

Lucía Raily Acuña

**INVESTIGAÇÃO DO FENÔMENO DE TOLERÂNCIA À  
PRIMEIRA EXPOSIÇÃO (*ONE-TRIAL TOLERANCE*)  
UTILIZANDO UMA LINHAGEM CONGÊNICA DE RATOS  
(SLA16) E SEU CONTROLE ISOGÊNICO SHR**

Dissertação submetida ao  
Programa de Biologia Celular e do  
Desenvolvimento da Universidade  
Federal de Santa Catarina para a  
obtenção do Grau de Mestre em  
Biologia Celular e do  
Desenvolvimento

Orientador: Prof. Dr. Geison de  
Souza Izídio

Florianópolis

2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

, Lucía Raily Acuña  
Investigação do Fenômeno de Tolerância à Primeira Exposição  
(One-Trial Tolerance) utilizando uma linhagem congênica de  
ratos (SLA16) e seu controle isogênico SHR / Lucía Raily  
Acuña ; orientador, Geison de Souza Izídio - Florianópolis,  
SC, 2015.  
68 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-  
Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Inclui referências

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2. Midazolam,  
Teste Triplo, Labirinto em Cruz Elevado. I. de Souza  
Izídio, Geison. II. Universidade Federal de Santa Catarina.  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do  
Desenvolvimento. III. Título.

**“Investigação do fenômeno de tolerância à primeira exposição (one-trial tolerance) utilizando uma linhagem congênica de ratos (SLA 16) e seu controle isogênico SHR”**

Por

**Lucia Raily Acuña**

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (016/PPGBCD/2015) do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento – UFSC.

---

Prof(a). Dr(a). Yara Maria Rauh Muller  
Coordenador(a) do Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e do  
Desenvolvimento

Banca examinadora:

---

Dr(a) Geison de Souza Izidio (BEG/CCB/UFSC)  
Orientador(a)

---

Dr(a) Leandro José Bertoglio (FMC/CCB/UFSC)

---

Dr(a) Marcelo Giachero (Pós-Doutorado PPGFMC/CCB/UFSC)

---

Dr(a) Evelise Nazari (BEG/CCB/UFSC)

Florianópolis, 26 de junho de 2015.



*Dedicado a minha filha Martina que nasceu junto com esta  
dissertação e cada dia renova minhas forças com seu amor*



## **AGRADECIMENTOS**

*Aos Professores Dr. Geison de Souza Izídio e Dr. André de Ávila Ramos pela oportunidade de formar parte do grupo de pesquisa do Laboratório de Genética do Comportamento, pelas contribuições a minha formação e pelo apoio pessoal brindado durante meu mestrado.*

*Ao corpo docente da Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento pelos conhecimentos transferidos.*

*Aos membros da banca, Profs. Drs. Evelise Maria Nazari, Leandro José Bertoglio, Marcelo Giachero e Rafael Rosa, pela generosidade de avaliar este trabalho.*

*À equipe de trabalho do Laboratório de Genética do Comportamento pela parceria. Especialmente a Paula, Natali e Renata M. pela colaboração brindada durante o desenvolvimento deste trabalho.*

*Aos meus irmãos Argentinos Elisa, Ana, Fernando e Mauro. Pela colaboração brindada neste trabalho, pela amizade, por acompanharnos, cuidar-nos e ser nossa família aqui em Florianópolis.*

*À Fernanda, Renata P. e Jeane, minhas amigas brasileiras.*

*À minha família que me apoia sempre ainda a distancia. E especialmente a minha mãe e minha filha que me dão a força para ir sempre em frente.*

*A CAPES pelo suporte financeiro sem o qual não poderia ter sido realizado este trabalho.*



*“A ciência moderna ainda não produziu um medicamento calmante tão eficaz  
como são algumas palavras amáveis”*

*Sigmund Freud*



## RESUMO

O fenômeno conhecido como Tolerância à primeira exposição, do inglês “*One Trial Tolerance* (OTT)”, vem sendo estudado durante os últimos 25 anos. Porém, os seus mecanismos subjacentes (neurobiológicos, moleculares, genéticos), ainda não foram totalmente desvendados. No OTT, uma simples experiência no labirinto em cruz elevado (LCE) reduz significativamente a ação das drogas, que exercem um efeito ansiolítico em roedores, quando estes são reexpostos ao teste. O estado farmacológico dos roedores durante a primeira exposição ao teste não influencia no desenvolvimento da tolerância criada por esta primeira passagem pelo LCE, e o fenômeno, parece persistir mesmo com um intervalo de duas semanas entre o teste e o reteste. No presente trabalho, nós investigamos o OTT em ratos machos e fêmeas, adultos, de duas linhagens diferentes, SLA16 (SHR.LEW-*Anxrr16*) e seu controle isogênico SHR (*Spontaneously Hypertensive Rats*). Inicialmente foi realizada uma caracterização comportamental de todos os grupos experimentais, sendo expostos durante cinco dias repetidos ao Teste Triplo (TT) (experimento 1) ou ao LCE (experimento 2), em um estado sem droga. Após, nós avaliamos o OTT no TT, utilizando novamente ratos machos e fêmeas adultos das linhagens SLA16 e SHR, utilizando doses baixas de midazolam (MDZ), (experimento 3). Nossos resultados para o experimento 1 sugeriram a ausência de OTT em todos os grupos. No experimento 2, os resultados sugerem que ao menos as fêmeas SLA16 apresentam total ausência de OTT em um estado sem droga quando testada também no LCE. Por fim, no experimento 3, foi observado que em machos, não ocorreu o OTT e em fêmeas a ausência do OTT foi verificada nos dias 3 e 4. Portanto, o TT demonstrou ser um teste comportamental útil para pesquisa de novos fármacos podendo ser utilizado para triagem de drogas ansiolíticas. Além disso, a linhagem SLA16, especialmente as fêmeas, parece ser uma ferramenta genética promissora para a pesquisa de novos fármacos, ou dos mecanismos biológicos subjacentes ao OTT.

**Palavras-chave:** Midazolam, Teste Triplo, Labirinto em Cruz Elevado, linhagens de ratos, ansiedade/emocionalidade.



## ABSTRACT

The phenomenon known as "One Trial Tolerance" (OTT) has been studied for the past 25 years. However, its underlying mechanisms (neurobiological, molecular, genetic), have not been fully unraveled. In OTT, a trial in elevated plus maze (EPM) significantly reduces the action of drugs that exert anxiolytic effects in rodents, when they are re-exposed into this test. The rodents pharmacological state during the first test exposure does not influence the development of tolerance created by this first trial in the EPM, and the phenomenon seems to persist even with an interval of two weeks between the test and the retest. In this study, we investigated the OTT in males and females, adults, of two rat strains, SLA16 (SHR.LEW-*Anxrr16*) and its inbred control SHR (*spontaneously hypertensive rats*). Initially, we performed a behavioral characterization of all experimental groups exposed them for five repeated days into Triple Test (TT) (experiment 1) or EPM (experiment 2) in a drug-free state. After we evaluated the OTT in TT, again using adult male and female SLA16 and SHR strains, using low doses of midazolam (MDZ) (experiment 3). Our results for the first experiment suggested the absence of OTT in all groups. In the experiment 2, the results suggested that at least the SLA16 females have total absence of OTT in a drug-free state, also when tested in the EPM. Finally, in the experiment 3, males didn't exhibited OTT what occurred on days 3 and 4 in females. Therefore, the TT proved a useful behavioral assay for screening of new anxiolytic drugs. Furthermore, SLA16 strain, especially females, appears to be a promising tool for genetic research on new drugs or biological mechanisms underlying the OTT.

Keywords: Midazolam, Triple Test, Elevated Plus Maze, rat strains, anxiety/emotionality.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representação esquemática da produção da linhagem congênica SLA16.....	5
<b>Figura 2.</b> Representação esquemática do genoma da linhagem congênica comparada aos genomas das linhagens parentais.....	6
<b>Figura 3.</b> Teste triplo.....	17
<b>Figura 4.</b> Campo aberto.....	18
<b>Figura 5.</b> Caixa branca-preta.....	19
<b>Figura 6.</b> Labirinto em cruz elevado.....	20
<b>Figura 7.</b> (A) Locomoção central, ou (B) Tempo gasto no centro, das linhagens SLA16 e SHR, machos e fêmeas, durante 5 dias repetidos, no TT.....	23
<b>Figura 8.</b> (A) Entradas ou (B) tempo gasto nos braços abertos, das linhagens SLA16 e SHR, machos e fêmeas, durante 5 dias repetidos, no TT.....	24
<b>Figura 9.</b> Tempo gasto no compartimento branco, das linhagens SLA16 e SHR, machos e fêmeas, durante 5 dias repetidos, no TT.....	25
<b>Figura 10.</b> (A) Entradas e (B) tempo gasto nos braços abertos, (C) Avaliação de risco e (D) Mergulho de cabeça, das linhagens SLA16 e SHR, machos e fêmeas, durante 5 dias repetidos, no LCE.....	26-27
<b>Figura 11.</b> Locomoção central dos machos SLA16 e SHR, controles (salina) ou tratados com MDZ, durante 4 dias repetidos (A), ou sem qualquer injeção no dia 5 (B), no TT.....	29

**Figura 12.** Tempo gasto no centro do CA dos machos SLA16 e SHR, controles (salina) ou tratados com MDZ, durante 4 dias repetidos (A), ou sem qualquer injeção no dia 5 (B), no TT.....30

**Figura 13.** Tempo gasto nos braços abertos do LCE dos machos SLA16 e SHR, controles (salina) ou tratados com MDZ, durante 4 dias repetidos (A), ou sem qualquer injeção no dia 5 (B), no TT.....32

**Figura 14.** Entradas nos braços abertos do LCE dos machos SLA16 e SHR, controles (salina) ou tratados com MDZ, durante 4 dias repetidos (A), ou sem qualquer injeção no dia 5 (B), no TT.....33

**Figura 15.** Tempo gasto no compartimento branco da CBP dos machos SLA16 e SHR, controles (salina) ou tratados com MDZ, durante 4 dias repetidos (A), ou sem qualquer injeção no dia 5 (B), no TT.....34

**Figura 16.** Locomoção central das fêmeas SLA16 e SHR, controles (salina) ou tratados com MDZ, durante 4 dias repetidos (A), ou sem qualquer injeção no dia 5 (B), no TT.....36

**Figura 17.** Tempo gasto no centro do CA das fêmeas SLA16 e SHR, controles (salina) ou tratados com MDZ, durante 4 dias repetidos (A), ou sem qualquer injeção no dia 5 (B), no TT.....37

**Figura 18.** Entradas nos braços abertos do LCE das fêmeas SLA16 e SHR, controles (salina) ou tratados com MDZ, durante 4 dias repetidos (A), ou sem qualquer injeção no dia 5 (B), no TT.....38

**Figura 19.** Tempo passado nos braços abertos do LCE das fêmeas SLA16 e SHR, controles (salina) ou tratados com MDZ, durante 4 dias repetidos (A), ou sem qualquer injeção no dia 5 (B), no TT.....39

**Figura 20.** Tempo gasto no compartimento branco da CBP pelas fêmeas SLA16 e SHR, controles (salina) ou tratados com MDZ, durante 4 dias repetidos (A), ou sem qualquer injeção no dia 5 (B), no TT.....40

## LISTA DE ABREVIATURAS

*Anxrr16- Anxiety related response QTL 16*

AR- Avaliação de risco

ANOVA- Análise de variância

BZDs- Benzodiazepinas

CA- Campo aberto

CB- Compartimento branco

CBP- Caixa branca/preta

CDZ- Clordiazepóxido

CP- Compartimento preto

EA- Entradas nos braços abertos

EF- Entradas nos braços fechados

LEW- Lewis

LCE- Labirinto em Cruz Elevado

LC- Locomoção central

LP- Locomoção periférica

MC- Mergulho de cabeça

MDZ- Midazolam

mg/kg- Miligramas/quilogramas

NT- Número de transições

OTT- Tolerância à primeira exposição (do inglês *One Trial Tolerance*)

OVX- Ovariectomizadas

QTL- *Quantitative Trait Loci*

SHR- *Spontaneously hypertensive rats*

SLA16- SHR.LEW-*Anxrr16*

TA- Tempo nos braços abertos

TC- Tempo no centro

TCB- Tempo no compartimento branco

TCP- Tempo no compartimento preto

TP- Tempo na periferia

TT- Teste Triplo



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 ANSIEDADE.....	1
1.2 MODELOS GENETICOS ANIMAIS.....	3
1.3 TESTES COMPORTAMENTAIS.....	7
1.3.1 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (LCE).....	8
1.3.2 FENÔMENO DE “ONE TRIAL TOLERANCE” (OTT).....	9
1.3.3 TESTE TRIPLO (TT).....	11
1.4 COMPORTAMENTO EMOCIONAL EM MACHOS E FÊMEAS.....	12
2. JUSTIFICATIVAS E HIPÓTESES.....	14
3. OBJETIVOS.....	15
3.1. OBJETIVO GERAL.....	15
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
4.1 ANIMAIS.....	15
4.2. TESTES COMPORTAMENTAIS.....	16
4.2.1 TESTE TRIPLO (TT).....	16
4.2.2 CAMPO ABERTO (CA).....	18
4.2.3 CAIXA BRANCA E PRETA (CBP).....	18
4.2.4 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (LCE).....	19
4.3 DROGAS.....	20
4.4 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS.....	20
4.4.1 Experimento 1: Linhagens SLA16 e SHR expostas repetidamente ao TT em ausência de tratamento farmacológico.....	20
4.4.2 Experimento 2: Linhagens SLA16 e SHR expostas repetidamente ao LCE em ausência de tratamento farmacológico.....	21
4.4.3 Experimento 3: Linhagens SLA16 e SHR no TT injetadas com MDZ repetidamente.....	21
4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	22
5. RESULTADOS.....	22
5.1 Experimento 1: Linhagens SLA16 e SHR expostas repetidamente ao TT em ausência de tratamento farmacológico.....	22
5.2 Experimento 2: Linhagens SLA16 e SHR expostas repetidamente ao LCE em ausência de tratamento farmacológico.....	25

5.3 Experimento 3: Linhagens SLA16 e SHR no TT injetadas com MDZ repetidamente.....	28
5.3.1 Teste triplo (TT) – Machos.....	28
7. CONCLUSÕES.....	50
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
9. APÊNDICE.....	65
9.1 Tempo gasto em cada aparato componente do Teste Triplo durante o teste 3.....	65
9.2 Distribuição do tempo gasto nas áreas não aversivas e aversivas do Teste Triplo durante o experimento 3.....	67

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 ANSIEDADE

Os transtornos de ansiedade tornaram-se nos últimos anos uma das doenças mais prevalentes na população mundial. Segundo a Associação de Ansiedade e Depressão de América (ADAA) 18% da população dos Estados Unidos é afetada por algum tipo de transtorno de ansiedade (NATIONAL INSTITUTE OF MENTAL HEALTH, 2014). Já no Brasil, aproximadamente 17% da população sofre algum transtorno emocional envolvendo a ansiedade (WHO, 2000). Segundo o DSM V (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, 2013), os transtornos de ansiedade compreendem: ansiedade generalizada, transtorno de pânico, agorafobia, transtornos comportamentais, transtornos de ansiedade social, transtorno de estresse pós-traumático, transtorno de ansiedade de doenças, transtorno de perda (luto), transtorno bipolar e depressivo, transtorno opositor desafiante, transtorno psicótico e transtorno de personalidade.

A ansiedade é um tipo de emoção básica, experimentada por todos nós ao menos uma vez na vida, como uma reação normal em resposta a um estímulo aversivo. Porém, quando ela é manifestada com maior frequência do que o normal, ou seja, quando sua manifestação é persistente, ou ainda quando ela é desencadeada por situações genuinamente não ameaçadoras, os resultados são comportamentos não adaptativos e prejudiciais que afetam a qualidade de vida do indivíduo (Doron e Parot, 1997; Blanchard *et al.*, 2008; Izídio, 2009).

Uma abordagem biológica poderia definir a ansiedade como um aumento das respostas fisiológicas e comportamentais apresentadas por um indivíduo diante de uma situação potencialmente perigosa (Blanchard *et al.*, 2001a, Blanchard *et al.*, 2001b). Enquanto que farmacologicamente ela refere-se a um estado emocional expresso sob condições ambientais aversivas, que pode ser atenuado ou aumentado pela administração de drogas ansiolíticas ou ansiogênicas específicas, respectivamente (Ramos e Mormède, 1998).

Embora as definições propostas acima sejam de aplicabilidade na clínica humana, o trabalho “A expressão de emoções em homens e animais” (Darwin, 1872), descreve que ambos, homens e animais compartilham o mesmo padrão de respostas emocionais. Assim, poderíamos estudar as respostas comportamentais defensivas (termo que

será utilizado neste trabalho em vez de ansiedade) apresentadas pelos animais frente a um estímulo aversivo, utilizando os resultados para fazer um paralelo com a ansiedade exibida pelo homem.

As respostas comportamentais defensivas apresentadas por um indivíduo frente a um estímulo aversivo podem ser classificadas em respostas defensivas de medo e de ansiedade. Blanchard e Blanchard (1988, 1989) demonstraram que estas respostas dependem do tipo de ameaça, sendo as respostas defensivas de medo geradas por uma ameaça real, presente; enquanto que as respostas defensivas de ansiedade estariam associadas a situações de ameaças potenciais. Gray e McNaughton (2000) incorporaram o conceito de “direção defensiva” às ideias antes mencionadas, para uma melhor distinção entre estes dois tipos de respostas comportamentais. Neste novo conceito a ansiedade conduz o indivíduo a se aproximar à situação ameaçadora, para avaliar e evitar a ameaça (avaliação de risco, esquiva passiva), enquanto o medo conduz a se afastar (esquiva ativa) da situação. A distinção entre o tipo de resposta defensiva apresentada por um indivíduo num determinado momento e ante uma determinada situação deve ser cuidadosamente avaliada, sobre todo considerando que desde um ponto de vista neural ambas as reações de defesa compartilham um circuito neural integrado que compreende estruturas neurais do sistema hipotalâmico de defesa, amígdala, tálamo, matéria cinzenta periaquedutal (MCP) e sistema septo-hipocampal (Canteras, 2008; Carvalho Netto, 2009). Uma área que demonstrou ser ativada diferencialmente para ansiedade é o *locus coeruleus*, podendo ser utilizado como um marcador específico para ansiedade (Chrousos e Gold, 1992).

