



Vitor de Castro Gomes

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

Dissertação de Mestrado

Dissertação apresentada como requisito parcial para
obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-
graduação em Psicologia do Departamento de
Psicologia da PUC-Rio.

Orientador: Prof. Jesus Landeira-Fernandez

Rio de Janeiro
Outubro de 2007



Vitor de Castro Gomes

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

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Psicologia Clínica do Departamento de Psicologia do Centro de Teologia e Ciências Humanas da PUC-Rio. Aprovada pela Comissão Examinadora abaixo assinada.

Prof. Jesus Landeira Fernandez
Orientador

Departamento de Psicologia - PUC-Rio

Profº. Guilherme Gutman C. de Araújo
Departamento de Psicologia - PUC-Rio

Profº. André de Ávila Ramos
Departamento de Biologia Celular Embriologia e
Genética - UFSC

Prof. Paulo Fernando Carneiro de Andrade
Coordenador Setorial de Pós-Graduação
e Pesquisa do Centro de Teologia
e Ciências Humanas – PUC-Rio

Rio de Janeiro, / /200 .

Todos os direitos reservados. É proibida a reprodução total ou parcial do trabalho sem autorização da universidade, do autor e do orientador.

Vitor de Castro Gomes

Aluno do curso de Doutorado em Psicologia pela linha Clínica e Neurociências, Departamento de Psicologia PUC-rio, início 03/2008. Mestrado em Psicologia pela linha Clínica e Neurociências, Departamento de Psicologia PUC-rio – 03/2006 – 10/2007. Bolsista CNPQ. Graduação: Psicologia – Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora – 03/2000 – 07/2005.

Ficha Catalográfica

Gomes, Vitor de Castro

Participação do complexo amigdalóide na resposta de congelamento em ratos geneticamente selecionados / Vitor de Castro Gomes ; orientador: Jesus Landeira-Fernandez. – 2007.

68 f. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado em Psicologia) – Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

Inclui bibliografia

1. Psicologia – Teses. 2. Ansiedade. 3. Amígdala. 4. Linhagens. I. Landeira-Fernandez, Jesus. II. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Departamento de Psicologia. III. Título.

CDD: 150

Dedico esta conquista aos meus pais, Francisco e Elizabete, meus grandes exemplos de vida, por me apoiarem sem medir esforços em todos os momentos, tornando possível o início desta caminhada.

Agradecimentos

Ao meu orientador, J. Landeira-Fernandez, pelo imenso apoio e dedicação, e por despertar em mim o interesse cada vez maior pelo estudo e pela ciência.

Ao CNPq, que possibilitou financeiramente toda a pesquisa e a PUC-rio, minha segunda casa, que forneceu todas as condições para que esta pesquisa fosse realizada.

A todos os funcionários do Departamento, pela grande ajuda, e por compartilharem comigo diariamente inúmeras dificuldades e alegrias.

Aos professores do Departamento, por serem uma fonte constante de inspiração.

Aos meus companheiros de pesquisa, amigos queridos: Ana Carolina, Bruno Galvão, Bruno Larrubia, Maria Raquel, Flávia Paes, Gisele Dias, Renata Barbosa, Fabiano Castro, Tânia Netto e Wouter Hommes. Compartilhamos inúmeros momentos alegres e especiais, que tornaram esta caminhada muito mais feliz e inesquecível.

Ao Alex, nosso bioterista, pelas inúmeras risadas e pelo apoio inestimável em absolutamente todos os momentos.

À minha querida tia Luzia Helena, pela enorme ajuda e pelo grande interesse em todas as minhas atividades.

Ao professor André Ramos, pelas valiosas críticas e pela imensa contribuição no desenvolvimento do trabalho.

Ao professor Mário Fiorani, e a todo o pessoal do laboratório de Fisiologia da Cognição Visual da UFRJ, pelas muitas contribuições e pelos importantes seminários.

Ao professor Marcus Brandão, e todos os pesquisadores e alunos da USP de Ribeirão Preto, pelos ótimos momentos compartilhados e pelo contínuo interesse em minha pesquisa.

Ao professor Fernando Cardenas, e seus alunos, Alejandro, Maria Angélica, Andréas, Carlos e Laura, por intervenções importantes e precisas em meu trabalho.

Aos meus inseparáveis amigos do peito: Luis Augusto, Marcos Eduardo, Felipe Pereira, Vinícius Figueiredo, Conrado Lawall, José Simão, Filipe Gomes, Angelo Batista, Marcos Guilhon, por estarem sempre ao meu lado em todos os momentos de minha vida.

Aos meus irmãos, Leandro de Castro e Pedro Henrique, pelo carinho e pela ajuda inestimável.

Pelo amor, carinho e dedicação em absolutamente todos os momentos, dedico esta conquista a meu grande amor, Mariana, uma pessoa que conheci no início desta caminhada, e que se tornou parte indissociável de minha vida.

Resumo

Gomes, Vitor de Castro, Fernandez, Jesus Landeira (Orientador). **Participação do Complexo Amigdalóide na Resposta de Congelamento em ratos geneticamente selecionados.** Rio de Janeiro, 2007. 68p. Dissertação de Mestrado – Departamento de Psicologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

Linhagens de animais são bastante usadas para investigar as bases genéticas de várias desordens psiquiátricas. No primeiro estudo deste trabalho, desenvolveu-se ao longo de três gerações, duas linhagens de ratos para reagirem com alta (Cariocas com Alto Congelamento - CAC) ou baixa (Cariocas com Baixo Congelamento - CBC) resposta condicionada de congelamento a estímulos contextuais previamente associados a choques elétricos. Um segundo estudo investigou os efeitos de lesões eletrolíticas no complexo amigdalóide sobre a resposta condicionada de congelamento nestas duas linhagens de animais. Ratos controles, que não pertenciam a estas linhagens, foram usados para determinar uma linha de base da resposta de congelamento. Lesões foram feitas após a fase de aquisição, quando os ratos receberam 3 choques não sinalizados numa caixa de condicionamento. Lesões falsas foram feitas em ratos dos três grupos. Resultados mostraram que as lesões na amígdala diminuíram a resposta de congelamento nos três grupos. Os resultados também mostraram que lesões na amígdala produziram efeitos semelhantes nas linhagens CAC e CBC. Estes resultados são discutidos levando-se em conta possíveis circuitos neurais envolvidos na resposta de congelamento.

Palavras-chave

Modelos animais de ansiedade, Emocionalidade, Linhagens, Seleção genética

Abstract

Gomes, Vitor de Castro, Fernandez, Jesus Landeira (Advisor). **Involvement of the amygdaloid complex on the freezing response in genetically selected rats.** Rio de Janeiro, 2007. 68p. MSc. Dissertation – Departamento de Psicologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

Animal selected lines are often used to investigate the genetic basis of many psychiatric disorders. In the first study of this work, selected lines of rats with high (Carioca High freezing- CHF) and low (Carioca Low Freezing- CLF) conditioned freezing to contextual cues previously associated with electric shocks were developed. In a second study, the effect of amygdaloid electrolytic lesions on conditioned freezing was investigated in these two selected lines. Control rats, which did not belong to the selected lines, were employed to determine conditioned freezing baseline. Lesions were made after the acquisition phase, when the rats received 3 unsignaled shocks in a conditioning chamber. Sham lesions were made in rats of all groups. Results indicated that the amygdaloid lesions decreased the freezing response in all the groups of animals. Results also revealed that the amygdaloid lesions produced similar effects in the CHF and CLF lines. These results are discussed in terms of possible neural circuitry involved in freezing response.

Keywords

Animal models of anxiety, Amygdala, Emotionality, Strains, Genetic selection.

Sumário

1. Introdução.	11
1.1. Teorias da Emoção	12
1.2. Modelos Animais de Ansiedade	15
1.2.1. Condicionamento Aversivo	15
1.2.2. A Resposta de Congelamento	18
1.3. Estruturas Neurais Relacionadas ao Medo e Ansiedade	19
1.3.1. Hipocampo e Matéria Cinzenta Periaquedutal	19
1.3.2. Sistema Límbico	21
1.3.3. Complexo Amigdalóide	21
1.3.4. Participação da Amígdala no Condicionamento Aversivo	25
1.4. Produção de linhagens com alta e baixa emocionalidade	26
2. Objetivos	29
3. Estudo 1	30
3.1. Método	30
3.1.1. Sujeitos	30
3.1.2. Equipamentos	31
3.1.3. Procedimento	31
3.2. Resultados	34
4. Estudo 2	38
4.1. Método	38
4.1.1. Sujeitos	38
4.1.2. Equipamento	38
4.1.3. Procedimento	38
4.1.4. Procedimentos Cirúrgicos	39
4.1.5. Histologia	40
4.2. Resultados	41
4.2.1. Análise Comportamental	42
5. Discussão	44
Referências bibliográficas	51
Anexo	59

“A natureza, para ser controlada, deve ser obedecida”
Francis Bacon

Introdução

O Manual Estatístico Diagnóstico de Doenças Mentais, o DSM-IV (American Psychiatric Association, 2002) define os transtornos de ansiedade de acordo com vários critérios diagnósticos, como preocupação excessiva, recorrente e desproporcional à realidade. Além disso, observa-se 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.

De acordo com Gross e Hen (2004), 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. Inferimos que outras pessoas também devem sentir conscientemente essas emoções, mas certeza mesmo ninguém tem.

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 (Calder e colaboradores, 2001).

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 (Landeira-Fernandez e colaboradores, 2006).

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 (Kim e Gorman, 2005).

De fato, ansiedade é benéfica ao organismo quando utilizada dentro de certo limite. Tal idéia foi descrita no início do século passado (1908) 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 (Kim & Gorman, 2005). 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 (Landeira-Fernandez, 2006; Almeida-Filho e colaboradores, 1997; Arikian & Gorman, 2001)

1.1

Teorias da emoção

A ansiedade, assim como o medo, sempre despertou um grande número de indagações ao longo da história da humanidade. Por causa disso, também sempre foi entendida sob uma infinidade de prismas e paradigmas. Atualmente o campo da neurociência se debruçou sobre o tema das emoções, adotando um paradigma calcado na teoria da seleção natural de Charles Darwin, de 1859 (republicado em 2000).

Em 1872, Charles Darwin publicou um livro impressionante: “A expressão das emoções nos homens e nos animais”. Neste livro, que foi o ápice de mais de 34 anos de pesquisas sobre inúmeras espécies animais, Darwin fez duas importantíssimas contribuições ao campo de estudo das emoções. A homologia das expressões emocionais entre os homens e os animais foi a primeira delas. Darwin, através do estudo aprofundado de centenas de figuras de animais, observou uma alta similaridade na forma de exprimir as emoções entre os animais e o homem. (Dalglish, 2004).

A segunda importante contribuição de Darwin foi a noção das “emoções básicas”. Tais emoções fundamentais, que incluem medo, raiva, surpresa e tristeza acompanham indivíduos de diferentes culturas e sociedades (Dalglish, 2004).

Depois de Darwin, uma das primeiras teorias sobre a emoção foi desenvolvida de forma independente pelo filósofo americano William James e pelo fisiologista dinamarquês Carl Lange, em 1884. A teoria “James-Lange” na verdade reverteu a forma usual de se pensar as emoções. Segundo os autores, ao nos depararmos com algum estímulo que represente perigo, nosso organismo primeiro responde fisiologicamente, com todas suas manifestações características. Neste estágio ainda não temos acesso consciente a essas respostas. Somente depois que as mudanças corporais eclodidas através do contato com o estímulo aversivo se tornarem conscientes é que as emoções são interpretadas e definidas subjetivamente.

Walter Cannon (1871-1945) e Philip Bard (1941-1946) revisaram a teoria de James-Lange no início do século vinte. Eles introduziram a noção do “processamento paralelo”, alterando o sistema de feedback proposto pela teoria James-Lange. Na verdade, segundo os autores, as respostas emocionais fisiológicas e conscientes disparadas na presença de um estímulo ameaçador ocorrem de forma paralela. É interessante observar que tais respostas não possuem, na visão destes autores, uma relação causal direta (Pinel, 2005).

Stanley Schachter e Jerome Singer foram dois psicólogos americanos que desenvolveram, em 1962, uma teoria das emoções que, assim como a de James, privilegiou a experiência consciente para a definição de uma emoção. Entretanto, segundo eles, somente a experiência das reações corporais não seria suficiente para se discriminar qual emoção está sendo vivenciada, devido à semelhança entre as reações fisiológicas.

Desse modo, eles propuseram a ação do chamado “rótulo cognitivo”, que seria produzido através das informações que o sujeito adquire do seu meio social para “rotular” suas reações emocionais.

Assim podemos observar que os pesquisadores consideraram dois fatores na produção de uma emoção: o fisiológico e o cognitivo. Como as cognições estão estreitamente vinculadas ao meio social do sujeito, tal teoria preconiza que os estímulos ambientais possuem um significativo impacto na interpretação emocional de um estímulo, mostrando a ambigüidade de qualquer reação emocional.

Heinrich Kluver (1897-1979) e Paul Bucy (1904-1992) observaram, em 1937, um padrão comportamental intrigante em macacos que haviam sofrido remoção de seus lobos temporais. Tal padrão comportamental, chamado posteriormente de Síndrome de Kluver-Bucy, apresenta as seguintes características: alto consumo alimentar, aumento da atividade sexual dirigida a objetos inapropriados, tendência de observação repetida de objetos familiares, ausência de medo. Observou-se que os mesmos macacos que, antes da cirurgia não podiam ser manipulados pelos experimentadores, se tornaram extremamente dóceis depois das lesões. Posteriormente descobriu-se que a maioria destes comportamentos parecia ser resultado de lesões no complexo amigdalóide (Pinel, 2005).

Foi somente em 1956 que Weiskrantz propôs, através de um estudo aprofundado da síndrome de Kluver-Bucy (1938), que o complexo amigdalóide possuía um papel primordial na aquisição e expressão de memórias emocionais. O trabalho original de Kuver-Bucy envolveu a remoção quase completa do lobo temporal de macacos. Weiskrantz, entretanto, mostrou que lesões bilaterais localizadas somente na amígdala destes animais foram suficientes para provocar os comportamentos específicos da síndrome observados inicialmente por Kluver e Bucy. Além disso, a remoção completa da amígdala nos macacos também resultou num forte retraimento social. Outros autores (Kalin, 2001; Bachevalier, 1994), posteriormente também observaram o mesmo fenômeno.

Observa-se que, desde o início do século passado, havia um grande interesse nos mecanismos cerebrais do comportamento emocional. Questões como agressividade, comportamento social, ansiedade, prazer e desprazer eram tidas como extremamente importantes. Mas houve um declínio em tal interesse, devido,

principalmente à chamada “Revolução Cognitiva” em Psicologia, que mudou o foco de interesse para os aspectos puramente cognitivos do funcionamento cerebral. O advento do computador digital facilitou a primazia da cognição como modelo completo para se entender a mente e o cérebro (LeDoux, 1998, 2000; Teixeira, 1998).

Outro problema colocado pelos cientistas cognitivos seria a dificuldade de se estudar as emoções de forma experimental, sem a influência da grande carga de subjetividade que tal processo é capaz de produzir (LeDoux, 1998, 2000; Teixeira, 1998).

A resposta veio através dos chamados modelos animais em psicologia, que simulam, em laboratório, situações que diversos animais enfrentariam no seu ambiente natural, com seu repertório de comportamentos emocionais característico. Além disso, o advento da chamada tomografia computadorizada com emissão de pósitrons proporcionou a possibilidade única de se observar o cérebro humano em funcionamento, abrindo, dessa forma, um leque absolutamente inédito de oportunidades (LeDoux, 1998; 2000).

Tais modelos convergiram para uma série de novas observações e questionamentos. Novos circuitos cerebrais associados à emoção foram sendo descobertos, revelando a primazia no controle de tais circuitos como sendo de uma pequena estrutura subcortical, o chamado Complexo Amigdalóide, ou simplesmente Amígdala.

1.2

Modelos animais de ansiedade

1.2.1

Condicionamento aversivo

Um dos maiores problemas encontrados para se estudar o funcionamento cerebral e os circuitos emocionais se deve justamente à complexidade que tal sistema apresenta. O cérebro possui mais de 100 bilhões de neurônios. Cada qual é capaz de fazer ligações, através de seus axônios, com centenas ou milhares de outras células nervosas. O funcionamento cerebral se dá através destas ligações específicas, os chamados circuitos neuronais. A questão está justamente em isolar

um determinado circuito para poder determinar qual é exatamente seu papel, e qual sua função (LeDoux, 1998).

Uma das saídas encontradas foram as chamadas técnicas de condicionamento. Através delas se torna possível determinar previamente um comportamento específico de um animal ou de um ser humano.

