

Nesse experimento testamos se o contexto e um sinal explícito compartilham as mesmas vias neurais do NMR, utilizando desta feita como estímulo explícito condicionado um som ou uma luz.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

---

### **1. Animais, cirurgia, microinjeção de drogas no NMR, histologia**

Como descrito anteriormente no Experimento I.

### **2. Equipamentos**

Para o grupo com associação som/choque nas patas, o EC foi um som de 1000 Hz (85 dB) produzido por um gerador de som (GW, Model GAG-808G - USA) e apresentado a partir de um alto-falante instalado na parede de fundo da caixa *A* (mesma utilizada no experimento I). Para o grupo com associação luz/choque nas patas o EC foi uma luz emitida por uma lâmpada de 15 W instalada no teto da caixa *A*. Em ambas as associações, o EI foi o choque nas patas apresentado sempre no final da apresentação de cada EC. A apresentação dos estímulos (condicionado e incondicionado) foi controlada por um microprocessador e uma interface para coleta de dados (Insight - Brasil).

### **2. Procedimento Experimental**

Os animais foram microinjetados com NMDA ou salina, ou com 8-OH-DPAT ou salina, 48 h ou 15 min, respectivamente, antes da sessão treino. Esses animais foram submetidos à sessão treino que consistia de 10 pareamentos entre choques nas patas com o som ou a luz. O EI (choque) era apresentado durante o último segundo dos 20 s

do EC, com intervalo variável entre 10 e 50 s. No dia seguinte (sessão teste), o estímulo condicionado era apresentado como na sessão treino para os animais testados no mesmo contexto, enquanto que nenhum estímulo (EC ou EI) era apresentado para os animais testados em contexto diferente.

Os comportamentos de congelamento, levantamento, eliminação de bolos fecais e micção dos animais foram registrados, como no experimento I.

### **3. Análise dos dados**

Para os animais testados no mesmo contexto ou em contexto diferente, os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM e analisados através de uma análise de variância (ANOVA) de duas vias (condição x contexto), como no Experimento I. O fator condição se refere aos grupos microinjetados com salina, NMDA ou 8-OH-DPAT, e o fator 2 ao mesmo contexto e contexto diferente. Em caso de significância estatística, foi aplicado o teste de Newman-Keuls. Um valor de p igual ou inferior a 0,05 foi considerado significativo.

**RESULTADOS**

---

Nos experimentos de condicionamento utilizando a luz como EC, o tempo total de congelamento, o número de levantamentos e as respostas autonômicas (bolos fecais e micção), registrados na sessão teste, foram avaliados por uma ANOVA de duas vias.

A Figura 9 A ilustra a média do tempo total de congelamento apresentada por animais que receberam microinjeção de NMDA ou 8-OH-DPAT no NMR, e testados um dia depois do treino no mesmo contexto + luz ou em contexto diferente sem luz. Análise estatística revelou um aumento significativo no tempo total de congelamento dos animais microinjetados com salina em comparação com os animais microinjetados com NMDA ou 8-OH-DPAT no NMR ( $F_{2,58}=15,26$ ,  $p<0,001$ ). Houve um efeito significativo no fator contexto ( $F_{1,58}=24,59$ ,  $p<0,001$ ), indicando maior tempo de congelamento dos animais no mesmo contexto + luz quando comparado aos testados no contexto diferente sem luz. A análise revelou uma interação significativa entre tratamento e contexto ( $F_{2,58}=14,80$ ,  $p<0,001$ ), indicando que os efeitos dos tratamentos foram dependentes do tipo de contexto a que os animais foram submetidos. Análise *post-hoc* revelou uma diferença significativa no tempo total de congelamento entre os grupos controle e microinjetados com NMDA ou 8-OH-DPAT testados no mesmo contexto + luz ( $p<0,001$  para NMDA e 8-OH-DPAT).

Análise da atividade locomotora vertical revelou que houve um efeito significativo das manipulações do NMR para contexto ( $F_{1,58}=23,53$ ,  $p<0,001$ ), indicando uma diminuição do número de levantamentos apresentados por animais testados no mesmo contexto + luz em relação aos animais testados em um contexto diferente sem luz. Não houve diferença significativa nessa resposta em relação à

condição ( $F_{1,58}=0,12$ ,  $p>0,05$ ). Esses dados estão representados na Figura 9 B.

