

## ANEXO I

TEMA:	AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL EM ROEDORES ATRAVÉS DE MODELOS COGNITIVOS, ANSIEDADE E DEPRESSÃO
Nº DE VAGAS:	5
PERÍODO:	26, 27 E 28 DE SETEMBRO DE 2018
DIAS DA SEMANA:	QUARTA-FEIRA, QUINTA-FEIRA E SEXTA-FEIRA
HORÁRIO:	08:00 ÀS 12:00 E 13:30 ÀS 17:30
LOCAL DO CURSO:	LABORATÓRIO DE FARMACOLOGIA DA INFLAMAÇÃO E COMPORTAMENTO (LAFICO)
DATA:	26/09/18 À 28/09/2018
MINISTRANTE:	CYNTHIA CRISTINA SOUSA DE M. DA SILVEIRA, BRUNO GONÇALVES PINHEIRO E SABRINA DE CARVALHO
JUSTIFICATIVA:	Apresentar para a comunidade acadêmica da pós-graduação do programa de neurociências e biologia celular as principais técnicas comportamentais utilizadas em modelos de depressão

### EMENTA

Fornecer as bases neurobiológicas e farmacológicas que norteiam os modelos cognitivos, ansiedade e depressão em roedores.

### OBJETIVOS

Propiciar aos estudantes a aquisição de conhecimentos em atividades de pesquisa envolvendo modelos pré-clínicos de depressão e também de características comportamentais.

### CRONOGRAMA

DIA	HORA	TURMA	ATIVIDADES
QUARTA-FEIRA	08:00 ÀS 12:00	MANHÃ:	CURSO TEÓRICO: ministrante Cynthia Cristina S.M. Silveira
QUARTA-FEIRA	13:30 ÀS 17:30	TARDE	CURSO PRÁTICO: ministrante Cynthia Cristina S.M. Silveira
QUINTA-FEIRA	08:00 ÀS 12:00	MANHÃ:	CURSO TEÓRICO: ministrante Bruno Gonçalves Pinheiro
QUINTA-FEIRA	13:30 ÀS 17:30	TARDE	CURSO PRÁTICO: ministrante Bruno Gonçalves Pinheiro
SEXTA-FEIRA	08:00 ÀS 12:00	MANHÃ	CURSO TEÓRICO: ministrante SABRINA DE CARVALHO
SEXTA-FEIRA	13:30 ÀS 17:30	TARDE	CURSO PRÁTICO: SABRINA DE CARVALHO
		CARGA HORARIA TOTAL:	24H

## RECURSOS

No curso serão realizadas aulas teóricas que necessitaram o uso de artigos sobre os modelos do tipo mnemônico (Reconhecimento de objeto, esQUIVA inibitória e Water maze) depressão (nado forçado e teste splash) e respostas comportamentais do tipo ansiedade (Campo aberto, labirinto em cruz elevado e caixa claro-escuro), bem como recursos visuais como data-show e vídeos demonstrando o comportamento animal para o melhor entendimento dos parâmetros a serem utilizados para tais modelos. Além disso, para as aulas práticas serão utilizados uma cuba de vidro com água e acoplado a células fotoelétricas (teste do nado forçado, software de análise comportamental. Além disso serão utilizados recipientes para o esguicho de solução de sacarose a 10% para o teste splash, ademais aparatos comportamentais do campo aberto, labirinto e caixa claro-escuro e seis ratos *wistar* adultos na faixa 60 dias de vida.

## PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

**TAREFA DO RECONHECIMENTO DE OBJETO:** Este teste será consistirá em uma arena de madeira (100 x 100 x 40 cm), pintada com material não permeável na cor preta, este teste será analisado através do softawe Any-maze™ versão 4.99 (Stoelting Co., USA). O teste de reconhecimento de objeto baseia-se no princípio de que, em um ambiente familiar, os roedores de laboratório mostram uma atração instintiva para a novidade, ou preferência por um novo objeto, não familiar (HUGHES, 2007). Esta preferência será utilizada como um indicativo de memória em relação ao objeto familiar. O procedimento realizado será segundo Pires e colaboradores (2009) o qual consistirá em 3 fases: i) uma fase de habituação; ii) uma fase de treino; iii) e uma fase de teste. A fase de habituação será considerada o momento em que o animal explora livremente o aparato no teste de campo aberto, sem objetos, por 5 minutos. As fases de treino e de teste durarão 3 minutos cada e terão intervalos de 30 minutos entre elas a fim de avaliar a memória de curta duração. Após 30 minutos da fase de habituação, previamente à fase de treino foram fixados dois objetos idênticos em formato de cubo (C1 e C2) em cantos opostos da arena, a 10cm distantes das paredes e aproximadamente 70 cm afastados um do outro.

