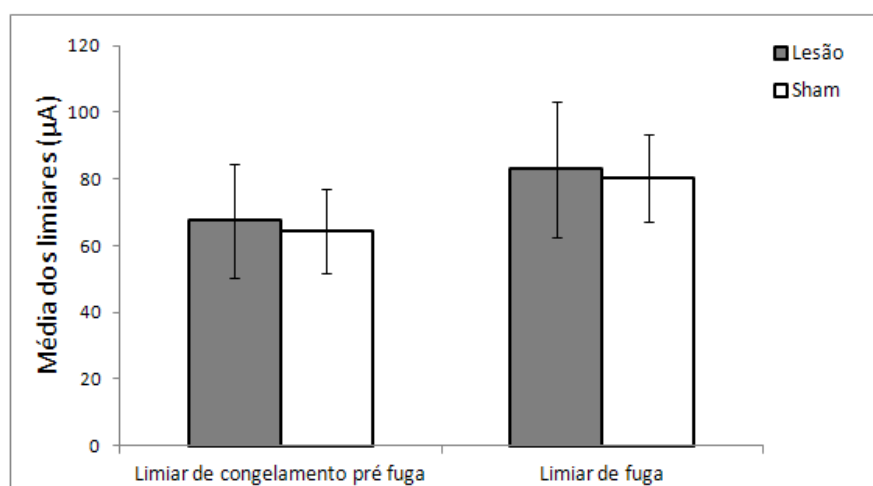


Figura 5. Média ($\pm$ SEM) dos limiares de congelamento e fuga determinados através do procedimento de estimulação elétrica da MCPD nos animais lesados e não lesados no CCAr.

A figura 6. mostra a média ($\pm$ SEM) de porcentagem de tempo que os animais lesados e não lesados tiveram de CPF após o término da estimulação elétrica na MCPD. A segunda ANOVA de duas vias de medidas repetidas mostrou efeito significativo para os grupos lesados e não lesados ($F[1,18] = 315.84$, $p < 0.0001$), mas não houve efeito de tempo ($F[1,18] = 1.22$, $p = 0.28$) e não houve interação entre os grupos e tempo no CPF durante os 12 minutos ($F[1,18] = 0.92$, $p = 0.52$) de análise.

A análise post hoc indicou que os animais lesados mostraram uma frequência menor de CPF comparado com os animais não lesados durante os 12 minutos de análise ($p < 0.001$).

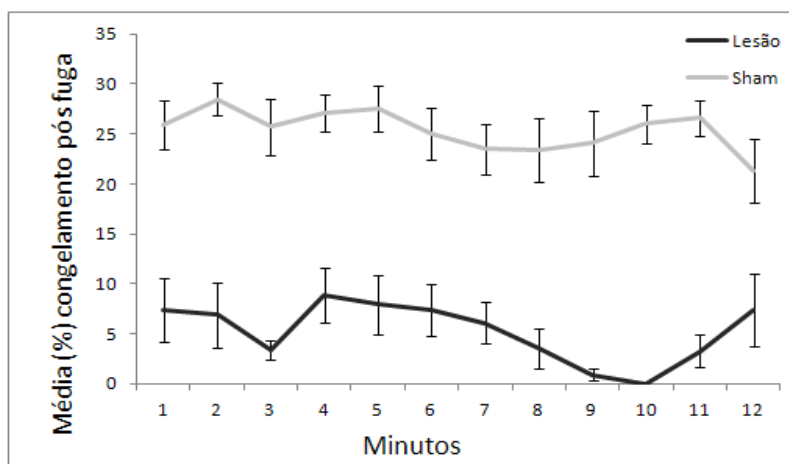


Figura 6. Média ($\pm$ SEM) dos limiares de congelamento dos animais lesados e não lesados no CCAR durante o período de 12 minutos após a interrupção da estimulação elétrica aplicada na MCPD para eliciação do comportamento de fuga

Duas ANOVA de duas vias de medidas repetidas foram utilizadas para avaliar as diferenças nos comportamentos de congelamento e recuperação entre os animais lesados e não lesados.

As figuras 7. e 8. mostram a média ($\pm$ SEM) de porcentagem de tempo que os animais lesados e não lesados tiveram de comportamento de congelamento e recuperação durante o paradigma de analgesia condicionada. Uma primeira ANOVA de duas vias de medidas repetidas revelou um efeito principal para os grupos lesados e não lesados ($F[1,39] = 176.75$, $p < 0.001$), e para congelamento e recuperação tendo pata levantada como índice de recuperação ($F[1,39] = 133.59$, $p < 0.001$). Houve interação entre congelamento, recuperação e os grupos ($F[1,39] = 366.23$, $p < 0.001$).

A análise post hoc indicou que os animais lesados e não lesados tiveram diferença tanto em comportamento recuperativo quanto em congelamento ($p < 0.001$).

