

## **Participação do Complexo Amigdalóide na Resposta de Congelamento em ratos geneticamente selecionados**

**Aluno: Bruno Costa Larrubia**  
**Orientador: J. Landeira Fernandez**

### **Introdução**

Dentre os distúrbios emocionais conhecidos, a ansiedade vem afetando em diferentes níveis, um grande número de indivíduos, fazendo da compreensão deste fenômeno um dos maiores desafios dos dias atuais. A ansiedade é um estado emocional que faz parte do espectro normal das experiências humanas, sendo, em determinados níveis, propulsora do desempenho. Toda tarefa possui um ponto ótimo de ansiedade para que ela possa ser executada da melhor forma possível. Todavia, níveis exageradamente elevados de ansiedade prejudicam a execução da tarefa, caracterizando-se assim o seu aspecto patológico. A ansiedade passa então a ser patológica, quando seus níveis estão desproporcionais à situação que a desencadeia, ou quando não existe um objeto específico ao qual se direcione. O Manual Estatístico Diagnóstico de Doenças Mentais, o DSM-IV [1] define os transtornos de ansiedade de acordo com vários critérios diagnósticos, como por exemplo, preocupação excessiva, recorrente, persistente irritabilidade, alta vigilância cognitiva e uma grande dificuldade de relaxar. Outros sintomas estão relacionados à hiperfuncionalidade fisiológica, como por exemplo, dores musculares, diarreia crônica, dores de cabeça, taquicardia, palpitações e disfunções gastrointestinais [1].

De acordo com Gross e Hen [2], a ansiedade é uma complexa combinação de diversas emoções, como medo, preocupação e apreensão. Como qualquer emoção, a ansiedade pode ser decomposta em três componentes. O primeiro deles, que sem dúvida é o principal, está relacionado com a atividade consciente dessa emoção. Este componente é de acesso exclusivo a cada pessoa. Somos apenas capazes de inferir que outras pessoas também devem sentir conscientemente essas emoções.

Além da consciência, a emoção apresenta também um aspecto comportamental e fisiológico. Estes dois aspectos são públicos e por isso podem ser observados e quantificados. O componente comportamental está associado a posturas corporais e expressões faciais. O componente fisiológico está associado às reações controladas pelo sistema nervoso autônomo, mais especificamente à porção simpática. Dentre estas reações destacam-se os batimentos cardíacos, alteração da respiração, sudorese [3].

A ansiedade, desta forma, produz um repertório de reações comportamentais e fisiológicas. Tais reações estão ligadas a padrões evolutivos de defesa, pois preparam os organismos a lidarem com alguma ameaça em potencial. Deve-se notar a ansiedade como um componente primordial de um sistema neuronal que se originou em mamíferos mais simples, e se manteve ao longo da evolução das espécies. Tal sistema responsabiliza-se tanto pela detecção de sinais representativos de perigo no meio ambiente, quanto pela ativação de reações adequadas de defesa [4].

As reações de medo e ansiedade formam a primeira linha de defesa dos organismos, protegendo-os de perigos que poriam em risco sua integridade e continuidade evolutiva [5]. De fato, ansiedade é benéfica ao organismo quando utilizada dentro de certo limite. Tal idéia foi descrita no início do século passado pelos psicólogos americanos Robert M. Yerkes e John D. Dodson. De acordo com este princípio, existe um ponto ótimo de ansiedade necessário para a melhor realização de uma determinada tarefa. Graficamente descrita, a relação entre o desempenho de uma atividade e ansiedade adquire a forma de um “U” invertido, significando que, até certo ponto o aumento da ansiedade tem a capacidade de aumentar e melhorar tal

desempenho. Obviamente, um aumento acima de um nível adequado para aquela tarefa poderá prejudicar sua execução. Este ponto ótimo é chamado coeficiente de ativação.

Entretanto, disfunções e o funcionamento anormal deste sistema motivacional de defesa provocam os chamados transtornos de ansiedade generalizada (TAG), que martirizam e angustiam a vida de milhões de pessoas em todo o mundo [5]. Dados levantados pelos institutos de saúde mental mostram que pelo menos 20% da população mundial apresentarão pelo menos um episódio relacionado a transtornos de ansiedade durante a vida [4, 6, 7].

Embora os transtornos de ansiedade sejam reações tipicamente humanas, os modelos animais de ansiedade têm se tornado mecanismos extremamente úteis na compreensão dos mecanismos patofisiológicos destes transtornos [4]. Mais precisamente, a resposta de congelamento associada aos estímulos contextuais apresenta um interessante isomorfismo com o transtorno de ansiedade generalizada humano. A resposta de congelamento é uma importante medida de medo condicionado. Small [8] observou que o congelamento é caracteristicamente uma reação de medo do rato. Griffith [9] concluiu que os ratos exibem a resposta de congelamento na presença de um gato, ou então na presença de estímulos que indicam a existência deste animal, como o odor. Os estudos que utilizaram a resposta de congelamento como sendo uma reação a um estímulo condicionado começaram no final da década de 70. Bouton e Bolles [10] demonstraram que no condicionamento aversivo, a observação e quantificação do congelamento se mostraram mais eficazes como um instrumento de medição do medo. Isto ocorre pelo fato de que ratos que não receberam o condicionamento aversivo não demonstraram a resposta de congelamento, fornecendo assim uma linha de base mais confiável. Além disso, após uma única sessão de pareamentos de choque e contexto, o rato já exibe a resposta de congelamento.

Condicionamentos mais intensos produzem um congelamento ainda mais robusto, chegando a 100% do tempo de exposição ao contexto [11]. Para os ratos a resposta de congelamento é um comportamento defensivo altamente específico. O movimento pode facilitar sua identificação por um predador, funcionando como um estímulo para o ataque. A resposta de congelamento já foi observada até em situações nas quais havia opção de escape. Os ratos são animais altamente precavidos contra ataques de predadores e para sobreviver a uma ameaça, eles utilizam um protocolo de fuga, que incluem um congelamento corporal total, ficando apenas o movimento respiratório, visando não ser notado pelo predador, e uma fuga desordenada quando o perigo é inescapável [12].

Compostos farmacológicos ansiolíticos, que diminuem a ansiedade em seres humanos, mostraram-se extremamente eficazes em diminuir, ou mesmo abolir a resposta de congelamento dos animais frente a um contexto aversivo. É interessante observar que a dosagem utilizada nas duas situações encontrava-se na mesma faixa daquela utilizadas para seres humanos [13].

A amígdala é um complexo de núcleos que se encontra no lobo temporal anterior de seres humanos e de outros animais [14]. Um dos primeiros pesquisadores a observar e classificar o hoje denominado “Complexo Amigdalóide” foi o fisiologista alemão Karl Friedrich Burdach, em 1819. Cortes especiais do cérebro revelavam uma massa de matéria cinzenta em forma de amêndoa, localizada numa região subcortical. Burdach denominou tal massa de “Complexo Amigdalalar” [15]. Após a descoberta de Burdach desta massa de neurônios subcorticais passaram-se cerca de 50 anos de controvérsias sobre em qual parte do cérebro tal complexo deveria estar localizado. Em 1867, outro fisiologista alemão, Theodor Meynert, definiu que a amígdala deveria ser para fins de classificação, definida como um lobo ventral e temporal, sendo uma extensão do “claustrum”. Segundo este fisiologista, o “Claustrum” seria o limite mais inferior do cérebro [15].