Assim, de um ponto de vista farmacológico se reconhece que pode haver dois tipos de comportamentos defensivos: os sensíveis a drogas ansiolíticas e os insensíveis aos ansiolíticos. Blanchard e Blanchard (1990a, 1993) demonstraram que quando roedores eram avaliados numa bateria de testes para respostas defensivas relacionadas ao medo não se observava uma diminuição destas respostas ao receber um tratamento farmacológico com drogas ansiolíticas. Porém, quando os animais eram expostos a uma bateria de testes para respostas defensivas relacionadas à ansiedade os fármacos ansiolíticos demonstraram ser efetivos sobre comportamentos como avaliação de risco (resposta defensiva de tipo ansioso) sem afetar respostas como congelamento (resposta defensiva relacionada ao medo) (Gray e McNaughton, 2000).

## 1.2 MODELOS GENÉTICOS ANIMAIS

Vários autores propuseram o uso de grupos de animais intraespecíficos que diferem na sua base genética e suas respostas às mudanças ambientais para investigar a base neurobiológica de transtornos psicológicos (Castanon e Mormède, 1994; File, 1991; Trullas e Skolnick, 1993; Ramos *et al.*, 1997). O inter cruzamento de linhagens contrastantes para a característica de interesse, seguido do estudo das gerações segregantes, demonstrou ser um meio eficaz para testar a relação entre parâmetros fisiológicos e comportamentais (Hendley *et al.*, 1986; Castanon *et al.*, 1995; Ramos *et al.*, 1997).

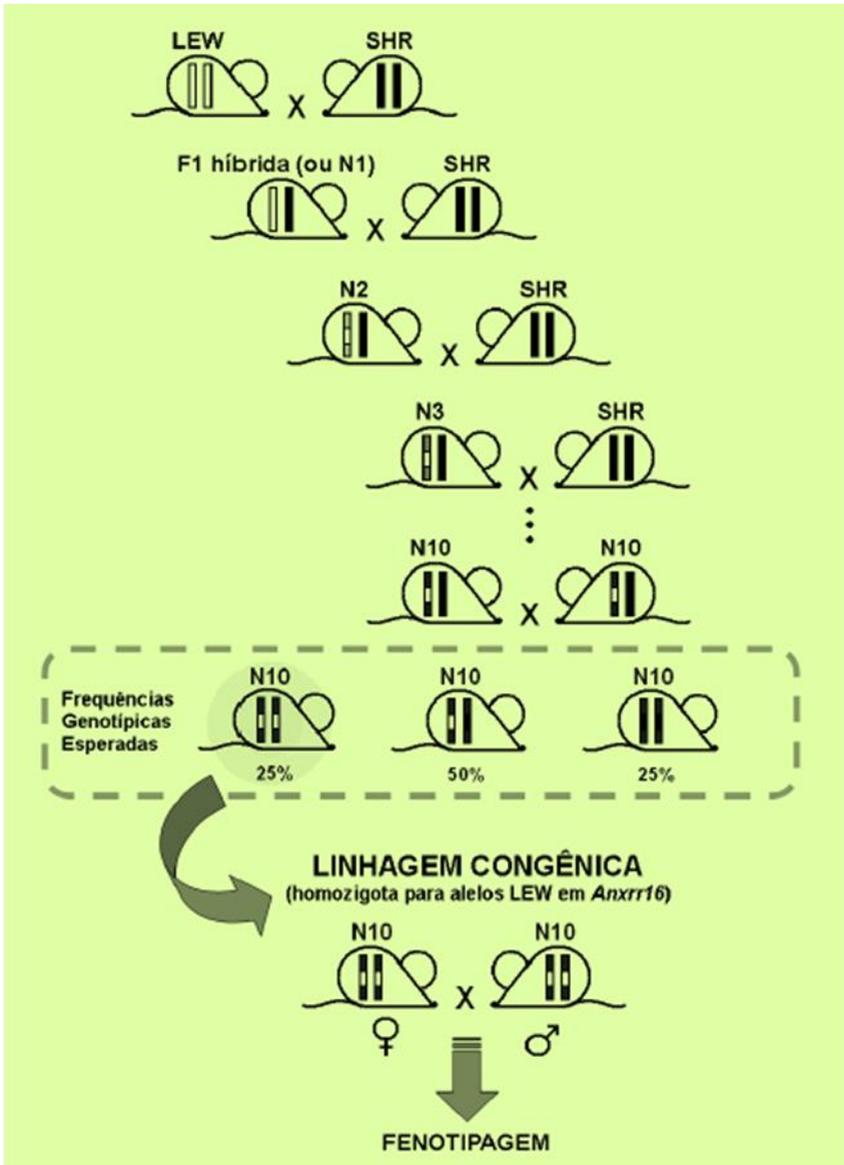
Ramos e colaboradores (1997) testaram seis linhagens isogênicas de ratos, chamadas assim por apresentar um alto grau de homozigose entre seus indivíduos, em uma bateria de testes e observaram que as linhagens LEW (Lewis) e SHR (*spontaneously hypertensive rats*) contrastam para uma série de comportamentos defensivos relacionados à ansiedade. Em todos os casos, os ratos SHR apresentaram uma aproximação maior aos estímulos aversivos, ou seja, um menor comportamento defensivo que os ratos LEW. Porém, este par de linhagens, ao contrário de outros modelos genéticos propostos para o estudo da emocionalidade não difere em sua locomoção geral tanto em ambientes novos como familiares (Flint *et al.*, 1995; Ramos *et al.*, 1998). A variação fenotípica observada entre indivíduos é classicamente atribuída à soma de dois efeitos principais, genéticos e ambientais. Assim, o comportamento contrastante destas linhagens pode ser visto como o resultado da interação dos genes com os fatores ambientais (Castanon *et al.*, 1994, 1995; Ramos e Mormède, 1998).

Muitas das diferenças comportamentais observadas nas populações são atribuídas a características quantitativas. O componente genético responsável pelas diferenças destas características são os alelos que se encontram em *loci* gênicos denominados *loci* para características quantitativas (*quantitative trait loci*, ou QTLs) (Plomin *et al.*, 1994; Flint, 2003). Através das linhagens de ratos LEW e SHR foi descoberto o primeiro QTL para comportamentos relacionados à ansiedade/emocionalidade em ratos. Esse QTL, se encontra localizado no cromossomo 4, originalmente foi denominado *Ofill* (*open field inner locomotion 1*), devido ao fato que foi observada a sua influência na locomoção central no teste do campo aberto (CA), uma variável utilizada para medir ansiedade/emocionalidade (Ramos *et al.*, 1999). Atualmente a denominação deste *loci* foi mudada para *Anxrr16* (*Anxiety*

*related response QTL 16*), e apresenta o segundo maior *LOD score* (teste estatístico que estima a relação entre os fenótipos e os marcadores moleculares) dentre os QTL para ansiedade/emocionalidade em ratos (RAT GENOME DATABASE WEBSITE, 2015).

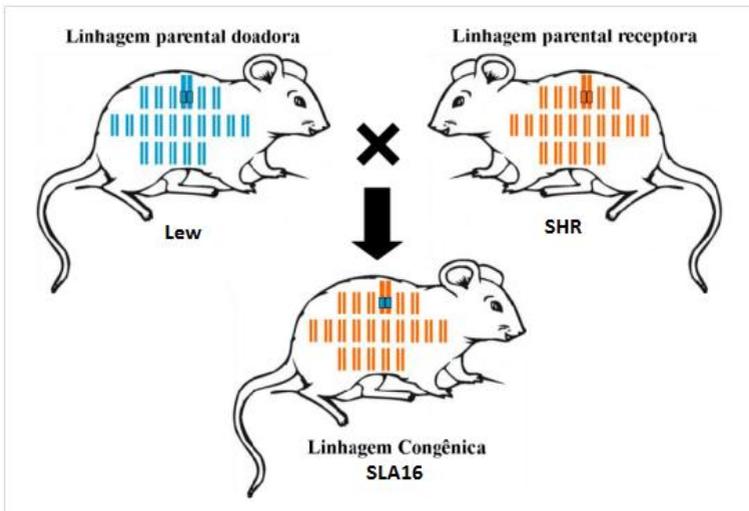
Com o intuito de aprofundar no estudo desta região genômica foi refinado o mapa do *locus* de interesse, através da construção de uma linhagem congênica. As linhagens congênicas são desenvolvidas mediante o cruzamento de duas linhagens isogênicas contrastantes para um fenótipo já conhecido. Assim, com o intuito de melhor compreender os efeitos do QTL *Anxrr16* sobre as respostas de ansiedade/emocionalidade em roedores, uma linhagem congênica, denominada SHR.LEW-*Anxrr16* (SLA16), foi construída no Laboratório de Genética do Comportamento.

A construção da linhagem congênica SLA16 começou com um intercruzamento entre fêmeas da linhagem LEW (doadora) e machos da linhagem SHR (receptora). Após, os animais produto deste intercruzamento (geração N1- heterozigotos) foram retrocruzados com a linhagem parental SHR, originando a geração N2. Este procedimento de retrocruzamentos entre as novas gerações e a linhagem parental SHR foi realizado até a obtenção da geração N10, sendo acompanhados os retrocruzamentos com marcadores moleculares (microssatélites) com a finalidade de fazer a transferência do *locus Anxrr16*. Finalmente, na geração N10 foram obtidos  $\frac{1}{4}$  dos animais homozigotos para os alelos da linhagem SHR,  $\frac{1}{2}$  heterozigotos e  $\frac{1}{4}$  homozigotos para os alelos da linhagem LEW nesse *locus*, dos quais os últimos foram selecionados como os constituintes da primeira geração (N10F1) de animais da linhagem congênica SLA16 (Fig. 1) (Pereira, 2010).



**Figura 1.** Representação esquemática da produção da linhagem congênica SLA16. Retirado de De Medeiros, 2013.

Como resultado, obteve-se uma linhagem com um genoma praticamente idêntico ao da linhagem SHR, exceto pela região do *locus Anxrr16* (Fig. 2) (De Medeiros, 2013). A caracterização fenotípica de SLA16 através de diferentes testes comportamentais demonstrou que esta linhagem apresenta em geral um comportamento defensivo menor do que a linhagem parental SHR, utilizada como controle. Portanto, o estudo desta nova linhagem contribuirá ao entendimento de como os genes contidos na região genômica correspondente ao *locus Anxrr16* e as possíveis interações dele com o background genético da linhagem SHR influenciam nas respostas comportamentais defensivas relacionadas à ansiedade (De Medeiros, 2013).



**Figura 2.** Representação esquemática do genoma da linhagem congênica comparada aos genomas das linhagens parentais. Retirado de De Medeiros, 2012.

### 1.3 TESTES COMPORTAMENTAIS

Os estudos comportamentais dos animais em aparatos específicos constituem a espinha dorsal da pesquisa pré-clínica sobre a neurobiologia dos transtornos psiquiátricos, e são empregados tanto para investigar os mecanismos subjacentes a eles (fisiologia, neurotransmissão, estruturas neurais envolvidas em doenças psiquiátricas ou neurodegenerativas), bem como ferramentas de triagem na busca de novos agentes terapêuticos (Lister, 1990; Treit, 1994; Rodgers *et al.*, 1997).

Os estudos do comportamento defensivo podem ser definidos como configurações experimentais controladas, em que o repertório comportamental de um animal é usado para obter informações sobre a ansiedade humana. Idealmente, o modelo de estudo dos animais deve assemelhar-se a ansiedade humana em termos de seus sintomas, sinais comportamentais, mecanismos biológicos e eficácia dos tratamentos farmacológicos (Treit, 1985; Lister, 1990; Ramos, 2008). O sucesso de qualquer teste comportamental é limitado pela caracterização do fenômeno que está sendo representado (Lister, 1990).

Os testes comportamentais podem ser classificados como modelos de respostas condicionadas ou não condicionadas a estímulos aversivos capazes de provocar ansiedade em humanos. Embora os modelos de condicionamento permitam um controle maior por parte do experimentador sobre as bases comportamentais, muitas vezes eles precisam expor os animais à privação de água ou alimentos, o uso de choque elétrico ou de tempos prolongados de formação dos indivíduos. Em contraste, os modelos que envolvem comportamentos não condicionados (espontâneos), como por exemplo, aversão natural a áreas abertas, apresentam geralmente um maior grau de validade etológica. Além disso, eles são menos susceptíveis à confusão de resultados de interferência, como aprendizagem/memória, fome/sede ou mecanismos nociceptivos e, permitindo assim a elaboração de um "perfil comportamental" que abrange as expectativas das intervenções experimentais (Rodgers *et al.*, 1997).

### 1.3.1 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (LCE)

Em 1955, Montgomery observou que quando se permitia que um grupo de ratos explorasse um labirinto em forma de Y, que tinha pistas abertas e fechadas elevadas a certa distância do chão, eles apresentavam uma menor exploração dos braços abertos em relação aos braços fechados. Então, ele levantou a hipótese de que a estimulação provocada pela novidade (o ambiente novo) produzia reações de conflito entre medo e curiosidade, evidenciadas por comportamentos como tendências à esquiva e aproximação, respectivamente (Montgomery, 1955; Montgomery e Monkman, 1955). Baseados nesse estudo, Handley e Mithani (1984) desenvolveram um modelo de labirinto em cruz elevado (LCE) parecido com o que existe hoje, como um teste comportamental para o estudo das respostas defensivas relacionadas à ansiedade. Esse labirinto, após sofrer a modificação que lhe deu a forma atual, foi validado comportamental, fisiológica e farmacologicamente para ratos, por Pellow e colaboradores (1985) e para camundongos, por Lister (1990).

Assim, o LCE é atualmente uma das ferramentas mais importantes para o estudo das bases biológicas do comportamento. Além de ser utilizado como uma ferramenta para visualizar os efeitos de drogas ansiolíticas/ansiógênicas (Handley e Mithani, 1984; Pellow *et al.*, 1985; Lister, 1990), sua utilidade hoje se espalhou para a compreensão das bases biológicas do comportamento defensivo relacionado com o aprendizado e a memória, dor, hormônios, adição e abstinência, bem como vários subtipos de transtornos de ansiedade tais como ansiedade generalizada, fobia e estresse pós-traumático (File *et al.*, 1998; Carobrez *et al.*, 2001, Bannerman *et al.*, 2004). Ele também tem sido utilizado com sucesso para definir as áreas do cérebro relacionadas com o medo/ansiedade (File *et al.*, 1998; Carobrez *et al.*, 2001; Carobrez e Bertoglio, 2005). Além disso, podem-se salientar as vantagens que apresenta sendo um teste barato, rápido, de simples desenho, que apresenta sensibilidade bidirecional para drogas, e não requer procedimentos de treino longos ou uso de privação de água/comida ou choque elétrico (Pellow *et al.*, 1985; Rodgers *et al.*, 1997).

Apesar de todos os fatores positivos apresentados pelo LCE, Carobrez e Bertoglio (2005) sugeriram que é preciso aperfeiçoar a confiabilidade/sensibilidade do teste, para uma melhor compreensão de algumas questões conceituais subjacentes a ele. Além de introduzir uma

abordagem metodológica mais ampla para avaliação das respostas comportamentais analisadas neste teste por meio de fatores como a análise do comportamento de avaliação de risco (AR), o uso de análise minuto a minuto e o protocolo de teste/reteste quando este aparato é utilizado precisam ser feitos.

### 1.3.2 FENÔMENO DE “*ONE TRIAL TOLERANCE*” (OTT)

Os benzodiazepínicos (BZDs) são um grupo de fármacos utilizados no tratamento da ansiedade e insônia. Além do seu uso como tranquilizantes e hipnóticos estas drogas têm utilidade como relaxantes musculares, antiepilépticos e pré-anestésicos. No LCE, drogas ansiolíticas benzodiazepínicas aumentam seletivamente a exploração nos braços abertos, considerados naturalmente como áreas aversivas do aparato. Mais especificamente, elas aumentam significativamente a porcentagem de tempo gasto (%TA) e o número de entradas (%EA) nos braços abertos, e reduzem comportamentos de avaliação de risco, sem, no entanto, alterar a atividade exploratória geral que é representada pelo número de entradas nos braços fechados (Rodgers e Cole, 1994).

A tolerância se desenvolve em ritmos diferentes para diferentes efeitos comportamentais dos BZDs, desenvolvendo-se mais lentamente para efeitos ansiolíticos do que para efeitos sedativos ou anticonvulsivantes (File, 1985). Evidências de que uma única experiência ao LCE pode reduzir significativamente ou até abolir os efeitos ansiolíticos dos BZDs clordiazepóxido (CDZ), em camundongos e ratos, respectivamente, foram relatadas por Lister (1987) e File (1990) e denominaram a este fenômeno observado “Tolerância à primeira exposição” – do inglês *One Trial Tolerance* – (OTT).

Ou seja, o fenômeno de OTT é caracterizado por uma significativa redução no efeito ansiolítico dos BZDs durante a exposição ao LCE quando os animais tiveram uma experiência anterior neste mesmo teste (File *et al.*, 1993; Gonzalez e File, 1997; Frussa Filho *et al.*, 1999). Ele parece ocorrer independentemente do estado farmacológico dos animais durante a primeira exposição, o intervalo entre as exposições e dos materiais de que o LCE é construído (File, 1990; Rodgers e Shepherd, 1993; Cruz- Morales *et al.*, 2002). O fenômeno de OTT também foi observado para outros compostos que aumentam a atividade do complexo receptor GABA-A, tais como, barbitúricos e álcool, e que reduzem a atividade do complexo do receptor de NMDA/glicina B, tais como MK - 801, HA-966 e

memantina, assim como aqueles que ativam ou antagonizam o receptor de serotonina tipo 1A (Bertoglio e Carobrez, 2003; Carobrez e Bertoglio, 2005). Segundo File (1990), a experiência nos braços abertos é o fator crucial para a esquiwa dos braços abertos, enquanto que, contrariamente, Holmes e Rodgers (1999) enfatizam a experiência prévia nos braços fechados. Porém, Bertoglio e Carobrez (2002) sugeriram que a existência de dois ambientes com diferentes níveis de aversão (braços abertos e braços fechados) é o fator chave para o processo de esquiwa aprendida neste teste.