A técnica de condicionamento comportamental mais largamente utilizada nas pesquisas atuais é o chamado Condicionamento Clássico, ou Condicionamento Pavloviano. Por utilizar as respostas inatas do animal, os circuitos neurais associados ao medo, ansiedade e pânico são mais frequentemente observados. Desta forma o condicionamento pelo medo, ou aversivo, é uma importante forma de se produzir respostas emocionais por parte dos organismos (LeDoux, 2000).

O condicionamento aversivo está inserido nos chamados modelos animais de ansiedade (Pinel, 2005; Cruz e colaboradores, 1997). Tais modelos são utilizados nas pesquisas psicobiológicas para testes pré-clínicos de compostos ansiolíticos, e no mapeamento dos circuitos neurais responsáveis pelo medo e ansiedade. Segundo Cruz e colaboradores (1997) existem mais modelos animais de ansiedade do que para qualquer outro tipo de condição psiquiátrica.

Segundo Pinel (2005) a psicologia sempre se utilizou de animais para auxiliar a compreensão de processos mentais humanos. O ponto de partida que permite tal afirmação é a teoria da evolução de Charles Darwin (1859). De acordo com este princípio, existe uma continuidade entre as diferentes espécies. O uso de animais permite testar determinadas hipóteses que jamais poderiam ser respondidas utilizando seres humanos como sujeitos experimentais. Existem diversas vantagens na utilização de modelos animais para este tipo de pesquisa, que passam, principalmente, pelo controle das variáveis. Desta forma, a idade dos animais, seu peso, alimentação, temperatura etc, podem ser conhecidas previamente, facilitando a manipulação das técnicas utilizadas.

De acordo com Schultz & Schultz (1992), diversos tipos de animais já foram utilizados como sujeitos experimentais ao longo da história da psicologia. Pombos, gatos e cachorros são apenas alguns exemplos.

Pavlov (1927) delineou, através de seus experimentos com cães, um tipo de aprendizagem associativa que levou posteriormente o seu nome. No condicionamento pavloviano aversivo, um estímulo condicionado discreto

(geralmente uma luz ou um som) fica associado a um estímulo incondicionado (geralmente um choque nas patas). A principal resposta condicionada eliciada pelo estímulo condicionado é uma redução da atividade geral motora, denominada de congelamento. Tal comportamento é uma reação defensiva adaptativa do animal frente a um estímulo aversivo (Landeira-Fernandez, 1996).

Além de estímulos discretos, a resposta de congelamento pode ficar também associada a estímulos contextuais que estão continuamente presentes no ambiente onde o animal recebe o estímulo incondicionado (Fanselow & Lester, 1988; Landeira-Fernandez, 1996). Observam-se também respostas do sistema nervoso autônomo, como variações na pressão sanguínea e dos batimentos cardíacos, além de respostas neuroendócrinas, como liberação de hormônios da glândula pituitária e das glândulas adrenais (LeDoux, 2002).

Apesar da resposta de congelamento ser uma importante medida do medo, diversos outros comportamentos podem resultar do condicionamento aversivo. Segundo Graeff (1993a), existe um espectro de várias reações que os animais podem assumir numa situação aversiva.

Existem basicamente três situações de perigo para um roedor. Quando se encontra num ambiente novo, que não represente perigo imediato, ele não abre mão de sua precaução. O animal continua com uma investigação cautelosa, chamada de avaliação de risco (“risk assessment”, em inglês). Este é o primeiro nível de defesa (potencial), e serve para o roedor coletar informações importantes do ambiente. Se ele se depara com um predador, o segundo nível de defesa é acionado (distal). Neste caso o comportamento específico é a resposta de congelamento (freezing). A terceira e última fase, a chamada proximal, eclode quando ocorre o encontro próximo com o predador. As reações comportamentais são caracterizadas como sendo de raiva e pânico, com muitos pulos e mordidas (Bouton & Bolles, 1980; Graeff, 1990, 1993a; Fanselow & Lester, 1988; Fanselow 1994).

Segundo Bouton & Bolles (1980), tais respostas comportamentais são caracterizadas como Respostas Defensivas Específicas da Espécie (SSDR – Specific Species Defensive Responses, em inglês), sendo acionadas pelos animais quando estes consideram se encontrar numa situação de perigo.

Segundo LeDoux (1998), o condicionamento aversivo já foi utilizado em diversas espécies, desde moscas até seres humanos, e observou-se que ele é eficaz

em muitos grupos de animais. Várias evidências sugerem que os mecanismos moleculares utilizados neste tipo de aprendizagem são similares em diferentes organismos. Uma vez formada a memória emocional através do condicionamento do medo, ela se torna relativamente permanente (Fanselow, 1994; Maren & Chang 2006). Muitas vezes o controle do comportamento do medo pode ser a única saída, ao invés da eliminação do medo em si.

1.2.2

A Resposta de congelamento

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 (ver, por exemplo, Landeira-Fernandez, Cruz e Brandão, 2006). 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 (1899) observou que o congelamento é caracteristicamente uma reação de medo do rato. Griffith (1920) 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 (1980) 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 (Fendt & Fanselow, 1999).

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 (Fanselow & Lester, 1988).

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 (Conti e colaboradores, 1990).

1.3

Estruturas neurais relacionadas ao medo e ansiedade

1.3.1

Hipocampo e matéria cinzenta periaquedutal

A memória não reside numa única estrutura anatômica. Ela é resultado de uma série de interações entre diversas estruturas, que compõem um circuito neural. Um circuito neural é um sistema de “entradas” e “saídas” que permitem uma adaptação das respostas do animal ao seu ambiente. (Fendt & Fanselow, 1999)

Quirk e outros (1995) e Maren (2001) demonstraram que o condicionamento aversivo causa mudanças morfológicas nos neurônios da amígdala. De fato, diversas evidências mostram que a amígdala é uma estrutura crítica na plasticidade e na formação de memórias relacionadas ao medo.

Segundo Swanson e Petrovich (1998), as principais conexões que a amígdala do rato faz são com regiões corticais que analisam informações olfatórias. De fato, a parte cortical da amígdala é também chamada de amígdala olfatória. Para os roedores, o uso do olfato é de importância primordial para a detecção de perigo potencial.

Outras estruturas também funcionam como processadoras de “entradas” para a amígdala, participando da produção de comportamentos defensivos específicos. Uma destas estruturas é o hipocampo. O Condicionamento ao contexto, por motivos óbvios, não depende somente de apenas um estímulo condicionado específico, mas de uma série de outros. Segundo LeDoux (2000) a

função de integrar estes estímulos numa relação coerente sempre foi considerada como sendo do hipocampo. Entretanto, novas pesquisas mostram que os estímulos são reunidos antes de chegarem a esta região cerebral. O hipocampo na verdade criaria uma representação espacial do contexto, ou seja, uma relação entre os diversos estímulos. Diversas evidências mostram que o hipocampo assume um papel de receptor de estímulos visuais, olfatórios e auditivos relevantes para o condicionamento aversivo (Sanders e outros, 2003; Rotenberg e Muller, 1997). Gross e Hen (2004) mostraram que um volume hipocampal reduzido aumenta a susceptibilidade do desenvolvimento de transtornos de ansiedade em humanos.

Segundo Wiltgen e colaboradores (2006), lesões no hipocampo podem dificultar a evocação de memórias relacionadas ao medo em ratos, mas não necessariamente interferem no aprendizado de novas memórias. Eles mostraram que, diferentemente de humanos, roedores podem dividir a formação do condicionamento contextual com outras estruturas límbicas.

Além do hipocampo, a matéria cinzenta periaquedutal dorsal (MCPD) e ventral (MCPV) também participam das respostas defensivas. Tais regiões também se localizam próximo à amígdala, e funcionam como gatilhos para diversas respostas motoras e comportamentais.

Oliveira e colaboradores (2004) mostraram que a MCPD é responsável pelo disparo da resposta de congelamento incondicionado. Isto pôde ser observado através de estimulação elétrica desta região, que resultou na alteração comportamental dos ratos. A corrente utilizada para a estimulação variou de 60 Hz, que provocou a resposta de congelamento, até 150 Hz, que provocou a resposta de fuga dos animais, com aumento da defecação e urina. É interessante observar que isto aconteceu mesmo quando a amígdala foi lesionada.

Entretanto, Fanselow (1994) observou que a MCPV também é responsável pela resposta de congelamento do animal. Tal estrutura recebe projeções diretas da amígdala. Diversas evidências sugerem que a porção ventral da matéria cinzenta periaquedutal seja responsável pela resposta de congelamento a estímulos distais, enquanto que a porção dorsal, por ser mais primitiva, elicie a resposta de congelamento para estímulos proximais ou táteis (Oliveira e colaboradores, 1994).

Além destas estruturas, podemos observar também a participação do Sistema septohipocampal na investigação cautelosa do rato em ambientes novos (avaliação de risco) e na resposta de congelamento. O Núcleo Medial da Rafe

também participa da resposta de congelamento. Já o hipotálamo lateral está envolvido nas respostas de luta ou fuga dos animais (Graeff, 1993a).

1.3.2

Sistema límbico

James Papez (1883-1958), através de estudos neuroanatômicos, descreveu, em 1937, um sistema subcortical, que bordeia o tálamo. Tal sistema engloba diversas estruturas, entre suas principais: o complexo amigdalóide, o corpo mamilar, o hipocampo, o fórnix, o córtex cingulado, o septo, o bulbo olfativo e o hipotálamo. Este conjunto de estruturas ficou conhecido como “Circuito de Papez”. O fisiologista sugeriu que os estados de emoção são expressos através da ação das diversas estruturas do circuito sobre o hipotálamo, e que tais emoções são vivenciadas através da ação destas mesmas estruturas sobre o córtex (Pinel, 2005, Kotter & Meyer, 1992).

MacLean (1949) propôs, baseando-se no “Circuito de Papez”, a teoria do sistema límbico. De fato, McLean fez propostas extremamente importantes para sustentar sua teoria do sistema límbico. Segundo ele, existem na verdade três cérebros separados evolutivamente, mas que coexistem no crânio de todos os animais superiores. Estes “cérebros” foram denominados de “Complexo Reptiliano”, “Sistema Límbico” e “Neocortex”.

Uma das estruturas observadas e delimitadas no sistema límbico por MacLean foi um complexo de estruturas localizadas no lobo temporal, atualmente conhecido como “Complexo Amigdalóide”, ou somente Amígdala (LeDoux, 1998).

1.3.3

Complexo amigdalóide

A amígdala é um complexo de núcleos que se encontra no lobo temporal anterior de seres humanos e de outros animais (Amaral e colaboradores, 1992). 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 Amigdalár” (Swanson & Petrovich, 1998).

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 (Swanson & Petrovich, 1998).

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 (Swanson & Petrovich, 1998).

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 localizados nestas vias de “entradas” e “saídas” (Swanson & Petrovich, 1998).

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 (Swanson & Petrovich, 1998). Os estudos de David Amaral (2002) sobre a amígdala de primatas foram mais largamente adotados, sendo validados para o cérebro do rato por Pitkanen e colaboradores, em 1997. 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 (Gale e colaboradores, 2004). 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 (Fanselow & Gale, 2003).

Ainda segundo Fanselow e Gale (2003), 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 a 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 (Fanselow & Gale, 2003; Gale e colaboradores, 2004).

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 (Fanselow & Gale, 2003; Gale e colaboradores, 2004, Ledoux 2000; Amaral, 2002).

Estudos neuroquímicos da amígdala (McDonald & Augustine, 1993; Sun & Cassel, 1993) 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 (Swanson & Petrovich, 1998).

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 (1992) e Sun & Cassel (1993) 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 subcorticais usam o GABA. Segundo Swanson e Petrovich (1998), 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 (Blanchard & Blanchard, 1972; Kim e colaboradores, 1993; Campeau & Davis, 1995; Fanselow & Gale, 2003; Davis, 1992; Ledoux, 1998, 2000, 2002; Ledoux e colaboradores 1990a; 1990b; Fanselow, 1994; Fanselow & Maren, 1996; Fanselow & Ledoux, 1999; Gale e colaboradores, 2004; Mayer & Fanselow, 2003, McGaugh e colaboradores, 1996).

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 (Amunts e colaboradores, 2005).

1.3.4

Participação da amígdala no condicionamento aversivo

Sabe-se hoje que o condicionamento a estímulos discretos (e.g. Luz ou som) ou estímulos contínuos (contextuais) dependem 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 (Kim e outros 1993; Fanselow e Fendt, 1999; Fanselow, 2003; Oliveira e colaboradores, 2004, Walker & Davis, 2002).

O envolvimento da amígdala na resposta de congelamento ao contexto previamente associado ao choque foi primeiramente demonstrado por Blanchard & Blanchard (1972). Outros estudos mostraram que a amígdala também possui uma participação crucial no condicionamento pelo medo utilizando-se estímulos auditivos (Iwata e outros, 1986).

Com base em observações feitas após a realização da amigdalectomia bilateral em macacos, Gaffan e Harrison (1987) 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 (Ledoux, 1998).

O complexo basolateral da amígdala, particularmente o núcleo basal e lateral, é responsável pela eliciação da resposta de congelamento do animal (Fendt & Fanselow, 1999). De fato, Fanselow e Dale (2003) 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, 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 (1993) 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 (Helmstetter, 1992, 1993; Helmstetter & Bellgowan, 1994).

1.4

A produção de linhagens com alta e baixa emocionalidade

Grandes diferenças comportamentais e fisiológicas são encontradas entre indivíduos de populações humanas ou animais. Tais diferenças relacionam-se com a capacidade que cada indivíduo possui para enfrentar situações estressantes ou desafiadoras, além de sua resistência ou vulnerabilidade a agentes patogênicos (Steimer e colaboradores, 2005).

Sabe-se hoje que a emocionalidade possui um grande fator hereditário em diferentes espécies animais, como por exemplo, em camundongos (Calderone e colaboradores, 1997) e em humanos (Grillon e colaboradores, 1998). No rato, diversos estudos também demonstraram tal caráter hereditário da reação emocional frente a perigos presentes no meio externo capazes de produzir diferentes tipos de respostas de defesa (Grahame, 2000; Landgraff & Wigger, 2002, Fernandez-Teruel e colaboradores, 2002).

Na tentativa de se elucidar as influências genéticas que contribuem para a ocorrência de comportamento defensivo de animais, utiliza-se um procedimento de seleção de linhagens obtidas através de sucessivos cruzamentos de animais de uma dada população que apresentem altos ou baixos valores extremos do traço desejado. Cepas, por sua vez, podem ser geradas através do cruzamento entre irmãos e irmãs de uma população específica, e que possuam algum traço semelhante, por gerações seguidas. Desta forma, geralmente após vinte gerações, os indivíduos de uma cepa se tornam isogênicos, ou seja, geneticamente idênticos entre si (Grahame, 2000).

Quando uma seleção genética ocorre baseando-se nos extremos do fenótipo desejado designa-se uma seleção bi-direcional. Neste sentido as duas linhagens divergentes irão progressivamente mostrar diferenças maiores através das gerações no que diz respeito ao traço desejado, e nos genes que definem tal traço. Entretanto, em relação aos outros traços característicos da população, e seus respectivos genes, as duas linhagens devem permanecer similares. Desta forma, no caso da resposta defensiva de um animal frente a um contexto aversivo, a criação selecionada resultaria em duas linhagens que possuem variações dos alelos dos genes relacionados a tal comportamento, e que possuiriam genes similares que não estão relacionados a esta resposta, como por exemplo, a cor da pelagem (Grahame, 2000).

De fato, a seleção de animais com base no desempenho em um determinado teste, resulta em linhagens com consistentes padrões comportamentais através das gerações. Além disso, este processo de seleção tem a capacidade de influenciar o padrão de uma série de respostas fisiológicas subjacentes ao traço selecionado (Steimer e colaboradores, 2005).

Os modelos animais mais utilizados para investigar processos relacionados com emocionalidade estão associados ao comportamento exploratório do rato, e da sua reatividade a ambientes novos ou potencialmente aversivos. O campo aberto, por exemplo, possibilita a observação de diversas ações dos roedores, como locomoção, urinação, defecação, congelamento, pulos e corridas, além do tempo despendido em cada setor da arena. Tal modelo permite também a testagem de diversos agentes farmacológicos no comportamento do animal. Além do campo aberto, ainda utiliza-se bastante o teste da caixa de transição claro e escuro, que é um modelo importante para a testagem da ansiedade no camundongo. Outro teste consagrado é o labirinto em cruz elevado, que possibilita, além da testagem de diversos agentes farmacológicos, a utilização de variáveis etológicas na descrição dos comportamentos dos roedores. Outros testes, como a interação social e os testes de conflito, que podem utilizar choques para supressão de respostas condicionadas, também constam no repertório comportamental para a seleção de traços fenotípicos desejados (para uma revisão, ver Ramos & Mormède, 1998).

