

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR,
EMBRIOLOGIA E GENÉTICA
LABORATÓRIO DE GENÉTICA DO COMPORTAMENTO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

Gabriela Ferreira de Medeiros

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DA
LINHAGEM CONGÊNICA DE RATOS SHR.LEW-*Anxrr16*
COMO UM NOVO MODELO GENÉTICO PARA O ESTUDO DA
ANSIEDADE**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Farmacologia.
Orientador: Prof. Dr. André de Avila Ramos

Florianópolis
2012

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

M488c Medeiros, Gabriela Ferreira de

Caracterização fenotípica e molecular da linhagem congênica de ratos SHR.LEW-Anxrr16 como um novo modelo genético para o estudo da ansiedade [dissertação] / Gabriela Ferreira de Medeiros ; orientador, André de Ávila Ramos. - Florianópolis, SC , 2012.

130 p.: il., grafs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Ansiedade - Aspectos genéticos. 3. Genética do comportamento. 4. Linhagem - (Genética). I. Ramos, André de Ávila. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

CDU 615

**Caracterização fenotípica e molecular da
linhagem congênica de ratos SHR.LEW-Anxrr16
como um novo modelo genético para o estudo da
ansiedade**

GABRIELA FERREIRA DE MEDEIROS

**Dissertação julgada e aprovada em sua forma
final pelos membros da Banca Examinadora,
composta pelos Professores Doutores:**



**André Avila Ramos
Presidente (BEG/UFSC)**



**Geison de S. Izídio
(UFRN)**



**Hélio Zangrossi Júnior
(USP-RP)**



**Leandro Bertoglio
(FMC/UFSC)**



**Profa. Dra. Thereza Christina Monteiro de Lima
Coordenadora do Programa de
Pós-Graduação em Farmacologia/UFSC**

Florianópolis, 16 de Março de 2012

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, ao Prof. Dr. André de Avila Ramos, por ter me acolhido no Laboratório de Genética do Comportamento desde a minha iniciação científica e me proporcionado a oportunidade de continuar meu trabalho nesse laboratório durante o Mestrado. Obrigada por acreditar e confiar a mim um projeto que exigia tanta dedicação e responsabilidade, e pela excelente orientação ao longo desses quatro anos de trabalho.

À Dra. Elayne Pereira, que foi pioneira no desafio da construção da linhagem congênica *SHR.LEW-Anxrr16*, fundamental para esta dissertação. Graças à sua paciência e dedicação, pude aprender as bases de cada técnica e conceito envolvidos neste trabalho, e então seguir com meus próprios pés no Mestrado.

À Natalli Granzotto, que me auxiliou na maioria das atividades envolvidas nesta dissertação. Não tenho palavras para agradecer todo o compromisso, dedicação e parceria durante a realização desse trabalho. Agradeço também pelo apoio e pela amizade, e por todos os momentos de alegria compartilhados, dentro e fora do laboratório.

A todos os demais alunos que fazem ou que já fizeram parte da equipe do Laboratório de Genética do Comportamento, em especial à Fernanda Junkes (e as nossas quintas-feiras felizes!), Mayara Anselmi e Sarah Samuel. Também ao nosso dedicado bioterista, Junior Cardoso. Muito obrigada pela ajuda nos experimentos e nas atividades do laboratório em geral. Não tenho dúvida alguma de que a amizade de vocês contribuiu enormemente para que os trabalhos mais exaustivos se tornassem muito mais leves e prazerosos.

A toda equipe do Laboratório de Neurobiologia Comportamental, em especial ao Prof. Dr. Antônio de Pádua Carobrez e às doutorandas Juliana Cavalli e Juliana Kroon. Muito obrigada por serem tão solícitos e prestativos, e por toda a ajuda, sobretudo durante os experimentos do Condicionamento Olfatório do Medo.

Aos Profs. Drs. Geison de Souza Izídio, Hélio Zangrossi Júnior e Leandro José Bertoglio, pela participação na banca examinadora desta dissertação e pelas valiosas contribuições feitas à este trabalho.

A todos os colegas e professores do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e do Departamento de Biologia celular, Embriologia e Genética.

Aos meus pais, Eduardo Candemil de Medeiros e Vera Regina Ferreira de Medeiros, por todo o incentivo recebido durante a minha trajetória acadêmica. O apoio de vocês foi fundamental em cada etapa e aspecto deste trabalho, muito obrigada MESMO! Também ao meu irmão, Rodrigo Ferreira de Medeiros, pela implicância com as minhas ausências nas atividades familiares durante os dias de experimento e pela dispersão proporcionada durante o período de redação deste trabalho.

Ao meu namorado e melhor amigo, Willian Rosa Salmoria, por todo o apoio e compreensão, sobretudo nos meus momentos mais atribulados. Go reds!

À CAPES pelo suporte financeiro.

A todos que não estão aqui explicitados, mas que colaboraram de alguma forma para a execução deste trabalho.

“DON'T PANIC”.

(Douglas Adams, *The Hitchhiker's Guide to the Galaxy*, 1979)

RESUMO

Um cruzamento entre as linhagens de ratos *Lewis* (LEW) e *Spontaneously Hypertensive Rats* (SHR) levou à identificação de um QTL (*quantitative trait locus*) no cromossomo 4, chamado de *Anxrr16*, influenciando a locomoção no centro do teste do campo aberto (CA), um índice experimental de ansiedade. Foi observado que, apesar dos animais da linhagem LEW normalmente exibirem um comportamento mais “ansioso” do que os SHR, a presença de alelos da linhagem LEW em *Anxrr16* aumentava a locomoção no centro do CA de animais F2, ao contrário do esperado. Uma linhagem congênica (denominada SHR.LEW-*Anxrr16*, ou SLA16) foi então construída, através de cruzamentos entre as linhagens LEW (doadora) e SHR (receptora), para melhor investigar os efeitos desse *locus*. Através de testes comportamentais realizados durante a construção desta linhagem (PEREIRA, 2010), o efeito contra-intuitivo desse QTL foi confirmado, entretanto, os dados obtidos não foram conclusivos. O presente estudo teve como objetivos principais o refinamento e a caracterização genotípica e fenotípica da linhagem congênica SLA16, através da genotipagem de três gerações para 20 marcadores moleculares mapeados no cromossomo 4, bem como da avaliação destes animais em testes comportamentais relacionados à emocionalidade. Como uma possível hiperatividade motora foi observada no CA durante o desenvolvimento desta linhagem, e pelo fato da linhagem SHR ser um modelo animal do transtorno do déficit de atenção e hiperatividade (TDAH), a atividade locomotora dos animais congênicos também foi avaliada em ambientes familiares e não-familiares. Além disso, estes animais foram submetidos ao teste da mudança da configuração atencional (MCA) a fim de investigar possíveis efeitos de *Anxrr16* sobre a atenção e a flexibilidade comportamental, envolvidos no TDAH. O efeito de *Anxrr16* sobre a locomoção no centro do CA foi confirmado. Além disso, esse *locus* também influenciou medidas de emocionalidade da caixa branca e preta (CBP), do teste triplo (TT) e do labirinto em T elevado (LTE), sempre de maneira contra-intuitiva, de acordo com o estudo que identificou o QTL. Experimentos farmacológicos com uma droga ansiolítica (clordiazepóxido) e uma ansiogênica (pentilenotetrazol), apesar de inconclusivos, sugeriram que o QTL em questão está de fato relacionado à ansiedade. Em relação ao TDAH, diferenças na atividade locomotora foram encontradas, porém, estas desapareceram após um período de habituação, sugerindo que são dependentes do estado emocional do animal e, portanto, não refletem

uma hiperatividade espontânea. Efeitos desse *locus* sobre a atenção e a flexibilidade comportamental não foram detectados, confirmando a ausência de efeito de *Anxrr16* sobre fenótipos associados ao TDAH. Com base nestes resultados, conclui-se que o *locus Anxrr16*, aqui delimitado em uma região do cromossomo 4 de aproximadamente 86 milhões de pares de base, afeta fenótipos associados à ansiedade em ratos, bem como à atividade locomotora em ambientes novos e, portanto, a linhagem congênica SLA16 representa uma importante ferramenta para o melhor entendimento das vias moleculares envolvidas nos comportamentos relacionados à ansiedade.

Palavras-chave: Ansiedade. Emocionalidade. Genética do Comportamento. Linhagem Congênica. LEW. SHR. *Anxrr16*.

ABSTRACT

An intercross between the inbred rat strains Lewis (LEW) and Spontaneously Hypertensive Rats (SHR) led to the identification of a quantitative trait locus (QTL) on chromosome 4, named *Anxrr16*, influencing locomotion in the central area of the open field (OF) test, an experimental index of anxiety. It was noticed that, even though LEW rats usually display more anxiety-like behaviors than SHR, the presence of LEW alleles on *Anxrr16* increased the inner locomotion displayed by F2 animals, contrary to what would be expected. A congenic strain (named SHR.LEW-*Anxrr16*, or SLA16) was then developed, from a cross between the strains LEW (donor) and SHR (receptor), in order to further investigate the behavioral effects of this locus. Through the behavioral tests performed during the construction of this strain (PEREIRA, 2010), the counterintuitive effect of the *Anxrr16* QTL was confirmed, however, the obtained data were not conclusive. The present study's main goals were to refine and characterize genotypically and phenotypically the congenic strain SLA16, by genotyping three generations to 20 molecular markers mapped on chromosome 4, as well as evaluating these animals in emotionality-related behavioral tests. As a possible motor hyperactivity was observed in the OF during the construction of this strain, and for the fact that the strain SHR is an animal model for attention deficit and hyperactivity disorder (ADHD), the locomotor activity of the congenic animals was also evaluated, in familiar and unfamiliar environments. Furthermore, these animals were submitted to the attentional set-shifting (SS) test in order to investigate potential effects of *Anxrr16* on attention and behavioral flexibility, traits involved in ADHD. The effect of *Anxrr16* over OF inner locomotion was confirmed. Moreover, this locus has also influenced emotionality measures in the light/dark box (LDB), in the triple test (TT) and in the T-maze (TM), in the same counterintuitive manner found in the study that identified *Anxrr16* QTL. Pharmacological experiments using an anxiolytic (chlordiazepoxide) and a panicolytic (pentylentetrazol) drug, although inconclusive, have suggested that this QTL is indeed related to anxiety. Regarding the ADHD phenotypes, differences in locomotor activity were found, however, they have disappeared after a habituation period, suggesting that they depend on the animal's emotional state and, therefore, do not reflect a spontaneous hyperactivity. Effects of this locus over attention or behavioral flexibility were not observed, confirming the absence of *Anxrr16* influences on ADHD associated phenotypes. Based on these results, it is concluded that the *Anxrr16*

locus, herein delimited in a region of chromosome 4 of approximately 86 million base pairs, affects anxiety-related phenotypes on rats, as well as the locomotor activity in novel places and, for that, the congenic strain SLA16 represents an important tool towards a better understanding of the molecular pathways involved in anxiety-related behaviors.

Keywords: Anxiety. Emotionality. Behavioral Genetics. Congenic Strain. LEW. SHR. *Anxrr16*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática do genoma de uma linhagem congênica comparado ao das suas linhagens parentais.....	33
Figura 2 – Serie de cruzamentos envolvidos na construção da linhagem congênica SLA16.....	36
Figura 3 – Exemplo dos diferentes genótipos observados durante a genotipagem dos animais congênicos SLA16.....	48
Figura 4 – Aparato utilizado no teste do CA.....	50
Figura 5 – Aparato utilizado no teste da CBP.....	53
Figura 6 – Aparato utilizado no teste do LCE.....	54
Figura 7 – Aparato utilizado no TT.....	55
Figura 8 – Aparato utilizado no teste do LTE.....	57
Figura 9 – Representação das caixas de condicionamento e de teste utilizadas no COM.....	58
Figura 10 – Esquema das fases de aquisição e expressão do COM.....	60
Figura 11 – Aparato utilizado no teste da CAtiv.....	62
Figura 12 – Aparato utilizado no teste de MCA.....	63
Figura 13 – Esquema das fases que compõem o teste de MCA.....	66
Figura 14 – Representação esquemática da frequência alélica observada nos animais SLA16 das gerações N10F4, N10F5 e N10F6.....	71
Figura 15 – Comportamentos exibidos no CA padrão por machos e fêmeas das linhagens SLA16 e SHR.....	73

Figura 16 – Comportamentos exibidos no CA, sob alta ou baixa luminosidade, por machos das linhagens SLA16 e SHR.....	75
Figura 17 – Comportamentos exibidos no CA por fêmeas das linhagens SLA16 e SHR em diferentes fases do ciclo estral.....	77
Figura 18 – Comportamentos exibidos no CA por fêmeas (segunda leva experimental) das linhagens SLA16 e SHR em diferentes fases do ciclo estral.....	79
Figura 19 – Comportamentos exibidos no CA por machos das linhagens SLA16 e SHR tratados com CDZ.....	81
Figura 20 – Comportamentos exibidos no CA por machos das linhagens SLA16 e SHR tratados com PTZ.....	83
Figura 21 – Comportamentos exibidos na CBP padrão por machos e fêmeas das linhagens SLA16 e SHR.....	84
Figura 22 – Comportamentos exibidos na CBP por machos das linhagens SLA16 e SHR tratados com CDZ.....	85
Figura 23 – Comportamentos exibidos na CBP por machos das linhagens SLA16 e SHR tratados com PTZ.....	86
Figura 24 – Comportamentos exibidos no LCE por machos e fêmeas das linhagens SLA16 e SHR.....	88
Figura 25 – Comportamentos exibidos no TT por machos das linhagens SLA16 e SHR.....	89
Figura 26 – Comportamentos exibidos no LTE por machos das linhagens SLA16 e SHR.....	91
Figura 27 – Comportamentos exibidos no COM por machos das linhagens SLA16 e SHR.....	93
Figura 28 – Comportamentos exibidos na CAtiv não-familiar por machos e fêmeas das linhagens SLA16 e SHR.....	95

Figura 29 – Comportamentos exibidos na CAtiv familiar por machos das linhagens SLA16 e SHR..... 96

Figura 30 – Número de sessões necessárias para atingir o critério e número de erros cometidos no teste de MCA por machos das linhagens SLA16 e SHR..... 97

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Número de animais das linhagens SLA16 e SHR submetidos aos testes comportamentais a cada geração analisada....	42
Quadro 2 – Informações sobre os marcadores moleculares do tipo microsatélite utilizados na genotipagem dos animais SLA16.....	45
Quadro 3 – Tipos celulares característicos de cada fase do ciclo estral das ratas.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Porcentagem de alelos da linhagem receptora que são introgrididos na linhagem congênica a cada retrocruzamento.....	37
Tabela 2 - Número de animais das linhagens SLA16 e SHR utilizados durante o processo de caracterização genotípica e fenotípica da linhagem SLA16.....	41
Tabela 3 – Número de fêmeas das linhagens SLA16 e SHR encontradas em cada fase do ciclo estral, imediatamente após o teste do CA.....	76
Tabela 4 – Número de fêmeas das linhagens SLA16 e SHR (segunda leva experimental) encontradas em cada fase do ciclo estral, imediatamente após o teste do CA.....	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA – Análise de Variância
Anxrr16 – *Anxiety Related Response QTL 16* (QTL para resposta relacionada à ansiedade 16)
CA – Campo Aberto
CA_{ativ} – Caixa(s) de Atividade
CBP – Caixa Branca e Preta
CDZ – Clordiazepóxido
CEUA/UFSC – Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina
COM – Condicionamento Olfatório do Medo
DNA – *Deoxyribonucleic Acid* (Ácido Desoxirribonucleico)
dNTP – Desoxirribonucleotídeo Trifosfatado
EC1 – Estímulo Condicionado 1
EC2 – Estímulo Condicionado 2
EUA – Estados Unidos da América
iNP – *Inbred Alcohol-nonpreferring*
iP – *Inbred Alcohol-preferring*
IP – Intraperitonealmente
LCE – Labirinto em Cruz Elevado
LEW – *Lewis*
LGC – Laboratório de Genética do Comportamento
LTE – Labirinto em T Elevado
MCA – Mudança da Configuração Atencional
Mpb – Mega Pares de Base (Milhões de Pares de Base)
NCS-R – *National Comorbidity Survey Replication*
NP – *Alcohol-nonpreferring*
Npy – Gene que codifica o neuropeptídeo Y
Ofill1 – *Open Field Inner Locomotion 1* (Locomoção Central no Campo Aberto 1)
Ofill2 – *Open Field Inner Locomotion 2* (Locomoção Central no Campo Aberto 2)
P – *Alcohol-preferring*
PCR – *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)
Prok2 – Gene que codifica a procineticina 2
PTZ – Pentilenotetrazol
QTG – *Quantitative Trait Gene* (Gene para Característica Quantitativa)
QTL – *Quantitative Trait Locus* (*Locus* para Característica Quantitativa)
QTLs – *Quantitative Trait Loci* (*Loci* para Características Quantitativas)
RHA – *Roman High Avoidance*

RLA – *Roman Low Avoidance*

SC – Subcutâneo

SHR – *Spontaneously Hypertensive Rats*

SLA16 – SHR.LEW-*Anxrr16*

Sncα – Gene que codifica a alfa-sinucleína

SNP – *Single Nucleotide Polimorfism* (Polimorfismo de Nucleotídeo Único)

SNP – *Single Nucleotide Polimorfisms* (Polimorfismos de Nucleotídeo Único)

SP – Substância P

TDAH – Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade

TNF – Teste do Nado Forçado

Tacr1 – Gene que codifica o receptor NK₁ da substância P

TT – Teste Triplo

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE QUADROS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIACÕES

1	INTRODUÇÃO.....	25
1.1	A RELEVÂNCIA DO ESTUDO DOS TRANSTORNOS DE ANSIEDADE.....	25
1.2	USO DO RATO NA PESQUISA BIOMÉDICA.....	26
1.2.1	As Linhagens Lewis (LEW) e SHR como Modelo Genético de Ansiedade.....	27
1.3	ANÁLISE DE <i>LOCI</i> PARA CARACTERÍSTICAS QUANTITATIVAS (QTL).....	28
1.4	A LINHAGEM CONGÊNICA SHR.LEW- <i>Anxrr16</i>	32
1.5	JUSTIFICATIVA.....	38
1.6	OBJETIVOS.....	39
1.6.1	Objetivos Gerais.....	39
1.6.2	Objetivos Específicos.....	39
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
2.1	ANIMAIS.....	41
2.2	GENOTIPAGEM.....	44
2.3	TESTES COMPORTAMENTAIS.....	48
2.3.1	Drogas e Substâncias Utilizadas.....	48
2.3.2	Campo Aberto.....	49
2.3.3	Caixa Branca e Preta.....	52
2.3.4	Labirinto em Cruz Elevado.....	53
2.3.5	Teste Triplo.....	54
2.3.6	Labirinto em T Elevado.....	56
2.3.7	Condicionamento Olfatório do Medo.....	57
2.3.8	Caixas de Atividade.....	61
2.3.9	Mudança da Configuração Atencional (<i>Attentional set-shifting</i>).....	62
2.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	67
3	RESULTADOS.....	69
3.1	REFINAMENTO GENOTÍPICO.....	69
3.2	CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA.....	72
3.2.1	Fenótipos Relacionados à Ansiedade/Emocionalidade.....	72
3.2.2	Fenótipos Relacionados ao TDAH.....	94

4	DISCUSSÃO.....	99
5	CONCLUSÕES.....	115
	REFERÊNCIAS.....	117

1 INTRODUÇÃO

1.1 A RELEVÂNCIA DO ESTUDO DOS TRANSTORNOS DE ANSIEDADE

A ansiedade pode ser definida como um estado emocional desenvolvido em antecipação a uma ameaça ou perigo, a qual promove a vigília e facilita os comportamentos de esquiva, auxiliando, portanto, na adaptação do organismo ao seu meio (GROSS; HEN, 2004). A distinção entre dois tipos de ansiedade, traço e estado, já foi proposta, sendo que a primeira representaria um estado emocional constante, enquanto a segunda seria uma consequência pontual de um estímulo ansiogênico (LISTER, 1990). Entretanto, alguns autores sugerem que a ansiedade traço e a ansiedade estado consistem simplesmente em diferentes lados da mesma moeda, com a primeira sendo definida pela intensidade e frequência dos episódios de ansiedade estado (LAZARUS, 1991; RAMOS, 2008). Apesar de ser uma parte normal do repertório emocional humano, quando esses estados emocionais se tornam excessivos e inapropriados, eles podem comprometer seriamente a qualidade de vida, adquirindo um caráter patológico, e sendo então denominados transtornos de ansiedade (GROSS; HEN, 2004).

De acordo com dados obtidos no *National Comorbidity Survey Replication* (NCS-R), realizado nos Estados Unidos entre os anos de 2001 e 2003, os transtornos de ansiedade formam o grupo de transtornos psiquiátricos com maior prevalência na população Estadunidense (KESSLER et al., 2005). Os transtornos de ansiedade estão associados a um grande prejuízo na funcionalidade e na qualidade de vida (RAPAPORT et al., 2005), além de causarem um impacto econômico substancial e gerar inúmeros gastos para a sociedade, de forma direta ou indireta (OVERBEEK et al., 2001; SMOLLER; BLOCK; YOUNG, 2009). Eles também estão relacionados a uma série de comorbidades, como a enxaqueca (BASKIN; SMITHERMAN, 2009), doenças autoimunes da tireoide (CARTA et al., 2004) e, particularmente, à depressão (SOMERS et al., 2006; DE MOOIJ-VAN MALSEN; OLIVIER; KAS, 2008). A pesquisa acerca dos transtornos de ansiedade tem crescido dramaticamente nos últimos anos e, ao que tudo indica, tende a continuar crescendo, uma vez que, apesar dos diversos fármacos e terapias disponíveis se mostrarem eficazes em muitos pacientes, existe a constante necessidade de evolução nos tratamentos, especialmente no que se refere à presença de efeitos colaterais, e do desenvolvimento de

estratégias de prevenção (BOSCHEN, 2008; SMOLLER; BLOCK; YOUNG, 2009).

A agregação familiar dos transtornos de ansiedade tem sido repetidamente relatada, sendo o componente genético o principal responsável por essa agregação (HETTEMA; NEALE; KENDLER, 2001; HAMILTON, 2009; SMOLLER; BLOCK; YOUNG, 2009). Considerando o já mencionado impacto social destes transtornos, bem como a constatação do envolvimento de fatores genéticos, as pesquisas sobre as bases genéticas dos transtornos de ansiedade são de fundamental importância para um maior entendimento destas condições.

Nas últimas duas décadas, abordagens genético-moleculares têm sido crescentemente empregadas no estudo dos transtornos de ansiedade. Contudo, achar os genes responsáveis por características relacionadas a esses transtornos não é uma tarefa fácil, uma vez que elas são complexas e conhecidas por refletirem a influência de numerosos genes (poligênicas), cada um, normalmente, contribuindo apenas com um pequeno efeito. Estes pequenos efeitos podem ainda depender da interação com outros genes (epistasia) ou com o ambiente (SMOLLER; BLOCK; YOUNG, 2009).

1.2 O USO DO RATO NA PESQUISA BIOMÉDICA

O rato de laboratório (*Rattus norvegicus*) vem sendo utilizado na pesquisa biomédica há mais de 150 anos, tendo sido a primeira espécie de mamífero empregada nesse tipo de pesquisa. Diversas características contribuem para a sua ampla utilização, dentre as quais podemos citar o seu reduzido tamanho, a fácil manipulação e a sua rápida reprodução (JACOB, 1999; AITMAN et al., 2008). Entretanto, historicamente, o camundongo (*Mus musculus*) se tornou o modelo de escolha de muitos geneticistas, por motivos que incluem o seu menor tamanho em relação ao rato, as diversas cores de pelagem disponíveis, e a herança mendeliana de algumas características, além do recente advento dos camundongos *knockout* (JACOB, 1999).

Por outro lado, o uso de ratos na identificação de genes relacionados a doenças compartilhadas com os humanos é bastante vantajoso, uma vez que ele é um dos modelos animais mais estudados na fisiologia, na toxicologia, na neurobiologia e no desenvolvimento de fármacos. Quando genes e suas funções são identificados nos ratos, a elucidação dos mecanismos patofisiológicos envolvidos é normalmente mais simples, uma vez que diversos processos biológicos já foram extensivamente estudados neste modelo, o que acaba por facilitar a

identificação de homologies genéticas em humanos (JACOB, 1999; SMITS; CUPPEN, 2006).

Após o desenvolvimento da primeira linhagem isogênica (*inbred strain*, composta por indivíduos geneticamente idênticos entre si) de ratos, por King em 1909, mais de quinhentas linhagens isogênicas foram desenvolvidas e estudadas em relação a diversos fenótipos bioquímicos e fisiológicos, constituindo modelos genéticos de diferentes doenças (AITMAN et al., 2008), tais como encefalomielite autoimune (STEFFERL et al., 1999), diabetes (SHINOHARA et al., 2000), artrite (TRENTHAM; TOWNES; KANG, 1977) e doenças cardiovasculares (KODAVANTI et al., 2000). Dentre os modelos genéticos relacionados ao comportamento, podemos citar os *Spontaneously Hypertensive Rats* (SHR), utilizados no estudo do transtorno do déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) (SAGVOLDEN, 2000; HOWELLS; BINDEWALD; RUSSELL, 2009), e as linhagens *alcohol-preferring* (P) e *alcohol-nonpreferring* (NP), selecionadas para o consumo espontâneo de álcool (BICE et al., 1998).

Na impossibilidade de se obter medidas objetivas e diretas do estado emocional de um animal, já que esse é um conceito que envolve componentes subjetivos, os pesquisadores tendem a inferir o seu estado emocional a partir de manifestações que possam ser medidas, tais como suas respostas comportamentais e fisiológicas (RAMOS; MORMÈDE, 1998). Algumas manifestações do repertório comportamental do rato, avaliadas através de diferentes testes comportamentais, permitem estabelecer um paralelo, mesmo que limitado, com características da ansiedade não patológica em humanos, fazendo do rato um bom modelo para estudos comportamentais relacionados à ansiedade.

1.2.1 As Linhagens Lewis (LEW) e SHR como Modelo Genético de Ansiedade

Duas linhagens de ratos podem diferir ou até mesmo ser contrastantes em relação à expressão de um determinado fenótipo. Quando submetidas às mesmas condições ambientais, pode-se dizer que as diferenças médias encontradas entre estas linhagens são de origem genética. Exemplos de linhagens de ratos contrastantes para fenótipos comportamentais incluem as linhagens *Roman High-Avoidance* (RHA) e *Roman Low-Avoidance* (RLA), contrastantes em relação ao comportamento de esquiva ativa (BIGNAMI, 1965), as linhagens *Maudsley Reactive* e *Nonreactive*, que apresentam alta e baixa defecação no teste do campo aberto (CA), respectivamente

(BROADHURST, 1975), e as linhagens Floripa H e Floripa L, que diferem em relação à locomoção na área central do teste do CA (RAMOS et al., 2003).

Ramos et al. (1997), através de uma bateria de testes comportamentais realizada com seis linhagens de ratos, observaram que as linhagens LEW e SHR contrastam para uma série de comportamentos relacionados à ansiedade, mas não à atividade locomotora. Naquele trabalho, os animais da linhagem SHR aproximaram-se mais dos estímulos aversivos de diversos testes em comparação aos da linhagem LEW, que exibiram um perfil mais “ansioso”. Esse contraste foi posteriormente atribuído a fatores genéticos, através de um estudo feito com o intercruzamento de animais das duas linhagens nascidos, criados e testados simultaneamente, sob as mesmas condições ambientais, e sendo demonstrada a ausência de efeitos maternos e das avós nos comportamentos avaliados (RAMOS et al., 1998).

Estudos posteriores confirmam estas diferenças comportamentais entre LEW e SHR, além de revelarem outras diferenças comportamentais, como em relação ao consumo de álcool, com a linhagem SHR apresentando maior consumo do que a LEW, à sensibilidade à dor no teste da formalina, com os ratos LEW se mostrando hiperalgésicos em relação aos SHR, à esquivia inibitória no labirinto em T elevado (LTE), com a linhagem LEW adquirindo a esquivia inibitória mais rapidamente do que a SHR, e ao comportamento relacionado à depressão no teste do nado forçado (TNF), com os ratos LEW passando mais tempo imóveis quando comparados aos SHR (HINOJOSA et al., 2006; RAMOS et al., 2002; DA SILVA; RAMOS; TAKAHASHI, 2004).

1.3 ANÁLISE DE *LOCI* PARA CARACTERÍSTICAS QUANTITATIVAS (QTLs)

A variação contínua observada em um determinado fenótipo é normalmente resultado do efeito de múltiplos genes, cada um contribuindo com um pequeno efeito, sendo que, em suas formas isoladas, cada um desses genes não é necessário e nem suficiente para que a característica em questão se expresse (PLOMIN; OWEN; MCGUFFIN, 1994; MOORE; NAGLE, 2000). Esses fenótipos que variam continuamente em uma determinada população são frequentemente denominados “características quantitativas”. A maioria das diferenças comportamentais normalmente observadas nas

populações são características quantitativas, sendo os *loci* gênicos que contêm as variantes alélicas responsáveis por estas diferenças denominados de *loci* para características quantitativas (*quantitative trait loci*, ou QTLs) (PLOMIN; OWEN; MCGUFFIN, 1994; FLINT, 2003).

O mapeamento de QTLs é a técnica normalmente empregada para mapear estes múltiplos genes, sendo capaz de definir, em teoria, o número, a localização genômica, e os efeitos individuais de cada gene que contribui para a característica em estudo. Esta técnica é amplamente utilizada na identificação de *loci* importantes para o melhoramento genético na agricultura e pecuária, e também para a compreensão de mecanismos envolvidos em patologias humanas complexas (MOORE; NAGLE, 2000).

O primeiro passo para a análise de QTLs é identificação de linhagens (preferencialmente isogênicas) discrepantes para uma determinada característica, sendo que, quanto maior a diferença entre as linhagens, maior será a probabilidade de se encontrar QTLs significativos. Depois de selecionadas as linhagens, são realizados cruzamentos de forma que a segunda geração de ratos gerada seja segregante para os alelos responsáveis pelo fenótipo. Esta geração segregante pode ser obtida tanto a partir do inter cruzamento dos animais da F1 (primeira geração originada do cruzamento das duas linhagens isogênicas), gerando uma F2, quanto retrocruzando-se os animais da F1 com animais de uma das linhagens parentais. A escolha da estratégia depende do fenótipo em questão e do modo de herança dos QTLs que se deseja estudar, entretanto, nota-se que o estudo com F2 é mais frequente (MOORE; NAGLE, 2000).