Várias hipóteses têm sido propostas com o intuito de explicar a ocorrência do OTT, dentre as quais as mais destacadas são: redução do conflito na reexposição; sensibilização do medo (Rodgers e Shepherd, 1993; Cruz- Morales *et al.*, 2002); alteração no sitio de ligação de BZDs (File *et al.*, 1992); habituação locomotora (Dawson *et al.*, 1994); mudança qualitativa da natureza da resposta aversiva entre as exposições de uma resposta incondicionada para uma esquiwa aprendida (Holmes e Rodgers, 1998); e o envolvimento do aprendizado/memória aversiva na mudança da estratégia adotada em cada uma das sessões de exposição ao LCE (File, 1993; Stern *et al.*, 2008).

A ausência de OTT foi observada em roedores nos seguintes casos: administração de uma dose amnésica de CDZ (75 mg/kg) (File *et al.*, 1990), escopolamina (Bertoglio e Carobrez, 2004) ou propranolol antes da primeira exposição ao teste (Stern *et al.*, 2008); por meio de alterações no tempo da sessão de teste no LCE para 1 minuto (Dal-Cól *et al.*, 2003) ou 10 minutos (File *et al.*, 1993a), ao invés da sessão padrão de 5 minutos; introdução de um novo conflito motivacional - estímulos aversivos associados aos braços fechados: luz e vento quente (Pereira *et al.*, 1999); inativação temporária da amígdala basolateral com lidocaína após a primeira exposição ao teste (File *et al.*, 1998) ou do hipotálamo dorsomedial, substância cinzenta periaquedutal dorsolateral (SCPd) e hipocampo dorsal antes do reteste (File *et al.*, 1999; Bertoglio *et al.*, 2006); bloqueio promovido na etapa de consolidação dessa memória, através da inibição da síntese proteica no hipocampo dorsal com anisomicina (Gazarini, 2011); uma extensão do intervalo inter-teste para 28 dias (em vez dos habituais 24 h); e uma mudança no contexto da sala de teste (Schneider *et al.*, 2011).

### 1.3.3 TESTE TRIPLO (TT)

Estudos de correlação de dados obtidos usando diferentes testes, além de serem contraditórios, muitas vezes indicam que há pouca correlação entre os comportamentos avaliados. Esta falta de correlação é geralmente interpretada como um sinal de diferença sobre os significados psicobiológicos dos vários testes (File, 1991; Ramos *et al.*, 1997; Ramos *et al.*, 1998). Apesar da popularidade e uso generalizado dos testes de comportamento defensivo relacionado à ansiedade, muitas inconsistências são achadas nas respostas avaliadas, pesquisadores concordam que nenhum dos testes existentes fornece uma medida de ansiedade pura e indiscutível da reatividade emocional, e que cada teste individual avalia apenas uma fração do perfil emocional de um animal (Lister, 1990; File, 1991; Ramos e Mormède, 1998).

Portanto, muitos autores acreditam que a utilização de uma bateria de testes comportamentais é melhor do que utilizar um único ensaio. Da mesma maneira, para obter uma imagem confiável e significativa do perfil emocional de um animal, moldado por fatores genéticos e ambientais, é preciso testá-lo em diferentes aparatos comportamentais. Mas ao fazê-lo em momentos diferentes, nós não sabemos se as respostas que eles apresentam são devidas ao seu perfil emocional variável, ou devido às diferenças entre os testes (Ramos, 2008).

Com o intuito de resolver essa questão, Ramos e colaboradores (2008) sugeriram que um perfil emocional mais completo e confiável de roedores de laboratório pode ser obtido pela combinação física de diferentes testes não condicionados existentes. Para fazer isso, propuseram uma combinação dos três testes mais amplamente utilizados para avaliar comportamento defensivo de tipo ansioso, ou seja, o campo aberto (CA), o labirinto em cruz elevado (LCE) e a caixa branca/preta (CBP). O teste consiste em colocar o rato no centro do CA e permitir que este explore o aparato inteiro durante 15 minutos. Sendo os comportamentos avaliados aqueles que são considerados para cada teste individual. Assim, com este teste integrado, o experimentador seria capaz de avaliar diferentes aspectos da emocionalidade simultaneamente, evitando-se, assim, os efeitos indesejáveis da experiência de testes prévios, os intervalos intertestes e a manipulação dos animais entre eles.

Este novo teste, denominado Teste Triplo (TT), foi proposto como um modelo de estudo do comportamento defensivo relacionado à

ansiedade/emocionalidade e atividade motora em ratos e camundongos, demonstrando ser sensível a diferenças genéticas nas respostas emocionais e aos efeitos farmacológicos das substâncias ansiolíticas e ansiogênicas. Uma característica interessante deste teste é que não foi observado o fenômeno de OTT em ratos *Wistar* que receberam CDZ (10 mg/kg) e foram expostos durante 20 dias repetidos ao TT (Wehrmeister, 2010). Além disso, machos e fêmeas de camundongos *Swiss-Webster* foram testados no TT numa situação de teste e reteste, recebendo também CDZ (1.0, 7.5 e 15.0 mg/kg), e foi observado que o efeito da droga era independente do dia e não havia um efeito de tolerância ao BZD (Fraser *et al.*, 2010; Hussin *et al.*, 2012).

#### **1.4 COMPORTAMENTO EMOCIONAL EM MACHOS E FÊMEAS**

A grande maioria dos testes comportamentais esta baseada no uso de roedores machos, muito provavelmente devido à presença do ciclo estral em fêmeas e as suas flutuações dos hormônios sexuais pronunciadas, o que multiplica o número de fêmeas a serem testadas. Porém, esta preferência pelo uso de machos nos trabalhos de pesquisa, não só esta limitando os resultados para um grupo de indivíduos, muito diferente de fêmeas, mas também prejudica as bases de dados que são extrapolados para as situações clínicas humanas. Onde é bem conhecido que mulheres respondem de forma diferente a homens a vários tratamentos medicamentosos (Horst, 2012).

Os hormônios sexuais femininos, estrógeno e progesterona, influenciam a emocionalidade e cognição, contribuindo para as diferenças comportamentais entre os sexos (Horst, 2012). Nas ratas, o ciclo hormonal dura de quatro a cinco dias e é composto por quatro fases: estro (fase onde a progesterona encontra-se em seu nível máximo, corresponde a etapa de ovulação) caracteriza-se por apresentar células cornificadas e com intensa descamação; metaestro (fase entre os ciclos, não há um tipo de hormônio predominante) com células diversificadas; diestro (fase onde se inicia a ação do estradiol alcançando a metade de sua taxa máxima) onde as células possuem grande quantidade de leucócitos e proestro (fase onde o estradiol alcança o pico máximo) caracterizado por possuir células grandes e nucleadas (Schwartz, 1969; Carter, 1993; Kandel *et al.*, 1995).

Fêmeas de ratos e camundongos expressam um menor comportamento defensivo que machos. As diferentes respostas

comportamentais observadas são, em grande parte, devidas a reatividade do eixo HPA (hipotálamo- hipófise- adrenal), a qual é diferente entre machos e fêmeas (Horst, 2012). Ratas têm geralmente níveis circulantes basais de corticosterona, até quatro vezes maiores, em comparação com os machos (Galea *et al.*, 1997; Bowman, 2004; Figueiredo *et al.*, 2002). Em resposta ao estresse, os níveis plasmáticos de vasopresina (AVP) e adrenocorticotropina (ACTH) são aumentados (Le Mével *et al.*, 1979; Williams *et al.*, 1985) e os níveis de corticosterona aumentam e permanecem mais elevados em fêmeas do que em machos (Kitay, 1961; Pollard *et al.*, 1975; Le Mével *et al.*, 1979; Figueiredo *et al.*, 2002).

Vários trabalhos relatam que ratas e camundongas apresentam um menor comportamento defensivo e excitação em novos ambientes do que os machos (Adamec *et al.*, 2006). Fêmeas entram mais facilmente nos braços do LCE (Johnston e File, 1991; Rodgers e Cole, 1993; Bowman *et al.*, 2001). Também no CA, a área central deste aparato é explorada mais extensivamente por fêmeas que por machos (Kennett *et al.*, 1986). Além disso, camundongas passam mais tempo no compartimento claro da CBP do que os machos (Adamec *et al.*, 2006; Voikar *et al.*, 2001). Estudos utilizando fêmeas ovariectomizadas (OVX) as quais foram tratadas com estradiol, foram testadas junto com seus controles numa bateria de testes, e como resultado foi observado que as fêmeas sob tratamento hormonal expressaram um menor comportamento defensivo em relação às fêmeas controle. Esses achados sugerem que o estrogênio poderia estar modulando as respostas comportamentais defensivas relacionadas à ansiedade, agindo como um agente ansiolítico (Luine *et al.*, 2007).

## 2. JUSTIFICATIVAS E HIPÓTESES

Há uma crescente necessidade por compreender o que significam realmente as emoções expressadas pelos animais quando são expostos aos testes comportamentais, para assim poder avaliar, testar e até desenvolver novos fármacos que vão ser empregados em terapias utilizadas na clínica humana dos transtornos psiquiátricos. Com o intuito de compreender melhor as respostas defensivas relacionadas à ansiedade apresentadas por roedores, Ramos e colaboradores (2008) desenvolveram o TT que permite uma análise dos comportamentos evitando efeitos indesejáveis da experiência de testes prévios, os intervalos intertestes e a manipulação entre eles, como anteriormente mencionado. Apesar do TT já ter sido validado farmacologicamente como modelo de estudo para comportamentos defensivos e de não ter sido observado o fenômeno do OTT em ratos *Wistar* testados repetidamente sob tratamento com CDZ, permanecem as dúvidas a respeito da presença ou ausência deste fenômeno na avaliação comportamental de outras linhagens no TT. Também permanece a dúvida a respeito da presença ou ausência deste fenômeno após tratamento com um BDZ efetivamente utilizado na clínica humana.

Assim, nossa primeira hipótese levantada foi que ratos, machos e fêmeas da linhagem SLA16 quando testados repetidamente no TT e no LCE, independentemente de um tratamento farmacológico, não apresentariam o fenômeno de OTT. Tornando-se assim, um modelo genético animal adequado para a avaliação comportamental ou triagem de fármacos ansiolíticos sob o tratamento agudo, repetido ou crônico.

Além desta, nossa segunda hipótese proposta é que ratos, fêmeas e machos das duas linhagens, SLA16 e SHR, testadas no TT repetidamente, com diferentes doses do BDZ midazolam (MDZ), não desenvolveriam o fenômeno de OTT.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVO GERAL

Investigar a ocorrência do Fenômeno de Tolerância à Primeira Exposição (*One-Trial Tolerance*) no Teste Triplo e no LCE utilizando uma linhagem congênica de ratos (SLA16) e seu controle isogênico SHR.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Caracterizar o comportamento de machos e fêmeas das linhagens SLA16 e SHR quando expostos repetidamente ao TT, na ausência de tratamento farmacológico.

Caracterizar o comportamento de machos e fêmeas das linhagens SLA16 e SHR quando expostos repetidamente ao LCE, na ausência de tratamento farmacológico.

Avaliar os efeitos do tratamento repetido com o MDZ em machos e fêmeas das linhagens SLA16 e SHR quando expostos ao TT.

### 4. MATERIAL E MÉTODOS

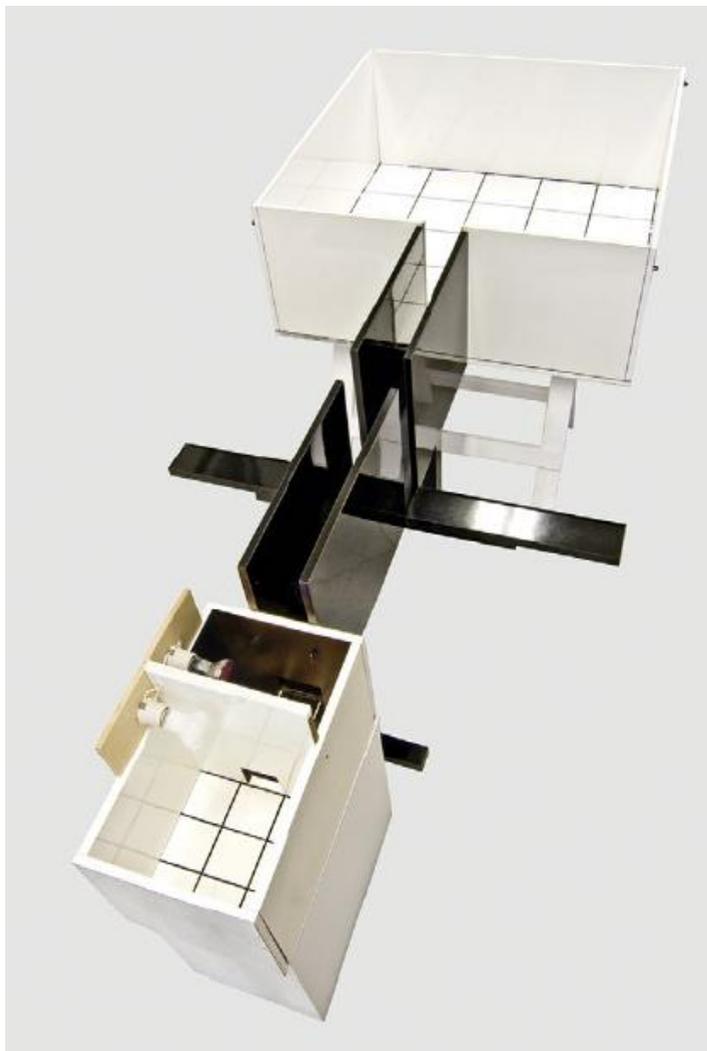
#### 4.1 ANIMAIS

Neste trabalho foram utilizados um total de 100 ratos da linhagem isogênica SHR (50 machos e 50 fêmeas) e 100 ratos da linhagem congênica SLA16 (50 machos e 50 fêmeas), entre 12 e 16 semanas de idade. Todos os animais foram criados em nosso laboratório, desmamados e separados por sexo com 28 dias de idade, e colocados em gaiolas de polipropileno (41 cm x 34 cm x 16 cm de altura) contendo cada uma 5 a 6 ratos por gaiola. Com água e comida *ad libitum*, sob um ciclo claro/ escuro de 12: 12 h (luzes acesas às 07:00h) e temperatura mantida a  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Os experimentos foram realizados entre as 10:00h e as 18:00h. Os procedimentos realizados foram aprovados e estão de acordo com as orientações do Comitê de Ética em Experimentação Animal local (CEUA/UFSC, Protocolo N°PP00656).

## **4.2. TESTES COMPORTAMENTAIS**

### **4.2.1 TESTE TRIPLO (TT)**

O TT (Figura 3) consiste na junção física dos três aparatos comportamentais, que serão posteriormente descritos, que se encontram conectados por aberturas localizadas nos braços fechados do LCE, no compartimento preto da CBP e uma abertura central em uma das paredes do CA. O LCE encontra-se no centro do teste triplo, servindo como conexão entre o CA e a CBP. Assim, no TT temos o CA, onde uma de suas paredes encontra-se conectada a um dos braços fechados do LCE por uma abertura central (10 cm de largura por 40 cm de altura) que permite livre acesso a todo o labirinto e consequentemente à CBP. Na extremidade do outro braço fechado do LCE há uma abertura (10 x 7 cm) conectando-o a CBP. Essa abertura encontra-se no centro de uma das paredes do compartimento preto da caixa, e, oposta a essa, existe outra pequena abertura (7x7 cm) ligando os dois compartimentos da CBP. O TT está disposto a 52 cm de altura do chão para que as características aversivas dos braços abertos do LCE sejam mantidas.



**Figura 3.** O Teste Triplo é um aparato que integra três testes clássicos que medem respostas defensivas relacionadas à ansiedade. Foto retirada de: Ramos, 2008.

#### 4.2.2 CAMPO ABERTO (CA)

O aparato utilizado neste teste (Figura 4) é de madeira coberta com fórmica, consiste em uma arena branca, quadrada (100 x 100 cm), dividida em 25 quadrados de 20 x 20 cm (linhas divisórias pretas), cercada por paredes também brancas, de 40 cm de altura. Os 16 quadrados adjacentes às paredes constituem a região periférica do aparato, enquanto os outros 9 formam a parte central.

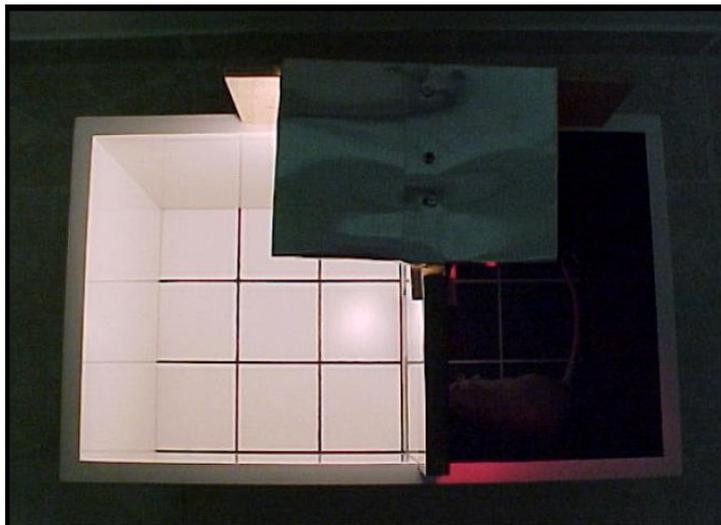


**Figura 4.** O Campo aberto é um dos aparatos que compõe o TT. Foto retirada de De Medeiros, 2012.

#### 4.2.3 CAIXA BRANCA E PRETA (CBP)

O aparato utilizado no teste (Figura 5) é de madeira coberta com fórmica, é uma caixa retangular, dividida 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), conectados por uma pequena abertura (7 x 7 cm) na parede divisória. A iluminação dos compartimentos foi feita através de lâmpadas fluorescentes, uma branca (750 lux) e uma vermelha (20 lux).

Ambas as lâmpadas de 40 W são localizadas 30 cm acima do piso do aparato.