Os ratos romanos (Roman High e Low), por exemplo, foram inicialmente selecionados a partir de uma cepa Wistar, utilizando-se como critério a resposta de

esquiva ativa numa caixa de vai-e-vem (Bignami, 1965). Estas linhagens já foram exaustivamente estudadas em diversas dimensões comportamentais, e através da utilização de outros modelos, além da formação de outras sub-linhagens (Steimer e colaboradores, 1999, 2005; Giorgio e colaboradores, 2007).

Um outro par de linhagens importantes, e que se tornou clássico nos estudos genéticos, se caracteriza pela reatividade do rato no campo aberto. Desenvolvidos por Broadhurst, em 1954, as linhagens denominadas de Maudsley Reativos e Não-reativos se caracterizam pela notável diferença na taxa de defecação no campo aberto, sendo que os animais da linhagem de baixa reatividade apresentam uma defecação próxima de zero, enquanto que a linhagem divergente, mais reativa, possui uma taxa de defecação maior. Além desta variável, a locomoção pelo campo aberto também foi observada, e se mostrou divergente entre os grupos (Ramos & Mormède, 1998).

Utilizando-se do labirinto em cruz elevado, desenvolveu-se na Universidade de Leipzig, nos anos de 1980, duas linhagens de animais com extremos no comportamento defensivo. Chamadas de HAB (High Anxiety Related Behavior) e LAB (Low Anxiety Related Behavior), estas linhagens também se mostraram divergentes no teste do campo aberto e no teste do nado forçado (Liebsch e colaboradores, 1998; Landgraf & Wigger, 2002).

Ramos e colaboradores desenvolveram, em 2003, duas linhagens de ratos que se caracterizam pelos divergentes níveis de comportamentos defensivos no campo aberto, no labirinto em cruz elevado e na caixa de transição claro e escuro (Ramos e colaboradores, 2003).

Num recente estudo, Ponder e colaboradores (2007) utilizaram o condicionamento clássico pavloviano para a seleção de extremos fenotípicos numa população de camundongos. O traço selecionado foi a resposta de congelamento dos animais, primeiramente ao contexto da caixa, e num segundo momento, a um barulho associado ao choque. Variáveis como a sensibilidade ao choque também foram consideradas neste estudo. Observou-se que as diferentes intensidades de choque produziram padrões comportamentais semelhantes nas duas linhagens selecionadas.

2

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. Embora já existam relatadas na literatura diferentes linhagens para diferentes aspectos de emocionalidade, tais como para o campo aberto (Broadhurst, 1962), esquiva ativa (Bignami, 1965) e labirinto em cruz elevado (Liebsch, 1998), nenhuma foi desenvolvida especificamente para ratos com altas e baixas taxas de congelamento a estímulos contextuais associados a choques elétricos. Deve-se observar que um estudo relatado recentemente (Ponder e colaboradores, 2007), utilizou esta medida para seleção em camundongos. Dessa forma, um dos objetivos deste trabalho foi o de dar início a este processo de seleção utilizando ratos da cepa Wistar.

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. Como já apresentado anteriormente, o complexo amigdalóide é uma das principais estruturas responsáveis pela modulação da resposta de congelamento a estímulos contextuais associados a choques elétricos.

3

Estudo 1

Linhagens de animais com alta e baixa taxa da resposta de congelamento condicionado

3.1

Método

3.1.1

Sujeitos

Ratos albinos da cepa Wistar foram 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).

3.1.2

Equipamentos

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).

3.1.3

Procedimento

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, definida 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.

A quantidade total da resposta de congelamento durante a sessão de teste foi empregada como critério para o cruzamento dos animais. Os 10 machos e 10 fêmeas com a maior taxa de congelamento condicionado, assim como os 10 machos e 10 fêmeas com menor taxa de congelamento condicionado foram selecionados para darem início às linhagens CAC e CBC, respectivamente. Das 10 famílias CAC nasceram 76 animais, enquanto que as 10 famílias CBC deram origem a 71 animais. Estes animais foram a primeira geração de filhotes de nosso procedimento de criação (S1). O mesmo procedimento foi usado para a produção de duas novas gerações de animais selecionados (S2 e S3). As 10 famílias com alto ou baixo congelamento eram escolhidas depois de todos os animais de uma dada geração ser fenotipados. Cruzamentos sempre ocorreram dentro de cada linhagem. Uma exceção ocorreu em S2, quando uma fêmea advinda da linhagem CBC com a maior taxa de congelamento condicionado cruzou com um macho da linhagem CAC, também com uma altíssima taxa de congelamento condicionado. Pares de cruzamentos Irmãos-Irmãs foram evitados para se reduzir endogamia, o que poderia levar a uma redução na taxa de fertilidade dos animais, além de alterações no desenvolvimento das linhagens selecionadas devido ao chamado “drift” genético (Falconer & MacKay, 1996).

Entre 6 e 8 dias após o nascimento, cada filhote de cada linhagem recebia 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. A Figura 1 apresenta uma ilustração deste sistema de marcação.

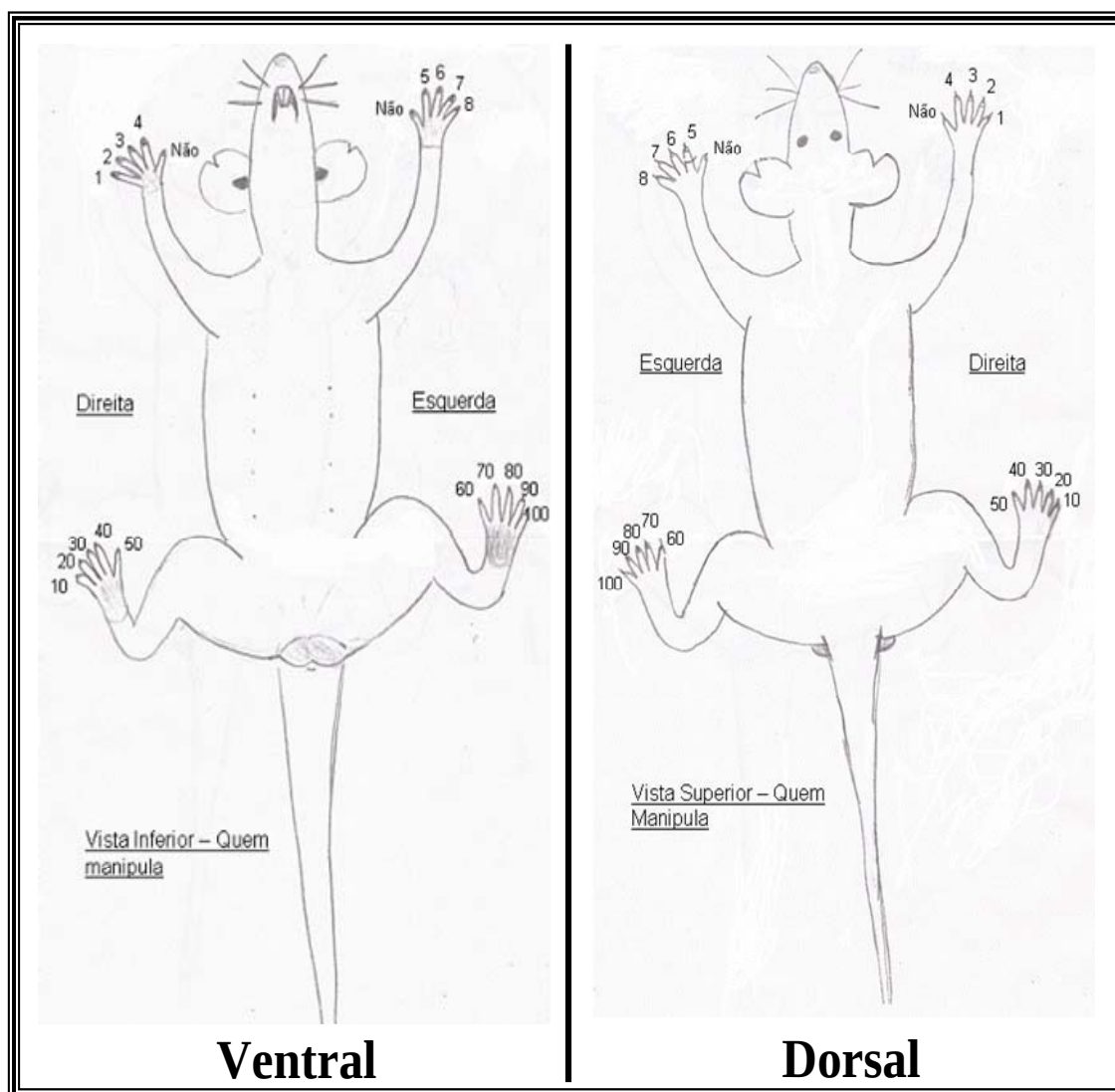


Figura 1: Ilustração de um sistema de marcação animal por meio da ablação de dedos.

3.2

Resultados

A Tabela 1 apresenta a distribuição dos 488 animais utilizados das gerações S1, S2 e S3 utilizados neste estudo. A distribuição destes animais permaneceu relativamente constante ao longo das diferentes gerações e em relação aos machos e fêmeas de ambas as linhagens. Essa hipótese foi confirmada estatisticamente. Uma análise com o teste chi-quadrado revelou uma ausência de qualquer diferença significativa entre os 12 grupos ($\chi^2=0,58$; $p>0,7$)

Tabela 1: Distribuição do número de machos e fêmeas das linhagens selecionadas com alto ou baixo congelamento condicionado pelas 3 gerações selecionadas (S1, S2 e S3).

Selected generation	High Freezing		Low Freezing		Total
	Male	Female	Male	Female	
S1	37	39	34	37	147
S2	37	35	37	34	143
S3	34	45	42	37	158
Total	108	119	113	108	448

A Figura 2 apresenta um rato em uma postura de congelamento durante a sessão de teste. Esta resposta se caracteriza pelo fato do animal apresentar uma ausência total de movimentos exceto pequenas alterações na região médio-ventral necessárias para a respiração. Por via de regra, o animal apresenta uma postura relativamente arqueada de seu dorso. Em outras situações, pode-se também observar uma resposta de congelamento quando o animal fica em pé com as patas traseiras (rearing).



Figura 2: Rato demonstrando a resposta de congelamento, na caixa de condicionamento do laboratório de Neurociência do Comportamento da PUC-Rio.

A resposta de congelamento condicionado foi analisada através de uma análise de variância de três vias (ANOVA). O primeiro fator, com três níveis, estava relacionado com o número da geração (S1, S2, S3). O segundo fator, com dois níveis, estava relacionado com a linhagem (CAC e CBC). Finalmente, o terceiro fator, também com dois níveis, estava relacionado com o sexo dos animais (macho ou fêmea). Esta análise revelou a ausência de uma interação de três vias ($F(2,448)=0.17$; $p>0.8$). Não foram encontradas interações de duas vias entre sexo e geração selecionada ($F(2,448)=0.28$; $p>0.7$) e entre sexo e linhagem ($F(1,448)=7.55$; $p<0.001$). A ANOVA ainda revelou uma interação de duas vias entre as linhagens dentre as três diferentes gerações ($F(2, 448)=7.55$; $p<0.001$). Finalmente, um efeito principal do sexo ($F(1,448)=13.10$; $p<0.001$) e linhagem ($F(1,448)=14.77$; $p<0.001$) foi também detectado.

O fato do sexo dos animais ter apresentado um efeito significativo na ausência de qualquer interação com as diferentes gerações ou linhagens indica a importância desta variável neste estudo. De uma forma geral, ratos machos congelaram 59.9% (+/- 2.03) enquanto que as fêmeas congelaram 50.9% (+/- 1.90).

Um teste t de student indicou uma diferença significativa entre estes dois grupos ($t(446) = 3,24; p < 0.01$).

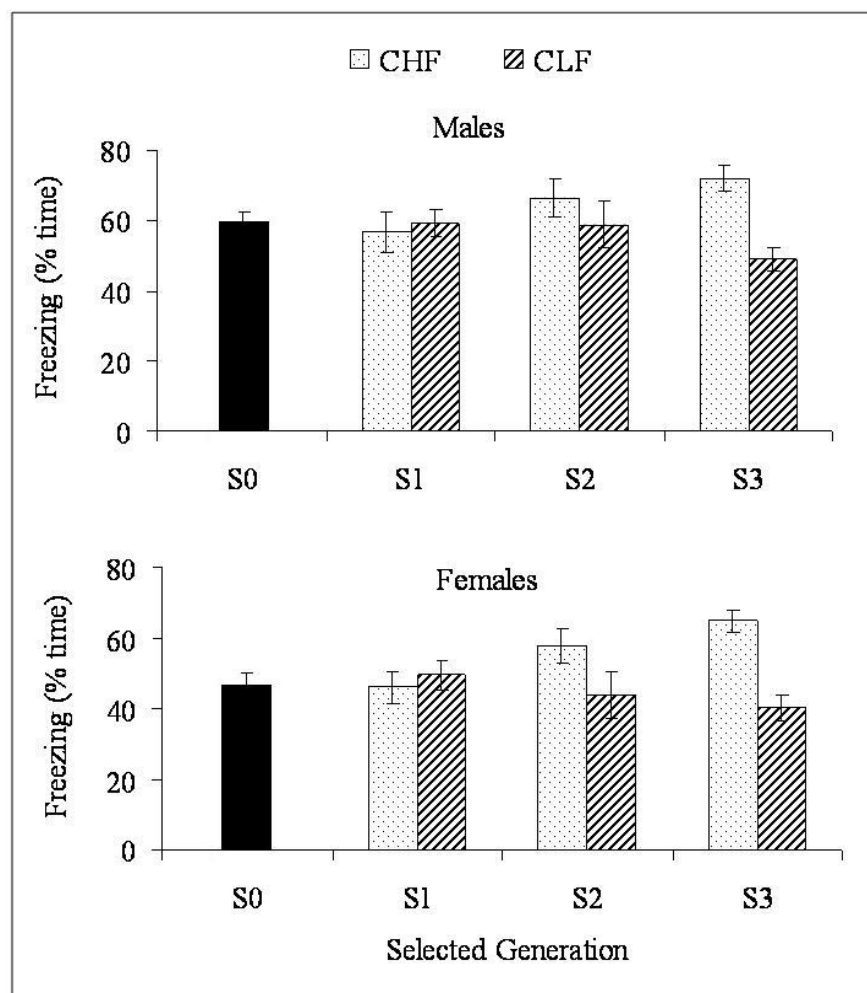


Figura 3: Porcentagem média do tempo de congelamento de animais provenientes das linhagens selecionadas com alta (CAC) e baixa (CBC) taxa de congelamento em relação à matriz inicial (S0) e as três gerações seguintes (S1, S2 e S3).

A figura 3 representa a média (+/- SEM) da porcentagem de tempo gasto na postura de congelamento em machos (parte de cima) e fêmeas (parte de baixo) durante a sessão de teste da população original (S0) assim como nas três gerações selecionadas (S1, S2 e S3) para alto (CAC) e baixo (CBC) congelamento condicionado. Comparações pareadas com o teste t de student entre CAC e CBC foram feitas para cada geração selecionada entre machos e fêmeas. Estas análises

permitiram identificar em qual geração as duas linhagens de ratos machos e fêmeas apresentaram uma diferença confiável no congelamento condicionado. De fato, machos não apresentaram nenhuma diferença significativa na primeira (S1) e na segunda (S2) gerações ($t(69)=0.37$; $p>0.7$ and $t(72)=10.92$; $p>0.3$, respectivamente). Entretanto, uma diferença confiável entre as linhagens CAC e CBC de ratos machos foi detectada na terceira (S3) geração ($t(74)=4.47$; $p<0.001$). Este mesmo padrão foi observado entre as fêmeas. Uma diferença confiável observada com CAC e CBC entre as fêmeas foi detectada em S3 ($t(80) = 5.31$, $p < 0.001$) mas não em S1 ($t(74)=0.55$; $p>0.5$ ou em S2 ($t(67)=0.92$; $p>0.3$). Desta forma, a criação selecionada resultou numa dissociação consistente do congelamento condicionado tanto em machos quanto em fêmeas na terceira geração selecionada.

4

Estudo 2

Participação do complexo amigdalóide no controle da resposta condicionada de congelamento nas linhagens CAC e CBC

4.1

Método

4.1.1

Sujeitos

O presente estudo empregou uma nova geração (S4) da linhagem CAC e CBC. Esta nova geração foi produzida a partir de S3 seguindo-se exatamente o mesmo procedimento descrito anteriormente. Além destas duas linhagens, foram também utilizados 48 ratos (24 machos e 24 fêmeas) do grupo controle. Este grupo não passou por nenhuma seleção genética.

4.1.2

Equipamento

O presente estudo utilizou os mesmos equipamentos empregados no estudo anterior.

4.1.3

Procedimento

Ao atingirem três meses de idade, 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. Este procedimento apresentou algumas mudanças em relação ao

procedimento utilizado no estudo anterior. Neste novo 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. Calculado 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..