Após a obtenção da geração segregante, os animais que a compõem são fenotipados para as características de interesse do estudo. Estes animais também serão genotipados para diversos marcadores moleculares conhecidamente polimórficos (cujos alelos possuem diferentes formas) entre as linhagens parentais, a fim de caracterizá-los genotipicamente. Posteriormente, análises estatísticas irão correlacionar os escores dos fenótipos avaliados com as formas variantes de cada marcador molecular utilizado ao longo do genoma. Desta forma, é possível identificar comportamentos que se relacionam com a presença de alelos do tipo A ou B em determinado *locus* do genoma, no qual, provavelmente, um ou mais genes influenciando estes comportamentos poderão ser encontrados (para revisão, ver DARVASI, 1998; ZENG; KAO, BASTEN, 1999). Uma rápida busca pelo *Rat Genome Database Website (2012b)* revela 996 QTLs encontrados no genoma do rato para os mais diversos fenótipos, incluindo o consumo de álcool, os níveis de

pressão arterial, a cor do pelo, a estrutura óssea, os níveis de atividade, entre outros.

A análise de QTLs em gerações F2 é mais apropriada quando ambas as linhagens parentais apresentam o fenótipo estudado, diferindo apenas na magnitude. A análise de F2 também tem mais probabilidade de encontrar QTLs crípticos, que são aqueles que estão mascarados nas linhagens parentais. Isso é possível graças à nova mistura genética entre os alelos das linhagens parentais que acontece na F2, possibilitando a expressão de *loci* que eram suprimidos por outros *loci* nas linhagens parentais (MOORE; NAGLE, 2000).

Um exemplo de QTL (*quantitative trait locus*, ou *locus* para característica quantitativa) críptico é um dos mais fortes já encontrados para a susceptibilidade à aterosclerose, através do estudo de uma F2 originada das linhagens de camundongo C57BL/6J e FVB/NJ. Na F2, a presença de alelos vindos da linhagem FVB/NJ em um determinado *locus* era responsável por altos índices de aterosclerose. Esse efeito era contra-intuitivo, uma vez que a linhagem FVB/NJ é conhecidamente mais resistente à aterosclerose do que a C57BL/6J (MOORE; NAGLE, 2000).

Outro exemplo importante de QTL críptico foi descoberto através das linhagens de ratos LEW e SHR. Como já mencionado anteriormente, estas duas linhagens isogênicas são contrastantes em diversos parâmetros relacionados à ansiedade, com os animais da linhagem LEW apresentando um perfil mais ansioso do que os da SHR (RAMOS et al., 1997; RAMOS et al., 2002). Através destas linhagens, Ramos et al. (1999) identificaram o primeiro QTL relacionado à ansiedade em ratos. Esse *locus*, localizado no cromossomo 4 e originalmente denominado *Ofill* (*open field inner locomotion 1*), afetou a locomoção central no teste do CA, um índice experimental de ansiedade. Atualmente, esse QTL é denominado *Anxrr16* (*Anxiety related response QTL 16*), e apresenta o segundo maior escore de LOD (teste estatístico que estima a relação entre os fenótipos e os marcadores moleculares) dentre os QTL para a ansiedade em ratos (RAT GENOME DATABASE WEBSITE, 2012b). Nesse estudo, foi observado que animais de uma geração F2 que possuíam dois alelos da linhagem LEW (a qual possui um perfil mais ansioso do que a SHR) no *locus Anxrr16*, apresentaram escores de locomoção central maiores do que ratos homocigotos para alelos SHR, se mostrando ainda menos ansiosos em relação a ambas as linhagens parentais (RAMOS et al., 1999). É possível notar que, de forma semelhante ao exemplo do QTL para a susceptibilidade à aterosclerose encontrado no camundongo, esse QTL

também apresenta um efeito contra-intuitivo, uma vez que os alelos oriundos da linhagem mais ansiosa, no *locus Anxrr16*, conferem um perfil menos ansioso aos animais da F2.

Estudos posteriores também relataram os efeitos do *locus Anxrr16* sobre a locomoção no centro do CA de descendentes do cruzamento entre LEW e SHR, confirmando o efeito contra-intuitivo previamente observado (VENDRUSCOLO et al., 2006a; IZÍDIO et al., 2011). Mormède et al. (2002) demonstraram a importância de *Anxrr16*, juntamente com a de outro QTL (*Ofil2*) localizado no cromossomo 7 do rato, sobre os comportamentos relacionados à ansiedade, através do desenvolvimento de duas linhagens com genótipos extremos para estes *loci*. No estudo em questão, foi verificado que a linhagem *high* (homozigota para alelos LEW em *Anxrr16* e para alelos SHR em *Ofil2*) apresentou maiores escores de locomoção nas áreas aversivas do CA e do labirinto em cruz elevado (LCE) em relação à linhagem *low* (homozigota para alelos SHR em *Anxrr16* e para alelos LEW em *Ofil2*). Contudo, devido ao seu delineamento experimental, esse estudo não permitiu separar as influências de *Anxrr16* e *Ofil2* sobre os fenótipos analisados (MORMÈDE et al., 2002). Um outro estudo envolvendo a seleção de duas linhagens contrastantes em relação à locomoção central no CA, a partir de descendentes das linhagens de ratos Wistar, Hooded e LEW, demonstrou que a variação genotípica observada para um marcador molecular na região do *locus Anxrr16* correlacionou-se significativamente com as variações no fenótipo selecionado (HAMEISTER et al., 2008).

Efeitos desse QTL sobre uma série de outros fenótipos comportamentais também já foram descritos, dentre os quais podemos citar o consumo de etanol (VENDRUSCOLO et al., 2006a), a analgesia induzida pelo estresse (VENDRUSCOLO et al., 2006b) e a sensibilização comportamental induzida pela cocaína (VENDRUSCOLO et al., 2009).

A influência do sexo sobre o efeito do QTL *Anxrr16* tem sido relatada desde o estudo que o descreveu, onde o seu efeito sobre a locomoção central no CA somente era observado em fêmeas netas de avós da linhagem LEW. Nesse primeiro estudo, algumas hipóteses foram formuladas para explicar esse efeito restrito às fêmeas, como a presença de *imprinting* genômico (fenômeno no qual apenas a cópia do gene de origem materna ou paterna é expressa, enquanto a outra cópia permanece inativa) ou a interação de *Anxrr16* com genes mitocondriais (que sempre possuem origem materna) (RAMOS et al., 1999). Vendruscolo et al. (2006a) também verificaram um efeito desse *locus*

exclusivamente sobre fêmeas, entretanto, a dependência do tipo de cruzamento que as originou não foi relatada. De forma contrária, o estudo de Izídio et al. (2011) identificou um efeito significativo de *Anxrr16* somente em machos, enquanto uma tendência marginalmente significativa foi observada nas fêmeas nas fases de diestro ou proestro, e nenhum efeito foi verificado nas fêmeas em estro ou metaestro, sugerindo que o efeito de *Anxrr16* em fêmeas é dependente das variações hormonais inerentes a cada fase do ciclo estral.

Mesmo com a utilização de um grande número de animais F2, aumentando assim o poder estatístico na detecção do QTL, os métodos clássicos para a análise de QTLs ainda apresentam baixo poder de resolução, mapeando *loci* correspondentes a regiões genômicas muito extensas, sobretudo quando dois ou mais genes próximos contribuem para o efeito de um *locus*. Dessa forma, o refinamento do mapa genético é uma etapa crucial entre a identificação do QTL e a descoberta do QTG (*quantitative trait gene*, um dos genes responsáveis pelo fenótipo em estudo) (FARBER; MEDRANO, 2007).

1.4 A LINHAGEM CONGÊNICA SHR.LEW-*Anxrr16*

As linhagens congênicas intervalo-específicas constituem uma das principais abordagens para a confirmação e o refinamento de mapas de QTLs. Atualmente, informações sobre mais de quinhentas linhagens congênicas de rato estão disponíveis no *Rat Genome Database Website* (2012d). Nessas linhagens, a região de um QTL previamente identificado, chamada de *locus* diferencial, é inteiramente transferida do genoma de uma das linhagens parentais (doadora) para a outra (receptora), através de uma série de retrocruzamentos (Fig. 1). A partir disso, é possível realizar comparações rigorosas entre dois grupos de animais praticamente idênticos genotipicamente, exceto pela região do *locus* diferencial (a linhagem congênica e a linhagem parental receptora), atribuindo-se a essa região as diferenças fenotípicas encontradas (FLAHERTY; BOLIVAR, 2006).

A construção de linhagens congênicas que isolam QTLs relacionados a fenótipos comportamentais é especialmente difícil, pois grandes variações desses fenótipos são observadas até mesmo entre animais que apresentam o mesmo genótipo, o que faz com que os escores comportamentais de um único animal não necessariamente reflitam o seu genótipo em um determinado *locus* (FLAHERTY; BOLIVAR, 2006).

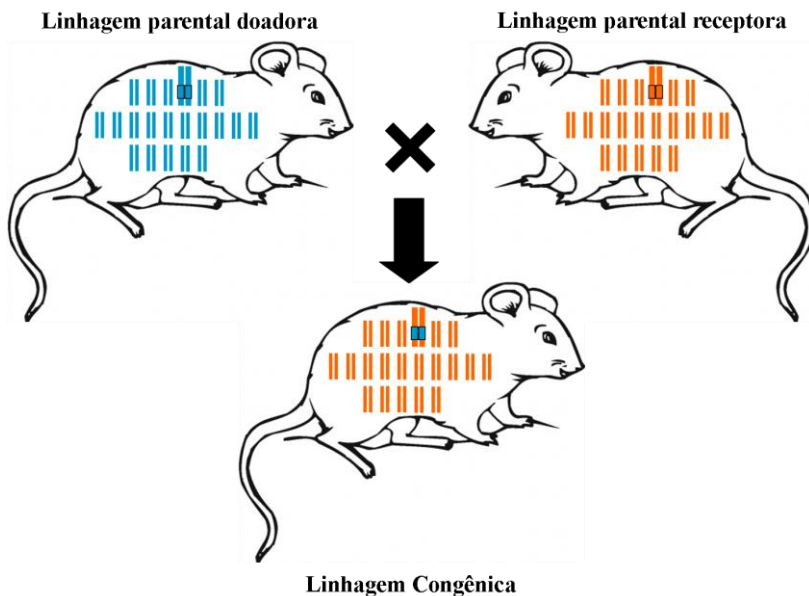


Figura 1 – Representação esquemática do genoma de uma linhagem congênica comparado ao das suas linhagens parentais. As barras verticais ilustram os vinte e um pares cromossômicos que constituem o genoma do rato (*Rattus norvegicus*). As barras ampliadas correspondem ao par de cromossomos homólogos número 4, e a área destacada em cada cromátide representa o *locus* diferencial. A cor alaranjada indica os alelos originários da linhagem receptora, enquanto a azul corresponde aos alelos provenientes da linhagem doadora. Dessa forma, observa-se que o animal congênico possui a maior parte do seu genoma constituído por alelos da linhagem receptora, exceto por aqueles presentes no *locus* diferencial, que foram transferidos da linhagem doadora.

Diferentes esquemas de cruzamentos podem ser utilizados na construção de uma linhagem congênica. O mais comum envolve um cruzamento inicial entre duas linhagens isogênicas, gerando uma F1, também chamada de N1 (primeira geração de retrocruzamento). Esta N1 é então retrocruzada com a linhagem receptora, dando origem à N2. Na geração N2, bem como a cada geração subsequente, os animais são genotipados no *locus* diferencial, selecionando-se aqueles que possuem alelos da linhagem doadora para o próximo retrocruzamento. Após dez gerações de retrocruzamentos, os animais são intercruzados, e aproximadamente $\frac{1}{4}$ da prole gerada constitui a linhagem congênica,

homozigota para alelos da linhagem doadora no *locus* diferencial (FLAHERTY; BOLIVAR, 2006).

De forma alternativa, o acompanhamento da transferência da região de interesse para a linhagem congênica pode ser feito através do fenótipo dos animais de cada geração, selecionando-os para a característica para a qual o QTL de interesse foi descrito. Contudo, devido à grande variabilidade fenotípica observada nas características comportamentais, esta estratégia pode ser frequentemente enganosa. Por isso, muitos geneticistas que estudam características complexas optam pela seleção genética do *locus* diferencial, através do uso de marcadores moleculares que o flanqueiam. A distância entre estes marcadores deve abranger o intervalo de confiança do QTL em questão, e ser grande o suficiente para que o pesquisador tenha segurança de que o QTL esteja contido nesta região. As linhagens desenvolvidas através desta estratégia são frequentemente denominadas linhagens congênicas intervalo-específicas (MOORE; NAGLE, 2000; ARMSTRONG; BRODNICKI; SPEED, 2006; FLAHERTY; BOLIVAR, 2006).

Linhagens congênicas para diferentes *loci* no cromossomo 4 já foram desenvolvidas, tendo como objetivo o estudo de fenótipos como o diabetes (HORNUM; LUNDSGAARD; MARKHOLST, 2007), a artrite (OLOFSSON et al., 2003), fatores de risco para doenças cardiovasculares (PRAVENEK et al., 1999; ANEAS et al., 2009), o alcoolismo (CARR et al., 2006), entre outros. Contudo, não há relatos na literatura de estudos comportamentais relacionados à ansiedade envolvendo linhagens congênicas para *loci* no cromossomo 4.

Com o intuito de melhor compreender os efeitos do QTL *Anxrr16* sobre comportamentos relacionados à ansiedade em roedores, através da confirmação dos seus efeitos como do refinamento de sua localização, uma linhagem congênica, denominada SHR.LEW-*Anxrr16* (que será aqui abreviada como SLA16), foi construída pela Dra. Elayne Pereira, durante o seu doutorado no Laboratório de Genética do Comportamento (LGC). Por abranger o intervalo de confiança do QTL *Anxrr16*, e provavelmente conter o(s) gene(s) responsável(is) pelos fenótipos associados à esse QTL, chamaremos aqui o *locus* diferencial da linhagem SHR.LEW-*Anxrr16* de *locus Anxrr16*.

Considerando-se que a linhagem LEW normalmente exhibe menor locomoção central no teste do CA quando comparada com a linhagem SHR (HINOJOSA et al., 2006; RAMOS et al., 1997, 1998), e que Ramos e colaboradores (1999) observaram que a presença de alelos da linhagem LEW em *Anxrr16* era responsável por um aumento da locomoção central do teste do CA em uma geração segregante (F2),

duas situações poderiam ser esperadas na construção de uma linhagem congênica: (1) a introgressão em *Anxrr16* de alelos do tipo LEW em um *background* genético do tipo SHR aumentaria os escores de locomoção no centro do CA desses animais em relação aos ratos SHR isogênicos; (2) a introgressão em *Anxrr16* de alelos do tipo SHR em um *background* genético do tipo LEW reduziria ainda mais os escores desses animais em comparação aos dos ratos LEW isogênicos. Uma vez que os escores de locomoção central de ratos LEW já são bastante baixos, a possível ocorrência de um efeito “piso” poderia limitar a redução da locomoção central prevista na segunda situação. Dessa forma, optou-se por construir animais congênicos com alelos do tipo LEW em *Anxrr16* e um *background* genético do tipo SHR, ou seja, utilizar a linhagem LEW como doadora e a linhagem SHR como receptora.

A construção da linhagem congênica SLA16 (Fig. 2) teve início com um cruzamento entre fêmeas da linhagem LEW (doadora) e machos da linhagem SHR (receptora), originando a geração híbrida N1. Os animais da geração N1, heterozigotos em todo o genoma, foram retrocruzados com a linhagem parental SHR, originando a geração N2. Com o objetivo de acompanhar molecularmente a transferência do *locus Anxrr16*, todas as gerações a partir da N2 foram genotipadas para três marcadores moleculares do tipo microssatélite. Esses marcadores, localizados na região do QTL *Anxrr16*, já eram conhecidamente polimórficos entre as linhagens parentais. Aqueles indivíduos da N2 heterozigotos nesses microssatélites foram então retrocruzados com a linhagem SHR, dando origem à geração N3, que também foi genotipada, selecionada e novamente retrocruzada com a linhagem SHR. Esse processo foi continuamente repetido até a obtenção da geração N10. Nesta, os animais heterozigotos para os marcadores do *locus Anxrr16* foram intercruzados, gerando cerca de $\frac{1}{4}$ dos animais homozigotos com alelos da linhagem SHR, $\frac{1}{2}$ heterozigotos e $\frac{1}{4}$ homozigotos com alelos da linhagem LEW nesse *locus*, sendo esses últimos os constituintes da primeira geração (N10F1) de animais da linhagem congênica SLA16 (PEREIRA, 2010).

Como cada retrocruzamento resulta na perda de cerca de 50% dos alelos da linhagem doadora, estima-se que, após dez gerações de retrocruzamento, os animais da geração N10F1 tenham mais de 99,9% do genoma (fora do *locus Anxrr16*) composto por alelos da linhagem SHR (MOORE; NAGLE, 2000; FLAHERTY; BOLIVAR, 2006). A porcentagem de alelos da linhagem receptora que é introgridida na linhagem congênica a cada retrocruzamento está representada na Tabela 1. A partir da N10F1, a nova linhagem foi mantida nos biotérios do

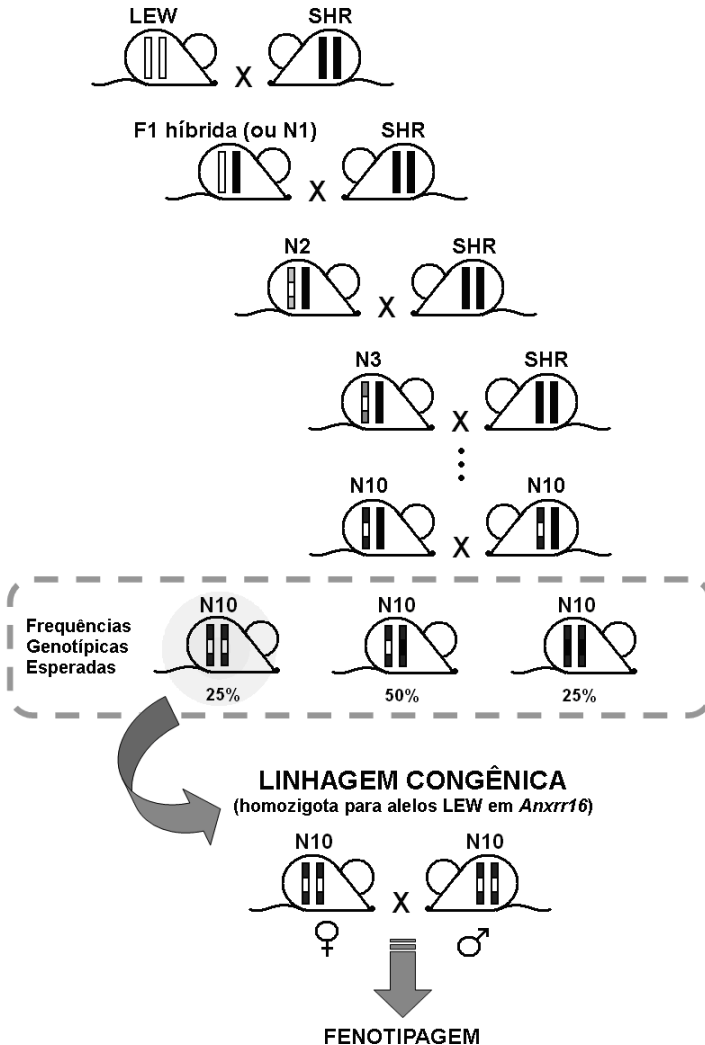


Figura 2 – Serie de cruzamentos envolvidos na construção da linhagem congênica SLA16. Após a obtenção da N1, os animais gerados foram continuamente retrocruzados com a linhagem parental SHR (e genotipados para três marcadores na região do *locus* diferencial) por dez gerações, após as quais os animais heterozigotos no *locus* *Anxrr16* foram intercruzados. A linhagem congênica é homozigota para alelos LEW no *locus* *Anxrr16*, e possui mais de 99.9% de alelos do tipo SHR no restante do seu genoma.

LGC através de intercruzamentos dos indivíduos de cada geração (N10F2, N10F3, etc.).

Durante o desenvolvimento da linhagem SLA16, os animais obtidos a cada geração passaram por uma série de testes comportamentais, dentre eles o CA, a caixa branca e preta (CBP) e o LCE, a fim de acompanhar o efeito do *locus Anxrr16* sobre o fenótipo desses animais. O conjunto de resultados obtidos a partir da caracterização comportamental realizada revelou uma tendência dos animais das gerações heterozigotas no *locus Anxrr16* (N3 a N10) a exibirem menores índices de emocionalidade em comparação aos animais homozigotos para alelos SHR, na maioria das gerações avaliadas. Já os resultados obtidos a partir de linhagens semicongênicas (animais homozigotos para alelos LEW no *locus* diferencial, produzidos através do intercruzamento dos animais de animais das gerações N3 e N6) e da N10F1 (primeira geração de animais congênicos produzida), confirmaram o menor índice de emocionalidade dos ratos homozigotos para alelos LEW em *Anxrr16*, em relação àqueles que possuíam alelos SHR em homozigose neste *locus*. Contudo, apesar de estarem de acordo com o esperado, estas diferenças comportamentais observadas não foram consistentes ao longo das gerações avaliadas e dos testes utilizados (PEREIRA, 2010).

Tabela 1 – Porcentagem de alelos da linhagem receptora que são introgrididos na linhagem congênica a cada retrocruzamento.

Geração	Alelos da linhagem receptora (%)
N1	50
N2	75
N3	87,5
N4	93,8
N5	96,9
N6	98,4
N7	99,2
N8	99,6
N9	99,8
N10	99,9

1.5 JUSTIFICATIVA

Uma vez que, após a obtenção da primeira geração de animais congênicos, constatou-se que o genótipo desses animais ainda se encontrava bastante heterogêneo nas regiões próximas ao *locus Anxrr16*, um refinamento genotípico faz-se necessário para que essa ferramenta alcance o seu propósito de isolar esse *locus*. Para uma completa caracterização comportamental dessa linhagem, uma investigação mais profunda sobre os fenótipos afetados pelo *locus* em questão também é necessária, já que as diferenças comportamentais atribuídas ao *locus Anxrr16* durante o desenvolvimento da linhagem SLA16 variaram de acordo com a geração e com o teste comportamental utilizado (PEREIRA, 2010). A influência do ciclo estral sobre os efeitos de *Anxrr16*, sugerida por Izídio et al. (2011), também deve ser esclarecida através desta linhagem. Efeitos do *locus Anxrr16* sobre a atividade locomotora também foram relatados durante a construção da linhagem congênica, e devem ser avaliados, tendo em vista que a linhagem parental SHR é um modelo animal amplamente utilizado no estudo do TDAH. Por esse mesmo motivo, efeitos desse *locus* sobre outros fenótipos relacionados ao TDAH também devem ser analisados. Considerando os fatores acima descritos, as seguintes hipóteses foram formuladas:

1. Os alelos LEW no *locus Anxrr16* da linhagem SLA16 farão com que ela se comporte de forma menos ansiosa do que a linhagem parental SHR nos testes comportamentais relacionados à ansiedade, confirmando assim a localização do QTL *Anxrr16* nesse *locus*, bem como os seus efeitos sobre esses comportamentos e o seu caráter críptico;
2. O ciclo estral interfere na influência do QTL *Anxrr16* sobre os comportamentos relacionados à ansiedade em fêmeas;
3. O aspecto locomotor afetado pelo QTL *Anxrr16* está relacionado à emocionalidade/ansiedade, ou, alternativamente, a região do QTL *Anxrr16* contém um ou mais genes responsáveis por características relacionadas ao TDAH, como hiperatividade e falta de atenção;

1.6 OBJETIVOS

1.6.1 Objetivos Gerais

Refinar e caracterizar genotípica e fenotipicamente a linhagem congênica de ratos SLA16, desenvolvida entre os anos de 2005 e 2009, como objeto da tese da Dra. Elayne Pereira. Uma vez refinada e caracterizada, será possível validar esta importante ferramenta no estudo genético da ansiedade e também verificar a influência do *locus Anxrr16* sobre outros fenótipos possivelmente associados. Finalmente, mas igualmente importante, o presente estudo pretende lançar as bases para o principal passo nessa estratégia experimental, que é a futura identificação do(s) gene(s) responsável(is) pelos efeitos comportamentais do *locus Anxrr16*.

1.6.2 Objetivos Específicos

- Genotipar todos os animais SLA16 das gerações 4, 5 e 6, utilizando vinte marcadores moleculares localizados ao longo do cromossomo 4;
- Selecionar, com base nos resultados da genotipagem, os animais que possuam o maior número de alelos LEW no *locus Anxrr16* e o maior número de alelos SHR fora dele, a fim de escolher animais reprodutores que contribuam para o refinamento molecular da linhagem SLA16;
- Montar o mapa genético do cromossomo 4 desta linhagem, permitindo a delimitação do *locus Anxrr16* e de seus efeitos;
- Analisar o efeito do *locus Anxrr16* sobre o perfil comportamental destes animais, utilizando tanto testes validados para comportamentos relacionados à ansiedade quanto para outros fenótipos possivelmente relacionados, sempre comparando a linhagem SLA16 com a linhagem parental isogênica SHR, utilizada como controle;
- Verificar a influência das diferentes fases do ciclo estral sobre o efeito desse *locus* nas fêmeas;
- Validar farmacologicamente, através do uso de uma droga ansiolítica e de uma droga ansiogênica, a nova linhagem congênica como modelo genético para o estudo da ansiedade;
- Verificar, através de testes para atividade motora e atenção, se o *locus Anxrr16* também influencia fenótipos relacionados ao

TDAH, uma vez que a linhagem parental SHR constitui um modelo animal desse transtorno.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 ANIMAIS

A linhagem de ratos congênica denominada SLA16 foi integralmente desenvolvida no LGC entre os anos de 2005 e 2009 (PEREIRA, 2010). Para a obtenção desses animais, duas linhagens parentais foram utilizadas: LEW, originária da Harlan Spregue Dowley Inc. (Indianápolis, IN) e obtida pelo LGC da Universidade Estadual de Campinas, SP; e SHR, originária da Harvard University (Boston, MA) e adquirida pelo LGC através da Universidade Federal do Espírito Santo. A isogenicidade das linhagens parentais vem sendo mantida através de um sistema de acasalamentos consanguíneos (irmão/irmã) a cada geração, desde as suas aquisições.

Este trabalho compreende a genotipagem e fenotipagem da quarta (N10F4) à sexta (N10F6) geração da linhagem congênica SLA16. Para cada geração, um número semelhante de animais da linhagem isogênica SHR (gerações 27, 28 e 29, a contar da aquisição desta linhagem pelo LGC) foi utilizado como controle nos testes comportamentais. Dentre as duas linhagens utilizadas, um total de 439 animais foram produzidos e testados, conforme ilustrado na Tabela 2.

Desde a N10F4 até a N10F6, todos os indivíduos gerados foram genotipados para 20 marcadores moleculares do tipo microsatélite, mapeados ao longo do cromossomo 4, selecionando-se reprodutores com o objetivo de tornar as gerações seguintes com cada vez mais alelos da linhagem LEW no *locus Anxrr16* e da SHR no restante do genoma.

Tabela 2 - Número de animais das linhagens SLA16 e SHR utilizados durante o processo de caracterização genotípica e fenotípica da linhagem SLA16.

	SLA16		SHR	
	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas
N10F4	28	26	18	23
N10F5	31	27	31	27
N10F6	90	30	78	30
Total por sexo	149	83	127	80
Total	232		207	

Machos e fêmeas das gerações N10F4 foram submetidos a uma bateria de testes, incluindo o teste do CA, a caixa de atividade (CATiv) não-familiar, a CBP e o LCE. Na N10F5, todos os machos foram primeiramente testados no CA sob alta ou baixa luminosidade e, em seguida, foram divididos em três grupos e testados no LTE, no teste de mudança da configuração atencional (MCA) ou na CATiv familiar. Por último, os animais previamente testados no LTE e na CATiv familiar foram submetidos ao protocolo de condicionamento olfatório do medo (COM). As fêmeas dessa geração foram testadas no protocolo do ciclo estral (CA e CBP). Os machos da N10F6 foram divididos em cinco grupos: o primeiro foi tratado com diferentes doses de clordiazepóxido (CDZ) e submetido ao CA e (após um *washout* de uma semana) à CBP; o segundo foi tratado com pentilenotetrazol (PTZ) e submetido ao CA e (também após um *washout* de uma semana) à CBP; o terceiro grupo foi avaliado no teste triplo (TT); e o quarto e quinto grupos foram testados no LTE e no MCA para completar o número amostral da geração anterior nesses mesmos testes. Também com o intuito de completar o número amostral, as fêmeas desta geração foram testadas no protocolo do ciclo estral (CA e CBP). O Quadro 1 ilustra a distribuição dos animais das três gerações nos diferentes testes comportamentais.

Quadro 1 – Número de animais das linhagens SLA16 e SHR submetidos aos testes comportamentais a cada geração analisada. Na coluna da direita está representada a média da idade dos animais em cada experimento.

Geração	Testes Realizados	Número de animais testados				Idade (semanas)
		SLA16		SHR		
		♂	♀	♂	♀	
N10F4	Campo aberto	28	26	18	23	9
	Caixa de atividade (não-familiar)	28	26	18	23	10
	Caixa branca e preta	28	25	18	23	11
	Labirinto em cruz elevado	28	25	18	23	12

(continua)

Quadro 1 – Número de animais das linhagens SLA16 e SHR submetidos aos testes comportamentais a cada geração analisada. Na coluna da direita está representada a média da idade dos animais em cada experimento.

