

4

Métodos

4.1.

Sujeitos

Os sujeitos usados nessa pesquisa foram ratos machos Wistar, com peso médio de 280g. Os animais foram acomodados em caixas-viveiro com medidas de 18 x 31 x 38 cm, com acesso a água e comida *ad libitum*, e mantidos em um biotério durante todo o momento, com temperatura controlada de 24°C (+/- 1°C). Um ciclo constante de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão foi mantido (07:00-19:00) e os experimentos comportamentais foram realizados durante a fase escura. Todos os procedimentos envolvendo os animais foram aprovados pelo comitê de ética da universidade PUC-Rio e seguiram as recomendações da Sociedade Brasileira de Neurociência e Comportamento.

4.2.

Materiais da Cirurgia

Para o procedimento cirúrgico, foi empregado um quadro estereotáxico (Kopf Instruments, California) e o atlas estereotáxico The RatBrain in StereotaxicCoordinates (Paxinos e Watson, 1997). Eletrodos monopolares teflonados (PlasticsOne, Virginia, EUA) foram utilizados para a realização das lesões eletrolíticas assim como para a estimulação elétrica. Cânulas guias de 12mm de comprimento foram fabricadas no laboratório utilizando agulhas hipodérmicas (25mm/0,6 BD, Estados Unidos), e os eletrodos foram ajustados para que se estendessem por 1mm para fora dela após serem encaixadas em posição. Um lesionador e estimulador elétrico modelo EL-0502 (Insight Equipamentos, Ribeirão Preto) foi empregado durante a cirurgia e o teste comportamental.

4.2.1.

Procedimento Cirúrgico

Os animais submetidos ao procedimento cirúrgico foram anestesiados com uma combinação de cloridato de cetamina e xilazina (.16cc e .04cc por 100g de peso, respectivamente) e verificados para certificação de um estado adequado de analgesia e sedação para plano cirúrgico. Em seguida, o animal era afixado em um estereotáxico, com o crânio posicionado horizontalmente de forma que Bregma e Lambda se mantivessem no mesmo plano dorso-ventral. Uma injeção subcutânea de cloridato de lidocaína (.30cc) foi administrada acima do crânio a fim de assegurar analgesia local. Após exposição do crânio, as coordenadas a partir de Bregma de AP 3,2mm, ML 0,6mm e -0,6mm, DV -5,0mm foram seguidas para lesões eletrolíticas bilaterais do córtex infralímbico, e Bregma de AP 3,2mm, ML 0,6mm e -0,6mm, DV -3,0mm para lesões do córtex pré-límbico (ambos com corrente de 0.5 mA e duração de 20 segundos). Em seguida, uma cânula guia foi posicionada em direção a MCPd nas coordenadas a partir de Bregma de AP -6.7mm, ML 0,0mm DV -3,8mm, e fixada em posição com a ajuda de uma resina acrílica e o uso de um mini parafuso preso ao crânio pelo furo utilizado para a lesão anterior. Um falso eletrodo das mesmas dimensões da cânula foi alojado dentro dela com o propósito de proteger o tubo de contaminações e obstruções, e removido no dia do experimento.

4.3.

Materiais dos Testes Comportamentais

Para ambos os procedimentos comportamentais (avaliação do comportamento de fuga e condicionamento clássico) o mesmo ambiente experimental foi utilizado. Os animais eram acomodados em caixas de avaliação comportamental medindo 25 x 20 x 20 cm (Insight, Ribeirão Preto). As caixas possuíam paredes traseiras compostas de acrílico transparente, o que possibilitava a observação remota dos animais através de uma câmera digital capaz de gravar imagens em situações de baixa luz. Estas caixas, por sua vez, eram acomodadas dentro de caixas maiores que isolam o ruído externo, e são equipadas com ventiladores para circulação do ar e a geração de um ruído branco de fundo de aproximadamente 78dB. Uma luz vermelha de 25W provia iluminação com o mínimo necessário de incomodo ao animal. A temperatura ambiente do local foi

mantida em 24°C durante os experimentos e no intervalo das análises dos animais a caixa era limpa para remoção de excrementos e aplicação de uma solução de hidróxido de amônia 5%, mantendo um ambiente neutro para todos os sujeitos no experimento.