As figuras 9. e 10. mostram a média ($\pm$ SEM) de porcentagem de tempo que os animais lesados e não lesados tiveram de comportamento de congelamento e recuperação durante o paradigma de analgesia condicionada. Uma segunda ANOVA de duas vias de medidas repetidas revelou um efeito principal para os grupos lesados e não lesados ($F[1,39] = 11.05$, $p < 0.02$), e para congelamento e

recuperação tendo pata levantada agora como índice de congelamento ($F[1,39] = 153.43$ $p < 0.001$). Houve interação entre congelamento, recuperação e os grupos ($F[1,39] = 279.38$, $p < 0.001$).

A análise post hoc indicou que os animais lesados e não lesados tiveram diferença tanto em comportamento recuperativo quanto em congelamento ($p < 0.001$). Em função da interação encontrada nas duas ANOVAS, novas análises foram necessárias para investigar o fenômeno. A tabela 3. faz uma comparação minuto a minuto utilizando o test-t student pareado ao longo dos 60 minutos do teste de formalina dentro do paradigma de analgesia condicionada.

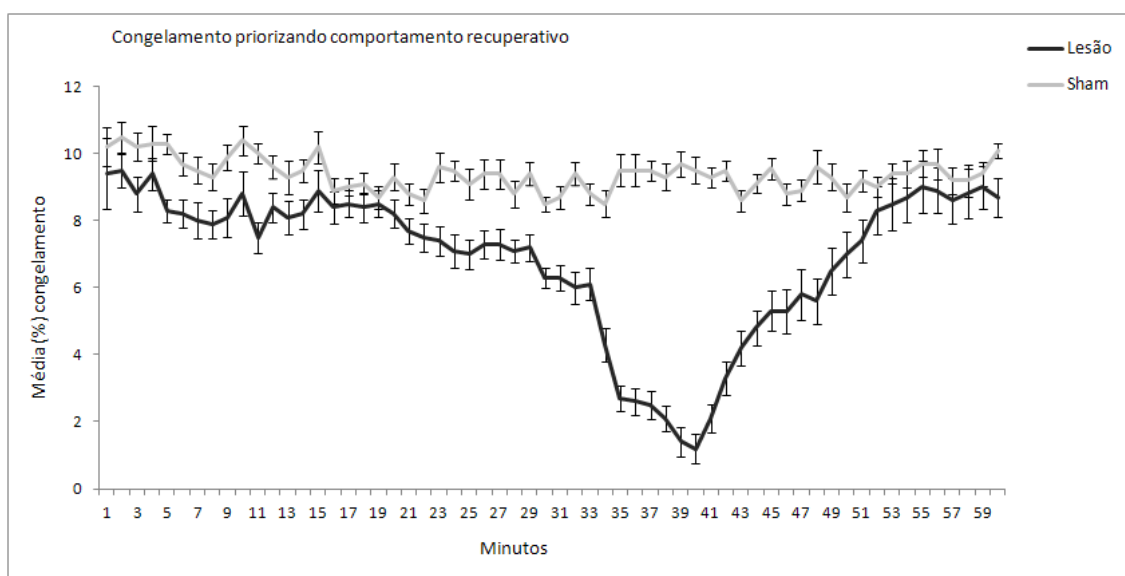


Figura 7. Média ($\pm$ SEM) do comportamento de congelamento dos animais lesados e não lesados no CCAr durante o período de 60 minutos do teste de formalina no paradigma de analgesia condicionada.