O número de bolos fecais e micção foram registrados por 5 minutos durante a sessão teste, assim como as respostas comportamentais descritas anteriormente. ANOVA de duas vias não revelou efeito significativo na condição ( $F_{1,58}=0,26$ ,  $p>0,05$  para bolos fecais;  $F_{1,58}=1,42$ ,  $p>0,05$  para micção) ou contexto ( $F_{1,58}=0,41$ ,  $p>0,05$  para bolos fecais;  $F_{1,58}=1,17$ ,  $p>0,05$  para micção). Esses efeitos estão ilustrados na Figura 9 (C e D).

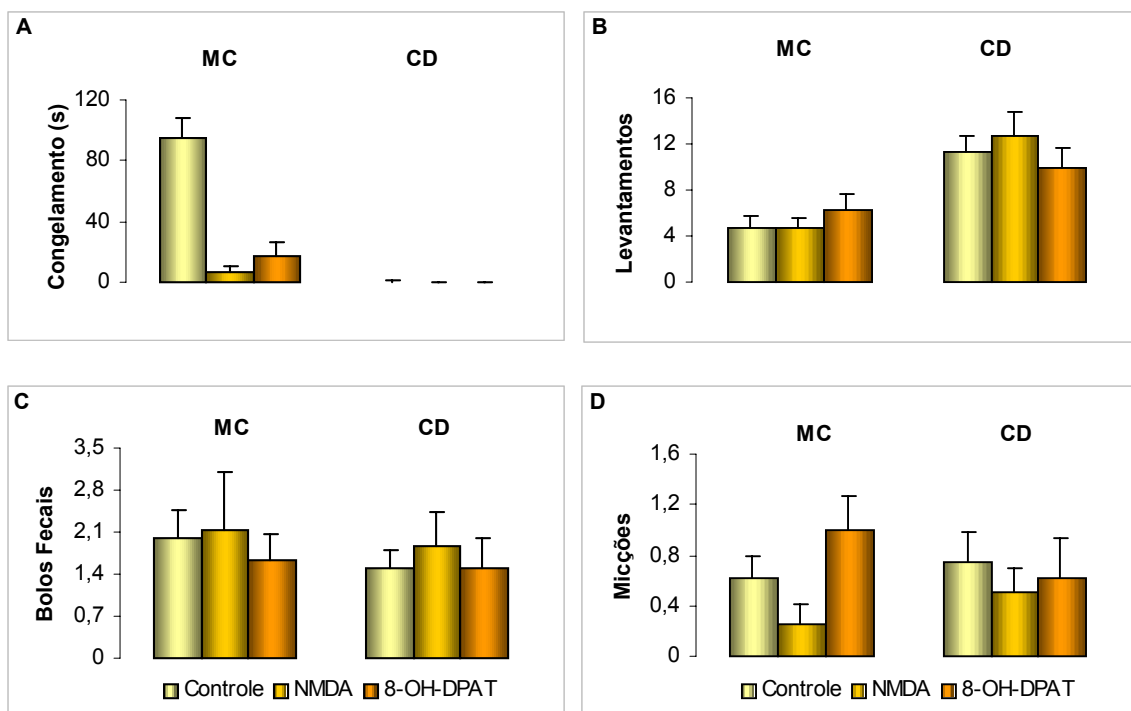
Nos experimentos de condicionamento utilizando o som como EC a ANOVA de duas vias revelou na sessão teste uma diferença significativa na resposta de congelamento no fator contexto + som ( $F_{1,58}=83,85$ ,  $p<0,001$ ), indicando um aumento significativo no tempo total de congelamento apresentado por animais testados no mesmo contexto + som quando comparado com aqueles testados em um contexto diferente sem a apresentação do EC. Essa análise não revelou efeito significativo para condição ( $F_{2,58}=0,02$ ,  $p>0,05$ ). A ausência de efeitos com microinjeção de NMDA ou 8-OH-DPAT no NMR sobre a resposta de congelamento estão representados na Figura 10 A.