Estas mesmas caixas de análise possuíam o chão composto por 18 barras de metal, espaçadas 1,4 mm umas das outras. Estas barras estavam ligadas a um circuito eletrônico na parte traseira da caixa, que é capaz de administrar uma corrente elétrica aos animais. Esta corrente se originava de geradores (Insight, Ribeirão Preto) localizados fora do ambiente de análise do comportamento. A administração dos choques foi utilizada no procedimento de condicionamento, não tendo participação na avaliação do comportamento de fuga.

4.3.1.

Estimulação Elétrica da MCPd

Sete dias após o procedimento cirúrgico os animais eram acomodados em grupos de 3 com livre acesso a água e comida. Durante este período os sujeitos eram monitorados para certificação da ausência de dor pós-cirúrgica ou outros incômodos, seguindo as recomendações do manual de uso de animais em pesquisa da Academia Nacional de Ciências Americana (Institute for Laboratory Animal Research 2009). Do total de animais utilizados, somente 2 sujeitos não resistiram ao procedimento cirúrgico, e todos os outros se recuperaram sem indício de dor, mantendo padrões normais de movimentação, alimentação, higiene, e sem apresentar sinais de incomodo ou de desconforto ao serem estimulados fisicamente na região em que a cirurgia foi realizada, indicando o bem-estar geral do animal.

Após este período de recuperação, os animais estavam prontos para o procedimento experimental, que foi realizado no ciclo claro em que eram alojados. Os animais eram acomodados na caixa de análise comportamental, com um eletrodo removível alojado dentro da cânula implantada cirurgicamente; este eletrodo era isolado ao longo de seu comprimento, com exceção da ponta que se inseria na MCPd.

Uma corrente era passada através do eletrodo a partir de um gerador, com corrente inicial de 5 microA, sendo gradualmente aumentada na proporção de 5 microA a cada tentativa. O limiar de congelamento era registrado a partir da

menor corrente necessária para causar a cessão dos movimentos do animal, com o início de um período de congelamento motor, hipervigilância e estado de alerta, seguido por exoftalmia e piloereção (Brandão et. Al, 2008). A administração da corrente elétrica continuava de forma crescente até o momento em que o rato apresentava o comportamento de fuga, caracterizado de forma muito evidente por uma explosão motora composta de corridas e pulos vigorosos. A corrente utilizada para gerar este comportamento era registrada como o limiar mínimo de fuga.

Após este momento, toda estimulação era cessada, e por 11 minutos o animal foi avaliado em relação ao congelamento motor. A cada 2 segundos um observador treinado analisava o comportamento do sujeito, que poderia ser registrado como movimento ou congelamento – que era constituído pela total ausência de movimento, a não ser aqueles necessários para a respiração.

Com o fim da sessão experimental o animal era retornado à sua caixa viveiro, sob as mesmas condições anteriores.

4.3.2.

Aquisição e expressão do medo ao contexto

24 horas após a estimulação elétrica da MCPd os animais retornavam ao mesmo contexto experimental descrito na etapa anterior. Desta vez, entretanto, quatro animais eram testados simultaneamente. Após 8 minutos de um processo de habituação, onde os ratos exploravam livremente a caixa e tinham seu comportamento registrado, três choques de 0.6 microA eram administrados através das barras de metal no chão, com intervalos de 20 segundos entre eles. Logo em seguida o comportamento dos animais para congelamento foi registrado a cada 4 segundos para cada animal durante 3 minutos. Ao fim do processo os animais retornavam às caixas viveiro sob as mesmas condições anteriores.

24 horas depois os animais retornavam às caixas de análise. Neste momento, porém, nenhum choque ou outro estímulo era administrado, e durante 8 minutos o comportamento dos animais era registrado para a resposta de congelamento condicionada ao contexto.

Em todas as etapas o observador encarregado de avaliar e registrar o comportamento dos animais não era informado a respeito de qual grupo cada sujeito fazia parte, evitando erros de inferência e tendências observacionais.

4.4.

4.4.1.