**TESTE DA ESQUIVA INIBITÓRIA DO TIPO “STEP DOWN”:** Este teste baseia-se num modelo de memória, que utiliza estímulo aversivo como fator para a obtenção da resposta comportamental (IZQUIERDO; MEDINA, 1997). O teste será realizado em uma caixa de alumínio (50 x 50 x 35 cm), com o assoalho constituído 15 barras de cobre paralelas, distribuídas com uma distância de 1 cm entre si, conectadas a um estimulador elétrico. Em posição lateral ao assoalho de barras encontra-se uma plataforma que não é conectada ao estimulador elétrico. O teste consistirá em uma sessão de habituação de 180 segundos, no qual será permitido a exploração interna no aparato. Na sessão de treino, os animais serão reexpostos a plataforma segura com a face voltada de forma oposta ao observador e imediatamente após o animal descer da plataforma e colocar as quatro patas sobre as grades, será aplicado um choque elétrico de 0,4 mA durante 1 segundo (estímulo aversivo). Cada animal será re-exposto mais duas vezes 1h 30 min após o treino para verificar aquisição da memória de curta duração e 24h após o treino para avaliação de memória de longa duração, realizando o mesmo procedimento, mas omitindo-se o choque, sendo registrada a latência para a descida da plataforma.

**TESTE DO LABIRINTO AQUÁTICO DE MORIS:** O teste consistirá em uma sessão de habituação de 180 segundos, no qual será permitido a exploração interna no aparato.

Na sessão de treino, os animais serão reexpostos a plataforma segura com a face voltada de forma oposta ao observador e imediatamente após o animal descer da plataforma e colocar as quatro patas sobre as grades, será aplicado um choque elétrico de 0,4 mA durante 1 segundo (estímulo aversivo). Cada animal será re-exposto mais duas vezes 1h 30 min após o treino para verificar aquisição da memória de curta duração e 24h após o treino para avaliação de memória de longa duração, realizando o mesmo procedimento, mas omitindo-se o choque, sendo registrada a latência para a descida da plataforma.

**TESTE DO NADO FORÇADO:** Os animais serão submetidos ao teste de maneira individual, assim sendo colocados no cilindro de vidro (50 cm de altura com 30 cm de diâmetro), com uma coluna de água de 40 cm a uma temperatura de  $23 \pm 1^\circ\text{C}$  e ficaram no aparato por 5 minutos, no qual os 2 primeiros minutos foram para reconhecimento do ambiente como aversivo, sendo contabilizados o tempo de imobilidade, tempo de nado, números de escaladas nos 3 minutos finais do teste. Os animais serão retirados do equipamento e secos com auxílios de flanelas e colocados na gaiola com palha seca.

**TESTE SPLASH:** O teste consiste em esguichar solução de sacarose a 10% na pelagem que reveste a região dorsal do animal, que foram colocados em caixas de acrílico (9x7x11cm) individualmente. Devido à sua viscosidade, a solução de sacarose suja a pele do rato, e este inicia o comportamento de limpeza. Após a aplicação da solução de sacarose, o tempo de latência para autolimpeza e o tempo da autolimpeza serão registrados manualmente por um período de 5 minutos, como um índice de autocuidado e comportamento motivacional. Após a sessão de cada animal, as caixas são limpas com uma solução de etanol à 10% para eliminar os vestígios de outro animal.

**CAMPO ABERTO:** Neste teste, será utilizada uma arena semelhante ao aparato conhecido como modelo do campo aberto, proposto para avaliar resposta de ansiedade em roedores, uma vez que em um ambiente não habitado, com abertura superior iluminada e fechado lateralmente, induz ao animal o instinto exploratório, traduzido como locomoção, levantamento e farejamento, ou pode ser interpretado como aversivo, por meio de micções e defecações.