Análise do número de levantamentos revelou uma diferença significativa em relação a contexto + som ( $F_{1,58}=50,83$ ,  $p<0,001$ ), indicando uma menor atividade locomotora vertical apresentada pelos animais testados no mesmo contexto + som quando comparado com contexto diferente sem som. Em relação à condição, não houve diferença significativa entre os animais microinjetados com salina x microinjetados com NMDA ou 8-OH-DPAT ( $F_{2,58}=0,88$ ,  $p>0,05$ ). Esses dados estão ilustrados na Figura 10 B.

Em relação às respostas autonômicas, a análise não revelou diferença significativa no número de bolos fecais para contexto ( $F_{1,58}=2,82$ ,  $p>0,05$ ) e tratamento

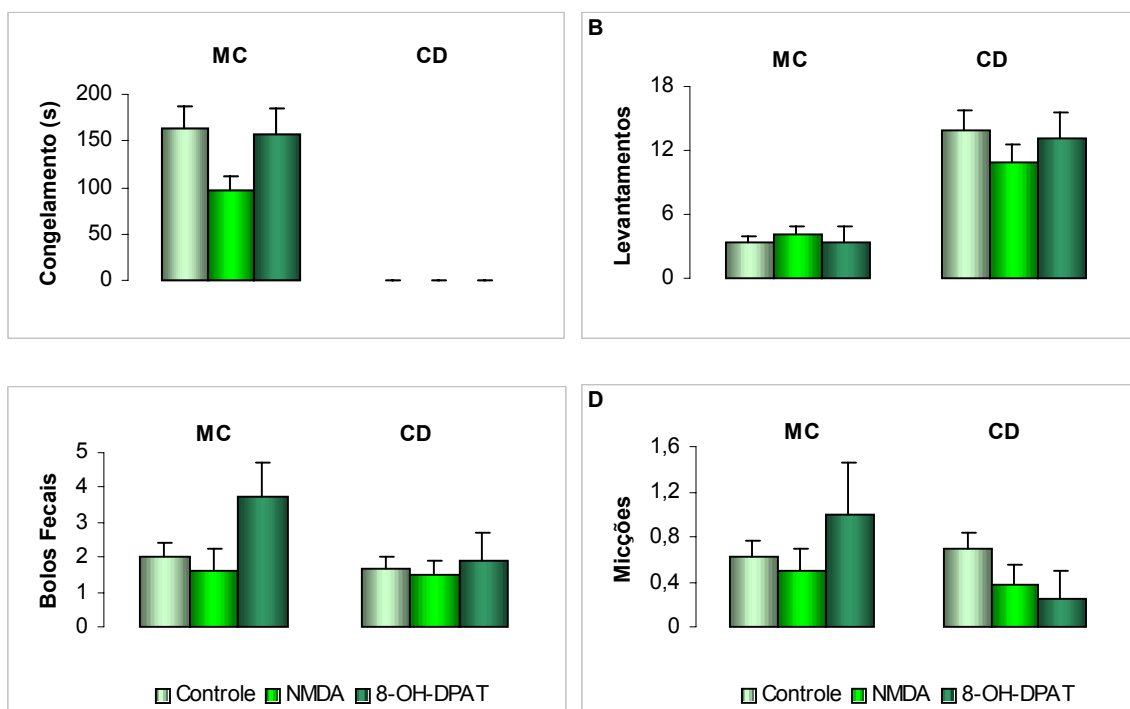
( $F_{1,58}=2,0$ ,  $p>0,05$ ). Resultados similares foram observados quanto ao número de micções, tanto para contexto ( $F_{1,58}=2,24$ ,  $p>0,05$ ), quanto para condição ( $F_{1,58}=0,21$ ,  $p>0,05$ ). Esses resultados estão ilustrados na figura 10 (C e D).

**LUZ + CONTEXTO**



**Figura 9:** Efeitos da microinjeção de salina (controle), NMDA ou 8-OH-DPAT no NMR no tempo total de congelamento (A), número de levantamentos (B), bolos fecais (C) e micção (D) na resposta de ratos testados no mesmo contexto (MC) ou em um contexto diferente (CD) do qual foram submetidos à associação luz/choque nas patas 24 h antes. Como os grupos controle para NMDA e 8-OH-DPAT não foram estatisticamente diferentes, foram representados em um mesmo grupo (n=16). N=8 tanto para o grupo microinjetado com NMDA, quanto para 8-OH-DPAT. As colunas representam as médias e as barras o EPM.