Materiais dos procedimentos histológicos

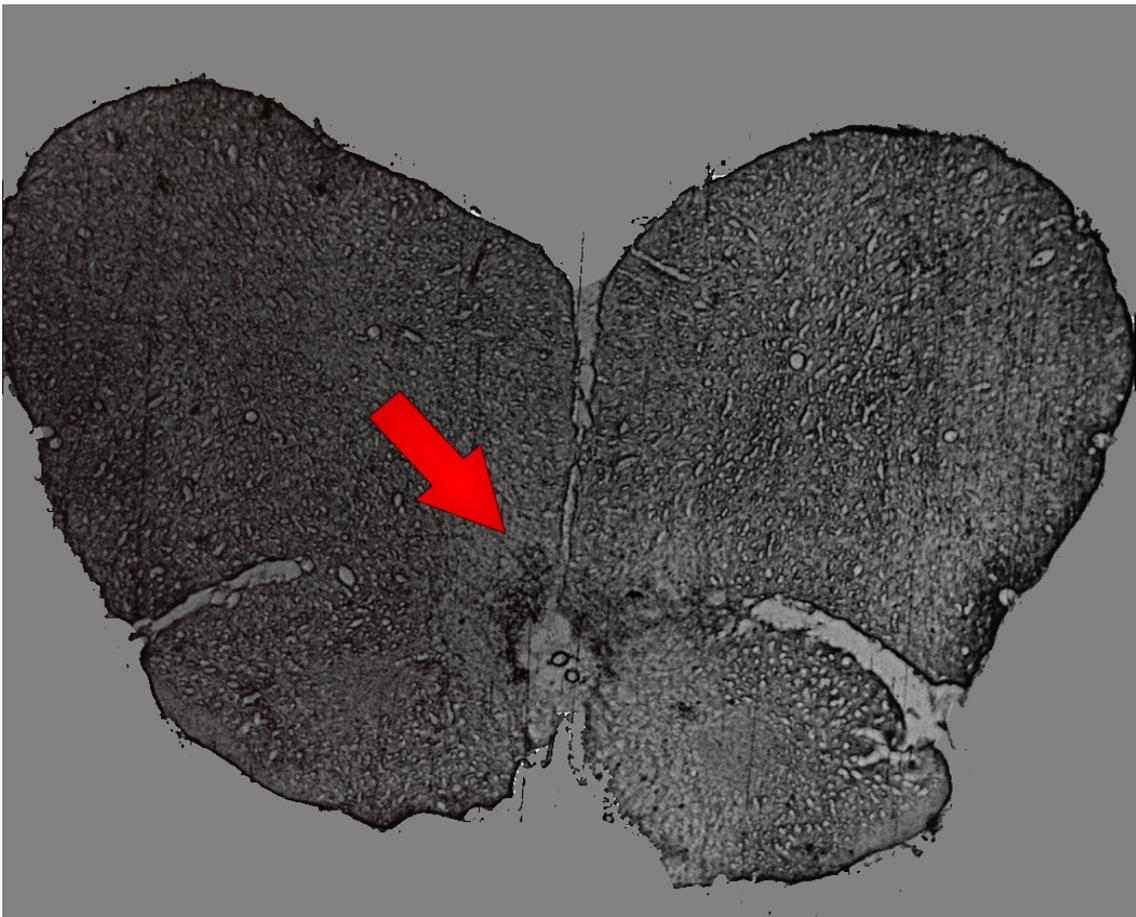
Para a perfusão dos animais, foi utilizada uma bomba dosadora peristáltica (Milan, São Paulo). Para a secção dos cérebros, um Crio-Micrótomo Leica (CM1850UV, Leica, Alemanha) e crio-solução de congelamento (O.C.T. Tissue-Tek, Sakura, Japão) foram utilizadas, e os cortes alocados em lâminas histológicas (25,4 x 76,2mm, Bioslide). A localização das lesões foi verificada com um microscópio Leica (DM2500, Alemanha) e o Rat Brain Atlas (6ª Edição, Paxinos e Watson, 2007).

4.4.2.

Análises histológicas

Ao fim dos testes comportamentais descritos acima os animais eram sacrificados com uma solução de hidrato de cloral, e passavam por um processo de perfusão intracardíaca, onde uma sequência de 100 ml de solução salina (0,9%), 100 ml de formalina (10%) e 50 ml de sacarose (10%) era bombeada pelo corpo do animal com o auxílio de uma bomba peristáltica. Em seguida o cérebro era removido da caixa craniana e armazenado em uma solução de formalina e sacarose a 10°C por 48 horas.