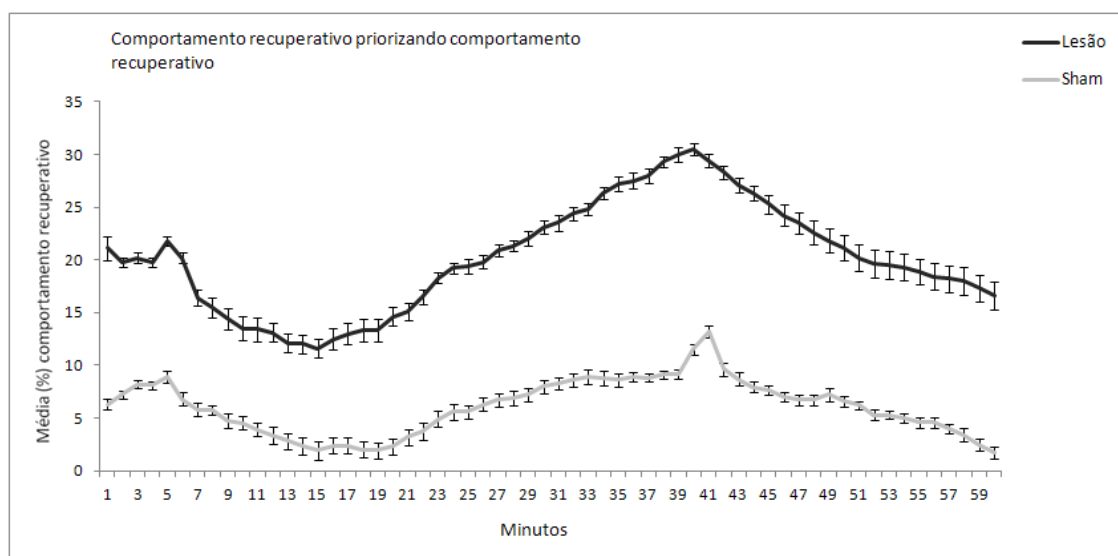


Figura 8. Média ($\pm$ SEM) do comportamento recuperativo dos animais lesados e não lesados no

CCAr durante o período de 60 minutos do teste de formalina no paradigma de analgesia condicionada.

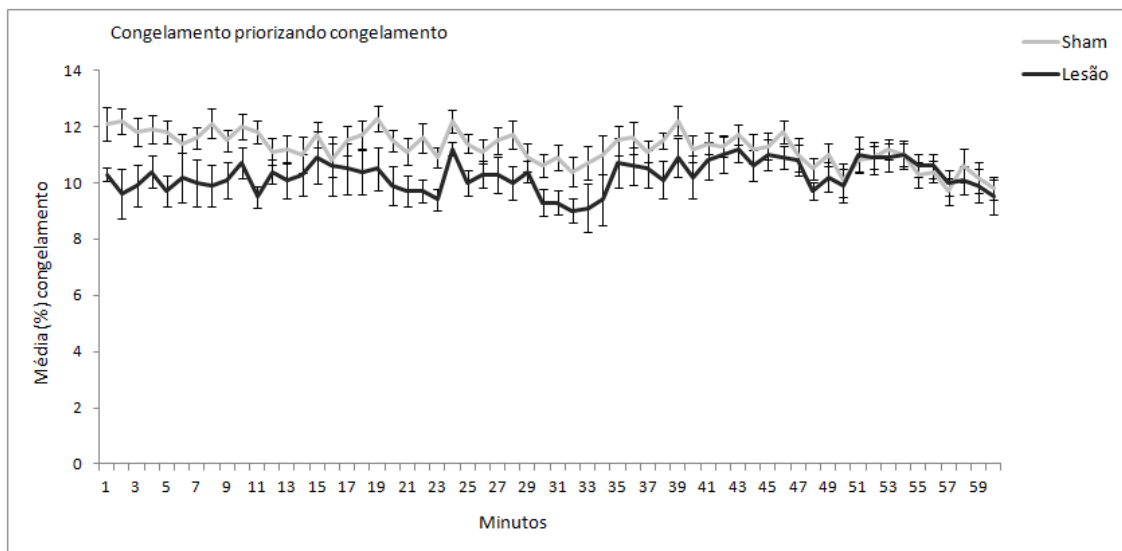


Figura 9. Média ($\pm$ SEM) do comportamento de congelamento dos animais lesados e não lesados no CCAr durante o período de 60 minutos do teste de formalina no paradigma de analgesia condicionada.

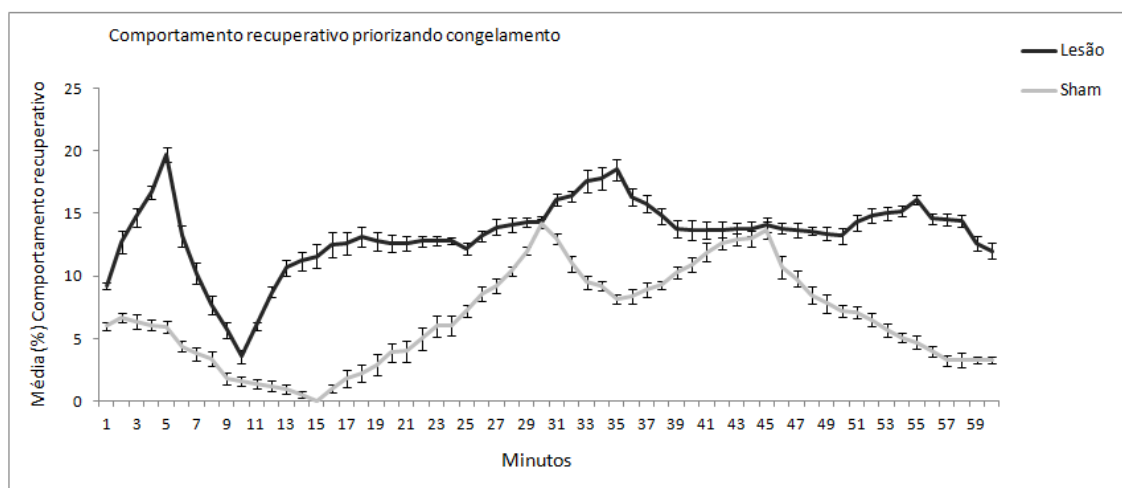


Figura 10. Média ($\pm$ SEM) do comportamento recuperativo dos animais lesados e não lesados no CCAr durante o período de 60 minutos do teste de formalina no paradigma de analgesia condicionada.