Mas as controvérsias não pararam por aí. Somente em 1923, por meio de J.B Johnston, que foi introduzida a descrição do complexo que é largamente usada até hoje. Ele comparou

exaustivamente um grande número de animais vertebrados. Sua proposta é que a amígdala fosse dividida em dois núcleos primitivos associados ao sistema olfatório (os núcleos central e medial). Além disso, ele observou que existem outros dois núcleos filogeneticamente mais novos, os núcleos lateral e basal [15]. Depois do início das primeiras observações do complexo amigdalóide, que privilegiavam a localização anatômica e a filogenia desta estrutura, as atenções foram voltadas para a determinação das relações de “entradas” e “saídas” dos diversos grupos neuronais da amígdala. Por causa disso os estudos privilegiaram os tipos de neurotransmissores e receptores localizadas nestas vias de “entradas” e saídas” [15]. Devido tais observações, que sem dúvida foram muito mais precisas do que aquelas feitas pelos primeiros pesquisadores, determinou-se que o complexo amigdalóide é uma região, basicamente, heterogênea [15]. Os estudos de David Amaral [14] sobre a amígdala de primatas foram mais largamente adotados, sendo validados para o cérebro do rato por Pitkanen e colaboradores, em 1997 [16]. Para fins de classificação a amígdala pode ser dividida em basicamente três grandes áreas: o grupo basolateral, o grupo centro-medial, e o grupo cortical [17]. O núcleo maior e mais bem diferenciado é o grupo basolateral. Ele é formado pelos núcleos laterais, os núcleos da base, e os núcleos acessórios da base. Tal grupo possui uma posição privilegiada no cérebro, recebendo informações do neocórtex, tálamo e hipocampo. De fato, é uma excelente posição para integração sensorial [18].

Ainda segundo Fanselow e Gale [18], outra parte de grande importância é o núcleo centro-medial. Ele é formado pelos núcleos central e medial. Este núcleo possui importantes conexões com a chamada “stria terminalis”. As células desta região são idênticas às do núcleo centro-medial, o que a denominou de “Amígdala Extendida”. O menor núcleo da amígdala é o grupo cortical, e é também conhecida como a “amígdala olfatória”. Este núcleo recebe informações diretas do bulbo olfatório.

A principal via de entrada das informações sensoriais que chegam à amígdala é o seu núcleo lateral. É através deste núcleo que a amígdala recebe informações do mundo exterior. E a estrutura do complexo amigdalóide que funciona como a via de saída das informações codificadas na amígdala é justamente seu núcleo central [17, 18].

No interior da amígdala existem diversas outras estruturas que estão entre o núcleo lateral e o núcleo central. Tais estruturas, como por exemplo, o complexo basolateral, codificam todas as informações de caráter emocional. Cada uma destas subdivisões é capaz de influenciar outras estruturas cerebrais associadas à emoção, como por exemplo, o hipocampo, o córtex frontal e o hipotálamo [14,17, 18, 19].

Estudos neuroquímicos da amígdala [20, 21] revelaram os neurotransmissores mais encontrados nas suas diversas subdivisões. Utilizando-se de imunohistoquímica para o neurotransmissor inibitório GABA e para proteínas que convertem o glutamato em GABA (a chamada GAD), observou-se a notável presença de uma densa população de neurônios da amígdala, que se estendem de forma ventral e ininterruptamente através do núcleo central e do núcleo medial desta estrutura, que utilizam o neurotransmissor GABA. É interessante observar que tais núcleos terminam no limite ventro-medial do hemisfério cerebral [15]

Em contraste às células do núcleo central e medial, robustamente GABAérgicas, em outras partes da amígdala encontram-se dispersamente apenas alguns neurônios GABAérgicos, provavelmente envolvidos na formação de circuitos locais. Segundo McDonald & Augustine [22] e Sun & Cassel [21] os neurônios encontrados em outras subdivisões da amígdala são, provavelmente, glutamatérgicos (utilizam o neurotransmissor excitatório glutamato). Tais evidências são fortes sugestões de que uma parte da amígdala (seus núcleos central e medial) é subcortical (estriatal), enquanto que suas outras partes são corticais.

Desta forma, evidências bastante consideráveis nos mostram que grande parte das projeções corticais (as chamadas células piramidais) da amígdala utiliza o glutamato como

neurotransmissor, enquanto que as projeções subcorticiais usam o GABA. Segundo Swanson e Petrovich [15], se isso for verdade, significa que as projeções não GABAérgicas da amígdala não fazem parte do córtex. Entretanto, a característica mais importante e mais marcante da amígdala é, sem dúvida, a sua capacidade de processar, codificar e controlar todas as informações de caráter emocional que chegam ao cérebro. Tal estrutura possui grande influência na circuitaria neural que envolve as respostas emocionais. Praticamente todo estímulo sensorial recebe uma avaliação rápida e precisa deste complexo. Ele possui várias conexões com diferentes partes do cérebro, adquirindo um alto poder de decisão frente a estímulos ameaçadores, sobrepujando inclusive o córtex frontal [17, 18, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33]

Nos vertebrados complexos, entre os quais os seres humanos se incluem, a amígdala desempenha um papel primordial no armazenamento e na formação de memórias associadas a eventos emocionais. Este processo de consolidação de memória é denominado de “Potenciação de Longo Prazo”, e provoca mudanças estruturais importantes nos neurônios da amígdala [34].

Sabe-se hoje que o condicionamento a estímulos discretos (e.g. luz ou som) ou estímulos contínuos (contextuais) depende da integridade do complexo amigdalóide. Tal estrutura sub-cortical tem sido amplamente estudada, e seu papel na aquisição e expressão dos comportamentos defensivos do rato já foi demonstrado por diversos autores [11, 18, 24, 35, 36]. O envolvimento da amígdala na resposta de congelamento ao contexto previamente associado ao choque foi primeiramente demonstrado por Blanchard & Blanchard [23]. Outros estudos mostraram que a amígdala também possui uma participação crucial no condicionamento pelo medo utilizando-se estímulos auditivos [37].

Com base em observações feitas após a realização da amigdalectomia bilateral em macacos, Gaffan e Harrison [38] defenderam que a amígdala é especialmente importante na mediação do controle do comportamento por reforços condicionados. Estudos conduzidos em humanos submetidos à ablação cirúrgica da amígdala geralmente produzem informações limitadas devido ao uso de amostras não controladas, mas tendem a mostrar atenuação da agressão e incapacidade de responder a estímulos que normalmente provocariam medo [27].

O complexo basolateral da amígdala, particularmente o núcleo basal e lateral, é responsável pela eliciação da resposta de congelamento do animal [11]. De fato, Fanselow e Gale [18] demonstraram que lesões na região frontotemporal da amígdala, que incluem seu núcleo basal e lateral, causam uma diminuição significativa nas respostas de congelamento do animal. Tais resultados também foram obtidos até mesmo um ano e meio após a primeira sessão de treinos, a chamada fase de aquisição.

Gale e colaboradores observaram, em 2004 [17], que o complexo basolateral da amígdala está intimamente envolvido no armazenamento das memórias relacionadas ao medo em ratos. Descobriu-se que memórias de alto valor hedônico (prazer/desprazer) podem ser, além de armazenadas, codificadas nesta mesma estrutura. Ratos lesionados bilateralmente na amígdala basolateral demonstraram um sério déficit no reconhecimento de contextos com alto valor emocional.