Os 48 pares de animais permaneceram acasalando por uma semana. Ao final deste período, todos os ratos machos (24 CAC, 24 CBC) foram reagrupados em novas caixas viveiros, permanecendo por um outro período de três semanas de ambientação. Após este período, metade dos animais das linhagens CAC e CBC foram submetidos a uma cirurgia estereotáxica com objetivo de destruir o complexo amigdalóide bilateralmente. A outra metade destes dois 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 antecederiam a apresentação dos choques elétricos, bem como aos quatro minutos da sessão de teste.

4.1.4

Procedimentos Cirúrgicos

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.

4.1.5

Histologia

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 50µm 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 feitos com auxílio de um Atlas de cérebro de rato (Paxinos & Watson, 1986).

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.

4.2

Resultados

Dentre os 48 animais utilizados neste experimento, 14 morreram ao longo do experimento (1) ou apresentaram lesões fora da área do complexo amígdaloide (13).

A figura 4 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.

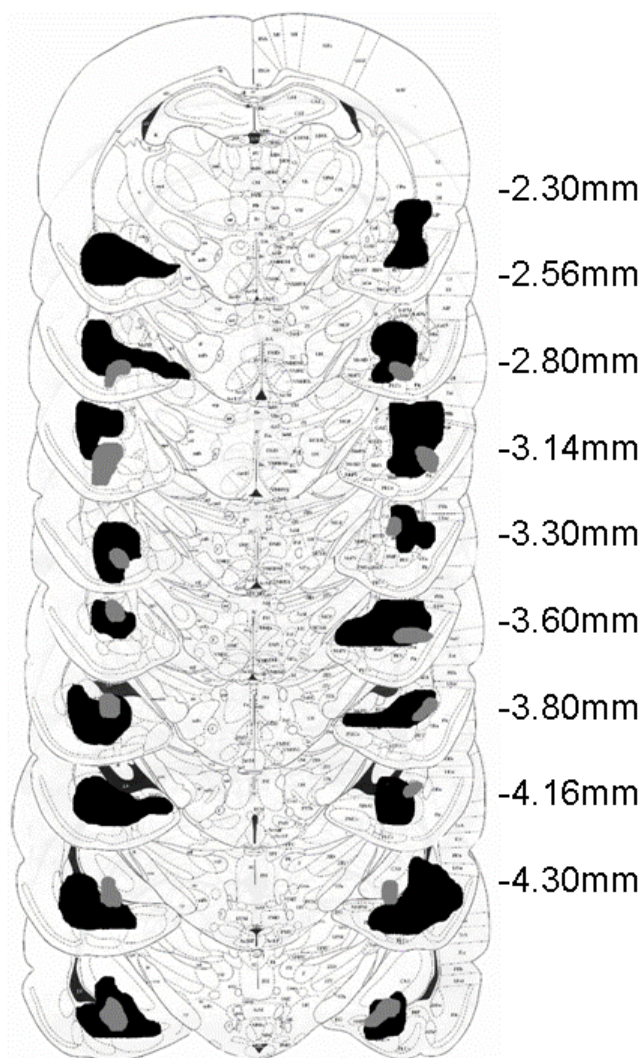


Figura 4: Composição das secções coronais, adaptada do Atlas Paxinos e Watson (1986). Números indicam a distância em milímetros de bregma. As menores lesões estão indicadas em cinza e as maiores em preto.

4.2.1

Análise Comportamental

A figura 5 mostra a porcentagem média de tempo gasto na resposta de congelamento para animais lesionados ou sham durante os 3 minutos de intervalo que precedem a segunda sessão de treino. Estes resultados foram analisados por uma ANOVA 2x2. O primeiro fator, com dois níveis, foi relacionado com o tipo de lesão (amígdala ou sham). O segundo fator, com três níveis, foi relacionado com as duas linhagens selecionadas (CAC e CBC). A ANOVA revelou uma ausência de uma interação significativa entre estes dois fatores ($F(1,35)=3.1$; $p>0.05$) e um efeito significativo principal da lesão ($F(1,35)= 18.0$; $p<0.001$) e linhagem selecionada ($F(1,35)= 17.9$; $p<0.001$). Comparações par-a-par indicaram que animais da linhagem CAC congelaram mais que os animais da linhagem CBC, e que lesões na amígdala nestes dois grupos causaram uma redução nas suas respostas de congelamento condicionado (todos os p 's <0.01). Animais da linhagem CAC com lesões no complexo amigdalóide apresentaram mais congelamento condicionado dos que animais lesionados do grupo CBC ($p=0.05$). Além disso, apesar das lesões no complexo amigdalóide serem capazes de diminuir o condicionamento contextual aversivo tanto no grupo CAC quanto no CBC, animais lesionados da linhagem CAC apresentaram significativamente mais congelamento condicionado comparados aos animais CBC. A diferença média das porcentagens entre animais lesionados e animais sham em cada linhagem foi calculada de forma a estimar o efeito das lesões no complexo amigdalóide no congelamento condicionado em cada uma destas linhagens. Esta é uma análise importante, já que animais sham do grupo CAC apresentaram uma porcentagem maior de congelamento condicionado em relação aos animais sham do grupo CBC. Estas análises revelaram que lesões no complexo amigdalóide levaram a redução de 60.6% na linhagem CAC e 63.0% na linhagem CBC.

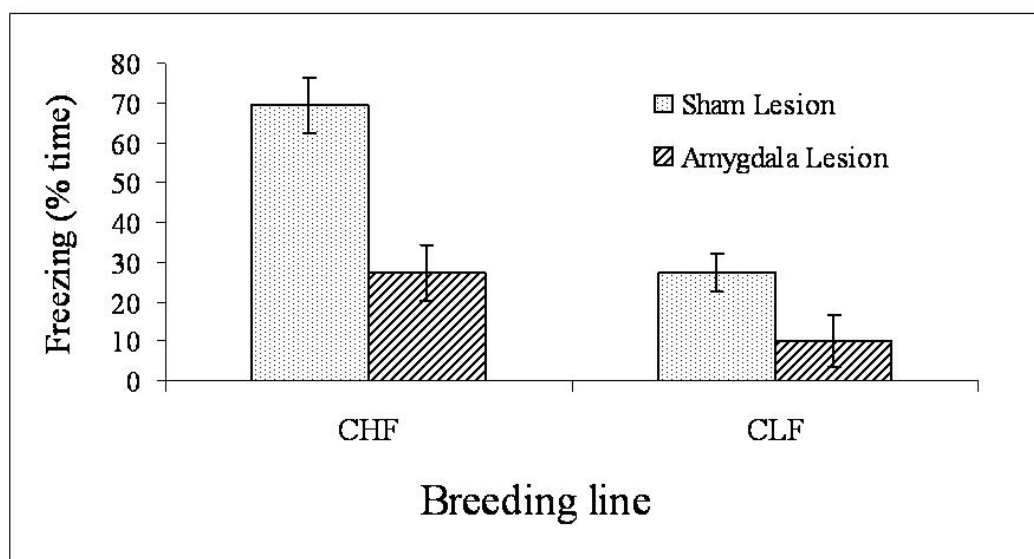


Figura 5: Porcentagem media do tempo de congelamento condicionado durante os 3 minutos da sessão de teste das linhagens Carioca Alto (CAC) e Carioca Baixo (CBC) congelamento.

Discussão

O presente trabalho apresenta dois estudos experimentais nos quais se investigaram a possibilidade de se estabelecer linhagens de ratos com alta (CAC) e baixa (CBC) taxa de resposta de congelamento a estímulos contextuais previamente associados a choques elétricos, bem como a participação do complexo amigdalóide sobre esta resposta de congelamento nestas duas linhagens. No primeiro experimento, estabeleceu-se uma estratégia de seleção bi-direcional, utilizando-se como critério os extremos fenotípicos da resposta de congelamento. A análise destes dados ao longo de quatro gerações indicou uma ausência de diferença comportamental entre os grupos nas primeiras gerações. Gradativamente, estas diferenças foram surgindo, tornando-se claras após o nascimento da terceira geração.

Diversas linhagens já foram estabelecidas para se estudar as bases genéticas de diferentes aspectos da emocionalidade. Algumas destas linhagens foram selecionadas a partir de respostas inatas que animais apresentam a um campo aberto (Broadhurst, 1957) ou ao labirinto em cruz elevado (Liebsch e colaboradores, 1998). Outros modelos selecionaram animais com alta e baixa emocionalidade a partir de processos de aprendizagem como, por exemplo, a resposta de esquiva ativa (Bignami, 1965). Além destes modelos, outras linhagens foram também desenvolvidas com o objetivo de delinear geneticamente outras desordens psiquiátricas. Por exemplo, as linhagens HAP (High Alcohol Preferring) e LAP (Low Alcohol Preferring) (Chester e colaboradores, 2003) foram desenvolvidas para o estudo do alcoolismo.

Recentemente, Ponder e colaboradores (2007) utilizaram a resposta de congelamento condicionada como critério de seleção para a criação de linhagens de camundongos. Além do congelamento ao contexto, estes autores observaram também o mesmo padrão da resposta de congelamento a um estímulo condicionado discreto, no caso um som. Neste estudo (Ponder e colaboradores, 2007), a diferenciação da resposta de congelamento entre as duas linhagens de animais já pôde ser observada a partir da primeira geração, tornando-se extremamente acentuada nas gerações subseqüentes. Dessa forma, é possível que

a diferenciação da resposta de congelamento seja mais rápida em camundongos em relação a ratos albinos utilizados no presente trabalho. De uma forma geral, os dados revelam que o medo condicionado é um traço altamente hereditário e pode ser rápida e bidirecionalmente selecionado após algumas gerações. Entretanto, deve-se notar que, apesar da maior rapidez em se desenvolver linhagens com alta e baixa taxa de congelamento com camundongos, o uso do rato oferece algumas vantagens, principalmente no que se referem à maior facilidade em se estudar variáveis fisiológicas e comportamentais, devido principalmente ao seu maior tamanho (Jacob & Kwitek, 2001).

Nesse sentido, a presente dissertação constitui a primeira tentativa de empregar a resposta de congelamento a estímulos ambientais previamente associados a choques elétricos como critério de seleção bidirecional em ratos. O emprego da resposta de congelamento para avaliar processos emocionais aprendidos parece ser uma medida mais interessante em relação à resposta de esquiva ativa. A esquiva ativa é uma forma complexa forma de aprendizagem que envolve a aquisição tanto de uma resposta de medo condicionada quanto uma resposta operante. A interação entre estes dois processos pode interferir com a medida de processos emocionais mediados pela aprendizagem associativa. Por exemplo, manipulações que diminuem o medo condicionado como a redução da intensidade do choque, ou o uso de drogas ansiolíticas, aumentam a aquisição de uma resposta de esquiva ativa. Por outro lado, a resposta de congelamento é uma medida mais direta e proeminente de medo condicionado, já que não envolve a aquisição de uma resposta operante. A resposta de congelamento é uma função da intensidade do choque, depende da associação entre estímulos condicionados e incondicionados, e é sensível a uma série de manipulações que interferem com sua força associativa.

Num recente trabalho, Brush (2003), utilizando ratos da linhagem “Syracuse”, destacou a diferença entre desempenho e aprendizagem em processos emocionais em ratos. Segundo o autor, embora os ratos da linhagem “Syracuse Low Avoidance”, apresentassem uma menor taxa de respostas de esquiva ativa em relação seus pares da linhagem “Syracuse High Avoidance”, estes resultados se inverteram quando avaliados através da resposta de esquiva passiva, que certamente envolve uma postura de congelamento. Estes dados apontam para a

importância da resposta de congelamento na performance de uma resposta adquirida através de condicionamento aversivo.

O desenvolvimento de linhagens de ratos com alta e baixa taxa de congelamento condicionado reside na possibilidade de se desenvolver um modelo animal próximo a transtornos de ansiedade em seres humanos. De acordo com Anagnostaras e colaboradores (1999), os transtornos de ansiedade geralmente compartilham causas ambientais e genéticas. As causas ambientais são os fatores de risco e as situações particulares que as pessoas vivenciam todos os dias. Além destas causas, diversas evidências indicam a existência de predisposições genéticas para o desenvolvimento de tais transtornos, embora seja necessária a experiência traumática para a eclosão do distúrbio.

Desta forma, o uso de linhagens selecionadas, como as desenvolvidas em nosso laboratório, se torna um importante instrumento para se estudar a influência de variáveis genéticas em distúrbios de ansiedade. Uma das vantagens de se utilizar linhagens de animais selecionadas através de características extremas do fenótipo é a de permitir com que uma série de variáveis biológicas, tais como respostas neurofisiológicas, quantidade de neurotransmissores, assim como genotipagens, possam ser realizadas através de técnicas cada vez mais avançadas.

Além disso, o uso de cruzamentos sucessivos de animais selecionados em relação a um determinado padrão fenotípico, como foi feito realizado neste primeiro estudo, possibilita que alelos de vários genes se tornem fixados pela população. Ou seja, todos os indivíduos de uma mesma linhagem tendem a carregar os mesmos alelos de determinados genes relevantes para o traço selecionado. Esta fixação ocorre para todos os genes que são relevantes para o traço característico que está em investigação. Embora não tenha sido o objetivo desta dissertação, esta característica específica de linhagens selecionadas também poderá ser considerada para estudos futuros.

No segundo experimento deste trabalho, foram feitas lesões extensivas no complexo amigdalóide em ratos das linhagens CAC e CBC desenvolvidas no primeiro estudo. O impacto destas lesões na amígdala sobre a resposta condicionada de congelamento foi proporcionalmente igual entre os grupos CAC e CBC, uma vez que a lesão produziu uma redução em torno de 60% da resposta de congelamento. Estes resultados são importantes, uma vez que indicam que o

complexo amigdalóide participa de forma similar no condicionamento aversivo nestas duas linhagens de animais.

Deve-se observar que a porcentagem de congelamento condicionado do grupo CAC que sofreram lesões no complexo amigdalóide apresentaram uma porcentagem significativamente maior em relação ao grupo CBC. Desta forma, embora o complexo amigdalóide tenha produzido efeitos similares entre as duas linhagens, é possível que outras estruturas neurais associadas à circuitaria neural responsável por reações emocionais exerçam efeitos diferenciados entre as linhagens CAC e CBC. Dentre estas estruturas, destacam-se o hipocampo e a matéria cinzenta periaquedutal, que possuem importante participação no condicionamento contextual aversivo. Desta forma, estudos futuros são necessários para que se possa investigar a participação destas estruturas no controle da resposta de congelamento nestas duas linhagens.

Outro efeito observado no segundo experimento desta dissertação foi a persistência do congelamento condicionado entre os ratos que não sofreram as lesões no complexo amigdalóide. Na segunda sessão de extinção, que ocorreu cerca de um mês após a primeira testagem com choques, observou-se que os níveis de congelamento se mantiveram comparáveis em relação à primeira sessão de extinção. De fato, diversas evidências sugerem que a amígdala desempenhe um papel mnemônico permanente no condicionamento aversivo. Gale e colaboradores (2004), por exemplo, testaram a participação da porção basolateral do complexo amigdalóide no armazenamento de memórias aversivas durante o tempo de vida de um rato. Para isso eles utilizaram um intervalo de 16 meses (que consta de boa parte do tempo de vida de um rato) entre o primeiro treino e o teste de extinção.

A circuitaria neural responsável pelo medo contextual condicionado envolve informações sensoriais multimodais que chegam à porção basolateral da amígdala através de projeções diretas provenientes do hipocampo. De fato, a Potenciação de Longo Prazo tem sido observada através desta via amigdalóide-hipocampal (Maren e Fanselow, 1995). Mais ainda, projeções ascendentes serotoninérgicas do núcleo mediano da rafe para o hipocampo parece fazer também parte desta via que regula o medo condicionado ao contexto. A porção ventral do córtex medial pré-frontal (Resstel e colaboradores, 2006) e o córtex perirrinal (Bucci e colaboradores, 2000) também estão envolvidos na regulação do medo condicionado. Projeções diretas provenientes destas áreas corticais para o

hipocampo e para o complexo basolateral da amígdala fornecem um processamento polimodal de informação sensorial de nível mais elevado. O fluxo de informações que percorre a região da amígdala envolve projeções tanto do complexo basolateral quanto da parte central da amígdala, que por sua vez constitui a principal porta de saída de informações da amígdala. Projeções eferentes da região central da amígdala para o tronco cerebral e para áreas hipotalâmicas dão origem a reações autonômicas e comportamentais distintas, envolvidas neste tipo de condicionamento. A saída motora da resposta de congelamento condicionada está relacionada às vias eferentes da região central da amígdala para a porção ventral da matéria cinzenta periaquedutal, que por sua vez possui projeções para grupos de neurônios motores na corda espinhal.