**Figura 5.** A Caixa branca/preta é um dos aparatos que compõe o TT. Foto retirada de De Medeiros, 2012

#### **4.2.4 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (LCE)**

O aparato (Figura 6) é de madeira coberta com fórmica preta, apresenta quatro braços, sendo dois abertos e dois fechados, dispostos em forma de cruz (52 cm elevados do chão, com 50 cm de comprimento e 10 cm de largura). Os braços fechados estando cercados por paredes de 40 cm, enquanto os braços abertos apresentam um anteparo de 1 mm por 5 mm de altura. Os braços são conectados por uma plataforma central (10 x 13,5 cm) formada pela intersecção dos quatro braços.



**Figura 6.** O Labirinto em cruz elevado é um dos aparatos que compõe o TT. Foto retirada de De Medeiros, 2012.

### **4.3 DROGAS**

A escolha das doses e quantidades empregadas foi baseada em dados da literatura (Bertoglio e Carobrez, 2002) e em experimentos prévios do nosso laboratório. Midazolam (MDZ; Dormire®, Cristália, Brasil) foi diluído em solução salina fisiológica (NaCl 0,9%), e administrado via i. p (1,0 mL/kg), 30 minutos antes do teste TT, nas doses de 0,5 e 0,75 mg/kg. O grupo controle recebeu um volume de salina de acordo com o peso do animal.

### **4.4 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS**

#### **4.4.1 Experimento 1: Linhagens SLA16 e SHR expostas repetidamente ao TT em ausência de tratamento farmacológico**

Durante cinco dias repetidos, os animais (10/linhagem/sexo) foram expostos ao TT, sendo posicionados no centro do CA, e deixados para explorar livremente os três aparatos (CA, LCE e CBP) durante 15 min, sem nenhum tratamento farmacológico. Os seguintes parâmetros comportamentais foram avaliados: locomoção central (LC) e periférica (LP), tempo gasto no centro (TC) e na periferia (TP) do CA, número de

entradas (EA) e tempo gasto nos braços abertos (TA) e número de entradas (EF) e tempo gasto nos braços fechados (TF) do LCE, tempo gasto no compartimento preto (TCP) e branco (TCB) e número de transições (NT) da CBP. No final de cada sessão de teste, o aparato foi limpo com etanol 10 % e seco com papel toalha. Os comportamentos foram registrados por três microcâmeras localizadas acima do aparato e monitorados por um experimentador treinado através de um sistema de vigilância em uma sala adjacente.

#### **4.4.2 Experimento 2: Linhagens SLA16 e SHR expostas repetidamente ao LCE em ausência de tratamento farmacológico**

Durante cinco dias repetidos, os animais (10/linhagem/sexo) foram expostos ao teste do LCE, sendo posicionados na plataforma central deste aparato e deixados para explorá-lo livremente o durante 5 min. Os seguintes parâmetros comportamentais foram avaliados: número de entradas (EA) e tempo gasto nos braços abertos (TA) e fechados (TF), avaliação de risco (AR) e mergulho de cabeça (*head dipping*) (MC). Foi realizada uma análise geral e uma análise do comportamento minuto a minuto. No final de cada sessão de teste, o aparato foi limpo com etanol 10 % e seco com papel toalha. Os comportamentos foram registrados por uma microcâmera localizada acima do aparato e monitorados por um experimentador treinado através de um sistema de vigilância em uma sala adjacente.

#### **4.4.3 Experimento 3: Linhagens SLA16 e SHR no TT injetadas com MDZ repetidamente**

Durante quatro dias seguidos, os animais (9-10/linhagem/sexo/tratamento) receberam salina (NaCl 0,9%), MDZ 0,5 mg/kg ou MDZ 0,75 mg/kg, e retornaram para uma gaiola isolada. No quinto e último dia não foi administrado tratamento farmacológico, com a finalidade de avaliar se os comportamentos dos animais seriam dependentes da administração diária do fármaco. 30 minutos após a injeção, o animal era posicionado no centro do CA, e deixado para explorar livremente os três aparatos do teste triplo (CA, LCE e CBP) durante 15 min. Os mesmos parâmetros comportamentais do experimento 1 foram aqui avaliados. No final de cada sessão de teste, o aparato foi limpo com etanol 10 % e seco com papel toalha. Os comportamentos foram registrados por três microcâmeras localizadas

acima do aparato e monitorados por um experimentador treinado através de um sistema de vigilância em uma sala adjacente.

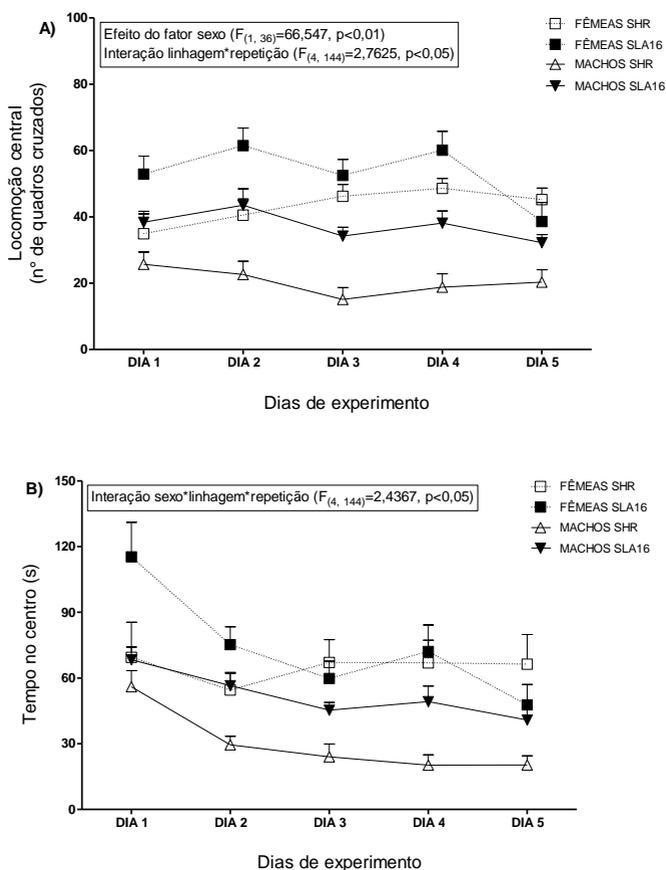
## 4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão. No primeiro experimento e segundo experimentos foram realizadas ANOVA de três vias de medidas repetidas (fatores linhagem, sexo e repetição). No terceiro experimento (TT com tratamento farmacológico) foi realizada uma ANOVA de três vias de medidas repetidas (fatores linhagem, tratamento e repetição), separadamente para cada sexo, nos quatro primeiros dias, durante os quais todos os grupos experimentais receberam tratamento farmacológico. Para analisar o quinto dia, no qual nenhum grupo recebeu tratamento farmacológico, foi realizada a ANOVA de duas vias (fatores linhagem e tratamento). Quando necessário, as análises foram seguidas do teste *post-hoc* de Duncan. Os resultados foram considerados significativos quando  $p \leq 0,05$ . Todas as análises foram realizadas utilizando o programa *Statistica*® 7.0, e todos os gráficos foram produzidos com o programa *GraphPad* 5.0.

## 5. RESULTADOS

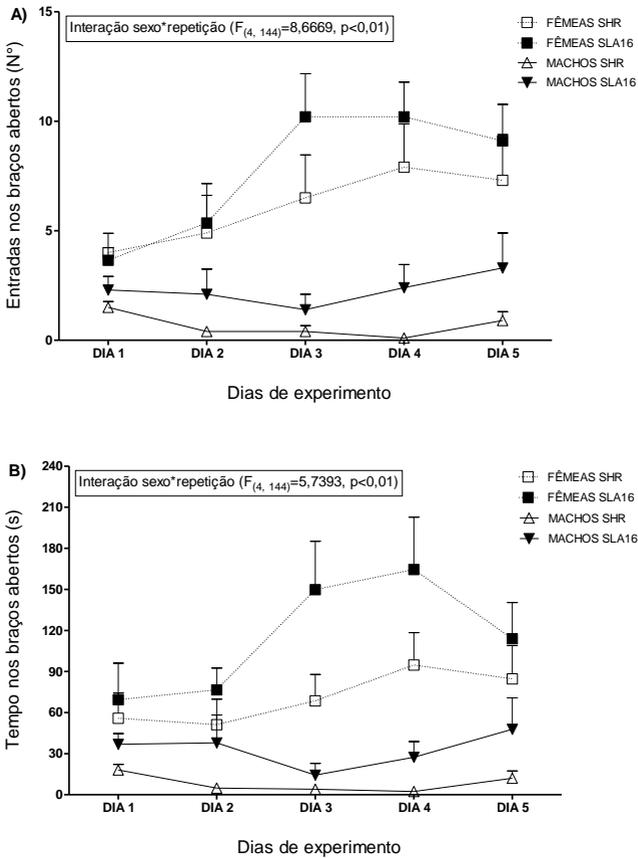
### 5.1 Experimento 1: Linhagens SLA16 e SHR expostas repetidamente ao TT em ausência de tratamento farmacológico

No TT, dentro da área do CA, a ANOVA de medidas repetidas revelou um efeito significativo para o **fator sexo** na medida: LC ( $F_{(1, 36)}=66,547$ ,  $p<0,01$ ; Fêmeas>Machos). Também foi observada uma interação entre os fatores **linhagem** e **repetição** na medida: LC ( $F_{(4, 144)}=2,7625$ ,  $p<0,05$ ), onde o *post-hoc* de Duncan mostrou que as linhagens diferem em todos os dias (SLA16>SHR), menos no dia 5 (Figura 7a). Ainda ocorreu uma interação entre os fatores **sexo** e **repetição** na medida: LP ( $F_{(4, 144)}=8,7989$ ,  $p<0,01$ ), onde o *post-hoc* de Duncan mostrou que as fêmeas apresentam maior locomoção que os machos, exceto no dia 1 (dados não mostrados). Por fim, ocorreu uma interação entre os fatores **sexo**, **linhagem** e **repetição** na medida: TC ( $F_{(4, 144)}=2,4367$ ,  $p<0,05$ ), onde o *post-hoc* de Duncan mostrou que as fêmeas SLA16 apresentaram maior tempo no centro que todos os outros grupos somente no dia 1 (Figura 7b).



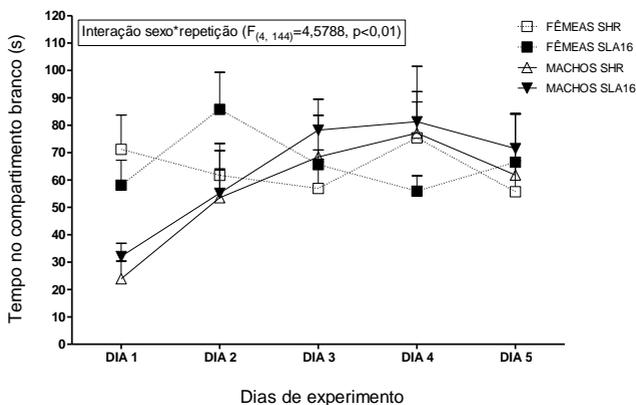
**Figura 7.** (A) Locomoção central, ou (B) Tempo gasto no centro, das linhagens SLA16 e SHR, machos e fêmeas, durante 5 dias repetidos, no TT ( $n=10$ /linhagem/sexo/dia). As linhas e símbolos representam a média  $\pm$  erro padrão. Efeitos significativos revelados pela ANOVA de três vias para medidas repetidas são apresentados no canto superior esquerdo com o F e p correspondentes.

No TT, dentro da área do LCE, a ANOVA de medidas repetidas revelou uma interação significativa entre os **fatores sexo e repetição** ( $F_{(4, 144)}=8,6669, p<0,01$ ) para EA e TA ( $F_{(4, 144)}=5,7393, p<0,01$ ). O teste *post-hoc* de Duncan revelou que as fêmeas da linhagem SLA16 entraram mais vezes e passaram mais tempo nos braços abertos que os animais dos outros grupos durante os dias 3, 4 e 5 (Figura 8a e b).



**Figura 8.** (A) Entradas ou (B) Tempo gasto nos braços abertos, das linhagens SLA16 e SHR, machos e fêmeas, durante 5 dias repetidos, no TT ( $n=10$ /linhagem/sexo/dia). As linhas e símbolos representam a média  $\pm$  erro padrão. Efeitos significativos revelados pela ANOVA de três vias para medidas repetidas são apresentados no canto superior esquerdo com o F e p correspondentes.

No TT, dentro da área da CBP, a ANOVA de medidas repetidas revelou um efeito significativo da interação entre os **fatores sexo e repetição** para as medidas: TCB ( $F_{(4, 144)}=4,5788, p<0,01$ ). O teste *post-hoc* de Duncan revelou que os machos no primeiro dia do teste apresentaram menor TCB do que os outros grupos (Figura 9).

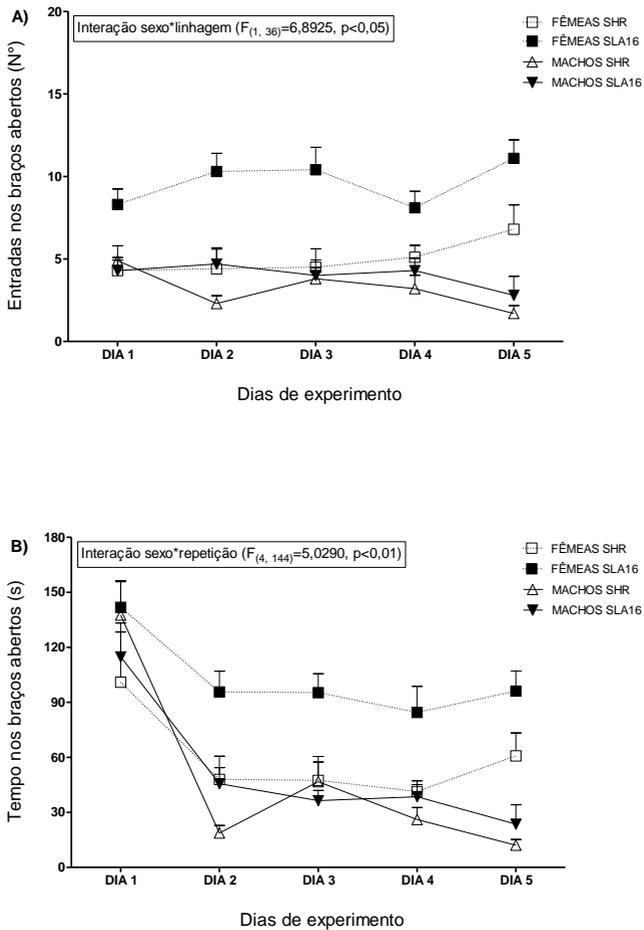


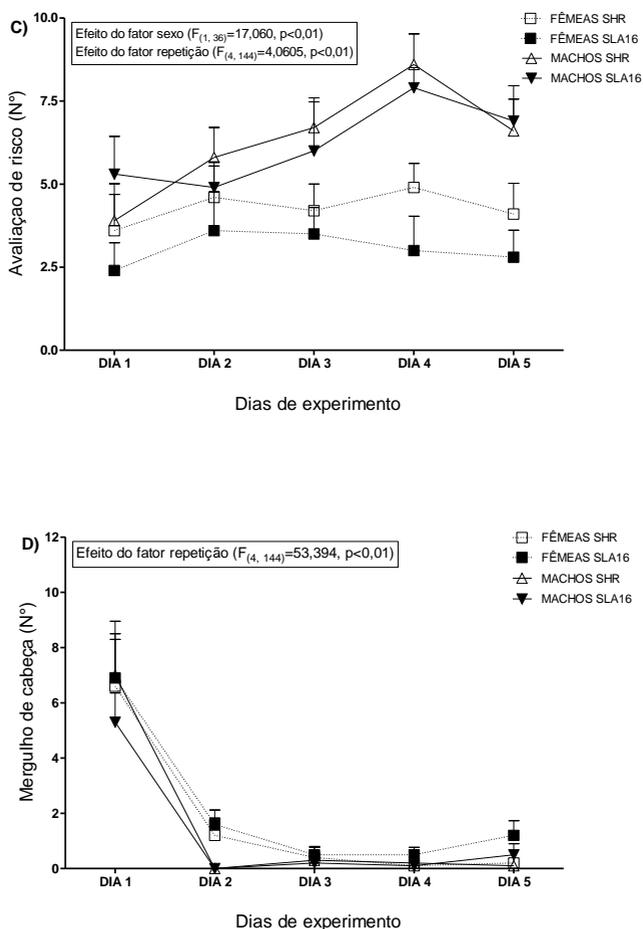
**Figura 9.** Tempo gasto no compartimento branco, das linhagens SLA16 e SHR, machos e fêmeas, durante 5 dias repetidos, no TT (n=10/linhagem/sexo/dia). As linhas e símbolos representam a média  $\pm$  erro padrão. Efeitos significativos revelados pela ANOVA de três vias para medidas repetidas são apresentados no canto superior esquerdo com o F e p correspondentes.

## 5.2 Experimento 2: Linhagens SLA16 e SHR expostas repetidamente ao LCE em ausência de tratamento farmacológico

A análise estatística do LCE repetido também foi realizada através de ANOVA de medidas repetidas, a qual revelou efeitos significativos para o **fator sexo** nas medidas: TF ( $F_{(1, 36)}=25,786$ ,  $p<0,01$ ; Fêmeas>Machos) e AR ( $F_{(1, 36)}=17,060$ ,  $p<0,01$ ; Machos>Fêmeas). O **fator repetição** apresentou diferenças significativas para as medidas: EF ( $F_{(4, 144)}=26,308$ ,  $p<0,01$ ), TF ( $F_{(4, 144)}=16,481$ ,  $p<0,01$ ), AR ( $F_{(4, 144)}=4,0605$ ,  $p<0,01$ ) e MC ( $F_{(4, 144)}=53,394$ ,  $p<0,01$ ). O teste *post-hoc* de Duncan revelou que todos os grupos apresentaram menor número de entradas e tempo gasto no braço fechado durante o primeiro dia em comparação com os outros dias (dados não mostrados). Em relação a variável AR este *post-hoc* indicou uma maior expressão deste comportamento nos dias 3, 4 e 5 em comparação aos dias 1 e 2 (Figura 10c). Por fim, foi revelado um elevado número de MC durante o primeiro dia do teste em comparação aos outros dias (Figura 10d). Foram encontradas interações entre os **fatores sexo e linhagem** ( $F_{(1, 36)}=6,8925$ ,  $p<0,05$ ) para a variável EA. O

teste *post-hoc* de Duncan revelou que as fêmeas SLA16 entram mais nesta área em comparação com as fêmeas SHR, fato que não ocorre nos machos, durante todos os dias (Figura 10a). Outra interação interessante foi achada entre os **fatores sexo e repetição** ( $F_{(4, 144)}=5,0290$ ,  $p<0,01$ ) para o TA, com machos e fêmeas de ambas as linhagens passando mais tempo nos braços abertos do LCE no primeiro dia de teste, em comparação aos demais, segundo *post-hoc* de Duncan (Figura 10b).