Kim e colaboradores [24] também demonstraram que lesões extensivas na amígdala em ratos provocaram uma atenuação na resposta de congelamento dos animais. Além disso, a aplicação de Lidocaína, Muscimol e Diazepam na amígdala também bloqueou a expressão da resposta de congelamento [39, 40, 41].

Devemos ainda considerar que dentro de uma população, certos indivíduos demonstram ter maior propensão a desenvolver transtornos de ansiedade. Neste caso, são impactados mais fortemente pelos eventos ansiogênicos, e muitos estudos tem apontado para a base genética destas predisposições [2, 7, 15, 19, 23, 45, 47]. Para reproduzirmos em modelo animal esta base genética da ansiedade, realizamos a seleção genética artificial de

ratos através do paradigma do congelamento para estabelecer um grupo de ratos com uma linha de base de ansiedade alta.

### **Objetivos**

A proposta do presente estudo foi a de verificar a possibilidade de se estabelecer, através de seleção genética, duas linhagens de ratos com alta e baixa reatividade ao condicionamento contextual aversivo. Uma vez detectados padrões diferentes desta resposta em gerações de animais oriundos de pais previamente selecionados com base na resposta condicionada de congelamento, decidiu-se também investigar a participação do complexo amigdalóide no controle desta resposta.

### **Metodologia**

Para realizarmos a seleção genética de ratos com alta e baixa taxa de congelamentos, foram escolhidos ratos do tipo albinos da cepa Wistar para serem utilizados neste estudo. A matriz inicial destes animais foi obtida de um criador local (Fundação Oswaldo Cruz) em 1995 e desde então vêm sendo procriados no Biotério do Departamento de Psicologia da Puc-Rio. Os animais foram mantidos em um ambiente com temperatura e luminosidade controlada. A temperatura foi ajustada em torno de 22° C e as luzes ciclaram em um intervalo de 12 horas iluminado por 12 horas de escuro.

Os animais foram mantidos em grupos de 6 a 8 em caixas de polietileno medindo 31x38cm. As caixas foram forradas com serragem de madeira para coletar as fezes e urina dos animais. Os animais tiveram acesso *ad libitum* à água e comida. Treinos e testes comportamentais ocorreram sempre durante o período iluminado do ciclo. Cinco dias antes do início do experimento, todos os animais eram manuseados uma vez por dia por um período de dois minutos. Todos os protocolos experimentais empregados nestes estudos estiveram em conformidade com as Diretrizes Para o Emprego e o Cuidado de Animais de Laboratório desenvolvidas pelo Instituto Americano de Saúde (National Institutes of Health; publicação número 85-23, revisada em 1985).

O treino e teste de condicionamento contextual aversivo foram realizados em uma caixa experimental quadrangular medindo 25 x 20 x 20 cm. Duas paredes laterais da caixa eram de alumínio e as restantes de acrílico. O assoalho da caixa experimental era composto por 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 oito canais (Insight, Ribeirão Preto) acoplada a um micro computador permitiu a apresentação deste estímulo aversivo. A caixa experimental era sempre limpa imediatamente antes que o animal fosse colocado no seu interior com uma solução de hidróxido de amônio (1%).

Este procedimento teve como objetivo eliminar possíveis influências que a urina e as fezes deixadas na caixa por um animal pudessem influenciar o comportamento do animal seguinte. A caixa experimental estava encerrada dentro de uma câmara de isolamento acústico feita de compensado de madeira e revestida por Eucatex acústico. Uma lâmpada vermelha de 25W instalada no teto da câmara de isolamento acústico permitiu a observação do animal por meio de uma microcâmera instalada no seu interior e conectada a uma placa de captura de vídeo instalada em uma sala adjacente. Um programa de leitura de imagens (Winfast) permitiu a gravação eletrônica das sessões de testes experimentais. Uma ventoinha instalada na câmara de isolamento acústico permitiu a apresentação contínua de um ruído branco de 78dB (escala A).

Com objetivo de se produzir uma linhagem de animais com alta taxa de congelamento condicionado (CAC – Cariocas com Alto Congelamento) e outra linhagem com baixa taxa de congelamento condicionado (CBC - Cariocas com baixo Congelamento), 120 ratos (60

machos e 60 fêmeas) constituíram a geração inicial (S0) para a produção destas duas linhagens.

Cada animal foi submetido a um procedimento de condicionamento contextual aversivo. Neste procedimento, o animal era colocado no interior da caixa experimental por oito minutos. Ao término deste período, três choques de 1 mA com duração de um segundo cada eram apresentados com um intervalo de 20 segundos entre choques. Após a apresentação do último choque, o animal permanecia por mais dois minutos, terminando assim a sessão de treino. Cerca de 24 horas após, teve início a sessão de teste. Nesta sessão, o animal era recolocado na caixa experimental por oito minutos. Nenhum choque era apresentado e a resposta de congelamento durante todo este período era registrada por meio de um procedimento de amostragem de tempo. A cada dois segundos, um observador avaliava se o animal apresentava uma postura de congelamento definido como a ausência total de qualquer movimento, exceto aqueles necessários para a respiração. A concordância entre observadores com relação a registro desta resposta em nosso laboratório é de 0,98. Calcado na média da resposta de congelamento durante a sessão de teste, selecionou-se 10 machos e 10 fêmeas com a maior taxa de congelamento para dar início à linhagem CAC assim como 10 machos e 10 fêmeas com a menor taxa de congelamento para dar início à linhagem CBC. Tomou-se o cuidado para evitar cruzamentos consangüíneos (cruzamento entre irmão – irmã), evitando-se assim a endogamia.

Das 10 famílias CAC nasceram 76 animais (37 machos e 39 fêmeas) enquanto que as 10 famílias CBC deram origem a 71 animais (34 machos e 37 fêmeas). Estes animais constituíram a primeira geração de animais selecionados (S1). Entre 6 e 8 dias após o nascimento, cada filhote recebeu um corte em uma das orelhas com objetivo de designar a sua linhagem (CAC – corte na orelha direita; CBC – corte na orelha esquerda). Um segundo sistema de marcação, realizado através da ablação de um ou mais dedos das patas do animal também foi realizado durante este período. Aos 21 dias de idade, os animais destas 20 famílias foram separados por sexo, alojados em grupos de 6 a 8 animais. Os animais eram sempre agrupados respeitando-se suas respectivas linhagens. Ao atingirem a idade de aproximadamente três meses, cada um destes animais foi submetido às sessões de treino e teste de condicionamento contextual aversivo. A média da resposta de congelamento durante a sessão de teste foi utilizada novamente como critério para a seleção de 10 novas famílias com as maiores taxas de congelamento e 10 novas famílias com as menores taxas de congelamento. Este mesmo procedimento foi utilizado para a produção de duas novas gerações selecionadas de animais (S2 e S3). Esta geração obtida como resultado deste procedimento compôs a base de sujeitos para o experimento de investigação da participação do complexo amigdalóide no controle da resposta de congelamento.

Ao atingirem três meses de idade, os sujeitos gerados através da nossa seleção genética (S4) foram divididos seguindo o critério de alta e baixa taxa de congelamento: 73 animais da linhagem CAC (46 machos e 27 fêmeas) bem como 78 animais da linhagem CBC (33 machos e 46 fêmeas) foram submetidos ao procedimento de condicionamento contextual aversivo. Neste procedimento, cada animal era colocado na caixa experimental e três minutos após, três choques elétricos de 1 mA com duração de 1 segundo cada foram apresentados com um intervalo de 20 segundos entre eles. Um minuto após o último choque, o animal era retirado da caixa experimental, retornando para sua caixa viveiro. Cerca de 24 horas após, o animal era recolocado na caixa experimental por quatro minutos sem que qualquer estímulo fosse apresentado. A resposta de congelamento foi observada durante os quatro minutos da sessão de teste exatamente da forma descrita anteriormente.