Os resultados do segundo experimento confirmam que a região amigdalóide desempenha um papel primordial no condicionamento contextual aversivo. Apesar de diferentes vias também participarem do processamento de estímulos potencialmente aversivos, os dados sugerem que todos eles convergem para a amígdala. Infelizmente, os resultados do presente estudo não clarificaram que outras estruturas cerebrais, que participam destes circuitos neurais, possam desempenhar um papel diferencial na aquisição e expressão dos diferentes níveis de congelamento condicionado induzidos pelo nosso programa de criação seletiva. Desta forma, estudos futuros são necessários para investigar com maior clareza a contribuição de cada uma destas estruturas subjacentes ao condicionamento contextual aversivo nestas duas linhagens de animais.

Um fato interessante observado nos dois experimentos deste trabalho foi a 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 (2005), 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 (Steimer & Driscoll, 2005).

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 (1991) 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 (para uma revisão ver Palanza, 2001).

Sugere-se que estas diferenças possam estar relacionadas ao dimorfismo sexual observado na anatomia e fisiologia do hipocampo. De fato, estudos eletrofisiológicos observaram que ratos machos que adquirem um medo condicionado mais rapidamente do que as fêmeas também mostram uma magnitude maior da Potenciação de Longo Prazo nas sinapses do giro dentado da formação hipocampal (Maren e colaboradores, 1994). Desta forma, é possível que as diferenças sexuais marcantes observadas no presente estudo estejam associadas com uma magnitude maior na Potenciação de Longo Prazo no hipocampo do rato macho, em comparação com as fêmeas.

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 espera-se que ambas as linhagens apresentem desempenhos similares neste modelo animal relacionado com memória espacial.

Referências bibliográficas

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.

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.

AMARAL, D.G. The Primate Amygdala and the Neurobiology of Social Behavior: Implications for Understanding Social Anxiety. **Society of Biological Psychiatry**, V. 51, pp. 11-17, 2002.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. DSM-IV: **Manual Estatístico de Transtornos Mentais**. Porto Alegre: ArtMed, 2002.

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.

ANAGNOSTARAS, S.G.; CRASKE, M.G.; FANSELOW, M.S. Anxiety: at the intersection of genes and experience. **Nature Neuroscience**, V. 2, pp. 780-782, 1999.

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.

BACHEVALIER, J. Medial temporal lobe structures and autism: A review of clinical and experimental findings. **Neuropsychologia**, V. 32, pp. 627-48, 1994.

BIGNAMI, G. Selection for high rates and low rates of avoidance conditioning in threat. **Animal Behavior**, V. 13, pp. 221-227, 1965.

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.

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.

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.

BROADHURST, P. A note in further progress in a psychogenetic selection experiment. **Psychological Reports**, V. 10, pp. 65-66, 1962.

BRUSH, F.R. Selection for Differences in Avoidance Learning: The Syracuse Strains Differ in Anxiety, Not Learning Ability. **Behavior Genetics**, V. 33, pp. 677-696, 2003.

BUCCI, D.J., PHILLIPS, R.G., BURWELL, R.D., Contributions of postrhinal and perirhinal cortex to contextual information processing. **Behavioral Neuroscience**, V. 114, pp. 882-894, 2000.

CALDER, A.J.; LAWRENCE, A.D.; YOUNG, A.W. Neuropsychology of fear and loathing. **Nature Reviews**, V. 2, pp. 352-363, 2001.

CALDERONI, B.; SAAVEDRA, C.; TARTAGLIA, K.; WEHNER, J.M.; DUDEK, B.C.; FLAHERTY, L. Quantitative trait loci analysis affecting contextual conditioning in mice. **Nature Genetics**, V. 17, pp. 335-337, 1997.

CANNON, W.B. **Bodily changes in pain, hunger, fear and rage**, V.2. New York: Appleton, 1929.

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.

CHESTER, J.A., LUMENG, L., TI, T-K., GRAHAME, N.J. High- and Low-Alcohol Preferring Mice show differences in conditioned taste aversion to alcohol. **Alcoholism: clinical and experimental research**, V. 27, pp. 12-18, 2003.

CONTI, L. H., MACIVER, C.R., FERKANY, J.W., ABREU, M.E. Footshock-induced freezing behavior in rats as a model for assessing anxiolytics. **Psychopharmacology (Berl)**, V. 102, pp. 492-497, 1990.

CRUZ, A.P.M., ZANGROSSI H., GRAEFF F.G., LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Modelos Animais de Ansiedade: Implicações para a seleção de drogas ansiolíticas. **Psicologia: Teoria e Pesquisa**, V. 13, pp 269 – 278, 1997.

DALGLEISH, T. The emotional Brain. **Nature Reviews Neuroscience**, V. 4, pp. 582-588, 2004.

DARWIN, C. **A Origem das Espécies e a Seleção Natural**. Curitiba: Hermes Editora, 2000.

DARWIN, C. **A Expressão das Emoções nos Homens e nos Animais**. São Paulo: Companhia das Letras, 2000.

DAVIS, M. The Role of the Amygdala in Fear and Anxiety. **Annual Review of Neuroscience**, V. 15, pp. 353-75, 1992.

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.

FANSELOW, M.S. Neural organization of the defensive behavior system responsible for fear. **Psychonomic Bulletin & Review**. V. 1, pp. 429-438, 1994.

FANSELOW, M.S.; MAREN, S. Eletrolytic Lesions of the Fimbria/Fornix, Dorsal Hippocampus, or Entorhinal Cortex produce anterograde deficits in contextual fear conditioning in rats. **Neurobiology of Learning and Memory**, V. 67, pp. 142-149, 1996.

FANSELOW, M.S.; LEDOUX, J.E. Why we think plasticity underlying Pavlovian fear conditioning occurs in the basolateral amygdala. **Neuron**, V. 23, pp. 229-32, 1999.

FANSELOW, M.S.; GALE, G.D. The Amygdala, Fear and Memory. **Annual N.Y. Academy of Sciences**, V. 985, pp. 125 – 134, 2003.

FENDT, M.; FANSELOW, M.S. The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, V. 23, pp. 743-760, 1999.

FERNÁNDEZ-TERVEL, A.; ESCORIHUELA, R.M.; GRAY, J.A.; AGUILAR, R.; GIL, L.; GIMÉNEZ, L.L.; TOBENÁ, A.; BHOMRA, A.; NICOD, A.; MOTT, R.; DRISCOLL, P.; DAWSON, G.R.; FLINT, J. A quantitative trait locus influencing anxiety in the laboratory rat. **Genome Research**, V. 12, pp. 618-626, 2002.

GAFFAN, D.; HARRISON, S. Amygdectomy and disconnection in visual learning for auditory secondary reinforcement by monkeys. **Journal of Neuroscience**, V. 7. pp. 2285-2292, 1987.

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.

GIORGIO, O.; PIRAS, G.; CORDA, M.G. The psychogenetically selected roman high-and-low avoidance rat lines: a model to study the individual vulnerability to drug addiction. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, V. 31, pp. 148-163, 2007.

GRAEFF F.G. Ansiedade. Em: GRAEFF, F.G. BRANDÃO, M.L. (eds.). **Neurobiologia das doenças mentais**. São Paulo, Lemos. Editora & Gráficos LTDA, pp. 109-143, 1993a.

GRAEFF, F.G. Brain defense systems and anxiety. In: **Handbook of Anxiety**, 3, edited by M. Roth, G.D. Burrows and R. Noyes. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 307-354, 1990.

GRAHAME, N.J. Selected lines and inbred strains. **Alcohol Research & Health**, V. 24, pp. 159-163, 2000.

GRIFFITH, C.R. The behavior of white rats in the presence of cats. **Psychobiology**, V. 2, pp. 19-28, 1920.

GRILLON, C.; DIERKER, L.; MERIAKANGAS, K.R. Fear-Potentiated Startle in adolescent offspring of parents with anxiety disorders. **Society of biological psychiatry**, V. 44. pp. 990-997, 1998.

GROSS, C.; HEN, R. The developmental origins of anxiety. **Nature Reviews Neuroscience**, V. 5, pp. 545-552, 2004.

HELMSTETTER, F.J. Contribution of the amygdala to learning and performance of conditioned fear. **Physiology and Behavior**, V. 51, pp. 271-1276, 1992.

HELMSTETTER, F.J. Stress-induced hypoalgesia and defensive freezing are attenuated by application of diazepam to the amygdale. **Pharmacological Biochemistry**, pp. 433-438, 1993.

HELMSTETTER, F.J.; BELLGOWAN, P.S. Effects of Muscimol applied to the basolateral amygdale on acquisition and expression of contextual fear conditioning in rats. **Behavioral Neuroscience**, V. 108, pp.1005-1009, 1994.

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.

JAMES, W. What is an emotion? **Mind**, V. 9, pp. 188-205, 1884.

JACOB, H.L.; KWITEK, A. E. Rat Genetics: Attaching Physiology and Pharmacology to the Genome. **Nature Reviews Genetic**, V.31, pp. 33-42, 2001.

JOHNSTON, J.B. **Journal of Comparative Neurology**, V. 35, pp. 337-482, 1923.

KALIN, N.H.; SHELTO, S.E.; DAVIDSON, R.J.; KELLEY, A.E. The primate amygdala mediates acute fear but not the behavioral and physiological component of anxious temperament. **The Journal of Neuroscience**, V. 21, pp. 2067-2074, 2001.

KLUVER, H.; BUCY, P.C. **American Journal of Physiology**, V. 11, pp. 352-353, 1937.

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.

KIM, J.; GORMAN, J. The Psychobiology of anxiety. **Clinical Neuroscience Research**. V. 4, pp. 335-347, 2005.

KOTTER, R.; MEYER, N. The limbic system: a review of its empirical foundation. **Behavior Brain Research**, V.52, pp.105-127, 1992.

LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Context and Pavlovian Conditioning. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, V.29, pp.149-173, 1996.

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.

LANDGRAF, R.; WIGGER, A. High vs Low Anxiety-Related Behavior Rats: An Animal Model of Extremes in Trait Anxiety. **Behavior Genetics**, V.32, pp.301-314, 2002.

LEDOUX, J.E.; CICCHETTI, 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.

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.

LEDOUX, J.E. **O cérebro emocional**. Rio de Janeiro: Editora Objetiva, 1998.

LEDOUX, J.E. Emotion Circuits in the Brain. **Annual Review of Neuroscience**, V. 23, pp. 155-184, 2000.

LEDOUX, J.E. The Emotional Brain, Fear, and the Amygdala. **Cellular and Molecular Neurobiology**, V.23, n. 4/5, pp.727 – 738, 2002.

LIEBSCH, G.; MONTKOWSKI, A.; HOLSBOER, F.; LANDGRAF, R. Behavioral profiles of two Wistar rat lines selectively bred for high or low anxiety-related behavior. **Behavioral Brain Research**, V. 94, pp. 301-310, 1998.

MACLEAN, P.D. **Psychosomatic Medicine**, V.11, pp. 338-353, 1949.

MAREN, S., DE OCA, B., FANSELOW, M.S. Sex differences in hippocampal long-term potentiation (LTP) and Pavlovian fear conditioning in rats: positive correlation between LTP and contextual learning. **Brain Research**. 661 (1-2), 25-34, 1994.

MAREN, S. Sexually dimorphic perforant path long-term potentiation (LTP) in urethane-anesthetized rats. **Neuroscience Letters** 196 (3), 177-180, 1995.

MAREN, S. Neurobiology of Pavlovian Fear Conditioning. **Annual review of Neuroscience**, V. 24, pp.897-931, 2001.

MAREN, S.; CHANG, C. Recent fear is resistant to extinction. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, V. 103(47), pp. 18020 – 18025, 2006.

MAYER, EA.; FANSELOW, MS. Dissecting the components of the central response to stress. **Nature Neuroscience**, V. 6(10), pp.1011-1012, 2003.

MCDONALD, A.J.; AUGUSTINE, J.R. Localization of GABA-like immunoreactivity in the monkey amygdala. **Neuroscience**, V.52 (2), pp. 281-294, 1993.

MCGAUGH, J.L.; CAHILL, L.; ROOZENDAL, B. Involvement of the amygdala in memory storage: Interaction with other brain systems. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, V.93, pp. 13508-13514, 1996.

OLIVEIRA, L.C.; NOBRE, M.J.; BRANDÃO, M.L.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Role of the amygdala in conditioned fear generated in the periaqueductal gray. **Learning and Memory**, V.15(14), pp. 2281-2285, 2004.

PALANZA, P. Animal Models of anxiety and depression: How are females different? **Neuroscience Biobehavioral Review**, V. 25, pp. 219-33, 2001.

PAPEZ, J.W. 1937. A proposed mechanism of emotion. *em* **J Neuropsychiatry Clin Neurosci**, V. 7(1), pp. 103-12, 1995

PAVLOV, I.P. Conditioned Reflex. **Oxford University Press**, Oxford, 1927.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in the Stereotaxic Coordinates**, Second Edition, Academic Press, Sydney, 1986.

PINEL, J. **Biopsicologia**. Porto Alegre: Artmed, 2005.

PITKANEN, A.; SAVANDER, V.; LEDOUX, J.E. Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: an emerging framework for understanding functions of the amygdala. **Trends in Neurosciences**, V. 20, Issue 11, pp. 517-523, 1997.

PONDER, C.A.; KLIETHERMES, C.L.; DREW, M.R.; MULLER, J.; DAS, K.; RISBROUGH, V.B; CRABBE, J.C; GILLIAM, T.C.; PALMER, A.A. Selection for contextual fear conditioning affects anxiety-like behaviors and gene expression. **Genes, Brain and Behavior**, V. 6(8), pp. 1-14, 2007.

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

QUIRK, G.J.; REPA, C.; LEDOUX, J.E. Fear Conditioning enhances short latency auditory responses of lateral amygdala neurons: parallel recordings in the freely behaving rat. **Neuron**, V. 15 (5), pp.1029-1039, 1995.

RAMOS, A.; MORMÈDE, P. Stress and Emotionality: a Multidimensional and Genetic Approach. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, V.22, pp. 33-57, 1998.

RAMOS, A.; CORREIA, E.C.; IZÍDIO, G.S.; BRUSKE, G.R. Genetic Selection of two new rat lines displaying different levels of anxiety-related behaviors. **Behavior Genetics**, V.33, pp. 657-668, 2003.

RESSTEL, L.B., JOCA, S.R., GUIMARÃES, F.G., CORRÊA, F.M. Involvement of medial prefrontal cortex neurons in behavioral and cardiovascular responses to contextual fear conditioning. **Neuroscience**, V.143, pp. 377-385, 2006.

ROTENBERG, A.; MULLER, R.U. Variable place cell coupling to a continuously viewed stimulus: evidence that the hippocampus acts as a perceptual system. **Philosophical Transactions: Biological Sciences**, V.352, pp.1505 – 1513, 1997.

SANDERS, M.J.; WILTGEN, B.J.; FANSELOW, M.S. The Place of Hippocampus in Fear Conditioning. **European Journal of Pharmacology**, V. 463, pp.217-223, 2003.

SCHACHTER, S.; SINGER, J. Cognitive, Social, and Physiological Determinants of Emotional State. **Psychological Review**, V. 69, pp. 379-399, 1962.

SCHULTZ, D.P.; SCHULTZ, S.E. **História da Psicologia Moderna**. São Paulo: Cultrix, 1992.

SMALL, W. Notes on the psychic development of the white rat. **American Journal of Psychology**, V.11, pp. 80-100, 1899.

STEIMER, T.; PYTHON, A.; DRISCOLL, P.; HILAIRE, S.Z. Psychogenetically selected (Roman High-and-Low Avoidance) rats differ in 24-hour sleep organization. **Journal of Biological Rhythms**, V. 14, pp. 221-226, 1999.

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.

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.

SWANSON, L.W.; PETROVICH, G.D. What is the amygdala? **Trends in Neuroscience**, V. 21, Issue 8, 1, pp. 323-331, 1998.

TEIXEIRA, J.F. **Mentes e máquinas: uma introdução às ciências cognitivas**. Porto Alegre: Artes Médicas, 1998.

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.

WEISKRANTZ, L. Behavioral changes associated with ablation of the amygdaloid complex in monkeys. **Journal of Comparative Physiological Psychology**, V. 49, pp. 381-391, 1956.

WILTGEN, B.; SANDERS, M.J.; ANAGNOSTARAS, S.G.; SAGE, J.R.; FANSELOW, M.S. Context fear learning in the absence of hippocampus. **The Journal of Neuroscience**, V. 26, Issue 20, pp. 5484 -5491, 2006.

YERKES, R.M.; DODSON, J.D. The relation of strength of stimulus to rapidity of habit-formation. **Journal of Comparative Neurology and Psychology**, V. 18, pp. 459-482, 1908.