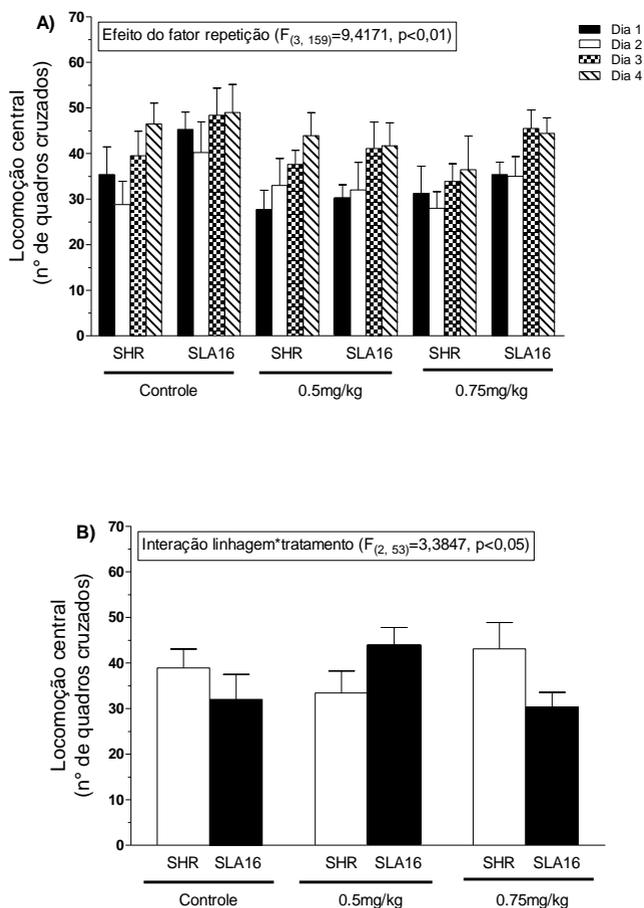
**Figura 10.** (A) Entradas e (B) Tempo gasto nos braços abertos, (C) Avaliação de risco e (D) Mergulho de cabeça, das linhagens SLA16 e SHR, machos e fêmeas, durante 5 dias repetidos, no LCE ( $n=10$ /linhagem/sexo/dia). As linhas e símbolos representam a média  $\pm$  erro padrão. Efeitos significativos revelados pela ANOVA de três vias para medidas repetidas são apresentados no canto superior esquerdo com o F e p correspondentes.

### 5.3 Experimento 3: Linhagens SLA16 e SHR no TT injetadas com MDZ repetidamente

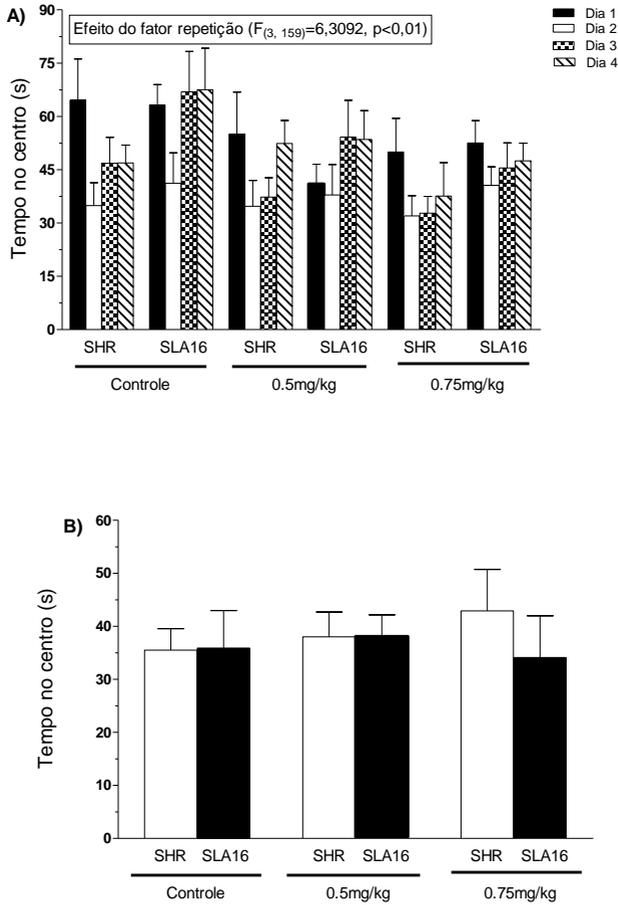
#### 5.3.1 Teste triplo (TT) - Machos

No TT, dentro da área do CA com machos, a ANOVA de medidas repetidas revelou um efeito significativo para o **fator repetição** nas medidas: LC ( $F_{(3, 159)}=9,4171$ ,  $p<0,01$ ) e TC ( $F_{(3, 159)}=6,3092$ ,  $p<0,01$ ). O teste *post-hoc* de Duncan mostrou que os animais apresentaram maiores índices de LC nos dias 3 e 4 em comparação aos dias 1 e 2 (Figura 11a) e menor TC no dia 2 em comparação aos outros dias (Figura 12a).

A ANOVA de duas vias revelou uma **interação entre linhagem e tratamento** para a medida LC no quinto dia ( $F_{(2, 53)}=3,3847$ ,  $p<0,05$ ). O teste *post-hoc* de Duncan mostrou que somente os animais da linhagem SLA16 que foram tratados nos dias anteriores com MDZ 0.5 mg/kg apresentaram um maior índice de locomoção, em comparação aos outros 2 grupos (Figura 11b).



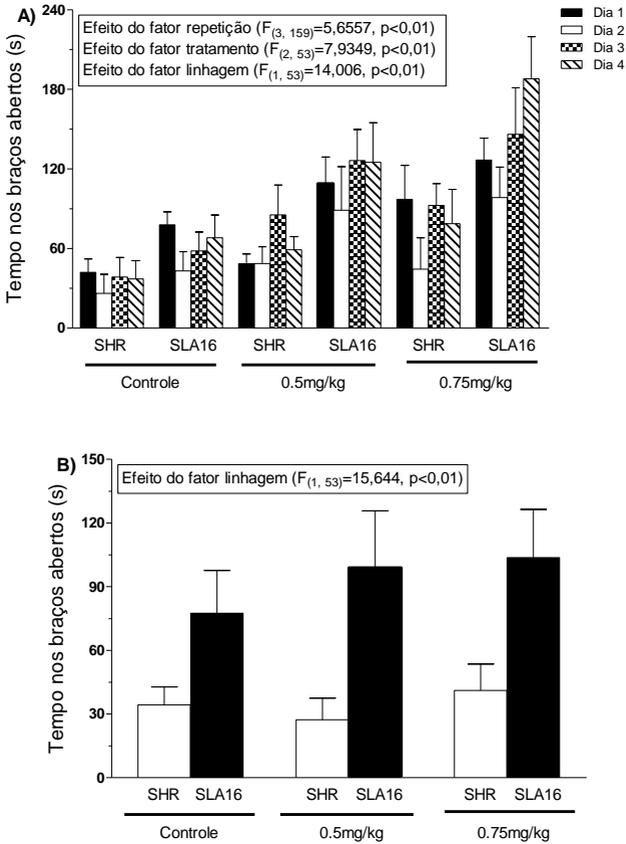
**Figura 11.** Locomoção central dos machos SLA16 e SHR, controles (salina) ou tratados com MDZ, durante 4 dias repetidos (A), ou sem qualquer injeção no dia 5 (B), no TT ( $n=10$ /linhagem/tratamento/dia). As colunas representam a média  $\pm$  erro padrão. Efeitos significativos revelados pela ANOVA de três vias para medidas repetidas são apresentados no canto superior esquerdo com o F e p correspondentes.



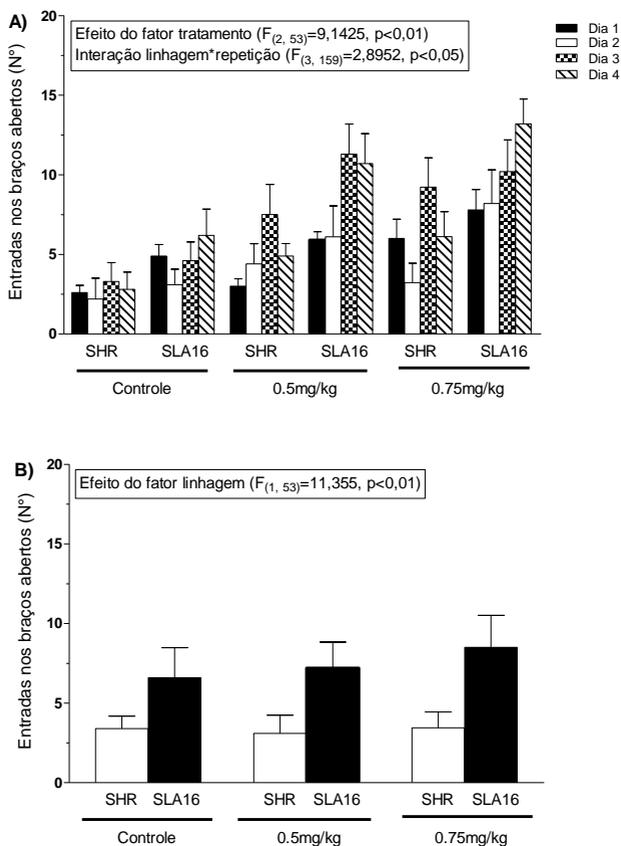
**Figura 12.** Tempo gasto no centro do CA dos machos SLA16 e SHR, controles (salina) ou tratados com MDZ, durante 4 dias repetidos (A), ou sem qualquer injeção no dia 5 (B), no TT ( $n=10$ /linhagem/tratamento/dia). As colunas representam a média  $\pm$  erro padrão. Efeitos significativos revelados pela ANOVA de três vias para medidas repetidas são apresentados no canto superior esquerdo com o F e p correspondentes.

No TT, dentro da área do LCE com machos, a ANOVA de medidas repetidas revelou um efeito significativo para o **fator repetição** nas medidas: TA ( $F_{(3, 159)}=5,6557$ ,  $p<0,01$ ) e EF ( $F_{(3, 159)}=7,8145$ ,  $p<0,01$ ). O teste *post-hoc* de Duncan mostrou que no dia 2 os animais passaram menos tempo nos braços abertos (Figura 13a) e que no dia 1 fizeram menos entradas nos fechados, em comparação aos outros dias (dados não mostrados). Também ocorreu um efeito do **fator tratamento** nas medidas: TA ( $F_{(2, 53)}=7,9349$ ,  $p<0,01$ ) e EA ( $F_{(2, 53)}=9,1425$ ,  $p<0,01$ ). O teste *post-hoc* de Duncan mostrou que os animais tratados com MDZ passaram mais tempo (Figura 13a) e entraram mais vezes nos braços abertos (Figura 14a) do que os animais controle. Ainda ocorreu um efeito do **fator linhagem** na medida: TA ( $F_{(1, 53)}=14,006$ ,  $p<0,01$ ; SLA16>SHR) (Figura 13a). Por fim, ocorreu uma **interação entre linhagem e repetição** na medida: EA ( $F_{(3, 159)}=2,8952$ ,  $p<0,05$ ). O teste *post-hoc* de Duncan mostrou que as linhagens diferem (SLA16>SHR) somente nos dias 2 e 4 (Figura 14a).

A ANOVA de duas vias revelou uma diferença significativa entre as linhagens para a variável TA ( $F_{(1, 53)}=15,644$ ,  $p<0,01$ ; SLA16>SHR) e EA ( $F_{(1, 53)}=11,355$ ,  $p<0,01$ ; SLA16>SHR) (Figuras 13b e 14b, respectivamente).



**Figura 13.** Tempo gasto nos braços abertos do LCE dos machos SLA16 e SHR, controles (salina) ou tratados com MDZ, durante 4 dias repetidos (A), ou sem qualquer injeção no dia 5 (B), no TT ( $n=10$ /linhagem/tratamento/dia). As colunas representam a média  $\pm$  erro padrão. Efeitos significativos revelados pela ANOVA de três vias para medidas repetidas são apresentados no canto superior esquerdo com o F e p correspondentes.

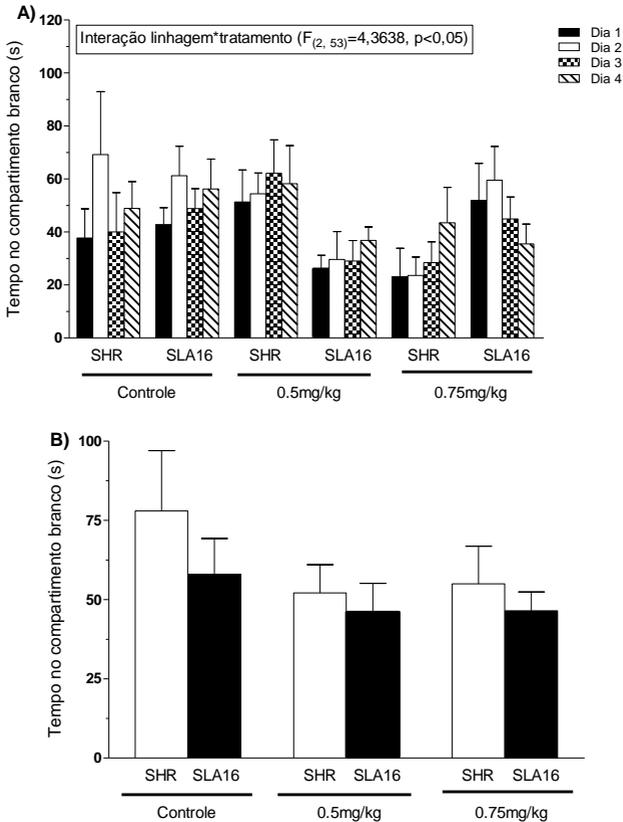


**Figura 114.** Entradas nos braços abertos do LCE dos machos SLA16 e SHR, controles (salina) ou tratados com MDZ, durante 4 dias repetidos (A), ou sem qualquer injeção no dia 5 (B), no TT ( $n=10$ /linhagem/tratamento/dia). As colunas representam a média  $\pm$  erro padrão. Efeitos significativos revelados pela ANOVA de três vias para medidas repetidas são apresentados no canto superior esquerdo com o F e p correspondentes.

No TT, dentro da área da CBP com machos, a ANOVA de medidas repetidas revelou um efeito significativo para o **fator repetição** na medida TCP ( $F_{(3, 159)}=5,8138, p<0,01$ ) (dados não mostrados). Foi detectada uma interação entre os **fatores linhagem e tratamento** ( $F_{(2, 53)}=4,3638, p<0,05$ ) para a variável TCB. O teste *post-hoc* de Duncan mostrou que os machos da linhagem SHR aumentaram o TCB quando receberam o tratamento de MDZ 0,5mg/kg, enquanto machos da

linhagem SLA16 diminuem o TCB quando recebem esta dose (Figura 15a). Essa mesma interação foi significativa para a variável NT ( $F_{(2, 53)}=4,0119, p<0,05$ ) (dados não mostrados).

Não foram encontradas diferenças significativas para o quinto dia com a ANOVA de duas vias (Figura 15b).

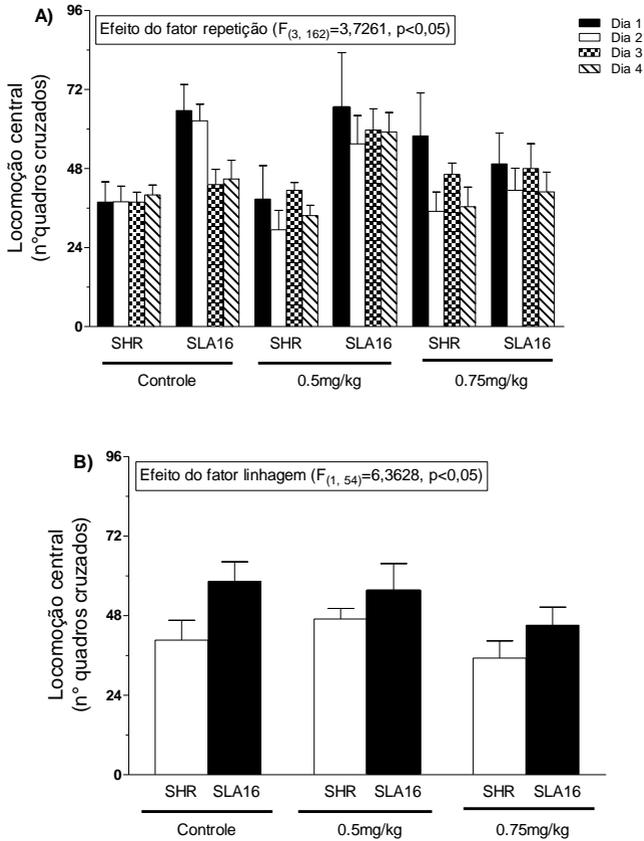


**Figura 15.** Tempo gasto no compartimento branco da CBP dos machos SLA16 e SHR, controles (salina) ou tratados com MDZ, durante 4 dias repetidos (A), ou sem qualquer injeção no dia 5 (B), no TT ( $n=10$ /linhagem/tratamento/dia). As colunas representam a média  $\pm$  erro padrão. Efeitos significativos revelados pela ANOVA de três vias para medidas repetidas são apresentados no canto superior esquerdo com o F e p correspondentes.