SOM + CONTEXTO



**Figura 10:** Efeitos da microinjeção de salina (controle), NMDA ou 8-OH-DPAT no NMR no tempo total de congelamento (A), número de levantamentos (B), bolos fecais (C) e micção (D) na resposta de ratos testados no mesmo contexto (MC) ou em um contexto diferente (CD) do qual foram submetidos à associação som/choque nas patas 24 h antes. Como os grupos controle para NMDA e 8-OH-DPAT não foram estatisticamente diferentes, foram representados em um mesmo grupo (n=16). N=8 tanto para o grupo microinjetado com NMDA, quanto para 8-OH-DPAT. As colunas representam as médias e as barras o EPM.

Os testes utilizados até aqui não nos permitem distinguir se os efeitos da microinjeção de NMDA e 8-OH-DPAT no NMR se deram sobre as respostas causadas pelo contexto, luz ou som, ou ainda à associação de estímulos contextuais e explícitos. Em razão disso, conduzimos testes adicionais para verificar os efeitos dessas manipulações sobre as respostas condicionadas de medo, causadas por esses estímulos condicionados isolados, sem a interferência do contexto.

Animais, microinjetados com 8-OH-DPAT ou salina 15 min antes do treino, foram submetidos ao condicionamento com o pareamento do EC com o EI, como descrito anteriormente, porém com as seguintes alterações introduzidas para melhorar o condicionamento: a) 2 dias de treino e 15 apresentações do EC + EI em cada dia; b) no dia seguinte à última sessão de condicionamento os animais foram submetidos à sessão teste em uma caixa contexto diferente (*B*), sem aplicação dos choques nas patas; c) foram utilizados dois grupos para cada EC: EC+ (com luz ou som) e EC- (sem luz ou som).

Os dados foram apresentados como média  $\pm$  EPM e analisados através de uma ANOVA de duas vias (tratamento x condicionamento), onde o fator 1 se refere aos grupos microinjetados com 8-OH-DPAT ou salina, e o fator 2 ao condicionamento com a presença do EC ou com a ausência do mesmo durante o teste. Em caso de significância estatística, foi aplicado o teste de Newman-Keuls.

Para o grupo de animais testados após o pareamento luz/choque, a ANOVA de duas vias revelou uma diferença significativa na resposta de congelamento no fator tratamento ( $F_{1,28}=18,31$ ,  $p<0,001$ ), indicando um tempo maior nessa resposta apresentada por animais controle, microinjetados com salina e testados com EC+ quando comparado com o grupo microinjetado com 8-OH-DPAT. Também houve uma diferença significativa em relação ao condicionamento na presença ou na ausência do



EC ( $F_{1,28}=18,91$ ,  $p<0,001$ ), indicando maior resposta de congelamento nos animais para EC+ que nos EC-. Houve uma interação significativa entre tratamento e condicionamento ( $F_{1,28}=18,30$ ,  $p<0,001$ ), indicando que o efeito do tratamento foi dependente da presença do EC durante a sessão teste. A Figura 11 A ilustra esses efeitos.

Análise do número de levantamentos revelou uma diferença significativa no fator condicionamento ( $F_{1,28}=9,15$ ,  $p<0,001$ ), indicando uma alteração na atividade locomotora vertical apresentada pelos animais, que foi dependente do EC- ou EC +. Não houve diferença significativa nessa resposta no fator tratamento ( $F_{1,28}=3,68$ ,  $p>0,05$ ). Esses dados estão representados na Figura 11 B.

Em relação às respostas autonômicas, a análise não revelou diferença significativa no número de bolos fecais no fator tratamento ( $F_{1,28}=1,89$ ,  $p>0,05$ ) e condicionamento ( $F_{1,28}=4,08$ ,  $p>0,05$ ), enquanto que efeitos significativos foram obtidos no número de micção tanto para tratamento ( $F_{1,28}=7,70$ ,  $p<0,001$ ) quanto para condicionamento ( $F_{1,28}=10,07$ ,  $p<0,001$ ), indicando uma diminuição significativa dessa resposta pelos animais tratados com 8-OH-DPAT em relação ao grupo controle. Esses resultados estão ilustrados na Figura 11 C e D.