TABELA 3. Comparação dos comportamentos do teste de formalina no paradigma de analgesia condicionada entre dois grupos: Não-Lesados (N = 10) e Lesados (N = 10), divididos minuto a minuto.

Behavior	valor do teste-t minuto a minuto e a soma total no teste de formalina																					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
Freezing																						
prioritizing Freezing	0,09	0,02*	0,02*	0,02*	<0,01*	0,03*	0,03*	0,03*	<0,01*	0,06	0,12	<0,01*	0,31	0,14	0,36	0,29	0,79	0,16	0,07	0,01*	0,03*	0,02*
prioritizing Recuperative Behavior	0,51	0,16	0,05*	0,22	<0,01*	0,01*	0,04*	0,03*	0,02*	0,06	<0,01*	0,05*	0,11	0,03*	0,11	0,42	0,31	0,20	0,71	0,07	0,04*	0,07
Recuperative Behavior																						
prioritizing Freezing	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*
prioritizing Recuperative Behavior	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*

TABELA 3.																						
Behavior	valor do teste-t minuto a minuto e a soma total no teste de formalina																					
	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44
Freezing																						
prioritizing Freezing	0,02*	0,11	0,02*	0,20	0,09	0,01*	0,41	0,02*	0,02*	0,06	0,05*	0,08	0,23	0,17	0,31	<0,01*	0,07	0,14	0,34	0,64	0,27	0,84
prioritizing Recuperative Behavior	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*
Recuperative Behavior																						
prioritizing Freezing	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	0,88	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	0,01*	0,09	0,20	0,19	0,35
prioritizing Recuperative Behavior	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*

* Resultados para um teste-t pareado considerando diferenças significativas com $p \leq 0,05$

TABELA 3.																						
Behavior	valor do teste-t minuto a minuto e a soma total no teste de formalina																					
	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	SUM					
Freezing																						
prioritizing Freezing	0,27	0,34	0,80	0,81	0,78	0,78	0,77	0,99	0,63	0,99	0,67	0,78	0,67	0,55	0,66	0,30	<0,01*					
prioritizing Recuperative Behavior	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	0,05*	0,05*	0,02*	0,38	0,30	0,41	0,43	0,34	0,45	0,66	0,59	0,04*	<0,01*					
Recuperative Behavior																						
prioritizing Freezing	0,65	0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*					
prioritizing Recuperative Behavior	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*	<0,01*					

* Resultados para um teste-t pareado considerando diferenças significativas com $p \leq 0,05$

Em adição foram feitas duas ANCOVA (tabela 4.) utilizando o comportamento recuperativo como variável dependente, comparando os grupos lesados e não lesados e usando o congelamento como covariável, considerando pata levantada primeiramente como índice de recuperação e depois como índice de congelamento. De acordo com Fanselow (1984) uma análise correlacional de Pearson (tabela 5.) também foi feita entre os índices de recuperação e congelamento entre os grupos lesados e não lesados considerando a pata levantada nas diferentes condições (como índice de congelamento e como índice de recuperação).

TABELA 4. Análise de Covariância para comparação entre grupo Sham ($N=10$) e Lesionado ($N=10$) tendo como Variável Dependente o Comportamento Recuperativo no teste de formalina e o Congelamento como Covariável em duas condições de coleta das frequências dos comportamentos: privilegiando recuperação (Fanselow, 1984) e congelamento.

<i>Pata Levantada</i>	ANCOVA			
	Fonte	Graus de Liberdade	F	P
Recuperação	Efeito Principal	2,19	211,46	<0,001*
	Interação	1,20	39,85	<0,001*
	Grupo	1,20	4,88	<0,05*
Congelamento	Efeito Principal	2,19	20,49	<0,001*
	Interação	1,20	0,92	0,35
	Grupo	1,20	17,66	<0,001*

*Dados considerados significativos aceitando nível de significância $p \leq 0,05$.

TABELA 5. Correlação de Pearson (r) entre os comportamentos de Recuperação e Congelamento privilegiando diferentes condições.

Grupo	<i>Pata Levantada</i>	Correlação
		Recuperação x Congelamento
Não-Lesado	Recuperação	-0,76
	Congelamento	-0,26
Lesado	Recuperação	-0,92
	Congelamento	-0,38

Valores significativos para $p \leq 0,05$.