(continuação)

Geração	Testes Realizados	Número de animais testados				Idade (semanas)
		SLA16		SHR		
		♂	♀	♂	♀	
N10F5	Campo aberto sob alta ou baixa luminosidade	31	-	31	-	9
	Labirinto em T elevado	10	-	10	-	12
	Mudança da configuração atencional	5	-	6	-	13
	Caixa de atividade (familiar)	10	-	10	-	14-15
	Ciclo estral (CA e CBP)	-	27	-	27	16
	Condicionamento olfatório do medo	20	-	20	-	15-17
N10F6	Campo aberto + CDZ	44	-	36	-	9
	Campo aberto + PTZ	22	-	18	-	9
	Caixa branca e preta + CDZ	44	-	36	-	10
	Caixa branca e preta + PTZ	22	-	18	-	10
	Teste triplo	15	-	15	-	11
	Labirinto em T elevado	3	-	3	-	11

(continua)

Quadro 1 – Número de animais das linhagens SLA16 e SHR submetidos aos testes comportamentais a cada geração analisada. Na coluna da direita está representada a média da idade dos animais em cada experimento.

(continuação)

Geração	Testes Realizados	Número de animais testados				Idade (semanas)
		SLA16		SHR		
		♂	♀	♂	♀	
N10F6	Mudança da configuração atencional	6	-	6	-	12
	Ciclo estral (CA e CBP)	-	30	-	30	16

Todos os animais utilizados foram desmamados e separados por sexo com aproximadamente 28 dias de vida, sendo então alojados em gaiolas de polipropileno (41 cm x 34 cm x 16 cm de altura). Cada gaiola continha um número balanceado de animais das linhagens SHR e SLA16, totalizando 5 a 6 ratos por gaiola. Todos os animais nasceram e foram mantidos nos biotérios do LGC, com temperatura controlada (22 ± 2 °C), ciclo claro/escuro de 12 horas (luzes acesas às 7:00 horas), e com livre acesso à água e ração - exceto no período de restrição alimentar descrito no protocolo de MCA. Os experimentos desenvolvidos estão de acordo com as normas locais da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFSC), sob o protocolo nº PP00656.

2.2 GENOTIPAGEM

Cada um dos 232 animais congênicos das gerações N10F4, N10F5 e N10F6 foi genotipado para 20 marcadores do tipo microssatélite mapeados ao longo do cromossomo 4 (Quadro 2), com intervalos médios de aproximadamente 11 milhões de pares de base (Mpb) entre dois marcadores adjacentes (sendo o intervalo máximo de 25 Mpb). As amostras de ácido desoxirribonucleico (DNA) foram extraídas de pequenos fragmentos tissulares da ponta das caudas (de aproximadamente 5 mm), seccionados por volta dos 30 dias de idade com o auxílio de uma tesoura cirúrgica. Um spray antisséptico contendo 21 mg/mL de cloridrato de lidocaína e 1,33 mg/mL de cloreto de

benzetônio (Salvelox, São Paulo, Brasil) foi aplicado na extremidade das caudas após o procedimento.

Quadro 2 – Informações sobre os marcadores moleculares do tipo microsatélite utilizados na genotipagem dos animais SLA16 das gerações N10F4, N10F5 e N10F6. Ao lado do nome de cada marcador encontram-se a sua posição em pares de base no cromossomo 4 (de acordo com o mapa *RGSC Genome Assembly v3.4*), as sequências dos seus primers *forward* (F) e *reverse* (R) e os tamanhos esperados para os alelos nas linhagens LEW e SHR (com base em dados das sub-linhagens *LEW/Pit* e *SHR/OlaHSd*, respectivamente). Todas as informações foram obtidas através do *Rat Genoma Database Website* (2012a,c).

Marcador	Posição (pb)	Sequências dos Primers <i>Forward</i> (F) e <i>Reverse</i> (R)	Tamanhos esperados (pb)	
			LEW	SHR
<i>D4Mgh22</i>	4.410.369	F: CCTGTCATGTTATTGATGATGATG	92	114
		R: GGTCACATGAAATTTGACCTCA		
<i>D4Rat126</i>	26.178.308	F: CATTCTGTGCCACTCAAGA	138	130
		R: GCAGGTAAGAAAAGCAAGGC		
<i>D4Rat151</i>	29.413.686	F: TCAAAGGGTAGATGATGGAGTTT	238	224
		R: GGTGCAAATTCAGAGGCATT		
<i>D4Rat14</i>	41.729.583	F: TTTCTCTCCTGTCCCTCTTTC	186	178
		R: AAAATTGCTTGGGCAAATAAA		
<i>D4Rat159</i>	Não disponível	F: ATTCCCGGACCCTAAAAA	162	180
		R: GGGCTTACATAAGCAGAGAAACC		
<i>D4Mgh16</i>	61.646.674	F: CAGGAGCTGTCTGGGACTTC	239	255
		R: GAACACTAGAGAAACTAGGCAGGC		
<i>D4Rat164</i>	73.005.176	F: AACTGTGATACTTACCTTTTGGTGT	175	189
		R: TCCCTTCTTTGATGACCCCTAA		
<i>D4Rat30</i>	74.625.616	F: CATATACGTGGGTGGTTGGG	115	127
		R: CTGAGGAATGACACCTGAGTTG		

(continua)

Quadro 2 – Informações sobre os marcadores moleculares do tipo microssatélite utilizados na genotipagem dos animais SLA16 das gerações N10F4, N10F5 e N10F6. Ao lado do nome de cada marcador encontram-se a sua posição em pares de base no cromossomo 4 (de acordo com o mapa *RGSC Genome Assembly v3.4*), as sequências dos seus primers *forward* (F) e *reverse* (R) e os tamanhos esperados para os alelos nas linhagens LEW e SHR (com base em dados das sub-linhagens *LEW/Pit* e *SHR/OlaHSd*, respectivamente). Todas as informações foram obtidas através do *Rat Genoma Database Website* (2012a,c).

(continuação)

Marcador	Posição (pb)	Sequências dos Primers <i>Forward</i> (F) e <i>Reverse</i> (R)	Tamanhos esperados (pb)	
			LEW	SHR
<i>D4Wox22</i>	78.042.681	F: TCAGAAAAATTTAAATTGTATCTGTG	Não disponível (aprox. 162 pb)	
		R: CCATATGCAAGTGTGGGTATC		
<i>D4Rat76</i>	84.886.545	F: GTTAAGGAACCATGGGCTGA	176	200
		R: GTATGTTTCCTTCCTGCCCC		
<i>D4Rat172</i>	94.921.064	F: CCCCTCCCCTCTCTCTT	133	143
		R: TTGAAGTTTGAACCAACACTGG		
<i>D4Rat49</i>	119.279.962	F: TCCATCCCTTCACAGACTTTG	151	157
		R: CAGGGAGCTACTGCACACCT		
<i>D4Mit16</i>	130.228.504	F: TGCATAGTCAATTTATGTCTCACA	109	113
		R: TTGGCCTTTCTAGTAAACAGTGG		
<i>D4Mgh6</i>	135.636.930	F: GGGTCTTG TAGCATTTTTTAAAGC	154	142
		R: AGAACCAACTCCTAAACTCCTGC		
<i>D4Rat104</i>	140.454.608	F: TCTAGGGTGTGCATGTGTGC	141	153
		R: TTCCTCCCATGAAACAGTGC		
<i>D4Rat59</i>	150.047.799	F: GCGGAATGATAGTTACTACGGC	168	174
		R: GCAGTGTGTTGGGGTAGCT		
<i>D4Rat61</i>	153.361.968	F: TTGTCCTTCTTCGACCTGCT	169	157
		R: GATGGTGCCAGTCTAGGTGG		

(continua)

Quadro 2 – Informações sobre os marcadores moleculares do tipo microsatélite utilizados na genotipagem dos animais SLA16 das gerações N10F4, N10F5 e N10F6. Ao lado do nome de cada marcador encontram-se a sua posição em pares de base no cromossomo 4 (de acordo com o mapa *RGSC Genome Assembly v3.4*), as sequências dos seus primers *forward* (F) e *reverse* (R) e os tamanhos esperados para os alelos nas linhagens LEW e SHR (com base em dados das sub-linhagens *LEW/Pit* e *SHR/OlaHSd*, respectivamente). Todas as informações foram obtidas através do *Rat Genoma Database Website* (2012a,c).

(continuação)

Marcador	Posição (pb)	Sequências dos Primers <i>Forward</i> (F) e <i>Reverse</i> (R)	Tamanhos esperados (pb)	
			LEW	SHR
<i>D4Mgh11</i>	171.204.377	F: CTCAACGAACAGGTTTCATTATG	150	158
		R: AGAAGGGATGACAATTGGTACG		
<i>D4Mgh13</i>	181.442.880	F: TTGTTTAAAAAATCTAGGCTGGC	175	117
		R: AGAAGCCACTTAGTCAATTTCCC		
<i>D4Rat206</i>	Não disponível	F: GCAGGAAACAGTTTACTTCATGC	160	170
		R: AAGTAGTTGGCATGCGTGTG		

Para a extração do DNA, utilizou-se o kit *DirectPCR Lysis Reagent (tail)* (Viagen Biotech), conforme as instruções do fabricante. Depois de extraídas, as amostras de DNA foram submetidas à reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction - PCR*), com 1 µL do produto da extração, 9,5 µL de água deionizada e purificada, 5 µL de mix de oligonucleotídeos (1 pmol/µL de cada), 0,38 u de GoTaq® DNA Polymerase, 0,4 µL de mix de dNTP (10mM de cada) e 4 µL de 5X Green GoTaq® Reaction Buffer (Promega), em um volume total de 20 µL. A amplificação foi realizada em um termociclador *Px2 Thermo Cycler* (Hybaid, EUA) com a seguinte programação: (a) um ciclo a 96 °C por 5 minutos; (b) trinta e cinco ciclos a 92 °C por 30 segundos, 51-59 °C (conforme o microsatélite) por 1 minuto e 72 °C por 31 segundos; e (c) um ciclo a 72 °C por 2 minutos. Depois de amplificadas, as amostras dos animais congênicos foram aplicadas - juntamente com amostras controle de animais LEW, SHR e F1 - em géis de agarose a 3%, corados com brometo de etídio. A genotipagem para cada microsatélite foi feita comparando-se a posição das bandas das amostras com as dos controles, conforme ilustrado na Fig. 3.

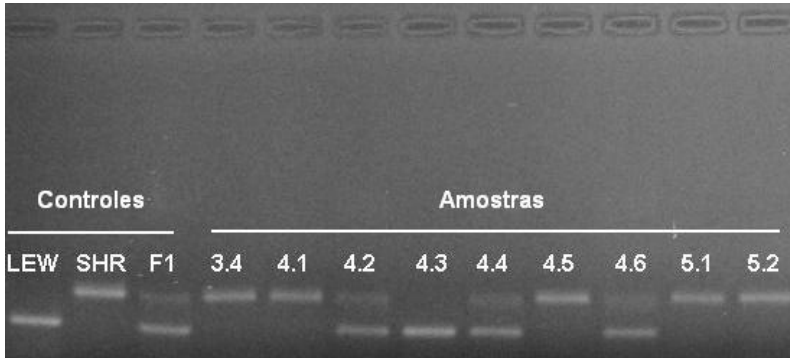


Figura 3 – Exemplo dos diferentes genótipos observados durante a genotipagem dos animais congênicos SLA16. A foto corresponde ao segmento de um gel de agarose com amostras amplificadas para o marcador D4Mgh22, polimórfico entre as linhagens LEW e SHR. As três primeiras amostras correspondem a produtos da PCR controle, extraídos de animais das linhagens parentais LEW (homozigotos LEW, banda baixa) e SHR (homozigotos SHR, banda alta), e de uma F1 híbrida (heterozigotos, banda dupla), respectivamente. As demais amostras correspondem a produtos da PCR dos animais cujo genótipo estava sendo analisado, neste caso nove animais da geração N10F4. Observam-se amostras dos animais congênicos exibindo os três genótipos possíveis: homozigotos para alelos LEW (4.3), homozigotos para alelos SHR (3.4, 4.1, 4.5, 5.1 e 5.2) e heterozigotos (4.2, 4.4 e 4.6).

2.3 TESTES COMPORTAMENTAIS

2.3.1 Drogas e Substâncias Utilizadas

As informações referentes às drogas e demais substâncias utilizadas nas etapas experimentais deste trabalho seguem listadas abaixo.

- Água destilada (estéril);
- Acetato de amila (*Aldrich*). Utilizado como estímulo olfatório (odor de banana) no experimento de COM. Foram depositados 100 µL da solução a 5% (diluído em propilenoglicol) em um pedaço de papel filtro;
- Clordiazepóxido (CDZ) (*Centaur Pharmaceuticals*). Utilizado nas doses de 0,5; 5 e 10 mg/kg, diluído em água destilada e administrado intraperitonealmente (IP) (2 mL/kg) 30 minutos antes do teste do CA ou da CBP (CHAOULOFF; DURAND;

MORMEDE, 1997; RAMOS et al., 2008; WEHRMEISTER et al., 2010);

- Benzoato de estradiol (*Schering-Plough*). Utilizado na dose de 0,1 mL/fêmea, diluído a 0,1 mg/mL em óleo de girassol e administrado subcutaneamente (SC), 48 horas antes da progesterona, para a indução do ciclo estral (IZÍDIO et al., 2011);
- Salina (solução estéril de NaCl 0,9%);
- Pentilenotetrazol (PTZ) (*Sigma*). Utilizado na dose de 10 mg/kg, diluído em salina e administrado IP (2 mL/kg) 5 minutos antes do teste do CA ou da CBP (RAMOS et al., 2008);
- Progesterona (*Sigma-RBI*), utilizada na dose de 5 mg/kg, diluída em óleo de girassol e administrada SC (1 mL/kg) 24 ou 96 horas antes do teste do CA, para a indução do ciclo estral (IZÍDIO et al., 2011).

2.3.2 Campo Aberto

O CA, originalmente desenvolvido por Calvin Hall em 1934 para medir a emocionalidade em ratos, é um dos modelos animais de ansiedade mais amplamente utilizados (PRUT; BELZUNG, 2003). Para esse teste, utilizou-se uma arena branca (Fig. 4), quadrada (100 x 100 cm), cercada por paredes de 40 cm de altura, com o chão dividido por linhas pretas em 25 quadrados (20 x 20 cm). Os 16 quadrados adjacentes às paredes constituíam a região periférica do aparato, enquanto os outros 9 formavam a parte central. A iluminação do teste foi feita através da lâmpada da sala de testes, controlada por um *dimmer*, podendo variar de 10 a 530 lux.

No protocolo padrão, cada animal foi posicionado no centro do aparato e o número de quadrados cruzados por ele no centro e na periferia foi registrado ao longo de 5 minutos. O tempo pelo qual o animal permaneceu na região central do CA também foi registrado. Os testes foram sempre realizados no período vespertino e a iluminação da sala de testes foi mantida em 10 lux. Considera-se que a locomoção na área central do aparato está mais relacionada com a emocionalidade do animal, enquanto a locomoção periférica envolveria majoritariamente o componente motor (RAMOS, 2008).



Figura 4 – Aparato utilizado no teste do CA.

Campo aberto sob alta ou baixa luminosidade

Este protocolo difere do protocolo do CA padrão apenas nas luminosidades utilizadas. Nesta variação, metade dos animais de cada linhagem foi submetida ao teste sob alta (530 lux) e metade sob baixa (10 lux) luminosidade, de maneira alternada ao longo dos dias de teste. O aumento da luminosidade deveria conferir maior aversividade ao aparato, uma vez que os ratos são animais de hábitos noturnos, aumentando, portanto, o componente emocional deste teste.

Campo aberto com controle de ciclo estral

Este experimento teve como objetivo investigar se as diferenças comportamentais relacionadas ao QTL *Anxrr16* em fêmeas são dependentes da fase do ciclo estral na qual as ratas se encontram, o que é sugerido pelos resultados de Izídio et al. (2011). Para isso, as fêmeas foram injetadas com 0,1 mL de benzoato de estradiol a 0,1 mg/mL, e, 48 horas depois, com 1 mL/kg de progesterona a 5mg/mL, ambas SC (na região da nuca), a fim de sincronizar o ciclo hormonal dos animais. As ratas foram divididas em dois grandes grupos, com o objetivo de se obter um número amostral semelhante em cada fase do ciclo estral: uma parcela das ratas foi testada 24 horas após a injeção de progesterona, quando estariam provavelmente nas fases de estro ou metaestro, enquanto a outra parcela foi testada 96 horas após a progesterona,

quando haveria grande chance de estarem em diestro ou proestro. O teste do CA foi realizado seguindo o protocolo padrão, já descrito anteriormente.

As ratas foram testadas em duas grandes levas (N10F5 e N10F6), com cada leva demandando dois dias de experimento, totalizando quatro dias de teste. Em cada dia, entre 27 e 30 ratas passaram pelo CA. A fase do ciclo estral na qual cada fêmea se encontrava foi confirmada no mesmo dia do teste, logo após todas as ratas passarem pelo CA, através da observação microscópica de um esfregaço vaginal. A coleta do material foi feita através da inserção de uma pequena ponteira na vagina das ratas, “lavando-a” com cerca de 0,1 mL de salina. O material coletado foi depositado em uma lâmina, corado com azul de metileno, e então observado em um microscópio óptico (aumentos de 10x e 40x), identificando-se os tipos celulares que caracterizam cada fase do ciclo (IZÍDIO et al., 2011). As classificações foram feitas com base no trabalho de Hoar e Hickman (1975) e estão ilustradas no Quadro 3.

Quadro 3 – Tipos celulares característicos de cada fase do ciclo estral das ratas. Baseado em Hoar e Hickman (1975).

Fase do Ciclo Estral	Tipos Celulares
Diestro	Predominância de leucócitos Algumas células epiteliais (nucleadas)
Proestro	Predominância de células epiteliais Desaparecimento dos leucócitos
Estro	Predominância de células epiteliais cornificadas (anucleadas) Ausência de Leucócitos
Metaestro	Reaparecimento dos leucócitos Algumas células epiteliais cornificadas remanescentes

Campo aberto após tratamento farmacológico

O protocolo de ambos os experimentos consistiu no tratamento dos animais com diferentes doses de CDZ ou PTZ, seguido do teste do CA em sua forma padrão, já descrita acima.

O CDZ, um ansiolítico da classe das benzodizepinas, foi utilizado nas doses de 0,5; 5 e 10 mg/kg, injetadas IP 30 minutos antes do teste. Já o PTZ, um composto ansiogênico, foi utilizado apenas na dose de 10 mg/kg, injetada IP 5 minutos antes do teste.

2.3.3 Caixa Branca e Preta

O teste da CBP foi descrito pela primeira vez por Crawley, em 1981, para avaliar as ações comportamentais das benzodiazepinas em camundongos, sendo ainda hoje bastante utilizado como modelo de ansiedade (RAMOS et al., 2008), inclusive em ratos. O teste foi realizado em uma caixa retangular (Fig. 5), com o seu interior dividido por uma parede em dois compartimentos: um maior (27 x 27 x 17 cm de altura), branco e fortemente iluminado, com o chão dividido por linhas pretas em 9 quadrados (9 x 9 cm); e um menor (27 x 18 x 27 cm de altura), preto, escuro, com o chão dividido por linhas brancas em 6 quadrados (9 x 9 cm). A transição entre os compartimentos era realizada através de uma pequena abertura (7 x 7 cm) na parede divisória. A iluminação dos compartimentos foi feita através de lâmpadas fluorescentes, uma branca (9W) e uma vermelha (14W), localizadas 30 cm acima do chão do aparato, que conferiam aos compartimentos branco e preto a luminosidade de 1500 e 65 lux, respectivamente, sendo estas as únicas fontes luminosas utilizadas durante o teste.

No protocolo padrão, os animais foram inicialmente posicionados no centro do compartimento branco, com a cabeça voltada para a abertura que interliga os compartimentos. Durante 5 minutos foram avaliados: o tempo permanecido e a locomoção realizada no compartimento branco, a locomoção realizada no compartimento preto, e o número de transições entre os compartimentos. Os testes foram sempre realizados no período vespertino. Por se tratar de uma área aversiva para os roedores, medidas relacionadas à exploração do compartimento branco e fortemente iluminado tendem a refletir aspectos emocionais do animal, sendo essas medidas afetadas pela administração de benzodiazepinas (CRAWLEY; GOODWIN, 1980; CRAWLEY, 1981; CHAOULOFF, DURAND; MORMEDE, 1997).

Caixa branca e preta após tratamento farmacológico

Este protocolo foi realizado com os mesmos animais utilizados nos experimentos do CA após tratamento farmacológico, depois uma semana de *washout*. De forma idêntica à realizada no CA, os experimentos consistiram no tratamento dos animais com diferentes doses de CDZ ou PTZ, seguido do teste da CBP em sua forma padrão (descrita acima). Cada animal recebeu a mesma droga e na mesma dose administrada na semana anterior.

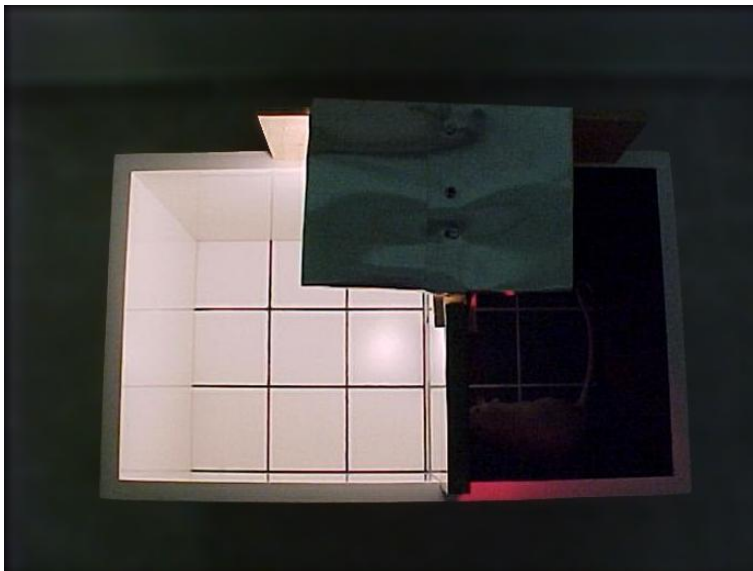


Figura 5 – Aparato utilizado no teste da CBP.

2.3.4 Labirinto em Cruz Elevado

O LCE é um modelo animal de ansiedade que foi inicialmente proposto por Pellow et al. (1985), com o objetivo de identificar os efeitos ansiolíticos e ansiogênicos de drogas em ratos. Para este teste, foi utilizado um aparato (Fig. 6) formado por quatro braços (52 cm elevados do chão, com 50 cm de comprimento e 10 cm de largura) de madeira, pretos, dispostos em formato de cruz. Um par de braços opostos era cercado por paredes de 40 cm (chamados de braços fechados), enquanto o outro par de braços possuía apenas um anteparo (1 mm por 5 mm de altura) na sua borda (chamados de braços abertos). Uma plataforma central (10 x 13,5 cm) era formada pela intersecção dos quatro braços.

No teste, cada animal foi colocado na plataforma central com a face voltada para um dos braços abertos. O tempo permanecido e o número de entradas nos braços abertos, bem como o número de entradas nos braços fechados foram registrados durante a sessão de 5 minutos. Consideram-se menos ansiosos os animais que apresentam uma maior exploração dos braços abertos (PELLOW et al., 1985). Os testes foram sempre realizados no período vespertino e a iluminação da sala de testes foi mantida em 10 lux.

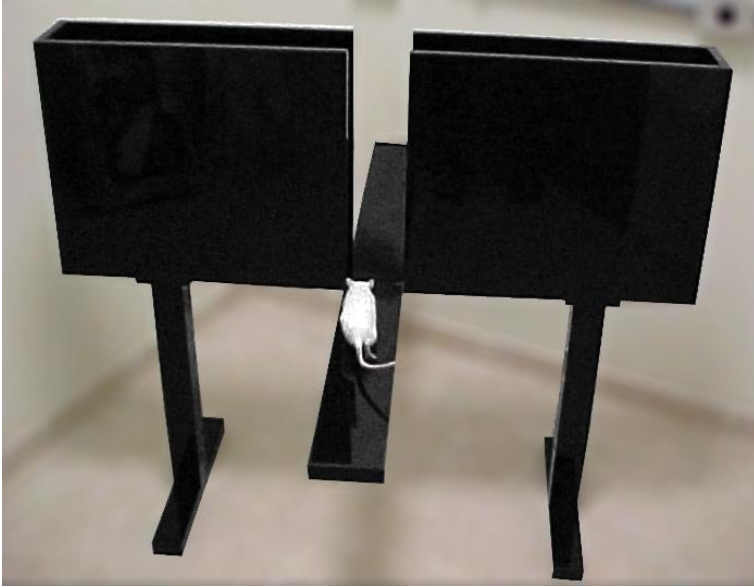


Figura 6 – Aparato utilizado no teste do LCE.

2.3.5 Teste Triplo

Este teste, validado como um modelo de ansiedade e atividade motora, (RAMOS et al., 2008), foi desenvolvido para avaliar uma ampla variedade de comportamentos incondicionados em apenas uma sessão. A junção do CA, LCE e CBP, nesta ordem, formava o aparato triplo (Fig. 7). A conexão entre estes aparatos se deu através de aberturas localizadas entre uma das paredes do CA e um dos braços fechados do LCE (10 x 40 de altura) e entre o outro braço fechado do LCE e o compartimento preto da CBP (7 x 10 de altura), com o LCE interligando os outros dois aparatos. Todo o aparato ficava a uma altura de 52 cm do chão da sala de testes, com o objetivo de manter a característica aversiva dos braços abertos do LCE.

No teste, cada animal foi inicialmente posicionado no centro do CA, podendo explorar livremente todo o aparato durante a sessão, que durou 15 minutos. Nesse tempo, parâmetros comumente avaliados nos testes individuais foram registrados: locomoção no centro e na periferia do CA, tempo permanecido no centro do CA, tempo permanecido e número de entradas nos braços abertos do LCE, entradas nos braços fechados do LCE, tempo permanecido e a locomoção realizada no

compartimento branco da CBP, locomoção realizada no compartimento preto e número de transições entre os compartimentos da CBP. Todas as sessões foram realizadas no período vespertino e as lâmpadas da CBP foram as únicas fontes luminosas utilizadas na sala de testes.



Figura 7 – Aparato utilizado no TT (Fonte: RAMOS, 2008).

2.3.6 Labirinto em T Elevado

Acredita-se que o LTE seja capaz de dissociar respostas comportamentais que estão entrelaçadas no LCE: a esquivas e a fuga dos braços abertos. A esquivas estaria relacionada aos transtornos de ansiedade generalizada, enquanto a fuga modelaria o transtorno de pânico, o que é corroborado por diversos estudos envolvendo drogas conhecidamente ansiolíticas e panicolíticas (ZANGROSSI; GRAEFF, 1997; GRAEFF; NETTO; ZANGROSSI, 1998; TEIXEIRA; ZANGROSSI; GRAEFF, 2000; POLTRONIERI; ZANGROSSI; VIANA, 2003). O aparato utilizado no LTE (Fig. 8) consistiu em uma adaptação do LCE, com um adesivo plástico (de textura semelhante ao revestimento do restante do aparato) fechando completamente a entrada de um dos braços fechados.

O protocolo utilizado foi idêntico ao descrito por Soares et al. (2011). Durante as manhãs dos dois dias que antecederam o teste propriamente dito, todos os animais passaram por sessões de manipulação, que duravam 5 minutos, sempre realizadas pelo mesmo experimentador. Na tarde do dia anterior ao teste, os animais foram confinados individualmente a um dos braços abertos, durante 30 minutos. Teixeira et al. (2000) mostraram que a prévia exposição forçada aos braços abertos diminui o tempo de fuga dos animais e assegura que a fuga seja motivada pela aversão a esses braços (POLTRONIERI; ZANGROSSI; VIANA, 2003).

No dia do teste, cada animal foi posicionado na parte distal do braço fechado, e o tempo levado para sair (com as quatro patas) deste braço foi registrado. Após a saída, o animal foi colocado em uma caixa de espera por 30 segundos e, em seguida, foi novamente posicionado no braço fechado. Esse processo foi repetido três vezes, de forma que três tempos de esquivas inibitória (latência basal, esquivas 1 e esquivas 2) foram obtidos. Após a obtenção dos três tempos de esquivas inibitória, cada animal foi colocado na caixa de espera por 30 segundos e, em seguida, posicionado na extremidade de um dos braços abertos (no mesmo braço ao qual foi confinado no dia anterior). O tempo que o animal levou para sair desse braço (também com as quatro patas) foi registrado. De forma semelhante, o procedimento foi repetido três vezes, com um intervalo de 30 segundos entre as tentativas, obtendo-se três tempos de fuga (fuga 1, fuga 2 e fuga 3). Cada tentativa foi limitada a um tempo máximo de 300 segundos, sendo excluídos do teste os animais que ultrapassaram esse limite, independentemente dos escores

obtidos nas tentativas anteriores. Todas as tentativas aconteceram no período vespertino, com a luz da sala de testes mantida em 10 lux.

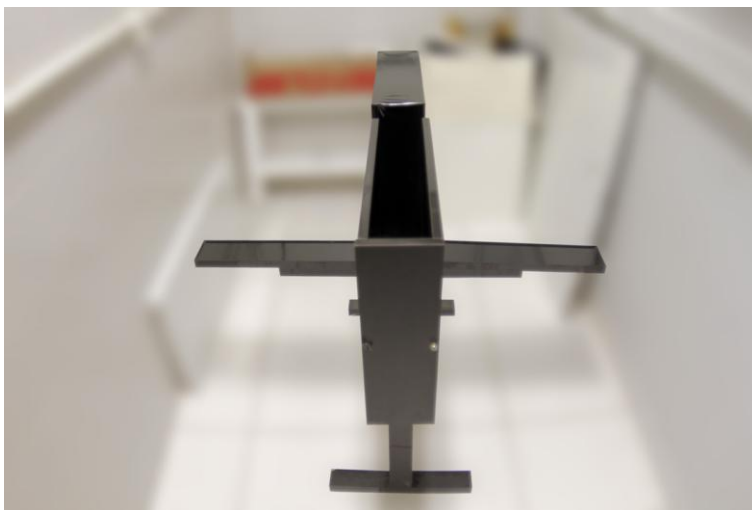


Figura 8 – Aparato utilizado no teste do LTE.