Para a histologia, o cérebro foi submerso em uma crio-solução de O.C.T e congelado a -20°C em um crio-micrótomo. Cortes de 30µm eram realizados na região do córtex frontal e da matéria cinzenta para averiguação do posicionamento adequado da lesão e da cânula guia, respectivamente. O Atlas de Coordenadas Histológicas foi utilizado como referência. A figura 2 indica os locais da lesão, e os animais cujas lesões ultrapassavam as áreas circunscritas eram eliminados da análise estatística. A figura 3 indica a região da MCPd onde a cânula foi implantada verticalmente.



Figuras 2: Exemplos de secção coronal, em torno de Bregma 3.2mm, onde a lesão eletrolítica é visível na região correspondente ao IL e ao PrL.

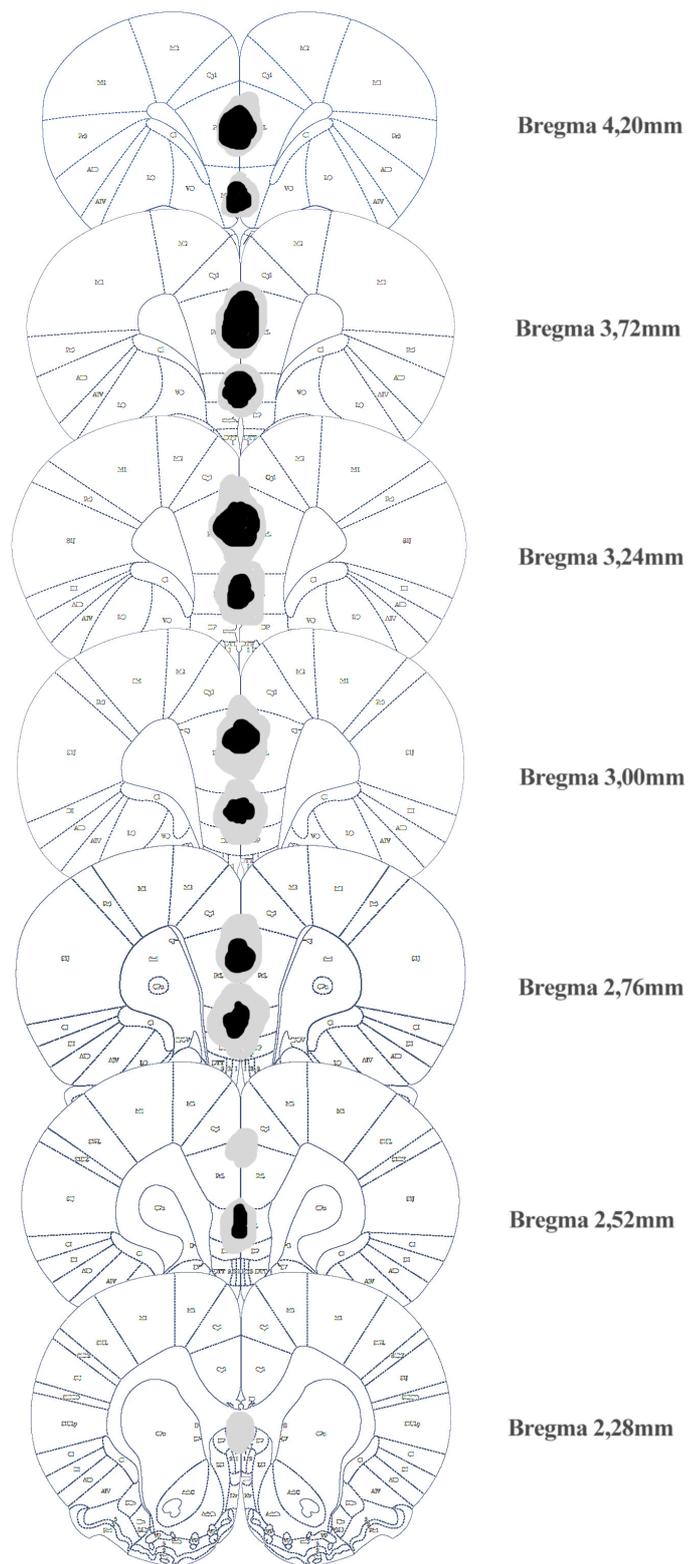


Figura 3: Montagem indicando a amplitude das lesões em IL e PrL. Indicado em cinza, o tamanho máximo das lesões; em preto, a menor extensão.



Figura 4: Exemplo de rastro deixado pela cânula guia direcionada à MCPd.