Calcado na média desta resposta 24 machos e 24 fêmeas com a maior taxa de congelamento, bem como 24 machos e 24 fêmeas com a menor taxa de congelamento, foram acasalados entre si, evitando a formação de pares consangüíneos. Vinte e quatro ratos machos

e outras 24 fêmeas livres do grupo controle foram também submetidos ao procedimento de condicionamento contextual aversivo bem como ao processo de acasalamento. Os 72 pares de animais permaneceram acasalando por uma semana. Ao final deste período, todos os ratos machos (24 CAC, 24 CBC e 24 controle) foram reagrupados em novas caixas viveiros, permanecendo por outro período de três semanas de ambientação. Após este período, metades dos animais das linhagens CAC e CBC bem como os do grupo controle foram submetidas a uma cirurgia estereotáxica com objetivo de destruir o complexo amigdalóide bilateralmente. A outra metade destes três grupos de animais recebeu lesões falsas.

Cerca de uma semana após a cirurgia, todos os animais foram expostos a um novo procedimento de condicionamento contextual aversivo. A resposta de congelamento foi registrada durante os três minutos iniciais da sessão de treino, que antecediam a apresentação dos choques elétricos, bem como aos quatro minutos da sessão de teste.

Para se perfazer as lesões eletrolíticas no complexo amigdalóide, os animais foram anestesiados com Tribromoetanol (250mg/kg) e fixados no aparelho estereotáxico (David Kopf, Tujunga, CA). Cada animal foi lesionado através da inserção de um eletrodo, implantado a 3 mm acima da amígdala, recebendo desta forma lesões eletrolíticas bilaterais. Utilizando-se bregma como referência as coordenadas utilizadas foram: AP – 3.2mm, ML 4.2mm, DV 5.8mm. O ângulo do braço estereotáxico foi de 90°. Utilizando-se um lesionador, percorreu-se uma corrente de 5mA, com duração de 20 segundos, para se perfazer as lesões. Os animais que receberam as lesões falsas (sham) passaram pelos mesmos procedimentos, com a exceção de que nenhuma corrente foi apresentada.

Ao final do experimento, todos os animais foram sacrificados através de uma dose específica de Hidrato de Cloral (1ml/100g). Os animais foram perfundidos cardiacamente com salina e formol (4%) contendo potássio de ferrocianeto (1%). Os cérebros foram extraídos e guardados numa solução de formol (10%) com sacarose (20%), por pelo menos uma semana. Após este tempo, os cérebros foram seccionados através de um criostato, formando-se fatias com espessura de 50um e a cada três, uma fatia foi montada em lâminas preparadas para a coloração cresil violeta. Desenhos da região correspondente à área cerebral afetada pela lesão foram feitas com auxílio de um Atlas de cérebro de rato [42].

A fim de permitir a comparação da região afetada pela lesão e corrigir eventuais encolhimentos causados pela preparação histológica, os cortes histológicos foram montados em lâminas e sobrepostos em um micro-projetor sobre a estrutura correspondente do Atlas. A magnificação foi ajustada até que a estrutura projetada e a encontrada no Atlas se igualem. Desenhos da região correspondente à área cerebral afetada pela lesão foram feitos na devida escala. A extensão da perda celular e cromatólise foram estimadas através da multiplicação das divisões do Atlas nos sentidos anterior-posterior, medial-lateral e ventral-dorsal. Dados obtidos com lesões incorretas foram excluídos da análise estatística.

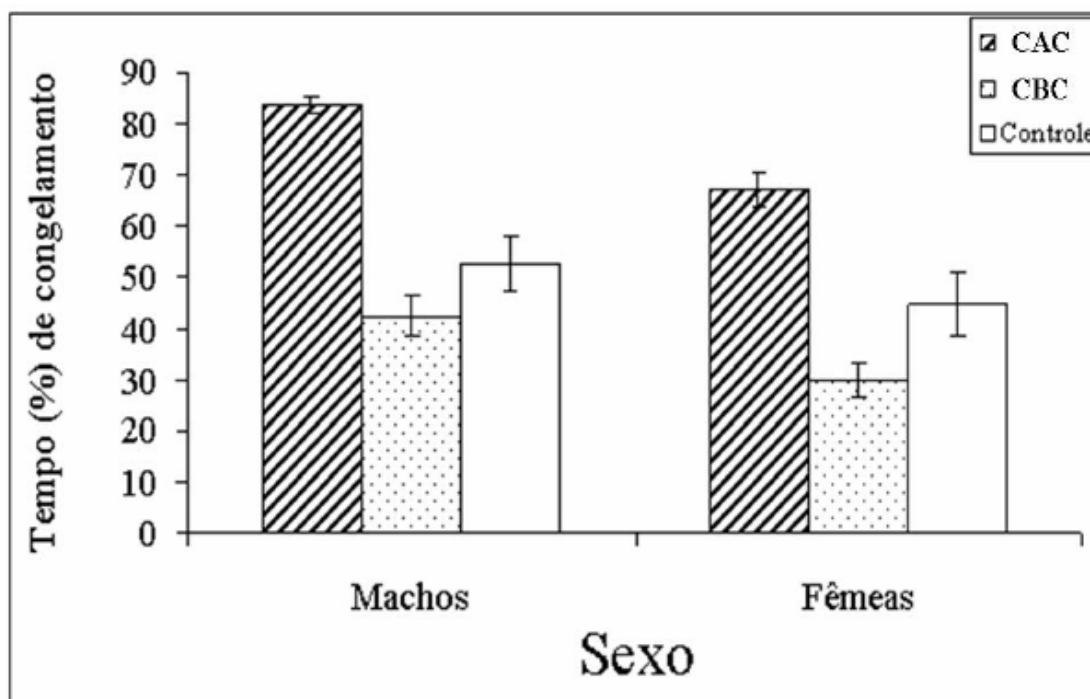
## Resultados

Dentre os 72 animais utilizados neste experimento (S4), 14 morreram ao longo do experimento ou apresentaram lesões fora da área do complexo amígdaloide. A Tabela abaixo apresenta a distribuição do número de animais em cada um dos seis grupos deste experimento.

Lesão	CAC	Controle	CBC
Amígdala	9	7	7
Falsa	11	12	12

Distribuição do número de animais do sexo masculino entre os seis grupos formados através da combinação das linhagens com alta (CAC), controle e baixa (CBC) taxa de congelamento e o tipo de lesão (lesões no complexo amígdaloide ou falsas lesões).

A figura abaixo apresenta a média da resposta de congelamento durante a sessão de teste do primeiro procedimento de condicionamento contextual aversivo entre os 144 animais que compuseram a amostra inicial do estudo.