2.3.7 Condicionamento Olfatório do Medo

Para avaliar os efeitos do *locus Anxrr16* sobre respostas defensivas de medo envolvendo condicionamento aversivo, foi realizado o teste do COM. O protocolo utilizado foi idêntico ao descrito por Kroon e Carobrez (2009), exceto pela fonte do estímulo olfatório. Para este teste, dois aparatos diferentes foram utilizados:

- Caixa de condicionamento (Fig. 9a): consistia em uma caixa (*Insight Ltda.*, Ribeirão Preto, Brasil) de alumínio (50 x 26 x 35 cm de altura), com a face frontal e tampa confeccionadas em acrílico transparente. O assoalho da caixa era composto de grades eletrificadas, distanciadas 1 cm entre si, que se conectavam a um sistema gerador de choques que possibilitava a emissão de impulsos elétricos regulados a partir de controladores de intensidade e tempo. O condicionamento foi realizado em um ambiente com som atenuado, temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ \text{C}$) e luminosidade em 80 lux.
- Caixa de testes (Fig. 9b): era inteiramente construída em acrílico e dividida em dois compartimentos: um aberto (40 x 26

x 40 cm de altura) e um fechado (20 x 26 x 40 cm de altura). As paredes frontais de ambos os compartimentos eram feitas de acrílico transparente, permitindo a visualização dos animais no modelo, enquanto as demais paredes eram de acrílico preto. Uma pequena abertura (6 x 6 cm), situada na parede divisória, permitia o livre acesso do animal aos dois compartimentos. Na parede lateral do compartimento aberto (oposta à divisória) existia um pequeno suporte plástico que alojava a fonte do estímulo olfatório. O assoalho da caixa possuía uma marcação localizada a 7 cm do suporte plástico, que serviu como referência para delimitar a área proximal à fonte do estímulo olfatório condicionado. O teste foi realizado em um ambiente com som atenuado, temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ \text{C}$) e intensidade de luz de 4 lux.

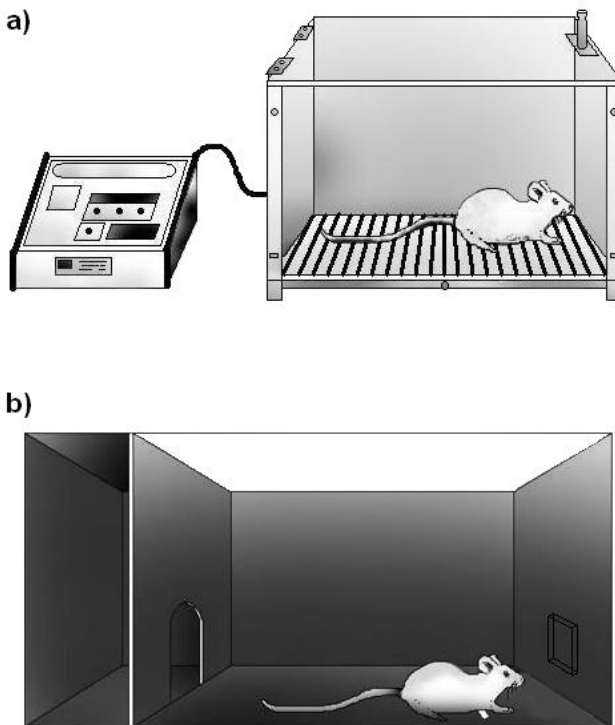


Figura 9 – Representação das caixas de condicionamento (a) e de teste (b) utilizadas no COM. Adaptado de Kroon, 2007.

Neste experimento, os animais de cada linhagem foram divididos em duas condições: pareados e não-pareados, totalizando quatro grupos experimentais (SLA16 pareados e SLA16 não-pareados, SHR pareados, SHR não-pareados). O protocolo foi dividido em duas fases diferentes: a aquisição do COM (dias 1 e 2) e a expressão do COM (dias 3, 4 e 5), ilustradas na Figura 10. Um intervalo de 24 horas foi dado entre cada sessão.

No primeiro dia do condicionamento olfatório de medo, todos os animais foram colocados na caixa de condicionamento para exploração do ambiente, durante 200 segundos, em uma sessão denominada familiarização. Durante esta sessão, os grupos não-pareados foram expostos ao odor de banana (100ul de acetato de amila a 5%, colocado em um pedaço de papel filtro sob as grades do assoalho), um estímulo olfatório neutro, enquanto os grupos pareados não foram expostos a estímulo olfatório algum (Fig. 10a). No dia seguinte, na sessão de condicionamento, os animais foram re-expostos à caixa de condicionamento por mais 200 segundos, ao longo dos quais foram emitidos choques elétricos (estímulo incondicionado) nas patas (5 choques de 0,4 mA por 2 segundos, com intervalo de 40 segundos entre os choques) (Fig. 10b). Desta vez, o odor de banana esteve presente nas sessões dos grupos pareados, enquanto os choques dos grupos não-pareados ocorreram sem a presença do estímulo olfatório.

Para a obtenção das respostas comportamentais basais na caixa de testes, todos os animais foram submetidos ao modelo no terceiro dia, em uma sessão de familiarização (F) (Fig. 10c). Durante a sessão de familiarização, um pequeno pedaço de papel filtro sem odor foi colocado no suporte plástico da parede da caixa. Vinte e quatro horas depois da familiarização (dia 4), foi realizado o primeiro dia de testes (estímulo condicionado 1 – EC1), onde todos os animais foram novamente colocados na caixa de testes, mas desta vez com o papel filtro contendo acetato de amila - que estaria agindo como estímulo olfatório condicionado para o grupo pareado (Fig. 10d). No segundo dia de testes (dia 5, estímulo condicionado 2 – EC2), com o propósito de avaliar a possível ocorrência de um condicionamento de segunda ordem, com o medo condicionado ao contexto, todos os sujeitos foram re-expostos à caixa de testes na presença de um pedaço de papel filtro sem odor (Fig. 10e).

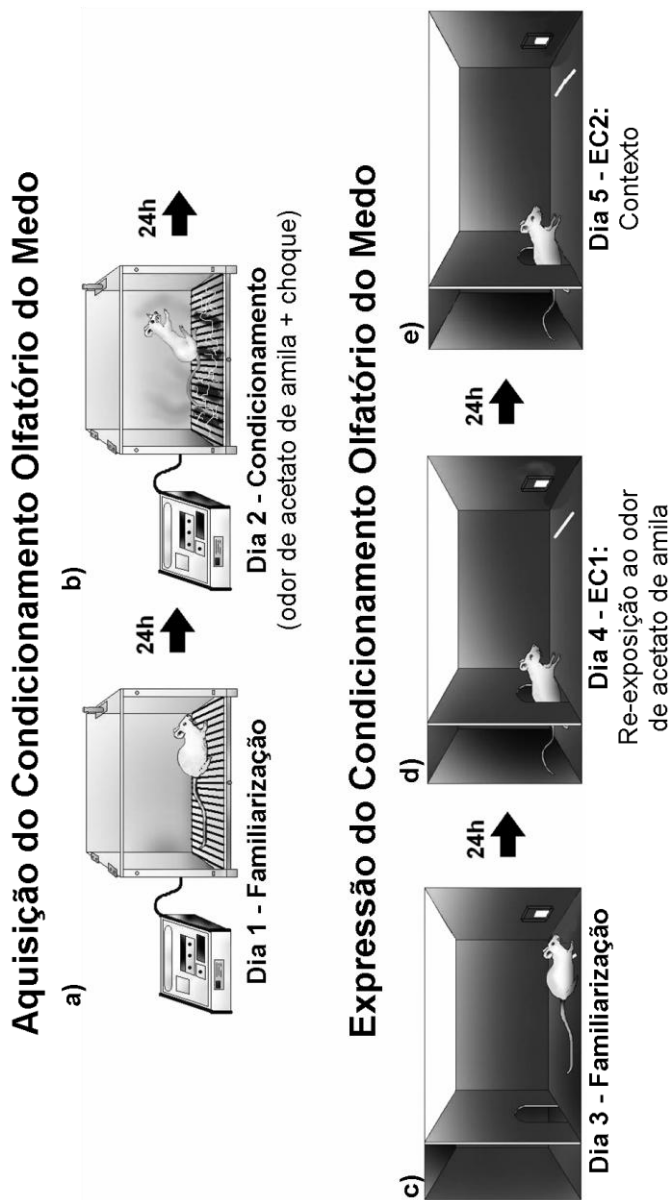


Figura 10 - Esquema das fases de aquisição (a-b) e expressão (c-e) do COM. Adaptado de Kroon e Carobrez, 2009.

Durante os três dias de exposição à caixa de testes (F, EC1 e EC2), os sujeitos foram inicialmente posicionados no compartimento aberto, junto à parede divisória, de frente para o suporte. Os seguintes parâmetros foram avaliados nas sessões de familiarização, EC1 e EC2, durante 10 minutos:

Tempo de aproximação: tempo pelo qual o animal permanece (com pelo menos a cabeça) a uma distância máxima de 7 cm da fonte de odor.

Tempo escondido: período em que o animal permanece dentro do compartimento fechado.

Tempo de avaliação de risco: tempo pelo qual o animal, dentro do compartimento fechado, estende a cabeça através da abertura da parede divisória, na direção da fonte de odor.

2.3.8 Caixas de Atividade

As CATiv foram utilizadas com o objetivo de avaliar a atividade motora dos animais fora dos testes clássicos de ansiedade. Quatro caixas de atividade (Fig. 11) foram utilizadas. Cada caixa de madeira medeia 70 x 27 x 22 cm de altura, possuindo uma tampa acrílica transparente e o fundo formado por uma grade metálica. Três sensores infravermelhos estavam distribuídos ao longo de cada caixa, os quais permitiam estimar a atividade locomotora do animal com base no número de interrupções dos feixes infravermelhos, sendo esse valor mostrado em um *display* digital conectado às caixas. Para o protocolo envolvendo 23,5 horas, uma pequena grade metálica contendo água e ração foi adaptada na tampa de cada caixa. A iluminação utilizada foi idêntica àquela dos biotérios do LGC (onde os animais estavam previamente alojados), incluindo o ciclo claro/escuro de 12 horas (luzes acesas às 7:00 horas).

Caixa de atividade não-familiar

No protocolo da CATiv não-familiar, os animais foram colocados nas caixas distribuídas na sala de testes (4 caixas por sessão/ 1 animal por caixa) e os seus escores de atividade locomotora foram registrados a cada 5 minutos, durante o período de 1 hora. As sessões de teste foram realizadas das 11:00 às 19:00 horas. Por ser um ambiente novo para o animal, espera-se que ele se locomova espontaneamente, mas que tal locomoção possa ser influenciada por um certo grau de medo, especialmente nos primeiros minutos do teste.



Figura 11 – Aparato utilizado no teste da CATiv. A grade metálica foi adaptada para fornecer água e ração aos animais no protocolo familiar.

Caixa de atividade familiar

No protocolo da CATiv familiar, os animais foram igualmente colocados nas caixas de atividade distribuídas na sala de testes (4 caixas por sessão/ 1 animal por caixa), onde permaneceram por 23,5 horas (início do teste às 21:00 horas), com água e comida disponíveis à vontade. No entanto, seus escores de atividade locomotora foram registrados, a cada 30 minutos, apenas nas duas últimas horas de teste (das 18:30 às 20:30 horas), período no qual já se esperava que os animais estivessem familiarizados ao novo ambiente e que sua locomoção não fosse, portanto, influenciada por componentes emocionais ou aversivos.

2.3.9 Mudança da Configuração Atencional (*Attentional set-shifting*)

Este teste foi utilizado com o objetivo de avaliar possíveis diferenças nos níveis de atenção da linhagem congênica em relação à SHR. O MCA é um teste de função cognitiva que consiste na demanda da atenção para um determinado estímulo relevante (por exemplo, a cor), enquanto outros estímulos irrelevantes (formato, cheiro, som, etc.) devem ser ignorados. Em seguida, o estímulo relevante é trocado (para o formato, por exemplo), e tanto a habilidade do animal mudar de

estratégia quanto a sua capacidade de manter a nova estratégia adquirida, são avaliadas (CHESS et al., 2011). Estudos em humanos e em modelos animais têm mostrado relação entre o TDAH e déficits na mudança da configuração atencional (RHODES; COGHILL; MATTHEWS, 2005; KANTAK et al., 2008).

Para este teste, foi utilizado um aparato (Fig. 12) formado por quatro braços (60 x 10 x 20 cm de altura) de madeira, brancos, conectados por uma plataforma central (10 x 10 cm) e elevados a 70 cm do chão. Na parte externa de cada braço existia uma indicação da sua posição espacial na sala (norte, sul, leste ou oeste). A entrada de cada um dos braços possuía um encaixe, no qual uma barreira do mesmo material do aparato podia ser adaptada, bloqueando a entrada daquele braço e conferindo ao aparato um formato de T. Um pedaço de fórmica listrada em preto e branco, do tamanho exato do chão de um braço (60 x 10 cm), foi utilizado como dica visual durante o teste. Todas as sessões de teste aconteceram entre 8:00 e 19:00 horas e, durante esse período, a iluminação da sala de testes foi mantida em 10 lux.



Figura 12 – Aparato utilizado no teste de MCA.

O protocolo utilizado foi uma versão simplificada daquele descrito por Floresco et al. (2006a). Por uma semana antes do início deste teste, todos os animais foram alojados em gaiolas individuais (22 x 30 x 16 cm de altura), com água a vontade e comida restrita a 10g de

ração por dia. Durante esse mesmo período, cada animal foi manipulado diariamente, sempre pelo mesmo experimentador, durante 5 minutos. Um dia antes do início dos testes, 10 grânulos de recompensa (ração *Mini Junior, Royal Canin*®) foram colocados em cada gaiola individual, para que os animais se familiarizassem com ela. O protocolo foi dividido em quatro etapas:

D) Familiarização: No primeiro dia de familiarização, três recompensas foram distribuídas ao longo de cada braço do aparato. Os animais foram posicionados na plataforma central e puderam explorar livremente o aparato - e comer as recompensas - por 15 minutos. Um critério de familiarização foi estabelecido como o consumo dos 12 grânulos em menos de 10 minutos que, uma vez atingido, permitia aos animais passarem para a próxima etapa do teste. Caso o critério não fosse atingido na primeira tentativa, uma segunda era realizada no dia seguinte.

II) Determinação do viés de escolha: No dia após o critério de familiarização ter sido atingido, o braço norte do aparato foi fechado, conferindo ao mesmo um formato de T, e um grânulo de recompensa foi colocado em cada um dos dois braços opostos (esquerda/oeste, direita/leste). O rato foi posicionado na extremidade do braço tronco (sul, nesse caso) e esperou-se que ele entrasse no braço esquerdo ou direito para consumir o primeiro grânulo. Após o consumo do primeiro grânulo, o animal foi repetidamente posicionado no braço tronco até que entrasse no braço contendo o segundo grânulo e o consumisse. A entrada nos dois braços (e o consumo dos dois grânulos) foi considerada uma tentativa. Foram realizadas sete tentativas e a primeira entrada (direita ou esquerda) realizada pelo animal em cada tentativa foi registrada, sendo a direção escolhida por mais vezes considerada o viés de escolha deste animal. Durante esta etapa do teste, a dica visual foi alternada de forma pseudo-aleatória (seguindo um padrão complexo pré-estabelecido).

III) Discriminação de respostas: Na fase de discriminação de respostas (Fig. 13a), iniciada no dia seguinte à determinação do viés de escolha, o animal deveria virar para a direção oposta ao seu viés de escolha para obter a recompensa, independentemente da localização da dica visual (chamada de resposta egocêntrica). Durante as tentativas, a dica visual continuou sendo posicionada de forma pseudo-aleatória (na direita ou na esquerda) e o animal partiu, alternadamente, do oeste, sul ou leste, de forma a desencorajá-lo de utilizar possíveis pistas espaciais presentes na sala de experimentos para tentar localizar a recompensa. Foi dado um intervalo de aproximadamente 20 segundos entre cada

tentativa, durante os quais o animal aguardou em uma caixa de espera, para que o aparato fosse re-configurado. O critério para o aprendizado foi a realização de dez escolhas corretas consecutivas, seguidas de uma “prova real”, que consistiu em mais uma tentativa, tendo o norte como braço de partida e com a dica visual posicionada no lado correspondente ao viés de escolha do animal. Quando feita a escolha incorreta na prova real, mais 5 tentativas consecutivas com escolhas corretas eram necessárias, seguidas de uma nova prova real.

IV) Discriminação da dica visual (MCA): Vinte e quatro horas após a discriminação de respostas, teve início a etapa de discriminação da dica visual (Fig. 13b). Desta vez, para obter a recompensa, o animal deveria escolher o braço no qual a dica visual (ainda disposta pseudo-aleatoriamente) estava localizada, mudando assim a estratégia previamente adquirida. Os mesmos braços de partida e critério de aprendizado da discriminação de respostas foram utilizados. Entradas nos braços que não continham a dica visual foram considerados erros e estes foram divididos em três subtipos, conforme descrito por Floresco et al., 2006a (Fig. 13c). Erros perseverantes foram registrados quando o rato continuou a fazer a mesma resposta egocêntrica requerida na etapa anterior, mesmo quando a dica visual estava posicionada no seu viés de escolha. Quatro de cada oito tentativas demandavam que o animal entrasse no braço do seu viés de escolha, as quais foram agrupadas em blocos de 4 tentativas. Os erros perseverantes foram registrados quando o animal entrou no braço incorreto em três ou mais tentativas a cada bloco. A partir do momento em que o animal fez menos de três erros perseverantes em um bloco, todos os erros subsequentes deste tipo foram registrados como erros regressivos, uma vez que o animal já estava escolhendo uma estratégia alternativa em, pelo menos, metade do tempo. Já os erros nunca-reforçados foram registrados quando o animal entrou no braço errado enquanto a dica visual estava localizada no braço oposto do seu viés de escolha, já que esse tipo de escolha (entrar no braço do seu viés de escolha quando este não possuía a dica visual) nunca foi antes reforçado. Os erros perseverantes refletem a inabilidade do animal em mudar de estratégia, enquanto os erros regressivos e nunca-reforçados são índices da habilidade de adquirir e manter uma nova estratégia (RAGOZZINO, 2002; FLORESCO et al., 2006a). Tanto para a fase de discriminação de respostas quanto para a de discriminação da dica visual, um limite máximo de 100 tentativas foi adotado, após as quais o animal foi eliminado do experimento.

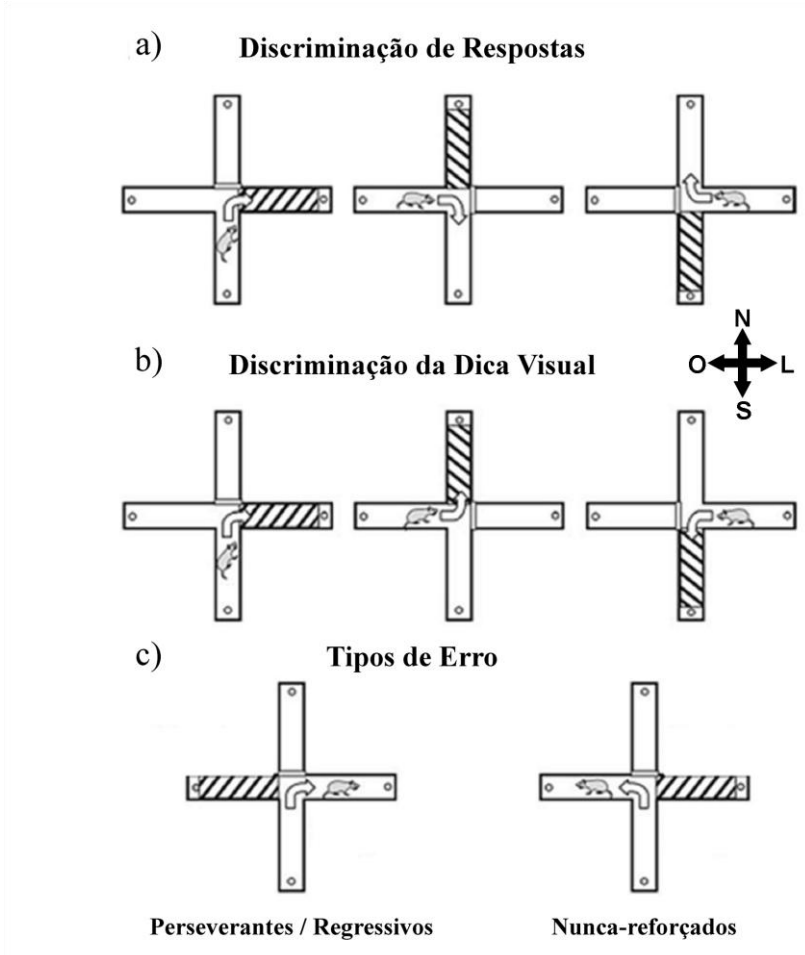


Figura 13 – Esquema das fases que compõem o teste de MCA: discriminação de respostas, na qual o rato precisa virar para o lado oposto ao seu viés de escolha para obter a recompensa, adotando, assim, uma estratégia egocêntrica (a); e discriminação da dica visual, onde, para obter a recompensa, o animal precisa abandonar a estratégia egocêntrica anteriormente aprendida e passar a se guiar pela dica visual (b). Nessa última fase, três tipos de erro podem ser cometidos (c): Os erros perseverantes e regressivos acontecem enquanto o animal insiste em manter a primeira estratégia aprendida, diferindo apenas no momento em que são cometidos, enquanto os erros nunca-reforçados consistem na entrada no braço oposto ao aprendido na estratégia egocêntrica quando ele não contém a dica visual. Adaptado de Floresco et al., 2006a.

2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises estatísticas foram feitas utilizando o software *Statistica 10* (Statsoft, Tulsa, OK, EUA). Experimentos envolvendo a linhagem como único fator foram analisados pelo teste t de Student, enquanto a análise de variância (ANOVA) fatorial foi utilizada quando dois fatores estavam presentes. Os dados longitudinais obtidos no LTE, COM e CATiv não-familiar foram analisados através da ANOVA de medidas repetidas. Sempre que necessário, o teste de comparação de médias (*post-hoc*) *Newman-Keuls* foi aplicado após a ANOVA. Valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

3 RESULTADOS

3.1 REFINAMENTO GENOTÍPICO

Todos os animais das gerações N10F4, N10F5 e N10F6 foram genotipados para 20 marcadores moleculares do tipo microssatélite, distribuídos ao longo do cromossomo 4. Ao longo dos dois anos deste trabalho, mais de 5420 PCR foram realizadas, e seus produtos aplicados em mais de 87 géis de agarose.

O QTL *Anxrr16* foi originalmente descrito como estando mais provavelmente localizado em um intervalo de cerca de 14,4 Mpb (entre os marcadores *D4Rat59* e *D4Mgh6*), entretanto, seu intervalo de confiança abrange uma região maior, com aproximadamente 77,7 Mpb (entre os marcadores *D4Rat37* e *D4Mgh11*) (RAMOS et al., 1999, RAT GENOME DATABASE WEBSITE, 2012). Durante a construção da linhagem congênica SLA16, um intervalo de 86,3 Mpb, entre os marcadores *D4Rat76* e *D4Mgh11* (ver Fig. 14), foi selecionado como o *locus* diferencial, a fim de se ter uma margem de segurança em torno da provável localização do QTL. Na geração N10 (última geração de animais heterozigotos), devido a uma série de dificuldades metodológicas com a genotipagem para o marcador *D4Mgh11*, este foi substituído por *D4Rat59* (na época, o marcador mais próximo de *D4Mgh11* disponível no LGC), o que diminuiu o intervalo selecionado para 65,2 Mpb (PEREIRA, 2010).

Na genotipagem dos animais da geração N10F4, verificou-se que esses animais possuíam uma região de 68,5 Mpb, compreendida entre os marcadores *D4Rat76* e *D4Rat61* (novo marcador, utilizado a partir da N10F4), com alelos da linhagem LEW em homozigose. Entretanto, a região de 17,8 Mpb localizada entre os marcadores *D4Rat61* e *D4Mgh11*, que fazia parte do *locus* diferencial antes da geração N10, estava bastante heterogênea, com a frequência dos alelos SHR em aproximadamente 22%. Em relação ao restante do cromossomo 4, observou-se que a frequência dos alelos SHR estava entre 57% e 100% nos 11 marcadores analisados. Com isso, a partir da geração N10F4, decidiu-se delimitar novamente o *locus* diferencial em uma região de 86,3 Mpb, compreendida entre os marcadores *D4Rat76* e *D4Mgh11*, conforme feito durante a construção dessa linhagem, priorizando-se o acasalamento de animais que tivessem o maior número de alelos do tipo LEW dentro deste intervalo, e do tipo SHR fora dele.

Na geração N10F5 ainda não foi possível observar um aumento na frequência dos alelos LEW no marcador *D4Mgh11* (então em torno

de 69%). Contudo, observou-se que a frequência dos alelos SHR fora do *locus Anxrr16* aumentou, estando entre 80% e 100%.

Por fim, na genotipagem dos animais da geração N10F6, constatou-se que mais de 88% dos alelos no marcador D4Mgh11 já eram do tipo LEW, enquanto um pouco menos de 12% de alelos SHR ainda estavam presentes em animais heterozigotos. Nesta geração, grande parte do cromossomo 4 externa ao *locus Anxrr16* já possuía alelos SHR em frequências superiores a 97%, enquanto algumas regiões ainda permaneciam heterogêneas.

Através do planejamento dos acasalamentos realizados entre os animais da geração N10F6, já foram obtidos animais da geração N10F7 com o genótipo desejado no cromossomo 4, ou seja, com o *locus Anxrr16* (86,3 Mpb, entre os marcadores *D4Rat76* e *D4Mgh11*) inteiramente formado por alelos da linhagem LEW, e com o restante do cromossomo 4 composto exclusivamente por alelos da linhagem SHR. As frequências dos alelos LEW e SHR encontradas durante a genotipagem do cromossomo 4 nas gerações N10F4, N10F5, N10F6 e N10F7 estão representadas na Figura 14.

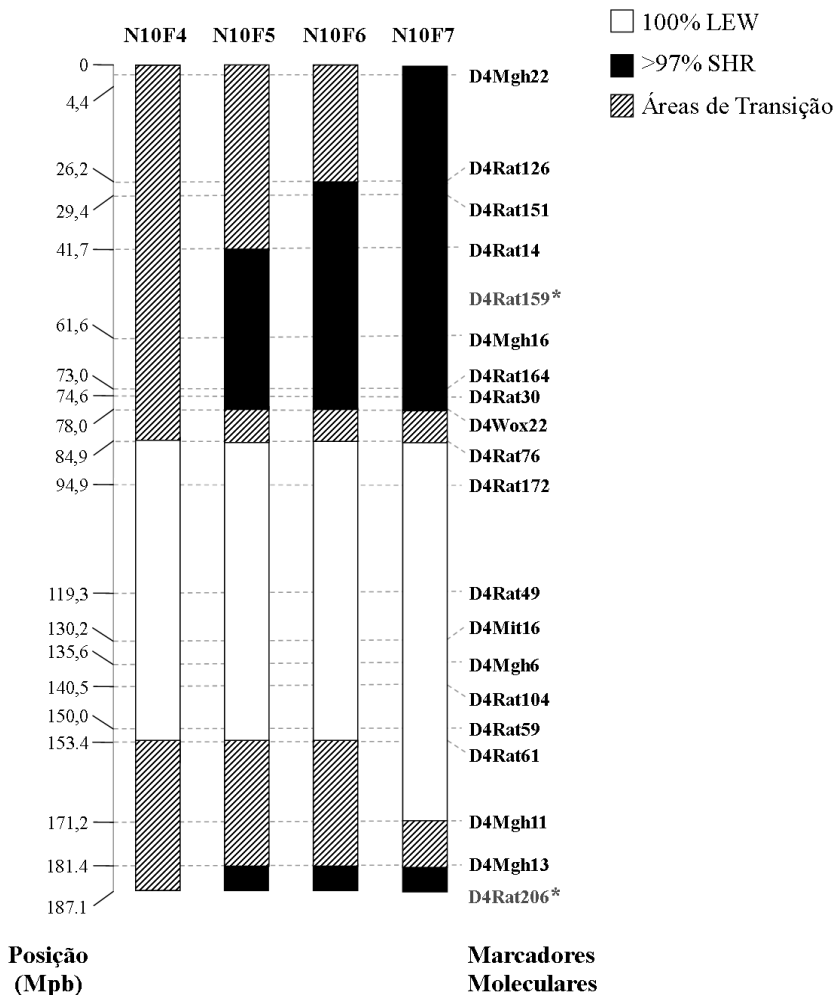


Figura 14 – Representação esquemática da frequência alélica observada nos animais SLA16 das gerações N10F4, N10F5, N10F6 e N10F7. As áreas em preto representam porções do genoma onde mais de 97% dos alelos são do tipo SHR, enquanto as áreas em branco são inteiramente constituídas por alelos do tipo LEW e as áreas hachuradas (de transição) indicam as regiões onde alelos de ambos os tipos ainda são encontrados, em proporções variadas. (*) indicam dois marcadores moleculares cujas posições em Mpb não estão disponíveis no Rat Genome Database, sendo as localizações estimadas com base nas suas posições em centimorgan (Rat Genome Database WEBSITE, 2012a,c).

3.2 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA

A caracterização comportamental dos SLA16 foi realizada seguindo rigorosamente os protocolos anteriormente descritos. Os números amostrais utilizados em cada teste podem ser encontrados nas legendas dos gráficos. Para facilitar a compreensão, os resultados foram agrupados em categorias, de acordo com as principais características avaliadas por cada grupo de testes. Não foram observados *outliers* nos grupos amostrais, exceto no TT, onde o escore de locomoção central no CA de um animal da linhagem SHR ultrapassou 1,96 vezes o desvio padrão das amostras, sendo, por isso, excluído dessa análise.

3.2.1 Fenótipos Relacionados à Ansiedade/Emocionalidade

Campo aberto padrão

No teste do CA padrão (Fig. 15a-c), a ANOVA de duas vias para os fatores linhagem e sexo revelou que os animais SLA16 apresentaram maior locomoção na área central (Fig. 15a) e aversiva do aparato do que os SHR ($F_{(1,90)}=34,07$, $p<0,001$), independentemente do sexo. Uma diferença na mesma direção foi encontrada para a locomoção periférica (Fig. 15b) ($F_{(1,90)}=14,11$, $p<0,001$), uma medida da atividade locomotora. Uma interação significativa entre linhagem e sexo foi detectada na porcentagem da locomoção realizada no centro do aparato (Fig. 15c) ($F_{(1,90)}=4,74$, $p<0,05$), com o teste *post-hoc* revelando que o percentual da locomoção dos machos da linhagem SLA16 realizada no centro do CA foi maior do que o dos machos da linhagem SHR ($p<0,01$). Um efeito geral do sexo também foi observado para estas três variáveis, com as fêmeas apresentando escores mais altos do que os machos ($F_{(1,90)}=50,31$, $p<0,001$ para a locomoção central, $F_{(1,90)}=17,80$, $p<0,001$ para a locomoção periférica e $F_{(1,90)}=10,19$, $p<0,01$ para a porcentagem da locomoção realizada no centro do CA). Nenhum efeito significativo foi encontrado para o tempo permanecido no centro do CA ($p>0,05$, dado não mostrado).