Anexo

available at www.sciencedirect.comwww.elsevier.com/locate/brainres**BRAIN
RESEARCH****Research Report****Amygdaloid lesions produced similar contextual fear conditioning disruption in the Carioca high- and low-conditioned freezing rats**Vitor de Castro Gomes^a, J. Landeira-Fernandez^{b,*}^aDepartamento de Psicologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Brazil^bDepartamento de Psicologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Curso de Psicologia, Universidade Estácio de Sá, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 10 July 2008

Keywords:

Animal models of anxiety disorder

Amygdala

Contextual fear conditioning

Selective breeding

Emotionality

Genetic selection

ABSTRACT

Rats selectively bred for high or low levels of emotionality represent an important and powerful tool to investigate the role of genetic variables in the occurrence of different anxiety disorders. In the present study, albino rats were selectively bred for differences in defensive freezing behavior in response to contextual cues previously associated with footshock, an animal model of general anxiety disorder. The results indicate that these two new lines of rats, which we refer to as Carioca High-Freezing (CHF) and Carioca Low-Freezing (CLF), show a reliable difference in conditioned freezing after three generations of selection. CHF and CLF rats did not present any differences during baseline or post-shock periods. Males from both lines consistently exhibit more conditioned freezing to contextual cues than females. A second experiment used male rats from the fourth generation to investigate the participation of the amygdala during contextual fear conditioning in the CHF and CLF lines. The results indicate that post-training amygdaloid electrolytic lesions lead to similar disruptions in conditioned freezing behavior in both animal lines.

© 2008 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Anxiety disorders represent the most prevalent mental health problem over the course of an individual's life span (The World Health Organization, World Mental Health Survey Consortium, 2004). They constitute a heterogeneous group of interrelated nosological categories associated with excessive and irrational fear in conjunction with intense physiological arousal. Different patterns of animal defensive behavior have been successfully used to investigate the underlying pathophysiological mechanisms involved in anxiety disorders. Understanding these neural mechanisms, and consequently the etiology of these disorders, will aid the

design of new and more effective forms of therapy for anxiety management.

Defensive freezing behavior is an immobile and crouching posture that animals adopt when facing potentially threatening or dangerous situations (Fanselow, 1984a). For example, in a typical contextual fear conditioning experiment, a rat is exposed to a novel chamber and a few minutes later a brief, unsignaled footshock is presented. Shortly after the shock or some time later (hours, days, or months), the animal freezes when returned to the same chamber in the absence of the aversive stimulus (Gale et al., 2004). Several studies indicate that this defensive freezing posture is a conditioned response to contextual cues associated with the footshock and repre-

* Corresponding author. Laboratório de Neurociência Comportamental-LANEC, Departamento de Psicologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, PUC-Rio, Rua Marquês de São Vicente, 225, Rio de Janeiro, RJ, 22453-900, Brazil. Fax: +55 21 3527 1187.

E-mail address: landeira@puc-rio.br (J. Landeira-Fernandez).

sents one of the most useful animal models for generalized anxiety disorder (see Brandão et al., 2008 for a review). For example, conditioned freezing is weakened by anxiety-reducing drugs (Fanselow et al., 1991) and enhanced by anxiety-inducing drugs (Conti et al., 1990; Izumi et al., 1999), indicating its ability to predict the validity of pharmacological substances that modulate general anxiety disorder in humans.

Selective breeding is a laboratory technique in which animals are bred in order to modify the frequency of genes underlying a particular phenotype. Mating animals within a population based on the opposite extremes of an observable characteristic will push, over many generations, this particular phenotype in opposite directions, leading to two separately bred lines. This technique has been widely employed to investigate how genes can influence a broad variety of behavioral traits, including defensive reactions associated with emotionality.

The development of bidirectional lines of animals with high and low levels of emotionality started in the middle of the 20th century, and since then a relatively large number of different lines have been described in the literature (see Ramos and Mormède, 2006 for a review). Unconditioned and conditioned emotional responses have been employed as the criteria for mating selection in rats. Among the unconditioned fear paradigms are ambulation and defecation in the open field, such as in the Maudsley reactive and non-reactive rats (Broadhurst, 1958; Hall, 1938) or open arm entrance in the elevated plus-maze, as in the high- and low-anxiety related behavior rats (Liebsch et al., 1998a; 1998b). Among paradigms of conditioned fear, active avoidance behavior has served as the main selection criteria for selectively breeding animals with high and low levels of emotionality. Examples in the literature are the high- and low-avoidance rats referred to as Roman (Bignami, 1965), Syracuse (Brush et al., 1979), Koltushi (Ryzhova et al., 1983), and Hatano (Ohta et al., 1995).

A few studies have indicated that conditioned freezing is a highly heritable response that can be rapidly selected. Radcliffe et al. (2000) and, more recently, Ponder et al. (2007, 2008) succeeded in producing two mouse lines exhibiting high and low levels of conditioned freezing after a single generation of selective breeding. Despite this encouraging result, there have been no published attempts to produce rat lines exhibiting high and low levels of conditioned freezing. This is an important issue, especially because rats are the predominant species used in laboratory studies to investigate the neurobiology of conditioned fear. Therefore, one of the purposes of the present study was to start a selective breeding program to develop two lines of rats with extremely high or low levels of defensive freezing response to contextual cues previously associated with footshock.

A large and highly consistent body of literature indicates that the amygdala is critically involved in the regulation of contextual fear conditioning (Fanselow and LeDoux, 1999; Kim and Jung, 2006; Maren, 2005). For example, electrolytic or neurotoxic lesions of the amygdala made before or after training disrupts conditioned freezing (Blanchard and Blanchard, 1972; Cousens and Otto, 1998; Helmstetter, 1992; Kim et al., 1993; Maren et al., 1996; Oliveira et al., 2004). In fact, reversible inactivation of the amygdala prevents the acquisition of contextual fear conditioning (Helmstetter and Bellgowan,

1994). Moreover, electrical or chemical stimulation of the amygdala can induce defensive freezing behavior (al Maskati and Zbrozyna, 1989; Da Costa Gómez et al., 1996; Kapp et al., 1982; Sajdyk and Shekhar, 1997). Finally, amygdaloid neurons show plasticity during fear conditioning (Ono et al., 1995; Parré and Collins, 2000; Rogan et al., 1997), probably mediated by long-term potentiation (LTP).

Recent results indicate that several genes in the amygdala are differentially expressed when mice are bidirectionally selected for conditioned freezing (Ponder et al., 2007). Therefore, this brain structure may be associated with the bidirectional selection of rats exhibiting high and low levels of conditioned freezing. The present work also investigated this issue as follows. After high- and low-conditioned freezing differences were established through the selective breeding procedure, a second experiment investigated the effect of bilateral lesions of the amygdala on contextual fear conditioning in these two new lines of animals. Electrolytic lesions were performed in both sides of the amygdala. Although this procedure destroy both neuronal cells and fibers of passage, evidence suggests that either electrolytic or neurotoxic lesions, that preserve the fibers of passage, produce similar effects on conditioned freezing in response to contextual cues associated with footshocks (Koo et al., 2004).

2. Experiment 1

2.1. Methods

2.1.1. Subjects

Albino Wistar rats were employed as subjects. The initial matrix of these animals was obtained in 1995 from a local farmer (Oswaldo Cruz Foundation), and since then they have been maintained in the colony room of the PUC-Rio Psychology Department. The selective breeding described in this work began in March of 2006.

Six to eight days after birth, animals were marked by amputation of one toe from each foot and a small cut in one of the ears. Upon weaning at 21 days of age, animals were separated by sex and housed in groups of five to seven, according to their respective lines, in polycarbonate cages measuring 18×31×38 cm, with food and water always provided *ad libitum*.

Room temperature was controlled (24±1 °C) and the light-dark cycle was maintained on a 12-h on-off cycle (07:00–19:00 h). All experiments took place during the light phase of the cycle. Animals were between 90 to 120 days of age at the beginning of the experiment. For five days leading up to the experiment, the animals were handled once daily for a period of 2 min. All experimental protocols employed in this work were approved by a local ethic committee and were conformed with the Brazilian Society of Neuroscience and Behavior Guidelines for Care and Use of Laboratory Animals (SBNeC), which are based on the US National Institutes of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals (revised in 1996).

2.1.2. Apparatus

Contextual fear conditioning took place in an observation chamber (25×20×20 cm) that was placed inside of a sound-

Table 1 – Distribution of the number of male and female rats of selected lines exhibiting high- and low-conditioned freezing responses along the three selected generations (S1, S2, and S3)

Selected generation	High Freezing		Low Freezing		Total
	Male	Female	Male	Female	
S1	37	39	34	37	147
S2	37	35	37	34	143
S3	34	45	42	37	158
Total	108	119	113	108	448

attenuating chest. A red light bulb (25 W) was placed inside the chest and a video camera was mounted in the back of the observation chambers so that the animal's behavior could be observed on a monitor placed outside the experimental chamber. A ventilation fan attached to the chest supplied a background noise of 78 dB (A scale).

The floor of the observational chamber was composed of 15 stainless rods with a diameter of 4 mm and spaced 1.5 cm apart (center-to-center), which were wired to a shock generator and scrambler (AVS, SCR04; São Paulo). An interface with eight channels (Insight; Ribeirão Preto) connected the shock generator to a computer, which allowed the experimenter to apply an electric footshock. Ammonium hydroxide solution (5%) was used to clean the chamber before and after each subject.

2.1.3. General procedure

In order to develop a line of rats with a high rate of conditioned freezing, termed Carioca¹ High-Freezing (CHF), and another line of rats with a low rate of conditioned freezing, named Carioca Low-Freezing (CLF), 120 animals (60 males and 60 females) randomly bred in our colony room were used. These animals constituted the initial generation (S0).

The contextual fear conditioning protocol involved an acquisition and a testing session. During acquisition, each animal was placed in the observation chamber for 8 min. At the end of this period, three unsignaled electrical footshocks were delivered at a strength of 1 mA, with each shock lasting 1 s and with an intershock interval of 20 s. The animal was returned to its home cage 2 min after the last shock.

The testing session occurred approximately 24 h after training. This test consisted of placing the animal for eight min in the same chamber in which the three footshocks had been administered on the previous day. No footshock or other stimulation occurred during this period. A time-sampling procedure was employed to evaluate fear conditioning to contextual cues. Every two seconds, the animal was observed and a well-trained observer recorded episodes of freezing, which were defined as the total absence of movement of the body or vibrissa except for movement required for respiration. The agreement between observers with respect to the scoring of freezing episodes in our laboratory is higher than 0.95.

At the acquisition session, freezing was scored during the 8-min baseline period prior to the occurrence of the first footshock as well as during the 2-min post-shock period immediately after the occurrence of the third footshock. Freezing was also scored during the 8-min test session. The

total amount of freezing behavior observed during the test session was used as the criterion for animal mating. The 10 male and 10 female rats with the highest conditioned freezing score, as well as the 10 male and 10 female rats with the lowest conditioned freezing rate were selected to breed the CHF and CLF lines, respectively. From the 10 CHF families, 76 animals were born, while the 10 CLF families gave rise to 71 animals. These animals were the first-generation offspring of our breeding procedure (S1). The same procedure was used for the production of two new generations of selected animals (S2 and S3). The 10 high- and low-family breeders were chosen after all animals from a given generation had been phenotyped. Mating always occurred within each line. One exception occurred in S2, when one female from the CLF line with the highest rate of conditioned freezing was bred with a male from the CHF line that also had the highest rate of conditioned freezing. Brother-sister breeding pairs were avoided in order to reduce inbreeding, which could lead a reduction in the animal's fertility and random changes in the development of the selected lines due to genetic drift (Falconer and MacKay, 1996).

3. Results

Table 1 shows the distribution of the 448 animals of the S1, S2, and S3 generations. Animal distribution remained relatively constant across both lines. An analysis using the chi-square

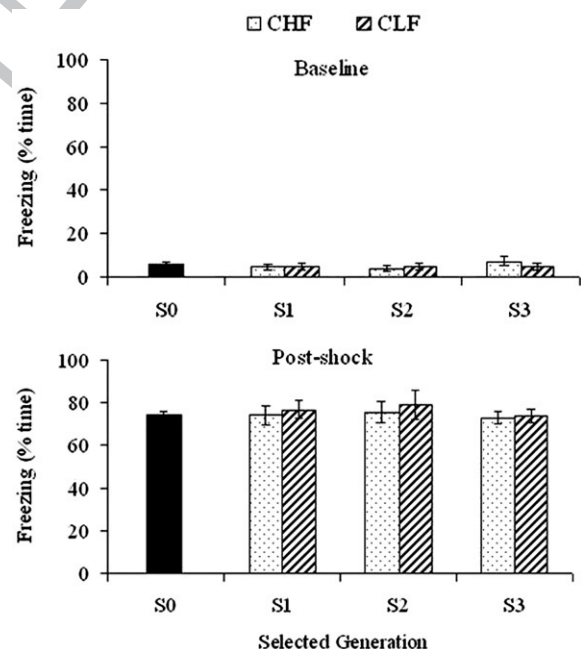


Fig. 1 – Mean (±SEM) percentage of time spent freezing during the baseline (top) and post-shock (bottom) acquisition session periods of the original population (S0) as well as of the three generations (S1, S2 and S3) selected for high (CHF) and low (CLF) levels of conditioned freezing. Original population was composed by 120 animals (60 males and 60 females). Number of animals in each group across the three generations is presented in Table 1.

¹ Carioca is the name given to those born in Rio de Janeiro.

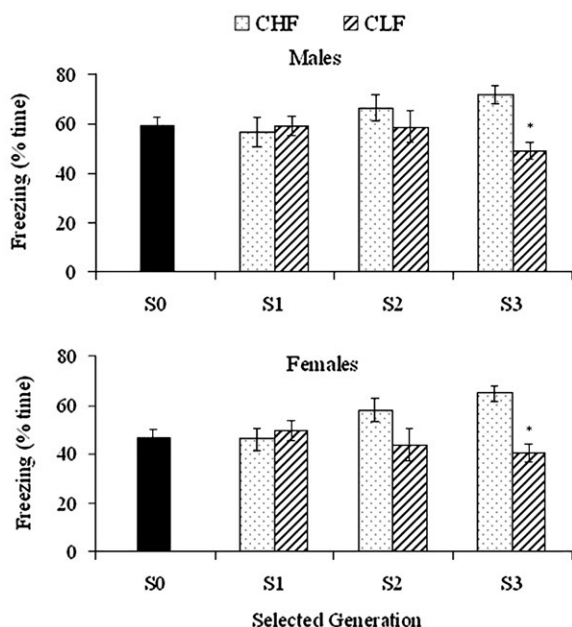


Fig. 2 – Mean (±SEM) percent of conditioned freezing during the testing session among male (top) and female (bottom) rats selected for high- or low-conditioned freezing in relation to the original population (S0) and the next three generations (S1, S2, and S3). Original population was composed by 120 animals (60 males and 60 females). Number of male and female rats in each group across the three generations is presented in Table 1. Asterisk indicated $p < 0.001$.

test showed no significant differences between the 12 groups (chi-square = 0.58, $p > 0.7$).

Fig. 1 presents the mean (±SEM) percentage of time spent freezing during the baseline (top) and post-shock (bottom) acquisition session periods of the original population (S0) as well as of the three generations (S1, S2 and S3) selected for high (CHF) and low (CLF) rates of conditioned freezing. As can be observed from the upper portion of Fig. 1, freezing during the baseline period was minimal with no significant differences among the groups. This impression was confirmed by a three-way analysis of variance (ANOVA). The first factor, with three levels, was related to the number of generations (S1, S2, and S3). The second factor, with two levels, was related to the breeding line (CHF and CLF). Finally, the third factor, also with two levels, was related to the animal's sex (male and female). This analysis revealed an absence of a three-way interaction [$F(2,448) = 1.41$; $p > 0.2$]. No two-way interactions between sex and the selected generation [$F(2,448) = 1.34$; $p > 0.2$], between sex and breeding line [$F(1,448) = 0.15$; $p > 0.9$] or between selected generation and breeding line [$F(2,448) = 0.84$; $p > 0.4$] were found. No main effect of sex [$F(1,448) = 1.06$; $p > 0.3$], breeding line [$F(1,448) = 0.21$; $p > 0.6$] or selected generation [$F(2,448) = 0.67$; $p > 0.5$] was also detected.

Freezing behavior during the post-shock period of CHF and CLF lines remained relatively constant across the different generations. The three-way ANOVA revealed an absence of a three-way interaction [$F(2,448) = 1.06$; $p > 0.1$]. No two-way interactions between sex and the selected

generation [$F(2,448) = 0.08$; $p > 0.9$], between sex and breeding line [$F(1,448) = 0.13$; $p > 0.9$] or between selected generation and breeding line [$F(2,448) = 0.15$; $p > 0.8$] were detected. No main effect of sex [$F(1,448) = 1.77$; $p > 0.1$], breeding line [$F(1,448) = 1.84$; $p > 0.1$] or selected generation [$F(2,448) = 1.56$; $p > 0.2$] was also found.