Para o grupo de animais testados após o pareamento som/choque, a ANOVA de duas vias revelou uma diferença significativa na resposta de congelamento no fator condicionamento ( $F_{1,28}=195,43$ ,  $p<0,001$ ), indicando que essa resposta foi dependente da presença do EC durante a sessão teste. Não houve diferença significativa nessa resposta em relação ao tratamento ( $F_{1,28}=0,13$ ,  $p>0,05$ ). A Figura 12 A ilustra esses efeitos.

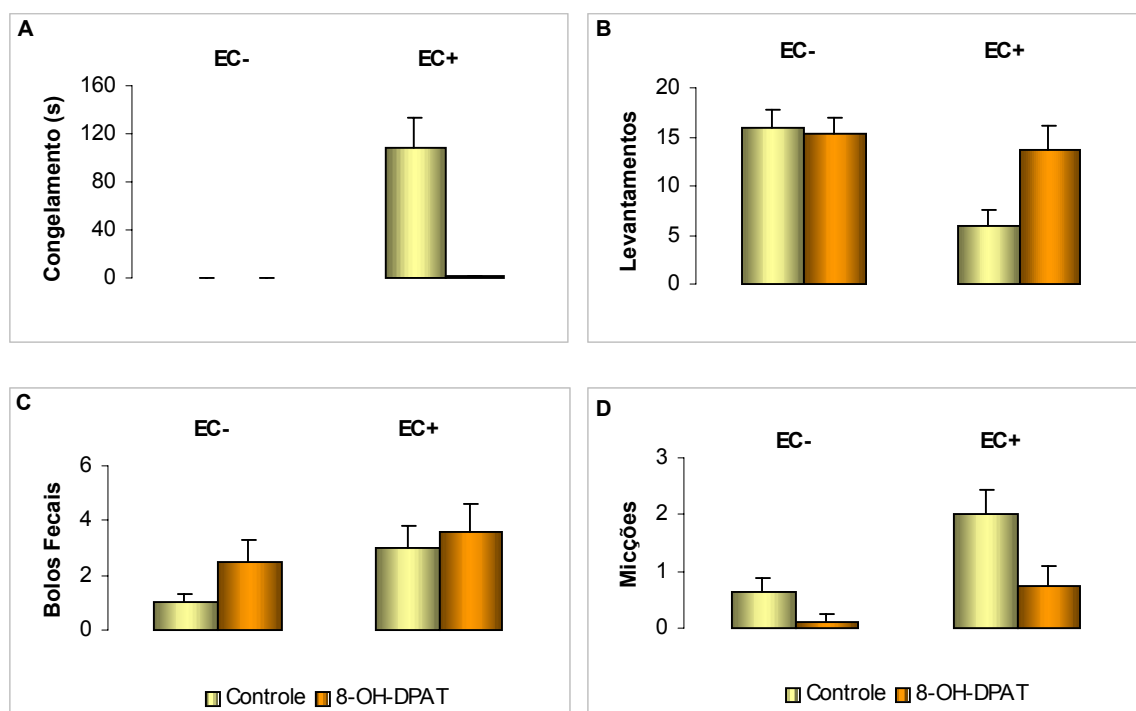
A microinjeção de NMDA ou 8-OH-DPAT no NMR não alterou o número de levantamentos no fator condicionamento ( $F_{1,28}=1,06$ ,  $p>0,05$ ) e no fator tratamento

( $F_{1,28}=1,06$ ,  $p>0,05$ ). Esses dados estão representados na Figura 12 B.

Em relação às respostas autonômicas, a análise revelou diferença significativa no número de bolos fecais no fator tratamento ( $F_{1,28}=11,26$ ,  $p<0,001$ ) e não no fator condicionamento ( $F_{1,28}=1,95$ ,  $p>0,05$ ). Já, com relação ao número de micções a ANOVA não revelou diferença significativa em relação ao condicionamento ( $F_{1,28}=0,26$ ,  $p>0,05$ ), bem como em relação ao tratamento ( $F_{1,28}=0,26$ ,  $p>0,05$ ). O efeito da inativação do NMR sobre as respostas autonômicas está ilustrado na Figura 12 (C e D).