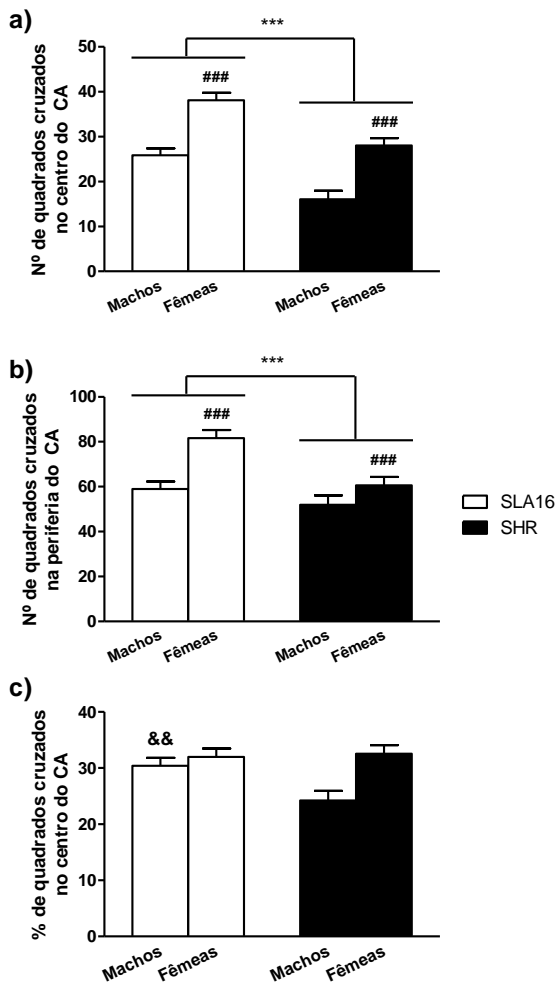


Figura 15 - Número de quadrados cruzados na região central (a) e periférica (b) e porcentagem de quadrados cruzados no centro (c) do CA padrão por machos e fêmeas das linhagens SLA16 (geração N10F4) e SHR (n=18-28/linhagem/sexo). Barras e linhas verticais representam os valores da média e erro padrão da média. (***) representam efeitos gerais significativos do fator linhagem ($p < 0,001$), (###) representam efeitos gerais significativos do fator sexo ($p < 0,001$) e (&&) representa uma interação significativa entre linhagem e sexo ($p < 0,05$), com os machos da linhagem SLA16 cruzando um percentual maior de quadrados no centro do CA do que os machos da linhagem SHR ($p < 0,01$). ANOVA de duas vias para os fatores linhagem e sexo, seguida do teste *post-hoc* Newman-Keuls para a interação entre os fatores linhagem e sexo.

Campo aberto sob alta ou baixa luminosidade

A variação do teste padrão, sob alta ou baixa luminosidade (Fig. 16a-c), não revelou efeito significativo ($p > 0,05$) do fator luminosidade na locomoção central (Fig. 16a) ou periférica (Fig. 16b), sendo as diferenças entre as linhagens mantidas para ambas as variáveis ($F_{(1,58)} = 14,35$, $p < 0,001$ para a locomoção central e $F_{(1,58)} = 15,16$, $p < 0,001$ para a locomoção periférica), com os ratos SLA16 apresentando escores mais altos do que os SHR. Uma interação significativa entre luminosidade e genótipo foi encontrada apenas para o tempo permanecido no centro do aparato ($F_{(1,58)} = 5,97$, $p < 0,05$), com o teste *post-hoc* revelando que a alta luminosidade diminuiu o tempo que os animais da linhagem SHR permaneceram na área central do CA ($p < 0,01$, dado não mostrado). Nenhum efeito significativo foi encontrado para a porcentagem da locomoção realizada no centro do CA (Fig. 16c) ($p > 0,05$).

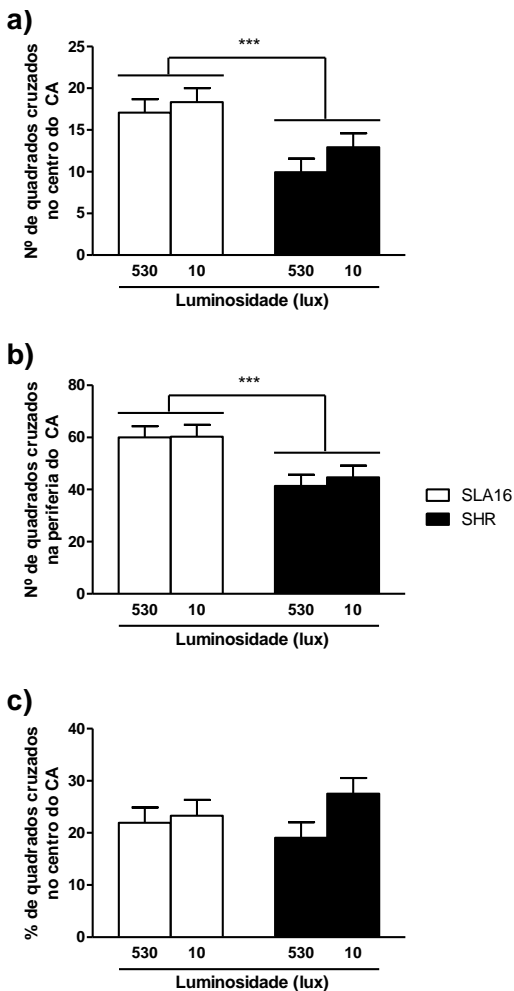


Figura 16 - Número de quadrados cruzados na região central (a) e periférica (b) e porcentagem de quadrados cruzados no centro (c) do CA, sob alta ou baixa luminosidade, por machos das linhagens SLA16 (geração N10F5) e SHR (n=15-16/linhagem/luminosidade). Barras e linhas verticais representam os valores da média e erro padrão da média. (***) representam efeitos gerais significativos do fator linhagem ($p < 0,001$). ANOVA de duas vias para os fatores linhagem e luminosidade.

Campo aberto com controle de ciclo estral

Izídio et al. (2011) sugeriram que os efeitos do *locus Anxrr16* sobre as fêmeas dependiam da fase do ciclo estral na qual elas se encontravam. Com base nisso, o teste do CA foi aqui realizado com fêmeas em diferentes fases do ciclo (Fig. 17a-c), estando o número total de animais por linhagem e por fase do ciclo representado na Tabela 3. Uma ANOVA de duas vias revelou, mais uma vez, um efeito geral da linhagem sobre a locomoção central (Fig. 17a) ($F_{(1,106)}=9,40$, $p<0,01$) e periférica (Fig. 17b) ($F_{(1,106)}=13,99$, $p<0,001$), mas não sobre a porcentagem da locomoção realizada (Fig. 17c) ou o tempo permanecido no centro (dado não mostrado) do CA ($p>0,05$). Nenhum efeito significativo da fase do ciclo estral ou interação significativa entre fase do ciclo e linhagem foram observados nas análises. Entretanto, nas locomoções central e periférica, pode-se observar uma tendência a um maior efeito da linhagem na fase de diestro.

Tabela 3 – Número de fêmeas das linhagens SLA16 e SHR encontradas em cada fase do ciclo estral, imediatamente após o teste do CA.

	SLA16	SHR	Total (fase)
Proestro	22	13	35
Estro	6	11	17
Metaestro	24	25	49
Diestro	5	8	13
Total (linhagem)	57	57	114

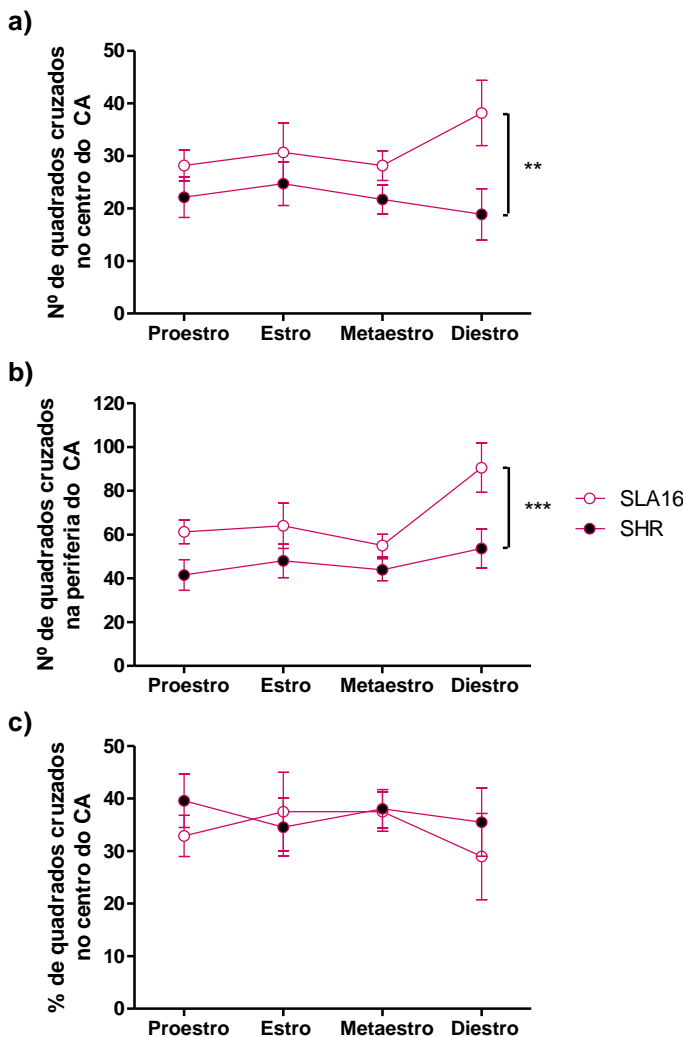


Figura 17 - Número de quadrados cruzados na região central (a) e periférica (b) e porcentagem de quadrados cruzados no centro (c) do CA por fêmeas das linhagens SLA16 (gerações N10F5 e N10F6) e SHR (n=5-25/linhagem/fase do ciclo) em diferentes fases do ciclo estral. Símbolos e linhas verticais representam os valores da média e erro padrão da média. (**) e (***) representam efeitos gerais significativos do fator linhagem ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente). ANOVA de duas vias para os fatores linhagem e fase do ciclo estral.

Devido a uma possível interferência da grande diferença no número de fêmeas encontradas em cada uma das fases, uma nova análise envolvendo somente as fêmeas da segunda leva experimental (leva menos dispare) foi conduzida (número total de animais por linhagem e por fase do ciclo representado na Tabela 4). Nessa análise, foram observados novamente efeitos da linhagem sobre a locomoção central (Fig. 18a) ($F_{(1,52)}=13,53$, $p<0,001$) e periférica (Fig. 18b) ($F_{(1,52)}=17,34$, $p<0,001$), e não sobre a porcentagem da locomoção realizada (Fig. 18c) ou o tempo permanecido no centro (dado não mostrado) do CA ($p>0,05$). Também não foi observado efeito significativo da fase do ciclo estral ou interação significativa entre fase do ciclo e linhagem. Além disso, esta nova análise não confirma a tendência a um maior efeito genotípico na fase do diestro sobre as locomoções central e periférica, evidenciada na análise anterior.

Tabela 4 – Número de fêmeas das linhagens SLA16 e SHR (segunda leva experimental) encontradas em cada fase do ciclo estral, imediatamente após o teste do CA.

	SLA16	SHR	Total (fase)
Proestro	11	6	17
Estro	4	8	12
Metaestro	10	12	22
Diestro	5	4	9
Total (linhagem)	30	30	60

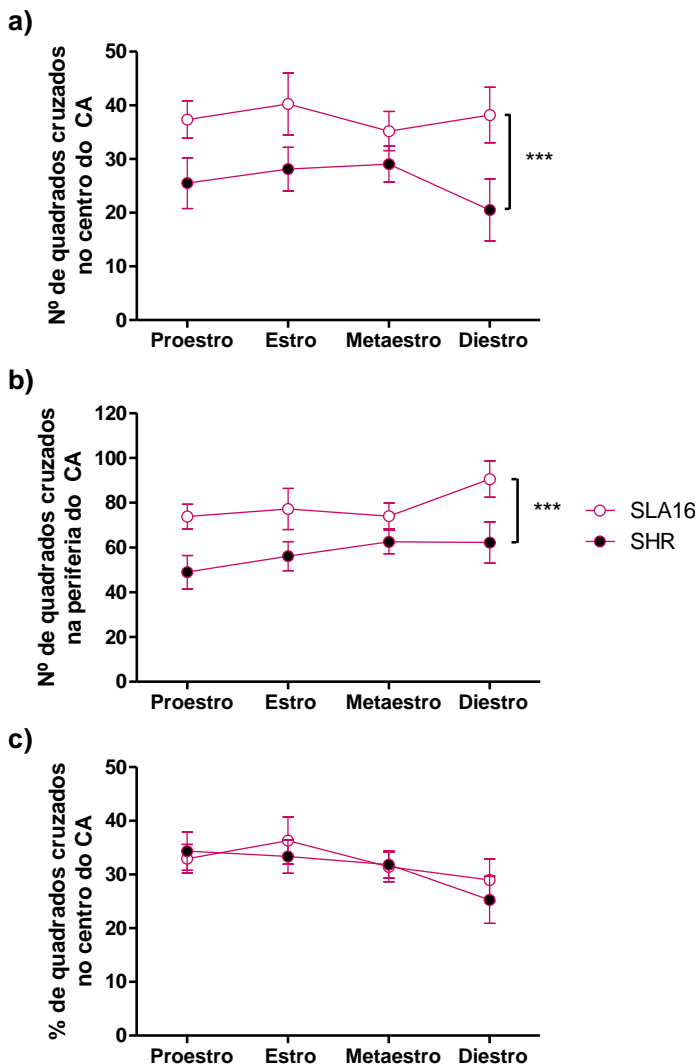


Figura 18 - Número de quadrados cruzados na região central (a) e periférica (b) e porcentagem de quadrados cruzados no centro (c) do CA por fêmeas (segunda leva experimental) das linhagens SLA16 (geração N10F6) e SHR (n=4-12/linhagem/fase do ciclo) em diferentes fases do ciclo estral. Símbolos e linhas verticais representam os valores da média e erro padrão da média. (***) representam efeitos gerais significativos do fator linhagem ($p < 0,001$). ANOVA de duas vias para os fatores linhagem e fase do ciclo estral.

Campo aberto após tratamento com clordiazepóxido

Mais uma vez, a ANOVA de duas vias revelou diferenças entre as linhagens para a locomoção central (Fig. 19a) ($F_{(1,72)}=40,71$, $p<0,001$), para a locomoção periférica (Fig. 19b) ($F_{(1,72)}=7,94$, $p<0,01$), e para a porcentagem da locomoção realizada na área central (Fig. 19c) ($F_{(1,72)}=9,69$, $p<0,01$) do teste do CA, sempre no sentido esperado (escores da linhagem SLA16 maiores do que os da SHR). Apenas para a locomoção central no teste do CA, um efeito significativo do tratamento ($F_{(3,72)}=4,08$, $p<0,01$) foi observado, com o teste *post-hoc* revelando um efeito do tipo ansiogênico da dose de 0,5 mg/kg de CDZ, que fez com que os animais tratados com essa dose (independentemente da linhagem) apresentassem escores mais baixos do que os do grupo controle ($p<0,05$, dado não mostrado). Ainda para essa mesma variável, uma tendência do fator linhagem próxima ao nível de significância foi detectada para a interação entre linhagem e tratamento ($F_{(3,72)}=2,18$, $p=0,097$), com o teste de comparação de médias mostrando que apenas os animais da linhagem SLA16 sofreram efeito do tipo ansiolítico da dose de 10 mg/kg, cuja média diferiu daquela dos animais controle ($p<0,05$), sugerindo, portanto, que esse comportamento está relacionado à ansiedade, ao menos nesta linhagem. Nenhum efeito significativo foi encontrado para o tempo permanecido no centro do CA ($p>0,05$, dado não mostrado).

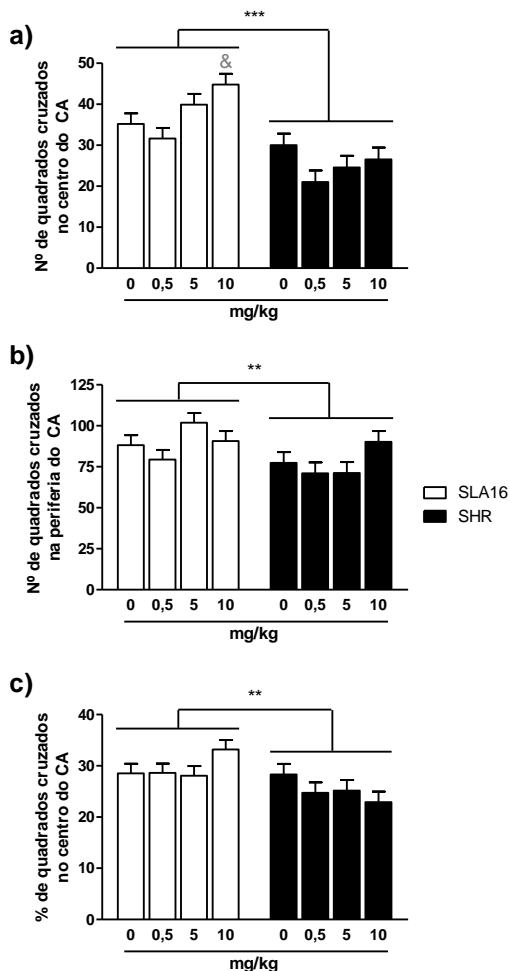


Figura 19 - Número de quadrados cruzados na região central (a) e periférica (b) e porcentagem de quadrados cruzados no centro (c) do CA por machos das linhagens SLA16 (geração N10F6) e SHR tratados com CDZ nas doses de 0 (controle), 0,5, 5 e 10 mg/kg ($n=9-11$ /linhagem/dose). Barras e linhas verticais representam os valores da média e erro padrão da média. (**) e (***) representam efeitos gerais significativos da linhagem ($p<0,01$ e $p<0,001$, respectivamente), e (&) uma tendência marginalmente significativa da interação entre os fatores linhagem e tratamento ($p=0,097$), com os animais tratados com a dose de 10 mg/kg diferindo significativamente dos controles apenas na linhagem SLA16 ($p<0,05$). ANOVA de duas vias para os fatores linhagem e tratamento, seguida do *post-hoc Newman-Keuls* para a interação entre os fatores linhagem e tratamento.

Campo aberto após tratamento com pentilenotetrazol

Já em relação ao experimento realizado com o PTZ no CA (Fig. 20a-c), não foram observados efeitos significativos do tratamento sobre a locomoção central (Fig. 20a) ou periférica (Fig. 20b) ($p > 0,05$). As diferenças entre as linhagens para estas duas variáveis foram apenas sugeridas por tendências marginalmente significativas ($F_{(1,36)}=3,16$, $p=0,084$ e $F_{(1,36)}=3,03$, $p=0,090$, respectivamente). Efeitos inesperados foram encontrados para o tempo permanecido no centro do CA, com um efeito geral da linhagem indicando que os ratos SHR apresentaram escores mais altos do que os dos SLA16 ($F_{(1,36)}=4,12$, $p < 0,05$), e um efeito geral do tratamento, revelando que a dose de 10 mg/kg aumentou o tempo permanecido nesta porção do aparato ($F_{(1,36)}=6,05$, $p < 0,05$) (dados não mostrados). Nenhuma diferença significativa foi observada para a porcentagem da locomoção realizada no centro (Fig. 20c) ($p > 0,05$).

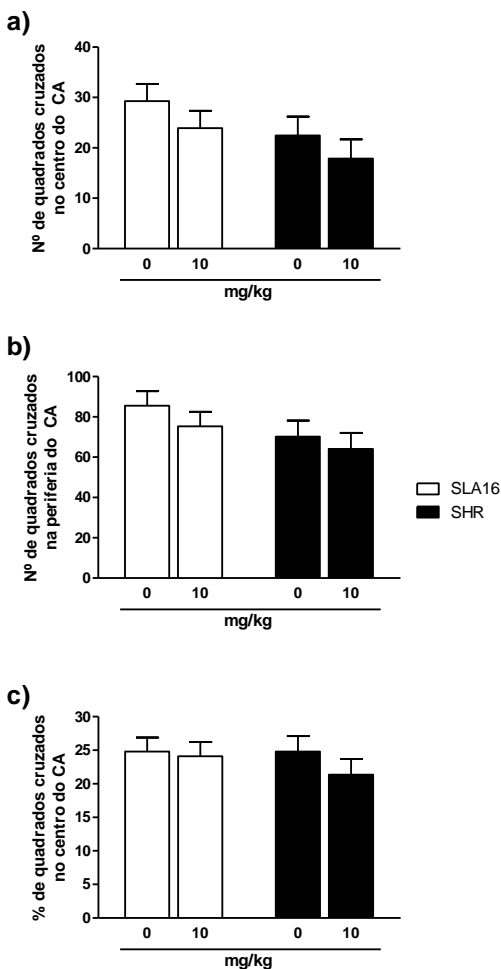


Figura 20 – Número de quadrados cruzados na região central (a) e periférica (b) e porcentagem de quadrados cruzados no centro (c) do CA por machos das linhagens SLA16 (geração N10F6) e SHR tratados com PTZ nas doses de 0 (controle) e 10 mg/kg (n=9-11/linhagem/dose). Barras e linhas verticais representam os valores da média e erro padrão da média. ANOVA de duas vias para os fatores linhagem e tratamento.

Caixa branca e preta padrão

Já na CBP (Fig. 21a-b), a ANOVA detectou diferenças significativas entre as linhagens para o tempo (Fig. 21a) permanecido no

compartimento branco ($F_{(1,89)}=4,58$, $p<0,05$) e para o número de transições realizadas entre os compartimentos ($F_{(1,89)}=8,17$, $p<0,01$) (Fig. 21b), sempre com os ratos SLA16 apresentando escores mais altos do que os SHR. Um efeito geral do sexo também foi detectado sobre estas duas variáveis ($F_{(1,89)}=25,95$, $p<0,001$ para o tempo permanecido no compartimento branco e $F_{(1,89)}=38,90$, $p<0,001$ para o número de transições entre os compartimentos), com as fêmeas apresentando maiores escores do que os machos. Não foram identificadas interações significativas entre linhagem e sexo para essas variáveis ($p>0,05$). Nenhum efeito significativo foi encontrado para as demais variáveis analisadas ($p>0,05$, dados não mostrados).

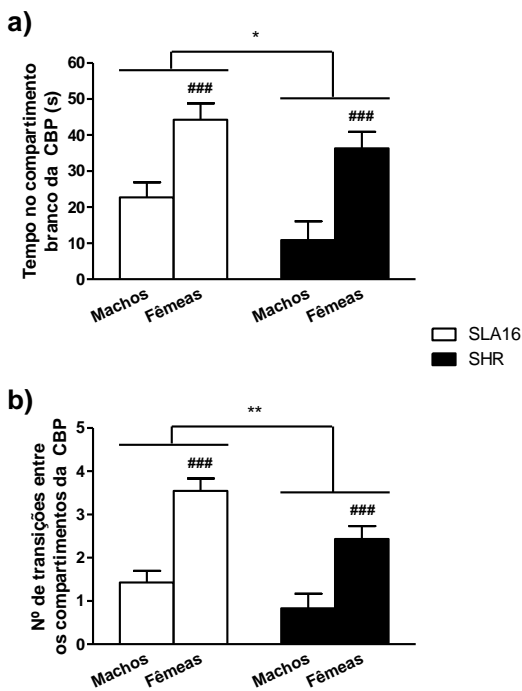


Figura 21 – Tempo permanecido no compartimento branco (a) e número de transições realizadas entre os compartimentos (b) da CBP padrão por machos e fêmeas das linhagens SLA16 (geração N10F4) e SHR ($n=18-28$ /linhagem/sexo). Barras e linhas verticais representam os valores da média e erro padrão da média. (*) e (**) representam efeitos gerais significativos do fator linhagem ($p<0,05$ e $p<0,01$, respectivamente), e (###) representam efeitos gerais significativos do fator sexo ($p<0,001$). ANOVA de duas vias para os fatores linhagem e sexo.

Caixa branca e preta após tratamento com clordiazepóxido

Na CBP (Fig. 22a-b), observou-se apenas um efeito significativo da linhagem sobre o tempo permanecido no compartimento branco (Fig. 22a) ($F_{(1,72)}=4,23$, $p<0,05$), também já detectado anteriormente. Uma tendência marginalmente significativa para o fator linhagem ($F_{(1,72)}=3,29$, $p=0,074$), no sentido esperado, foi observada para a locomoção no compartimento branco (dados não mostrados). Não foram encontrados efeitos significativos do tratamento ou interações significativas entre tratamento e linhagem para o número de transições entre os compartimentos (Fig. 22b) ou para as demais variáveis analisadas (dados não mostrados) ($p>0,05$).

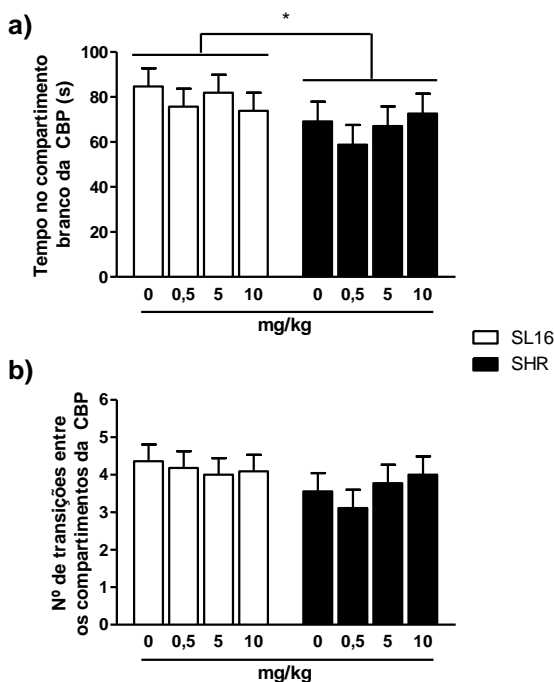


Figura 22 – Tempo permanecido no compartimento branco (a) e número de transições realizadas entre os compartimentos (b) da CBP por machos das linhagens SLA16 (geração N10F6) e SHR tratados com CDZ nas doses de 0 (controle), 0,5, 5 e 10 mg/kg ($n=9-11$ /linhagem/dose). Barras e linhas verticais representam os valores da média e erro padrão da média. (*) representa um efeito geral significativo do fator linhagem ($p<0,05$). ANOVA de duas vias para os fatores linhagem e tratamento.

Caixa branca e preta após tratamento com pentilenotetrazol

Na CBP (Fig. 23a-b) também foram encontradas apenas tendências marginalmente significativas, no sentido esperado, para o fator linhagem nas variáveis tempo permanecido (Fig. 23a) e locomoção no compartimento branco (dado não mostrado) ($F_{(1,34)}=3,99$, $p=0,054$ e $F_{(1,34)}=3,71$, $p=0,062$, respectivamente) e número de transições entre os compartimentos (Fig. 23b) ($F_{(1,34)}=3,55$, $p=0,068$). Foi observado um efeito significativo do tratamento sobre as variáveis locomoção no compartimento branco ($F_{(1,34)}=7,48$, $p<0,01$) e locomoção no compartimento preto ($F_{(1,34)}=9,73$, $p<0,01$), com o PTZ exibindo um efeito hipolocomotor sobre os animais, independentemente da linhagem (dados não mostrados).

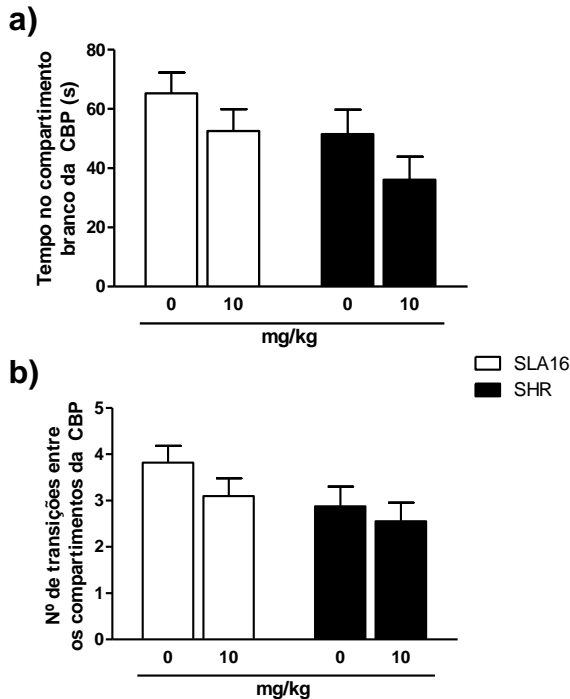


Figura 23 – Tempo permanecido no compartimento branco (a) e número de transições realizadas entre os compartimentos (b) da CBP por machos das linhagens SLA16 (geração N10F6) e SHR tratados com PTZ nas doses de 0 (controle) e 10 mg/kg ($n=9-11$ /linhagem/dose). Barras e linhas verticais representam os valores da média e erro padrão da média. ANOVA de duas vias para os fatores linhagem e tratamento.