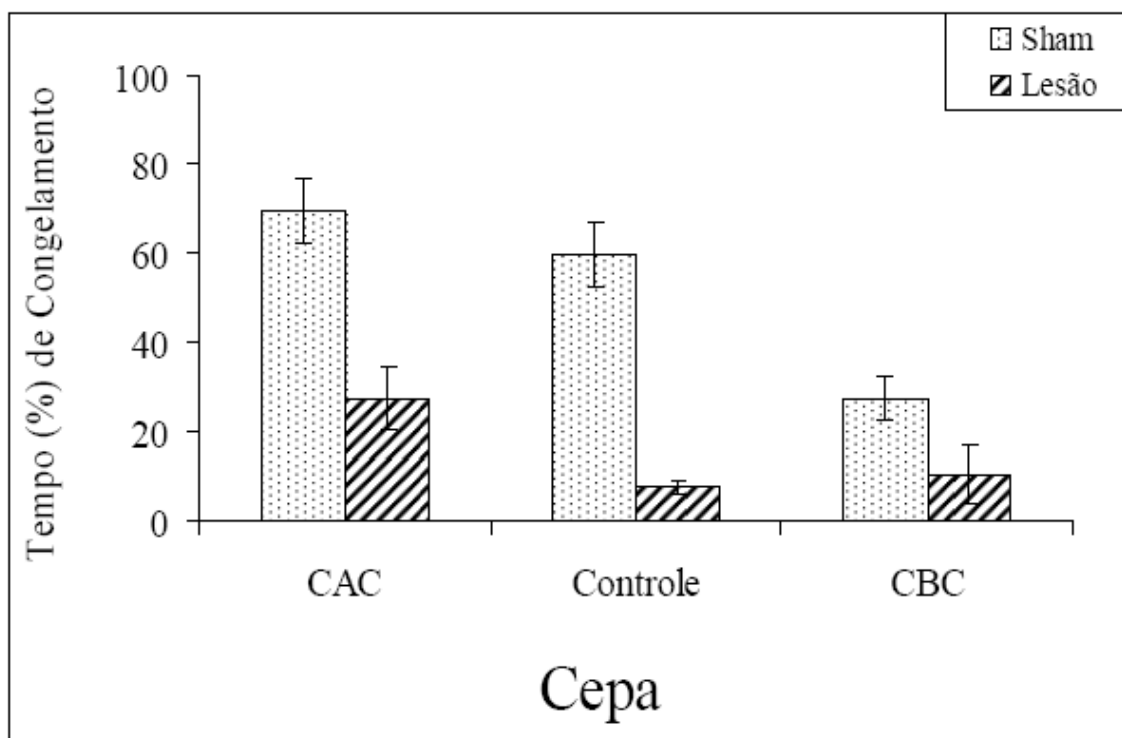
Porcentagem média do tempo de congelamento dos animais selecionados para o experimento.

Uma análise de variância (ANOVA) de duas vias (2 x 3) foi empregada para analisar os resultados. O primeiro fator, com dois níveis, estava relacionado com o sexo (machos e fêmeas). O segundo fator, com três níveis, estava relacionado com o tipo de linhagem (CAC, CBC e controle). Comparações par-par foram realizadas através do teste *t-student*. A



ANOVA revelou um efeito significativo para o sexo ( $F(1,144)=17,7$ ;  $p<0,001$ ) e para a linhagem ( $F(2,144)=45,10$ ;  $p<0,001$ ). A interação entre estes dois fatores não foi significativa ( $F(2,144)=0,53$ ;  $p>0,58$ ). Comparações par-a-par confirmam a impressão da Figura 5, com machos apresentando uma quantidade maior de congelamento em relação às fêmeas (todos os  $p's<0,05$ ). Mais ainda, animais da linhagem CAC permaneceram na postura de congelamento por um tempo maior em relação à linhagem CBC e controle, tanto entre machos quanto entre fêmeas (todos os  $p's<0,001$ ). Da mesma forma, animais da linhagem CBC permaneceram na postura de congelamento por um tempo menor em relação à linhagem CAC e controle tanto entre machos e fêmeas (todos os  $p's<0,001$ ). Finalmente, animais controles (machos e fêmeas) apresentaram uma resposta de congelamento intermediária em relação aos animais da linhagem CAC e CBC (todos os  $p's<0,001$ ).

A figura abaixo apresenta a porcentagem média do tempo de congelamento durante o período de treino entre os 58 animais que foram submetidos ao segundo procedimento de condicionamento contextual aversivo após terem recebido lesões no complexo amígdalóide ou lesões falsas. A tabela previamente apresentada apresenta a distribuição do número de animais para cada um destes grupos.

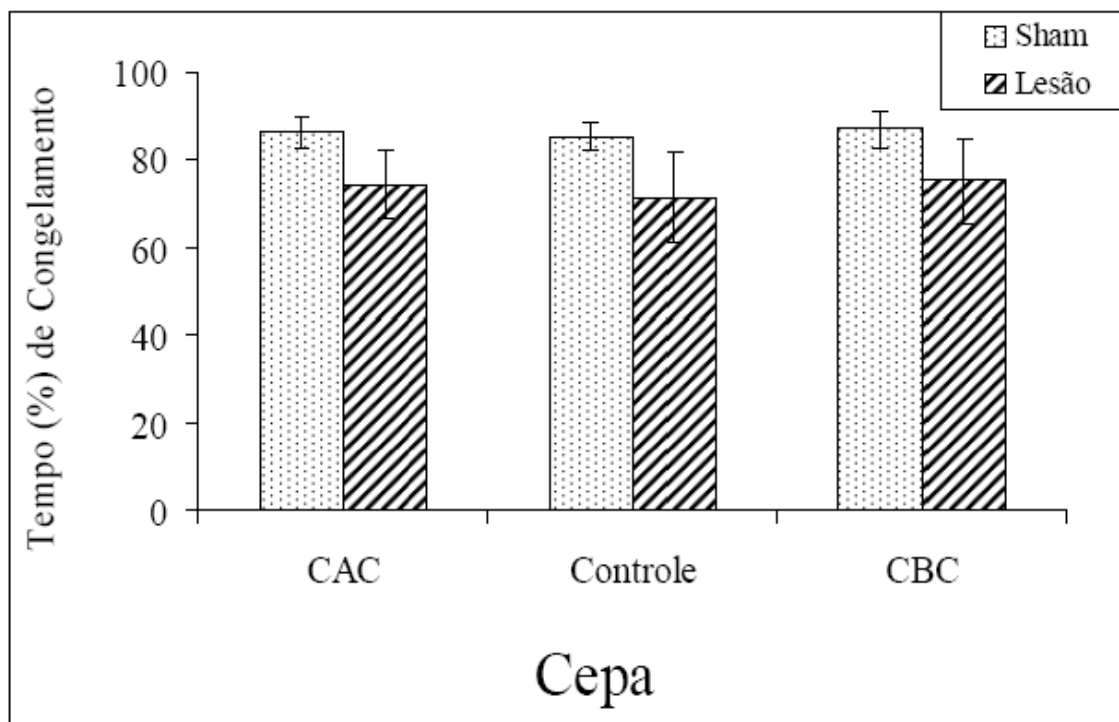


Representação gráfica da porcentagem média do tempo de congelamento 3 minutos antes do início da segunda série de choques.