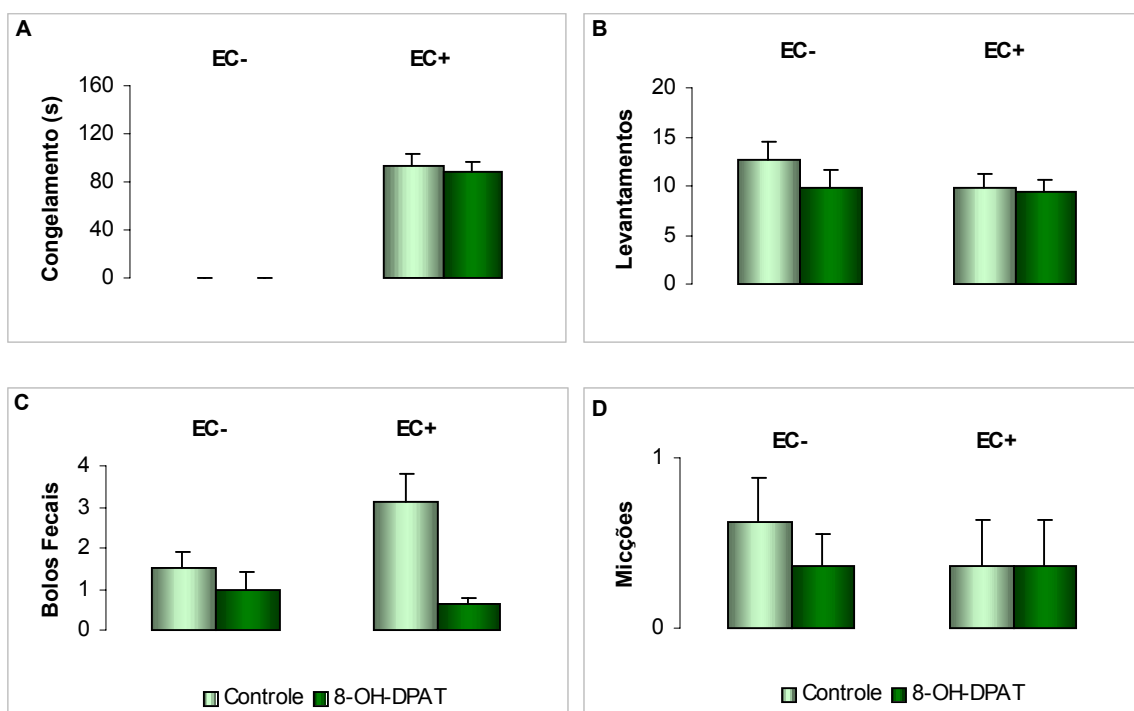
Os presentes resultados mostram que o NMR não é essencial na memória do medo baseado na associação som-choque. Esses dados indicam que essa estrutura é importante para a aquisição do medo condicionado contextual mas não em toda memória associativa de medo. Similarmente, resultados negativos também foram obtidos em estudos que utilizam o som como EC em animais com lesão do hipocampo (Kim & Fanselow, 1992; Philips & LeDoux, 1992).

LUZ - EC



**Figura 11:** Efeitos da microinjeção de 8-OH-DPAT no NMR no tempo total de congelamento (A), número de levantamentos (B), bolos fecais (C) e micção (D) na resposta de animais testados na presença do estímulo condicionado (EC+) ou na ausência deste (EC-) depois de terem sido submetidos à associação luz/choque nas patas. N=8 para todos os grupos. As colunas representam as médias e as barras o EPM.

SOM - EC



**Figura 12:** Efeitos da microinjeção de 8-OH-DPAT no NMR no tempo total de congelamento (A), número de levantamentos (B), bolos fecais (C) e micção (D) na resposta de animais testados na presença do estímulo condicionado (EC+) ou na ausência deste (EC-) depois de terem sido submetidos à associação som/choque nas patas. N=8 para todos os grupos. As colunas representam as médias e as barras o EPM.