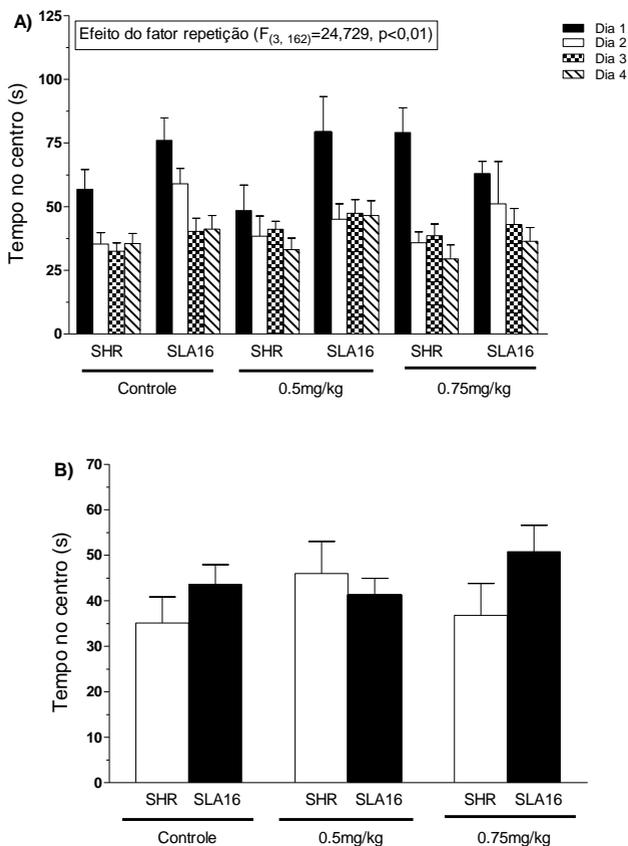
### 5.3.2 Teste triplo (TT) – Fêmeas

No TT, dentro da área do CA com fêmeas, a ANOVA de medidas repetidas revelou um efeito significativo do **fator repetição** nas medidas: LP ( $F_{(3, 162)}=4,0271$ ,  $p<0,01$ ), LC ( $F_{(3, 162)}=3,7261$ ,  $p<0,05$ ) e TC ( $F_{(3, 162)}=24,729$ ,  $p<0,01$ ). O teste *post-hoc* de Duncan revelou um efeito significativo na LC (Figura 16a) e no TC para o primeiro dia do teste (Figura 17a), onde os animais apresentaram maior locomoção e tempo gasto no centro neste dia. Para a variável LP uma maior locomoção foi observada nos dias 1 e 3 em comparação com os dias 2 e 4, segundo o teste *post-hoc* de Duncan (dados não mostrados).

A ANOVA de duas vias detectou diferença entre as linhagens durante o quinto dia para a variável LC ( $F_{(1, 54)}=6,3628$ ,  $p<0,05$ ). O teste *post-hoc* de Duncan revelou que o grupo SHR que recebia a dose 0,75 mg/kg de MDZ apresentou menor locomoção em relação aos outros grupos (Figura 16b).



**Figura 16.** Locomoção central das fêmeas SLA16 e SHR, controles (salina) ou tratados com MDZ, durante 4 dias repetidos (A), ou sem qualquer injeção no dia 5 (B), no TT ( $n=10$ /linhagem/tratamento/dia). As colunas representam a média  $\pm$  erro padrão. Efeitos significativos revelados pela ANOVA de três vias para medidas repetidas são apresentados no canto superior esquerdo com o F e p correspondentes.

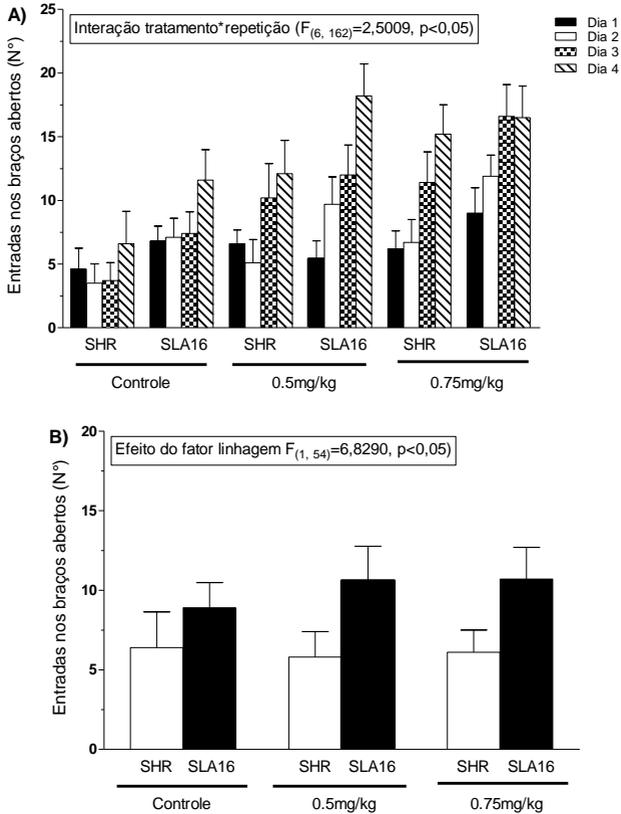


**Figura 17.** Tempo gasto no centro do CA das fêmeas SLA16 e SHR, controles (salina) ou tratados com MDZ, durante 4 dias repetidos (A), ou sem qualquer injeção no dia 5 (B), no TT ( $n=10$ /linhagem/tratamento/dia). As colunas representam a média  $\pm$  erro padrão. Efeitos significativos revelados pela ANOVA de três vias para medidas repetidas são apresentados no canto superior esquerdo com o F e p correspondentes.

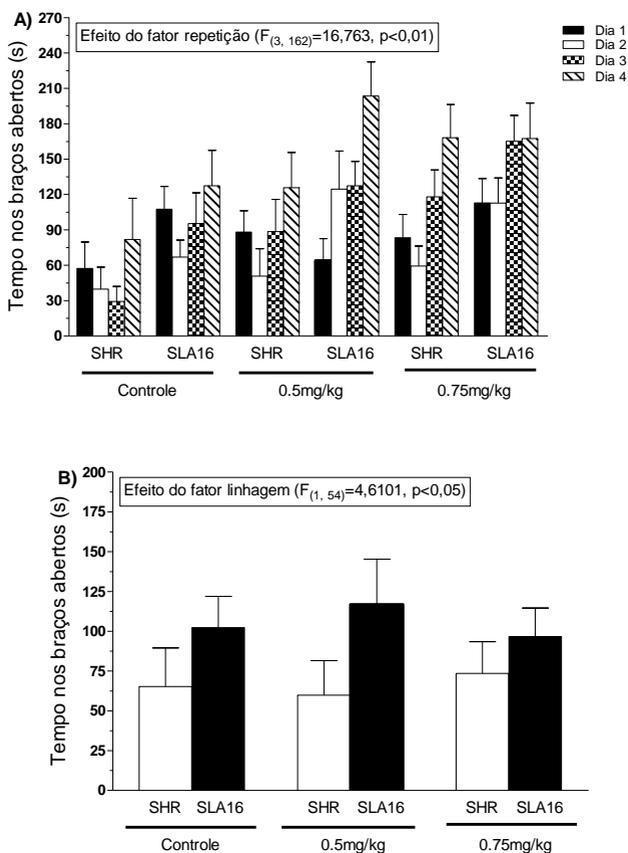
No TT, dentro da área do LCE com fêmeas, a ANOVA de medidas repetidas revelou um efeito significativo do **fator repetição** nas medidas: EF ( $F_{(3, 162)}=6,2281, p<0,01$ ) e TA ( $F_{(3, 162)}=16,763, p<0,01$ ). O teste *post-hoc* de Duncan mostrou um maior TA no dia 4 em comparação aos outros dias (Figura 19a). Por fim, ocorreu uma interação entre os **fatores tratamento e repetição** na medida: EA ( $F_{(6, 162)}=2,5009, p<0,05$ ), onde os grupos que tinham recebido tratamento

com MDZ aumentaram as entradas nos dias 3 e 4, segundo o *post-hoc* de Duncan (Figura 18a).

Para o quinto dia a ANOVA de duas vias mostrou uma diferença significativa entre linhagens para a variável EA ( $F_{(1, 54)}=6,8290$ ,  $p<0,05$ ; SLA16>SHR) e TA ( $F_{(1, 54)}=4,6101$ ,  $p<0,05$ ; SLA16>SHR) (Figuras 18a e 19b).



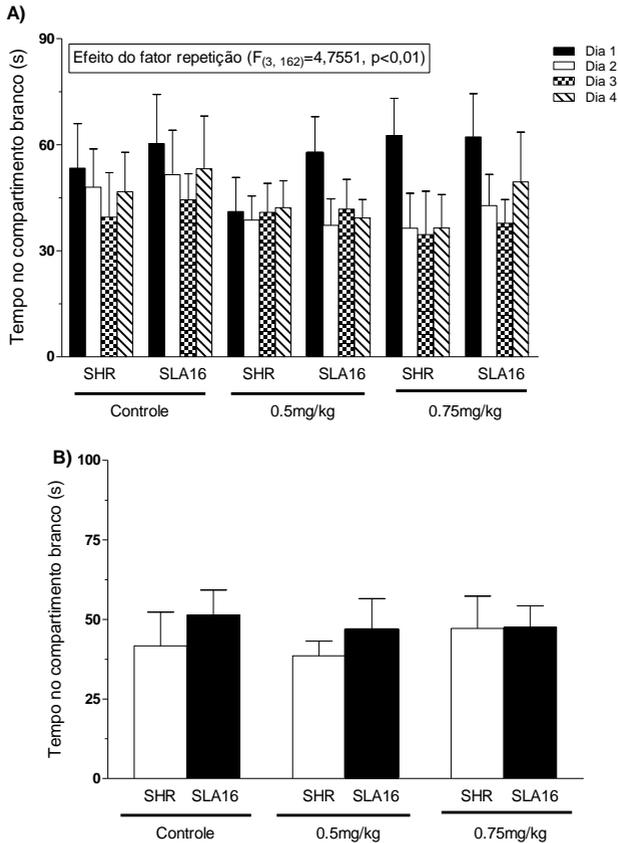
**Figura 18.** Entradas nos braços abertos do LCE das fêmeas SLA16 e SHR, controles (salina) ou tratados com MDZ, durante 4 dias repetidos (A), ou sem qualquer injeção no dia 5 (B), no TT ( $n=10$ /linhagem/tratamento/dia). As colunas representam a média  $\pm$  erro padrão. Efeitos significativos revelados pela ANOVA de três vias para medidas repetidas são apresentados no canto superior esquerdo com o F e p correspondentes.



**Figura 19.** Tempo passado nos braços abertos do LCE das fêmeas SLA16 e SHR, controles (salina) ou tratados com MDZ, durante 4 dias repetidos (A), ou sem qualquer injeção no dia 5 (B), no TT ( $n=10$ /linhagem/tratamento/dia). As colunas representam a média  $\pm$  erro padrão. Efeitos significativos revelados pela ANOVA de três vias para medidas repetidas são apresentados no canto superior esquerdo com o F e p correspondentes.

Na área da CBP do TT, as fêmeas apresentaram um efeito significativo no **fator repetição** para a variável TCB ( $F_{(3, 162)}=4,7551, p<0,01$ ). O *post-hoc* de Duncan indicou uma diferença significativa no TCB para o primeiro dia quando comparado aos outros dias (Figura 20a).

A ANOVA de duas vias não evidenciou diferenças significativas no quinto dia de teste (Figura 20b).



**Figura 20.** Tempo gasto no compartimento branco da CBP pelas fêmeas SLA16 e SHR, controles (salina) ou tratados com MDZ, durante 4 dias repetidos (A), ou sem qualquer injeção no dia 5 (B), no TT ( $n=10$ /linhagem/tratamento/dia). As colunas representam a média  $\pm$  erro padrão. Efeitos significativos revelados pela ANOVA de três vias para medidas repetidas são apresentados no canto superior esquerdo com o F e p correspondentes.

## 6. DISCUSSÃO

No presente trabalho, nós objetivamos investigar a ocorrência do fenômeno de OTT (*One-Trial Tolerance*) no TT e no LCE, utilizando uma linhagem congênica de ratos (SLA16) e seu controle isogênico SHR. Nós observamos, que no experimento 1, os resultados sugeriram que todos os grupos experimentais mantêm suas visitas aos braços abertos, confirmando a ausência de OTT. Estes resultados sugerem que as linhagens por si só podem apresentar ausência de OTT, independentemente do estado farmacológico. O grupo de fêmeas da linhagem SLA16 chega até mesmo a aumentar o comportamento de visitas aos braços abertos da área do LCE, a partir do dia 3 (Figura 8). Depois, nós nos perguntamos se estes efeitos (experimento 1) são dependentes do TT ou também acontecem no clássico aparato do LCE (experimento 2). Os resultados do segundo experimento sugerem que ao menos as fêmeas SLA16 apresentam total ausência de OTT em um estado sem droga e mesmo no LCE (Figura 10). Assim, por fim, nós nos perguntamos (experimento 3) se a ausência do OTT encontrada no experimento 1 seria observada quando administrada uma injeção de MDZ. Neste experimento observamos que em machos, não ocorreu o OTT, pois o tratamento com MDZ funcionou nas duas linhagens e em todos os 4 dias de exposição ao aparato (Figuras 13 e 14). Já em fêmeas, também no experimento 3, a ausência do OTT pode ser verificada nos dias 3 e 4 (Figuras 18 e 19). Desta maneira, nós confirmamos, neste estudo, as nossas primeira e segunda hipóteses experimentais, parcial e totalmente, respectivamente.

### **Experimento 1: Linhagens SLA16 e SHR expostas repetidamente ao TT em ausência de tratamento farmacológico**

No experimento 1, foram observadas diferenças de comportamento entre os sexos com fêmeas de ambas as linhagens andando mais no centro da área do CA, entrando e passando mais tempo nos braços abertos da área do LCE em comparação com machos. Também no primeiro dia de teste para a área da CBP machos passam menos tempo no compartimento branco do que fêmeas. Além disso, fêmeas SLA16 apresentam maiores escores nas áreas aversivas do CA e LCE (dias 3 e 4) em comparação aos demais grupos. Nossos dados coincidem com os observados por De Medeiros (2012) durante a caracterização genotípica e fenotípica da linhagem SLA16 realizada

para os testes individualmente. No referido estudo, animais de ambos os sexos desta linhagem apresentam maior locomoção central no CA, entram mais vezes nos braços abertos do LCE e as fêmeas passam mais tempo no compartimento branco do que machos na CBP em relação aos animais da linhagem SHR.

É conveniente salientar que a caracterização de ambos os sexos da linhagem SLA16 realizada por De Medeiros (2012) e mencionada anteriormente foi realizada nos testes separadamente, e o protocolo utilizado por ela foi de um dia, enquanto que neste trabalho nosso protocolo consta de cinco dias repetidos. Porém, os dados do trabalho de De Medeiros (2012) são utilizados aqui devido a que não existem mais pesquisas realizadas com ambos os sexos da linhagem SLA16 no TT.

A caracterização de SLA16 realizada no TT por De Medeiros (2012) incluiu somente animais machos. Nela foram observadas diferenças significativas em favor de SLA16 para as variáveis: locomoção central e periférica na área do CA, número de entradas e tempo permanecido nos braços abertos da área do LCE e não foram achadas diferenças significativas na área da CBP, quando comparada com sua linhagem controle SHR. Já no nosso estudo quando foram comparados os comportamentos entre os machos no TT, observou-se que a linhagem SLA16 apresenta maiores escores para todas as variáveis medidas nas áreas aversivas do teste em comparação com a linhagem SHR.

As diferenças observadas entre sexos no nosso trabalho não é uma novidade, pois vários trabalhos têm relatado que fêmeas de roedores apresentam um menor comportamento defensivo do que machos, tendo sido observados comportamentos onde os braços abertos do LCE são mais visitados por fêmeas que por machos, também no teste do CA, fêmeas apresentam uma maior exploração do centro e na CBP passam mais tempo no compartimento claro do que machos (Kennett *et al.*, 1986; Johnston e File, 1991; Voikar *et al.*, 2001; Tropp e Markus 2001; Adamec *et al.*, 2006).

No nosso experimento, o fenômeno de OTT não foi observado para animais de ambos os sexos da linhagem SLA16. As diferenças comportamentais observadas entre as linhagens SLA16 e SHR poderiam ser devidas à presença dos alelos da linhagem Lewis no *locus Anxrr16* do cromossomo 4 da linhagem SLA16, os quais teoricamente aumentam a exploração de áreas aversivas (Ramos *et al.*, 1999; Mormède *et al.*, 2002; Izidio *et al.*, 2011). Inicialmente foi pensado que existia uma diferença na forma em que este *locus* influenciava o comportamento em

machos e fêmeas, tendo sido informado que os efeitos do *locus Anxrr16* estavam presentes só em fêmeas (Ramos *et al.*, 1999; Vendruscolo *et al.*, 2006a), só em machos (Izídio *et al.*, 2011) ou em ambos os sexos (Mormède *et al.*, 2002; Hameister *et al.*, 2008). Nosso estudo sugere que o *locus Anxrr16* presente no cromossomo 4 da linhagem SLA16 afeta ambos os sexos, sendo observada uma maior influência nos comportamentos defensivos relacionados à ansiedade apresentados por fêmeas.

Assim, os resultados de nosso primeiro experimento fizeram com que nos questionemos se a linhagem SLA16 poderia ser uma linhagem que naturalmente não apresentará OTT, convertendo-se assim em uma linhagem com potencial uso na triagem de fármacos. Com o intuito de responder a nossa pergunta foi realizado o experimento repetido no LCE padrão onde procuramos caracterizar o comportamento desta nova linhagem em ausência de tratamento farmacológico, lembrando que este fenômeno se apresenta independentemente do estado farmacológico do animal durante a primeira exposição ao teste do LCE.