Estes resultados foram analisados através de uma ANOVA de duas vias (2 x 3). O primeiro fator, com dois níveis, estava relacionado com o tipo de lesão (amígdala ou falsa lesão (sham)). O segundo fator, com três níveis, estava relacionado com a linhagem do animal (CAC, CBC e controle). Esta ANOVA indicou um efeito significativo em relação à lesão ( $F(1,58)=42,4$ ;  $p<0,001$ ) e para a linhagem ( $F(2,58)=9,1$ ;  $p<0,001$ ). A interação entre estes dois fatores também se mostrou significativa ( $F(2,58)=3,2$ ;  $p<0,05$ ). Comparações par-a-par indicaram que todos os animais submetidos à lesão da amígdala apresentaram uma redução significativa da resposta de congelamento em relação às suas respectivas linhagens que receberam lesões falsas (todos os  $p's <0,01$ ). Nenhuma diferença foi encontrada em relação à

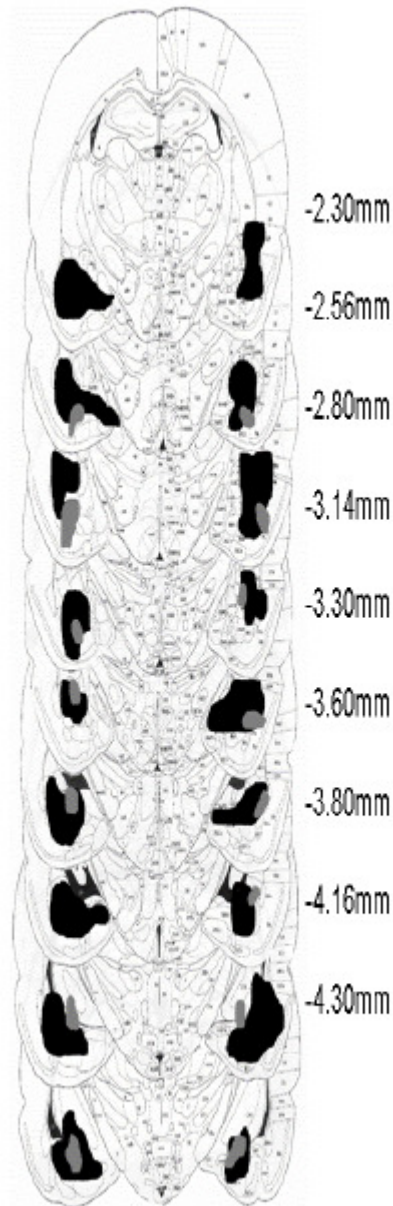
resposta de congelamento entre os animais com lesões na amígdala da linhagem CBC e controles ( $p>0,7$ ). Ainda em relação à figura acima, as comparações par-a-par entre os animais que receberam lesões falsas indicaram uma diferença significativa entre as linhagens CAC e CBC assim como entre a linhagem CAC e animais controles (todos os  $p's<0,05$ ). Nenhuma diferença foi encontrada entre os animais da linhagem CBC e animais controle ( $p>0,3$ ).

Uma análise da redução da resposta de congelamento produzida pela lesão do complexo amigdalóide utilizando como referência as médias das respostas de congelamento dos grupos “shams” indicou que lesões no grupo CAC produziram uma redução de 60,6% na taxa de congelamento. Lesões no grupo CBC produziram reduções similares (63,0%). Finalmente lesões no grupo controle levaram a uma redução de 87,7% na taxa da resposta de congelamento. Na figura abaixo podemos observar a porcentagem média de tempo de congelamento 24 horas após o segundo procedimento de condicionamento contextual aversivo. Uma ANOVA revelou um efeito significativo exclusivamente para a lesão ( $F(1,58)=6,68$ ;  $p<0,05$ ). Nenhum efeito em relação à linhagem ( $F(1,2,58)=0,1$ ;  $p>0,9$ ) ou à interação entre estes dois fatores ( $F(2,58)=0,1$ ;  $p>0,9$ ) foi encontrado. Frente aos resultados da ANOVA, a observação da figura revela que, de maneira independente de linhagem, animais lesionados tiveram menor tempo de congelamento do que animais controle. Já as diferenças inter-linhagens observadas nos experimentos anteriores não apareceram para estas medidas.



Representação gráfica da porcentagem média de tempo de congelamento 24 horas após a segunda série de choques.

A figura abaixo apresenta uma composição de desenhos histológicos demonstrando áreas representativas das menores e maiores lesões na amígdala. Análises histológicas das lesões eletrolíticas bilaterais na amígdala indicaram que elas tenderam a ser simétricas, e danificaram grande parte das porções basolateral, central e lateral desta estrutura.



Composição das secções coronais, adaptadas do Atlas Paxinos e Watson (1986). Os números indicam a distancia em milímetros de bregma. As menores lesões estão indicadas em cinza e as maiores em preto.

## **Discussão**

Os resultados do experimento que lesionou o complexo amigdalóide em ratos geneticamente selecionados indicaram que a reexposição de animais previamente condicionados a uma nova sessão de condicionamento contextual aversivo foi capaz de aumentar drasticamente a resposta de congelamento observada na primeira sessão de condicionamento. De fato, esta segunda sessão aboliu o efeito das linhagens CAC e CBC, uma vez que todos os grupos, incluindo o grupo controle, apresentaram um acentuado aumento na taxa da resposta de congelamento após uma segunda série de choques aplicados 30 dias após a primeira sessão.

Este desaparecimento do efeito da linhagem observado após a segunda sessão de condicionamento pode estar associado ao efeito de “supercondicionamento” [18, 43]. Embora não exista uma clara definição da quantidade de choques necessários para produzir este efeito [32], é possível que três novos choques presentes em nosso procedimento, sejam capazes de produzir tal efeito. Gale e colaboradores [17], por exemplo, utilizaram o procedimento do “supercondicionamento” em ratos que receberam lesões neuroquímicas no complexo basolateral da amígdala. Neste caso, 76 choques não sinalizados foram utilizados dias após uma sessão de condicionamento prévio. Observou-se que os animais lesionados submetidos a esta série maior de choques tiveram um desempenho da resposta de congelamento similar àqueles animais não lesionados que receberam o treinamento normal, com três choques. É interessante observar que a intensidade do choque utilizada foi a mesma da presente dissertação, 1 mA. Fanselow e Gale [18] observaram o mesmo efeito do supercondicionamento, após uma série de 75 choques não sinalizados de 1 mA em ratos lesionados na porção frontotemporal da amígdala. Além de serem recolocados no contexto onde receberam os choques elétricos, os animais também foram expostos a um contexto novo, onde tiveram uma porcentagem muito baixa da resposta de congelamento. Experimentos que utilizaram lesões pré-treinamento também demonstraram o efeito do super-condicionamento. Maren [44] observou que ratos que sofreram lesões na porção basolateral da amígdala antes do condicionamento contextual aversivo tiveram um desempenho similar ao grupo controle (que não recebeu as lesões) quando a quantidade de choques foi de 75. Desta forma, uma maior quantidade de choques preservou a capacidade dos animais lesionados de demonstrarem a resposta de congelamento. Experimentos nos quais ocorre um aumento da resposta de congelamento em animais com lesões no complexo amigdalóide sugerem a existência de uma hierarquia nos circuitos neurais do medo e da ansiedade. Ponnusamy e colaboradores [43], por exemplo, sugerem que o complexo basolateral da amígdala seja a via primária deste circuito, sendo que em sua ausência circuitos secundários possam desempenhar um papel compensatório no condicionamento aversivo.