Labirinto em cruz elevado

Para o LCE (Fig. 24a-b), a ANOVA revelou diferenças significativas apenas para duas variáveis principalmente envolvidas com a locomoção: entradas nos braços fechados (Fig. 24b) e total de entradas (dados não mostrados). Para ambas, foram observados efeitos gerais do genótipo ($F_{(1,90)}=11,61$, $p<0,001$ para o número de entradas nos braços fechados e $F_{(1,90)}=13,87$, $p<0,001$ para o número total de entradas), com os animais da linhagem SLA16 apresentando escores mais altos do que os SHR; e do sexo ($F_{(1,90)}=9,44$, $p<0,01$ para o número de entradas nos braços fechados e $F_{(1,90)}=4,80$, $p<0,05$ para o número total de entradas), com as fêmeas apresentando escores mais altos do que os machos. Uma tendência do fator linhagem próxima ao nível de significância ($F_{(1,90)}=3,32$, $p=0,072$), no sentido esperado (SLA16 maior do que SHR), foi encontrada para o número de entradas nos braços abertos (Fig. 24a). Não foram identificadas interações significativas entre linhagem e sexo para essas variáveis. Nenhum efeito significativo foi encontrado para o tempo permanecido nos braços abertos ($p>0,05$, dado não mostrado).

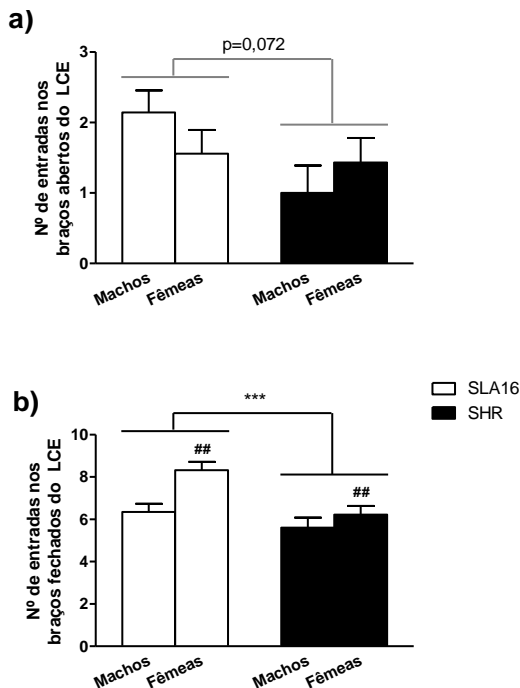


Figura 24 – Número de entradas realizadas nos braços abertos (a) e fechados (b) do LCE por machos e fêmeas das linhagens SLA16 (geração N10F4) e SHR (n=18-28/linhagem/sexo). Barras e linhas verticais representam os valores da média e erro padrão da média. (***) representa um efeito geral significativo do fator linhagem ($<0,001$), (##) representam um efeito geral significativo do fator sexo ($p<0,01$) e ($p=0,072$) representa uma tendência marginalmente significativa do fator linhagem. ANOVA de duas vias para os fatores linhagem e sexo.

Teste triplo

Testes t mostraram que ratos SLA16 apresentaram escores mais altos de locomoção central (Fig. 25a) e periférica (Fig. 25b) no CA; número de entradas (Fig. 25c) e tempo permanecido nos braços abertos (dado não mostrado) e número de entradas nos braços fechados (Fig. 25d) no LCE, quando comparados aos SHR ($p<0,05$ para todas estas variáveis). Não foram encontradas diferenças significativas para o número de transições realizadas entre os compartimentos da CBP (Fig. 25e), para a locomoção no compartimento preto (Fig. 25f) da CBP, ou para as demais variáveis analisadas ($p>0,05$, dados não mostrados).

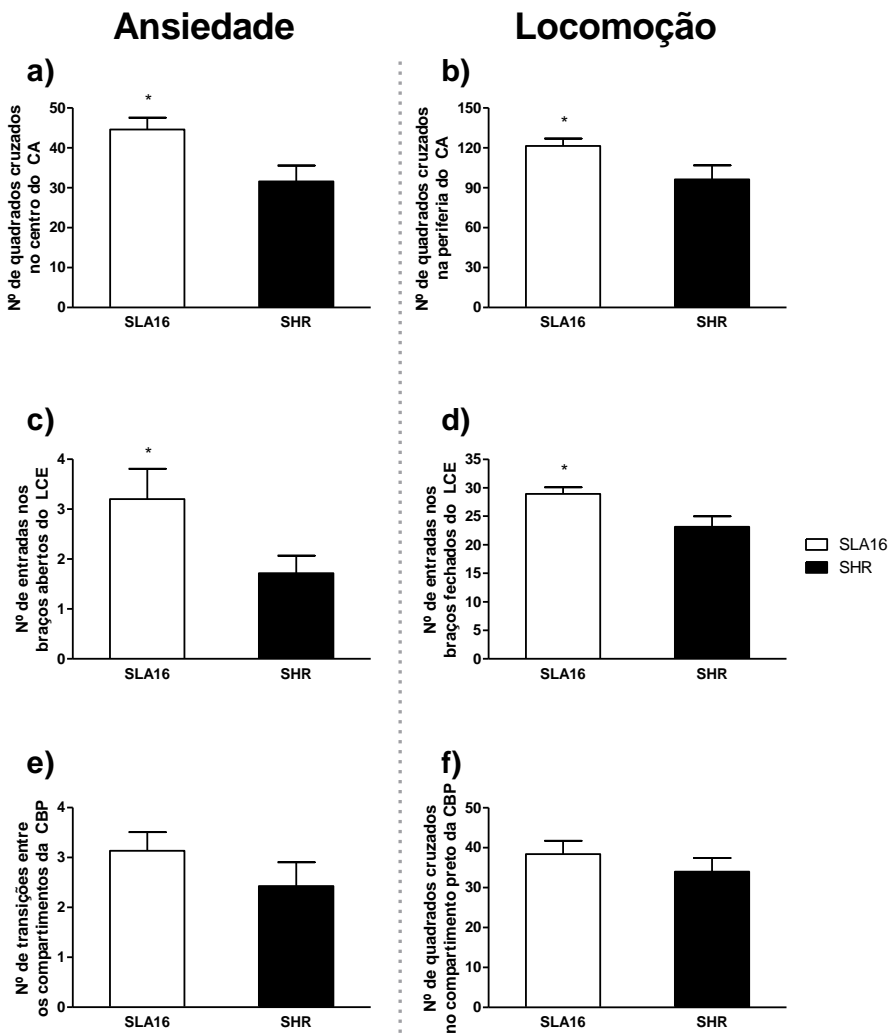


Figura 25 – Número de quadrados cruzados na região central (a) e periférica (b) do CA, número de entradas realizadas nos braços abertos (c) e fechados (d) do LCE e número de transições realizadas entre compartimentos (e) e locomoção realizada no compartimento preto (f) da CBP por machos das linhagens SLA16 (geração N10F6) e SHR (n=14-15/linhagem) durante o TT. As variáveis predominantemente relacionadas à ansiedade ou à locomoção estão representadas na esquerda ou na direita da figura, respectivamente. Barras e linhas verticais representam os valores da média e erro padrão da média. (*) representam efeitos gerais significativos do fator linhagem ($p < 0,05$). Teste t de Student.

Labirinto em T elevado

No teste do LTE (Fig. 26a-b), dois animais ultrapassaram o limite de 300 segundos estabelecido por tentativa, sendo, por isso, excluídos da amostra. A ANOVA de medidas repetidas revelou efeitos gerais significativos do fator genótipo, tanto na esQUIVA inibitória (Fig. 26a) quanto na fuga (Fig. 26b). Na esQUIVA inibitória, os ratos SLA16 exibiram menores latências ($F_{(1,22)}=7,12$, $p<0,05$) do que os SHR. Um efeito geral da sessão também foi identificado ($F_{(2,44)}=5,13$, $p<0,01$), com os escores da esQUIVA 2 sendo maiores do que a latência basal ($p<0,01$). Não houve interação significativa entre linhagem e sessão para esta medida ($p>0,05$). Já na fuga, os animais da linhagem SLA16 fugiram mais rapidamente dos braços abertos do que os SHR ($F_{(1,22)}=4,53$, $p<0,05$). Foi também detectada uma tendência marginalmente significativa para a interação entre linhagem e sessão ($F_{(2,44)}=2,83$, $p=0,070$), com o teste *post-hoc* mostrando que os escores das sessões de fuga 1, 2 e 3 da linhagem SHR diferem entre si ($p<0,05$), sugerindo que há uma redução dos tempos de fuga da linhagem SHR ao longo das sessões, enquanto os da linhagem SLA16 se mantiveram constantes. Não foi detectado efeito da sessão sobre essa variável ($p>0,05$).

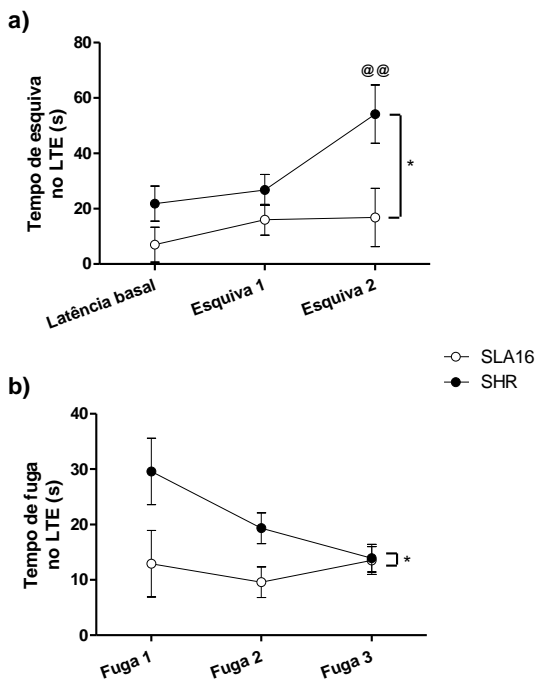


Figura 26 – Tempos de esquiva inibitória (a) e de fuga (b) obtidos através do teste do LTE, realizado com os machos das linhagens SLA16 (gerações N10F5 e N10F6) e SHR (n=12/linhagem). Símbolos e linhas verticais representam os valores da média e erro padrão da média. (*) representam efeitos gerais significativos do fator linhagem ($p < 0,05$) e (@@) representa um efeito geral significativo da sessão, com o tempo de esquiva 2 sendo maior do que a latência basal ($p < 0,01$). ANOVA de medidas repetidas para os fatores linhagem e sessão (repetição), seguida do teste *post-hoc Newman-Keuls* para o fator sessão.

Condicionamento olfatório do medo

Para o COM (Fig. 27a-c), a ANOVA de medidas repetidas com os fatores linhagem, condição (pareado ou não-pareado) e sessão (familiarização, EC1 e EC2) revelou, para todas as três variáveis analisadas (porcentagem de tempo de aproximação da fonte de odor, porcentagem de tempo permanecido no compartimento fechado e tempo gasto em avaliação de risco) um efeito geral significativo da sessão ($F_{(2,72)}=5,44$, $p < 0,01$, $F_{(2,72)}=12,62$, $p < 0,001$ e $F_{(2,72)}=11,21$, $p < 0,001$, respectivamente). O teste de comparação de médias indicou que, em todos os casos, os escores obtidos tanto em EC1 quanto em EC2

diferiram significativamente daqueles da sessão de familiarização (valores de p representados na Fig. 27a-c), independentemente da linhagem ou da condição dos animais. Efeitos do pareamento, dependentes da linhagem ou não, expressos na forma de interações, não foram observados.

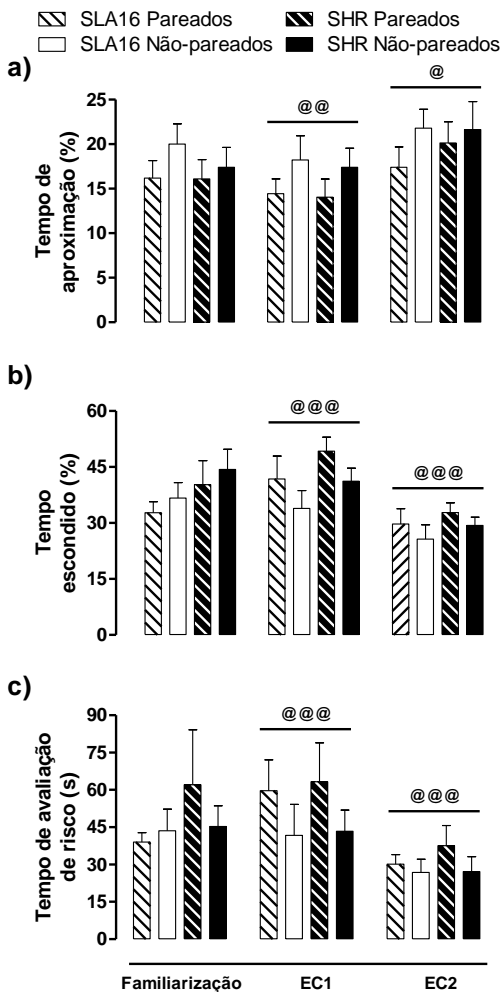


Figura 27 – Porcentagem do tempo gasto em aproximação da fonte de odor (a) ou escondido no compartimento fechado (b), e tempo gasto em avaliação de risco (c) por machos das linhagens SLA16 (geração N10F5 e N10F6) e SHR, divididos nos grupos pareados e não-pareados ($n=10$ /linhagem/grupo), durante as sessões de familiarização, EC1 e EC2 no teste do COM. Barras e linhas verticais representam os valores da média e erro padrão da média. (@), (@@) e (@@@) representam efeitos gerais significativos da sessão, com os escores de EC1 e de EC2 diferindo daqueles da familiarização ($p<0,05$, $p<0,01$ e $p<0,001$, respectivamente). ANOVA de duas vias para medidas repetidas, para os fatores linhagem, condição e sessão (repetição), seguida do teste *post-hoc Newman-Keuls* para o fator sessão.

3.2.2 Fenótipos Relacionados ao TDAH

Caixas de atividade não-familiar e familiar

A ANOVA de duas vias detectou diferenças locomotoras entre as linhagens na CATiv não-familiar, tanto no primeiro (0-10) quanto no último (50-60) intervalo de 10 minutos ($F_{(1,84)}=9,98$, $p<0,01$ e $F_{(1,84)}=7,32$, $p<0,01$, respectivamente), assim como diferenças entre os sexos ($F_{(1,84)}=24,78$, $p<0,001$ e $F_{(1,84)}=23,90$, $p<0,001$, respectivamente) (Fig. 28a). Uma ANOVA de medidas repetidas com os escores obtidos a cada 5 minutos (não-cumulativos) revela efeitos significativos da linhagem ($F_{(1,84)}=15,54$, $p<0,001$, SLA16>SHR), do sexo ($F_{(1,84)}=74,14$, $p<0,001$, fêmeas>machos) e do tempo ($F_{(11,924)}=73,24$, $p<0,001$), mas não interações entre sexo e linhagem, tempo e sexo, tempo e linhagem ou tempo, sexo e linhagem ($p>0,05$) (Fig. 28b). Contudo, apesar da interação entre tempo e linhagem não ter sido estatisticamente significativa, é possível sugerir um efeito do tempo sobre as diferenças motoras entre as linhagens, sobretudo em machos. Neles, a partir dos 40 minutos de teste, em 4 dos 5 períodos analisados (ou seja, 80% das amostras de tempo) as médias das duas linhagens são praticamente idênticas. Essa variação na diferença entre as linhagens ao longo do tempo foi confirmada na análise dos últimos 30, 60, 90 e 120 minutos de teste na CATiv familiar (últimos 60 minutos representados na Fig. 29), onde a diferença entre as linhagens desaparece após 21,5 horas de habituação ($p>0,05$).

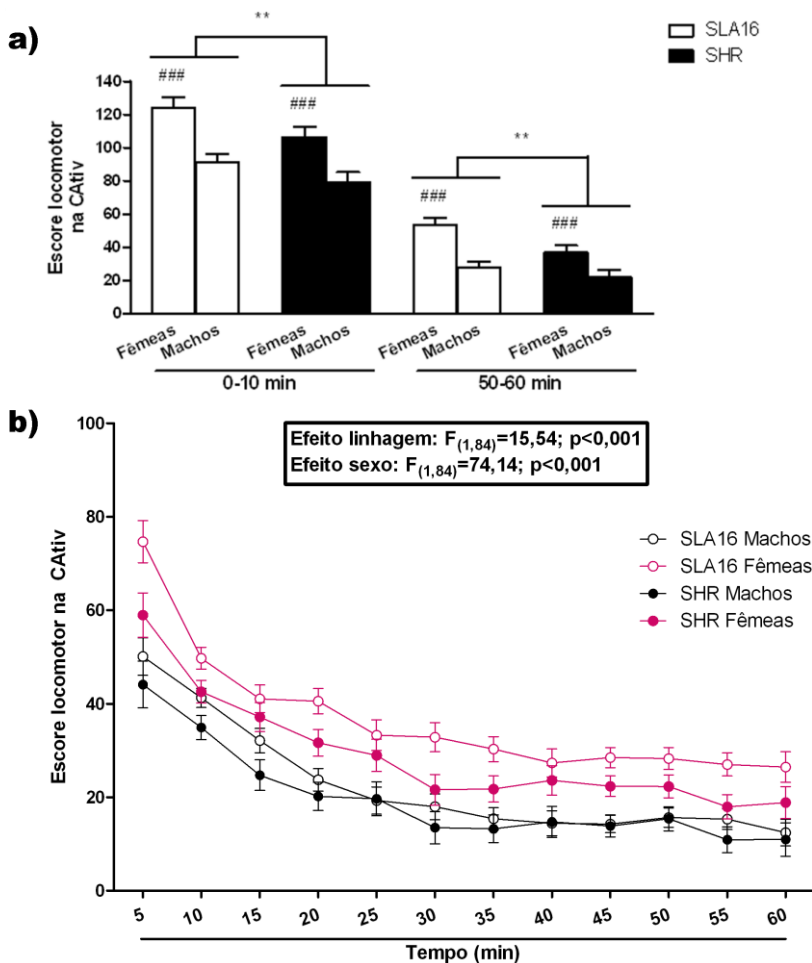


Figura 28 – Número de interrupções dos feixes infravermelhos na CATiv durante os primeiros e últimos 10 minutos de teste (a), e a cada 5 minutos (não-cumulativos) (b), durante a sessão de 60 minutos do protocolo não-familiar. O protocolo não-familiar foi realizado com machos e fêmeas das linhagens SLA16 (geração N10F4) e SHR (n=18-28/linhagem/sexo). Símbolos ou barras e linhas verticais representam os valores da média e erro padrão da média. (**) representam efeitos gerais significativos do fator linhagem ($p<0,01$), e (###) representam efeitos gerais significativos do fator sexo ($p<0,001$). ANOVA de duas vias para os fatores linhagem e sexo (a) e ANOVA de medidas repetidas para os fatores linhagem, sexo e tempo (repetição) (b).

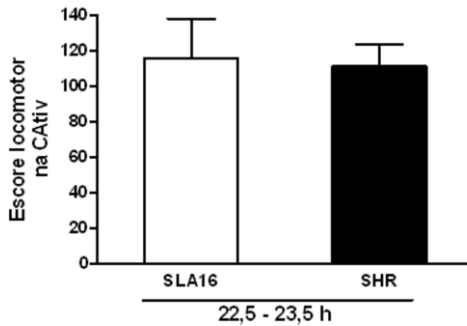


Figura 29 – Número de interrupções dos feixes infravermelhos na CATiv na última hora de teste do protocolo familiar. O protocolo familiar foi realizado apenas com os machos das linhagens SLA16 (geração N10F5) e SHR (n=10/linhagem). Barras e linhas verticais representam os valores da média e erro padrão da média. Teste t de Student.

Mudança da configuração atencional

Durante a realização do teste da MCA (Fig. 30a-b), 2 animais da linhagem SLA16 ultrapassaram o limite de 100 sessões previamente estabelecido, sendo, portanto, excluídos da amostra. O teste t revelou diferença significativa da linhagem apenas para o número de sessões para atingir o critério de aprendizado na discriminação de respostas (Fig. 30a) ($p < 0.05$), com os ratos SHR necessitando de um maior número de sessões do que os SLA16. As duas linhagens não diferiram no número de sessões para atingir o critério de aprendizado (Fig. 30a), nem no número ou tipo de erros cometidos (Fig. 30b) durante a fase de discriminação da dica visual.

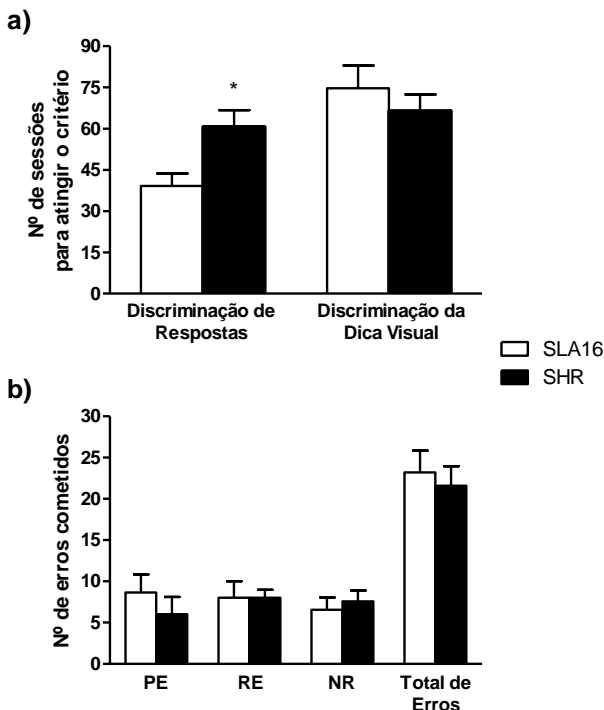


Figura 30 – Número de sessões necessárias para atingir o critério nas fases de discriminação de respostas e de discriminação da dica visual (a) e número de erros cometidos durante a fase de discriminação da dica visual (b) no teste de MCA por machos das linhagens SLA16 (geração N10F5 e N10F6) e SHR (n=9-12/linhagem). Os erros estão representados por tipo (perseverantes – PE, regressivos – RE e nunca-reforçados – NR) ou agrupados na forma do número total de erros. Barras e linhas verticais representam os valores da média e erro padrão da média. (*) representa um efeito significativo da linhagem ($p < 0,05$). Teste t de Student.

4 DISCUSSÃO

Um dos principais objetivos deste estudo foi delimitar fisicamente e avaliar os efeitos do *locus Anxrr16*, localizado no cromossomo 4 do rato, sobre comportamentos relacionados à ansiedade e outros fenótipos associados. Isto foi feito através do refinamento genotípico da linhagem congênica SLA16, acompanhado de uma série de testes comportamentais relacionados à ansiedade, à atividade locomotora, à flexibilidade comportamental e à atenção.

Como já relatado anteriormente, durante a construção da linhagem congênica SLA16 o *locus Anxrr16* foi definido em uma região de 86,3 Mpb, flanqueada pelos marcadores moleculares *D4Rat76* e *D4Mgh11*. No entanto, os animais testados durante este trabalho possuíam uma região menor, de cerca de 68,5 Mpb, em homozigose para alelos da linhagem LEW. Essa diminuição do tamanho do *locus* diferencial foi provavelmente causada pelo abandono do marcador molecular *D4Mgh11* durante a genotipagem da geração N10, o que reduziu o tamanho da região selecionada de 86,3 Mpb para 65,2 Mpb naquela geração, que foi a última originada a partir de um retrocruzamento. Ainda assim, a frequência de alelos SHR no fragmento do *locus Anxrr16* que ainda não é homozigoto para alelos da linhagem LEW (que possui cerca de 17,8 Mpb, entre os marcadores *D4Rat61* e *D4Mgh11*) é baixa, estando entre 0% e 31% nas gerações aqui avaliadas.

Dessa forma, podemos dizer que as diferenças comportamentais encontradas entre as linhagens SLA 16 e SHR são muito provavelmente causadas pelo *locus Anxrr16*, uma vez que, desde a geração N10F1, a imensa maioria (mais de 99,9%) do genoma dos ratos SLA16 fora do cromossomo 4 já era constituída por alelos SHR. Além disso, conforme as gerações foram sendo selecionadas, a proporção de alelos SHR nas porções do cromossomo 4 externas ao *locus Anxrr16* aumentou, o que deixa ainda maior a probabilidade do(s) gene(s) causador(es) das diferenças observadas estar(em) dentro desse *locus*. Devemos também considerar que o DNA residual originário da linhagem LEW ainda presente nas regiões externas ao *locus Anxrr16* (menos de 0,1% do genoma) encontra-se aleatoriamente distribuído em diferentes pontos do genoma de cada rato congênico analisado, o que torna extremamente improvável a contribuição desses alelos para os efeitos aqui observados.

Em relação ao protocolo padrão do teste do CA, a influência do *locus Anxrr16* sobre a locomoção central, supostamente relacionada à ansiedade, é nítida, o que corrobora os efeitos deste QTL descritos por

Ramos et al. (1999). Diversos estudos reportaram que os efeitos de *Anxrr16* somente estavam presentes em fêmeas (RAMOS et al., 1999; VENDRUSCOLO et al., 2006a), ou em machos (IZÍDIO et al., 2011) ou em ambos os sexos (MORMÈDE et al., 2002; HAMEISTER et al., 2008). O presente estudo indica que esta diferença está presente em animais de ambos os sexos, o que pode ter sido revelado graças à robustez da ferramenta utilizada, através da qual é possível avaliar os efeitos do *locus Anxrr16* de forma praticamente isolada. As diferenças comportamentais encontradas nesse estudo também estão de acordo com a natureza críptica deste QTL, já que a presença dos alelos da linhagem LEW no *locus Anxrr16* parece aumentar a exploração de ambientes novos e/ou aversivos, conforme já relatado em estudos anteriores envolvendo essa região (RAMOS et al., 1999; MORMÈDE et al., 2002; VENDRUSCOLO et al., 2006a; IZÍDIO et al., 2011). Entretanto, diferenças relacionadas à locomoção periférica – que é frequentemente considerada um índice da atividade locomotora – foram também encontradas. Diversos autores sugerem que medidas tidas como locomotoras podem também ser moduladas por diferentes níveis de ansiedade (WEISS et al., 1998; MORMÈDE et al., 2002; ROY et al., 2009), uma vez que em vários testes de ansiedade baseados no comportamento exploratório, dentre eles o CA, não é possível realizar uma completa separação entre os comportamentos relacionados à ansiedade ou à locomoção (TAKAHASHI et al., 2006). Além disso, estes resultados são consistentes com estudos anteriores, que mostram uma correlação genética entre a locomoção central e periférica no CA (MORMÈDE et al., 2002; IZÍDIO et al., 2011).

Um efeito geral do sexo pôde ser observado sobre as locomoções central e periférica, sempre com as fêmeas apresentando escores mais altos do que os machos. Estas diferenças na atividade são frequentemente encontradas quando o CA é realizado com animais de ambos os sexos (RAMOS et al., 1997; RAMOS et al., 2002; HINOJOSA et al., 2006; IZÍDIO et al., 2011), e vem sendo relatada desde os primeiros experimentos com esse aparato (HALL, 1934).

Apesar de interações significativas entre linhagem e sexo não terem sido observadas para as medidas de locomoção central ou periférica no CA padrão, é observada uma tendência, principalmente das fêmeas, em diferir nessas medidas relacionadas à locomoção - independentemente do componente emocional envolvido - mas não na porcentagem de locomoção central, medida esta que tenta dissociar o componente motor do emocional. Já os machos das duas linhagens mostram uma tendência a diferir principalmente na locomoção central, e

uma interação significativa entre linhagem e sexo foi observada na porcentagem de locomoção central no CA, com apenas os machos diferindo no sentido esperado. Entretanto, na locomoção periférica, uma medida majoritariamente locomotora, os escores dos machos de ambas as linhagens permanecem bastante próximos, ao contrário dos das fêmeas. Com isso, seria possível imaginar que, apesar das linhagens diferirem independentemente do sexo nas medidas de locomoção central e periférica no teste do CA, a contribuição das fêmeas para esta diferença seria principalmente de ordem locomotora, enquanto a contribuição dos machos estaria mais associada à emocionalidade. Esta hipótese poderia ser confirmada utilizando-se um número amostral maior, sobretudo de machos, uma vez que nesta geração apenas 18 machos da linhagem SHR estavam disponíveis para teste, o que pode ter mascarado possíveis interações entre linhagem e sexo.

Os resultados do teste do CA sob alta ou baixa luminosidade – desta vez com um número amostral de 31 animais por linhagem - vão de encontro à hipótese das diferentes contribuições dos sexos para o efeito da linhagem. Esse teste foi realizado apenas com os machos da geração N10F5, e, ainda assim, efeitos robustos do *locus Anxrr16* foram mantidos não apenas sobre a locomoção central, mas também sobre a periférica, sempre no sentido esperado. O único efeito que a luminosidade teve nesse protocolo, que na verdade trata-se de uma interação significativa entre linhagem e luminosidade, foi sobre o tempo permanecido no centro do CA, onde a alta luminosidade mostrou ser um estímulo ansiogênico apenas para os animais da linhagem SHR. Esta diferença na reatividade emocional provocada pela luminosidade pode corroborar os efeitos do *locus Anxrr16* como não sendo puramente locomotores, uma vez que o tempo permanecido no centro do CA não é diretamente afetado pela atividade locomotora dos animais. Desta forma, o *locus Anxrr16* estaria afetando, ao mesmo tempo, uma medida de locomoção majoritariamente relacionada ao estado emocional (central), a atividade locomotora *per se* (periférica), e uma medida de emocionalidade menos afetada pela atividade motora (tempo permanecido no centro). Ao contrário do observado no teste do CA realizado com machos e fêmeas, não foi encontrado aqui um efeito geral da linhagem sobre a porcentagem de locomoção central. A ausência de efeito da luminosidade sobre as variáveis analisadas (exceto na interação entre linhagem e luminosidade encontrada para o tempo permanecido no centro) está de acordo com os resultados obtidos por Ramos et al. (2002), que encontraram diferenças significativas entre as linhagens LEW e SHR para medidas relacionadas à ansiedade no CA,

independentemente da luminosidade utilizada no teste. Cabe lembrar que, mesmo sob luz fraca, o CA é um ambiente novo e, portanto, potencialmente aversivo para os animais.