## **Experimento 2: Linhagens SLA16 e SHR no LCE repetidamente sem drogas**

No experimento 2, LCE padrão, uma diferença relevante de comportamento foi observada para fêmeas da linhagem SLA16 nos parâmetros entradas e tempo gasto nos braços abertos, mostrando valores mais elevados para estas variáveis do que os outros grupos, indicando claramente uma ausência de OTT no LCE. No entanto, todos os outros grupos mostraram uma diminuição ou mantiveram os mesmos comportamentos durante os 5 dias, dados coincidentes com a enorme quantidade de artigos científicos que mostram o desenvolvimento de OTT depois de uma exposição ao LCE (Lister, 1987; File, 1990; File *et al.*, 1993; Rodgers e Shepherd, 1993; Gonzalez e File, 1997; Frussa Filho *et al.*, 1999; Cruz-Morales *et al.*, 2002; Bertoglio e Carobrez, 2002). Além das variáveis clássicas analisadas no LCE, foram medidos os parâmetros avaliação de risco e *head dipping* (mergulho de cabeça). E ainda foi realizada uma análise minuto a minuto como sugerido por Carobrez e Bertoglio (2005). O parâmetro avaliação de risco aumentou com o decorrer dos dias para ambas as linhagens, quando realizada a análise minuto a minuto foi observada uma tendência à diminuição deste comportamento após o primeiro minuto para todos os dias como

sugerido por Holmes e Rodgers (1998), podendo representar uma familiarização inicial do aparato. Porém, durante o primeiro dia de teste o padrão observado para avaliação de risco diminui após o primeiro minuto, não coincidindo com a estabilidade desta variável para o primeiro ensaio relatada por outros autores (Fernandes e File, 1996, Rodgers, 1996). Duas hipóteses poderiam ser propostas para este tipo de respostas, uma rápida familiarização com o aparato ou um conflito entre ansiedade/impulsividade gerado pelos dois ambientes desconhecidos agindo em duas dimensões comportamentais como são as respostas defensivas e a exploração respectivamente. Em relação aos comportamentos de *head dipping*, foram observadas correlações entre as entradas nos braços abertos e esta variável, diminuindo dito comportamento junto com a diminuição das entradas nos braços abertos.

Assim, os dados dos experimentos 1 e 2 confirmam a tendência dos animais de ambos os sexos da linhagem SLA16 de apresentar menores índices de emocionalidade do que seu controle isogênico SHR como informado anteriormente por Pereira (2010), De Medeiros e colaboradores (2013) e Junkes (2015). Em relação à ausência de OTT observada nas fêmeas SLA16 no LCE em um estado sem droga, dois fatores chaves devem ser analisados: a possibilidade do *locus Anxrr16* estar interferindo nos processos de aprendizado/memória e as influências hormonais.

É bem conhecido que o fenômeno de OTT envolve processos de aprendizado e memória, tem sido informado que um prejuízo no aprendizado causado pela administração de doses amnésicas de BDZs, escopolamina ou propanolol antes do teste evitam o desenvolvimento de OTT (File *et al.*, 1990; Bertoglio e Carobrez, 2004; Stern *et al.*, 2008), assim como a inativação da amígdala basolateral após o teste, a inibição da síntese proteica no hipocampo dorsal, a inativação do hipotálamo dorsomedial, a substância cinzenta periaquedutal dorsolateral, que afetam os processos mnemônicos fazendo com que não se manifeste o OTT (File *et al.*, 1998; File *et al.*, 1999; Bertoglio *et al.*, 2005; Bertoglio *et al.*, 2006). Devido a estes dados da literatura científica poderia pensar-se que existe uma diferença na aprendizagem ou na memória dos animais SLA16 em relação aos SHR. De fato, dois QTL significativos relacionados a aprendizado/memória foram achados no cromossomo 4 dos ratos de uma F2 derivados de LEW e SHR (linhagens parentais de SLA16) (Junkes, 2015). Também foram observados comportamentos contrastantes em testes que avaliam memória/aprendizado e ansiedade/emocionalidade no trabalho de Junkes (2015). Ressaltando

que ambas as linhagens apresentaram diferenças de aprendizado apenas nos testes que envolviam um componente emocional (Labirinto em Cruz Elevado Modificado, Campo Aberto, Medo Condicionado). Porém, esses dados foram obtidos a partir de estudos com machos da linhagem SLA16 e experimentos avaliando memória e aprendizado com fêmeas destas linhagens deveriam ser realizados em nosso laboratório.

Em relação às influências hormonais, como comentado anteriormente, o fato de machos e fêmeas apresentarem diferentes respostas comportamentais frente a situações de estresse não é uma novidade, a modulação das respostas comportamentais por parte dos hormônios sexuais é um campo de pesquisa ativo e a literatura nos proporciona fundamentos para pensar que tal vez a ausência de OTT apresentada por fêmeas SLA16 possa estar influenciada pelo seu sistema hormonal.

Devido ao uso de fêmeas na pesquisa comportamental estar limitado pelas flutuações hormonais que estas sofrem durante seu ciclo estral poucos estudos sobre OTT utilizando fêmeas são encontrados na literatura, dentre eles Izídio e colaboradores (2005) realizaram uma pesquisa sobre o OTT no LCE com animais de ambos os sexos das linhagens LEW e SHR. No entanto, não foram encontradas diferenças significativas entre machos e fêmeas destas linhagens para ao desenvolvimento de OTT neste trabalho, apresentando todos eles uma diminuição nas entradas e tempo gasto nos braços abertos do LCE, comportamentos característicos deste fenômeno.

Porém, estudos realizados com fêmeas ovariectomizadas (OVX) nos quais um grupo recebia tratamento de substituição de estrógeno relataram diferenças nas respostas comportamentais observadas no CA e no LCE entre estas e seus controles. Fêmeas OVX controle mostram um comportamento defensivo maior do que fêmeas OVX que recebiam o tratamento com estrógeno, apresentando estas últimas mais entradas no centro do CA e nos braços abertos do LCE o que sugere que este hormônio estaria produzindo um efeito de tipo ansiolítico (Walf e Frye, 2005, Luine *et al.*, 2007).

Além disso, o estrogênio é reconhecido como um modulador do sistema receptor gabaérgico para numerosas áreas do SNC. De novo, trabalhos realizados com fêmeas OVX recebendo tratamentos com estradiol resultaram em uma *up-regulation* dos receptores GABA, aumentando os sítios de ligação destes receptores (Perez *et al.*, 1986). Fato interessante devido a que os fármacos BDZs se ligam nestes

receptores, estudos envolvendo tratamentos farmacológicos no LCE deverão ser realizados no nosso laboratório.

Em conjunto, esses dados da literatura demonstram a importância da hipótese da influência hormonal, e estudos adicionais deverão ser realizados no LCE com roedores das linhagens utilizadas no presente trabalho para investigar a base da ausência total de OTT observada em fêmeas SLA16.

### **Experimento 3: Linhagens SLA16 e SHR no TT injetadas com MDZ repetidamente**

No experimento 3, machos de ambas as linhagens se locomovem mais no centro da área do CA nos dias 3 e 4 em comparação com os dias 1 e 2. Estes dados concordam com os observados por Werhmeister e colaboradores (2010) em machos *Wistar* quando estes foram expostos ao TT sob tratamento com CDZ (10 mg/kg) por 4 dias repetidos. Contrário a esses resultados encontrados em machos, as fêmeas das duas linhagens apresentam uma maior locomoção e tempo gasto nesta área no primeiro dia de experimento, quando comparado com os outros dias. Dados da literatura informando as respostas observadas no teste do CA quando este teste foi utilizado como um paradigma para medir efeitos de drogas, relatam a existência de casos em que os benzodiazepínicos não produziram efeitos visíveis (31% de estudos) ou produziram efeitos ansiogênicos (13%). A variação observada nos efeitos dos BDZs (entre ansiolítico e ansiogênico) pode ser devida as doses utilizadas (sendo as altas doses indutoras de sedação), a diferenças nas espécies testadas ou nos procedimentos experimentais empregados (Prut e Belzung, 2003).

Na área do LCE machos das duas linhagens tratados com MDZ (0,5 e 0,75 mg/kg) mostram um maior número de entradas e tempo gasto nos braços abertos em comparação com os grupos controle durante os quatro dias de tratamento, enquanto que fêmeas de ambas as linhagens aumentam as entradas nos braços abertos nos dias 3 e 4. Novamente esses dados concordam com Werhmeister e colaboradores (2010) que encontraram o mesmo resultado em machos *Wistar* no seu experimento no TT com CDZ (10 mg/kg). Além disso, nossos resultados concordam com Hussim e colaboradores (2012) que demonstraram clara ausência de OTT em camundongos no TT. Esses resultados estariam confirmando a nossa hipótese de que animais de ambas as linhagens não apresentariam o fenômeno de OTT quando

testados repetidamente no TT sob tratamento com uma BDZ de uso clínico (MDZ).

Na área da CBP, machos da linhagem SHR passam mais tempo no compartimento branco quando recebem a dose 0,5 mg/kg de MDZ, e no caso das fêmeas as duas linhagens passam mais tempo neste compartimento no primeiro dia mostrando uma diminuição gradual do tempo gasto aqui conforme passaram os dias. Ausência de efeitos ansiolíticos de BDZs como diazepam (DZ) e CDZ foram relatadas por Chaouloff e colaboradores (1997) quando utilizada a CBP no formato “*dark/light test*”. Ou seja, quando o roedor é colocado primeiramente no compartimento preto. Este efeito muda quando o animal é colocado no compartimento branco primeiro observando-se efeitos ansiolíticos na direção esperada devido à mudança no grau de aversividade que gera o teste quando o rato é exposto inicialmente à área aversiva dele. No formato em que a CBP é colocada no TT, o rato também entra em contato com o compartimento preto primeiramente o que poderia estar influenciando nos baixos efeitos ansiolíticos observados para MDZ neste estudo. Este mesmo efeito já tinha sido observado por Werhmeister e colaboradores (2010), e para melhor compreender o observado estes autores realizaram um experimento no teste CBP individual utilizando CDZ (0,5, 5 e 10 mg/kg) para determinar a sensibilidade dele as BDZs, não achando diferenças quando o teste é usado separadamente, pelo qual foi assumido que a CBP não apresenta sensibilidade significativa a BDZs. Assim, nós investigaremos, no futuro, se a modificação da posição da CBP, deixando-a no formato “*light/dark test*” para o qual já foram relatados efeitos ansiolíticos (Chaouloff *et al.*, 1997; Hussin *et al.*, 2012) poderá alterar os resultados encontrados no presente estudo.

Portanto, os resultados aqui observados nos permitem confirmar a ausência de OTT no TT observada anteriormente em ratos (Werhmeister *et al.*, 2010) e camundongos (Hussin *et al.*, 2012). Os resultados observados na área do LCE (para a qual foi caracterizado o fenômeno de OTT) em protocolos experimentais de teste- reteste, de dias repetidos, ou exposição crônica mudam no TT não se observando o fenômeno de OTT. Esta mudança na interpretação do paradigma do LCE pode dever-se a vários fatores que impedem o desenvolvimento à tolerância de BDZs. Alguns deles podem ser: devido ao uso de uma dose sedativa da droga utilizada, as mudanças do tempo de exploração do teste para 15 minutos, e a introdução de uma situação de conflito no

LCE para o animal (File *et al.*, 1990; File *et al.*, 1993; Dal- Col *et al.*, 2003; Pereira *et al.*, 1999).

Em relação às doses de MDZ (0,5 e 0,75 mg/kg) utilizadas neste trabalho, estas não apresentam caráter sedativo, pois não foram observadas aqui alterações no comportamento (diminuição na locomoção) que possam indicar dito efeito sedativo, sendo nossos dados coincidentes com trabalhos que utilizando doses de 0,5 e 1,0 mg/kg de MDZ não relataram efeitos sedativos destas doses quando utilizadas em experimentos de teste e re-teste no LCE (Bertoglio e Carobrez, 2002).

Sobre o aumento do tempo utilizado no TT, foi testada, demonstrada e discutida a quantidade de tempo que os animais passam em cada teste, sendo encontrado em trabalhos anteriores um padrão balanceado no tempo gasto em cada teste durante os 15 minutos. Esse tempo foi estabelecido quando foi criado o modelo do TT por ser o tempo que os roedores precisam para explorar todos os três aparatos por igual (Ramos *et al.*, 2008, Werhmeister *et al.*, 2010). Em um apêndice ao final deste trabalho foram colocadas duas tabelas com os tempos gastos em cada área que compõe o TT nas quais se podem observar um balance no tempo gasto em cada área durante os 5 dias de teste, demonstrando-se a existência deste equilíbrio de tempo gasto em cada área do teste e além disso, descartando-se a hipótese de um aumento na entrada e o tempo gasto nos braços abertos do teste em consequência de um aumento do tempo gasto nesta área (LCE) com o decorrer dos dias. Também foi observado e documentado o tempo gasto nas áreas aversivas e não aversivas do teste não se observando variações abruptas entre os dias.

Dados da literatura indicam que o desenvolvimento de tolerância no LCE depende de um processo de aprendizagem aversiva, e que o conflito de aproximação/esquiva gerado pela presença de dois ambientes, aversivo/não aversivo, é resolvido à medida que o animal se familiariza com o aparato e aprende o perigo que representam os braços abertos para ele, por tanto, poderia ser argumentado que ante a presença de um teste de maior tamanho, que envolve varias áreas consideradas aversivas pelos roedores, eles precisariam de mais tempo para conseguir resolver esse conflito e finalmente escolher a área aonde vão se sentir mais protegidos (Rodgers e Shepherd, 1993; Bertoglio e Carobrez, 2000; Bertoglio e Carobrez, 2002; Bertoglio e Carobrez, 2003; Vargas *et al.*, 2006; Albrechet-Souza *et al.*, 2007, Roy *et al.*, 2009).

Finalmente, como é conhecida, a introdução de estímulos aversivos nos braços fechados como, luz de grande intensidade, um forte som, vento quente na primeira exposição ao LCE, assim como a apresentação de um objeto desconhecido no braço aberto ou alimento dentro do ambiente no reteste, provocam ausência de OTT na segunda exposição ao aparato, assim a presença do CA e a CBP nos extremos do LCE poderia ser interpretada como estímulos novos que gerem certo grau de aversividade adicional, mantendo o conflito de aproximação/esquiva (Pereira *et al*, 1999, Andreatini *et al*, 2003).

Resumindo, nossos resultados confirmam a ausência de OTT, independentemente do estado farmacológico dos animais testados, quando é utilizado o TT como postulado anteriormente por Whermeister e colaboradores (2010).

## 7. CONCLUSÕES

A hipótese de que ratos, fêmeas e machos da linhagem SLA16 quando testados repetidamente no TT e no LCE, independentemente de um tratamento farmacológico, não apresentariam o fenômeno de OTT, foi parcialmente confirmada, pois apenas fêmeas da linhagem SLA16 não desenvolveram este fenômeno.

A segunda hipótese deste trabalho, de que ratos, fêmeas e machos das duas linhagens testadas no TT repetidamente, com diferentes doses do BDZ midazolam (MDZ), não desenvolveriam o fenômeno de OTT foi confirmada, pois todos os grupos testados sob tratamento farmacológico mostraram ausência de OTT.

Sendo assim, o TT demonstrou ser uma ferramenta útil para a pesquisa de novos fármacos, desde que os animais testados no presente trabalho não apresentaram o fenômeno de OTT, quando avaliados repetidamente sob tratamento com MDZ.

Em relação às fêmeas da linhagem SLA16 as quais não apresentaram OTT quando testadas no LCE durante cinco dias repetidos, nem oscilações comportamentais ao longo do ciclo estral, podemos dizer que estas são uma interessante ferramenta genética a ser considerada para a pesquisa farmacológica e a busca dos genes e mecanismos biológicos envolvidos no OTT.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMEC, R.; HEAD, D.; BLUNDELL, J.; BURTON, P.; BERTON, O. Lasting anxiogenic effects of feline predator stress in mice: sex differences in vulnerability to stress and predicting severity of anxiogenic response from the stress experience. **Physiol Behav.** 88.1–2:12–29. 2006.

ALBRECHET-SOUZA, L.; BORELLI, K. G.; BRANDAO, M. L. Activity of the medial prefrontal cortex and amygdala underlies one-trial tolerance of rats in the elevated plus-maze. **Journal of Neuroscience Methods.** 169. 109–118. 2008.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION: DIAGNOSTIC AND STATISTICAL MANUAL OF MENTAL DISORDERS. Fifth Edition. **Arlington, VA, American Psychiatric Association.** p. 194- 195. 2013.

ANDREATINI, R.; VITAL, M. A. B. F. E.; SANTOS, G. L. The reinstatement of conflict reverses the one-trial tolerance to diazepam on elevated plusmaze. **Eur. Neuropsychopharmacol.**, v.13 (Suppl. 4), p.S378-S379. 2003.

BANNERMAN, D. M.; RAWLINS, J. N.; MCHUGH, S. B.; DEACON, R. M.; YEE, B. K.; BAST, T.; ZHANG, W. N.; POTHUIZEN, H. H.; FELDON, J. Regional dissociations within the hippocampus—memory and anxiety. **Neurosci. Biobehav. Rev.** 28, 273–283. 2004.

BERTOGLIO, L. J.; CAROBREZ, A. P. Previous maze experience required to increase open arm avoidance in rats submitted to the elevated plus-maze model of anxiety. **Behav. Brain Res.** 108, 197–203. 2000.

BERTOGLIO, L. J.; CAROBREZ, A. P. Prior maze experience required to alter midazolam effects in rats submitted to the elevated plus-maze. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior.** 72: 449–455. 2002.

BERTOGLIO, L. J.; CAROBREZ, A. P. Anxiolytic-like effects of NMDA/ glycine-B receptor ligands are abolished during the elevated plus-maze Trial 2 in rats. **Psychopharmacology.** 170, 335–342. 2003.

BERTOGLIO, L. J.; CAROBREZ, A. P. Scopolamine given pre-Trial 1 prevents the one-trial tolerance phenomenon in the elevated plus-maze Trial 2. **Behavioural Pharmacology**. v.15 (1), p.45-54, 2004.

BERTOGLIO, L. J.; ANZINI, C.; LINO-DE-OLIVEIRA, C. E.; CAROBREZ, A. P. Enhanced dorsolateral periaqueductal gray activity counteracts the anxiolytic response to midazolam on the elevated plus-maze Trial 2 in rats. **Behav Brain Res**. v.162, n.1, p.99-107. 2005.