Um efeito teto pode ser uma possibilidade alternativa para explicar a ausência de diferença entre as linhagens CAC e CBC após a segunda sessão de choques. De fato, a quantidade de congelamento observada nesta sessão foi extremamente alta, atingindo porcentagens próximas de 80% a 90%, uma vez que o tempo de observação foi de apenas quatro minutos. Dessa forma, seria interessante ter um procedimento que envolvesse um tempo maior de observação, ou então poderiam ter sido feitas outras sessões de extinção. Com um tempo maior, talvez as linhagens se diferenciasssem e chegassem ao padrão de comportamento já observado. Um fato interessante observado nos dois experimentos deste trabalho foi à maior taxa de congelamento de machos em relação às fêmeas tanto na linhagem CAC como na CBC. Por esta razão, ratos machos foram utilizados na segunda parte do segundo experimento que investigou a participação do complexo amigdalóide sobre a resposta de congelamento nestas duas linhagens. Segundo Steimer & Driscoll [45], a grande maioria

dos estudos experimentais que envolvem ansiedade e estresse em roedores utilizam animais machos.

Basicamente, esta preferência está ligada aos efeitos negativos que variações fisiológicas e comportamentais que as fêmeas apresentam devido ao ciclo reprodutivo. Tais variações estão ligadas a flutuações nos níveis dos hormônios estrogênio e progesterona. Observa-se que fêmeas, como por exemplo, ratas da linhagem “Roman High Avoidance”, são mais ativas e menos ansiosas na fase do proestro (fase que antecede a fase fértil) em comparação com fêmeas desta mesma linhagem na fase diestro (não-fértil). Além disso, hormônios ligados ao sexo também podem influenciar no desempenho cognitivo, associados à aprendizagem [44].

As diferenças sexuais nos testes de ansiedade com roedores foram inicialmente postuladas com base em observações no campo aberto. Neste modelo os ratos machos mostram menor atividade locomotora e maiores taxas de defecação do que as fêmeas. Tais resultados são tradicionalmente interpretados como um indicativo de que os machos são mais “ansiosos” e “medrosos” do que as fêmeas. Entretanto um número alternativo de explicações (como o metabolismo, por exemplo) pode influenciar nas diferenças encontradas nas taxas de defecação e ambulação. Testes feitos com três outros modelos animais de ansiedade (interação social, o labirinto em cruz elevado e o teste de conflito de Vogel) também indicam diferenças sexuais. No entanto, as diferenças variaram através dos testes, com as fêmeas demonstrando menos ansiedade no labirinto em cruz elevado, e sendo mais ansiosas no teste de conflito de Vogel. Blanchard e colaboradores [46] forneceram evidências de que as fêmeas são mais ansiosas do que os machos em situações de perigo potencial, como a presença de um gato ou somente o odor dele [47]. Finalmente, deve-se reconhecer que vários aspectos relacionados ao presente processo de seleção genética, tais como a intensidade do choque elétrico, ainda carecem de maior investigação. No presente trabalho, utilizou-se uma intensidade de 1mA. É possível que esta intensidade tenha sido excessiva, especialmente porque foram empregados três choques com intervalos de 20 segundos. Testagens com diferentes intensidades seriam necessárias para investigar essa questão de forma sistemática e verificar qual a intensidade ideal de choques para produzir uma dissociação mais rápida da resposta de congelamento.

Deve-se reconhecer também que existe a possibilidade de que a dissociação da resposta de congelamento entre as linhagens CAC e CBC esteja relacionada não a processos emocionais mais sim a fenômenos sensoriais associados ao processo dos choques elétricos. É possível que a linhagem CAC tenha desenvolvido uma maior sensibilidade dolorosa a choques elétricos ao passo que a linhagem CBC uma menor sensibilidade a este estímulo aversivo. Nesse sentido, seria interessante avaliar a reação que estes animais exibem durante a apresentação de choques elétricos. Está é uma tarefa complexa, uma vez que estas reações são de difícil quantificação e tem uma duração muito rápida, uma vez que a duração do choque elétrico é de apenas um segundo.

Uma avaliação indireta desta possível crítica relacionada a aspectos sensoriais entre as linhagens CAC e CBC seria a de testar estas duas linhagens em outros modelos animais de ansiedade. Nesse sentido, estudos já estão sendo feitos em nosso laboratório, utilizando-se o labirinto em cruz elevado e o campo aberto com objetivo de verificar se as linhagens CAC e CBC apresentam comportamentos diferenciados nestes dois modelos de ansiedade. Mais ainda, estas mesmas linhagens deverão também ser testadas em outros modelos não relacionados com ansiedade, como por exemplo, o labirinto aquático de Morris. Se, de fato, as linhagens CAC e CBC foram selecionadas exclusivamente com base em processos emocionais, então se espera que ambas as linhagens apresentem desempenhos similares neste modelo animal relacionado com memória espacial.

## **Referências**

- 1- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. DSM-IV: Manual Estatístico de Transtornos Mentais. Porto Alegre: ArtMed, 2002.
- 2- GROSS, C.; HEN, R. The developmental origins of anxiety. *Nature Reviews Neuroscience*, V. 5, pp. 545-552, 2004.
- 3- CALDER, A.J.; LAWRENCE, A.D.; YOUNG, A.W. Neuropsychology of fear and loathing. *Nature Reviews*, V. 2, pp. 352-363, 2001.
- 4- LANDEIRA-FERNANDEZ, J.; CRUZ, A.P.M.; BRANDÃO, M.L. Padrões de Respostas Defensivas de Congelamento Associados a Diferentes Transtornos de Ansiedade. *Psicologia USP, Bol.* 17(4), pp.175-192, 2006.
- 5- KIM, J.; GORMAN, J. The Psychobiology of anxiety. *Clinical Neuroscience Research*. V. 4, pp. 335-347, 2005.
- 6- ALMEIDA-FILHO, N.; MARI, J.J.; COUTINHO, E; FRANÇA, J.F.; FERNANDES, F.; ANDREOLI, S.B. Brazilian multicentric study of psychiatric morbidity. *British Journal of Psychiatry*, V. 171, pp. 524-529, 1997.
- 7- ARIKIAN, S.R.; GORMAN, J.M. A review of the diagnosis, pharmacologic treatment, and economic aspects of anxiety disorders. *Prim care companion. Journal of Clinical Psychiatry*, V. 3, pp.110-117, 2001.
- 8- SMALL, W. Notes on the psychic development of the white rat. *American Journal of Psychology*, V.11, pp. 80 – 100, 1899.
- 9- GRIFFITH, C.R. The behavior of white rats in the presence of cats. *Psychobiology*, V. 2, pp. 19-28, 1920.
- 10- BOUTON, M.E.; BOLLES, R.C. Conditioned fear assessed by freezing and by suppression of three different baselines. *Animal Learning & Behavior*, V. 8, pp. 429-434, 1980.
- 11- FENDT, M.; FANSELOW, M.S. The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, V. 23, pp.743-760, 1999.
- 12- FANSELOW, M.S.; LESTER L.S. A functional behavioristic approach to aversively motivated behavior: predatory imminence as a determinant of the topography of defensive behavior. *Evolution and Learning*, pp. 185-212, 1988.
- 13- CONTI, L. H., MACIVER, C.R., FERKANY, J.W., ABREU, M.E. Footshockinduced freezing behavior in rats as a model for assessing anxiolytics. *Psychopharmacology (Berl)*, V. 102, pp. 492-497, 1990.