Conditioned freezing scored during the test session was also analyzed by the three-way ANOVA. This analysis indicated an absence of a three-way interaction [$F(2,448) = 0.17$; $p > 0.8$]. No two-way interactions were found, either between sex and the selected generation [$F(2,448) = 0.28$; $p > 0.7$], or between sex and breeding line [$F(1,448) = 0.22$; $p > 0.6$]. However, ANOVA did reveal a reliable two-way interaction between breeding lines along the three different generations [$F(2,448) = 7.55$; $p < 0.001$]. The analysis also revealed a significant main effect of sex [$F(1,448) = 13.10$; $p < 0.001$] and breeding line [$F(1,448) = 14.77$; $p < 0.001$] but no main effect of selected generation [$F(2,448) = 0.68$; $p > 0.5$].

The presence of a main effect of sex indicated that importance of this variable in this study. Therefore, male and female results were analyzed separately. Fig. 2 presents the mean (±SEM) percentage of time spent freezing in male (top) and female (bottom) rats during the test session of the original population (S0), as well as of the three generations (S1, S2 and S3) selected for high (CHF) and low (CLF) rates of conditioned freezing. Pairwise Student's *t*-test comparisons between CHF and CLF were performed for each selected generation among male and female rats. These analyses allowed us to identify which generation the two lines of male and female rats presented a reliable difference in conditioned freezing. The results indicate that CHF and CLF males did not show any significant differences in the first (S1) or second (S2) generations [S1: $t(69) = 0.37$, $p > 0.7$; S2: $t(72) = 10.92$; $p > 0.3$]. However, a reliable difference between the two male lines was detected in the third (S3) generation [$t(74) = 4.47$; $p < 0.001$]. The same pattern was observed among females. A reliable difference between CHF and CLF lines within females was detected in S3 [$t(80) = 5.31$, $p < 0.001$], but not in S1 [$t(74) = 0.55$; $p > 0.5$] or S2 [$t(67) = 0.92$; $p > 0.3$]. Therefore, selective breeding led to divergence of conditioned freezing in both male and female rats by the third selected generation.

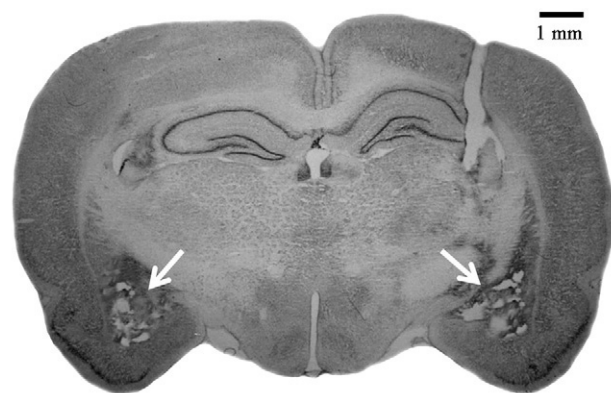


Fig. 3 – Representative photomicrographs with arrows showing a typical example of a bilateral electrolytic lesion in the amygdala.

4. Experiment 2

4.1. Methods

4.1.1. Subjects

CHF and CLF animals from the fourth generation (S4) were used as subjects. This new generation of animals was created from S3 following the same procedure described in Experiment 1.

The S4 population consisted of 77 animals from the CHF line (46 males and 31 females), and 74 animals from the CLF line (33 males and 41 females).

4.1.2. Equipment and procedure

All animals were phenotyped for contextual fear conditioning using the equipment previously described. The conditioning protocol was slightly different from Experiment 1. Each animal was placed in an observation chamber and three minutes

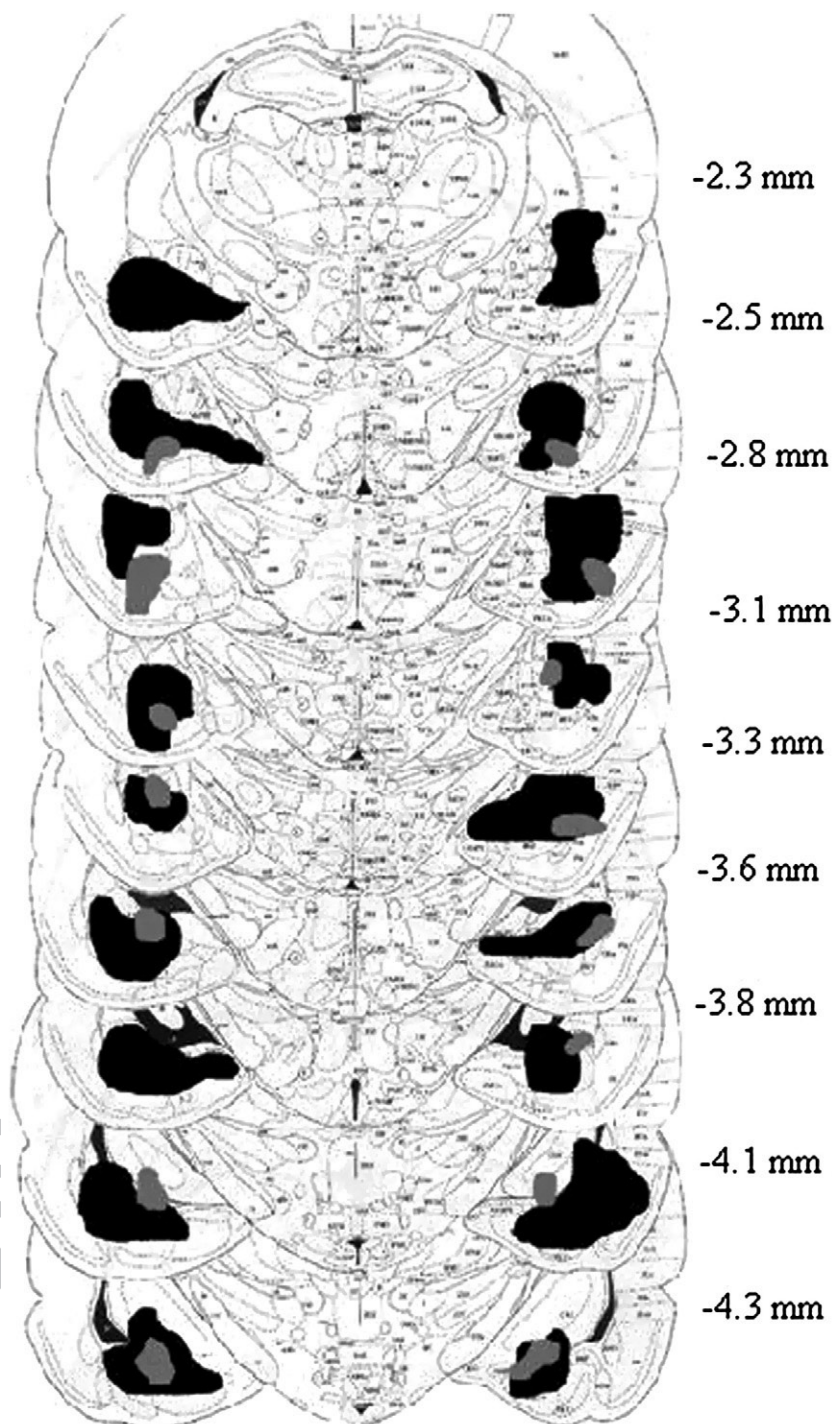


Fig. 4 – Composite of coronal sections adapted from the Paxinos and Watson (1986) rat brain atlas. Numbers indicate the distance in millimeters from bregma. The figure shows the smallest (black) and largest (gray) damaged areas in the amygdala-lesioned animals.

later, three unsignaled electrical footshocks with strength of 1 mA and a duration of 1 s were delivered 20 s apart. One minute after the last shock, the animal was returned to its home cage. Approximately 24 h after the training session, the animal was placed back in the same observation chamber for a 4-min test session in the absence of any stimulation.

The 24 male and 24 female rats from the CHF with the highest conditioned freezing scores as well as the 24 male and 24 female rats from the CLF with the lowest amount of conditioned freezing were mated for one week. After this period, all 48 male rats (24 animals from each line) were housed in groups of six, according to their respective lines. Approximately three weeks later, half of the 24 CHF and CLF animals received bilateral electrolytic lesions in the amygdala whereas the other half of the animals received sham lesions. One week after surgery, each animal was returned to the conditioning chamber for a 3-min test session in the absence of any stimulation.

4.1.3. Surgery

Under aseptic conditions, animals were anaesthetized with ribromoethanol (250 mg/kg, i.p.) and fixed in a stereotaxic frame (David Kopf, Tujunga, CA). The upper incisor bar was set at 3.3 mm below the interaural line such that the skull was horizontal between bregma and lambda. Bilateral electrolytic lesions of the amygdala were made by passing a 5 mA anodal current for 20 s through a stainless steel insect pin (size 00) insulated with baked epoxylite except for the cut tip. A cathode clamped to the tail completed the circuit. The current was delivered by a lesion-generating device (DelVecchio, Ribeirão Preto, Brazil). Based on the rat brain atlas of Paxinos and Watson (1986), the stereotaxic coordinates were 3.2 mm posterior to bregma, 4.2 mm lateral to each side of the midline, and 5.8 mm ventral to the dura of the brain. Sham-lesion animals were submitted to the same surgical procedure except that no current was delivered.

4.1.4. Histology

At the end of the experiment, animals were overdosed with cloral hydrate (1 ml/100 g, i.p.) and perfused through the left ventricle of the heart with 0.9% saline followed by a formalin (4%) solution containing potassium ferrocyanide (1%). After transcardiac perfusion, the brain was removed and placed in a 10% solution of phosphate-buffered saline containing 30% sucrose for at least one week. Serial 60 μ m brain sections were cut using a cryostat microtome, thaw-mounted on gelatinized slides, and stained with cresyl violet in order to localize the electrolytic lesions according to the rat brain atlas of Paxinos and Watson (1986).

5. Results

Of the 48 male rats subjected to surgery, nine animals were excluded due to death (1) or misplaced lesions (8). The final sizes of each of the six groups were as follows: CHF-amygdala lesion group, $n=9$; CHF-sham lesion group, $n=11$; CLF-amygdala lesion group, $n=7$; and CLF-sham lesion group, $n=12$.

Fig. 3 shows a representative histological section of a bilateral electrolytic lesion of the amygdala. Fig. 4 presents a

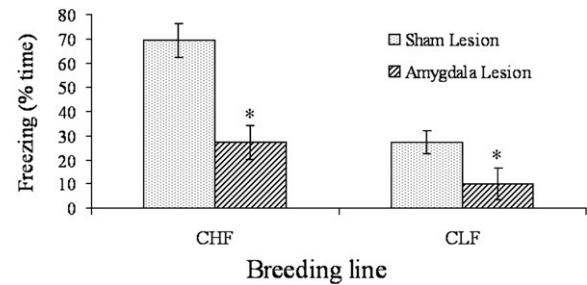


Fig. 5 – Mean percent ($\pm$ SEM) of conditioned freezing during the testing session among Carioca High-Freezing (CHF) and Carioca Low-Freezing (CLF) rats. Asterisk indicated $p<0.01$.

composite of the representative areas of the smallest and largest lesions in the amygdala. Histological examination of the bilateral electrolytic lesions in the amygdala showed that the induced damage was usually symmetrical and affected most of the basolateral (BLA) and central nucleus (CEA) of the amygdala, as well as lateral portions of the amygdala and small portions of the ventral striatum.

Fig. 5 depicts the mean ($\pm$ SEM) percentage of time that sham- and amygdaloid-lesioned animals exhibited freezing during the test session. These results were analyzed by a 2×2 ANOVA. The first factor, with two levels, was related to the type of lesion (amygdala or sham). The second factor, with also two levels, was related to the two breeding lines (CHF or CLF). The ANOVA revealed no significant interaction between these two factors [$F(1,39)=3.1$; $p>0.08$] and a significant effect of lesion [$F(1,39)=18.0$; $p<0.001$] and breeding line [$F(1,39)=17.9$; $p<0.001$]. Pairwise comparison indicated that CHF animals froze more than CLF animals, and amygdala lesion caused a reduction in their conditioned freezing ($p<0.01$ in all cases). The mean percentage difference between sham and lesioned animals within each line of animals was calculated in order to estimate the effect of amygdaloid lesions on conditioned freezing in each of the lines. These analyses revealed that amygdaloid lesions reduced the percentage of conditioned freezing by 60.6% in the CHF line and by 63.0% in the CLF line.

6. Discussion

This work presents initial results from two new lines of animals that were selectively bred for high or low levels of freezing in response to contextual cues previously associated with footshock. Results from this ongoing selective breeding program in our laboratory indicated a progressive divergence of the conditioned freezing phenotype in both male and female rats. Differences between CHF and CLF lines became clear after three breeding generations. No differences in freezing behavior were observed during baseline or post-shock periods of the acquisition sessions. These results represent the first successful attempt to select rats with reliable and selective differences in conditioned freezing. It extends the results of previous report, which also achieved a bidirectional short-term selection of this conditioned response among mice (Ponder et al., 2007; 2008; Radcliffe et al., 2000).

Reports from mouse studies have indicated that only one generation was sufficient to differentiate high- and low-conditioned freezing lines, whereas the present results detected a reliable difference after three generations. This result may suggest subtle differences between the two species. As a whole, these data reveal that conditioned fear is a highly heritable trait and can be rapidly, bidirectionally selected after a few generations. The present CHF and CLH lines are particularly important since most behavioral, pharmacological, and neuroanatomical experiments studying conditioned fear have been conducted using rats.

The active avoidance paradigm has been widely used in genetic research as the main rat model of conditioned fear. Avoidance is a complex form of learning that involves the acquisition of both associative fear and an operant response (Gray, 1975; Mowrer, 1947; 1960). The interaction between these two learning processes may interfere with the measurement of emotional processes mediated by associative learning. For example, manipulations that decrease conditioned fear—such as a reduction in shock intensity (McAllister et al., 1971), anxiolytic drugs (Fernandez-Teruel et al., 1991), and a decrease in contextual fear conditioning (Dieter, 1977)—enhance the acquisition of an active avoidance response. On the other hand, freezing is a more direct and prominent measure of conditioned fear since it does not involve the acquisition of an operant response. This defensive response is a function of shock intensity, depends on the association between conditioned and unconditioned stimuli, and is sensitive to a series of manipulations that interferes with its associative strength (Fanselow and Bolles, 1979; Landeira-Fernandez, 1996; Landeira-Fernandez et al., 1995). Therefore, in studies investigating the genetic mechanisms of conditioned fear, lines of animals selectively bred for high and low levels of conditioned freezing may represent a better model than the bidirectional selection of the active avoidance response.

It is possible that differences in contextual fear conditioning between CHF and CLF animals might reflect differences in pain sensitivity of these two new lines of animals. This is an important issue since freezing observed immediately after footshock as well as 24 h after conditioning are closely related to pain sensitivity and shock intensity (Cordero et al., 1998; Fanselow, 1984b). The fact that CHF and CLF rats did not present any differences in post-shock freezing during the acquisition sessions of the contextual fear conditioning weakens this possibility. However, future studies are important to further evaluate whether CHF and CLF rats might present differences in pain sensitivity.

Previous studies indicated that post-shock freezing and freezing observed 24 h after contextual fear conditioning are mediated by associative learning (see Landeira-Fernandez, 1996 for a review). The fact that CHF and CLF animals presented differences in conditioned freezing observed 24 h after conditioning but not immediately after footshocks suggests that these two forms of freezing behavior might be mediated by distinct set of genes which in turn regulates different neural mechanism associated with each form of learning. In accordance with this view, it has been shown that freezing 24 h after conditioning but not post-shock freezing, is mediated by N-methyl D-aspartate receptors (Kim et al., 1991; Kim et al., 1992).

Results from Experiment 1 also indicate that male rats consistently exhibit more conditioned freezing than females during the development of the CHF and CLF lines. Sex differences favoring males have been observed in contextual fear conditioning (Maren et al., 1994; Markus & Zecevic, 1997) as well as in other spatial learning such as in the 12-arm radial maze (Williams et al., 1990) and the Morris water maze (Roof, 1993). It has been suggested that these differences may be related to sexual dimorphism observed in hippocampal anatomy and physiology. Indeed, electrophysiological studies have found that male rats that acquired contextual fear more rapidly than female rats also showed a higher magnitude of LTP induced at perforant path synapses in the dentate gyrus of the hippocampal formation (Maren et al., 1994; Maren, 1995). Therefore, it is possible that marked sex differences observed in the present study are associated with greater magnitude in male hippocampus LTP compared to female rats.

The second experiment used fourth-generation male rats from our selective breeding procedure to investigate the effect of bilateral lesions of the amygdala on contextual fear conditioning in the CHF and CLF lines. In agreement with previous reports (Blanchard and Blanchard, 1972; Cousens and Otto, 1998; Kim et al., 1993; Maren et al., 1996; Oliveira et al., 2004), electrolytic lesions of the amygdala caused a substantial reduction in the amount of conditioned freezing. Interestingly, this deleterious effect was similar in both lines of animals (~60%), indicating that the high and low rates of conditioned freezing induced by our selective breeding procedure are regulated by an amygdala-dependent neural pathway. These results are in agreement with other reports (Maren, 1998; 2001; Zimmerman et al., 2007), which also found that post-training lesions of BLA or CEA caused similar disruption of conditioned freezing in rats with different levels of training.