Para este estudo, será utilizada uma arena em madeira cujo piso (100 x 100 cm) e paredes (40 cm de altura) possuem a cor preta cobertos com Fórmica impermeável. Inicialmente os animais serão colocados individualmente no centro do campo aberto sendo permitido o livre deslocamento dentro do aparato por 5 minutos, seus movimentos ao longo da sessão serão registrados através de filmadora posicionada acima da arena. Será mensurado o percentual de quadrantes centrais e o tempo no quadrante central. A percentagem do número de quadrantes centrais percorridos será calculada utilizando a seguinte fórmula: (PANDOLFO et al. 2007)  $\text{NQC} / (\text{NQC} + \text{NQP}) \times 100$ , onde NQC: número de quadrantes centrais e NQP: número de quadrantes periféricos, respectivamente.

**TESTE DA CAIXA CLARO/ESCURO:** Desenvolvido em 1980 pelos pesquisadores Crawley e Goodwin, o modelo da transição claro-escuro constitui-se de uma caixa contendo dois compartimentos, um escuro e um iluminado, interligados por uma abertura divisória. O paradigma claro-escuro é baseado em uma situação de conflito, sem que haja a presença de um estímulo punitivo. O conflito se dá entre a tendência natural dos animais a explorar e a tendência inicial de se esquivar do que não é familiar (neofobia). O comportamento aversivo dos animais é produzido neste modelo pelos estímulos estressores moderados “ambiente novo” e “iluminação”.

A caixa claro/escuro é composta por uma arena em acrílico (46 X 27 X 30cm de altura) dividida em dois compartimentos, o menor (15 X 27 X 30cm) é preto e o maior compartimento (31 X 27 X 30cm) é branco, este será iluminado por uma lâmpada fluorescente (fria) de 20W. Os dois compartimentos serão separados por uma placa de acrílico preta de 27 X 30cm (base x altura) com abertura de 7,5 x 7,5cm localizada no centro da divisão, ao nível do chão (Figura 3).

O procedimento, geralmente empregado no teste da transição claro-escuro, consiste em colocar o animal, individualmente por 5 minutos, no lado claro do modelo, intensamente iluminado, com a cabeça voltada para a porta divisória. Após a primeira entrada do animal no compartimento escuro, serão registrados os seguintes parâmetros: tempo gasto no compartimento claro e o número de transições entre os dois compartimentos. A diminuição desses parâmetros representa comportamento do tipo ansiogênico.

**TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (LCE):** O LCE é um dos modelos validados para verificar comportamento do tipo ansiogênico em ratos. É baseado em respostas incondicionadas aos ambientes potencialmente perigosos, tais como a aversão natural de roedores aos espaços abertos. Os índices principais de ansiedade no teste compreendem medidas espaço-temporais de fuga dos braços abertos.

O LCE é um equipamento em madeira, na forma de cruz, elevado 50 cm do chão, com dois braços fechados (50 x 10 x 40 cm) e dois abertos (50 x 10 x 1 cm), opostos entre si. Nos braços abertos há uma proteção de 1 cm de altura circundando-os à fim de impedir a queda dos animais do aparato.

Cada animal será posicionado no centro do LCE com a face voltada para um dos braços fechados, no qual será permitida exploração espontânea do animal por 5 minutos. Um observador, que não teve conhecimento prévio do grupo a que pertencia cada animal, registrará o número de entradas nos braços abertos (EBA) e fechados (EBF), assim como, o tempo de permanência nos braços abertos. O percentual de EBA (%EBA) e de TBA (%TBA) serão calculadas de acordo com as fórmulas:  $(EBA / EBA + EBF) \times 100$ ;  $(TBA / TBA + TBF) \times 100$  (PELLOW; FILE, 1986). Será possível observar resposta do tipo ansiedade através da diminuição na entrada e/ou tempo de permanência nos braços abertos.

#### **AVALIAÇÃO:**

Os alunos serão avaliados pela entrega de relatórios das atividades práticas que serão realizadas.



### ANEXO III

#### RELAÇÃO DE ALUNOS INSCRITOS

ALUNOS DE MESTRADO DO PNBC		
Nº	NOME	MATRÍCULA