- 14- AMARAL, D.G.; PRICE, J.L.; PITKANEM, A.; CARMICHAEL, S.T. "Anatomical organization of the primate amygdala complex." In: *The Amygdala*, J. Aggleton, ed., New York: Wiley-Liss, pp 1-67, 1992.
- 15- SWANSON, L.W.; PETROVICH, G.D. What is the amygdala? *Trends in Neuroscience*, V.21, Issue 8, 1, pp.323-331, 1998.
- 16- PITKANEN, A.; SAVANDER, V.; LEDOUX, J.E. Organization of intraamygdaloid circuitries in the rat: an emerging framework for understanding functions of the amygdala. *Trends in Neurosciences*, V. 20, Issue 11, pp. 517-523, 1997.
- 17- GALE, G.D.; ANAGNOSTARAS, S.G.; GODSIL, B.P.; MITCHELL, S.; NOZAWA, T.; SAGE, J.R.; WILTGEN, B.; FANSELOW, M.S. Role of the basolateral amygdala in the storage of fear memories across the adult lifetime of rats. *The Journal of Neuroscience*, V. 14, pp. 3810-3815, 2004.
- 18- FANSELOW, M.S.; GALE, G.D. *The Amygdala, Fear and Memory*. Annual N.Y. Academy of Sciences, V. 985, pp. 125 – 134, 2003.
- 19- LEDOUX, J.E. Emotion Circuits in the Brain. *Annual Review of Neuroscience*, V. 23, pp. 155 – 184, 2000.
- 20- MCDONALD, A.J.; AUGUSTINE, J.R. Localization of GABA-like immunoreactivity in the monkey amygdale. *Neuroscience*, V.52 (2), pp. 281-294, 1993.
- 21- SUN, N.; CASSEL, M.D. Intrinsic GABAergic neurons in the rat central extended amygdala. *Journal of Comparative Neurology*, V.15; 330(3), pp.381-404, 1993.
- 22- MCDONALD, A.J.; AUGUSTINE, J.R. Localization of GABA-like immunoreactivity in the monkey amygdale. *Neuroscience*, V.52 (2), pp. 281-294, 1993.
- 23- BLANCHARD, C.D.; BLANCHARD, R.J. Innate and conditioned reactions to threat in rats with amygdaloid lesions. *Journal of Comparative Physiological Psychology*, V.81. pp. 281-290, 1972.
- 24- KIM, J.J.; RISON, R.A.; FANSELOW, M.S. Effects of amygdala, hippocampus, and periaqueductal gray lesions on short- and long-term contextual fear. *Behavioral Neuroscience*, V.107, pp. 1093-1098, 1993.
- 25- CAMPEAU, S.; DAVIS, M. Involvement of the central nucleus and basolateral complex of the amygdala in fear conditioning measured with fear-potentiated startle in rats trained concurrently with auditory and visual conditioned stimuli. *The Journal of Neuroscience*, V. 15, pp. 2301-2311, 1995.
- 26- DAVIS, M. *The Role of the Amygdala in Fear and Anxiety*. Annual Review of Neuroscience, V. 15, pp. 353-75, 1992.
- 27- LEDOUX, J.E. *O cérebro emocional*. Rio de Janeiro: Editora Objetiva, 1998.

- 28- LEDOUX, J.E. Emotion Circuits in the Brain. *Annual Review of Neuroscience*, V. 23, pp. 155 – 184, 2000.
- 29- LEDOUX, J.E. The Emotional Brain, Fear, and the Amygdala. *Cellular and Molecular Neurobiology*, V.23, n. 4/5, pp.727 – 738, 2002.
- 30- LEDOUX, J.E.; CICCETTI, P.; XAGORARIS, A.; ROMANSKI, L.M. The lateral amygdaloid nucleus: Sensory interface of the amygdala in fear conditioning. *The Journal of Neuroscience*, V. 10, pp. 1062-1069, 1990a.
- 31- LEDOUX, J.E.; FARB, C.F.; RUGGIERO, D.A. Topographic organization of neurons in the acoustic thalamus that project to the amygdala.. *The Journal of Neuroscience*, V.10, pp. 1043-1054, 1990b.
- 32- MAYER, EA.; FANSELOW, MS. Dissecting the components of the central response to stress. *Nature Neuroscience*, V. 6(10), pp.1011-1012, 2003.
- 33- MCGAUGH, J.L.; CAHILL, L.; ROOZENDAL, B. Involvement of the amygdale in memory storage: Interaction with other brain systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, V.93, pp.13508-13514, 1996.
- 34- AMUNTS, K.; KEDO, O.; KINDLER, M.; PIEPERHOFF, P.; MOHLBERG, H.; SHAH, N.J.; HABEL, U.; SCHNEIDER, F.; ZILLES, K. Cytoarchitectonic mapping of the human amygdala, hippocampal region and entorhinal cortex: intersubject variability and probability maps. *Anatomy and Embryology*, V. 210, pp. 343-352, 2005.
- 35- OLIVEIRA, L.C.; NOBRE, M.J.; BRANDÃO, M.L.; LANDEIRAFERNANDEZ, J. Role of the amygdala in conditioned fear generated in the periaqueductal gray. *Learning and Memory*, V.15(14), pp.2281 – 2285, 2004.
- 36- WALKER, D.L.; DAVIS, M. The role of amygdala glutamate receptors in fear learning, fear-potentiated startle, and extinction. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, V.71, pp. 379 – 392, 2002.
- 37- IWATA, J.; LEDOUX, J.E.; MEELEY, M.P.; ARNERIC, S.; REIS, D.J. Intrinsic neurons in the amygdale field projected by the medial geniculate body mediate emotional responses conditioned to acoustic stimuli. *Brain Research*, V. 383, pp.195-214, 1986.
- 38- GAFFAN, D.; HARRISON, S. Amygdalectomy and disconnection in visual learning for auditory secondary reinforcement by monkeys. *Journal of Neuroscience*, V. 7. pp. 2285-2292, 1987.
- 39- HELMSTETTER, F.J. Contribution of the amygdala to learning and performance of conditioned fear. *Physiology and Behavior*, V. 51, pp. 271-1276, 1992.
- 40- HELMSTETTER, F.J. Stress-induced hypoalgesia and defensive freezing are attenuated by application of diazepam to the amygdale. *Pharmacological Biochemistry*, pp. 433-438, 1993.



- 41- HELMSTETTER, F.J.; BELLGOWAN, P.S. Effects of Muscimol applied to the basolateral amygdala on acquisition and expression of contextual fear conditioning in rats. *Behavioral Neuroscience*, V. 108, pp.1005 – 1009, 1994.
- 42- PAXINOS, G.; WATSON, C. *The rat brain in the Stereotaxic Coordinates*, Second Edition, Academic Press, Sydney, 1986.
- 43- PONNUSAMY, R.; POULOS, A.M.; FANSELOW, M.S. Amygdala-dependent and amygdala-independent pathways for contextual fear conditioning. *Behavioral Neuroscience*, V.147, Issue 4, pp. 919-927, 2007.
- 44- MAREN, S. Neurobiology of Pavlovian Fear Conditioning. *Annual review of Neuroscience*, V. 24, pp.897-931, 2001.
- 45- STEIMER, T.; DRISCOLL, P. Inter-individual vs line strain differences in psychogenetically selected roman high – (RHA) and low (RLA) avoidance rats. Neuroendocrine and behavioral aspects. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, V.29, pp. 99-112, 2005.
- 46- BLANCHARD, C.D.; SHEPERD, J.K.; DE PÁDUA CAROBREZ, A.; BLANCHARD, A. Sex effects in defensive behaviors: baseline differences and drug interaction. *Neuroscience Biobehavioral Reviews*, V. 15, pp.461-468, 1991.
- 47- PALANZA, P. Animal Models of anxiety and depression: How are females different? *Neuroscience Biobehavioral Review*, V. 25, pp. 219-33, 2001.