O teste do CA seguido da análise do ciclo estral mostrou que as diferenças já encontradas na locomoção central e periférica se mantêm, independentemente da fase do ciclo estral na qual as fêmeas se encontram. Izídio et al. (2011) encontraram um QTL sugestivo para a locomoção central no CA, na mesma região do *locus Anxrr16*, apenas no grupo das fêmeas nas fases de diestro e proestro. Novamente, por se tratar de uma ferramenta genética mais “limpa”, e, por isso, ser capaz de evidenciar os efeitos deste *locus* sem tanta interferência da heterogeneidade do restante do genoma (como nos estudos com gerações F2, por exemplo), a linhagem congênica pode ter possibilitado a detecção de diferenças entre as linhagens que na análise de Izídio et al. (2011) só foram detectadas na fase onde estas são mais pronunciadas. Esses resultados também estão de acordo com os do CA padrão e do CA sob alta ou baixa luminosidade, onde as mesmas diferenças na locomoção central e periférica foram observadas. Contudo, mesmo na análise feita apenas com a segunda leva experimental, a disparidade no número de fêmeas obtido nas diferentes fases do ciclo estral pode ter mascarado efeitos das fases ou interações entre fase e linhagem.

No teste do CA realizado com animais previamente tratados com CDZ, também foram observadas as diferenças significativas entre as linhagens para a locomoção central e periférica, o que reforça a consistência e robustez dessas diferenças. As linhagens também apresentaram diferença significativa para a porcentagem da locomoção realizada no centro do CA, do mesmo modo que no CA padrão.

O efeito ansiolítico esperado do tratamento com CDZ se manifestou através de uma tendência ao aumento da locomoção central, exibido apenas por animais da linhagem SLA16 tratados com a dose de 10mg/kg (em relação aos controles da mesma linhagem). O CA é um teste parcialmente sensível ao efeito ansiolítico das benzodiazepinas clássicas, apesar de ser insensível a outros compostos eficazes no tratamento do transtorno de ansiedade generalizada ou de pânico – como o alprazolam e o tratamento crônico com inibidores seletivos da recaptação de serotonina (PRUT; BELZUNG, 2003). Na literatura, é possível encontrar diversos estudos que relatam o efeito ansiolítico do CDZ sobre ratos no teste do CA (SANGER; ZIVKOVIC, 1988; ANGRINI; LESLIE; SHEPHARD, 1998; VENDRUSCOLO et al., 2003; KNOLL et al., 2007), normalmente verificado através de comportamentos associados ao centro deste aparato. Apesar disso,

outros estudos também relatam a ausência de efeito destes compostos no CA (SANGER; ZIVKOVIC, 1988; RAMOS et al., 2008; WEHRMEISTER et al., 2010). Dentre os fatores que podem estar influenciando esta variedade de respostas, estão as doses e vias de administração, as linhagens, e as variações no protocolo utilizado (PRUT; BELZUNG, 2003). Esta possível diferença na resposta das linhagens ao CDZ pode estar refletindo uma menor sensibilidade da linhagem SHR às benzodiazepinas. Mais estudos envolvendo ambas as linhagens e diferentes compostos benzodiazepínicos, bem como outras classes de ansiolíticos, poderão esclarecer melhor esta relação.

De forma contrária ao esperado, um efeito ansiogênico foi encontrado para a dose de 0,5 mg/kg de CDZ, a qual diminuiu a locomoção central dos animais, independentemente da linhagem. Entretanto, a literatura também reconhece que doses moderadas de benzodiazepinas podem diminuir a atividade em ratos (PRUT; BELZUNG, 2003), o que pode explicar esse efeito. Assim, apesar de serem possivelmente menos sensíveis aos efeitos ansiolíticos do CDZ, os SHR parecem responder de forma semelhante aos SLA16 à diminuição da atividade causada por doses moderadas deste composto, uma vez que apenas um efeito geral da dose foi detectado. O fato do tratamento com CDZ ter exibido efeito, sendo ele ansiolítico ou ansiogênico, apenas sobre locomoção central (e não sobre a locomoção periférica) indica que a droga não teve efeito sedativo em nenhuma das doses utilizadas.

Já no teste do CA realizado com animais previamente tratados com PTZ, apenas tendências marginalmente significativas do fator linhagem sobre a locomoção central e periférica foram observados. Isto se deve provavelmente ao pequeno número de animais testado por linhagem (n=20), quando comparado aos demais testes do CA realizados (que variavam entre 31 e 57 animais por linhagem), ou à baixa dose utilizada. Um efeito geral significativo da linhagem foi encontrado somente para o tempo permanecido no centro do CA, porém no sentido contrário ao esperado: com os animais da linhagem SHR permanecendo mais tempo no centro do CA do que os SLA16. Esse é um resultado difícil de ser explicado, uma vez que, dentro de todas as variações do CA realizadas nesse trabalho, esta é a primeira e única vez em que a linhagem SHR exibe um comportamento menos “ansioso” do que a linhagem SLA16. Um efeito inesperado do tratamento também foi encontrado para essa mesma variável, com os animais tratados com 10 mg/kg de PTZ permanecendo mais tempo no centro do CA do que os tratados com salina. O efeito ansiogênico e hipolocomotor do PTZ sobre

ratos, inclusive no teste do CA, é frequentemente relatado (PELLOW et al., 1985; RAMOS et al., 1997; RAMOS et al., 2008), e este maior tempo permanecido no centro do aparato pelos animais tratados poderia estar refletindo uma menor atividade motora dos mesmos, que os faria levar mais tempo para se deslocar do centro (ponto de partida do teste) para a periferia do aparato. Contudo, devido à disponibilidade de um número limitado de animais, apenas uma dose de PTZ foi utilizada nesse experimento, fazendo com que os resultados obtidos careçam da comparação com outras doses dessa droga. Tal comparação poderia contribuir na elucidação deste efeito inesperado.

Resumidamente, os resultados obtidos através do teste do CA, realizado com animais das diferentes gerações e com variações do protocolo experimental, revelam diferenças robustas (e independentes do sexo) entre as linhagens nas medidas de locomoção central – um índice experimental de ansiedade – bem como na medida de locomoção periférica – que reflete majoritariamente a atividade motora, mas que também pode sofrer influência do estado emocional dos animais. Além disso, diferenças significativas entre os machos de ambas as linhagens na porcentagem da locomoção realizada na área central e no tempo permanecido no centro do CA – variáveis também relacionadas à ansiedade, mas que não envolvem tão fortemente o componente motor – foram encontradas em algumas variações do protocolo. O tratamento com o ansiolítico CDZ apresentou uma tendência próxima ao nível de significância para dose mais alta utilizada somente na linhagem SLA16. De uma forma geral, estes resultados sugerem que os efeitos do *locus Anxrr16* sobre a locomoção central no CA podem estar relacionados com a ansiedade.

Em relação aos resultados obtidos no teste da CBP padrão, foram observados efeitos da linhagem e do sexo, no sentido esperado, sobre as variáveis tempo e porcentagem de tempo permanecido no compartimento branco, e número de transições entre os compartimentos, todas medidas relacionadas à ansiedade (CRAWLEY, 1981; COSTALL et al., 1989; CHAOULOFF; DURAND; MORMÈDE, 1997). No experimento envolvendo CBP e CDZ, os machos das duas linhagens também diferiram no tempo permanecido no compartimento branco, e uma diferença marginalmente significativa foi encontrada para a locomoção nesse compartimento, sempre no sentido esperado (SLA16 apresentando escores mais altos em relação aos SHR). Curiosamente, nenhum efeito do tratamento com o CDZ foi observado na CBP, inclusive sobre as transições, o que seria esperado se considerarmos que o teste da CBP foi inicialmente proposto com as transições sendo uma

medida comportamental responsiva às benzodiazepinas, e, portanto, relacionada à ansiedade (CRAWLEY; GOODWIN, 1980; CRAWLEY, 1981). Apesar do consistente efeito das benzodiazepinas sobre o comportamento de camundongos na CBP (CRAWLEY; GOODWIN, 1980; CRAWLEY, 1981; COSTALL et al., 1989; BOURIN; HASCOËT, 2003), diversos estudos com ratos demonstram a ausência de efeito ansiolítico do CDZ, bem como de outras drogas ansiolíticas, sobre medidas clássicas de ansiedade na CBP, sugerindo que talvez este aparato não seja tão eficiente na avaliação dos efeitos de drogas ansiolíticas em ratos quanto é em camundongos (CHAOULOFF; DURAND; MORMÈDE, 1997; BILKEI-GORZÓ; GYERTYÁN; LÉVAY, 1998; RAMOS et al., 2002).

Por último, no teste envolvendo o tratamento prévio com PTZ, somente foram identificadas tendências marginalmente significativas da linhagem, no sentido esperado, para medidas relacionadas à exploração do compartimento branco, que, da mesma forma que as tendências encontradas no experimento do CA com PTZ, poderiam ser resultado do número amostral reduzido desse experimento ou da baixa dose escolhida. Foram observados efeitos significativos do tratamento sobre a locomoção nos compartimentos branco e preto da CBP, com o PTZ diminuindo a locomoção em ambos, independentemente da linhagem. A diminuição da exploração de ambos os compartimentos da CBP pode ser um reflexo do efeito ansiolítico e hipolocomotor do PTZ. Novamente, um experimento com mais doses dessa droga se faz necessário para um melhor entendimento dos seus efeitos sobre as linhagens SLA16 e SHR.

Em conjunto, os dados obtidos na CBP corroboram o efeito do *locus Anxrr16* sobre comportamentos relacionados à ansiedade, através de efeitos significativos (e tendências marginalmente significativas) da linhagem sobre a exploração do compartimento branco e sobre o número de transições. O tratamento com CDZ não corrobora a relação destas variáveis com a ansiedade. Já o tratamento com PTZ revelou apenas tendências no sentido esperado.

No LCE, somente diferenças nas entradas nos braços fechados e número total de entradas foram observadas entre as linhagens e entre os sexos, com os escores dos ratos SLA16 e das fêmeas sendo maiores do que os dos ratos SHR e dos machos, conforme o esperado. Originalmente, o número total de entradas era considerado a principal medida locomotora avaliada nesse teste, entretanto, estudos multifatoriais mostraram que esta medida se enquadra em fatores relacionados à ansiedade e à locomoção, enquanto apenas a medida de locomoção nos braços fechados se enquadra exclusivamente no fator

relacionado à locomoção (PELLOW et al., 1985; CRUZ; FREI; GRAEFF, 1994; RODGERS; JOHNSON, 1995). Foi encontrada uma tendência marginalmente significativa do fator linhagem sobre o número de entradas nos braços abertos, medida classicamente relacionada à ansiedade (PELLOW et al., 1985), também no sentido esperado. Os dados obtidos no LCE refletem diferenças entre as linhagens principalmente de ordem locomotora não corroborando totalmente os dados obtidos no CA e na CBP.

Diferentes aspectos dos efeitos comportamentais do *locus Anxrr16* puderam ser observados no TT, um teste integrado desenvolvido para fornecer uma ampla gama de medidas relacionada à ansiedade e à locomoção em uma única sessão (RAMOS et al., 2008; FRASER et al., 2010; WEHRMEISTER et al., 2010). Os resultados obtidos no TT confirmaram as diferenças comportamentais encontradas nos testes do CA e do LCE individuais, tanto as relacionadas à ansiedade quanto à locomoção, mas não aquelas verificadas na CBP. Destacam-se os efeitos significativos da linhagem sobre tempo permanecido e o número de entradas nos braços abertos do LCE, importantes medidas relacionadas à ansiedade que não tiveram efeito significativo na forma individual do LCE. A ausência de efeitos significativos da linhagem sobre as variáveis da CBP (que já haviam sido observados no protocolo individual) no teste integrado pode estar relacionada com o menor número amostral utilizado no TT em relação aos testes individuais.

No LTE, a ANOVA de medidas repetidas revelou que as duas linhagens testadas diferiram tanto nos escores de esquiva inibitória quanto nos escores de fuga, com os tempos de esquiva e de fuga sempre maiores na linhagem SHR do que na SLA16, independentemente da sessão. Apesar de interações significativas entre linhagem e sessão não terem sido encontradas para nenhuma das duas medidas, observa-se em ambas que os escores dos animais SLA16 não apresentam grandes variações entre as sessões, enquanto os escores dos SHR tendem a aumentar ao longo das sessões da esquiva inibitória e a diminuir na fuga. Isto poderia indicar uma maior facilidade dos animais da linhagem SHR em adquirir a esquiva inibitória, possivelmente induzida por apresentarem níveis de ansiedade mais altos dos que os da SLA16 (ZANGROSSI; GRAEFF, 1997). Os menores escores apresentados pela linhagem SLA16 tanto nas medidas de esquiva quanto nas de fuga poderiam também ser um reflexo de uma maior atividade motora destes animais.

Ramos et al. (2002), realizando uma versão semelhante do LTE descrito nesse trabalho, observaram que os machos da linhagem SHR precisaram de mais sessões do que os LEW para adquirir a esQUIVA inibitória de 300 segundos, e, ainda assim, tiveram um tempo de esQUIVA menor na sessão realizada no dia seguinte. Interessantemente, os animais da linhagem LEW exibiram um comportamento mais “ansioso” em relação aos SHR no teste do LTE realizado por Ramos et al. (2002), enquanto, no experimento aqui descrito, os animais SLA16 - que possuem alelos LEW apenas no *locus Anxrr16* - manifestaram comportamentos menos “ansiosos” do que os SHR. Desta forma, os resultados obtidos na esQUIVA inibitória estão de acordo com o esperado quando consideramos o efeito críptico do QTL *Anxrr16* sobre comportamentos relacionados à ansiedade. Contudo, a influência de possíveis diferenças de aprendizado entre as linhagens não pode ser descartada, uma vez que as diferenças emocionais detectadas pelo LTE, sobretudo na esQUIVA inibitória, são dependentes do aprendizado (RAMOS et al., 2002).

Na análise do COM, observa-se que a diferença entre os escores da sessão de familiarização e dos dois dias de teste (EC1 e EC2) nas variáveis analisadas (porcentagem de tempo de aproximação da fonte de odor, porcentagem de tempo permanecido no compartimento fechado e tempo gasto em avaliação de risco) foi um efeito geral das sessões. Dessa forma, não é possível afirmar que houve o pareamento entre o odor e o choque em nenhuma das linhagens, pois as diferenças entre as sessões encontradas não foram dependentes da condição (pareado ou não-pareado).

Entretanto, apesar da ausência de efeitos significativos da condição, é possível observar uma tendência dos animais de ambas as linhagens à aquisição das respostas de medo. Isso é sugerido pelas médias dos grupos pareados que se apresentam sempre maiores do que a dos seus respectivos controles (não-pareado de cada linhagem) nas sessões EC1 e EC2 para as variáveis porcentagem de tempo permanecido no compartimento fechado e tempo gasto em avaliação de risco, e menores a para porcentagem de tempo de aproximação da fonte de odor, conforme esperado no pareamento.

Um estudo utilizando ratos Wistar verificou que a utilização de um, dois ou três pareamentos entre o estímulo olfatório e o choque não foram suficientes para promover o aprendizado do medo condicionado nesses animais, que foi adquirido somente após cinco pareamentos (KROON; CAROBREZ, 2009). No presente estudo, um número ainda maior de pareamentos entre o choque e o estímulo olfatório, ou até

mesmo um aumento na intensidade destes choques, poderia enfatizar as diferenças entre os grupos pareados e não-pareados dentro das sessões EC1 e EC2. Dessa forma, também seria possível verificar se existe diferença no aprendizado do medo condicionado entre as duas linhagens.

A avaliação de comportamentos relacionados ao TDAH foi motivada pela ampla utilização da linhagem SHR como modelo animal para este transtorno, bem como pela observação repetida e consistente das diferenças locomotoras entre as linhagens SLA16 e SHR. A linhagem SHR é bastante ativa (quando comparada à Wistar-Kyoto), e exhibe sintomas comportamentais e dificuldades neurocognitivas similares às de indivíduos portadores de TDAH (como a hiperatividade, a desatenção e a impulsividade) que, inclusive, respondem ao tratamento com metilfenidato, a droga mais amplamente prescrita no tratamento deste transtorno (SAGVOLDEN; HENDLEY; KNARDAHL, 1992; DE BRUIN et al., 2003; KANTAK et al., 2008).

Em uma tentativa de compreender e interpretar as diferenças locomotoras entre as duas linhagens, a CATiv foi utilizada, seguindo inicialmente um protocolo sem familiarização, no qual a locomoção foi medida durante uma hora em um ambiente desconhecido. Posteriormente, um protocolo com familiarização mediu a locomoção durante duas horas, após um período de 21,5 horas de habituação. Observando-se o gráfico não-cumulativo da CATiv não-familiar, percebe-se que a diferença locomotora entre as linhagens, sobretudo em machos, parece maior durante os primeiros minutos de teste, apesar de nenhuma interação significativa entre tempo e linhagem ter sido verificada. Dessa forma, é possível imaginar que ocorra um decréscimo dessa diferença locomotora com a habituação ao novo ambiente. Ainda assim, os 60 minutos de teste do protocolo não-familiar não foram suficientes para eliminar o caráter aversivo do novo ambiente. Conforme o esperado, após as 21,5 horas de habituação do protocolo familiar, não foram observadas diferenças locomotoras entre as linhagens nos intervalos de tempo analisados (últimos 30, 60, 90 ou 120 minutos).

Uma vez que não foram encontradas diferenças significativas entre os escores de atividade de ambas as linhagens após a habituação em um ambiente previamente desconhecido, e por efeitos significativos da linhagem terem sido encontrados para comportamentos relacionados à ansiedade, mas que não envolvem diretamente um componente motor (como o tempo permanecido no compartimento branco da CBP e nos braços abertos do EPM), os resultados deste estudo sugerem que o *locus*

Anxrr16 modula de fato a reatividade ao estresse, e não a atividade motora espontânea, como havia sido suposto.

O teste da MCA, modelo de atenção e flexibilidade comportamental, mostrou uma diferença significativa entre as linhagens apenas para o número de sessões necessárias para atingir o critério de aprendizado na etapa de discriminação de respostas, onde o animal deveria aprender uma simples estratégia egocêntrica. Esse resultado pode indicar um prejuízo de aprendizado dos animais da linhagem SHR em relação aos congênicos, não necessariamente envolvendo características particulares ao TDAH, e deverá ser melhor investigado. Contudo, a ausência de efeito da linhagem sobre o número de sessões para atingir o critério de aprendizado na fase de discriminação da dica visual, quando o animal deve abandonar uma estratégia previamente adquirida e redirecionar a sua configuração atencional para um estímulo diferente, em conjunto com os escores semelhantes de erros do tipo perseverante, indica que não há diferença entre as linhagens em relação à flexibilidade comportamental. Os índices de atenção das duas linhagens também parecem ser idênticos, uma vez que não foram encontradas diferenças significativas entre os números de erros regressivos ou nunca-reforçados, os quais refletem aspectos atencionais (FLORESCO et al., 2006b; KANTAK et al., 2008). Portanto, no presente estudo, não foi possível estabelecer uma relação entre o *locus Anxrr16* e fenótipos relacionados ao TDAH.

Por fim, pode-se dizer que os resultados obtidos confirmam a primeira hipótese formulada no início deste trabalho, a qual afirma que os alelos LEW no *locus Anxrr16* da linhagem SLA16 fariam com que ela se comportasse de forma menos ansiosa do que a linhagem parental SHR nos testes comportamentais relacionados à ansiedade. A confirmação dessa hipótese corroborou a localização do QTL *Anxrr16* nesse *locus*, bem como os seus efeitos sobre comportamentos relacionados à ansiedade e o seu caráter críptico. A influência do ciclo estral nos efeitos de *Anxrr16* sobre os comportamentos relacionados à ansiedade, sugerida na segunda hipótese, não foi confirmada neste trabalho, sendo os efeitos de *Anxrr16* observados nas fêmeas independentemente da fase do ciclo estral na qual se encontravam. Finalmente, com relação à terceira hipótese formulada, este trabalho sugere que o aspecto locomotor afetado pelo QTL *Anxrr16* está relacionado à emocionalidade/ansiedade, e não à características relacionadas ao TDAH.

De acordo com a pesquisa bibliográfica realizada, a linhagem SLA16 é a única linhagem de ratos congênica desenvolvida no mundo

utilizando um QTL relacionado à ansiedade como *locus* diferencial. O presente estudo comprova a utilidade desta ferramenta na identificação dos efeitos do *locus Anxrr16*, sobretudo, mas não somente, sobre os comportamentos relacionados à ansiedade. Apesar do um amplo *screening* comportamental realizado nesse trabalho, uma infinidade de outros fenótipos ainda necessita ser investigada na linhagem SLA16, dentre os quais estão o aprendizado, a memória, e diferentes índices de ansiedade e atividade motora.

Além disso, com os efeitos comportamentais deste *locus* confirmados, o intervalo cromossômico contendo o QTL de interesse fica claramente delimitado na linhagem congênica. Esta delimitação permite a posterior geração de linhagens sub-congênicas, que são um próximo passo rumo à identificação do(s) gene(s) responsável(is) pelos efeitos desse *locus*. Na linhagem sub-congênica a região do *locus* diferencial é fragmentada, originando várias linhagens, cada uma possuindo uma parcela deste *locus*. Esta fragmentação é normalmente fruto de recombinações que acontecem após um inter cruzamento dos animais da linhagem congênica, ou do retrocruzamento destes animais com a linhagem que serviu como receptora durante o seu desenvolvimento (ARMSTRONG; BRODNICKI; SPEED, 2006; FARBER; MEDRANO, 2007). Essa estratégia deverá ser desenvolvida com a linhagem SLA16 em um futuro próximo.

Existem cerca de 87 QTLs descritos no *Rat Genome Database Website* (2012b) na região compreendida pelo *locus Anxrr16* (aqui definido como a região de 86,3 Mpb, entre os marcadores *D4Rat76* e *D4Mgh11*) sendo pelo menos cinco deles relacionados à resposta ao estresse, o que pode comprometer a relação entre os resultados aqui reportados e o QTL *Anxrr16* descrito por Ramos et al. (1999). Outros QTLs comportamentais também foram descritos nessa região para o consumo de álcool e de alimento (RAT GENOME DATABASE WEBSITE, 2012b).

Izídio et al. (2011), ao procurarem por QTLs relacionados à emocionalidade e ao consumo de álcool no cromossomo 4 de F2 originadas do cruzamento das linhagens LEW e SHR, encontraram uma série de QTLs sugestivos e significativos dentro do intervalo do *locus Anxrr16*. Nesta região, um QTL significativo para a locomoção no centro do CA foi identificado nos machos, inclusive exibindo um efeito críptico. Além desse, outros QTLs relacionados à locomoção periférica no CA, à locomoção no compartimento branco da CBP, e aos tempos permanecidos nos compartimentos branco e preto da CBP foram encontrados dentro deste *locus*. Nas fêmeas, apenas QTLs sugestivos

foram encontrados dentro do *locus Anxrr16*, sendo os comportamentos afetados por eles dependentes da fase do ciclo estral das ratas. Dentre os QTLs sugestivos encontrados nesse intervalo, estão QTLs para a locomoção central (somente no grupo diestro-proestro, na mesma localização encontrada nos machos), periférica e total no CA. As fêmeas em diestro-proestro, mas não as em estro-metaestro, também apresentaram, nesse intervalo, QTLs relacionados ao tempo permanecido e à locomoção no compartimento branco da CBP. Dessa forma, observamos que o *locus Anxrr16* parece abrigar diversos QTLs relacionados à emocionalidade, fenótipos difíceis de serem dissociados.

Uma maneira de se isolar diferentes QTLs presentes em um *locus* diferencial é a utilização de um conjunto de sub-congênicos cujos *loci* diferenciais se sobreponham e cubram toda a região da linhagem doadora. Dessa forma, o efeito do QTL em questão, bem como o de diversos outros QTLs vizinhos, pode ser verificado nas linhagens sub-congênicas, e um maior refinamento ainda pode ser feito através da análise da sobreposição dos *loci* diferenciais entre essas linhagens (FARBER; MEDRANO, 2007).

Em um menor intervalo cromossômico, é possível partir para estratégias mais pontuais, como o *microarray*, que permite a identificação de diferenças na expressão de genes escolhidos, e o sequenciamento dos genes contidos nesse intervalo, visando a identificação da(s) variante(s) alélica(s) responsável(is) pelo efeito do QTL (NABIKA; KOBAYASHI; YAMORI, 2000). O intervalo compreendido pelo *locus Anxrr16* ainda é relativamente grande para esta abordagem, possuindo aproximadamente 86,3 Mpb e contendo mais de 950 genes.

Dentre os potenciais genes candidatos para os efeitos do *locus Anxrr16*, podemos citar o *Tacr1*, localizado a 116,6 Mpb do cromossomo 4 do rato (próximo ao marcador *D4Rat49*), que codifica o receptor NK₁ da substância P (SP), a qual está envolvida em diversos processos fisiológicos e patológicos, como na transmissão de sinais de dor e estresse, na inflamação, e na contração do músculo liso (BILKEL-GORZO et al., 2002; SETO et al., 2005; EBNER; SINGEWALD, 2006). O Receptor NK₁ é o receptor pelo qual a SP possui maior afinidade, sendo altamente expresso nas regiões cerebrais envolvidas no controle das emoções (EBNER; SINGEWALD, 2006; HALASZ et al., 2009). Evidências sugerem que o sistema SP-NK₁ pode estar envolvido na fisiopatologia de transtornos psiquiátricos relacionados com o estresse, como os transtornos de ansiedade e a depressão (EBNER; SINGEWALD, 2006). Estudos com camundongos *knockout* mostram

que a deleção do gene *Tacr1* faz com que os animais apresentem menos comportamentos relacionados à depressão e à ansiedade, quando comparados com controles que expressam esse gene normalmente (SANTARELLI et al., 2001; BILKEI-GORZO et al., 2002). Dessa forma, possíveis polimorfismos do gene *Tacr1* entre as linhagens LEW e SHR poderiam estar por trás das diferentes respostas emocionais observadas. Esta hipótese pode ser corroborada pelo estudo de Vendruscolo et al. (2003), que, estudando as linhagens LEW e SHR, verificaram diferentes respostas ansiolíticas a um antagonista seletivo dos receptores NK₁, dependente da linhagem, do sexo, e do teste comportamental utilizado.

Outro gene compreendido nesse intervalo é o *Snca*, localizado a 89,6 Mpb do cromossomo 4 do rato (próximo ao marcador *D4Rat76*), que codifica a alfa-sinucleína, uma proteína sináptica formada por 140 aminoácidos, cujas funções biológicas ainda não estão totalmente elucidadas (IWAI et al., 1995; PEREZ; HASTINGS, 2004). Sabe-se que ela está associada à neurotransmissão e à plasticidade sináptica, e que mutações do gene *Snca* e as agregações da proteína estão envolvidos nos processos patológicos das sinucleinopatias, que incluem a doença de Parkinson, a atrofia sistêmica múltipla e a demência com corpos de Lewi (CHENG; VIVACQUA; YU, 2011). Uma função na regulação da biossíntese da dopamina, através da inibição da atividade da tirosina-hidroxilase e consequente redução da síntese da dopamina, também é sugerida (PEREZ et al., 2002). Estudos com camundongos mostram que mutações deste gene podem conferir um perfil menos ansioso aos animais (GEORGE et al., 2008; GRAHAM; SIDHU, 2010), apesar do não-envolvimento da alfa-sinucleína com a ansiedade também ser relatado (PEÑA-OLIVER; BUCHMAN; STEPHENS, 2010). A expressão diferencial do gene *Snca* e da alfa-sinucleína no hipocampo, causada por polimorfismos de nucleotídeo único (*single nucleotide polymorphisms* - SNPs), foi inicialmente relatada para as linhagens *inbred alcohol-preferring* (iP) e *inbred alcohol-nonpreferring* (iNP) como tendo uma possível contribuição na preferência pelo álcool da linhagem iP (LIANG, et al., 2003). Uma diferença na expressão do gene e da proteína no hipocampo também foi encontrada por Chiavegato et al. (2009) entre as linhagens LEW e SHR, sendo, entretanto, atribuída a um SNP diferente. Nesse estudo, os autores sugerem que o *Snca* seria um bom gene candidato a estar influenciando as diferenças nos comportamentos relacionados à ansiedade entre as linhagens LEW e SHR, uma vez que a variante vinda da linhagem LEW, quando em homozigose, aumentou os escores de locomoção central no CA de

animais F2, indo ao encontro do efeito críptico do QTL *Anxrr16*. Contudo, a associação deste SNP com a diferença no consumo de álcool entre as linhagens LEW e SHR não foi encontrada.

Podemos ainda citar o gene *Prok2*, localizado a aproximadamente 134,6 Mpb do cromossomo 4 do rato, já descrito em humanos como um dos genes que servem como assinatura molecular do transtorno depressivo maior (SPIJKER et al., 2010). Já o neuropeptídeo *Npy*, codificado pelo gene homônimo que se localiza próximo ao locus *Anxrr16* (em 78,0 Mpb, a aproximadamente 6,8 Mpb do início desse locus), apresentou ação ansiolítica em uma série de estudos envolvendo modelos animais, e seus receptores representam importantes alvos para o desenvolvimento de fármacos relacionados à esse transtorno (HEILIG, 2004). Entretanto, como já mencionado anteriormente, devido ao grande número de genes compreendidos no locus *Anxrr16*, os genes aqui citados representam apenas possíveis responsáveis pela diferença comportamental entre as linhagens SLA16 e SHR, com base em informações obtidas na literatura sobre os fenótipos por eles influenciados. Somente estratégias moleculares mais pontuais, como o *microarray* ou o sequenciamento de genes, a serem desenvolvidas após a geração de animais sub-congênicos, deverão elucidar os genes envolvidos nestas diferenças comportamentais.

5 CONCLUSÕES

A linhagem congênica caracterizada comportamental e fenotipicamente através deste trabalho representa uma ferramenta importante no entendimento das vias moleculares subjacentes aos comportamentos, sobretudo os relacionados à ansiedade, aqui descritos. Diferentemente das abordagens dos *knockouts* e transgênicos, esta ferramenta se baseia em variantes naturais de genes que modulam fisiologicamente o comportamento, podendo, assim, facilitar a tradução dos resultados obtidos através dela para humanos.

De forma resumida, o presente estudo identificou diferenças comportamentais entre a linhagem congênica SLA16 e a sua linhagem parental receptora, SHR, confirmando o efeito do *locus Anxrr16* sobre a emocionalidade dos ratos. Uma vez que o *background* genético destas duas linhagens é praticamente idêntico, as diferenças encontradas podem ser atribuídas ao *locus Anxrr16*, que, na linhagem SLA16, corresponde a um intervalo de aproximadamente 86,3 Mpb, constituído quase que inteiramente por alelos da linhagem LEW. As diferenças encontradas estão de acordo com estudos prévios (MORMEDE et al., 2002; VENDRUSCOLO et al., 2006a; IZÍDIO et al., 2011), que descrevem a natureza críptica deste QTL. Os efeitos deste *locus* podem ser observados em uma série de comportamentos relacionados à ansiedade, ao pânico, e à locomoção relacionada à novidade, mas não nos que envolvem atenção, flexibilidade comportamental ou atividade locomotora em ambientes familiares. Fenótipos relacionados à aquisição do medo condicionado e ao aprendizado ainda necessitam ser melhor investigados.