The neural circuitry responsible for contextual fear conditioning involves multimodal sensory information that reaches the BLA through direct projections from the hippocampus. Indeed, LTP has been observed along this hippocampal-amygdaloid pathway (Maren and Fanselow, 1995). Moreover, ascending serotonergic projections from the median raphe nucleus to the hippocampus seem to be part of the pathway that regulates contextual fear conditioning (Silva et al., 2002). The ventral portion of the medial prefrontal cortex (Resstel et al., 2006) and the perirhinal and postrhinal cortices (Bucci et al., 2000; Corodimas and LeDoux, 1995; Sacchetti et al., 1999) are also thought to be involved contextual fear conditioning. Direct projections from these cortical areas to the hippocampus and to the BLA may provide higher-order processing of polymodal sensory information. The information flow within the amygdaloid region involves projections from the BLA to the CEA, which constitutes the main output region of the amygdala. Efferent projections from the CEA to the brain stem and hypothalamic areas give rise to distinct behavioral and autonomic reactions involved in this type of conditioning. The motor output of the conditioned freezing response is related to efferents from the CEA to the ventral portion of the periaqueductal gray, which in turn sends projections to motoneuron cell groups in the spinal cord.

The results presented here confirm that the amygdaloid region plays a pivotal role in contextual fear conditioning. Although different pathways may participate in processing

Q2

dangerous stimuli, they all seem to converge in the amygdala. In this way, CHF and CLF animals bearing lesions within this area show a similar disruption in conditioned freezing. Unfortunately, this study cannot clarify whether other brain structures along these neural pathways might play a differential role in acquisition and expression of the different levels of conditioned freezing induced by our selective breeding procedure. Therefore, further studies are necessary to investigate more completely the contribution of each of these neural structures underlying contextual fear conditioning in these two new lines of animals.

In sum, the present report introduces two new lines of rats bidirectionally selected for their enhanced (CHF) or reduced (CLF) contextual fear conditioning, as measured by freezing behavior. Divergence between these two lines was observed after three generations, indicating a strong heritable component of this trait. The amygdala seems to be crucial for the expression of contextual fear conditioning presented by CHF and CLF lines regardless of their high or low levels of conditioned response since post-training electrolytic lesion within this area produced a similar disruption in conditioned freezing in both lines of animals.

Acknowledgments

This research was supported by a Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) grant 52272095-1 to JLF. VCG had a graduate student fellowship from CNPq. We also thank A. Pedro de Mello Cruz, Yossi Zana, Manoel Jorge Nobre and André Ramos for their help in different stages of this work.

REFERENCES

al Maskati, H.A., Zbrozyna, A.W., 1989. Cardiovascular and motor components of the defense reaction elicited in rats by electrical and chemical stimulation in amygdala. *J. Auton. Nerv. Syst.* 28 (2), 127-131.

Bignami, G., 1965. Selection for high rates and low rates of avoidance conditioning in the rat. *Anim. Behav.* 13 (2), 221-227.

Blanchard, D.C., Blanchard, R.J., 1972. Innate and conditioned reactions to threat in rats with amygdaloid lesions. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 81 (2), 281-290.

Brandão, M.L., Zanovelia, J.M., Ruiz-Martinez, R.C., Oliveira, L.C., Landeira-Fernandez, J., 2008. Different patterns of freezing behavior organized in the periaqueductal gray of rats: **association** with different types of anxiety. *Behav. Brain Res.* 188 (1), 1-13.

Broadhurst, P.L., 1958. Determinants of emotionality in the rat: III. Strain differences. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 51 (1), 55-59.

Brush, J.C., Froehlich, Sakellaris, P.C., 1979. Genetic selection for avoidance behavior in the rat. *Behav. Genet.* 9 (4), 309-316.

Bucci, D.J., Phillips, R.G., Burwell, R.D., 2000. Contributions of post-thal and perirhinal cortex to contextual information processing. *Behav. Neurosci.* 114 (5), 882-894.

Conti, L.H., Maciver, C.R., Ferkany, J.W., Abreu, M.E., 1990. Footshock-induced freezing behavior in rats as a model for assessing anxiolytics. *Psychopharmacology (Berl)* 102 (4), 492-497.

Cordero, M.I., Merino, J.J., Sandi, C., 1998. Correlational relationship between shock intensity and corticosterone secretion on the establishment and subsequent expression of contextual fear conditioning. *Behav. Neurosci.* 112 (4), 885-891.

Corodimas, K.P., LeDoux, J.E., 1995. Disruptive effects of posttraining perirhinal cortex lesions on conditioned fear: contributions of contextual cues. *Behav. Neurosci.* 109 (4), 613-619.

Cousens, G., Otto, T., 1998. Both pre- and posttraining excitotoxic lesions of the basolateral amygdala abolish the expression of olfactory and contextual fear conditioning. *Behav. Neurosci.* 112 (5), 1092-1103.

Da Costa Gómez, T.M., Chandler, S.D., Behbehani, M.M., 1996. The role of the basolateral nucleus of the amygdala in the pathway between the amygdala and the midbrain periaqueductal gray in the rat. *Neurosci. Lett.* 214 (1), 5-8.

Dieter, S.E., 1977. Preexposure to situational cues and shock intensity in two-way avoidance learning. *Anim. Learn. Behav.* 5 (4), 403-406.

Falconer, D.S., Mackay, T.F., 1996. *Introduction to Quantitative Genetics*, fourth ed. Longman Scientific & Technical, New York.

Fanselow, M.S., 1984a. What is conditioned fear? *Trends Neurosci.* 7, 460-462.

Fanselow, M.S., 1984b. Opiate modulation of the active and inactive components of the postshock reaction: parallels between naloxone pretreatment and shock intensity. *Behav. Neurosci.* 98, 269-277.

Fanselow, M.S., Bolles, R.C., 1979. Naloxone and shock elicited freezing in the rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 93 (4), 736-744.

Fanselow, M.S., LeDoux, J.E., 1999. Why we think plasticity underlying Pavlovian fear conditioning occurs in the basolateral amygdala. *Neuron* 23 (2), 229-232.

Fanselow, M.S., Helmstetter, F.J., Calcagnetti, D.J., 1991. Parallels between the behavioral effects of dimethoxy-carboline (DMCM) and conditional fear stimuli. In: Dachowski, L.L., Flaherty, C.F. (Eds.), *Current Topics in Animal Learning: Brain, Emotion, and Cognition*. Erlbaum, Hillsdale, N.J., pp. 187-206.

Fernandez-Teruel, A., Escorihuela, R.M., Nunez, J.F., Zapata, A., Boix, F., Salazar, W., Tobena, A., 1991. The early acquisition of two-way (shuttle-box) avoidance as an anxiety-mediated behavior: **psychopharmacological** validation. *Brain Res. Bull.* 26 (1), 173-176.

Gale, G.D., Anagnostaras, S.G., Godsil, B.P., Mitchell, S., Nozawa, T., Sage, J.R., Wiltgen, B., Fanselow, M.S., 2004. Role of the basolateral amygdala in the storage of fear memories across the adult lifetime of rats. *J. Neurosci.* 24 (15), 3810-3815.

Gray, J.A., 1975. *Elements of a Two Process Theory of Learning*. Academic Press, London.

Hall, C.S., 1938. The inheritance of emotionality. *Sigma Xi Quart.* 26, 17-27.

Helmstetter, F.J., 1992. The amygdala is essential for the expression of conditional hypoalgesia. *Behav. Neurosci.* 106 (3), 518-528.

Helmstetter, F.J., Bellgowan, P.S., 1994. Effects of muscimol applied to the basolateral amygdala on acquisition and expression of contextual fear conditioning in rats. *Behav. Neurosci.* 108 (5), 1005-1009.

Izumi, T., Inoue, T., Tsuchiya, K., Hashimoto, S., Ohmori, T., Koyama, T., 1999. Effects of the benzodiazepine antagonist flumazenil on conditioned fear stress in rats. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 23 (7), 1247-1258.

Kapp, B.S., Gallagher, M., Underwood, M.D., McNall, C.L., Whitehorn, D., 1982. Cardiovascular responses elicited by electrical stimulation of amygdala central nucleus in the rabbit. *Brain Res.* 234 (2), 251-262.

Kim, J.J., Jung, M.W., 2006. Neural circuits and mechanisms involved in Pavlovian fear conditioning: a critical review. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 30 (2), 188-202.

- Kim, J.J., DeCola, J.P., Landeira-Fernandez, J., Fanselow, M.S., 1991. N-methyl-D-aspartate receptor antagonist APV blocks acquisition but not expression of fear conditioning. *Behav. Neurosci.* 105 (1), 126–133.
- Kim, J.J., Fanselow, M.S., DeCola, J.P., Landeira-Fernandez, J., 1992. Selective impairment of long-term but not short-term conditional fear by the N-methyl-D-aspartate antagonist APV. *Behav. Neurosci.* 106 (4), 591–596.
- Kim, J.J., Rison, R.A., Fanselow, M.S., 1993. Effects of amygdala, hippocampus and periaqueductal gray lesions on short- and long-term contextual fear. *Behav. Neurosci.* 107 (6), 1093–1098.
- Koo, J.W., Han, J.S., Kim, J.J., 2004. Selective neurotoxic lesions of basolateral and central nuclei of the amygdala produce differential effects on fear conditioning. *J. Neurosci.* 24 (35), 7654–7662.
- Landeira-Fernandez, J., 1996. Context and Pavlovian conditioning. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 29 (2), 149–173.
- Landeira-Fernandez, J., Fanselow, M.S., DeCola, J.P., Kim, J.J., 1995. Effects of handling and context preexposure on the immediate shock deficit. *Anim. Learn. Behav.* 23 (3), 335–338.
- Liebsch, G., Linthorst, A.C.E., Neumann, I.D., Reul, J.M.H.M., Holsboer, F., Landgraf, R., 1998a. Behavioral, physiological, and neuroendocrine stress responses and differential sensitivity to diazepam in two Wistar rat lines selectively bred for high- and low-anxiety-related behavior. *Neuropsychopharmacology* 19 (5), 381–396.
- Liebsch, G., Montkowski, A., Holsboer, F., Landgraf, R., 1998b. Behavioural profiles of two Wistar rat lines selectively bred for high or low anxiety-related behaviour. *Behav. Brain Res.* 94 (2), 301–310.
- Maren, S., 1995. Sexually dimorphic perforant path long-term potentiation (LTP) in urethane-anesthetized rats. *Neurosci. Lett.* 196 (3), 177–180.
- Maren, S., 1998. Overtraining does not mitigate contextual fear conditioning deficits produced by neurotoxic lesions of the basolateral amygdala. *J. Neurosci.* 18 (8), 3088–3097.
- Maren, S., 2001. Is there savings for Pavlovian fear conditioning after neurotoxic basolateral amygdala lesions in rats? *Neurobiol. Learn. Mem.* 76 (3), 268–283.
- Maren, S., 2005. Synaptic mechanisms of associative memory in the amygdala. *Neuron* 47 (6), 783–786.
- Maren, S., De Oca, B., Fanselow, M.S., 1994. Sex differences in hippocampal long-term potentiation (LTP) and Pavlovian fear conditioning in rats: positive correlation between LTP and contextual learning. *Brain Res.* 661 (1–2), 25–34.
- Maren, S., Aharonov, G., Fanselow, M.S., 1996. Retrograde abolition of conditional fear after excitotoxic lesions in the basolateral amygdala of rats: absence of a temporal gradient. *Behav. Neurosci.* 110 (4), 718–726.
- Markus, E.J., Zecevic, M., 1997. Sex differences and estrous cycle changes in hippocampus-dependent fear conditioning. *Psychobiology* 25 (3), 246–252.
- McAllister, W.R., McAllister, D., Douglas, W.K., 1971. The inverse relationship between shock intensity and shuttle-box avoidance learning in rats. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 74, 426–433.
- Mowrer, O.H., 1947. On the dual nature of learning: a re-interpretation of conditioning and problem-solving. *Harv. Educ. Rev.* 17 (2), 102–150.
- Mowrer, O.H., 1960. *Learning Theory and Behavior*. Wiley, New York.
- Ohta, R., Matsumoto, A., Hashimoto, Y., Nagao, T., Mizutani, M., 1995. Behavioral characteristics of rats selectively bred for high and low avoidance shuttlebox response. *Cong. Anom.* 35, 223–229.
- Oliveira, L.C., Nobre, M.J., Brandão, M.L., Landeira-Fernandez, J., 2004. Role of amygdala in conditioned and unconditioned fear generated in the periaqueductal gray. *Neuroreport* 15 (14), 2281–2285.
- Ono, T., Nishijo, H., Uwano, T., 1995. Amygdala role in conditioned associative learning. *Prog. Neurobiol.* 46 (4), 401–422.
- Parré, D., Collins, D.R., 2000. Neuronal correlates of fear in the lateral amygdala: multiple extracellular recordings in conscious cats. *J. Neurosci.* 20 (7), 2701–2710.
- Paxinos, G., Watson, C., 1986. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, second ed. Academic Press.
- Ponder, C.A., Kliethermes, C.L., Drew, M.R., Muller, J., Das, K., Risbrough, V.B., Crabbe, J.C., Gilliam, T.C., Palmer, A.A., 2007. Selection for contextual fear conditioning affects anxiety-like behaviors and gene expression. *Genes Brain Behav.* 6 (8), 736–749.
- Ponder, C.A., Huded, C.P., Muñoz, M.B., Gulden, F.O., Gilliam, T.C., Palmer, A.A., 2008. Rapid selection response for contextual fear conditioning in a cross between C57BL/6J and A/J: behavioral, QTL and gene expression analysis. *Behav. Genet.* 38 (3), 277–291.
- Radcliffe, R.A., Lowe, M.V., Wehner, J.M., 2000. Confirmation of contextual fear conditioning QTLs by short-term selection. *Behav. Genet.* 30 (3), 183–191.
- Ramos, A., Mormède, P., 2006. Genetic analysis of emotional behaviors using animal models. In: Jones, B.C., Mormède, P. (Eds.), *Neurobehavioral Genetics: Methods and Applications*, Second Edition, second ed. CRC Press, Boca Raton, pp. 291–306.
- Resstel, L.B., Joca, S.R., Guimarães, F.G., Corrêa, F.M., 2006. Involvement of medial prefrontal cortex neurons in behavioral and cardiovascular responses to contextual fear conditioning. *Neuroscience* 143 (2), 377–385.
- Rogan, M.T., Taubli, U.V., LeDoux, J.E., 1997. Fear conditioning induces associative long-term potentiation in the amygdala. *Nature* 390 (6660), 604–607.
- Roof, R.L., 1993. Neonatal exogenous testosterone modifies sex difference in radial arm and Morris water maze performance in prepubescent and adult rats. *Behav. Brain Res.* 53 (1–2), 1–10.
- Ryzhova, L.Y., Kulagin, D.A., Lopatina, N.G., 1983. Correlated variability in movement activity and emotionality in the selection of rats for high and low levels of conditioned active avoidance reflexes. *Genetika* 19 (1), 121–125.
- Sacchetti, B., Lorenzini, C.A., Baldi, E., Tassoni, G., Bucherelli, C., 1999. Auditory thalamus, dorsal hippocampus, basolateral amygdala, and perirhinal cortex role in the consolidation of conditioned freezing to context and to acoustic conditioned stimulus in the rat. *J. Neurosci.* 19 (21), 9570–9578.
- Sajdyk, T.J., Shekhar, A., 1997. Excitatory amino acid receptor antagonists block the cardiovascular and anxiety responses elicited by gamma-aminobutyric acidA receptor blockade in the basolateral amygdala of rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 283 (2), 969–977.
- Silva, R.C.B., Cruz, A.P.M., Landeira-Fernandez, J., Avanzi, V., Brandão, M.L., 2002. Distinct contributions of median raphe nucleus to contextual fear conditioning and fear potentiated startle. *Neural Plas.* 9 (4), 233–247.
- The World Health Organization, World Mental Health Survey Consortium, 2004. Prevalence, severity, and unmet need for treatment of mental disorders in the World Health Organization world mental health surveys. *JAMA* 291, 2581–2590.
- Williams, C.L., Barnett, A.M., Meck, W.H., 1990. Organizational effects of early gonadal secretions on sexual differentiation in spatial memory. *Behav. Neurosci.* 104 (1), 84–97.
- Zimmerman, J.M., Rabinak, C.A., McLachlan, I.G., Maren, S., 2007. The central nucleus of the amygdala is essential for acquiring and expressing conditional fear after overtraining. *Learn. Mem.* 14 (9), 634–644.