REFERÊNCIAS

- AITMAN, T. J.; CRITSER, J.K.; CUPPEN, E.; DOMINICZAK, A.; FERNANDEZ-SUAREZ, X.M.; FLINT, J.; GAUGUIER, D.; GEURTS, A.M.; GOULD, M.; HARRIS, P.C.; HOLMDAHL, R.; HUBNER, N.; IZSVÁK, Z.; JACOB, H.J; KURAMOTO, T.; KWITEK, A.E.; MARRONE, A.; MASHIMO, T.; MORENO, C.; MULLINS, J.; MULLINS, L.; OLSSON, T.; PRAVENEC, M.; RILEY, L.; SAAR, K.; SERIKAWA, T.; SHULL, J.D.; SZPIRER, C.; TWIGGER, S.N.; VOIGT, B.; WORLEY, K. Progress and prospects in rat genetics: a community view. **Nature Genetics**, v. 40, n. 5, p. 516-522. 2008.
- ANEAS, I.; RODRIGUES, M. V.; PAULETTI, B. A.; SILVA, G. J. J.; CARMONA, R.; CARDOSO, L.; KWITEK, A. E.; JACOB, H. J.; SOLER, J. M. P.; KRIEGER, J. E. Congenic strains provide evidence that four mapped loci in chromosomes 2, 4, and 16 influence hypertension in the SHR. **Physiology Genomics**, v. 37, n. 1, p. 52-57. 2009.
- ANGRINI, M.; LESLIE, J. C.; SHEPHARD, R. A. Effects of propranolol, buspirone, pcpa, reserpine, and chlordiazepoxide on open-field behavior. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 59, n. 2, p. 387-397. 1998.
- ARMSTRONG, N. J.; BRODNICKI, T. C.; SPEED, T. P. Mind the gap: analysis of marker-assisted breeding strategies for inbred mouse strains. **Mammalian Genome**, v. 17, n. 4, p. 273-287. 2006.
- BASKIN, S. M.; SMITHERMAN, T. A. Migraine and psychiatric disorders: comorbidities, mechanisms, and clinical applications. **Journal of The Neurological Sciences**, v. 30, supl. 1, p. S61-S65. 2009.
- BICE, P.; FOROUD, T.; BO, R.; CASTELLUCCIO, P.; LUMENG, L.; LI, T. K.; CARR, L. G. Genomic screen for QTLs underlying alcohol consumption in the P and NP rat lines. **Mammalian Genome**, v. 9, n. 12, p. 949-955. 1998.
- BIGNAMI, G. Selection for high rates and low rates of avoidance conditioning in the rat. **Animal Behavior**, v. 13, n. 2, p. 221-227. 1965.

- BILKEI-GORZÓ, A.; GYERTYÁN, I.; LÉVAY, G. mCPP-induced anxiety in the light-dark box in rats – a new method for screening anxiolytic activity. **Psychopharmacology**, v. 136, n. 3, p.291-298. 1998.
- BILKEI-GORZO, A.; RACZ, I.; MICHEL, K.; ZIMMER, A. Diminished anxiety- and depression-related behaviors in mice with selective deletion of the *Tac1* gene. **The Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 22, p. 10046-10052. 2002.
- BOSCHEN, M. J. Publication trends in individual anxiety disorders: 1980–2015. **Journal of Anxiety Disorders**, v. 22, n. 3, 570-575. 2008.
- BOURIN, M.; HASCOËT, M. The mouse light/dark box test. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, n.1-3, p.55-65. 2003.
- BROADHURST, P. L. The Maudsley reactive and nonreactive strains of rats: a survey. **Behavior Genetics**, v. 5, n. 4, p.299-319. 1975.
- CARR, L. G.; HABEGGER, K.; SPENCE, J. P.; LIU, L.; LUMENG, L.; FOROUD, T. Development of congeneric rat strains for alcohol consumption derived from the alcohol-preferring and nonpreferring rats. **Behavior Genetics**, v. 36, n. 2, p. 285-290. 2006.
- CARTA, M. G.; LOVISELLI, A.; HARDOY, M. C.; MASSA, S.; CADEDDU, M.; SARDU, C.; CARPINIELLO, B.; DELL’OSSO, L.; MARIOTTI, S. The link between thyroid autoimmunity (antithyroid peroxidase autoantibodies) with anxiety and mood disorders in the community: a field of interest for public health in the future. **BioMed Central Psychiatry**, v. 4, n. 25, p. 1-5. 2004.
- CHAOULOFF, F.; DURAND, M.; MORMÈDE, P. Anxiety- and activity-related effects of diazepam and chlordiazepoxide in the rat light/dark and dark/light tests. **Behavioural Brain Research**, v. 85, n. 1, p. 27-35. 1997.
- CHENG, F.; VIVACQUA, G.; YU, S. The role of alpha-synuclein in neurotransmission and synaptic plasticity. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 42, n. 4, p. 242-248. 2011.

CHESS, A. C.; RAYMOND, B. E.; GARDNER-MORSE, I. G.; STEFANI, M. R.; GREEN, J. T. Set shifting in a rodent model of attention-deficit/hyperactivity disorder. **Behavioral Neuroscience**, v. 125, n. 3, p. 372-382. 2011.

CHIAVEGATTO, S.; IZIDIO, G.S.; MENDES-LANA, A.; ANEAS, I.; FREITAS, T.A.; TORRÃO, A.S.; CONCEIÇÃO, I.M.; BRITTO, L.R.G.; RAMOS, A. Expression of α -synuclein is increased in the hippocampus of rats with high levels of innate anxiety. **Molecular Psychiatry**, v.14, n. 9, p. 894-905. 2009.

COSTALL, B.; JONES, B. J.; KELLY, M. E.; NAYLOR, R. J.; TOMKINS, D. M. Exploration of mice in a black and white test box: validation as a model of anxiety. **Pharmacology Biochemistry & Behavior**, v. 32, n. 3, p. 777-785. 1989.

CRAWLEY, J. N. Neuropharmacologic specificity of a simple animal model for the behavioral actions of benzodiazepines. **Pharmacology Biochemistry & Behavior**, v. 15, n. 5, p. 695-699. 1981.

CRAWLEY, J. N.; GOODWIN, F. K. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. **Pharmacology Biochemistry & Behavior**, v. 13, n. 2, p. 167-170. 1980.

CRUZ, A. P. M.; FREI, F.; GRAEFF, F. G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. **Pharmacology Biochemistry & Behavior**, v. 49, n. 1, p. 171-176. 1994.

DARVASI, A. Experimental strategies for the genetic dissection of complex traits in animal models. **Nature Genetics**, v. 18, n. 1, p. 19-24. 1998.

DA SILVA, G.E.; RAMOS, A.; TAKAHASHI, R.N. Comparison of voluntary ethanol intake by two pairs of rat lines used as genetic models of anxiety. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 10, p. 1511-1517. 2004.

DE BRUIN, N. M. W. J.; KILIAAN, A. J.; DE WILDE, M.C.; BROERSEN, L. M. Combined uridine and choline administration

improves cognitive deficits in spontaneously hypertensive rats.

Neurobiology of Learning and Memory, v. 80, n. 1, p. 63-79. 2003.

DE MOOIJ-VAN MALSEN, A. J. G.; OLIVIER, B.; KAS, M. J. H. Behavioural genetics in mood and anxiety: A next step in finding novel pharmacological targets. **European Journal of Pharmacology**, v. 585, n. 2-3, p. 436-440. 2008.

EBNER, K.; SINGEWALD, N. The role of substance P in stress and anxiety responses. **Amino Acids**, v. 31, n. 3, p. 251-272. 2006.

FARBER, C. R.; MEDRANO, J. F. Fine mapping reveals sex bias in quantitative trait loci affecting growth, skeletal size and obesity-related traits on mouse chromosomes 2 and 11. **Genetics**, v. 175, n. 1, p. 349-360. 2007.

FLAHERTY, L.; BOLIVAR, V. Congenic and consomic strains. In: JONES, B. C.; MORMÈDE, P. **Neurobehavioral Genetics: Methods and Applications**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 2006. p. 115-127.

FLINT, J. Analysis of quantitative trait loci that influence animal behavior. **Journal of Neurobiology**, v. 54, n. 1, p. 46-77. 2003.

FLORESCO, S. B.; GHODS-SHARIFI, S.; VEXELMAN, C.; MAGYAR, O. Dissociable roles for the nucleus accumbens core and shell in regulating set shifting. **The Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 9, p. 2449-2457. 2006a.

FLORESCO, S. B.; MAGYAR, O.; GHODS-SHARIFI, S.; VEXELMAN, C.; TSE, M. T. L. Multiple dopamine receptor subtypes in the medial prefrontal cortex of the rat regulate set-shifting. **Neuropsychopharmacology**, v. 31, n. 2, p. 297-309. 2006b.

FRASER, L. M.; BROWN, R. E.; HUSSIN, A.; FONTANA, M.; WHITTAKER, A.; O'LEARY, T. P.; LEDERLE, L.; HOLMES, A.; RAMOS, A. Measuring anxiety- and locomotion-related behaviours in mice: a new way of using old tests. **Psychopharmacology**, v. 211, n. 1, p. 99-112. 2010.

GEORGE, S.; VAN DEN BUUSE, M.; MOK, S. S.; MASTERS, C. L.; LI, Q.; CULVENOR, J. G. α -synuclein transgenic mice exhibit reduced

anxiety-like behaviour. **Experimental Neurology**, v. 210, n. 2, p. 788-792. 2008.

GRAEFF, F. G.; NETTO, C. F.; ZANGROSSI JR, H. The elevated T-maze as an experimental model of anxiety. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 23, n. 2, p. 237-246. 1998.

GRAHAM, D. R.; SIDHU, A. Mice expressing the a53t mutant form of human alpha-synuclein exhibit hyperactivity and reduced anxiety-like behavior. **Journal of Neuroscience Research**, v. 88, n. 8, p. 1777-1783. 2010.

GROSS, C.; HEN, R. Genetic and environmental factors interact to influence anxiety. **Neurotoxicity Research**, v. 6, n. 6, p. 493-501. 2004.

HALASZ, J.; ZELENA, D.; TOTH, M.; TULOGDI, A.; MIKICS, E.; HALLER, J. Substance P neurotransmission and violent aggression: The role of tachykinin NK1 receptors in the hypothalamic attack area. **European Journal of Pharmacology**, v. 811, n. 1-3, p. 35-43. 2009.

HALL, C. S. Emotional behavior in the rat. **Journal of Comparative Psychology**, v. 18, n. 3, p. 385-403. 1934.

HAMEISTER, T. M.; IZÍDIO, G. S.; VALIATI, V. H.; RAMOS, A. Association of a locus on rat chromosome 4 with anxiety-related behaviors in two selectively bred rat lines. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, n. 4, p. 843-849. 2008.

HAMILTON, S. P. The genetics of anxiety disorders. In: **Molecular Biology of Neuropsychiatric Disorders**. Berlin, Heidelberg: Springer, 2009. p. 165-185

HEILIG, M. The *Npy* system in stress, anxiety and depression. **Neuropeptides**, v. 38, n. 4, p. 213-224. 2004.

HETTEMA, J. M.; NEALE, M. C.; KENDLER, K. S. A review and meta-analysis of the genetic epidemiology of anxiety disorders. **American Journal of Psychiatry**, v. 158, n. 10, p. 1568-1578. 2001.

HINOJOSA, F. R.; SPRICIGO, J. L.; IZÍDIO, G. S.; BRÜSKE, G. R.; LOPES, D. M.; RAMOS, A. Evaluation of two genetic animal models in

behavioral tests of anxiety and depression. **Behavioural Brain Research**, v. 168, n. 1, p. 127-136. 2006.

HOAR, W. S.; HICKMAN, C. P. Ovariectomy and the estrous cycle of the rat. In: HOAR, W. S. **General Comparative Physiology**. 2. ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1975. p. 260-265.

HORNUM, L.; LUNDSGAARD, D.; MARKHOLST, H. PolyI:C induction of diabetes is controlled by *Iddm4* in rats with a full regulatory T cell pool. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1110, p. 65-72, 2007.

HOWELLS, F. M.; BINDEWALD, L.; RUSSELL, V. A. Cross-fostering does not alter the neurochemistry or behavior of spontaneously hypertensive rats. **Behavioral and Brain Functions**, v. 5, n. 24, p. 1-11. 2009.

IWAI, A.; MASLIAH, E.; YOSHIMOTO, M.; GE, N.; FIANAGAN, L.; DE SILVA, H. A. R.; KITTEI, A.; SAITOH, T. The precursor protein of non- $\alpha\beta$ component of alzheimer's disease amyloid is a presynaptic protein of the central nervous system. **Neuron**, v. 14, n. 2, p. 467-475. 1995.

IZÍDIO, G. S.; OLIVEIRA, L. C.; OLIVEIRA, L. F. G.; PEREIRA, E.; WEHRMEISTER, T. D.; RAMOS, A. The influence of sex and estrous cycle on QTL for emotionality and ethanol consumption. **Mammalian Genome**, v. 22, n. 5-6, p. 329-340. 2011.

JACOB, H. J. Functional genomics and rat models. **Genome Research**, v. 9, n. 11, p. 1013-1016. 1999.

KANTAK, K.M.; SINGH, T.; KERSTETTER, K. A.; DEMBRO, K.A.; MUTEBI, M. M.; HARVEY, R. C.; DESCHEPPER, C. F.; DWOSKIN, L. P. Advancing the spontaneous hypertensive rat model of attention deficit/hyperactivity disorder. **Behavioral Neuroscience**, v. 122, n. 2, p. 340-357. 2008.

KESSLER, R. C.; BERGLUND, P.; DEMLER, O.; JIN, R.; MERIKANGAS, K. R.; WALTERS, E. E. Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV Disorders in the national comorbidity

survey replication. **Archives of General Psychiatry**, v. 62, n. 6, p. 593-602. 2005.

KNOLL, A. T.; MELONI, E. G.; THOMAS, J. B.; CARROLL, F. I. Anxiolytic-like effects of k-opioid receptor antagonists in models of unlearned and learned fear in rats. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 323, n. 3, p. 838-845. 2007.

KODAVANTI, U. P.; SCHLADWEILER, M. C.; LEDBETTER, A. D.; WATKINSON, W. P.; CAMPN, M. J.; WINSETT, D. W.; RICHARDS, J. R.; CRISSMAN, K. M.; HATCH, G. E.; COSTA, D. L. The spontaneously hypertensive rat as a model of human cardiovascular disease: evidence of exacerbated cardiopulmonary injury and oxidative stress from inhaled emission particulate matter. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 164, n. 3, p. 250-263. 2000.

KROON, J. A. V. **Efeitos do midazolam, propranolol e escopolamina em ratos submetidos ao modelo de condicionamento olfatório do medo**. 2007. 85 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

KROON, J. A. V.; CAROBREZ, A. P. Olfactory fear conditioning paradigm in rats: Effects of midazolam, propranolol or scopolamine. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 91, n. 1, p. 32-40. 2009.

LAZARUS, R. S. Issues of research, classification and measurement. In: LAZARUS, R. S. **Emotion and adaptation**. 1. ed. New York: Oxford University Press, 1991. p. 42-87.

LIANG, T.; SPENCE, J.; LIU, L.; STROTHER, W. N.; CHANG, H. W.; ELLISON, J. A.; LUMENG, L.; LI, T.; FOROUD, T.; CARR, L. G. α -Synuclein maps to a quantitative trait locus for alcohol preference and is differentially expressed in alcohol-preferring and -nonpreferring rats. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 8, p. 4690-4695. 2003.

LISTER, R. G. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 46, n. 3, p. 321-340. 1990.

MOORE, K. J.; NAGLE, D. L. Complex trait analysis in the mouse: The strengths, the limitations and the promise yet to come. **Annual Review of Genetics**, v. 34, p. 653-686. 2000.

MORMÈDE, P.; MONEVA, E.; BRUNEVAL, C.; CHAOULOFF, F.; MOISAN, M., -P. Marker-assisted selection of a neuro-behavioural trait related to behavioural inhibition in the SHR strain, an animal model of ADHD. **Genes, Brain and Behavior**, v. 1, n. 2, p. 111-116. 2002.

NABIKA, T.; KOBAYASHI, Y.; YAMORI, Y. Congenic rats for hypertension: How useful are they for the hunting of hypertension genes? **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 27, n. 4, p. 251-256. 2000.

OLOFSSON, P.; LU, S.; HOLMBERG, J.; SONG, T.; WERNHOFF, P.; PETTERSSON, U.; HOLMDAHL, R. A comparative genetic analysis between collagen-induced arthritis and pristane-induced arthritis. **Arthritis & Rheumatism**, v. 48, n. 8, p. 2332-2342. 2003.

OVERBEEK, T.; VERMETTEN, E.; GRIEZ, E.J.L. Epidemiology of Anxiety Disorders. In: GRIEZ, E. J. L.; FARAVELLI, C.; NUTT, D.; ZOHAR, D. (Ed). **Anxiety Disorders**. West Sussex, UK: John Wiley & Sons Ltd, 2001. p. 3-24.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, B. Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, n. 3, p. 149-167. 1985.

PEÑA-OLIVER, Y.; BUCHMAN, V. L.; STEPHENS, D. N. Lack of involvement of alpha-synuclein in unconditioned anxiety in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 209, n. 2, p. 234-240. 2010.

PEREIRA, E. **Desenvolvimento de uma linhagem congênica para um locus no cromossomo 4 do rato com efeito sobre a emocionalidade**. 2010. 145f. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

PEREZ, R. G.; WAYMIRE, J. C.; LIN, E.; LIU, J. J.; GUO, F.; ZIGMOND, M. J. A role for α -synuclein in the regulation of dopamine biosynthesis. **The Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 8, p. 3090-3099. 2002.

PEREZ, R. G.; HASTINGS, T. G. Could a loss of a-synuclein function put dopaminergic neurons at risk? **Journal of Neurochemistry**, v. 89, n. 6, p. 1318-1324. 2004.

PLOMIN, R.; OWEN, M. J.; MCGUFFIN, P. The genetic basis of complex human behaviors. **Science**, v. 264, n. 5166, p. 1733-1739. 1994.

POLTRONIERI, S. C.; ZANGROSSI JR, H.; VIANA, M. B. Antipanic-like effect of serotonin reuptake inhibitors in the elevated T-maze. **Behavioural Brain Research**, v. 147, n. 1-2, p. 185-192. 2003.

PRAVENEK, M.; ZIDEK, V.; SIMAKOVA, M.; KREN, V.; KRENOVA, D.; HORKY, K.; JACHYMOVA, M.; MIKOVA, B.; KAZDOVA, L.; AITMAN, T. J.; CHURCHILL, P. C.; WEBB, R. C.; HINGARH, N. H.; YANG, Y.; WANG, J. M.; LEZIN, E. M.; KURTZ, T. W. Genetics of Cd36 and the clustering of multiple cardiovascular risk factors inspontaneous hypertension. **Journal of Clinical Investigation**, v. 103, n. 12, p. 1651-1657. 1999.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, n. 1-2, p. 3-33. 2003.

RAGOZZINO, M. E. The effects of dopamine d1 receptor blockade in the prelimbic-infralimbic areas on behavioral flexibility. **Learning & Memory**, v. 9, n. 1, p. 18-28. 2002.

RAMOS, A.; BERTON, O.; MORMÈDE, P.; CHAOULOFF, F. A multiple-test study of anxiety-related behaviours in six inbred rat strains. **Behavioural Brain Research**, v. 85, n. 1, p. 57-69. 1997.

RAMOS, A.; MELLERIN, Y.; MORMÈDE, P.; CHAOULOFF, F. A genetic and multifactorial analysis of anxiety-related behaviours in Lewis and SHR intercrosses. **Behavioural Brain Research**. v. 96, n. 1-2, p. 195-205. 1998.

- RAMOS, A.; MORMÈDE, P. Stress and emotionality: a multidimensional and genetic approach. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 22, n. 1, p. 33-57. 1998.
- RAMOS, A.; MOISAN, M. -P.; CHAOULOFF, F.; MORMÈDE, C.; MORMÈDE, P. Identification of female-specific QTLs affecting an emotionality-related behavior in rats. **Molecular Psychiatry**, v. 4, n. 5, p. 453-462. 1999.
- RAMOS, A.; KANGERSKI, A. L.; BASSO, P. F.; SANTOS, J. E. D. S.; ASSREUY, J.; VENDRUSCOLO, F.; TAKAHASHI, R. N. Evaluation of Lewis and SHR rat strains as a genetic model for the study of anxiety and pain. **Behavioural Brain Research**, v. 129, n. 1-2, p. 113-123. 2002.
- RAMOS, A.; CORREIA, E.C.; IZÍDIO, G.S.; BRÜSKE, G.R. Genetic selection of two new rat lines displaying different levels of anxiety-related behaviors. **Behavior Genetics**, v. 33, n. 6, p. 657-668. 2003.
- RAMOS, A. Animal models of anxiety: do I need multiple tests? **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 29, n. 10, p. 493-498. 2008.
- RAMOS, A.; PEREIRA, E.; MARTINS, G. C.; WEHRMEISTER, T. D.; IZÍDIO, G. S. Integrating the open field, elevated plus maze and light/dark box to assess different types of emotional behaviors in one single trial. **Behavioural Brain Research**, v. 193, n. 2, p. 277-288. 2008.
- RAPAPORT, M. H.; CLARY, C.; FAYYAD, R.; ENDICOTT, J. Quality-of-life impairment in depressive and anxiety disorders. **American Journal of Psychiatry**, v. 162, n. 6, p. 1171-1178. 2005.
- RAT GENOME DATABASE WEB SITE. Medical College of Wisconsin. **Marker search**. Disponível em: <<http://rgd.mcw.edu/rgdweb/search/markers.html>>. Acesso em: fev, 2012a.
- RAT GENOME DATABASE WEB SITE. Medical College of Wisconsin. **QTL search**. Disponível em: <<http://rgd.mcw.edu/rgdweb/search/qtls.html>>. Acesso em: fev, 2012b.

RAT GENOME DATABASE WEB SITE. Medical College of Wisconsin. **RGSC Genome Assembly v3.4 Map**. Disponível em: <http://rgd.mcw.edu/fgb2/gbrowse/rgd_904>. Acesso em: fev, 2012c.

RAT GENOME DATABASE WEB SITE. Medical College of Wisconsin. **Strain search**. Disponível em: <<http://rgd.mcw.edu/rgdweb/search/strains.html>>. Acesso em: fev, 2012d.

RHODES, S. M.; COGHILL, D. R.; MATTHEWS, K. Neuropsychological functioning in stimulant-naïve boys with hyperkinetic disorder. **Psychological Medicine**, v. 35, n. 8, p. 1109-1120. 2005

RODGERS, R. J.; JOHNSON, N. J. T. Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine plus-maze test of anxiety. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 52, n. 2, p. 297-303. 1995.

ROY, V.; CHAPILLON, P.; JELJELI, M.; CASTON, J.; BELZUNG, C. Free versus forced exposure to an elevated plus-maze: evidence for new behavioral interpretations during test and retest. **Psychopharmacology**, v. 203, n. 1, p. 131-141. 2009.

SAGVOLDEN, T.; HENDLEY, E. D.; KNARDAHL, S. Behavior of hypertensive and hyperactive rat strains: Hyperactivity is not unitarily determined. **Physiology & Behavior**, v. 52, n. 1, p. 49-57. 1992.

SAGVOLDEN, T. Behavioral validation of the spontaneously hypertensive rat (SHR) as an animal model of attention-deficit/hyperactivity disorder (AD/HD). **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 24, n. 1, p. 31-39. 2000.

SANGER, D. J.; ZIVKOVIC, B. Further behavioural evidence for the selective sedative action of zolpidem. **Neuropharmacology**, v. 27, n. 11, p. 1125-1130. 1988.

SANTARELLI, L.; GOBBI, G.; DEBS, P. C.; SIBILLE, E. L.; BLIER, P.; HEN, R.; HEATH, M. J. S. Genetic and pharmacological disruption of neurokinin 1 receptor function decreases anxiety-related behaviors

and increases serotonergic function. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 4, p. 1912-1917. 2001.

SETO, S.; TANIOKA, A.; IKEDA, M.; IZAWA, S. Design and synthesis of novel 9-substituted-7-aryl-3,4,5,6-tetrahydro-2H-pyrido[4,3-b]- and [2,3-b]-1,5-oxazocin-6-ones as NK1 antagonists. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 15, n. 5, p. 1479-1484. 2005.

SHINOHARA, M.; MAUYAMA, T.; SHODA, T.; TAKAHASHI, T.; KATSUDA, Y.; KOMEDA, K.; KUROKI, M.; KAKEHASHI, A.; KANAZAW, Y. A new spontaneously diabetic non-obese Torii rat strain with severe ocular complications. **International Journal of Experimental Diabetes Research**, v. 1, n. 2, p. 89-100. 2000.

SMITS, B. M. G.; CUPPEN, E. Rat genetics: the next episode. **Trends in Genetics**, v. 22, n. 4, p. 232-240. 2006.

SMOLLER, J. W.; BLOCK, S. R.; YOUNG, M. M. Genetics of anxiety disorders: the complex road from DSM to DNA. **Depression and Anxiety**, v. 26, n. 11, p. 965-975. 2009.

SOARES, V. P.; VICENTE, M. A.; BIOJONE, C.; ZANGROSSI JR, H.; GUIMARÃES, F. S.; JOCA, S. R. L. Distinct behavioral consequences of stress models of depression in the elevated T-maze. **Behavioural Brain Research**, v. 225, n. 2, p. 590-595. 2011.

SOMERS, J. M.; GOLDNER, E. M.; WARAICH, P.; HSU, L. Prevalence and incidence studies of anxiety disorders: a systematic review of the literature. **Canadian Journal of Psychiatry**, v. 51, n. 2, p. 100-113. 2006.

SPIJKER, S.; VAN ZANTEN, J. S.; DE JONG, S.; PENNINX, B. W. J. H.; VAN DYCK, R.; ZITMAN, F. G.; SMIT, J. H.; YLSTRA, B.; SMIT, A. B.; HOOGENDIJK, W. J. G. Stimulated Gene Expression Profiles as a Blood Marker of Major Depressive Disorder. **Biological Psychiatry**, v. 68, n. 2, p. 179-186. 2010.

STATSOFT, Inc. **STATISTICA** (data analysis software system), vs. 10. <www.statsoft.com>. 2011.

STEFFERL, A.; BREHM, U.; STORCH, M.; LAMBRACHT-WASHINGTON, D.; BOURQUIN, C.; WONIGEIT, K.; LASSMANN, H.; LININGTON, C. Myelin oligodendrocyte glycoprotein induces experimental autoimmune encephalomyelitis in the “resistant” Brown Norway rat: disease susceptibility is determined by MHC and MHC-linked effects on the B cell response. **The Journal of Immunology**, v. 163, n. 1, p. 40-49. 1999.

TAKAHASHI, A.; KATSUNORI, K.; MAKINO, J.; SHIROISHI, T.; KOIDE, T. Multivariate analysis of temporal descriptions of open-field behavior in wild-derived mouse strains. **Behavior Genetics**, v. 36, n. 5, p. 763-774. 2006.

TEIXEIRA, R. C.; ZANGROSSI JR, H.; GRAEFF, F. G. Behavioral effects of acute and chronic imipramine in the elevated t-maze model of anxiety. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 65, n. 4, p. 571-576. 2000.

TRENTHAM, D. E.; TOWNES, A. S.; KANG, A. H. Autoimmunity to type II collagen: an experimental model of arthritis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 146, n. 3, p. 857-868. 1977.

VENDRUSCOLO, L. F.; TAKAHASHI, R. N.; BRÜSKE, G. R.; RAMOS, A. Evaluation of the anxiolytic-like effect of NKP608, a NK1-receptor antagonist, in two rat strains that differ in anxiety-related behaviors. **Psychopharmacology**, v. 170, n. 3, p. 287-293. 2003.

VENDRUSCOLO, L. F.; TERENINA-RIGALDIE, E.; RABA, F.; RAMOS, A.; TAKAHASHI, R. N.; MORMÈDE, P. Evidence for a female-specific effect of a chromosome 4 locus on anxiety-related behaviors and ethanol drinking in rats. **Genes, Brain and Behavior**, v. 5, n. 6, p. 441-450. 2006a.

VENDRUSCOLO, L. F.; VENDRUSCOLO, J. C. M.; RIGALDIE, E. T.; RABA, F.; RAMOS, A.; TAKAHASHI, R. N.; MORMÈDE, P. Genetic influences on behavioral and neuroendocrine responses to predator odor stress in rats. **Neuroscience Letters**, v. 409, n. 2, p. 89-94. 2006b.

VENDRUSCOLO, L. F.; VENDRUSCOLO, J. C. M.; TERENINA, E.; RAMOS, A.; TAKAHASHI, R. N.; MORMÈDE, P. Marker-assisted

dissection of genetic influences on motor and neuroendocrine sensitization to cocaine in rats. **Genes Brain and Behavior**, v.8, n. 3, p. 267-274. 2009.

WEHRMEISTER, T. D.; IZÍDIO, G. S.; PEREIRA, E.; IZÍDIO, G.; RAMOS, A. Absence of repeated-trial tolerance to the anxiolytic-like effects of chlordiazepoxide in the rat triple test. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 97, n. 2, p. 301-309. 2010.

WEISS, S. M.; WADSWORTH, G.; FLETCHER, A.; DOURISH, C. T. Utility of ethological analysis to overcome locomotor confounds in elevated maze models of anxiety. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 23, n. 2, p. 265-271. 1998.

ZANGROSSI JR, H.; GRAEFF, F. G. Behavioral validation of the elevated t-maze, a new animal model of anxiety. **Brain Research Bulletin**, v. 44, n. 1, p. 1-5. 1997.

ZENG, Z.-B.; KAO, C.-H.; BASTEN, C. J. Estimating the genetic architecture of quantitative traits. **Genetical Research, Cambridge**, v. 74, n. 3, p. 279-289. 1999.