BERTOGLIO, L. J.; JOCA, S. R.; GUIMARAES, F. S. Further evidence that anxiety and memory are regionally dissociated within the hippocampus. **Behav Brain Res**. v.175, n.1, p.183-188. 2006.

BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. **Annu Rev Psychol**. v.39, p.43-68. 1988.

BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J. Antipredator defensive behaviors in a visible burrow system. **J Comp Psychol**. v.103, n.1, Mar, p.70-82. 1989.

BLANCHARD, D. C.; GRIEBEL, G.; BLANCHARD, R. J. Mouse defensive behaviors: Pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. **Neurosci. Biobehav. Rev**. v. 25, p. 205-218, 2001a.

BLANCHARD, R. J.; MCKITTRICK, C. R.; BLANCHARD, D. C. Animal models of social stress: Effects on behavior and brain neurochemical systems. **Physiol. Behav**. v. 73. p. 261-271. 2001b.

BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C.; GRIEBEL, G; NUTT, D. Introduction to the handbook on fear and anxiety. In: J. P. Huston (Ed.). **Handbook of anxiety and fear**. Dusseldorf: Academic Press, v. 17, p. 3-7. 2008.

BOWMAN, R. E.; ZRULL, M. C.; LUINE, V. N. Chronic restraint stress enhances radial arm maze performance in female rats. **Brain Res**. 904(2):279–289. 2001.

BOWMAN, R.; MACLUSKY, N. J.; SARMIENTO, Y.; FRANKFURT, M.; GORDON, M.; LUINE, V. N. Sexually dimorphic effects of

prenatal stress on cognition, hormonal responses and central neurotransmitters. **Endocrinology**. 145: 3778–3787. 2004.

CANTERAS, N. S. Neural systems activated in response to predators and partial predator stimuli. In: Blanchard DC, Blanchard RJ, Griebel G, Nutt D, editors. **Handbook of anxiety and fear**. Amsterdam: Academic Press. p.124-40. 2008.

CARVALHO NETTO, E. F. Fear and anxiety: behavior and neuroanatomical aspects. **Arq Med Hosp**. Fac Cienc Med Santa Casa São Paulo. 54(2): 62-5. 2009.

CAROBREZ, A. P.; TEIXEIRA, K. V.; GRAEFF, F. G. Modulation of defensive behavior by periaqueductal gray NMDA/glycine-B receptor. **Neurosci. Biobehav. Rev.** 25, 697–709. 2001.

CAROBREZ, A. P.; BERTOGLIO, L. J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v.29, n.8, p.1193-1205. 2005.

CARTER, C. S. Neuroendocrinology of sexual behavior in the female. Em J. B. Becker; S. M. Breedlove & D. Crews (Orgs.), **Behavioral Endocrinology**. (p. 71-96). 3a reimpressão. MIT Press, Cambridge, Mass. 1993.

CASTANON, N.; MORMÈDE, P. Psychobiogenetics, adapted tools for the study of the coupling between behavioral and neuroendocrine traits of emotional reactivity. **Psychoneuroendocrinology**, 19, 257–282.1994.

CASTANON, N.; PEREZ-DIAZ, F.; MORMÈDE, P. Genetic analysis of the relationships between behavioral and neuroendocrine traits in Roman High and Low Avoidance lines. **Behav.Genet.** 25, 371–384.1995.

CHAOULOFF, F.; DURAND, M. E.; MORMÈDE, P. Anxiety- and activity-related effects of diazepam and chlordiazepoxide in the rat light/dark and dark/light tests. **Behav Brain Res.** v.85, n.1, p.27-35. 1997.

CHROUSOS, G. P., GOLD, P. W. The concepts of stress and stress system disorders. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*. 267 (9), 1244- 1252. 1992.

CRUZ- MORALES, S. E.; SANTOS, N. R.; BRANDÃO, M. L. One trial tolerance to midazolam is due to enhancement of fear and reduction of anxiolytic-sensitive behaviors in the elevated plus-maze retest in the rat. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 72: 973–978. 2002.

DAL-CÓL, M. L.; PEREIRA, L. O.; ROSA, V. P.; CALIXTO, A. V.; CAROBREZ, A. P.; FARIA, M. S. Lack of midazolam-induced anxiolysis in the plus-maze Trial 2 is dependent on the length of Trial 1. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*. v.74 (2). p.395-400, 2003.

DARWIN, C. R. The expression of emotions in man and animals. **London: John Murray.** 1872.

DAWSON, G. R.; CRAWFORD, S. P.; STANHOPE, K. J.; IVERSEN, S. D.; TRICKLEBANK, M. D. One-trial tolerance to the effects of chlordiazepoxide on the elevated plus maze may be due to locomotor habituation, not repeated drug exposure. *Psychopharmacology*. 113: 570-572. 1994.

DE MEDEIROS, G. F. Caracterização fenotípica e molecular da linhagem congênica de ratos SHR.LEW-*Anxrr16* como um novo modelo genético para o estudo da ansiedade. **Tese (Mestrado em Farmacologia)** - Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2012.

DE MEDEIROS, G. F.; PEREIRA, E.; GRANZOTTO, N.; RAMOS, A. Low-anxiety rat phenotypes can be further reduced through genetic intervention. *PLoS One*. v. 8, n. 12, p. e83666. 2013.

DIAZ-VELIZ, G.; ALARCON, T.; ESPINOZA, C.; DUSSAUBAT, N.; MORA, S. Ketanserin and anxiety levels: influence of gender, estrous cycle, ovariectomy and ovarian hormones in female rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 58(3):637–642. 1997.

DORON, R.; PAROT, F. Dictionnaire de psychologie. Paris: **Presses Universitaires de France**. 1991.

FERNANDES, C.; FILE, S.E. The influence of open arm ledges and maze experience in the elevated plus-maze. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 54, 31–40. 1996.

FIGUEIREDO, H. F.; DOLGAS, C. M.; HERMAN, J. P. . Stress activation of cortex and hippocampus is modulated by sex and stage of estrus. **Endocrinology**. 143(7):2534–2540. 2002.

FILE, S. E. Tolerance to the behavioral actions of benzodiazepines. **Neurosci.Biobehav.Rev.** 9:113-121. 1985.

FILE, S. E. The contribution of behavioural studies to the neuropharmacology of anxiety. **Neuropharmacology**. 26, 877–886. 1987.

FILE, S. E.; MABBUTT, P. S.; HITCHCOTT, P. K. Characterisation of the phenomenon of "*one-trial tolerance*" to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in the elevated plus-maze. **Psychopharmacology**. 102(1): 98-101. 1990.

FILE, S. E. One-trial tolerance to the anxiolytic effects of chlordiazepoxide in the plus-maze. **Psychopharmacology**. 100: 281± 2. 1990.

FILE, S. E. The biological basis of anxiety. In: Meltzer, H. Y.; Nerozzi, D., eds. **Current practices and future developments in the pharmacotherapy of mental disorders**. Amsterdam: Elsevier.159–165.1991.

FILE, S. E.; ANDREWS, N.; WU, P. Y.; ZHARKOVSKY, A.; ZANGROSSI, H. Jr. Modification of chlordiazepoxide's behavioural and neurochemical effects by handling and plus –maze experience. **Eur. J Pharmacol.** 218: 9-14. 1992.

FILE, S.E. The interplay of learning and anxiety in the elevated plus maze. **Behav. Brain Res.** 58, 199–202. 1993.

FILE, S. E.; ZANGROSSI, H. Jr.; VIANA, M.; GRAEFF, F. G. Trial 2 in the elevated plus-maze: a different form of fear?. **Psychopharmacology**. v.111 (4). p.491-4, 1993a.

FILE, S. E.; GONZALEZ, L. E.; GALLANT, R. Role of the basolateral nucleus of the amygdala in the formation of a phobia. **Neuropsychopharmacology**. 19. p 397–405. 1998.

FILE, S. E.; GONZALEZ, L. E.; GALLANT, R. Role of the dorsomedial hypothalamus in mediating the response to benzodiazepines on trial 2 in the elevated plus-maze test of anxiety. **Neuropsychopharmacology**. v.21 (2). p.312-20, 1999.

FLINT, J.; CORLEY, R.; DEFRIES, J. C.; FULKER, D. W.; GRAY, J.; MILLER, S.; COLLINS, A. C. A simple genetic basis for a complex psychological trait in laboratory mice. **Science**. 269:1432–5.1995.

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

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 models. **Psychopharmacology**. 211, P. 99 e 112. 2010.

FRUSSA-FILHO, R.; BARBOSA-JUNIOR, H.; SILVA, R. H.; DA, C. C.; MELLO, C. F. Naltrexone potentiates the anxiolytic effects of chlordiazepoxide in rats exposed to novel environments. **Psychopharmacology**. (Berl.) 147, 168–173. 1999.

FRYE, C. A.; PETRALIA, S. M.; RHODES, M. E. Estrous cycle and sex differences in performance on anxiety tasks coincide with increases in hippocampal progesterone and 3alpha, 5alpha-THP. **Pharmacol Biochem Behav**. 67(3):587–596. 2000.

GALEA, L. A.; MCEWEN, B. S.; TANAPAT, P.; DEAK, T.; SPENCER, R. L.; DHABHA, F. S. Sex differences in dendritic atrophy of CA3 pyramidal neurons in response to chronic restraint stress. **Neuroscience**. 81: 689–697. 1997.

GAZARINI, L. A inibição da síntese protéica no hipocampo dorsal de ratos impede a tolerância ao midazolam induzida pela experiência prévia no labirinto em cruz elevado. **Dissertação (Mestrado em Farmacologia)** - Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2011.

GONZALEZ, L. E.; FILE, S. E. A five minute experience in the elevated plus-maze alters the state of the benzodiazepine receptor in the dorsal raphe nucleus. **J. Neurosci.** 17, 1505–1511. 1997.

GOUVEIA, A. JR.; DOS SANTOS, U. D.; FELISBINO, F. E.; DE AFONSECA, T. L.; ANTUNES, G.; MORATO S. Influence of the estrous cycle on the behavior of rats in the elevated T-maze. **Behav Process.** 67(2):167–171. 2004.

GRAY, J. A.; MCNAUGHTON, N. Fundamentals of the septo-hippocampal system. In: Gray JA, McNaughton N, editors. The neuropsychology of anxiety: an enquiry into the functions of septo-hippocampal system. 2nd ed. **Oxford Oxford University Press.** 2000.

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.

HANDLEY, S. L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'- motivated behaviour. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology.** 327. p 1-5. 1984.

HENDLEY, E. D.; WESSEL, D. J.; VAN HOUTEN, J. Inbreeding of Wistar- Kyoto rat strain with hyperactivity but without hypertension. **Behav. Neurol. Biol.** 45: 1- 16. 1986.

HOLMES, A.; RODGERS, R. J. Responses of Swiss-Webster mice to repeated plus-maze experience: further evidence for qualitative shift in emotional state? **Pharmacol. Biochem. Behav.** 60: 473-488. 1998.

HOLMES, A.; RODGERS, R. J. Influence of spatial and temporal manipulations on the anxiolytic efficacy of chlordiazepoxide in mice previously exposed to the elevated plus-maze. **Neurosci. Biobehav. Rev.** 23. p 971–980. 1999.

HORST, J. P.; KLOET, E. R.; SCHÄCHINGER, H. Relevance of stress and female sex hormones for emotion and cognition. **Cell Mol Neurobiol.** 32:725–735. 2012.

HUSSIN, A. T.; FRASER, L. M.; RAMOS, A.; BROWN, R. E. The effect of chlordiazepoxide on measures of activity and anxiety in Swiss-Webster mice in the triple test. **Neuropharmacology.** 63. P. 883e889. 2012.

IZÍDIO, G. S.; SPRICIGO, L. JR.; RAMOS, A. Genetic differences in the elevated plus-maze persist after first exposure of inbred rats to the test apparatus. **Behavioural Processes.** 68, 129–134. 2005.

IZIDIO, G. S. Análise de QTL com estudo de genes candidatos para comportamentos relacionados à emocionalidade e ao consumo de etanol usando um modelo genético composto pelas linhagens de ratos Lewis e SHR. **Tese (Doutorado em Farmacologia)** - Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2005.

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.

JOHNSTON, A. L.; FILE, S. E. Sex differences in animal tests of anxiety. **Physiol Behav.** 49(2):245–250. 1991.

JUNKES, F. O cromossomo 4 influencia comportamentos relacionados à memória em um modelo genético de ratos **Dissertacao (Mestrado em Farmacologia)** - Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2015.

KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSELL, T. M. (Orgs.) Essentials in neural sciences and Behavior. Londres, UK: **Prentice Hall International**. Inc. 1995.

KENNETT, G. A.; CHAOULOFF, F.; MARCOU, M.; CURZON, G. Female rats are more vulnerable than males in an animal model of depression: the possible role of serotonin. **Brain Res.** 382(2):416–421. 1986.

KITAY, J. I. Sex differences in adrenal cortical secretion in the rat. **Endocrinology.** 68:818–824. 1961.

KROON, J. A.; CAROBREZ, A. P. Olfactory fear conditioning paradigm in rats: effects of midazolam, propranolol or scopolamine. **Neurobiol Learn Mem.** v.91, n.1, Jan, p.32-40. 2009.

LE MEVEL, J. C.; ABITBOL, S.; BERAUD, G.; MANIEY, J. Temporal changes in plasma adrenocorticotropin concentration after repeated neurotropic stress in male and female rats. **Endocrinology.** 105(3):812–817. 1979.

LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology.** 92, 180–185. 1987.

LISTER, R. G. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. **Pharmacology and Therapeutics.** 46: 321-340. 1990.

LUINE, V. N.; BECK, K. D.; BOWMAN, R. E.; FRANKFURT, M.; MACLUSKY, N. J. “Chronic Stress and Neural Function: Accounting for Sex and Age”. Journal of **Neuroendocrinology.** 19, 743–751. 2007.

MARCONDES FK, MIGUEL KJ, MELO LL, SPADARI-BRATFISCH RC. Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze test. **Physiol Behav.** 74(4–5):435–440. 2001.

MONTGOMERY, K. C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. **J Comp. Physiol. Psychol.** v.48, n.4. p.254-260. 1955.

MONTGOMERY, K. C.; MONKMAN, J. A. The relation between fear and exploratory behavior. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**. 48, 132–136.1955.

MORA, S.; DUSSAUBAT, N.; DIAZ-VELIZ, G. Effects of the estrous cycle and ovarian hormones on behavioral indices of anxiety in female rats. **Psychoneuroendocrinology**. 21(7):609–620. 1996.

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.

NATIONAL INSTITUTE OF MENTAL HEALTH. Facts & Statistics. 2014. Disponível em: <http://www.adaa.org/about-adaa/press-room/facts-statistics> . Acesso em: 13 mar. 2015.

PALANZA, P. Animal models of anxiety and depression: How are females different? **Neurosci Biobehav Rev**. 25(3):219–233. 2001.

PALANZA, P.; GIOIOSA, L.; PARMIGIANI, S. Social stress in mice: gender differences and effects of estrous cycle and social dominance. **Physiol Behav**. 73(3):411–420. 2001.

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

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

PEREIRA, J. K.; VIEIRA, R. J.; KONISHI, C. T.; RIBEIRO, R. A.; FRUSSA-FILHO, R. The phenomenon of "one-trial tolerance" to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in the elevated plus-maze is abolished by the introduction of a motivational conflict situation. **Life Sciences**. v.65 (10). p.101-7, 1999.

PEREZ, J., ZUCCHI, I., MAGGI, A. Estrogen modulation of the gamma-aminobutyric acid receptor complex in the central nervous system of rat. **JPET** vol. 244 no. 3 1005-1010. 1988.

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

POLLARD, I.; WHITE, B. M.; BASSETT, J. R.; CAIRNCROSS, K. D. Plasma glucocorticoid elevation and desynchronization of the estrous cycle following unpredictable stress in the rat. **Behav Biol**. 14(01):103-108. 1975.

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

RAMOS, A.; BERTON, O.; MORMÈDE, P.; CHAOULOFF, F. A multiple-test study of anxiety related behaviors in six inbred rat strains. **Behav. Brain Res**. 85:57-69.1997.

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.; MELLERIN, Y.; MORMÈDE, P.; CHAOULOFF, F. A genetic and multifactorial analysis of anxiety-related behaviors in Lewis and SHR intercrosses. **Behav. Brain Res**. 96:195-205.1998.

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**. 4, 453-462. 1999.

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.; IZIDIO, G. S. Integrating the open field, elevated plus maze and light/dark box to assess different types of emotional behaviors in one single trial. **Behav. Brain Res**. v.193. n.2. p.277-288. 2008.

RAT GENOME DATABASE WEB SITE. Medical College of Wisconsin. **QTL search.** Disponível em: <http://rgd.mcw.edu/rgdweb/search/qtls.html>. Acesso em: 14 mar. 2015.

RODGERS, R. J.; SHEPHERD, J. K. Influence of prior maze experience on behaviour and response to diazepam in the elevated plus-maze and light/dark tests of anxiety in mice. **Psychopharmacology**. v.113 (2). p.237-242. 1993.

RODGERS, R. J.; COLE, J. C. Influence of social isolation, gender, strain, and prior novelty on plus-maze behaviour in mice. **Physiol Behav**. 54(4):729–736. 1993.

RODGERS, R. J.; COLE, J. C. The elevated plus-maze: pharmacology, methodology and ethology. In: Cooper, SJ, Hendrie, CA (Eds). **Ethology and psychopharmacology**. Chichester: Wiley. pp. 9-44. 1994.

RODGERS, R. J.; JOHNSON, N. J. T.; COLE, J. C.; DEWAR, C. V.; KIDD, G. R.; KIMPSON, P. H. Plus-maze retest profile in mice: importance of initial stages of trial 1 and response to post-trial cholinergic receptor blockade. **Pharmacol. Biochem. Behav**. 54, 41–50. 1996.

RODGERS, R. J.; CAO, B. J.; DALVI, A.; HOLMES, A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. **Braz. J Med. Biol. Res**. 30: 289- 304. 1997.

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**. (Berl), v.203, n.1, p.131-141. 2009.

SCHNEIDER, P.; HO, Y. J.; SPANAGEL, R.; PAWLAK, C. R. A novel elevated plus-maze procedure to avoid the one-trial tolerance problem. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**. V.5- Art.43. 2011.

SCHWARTZ, N. B. A model for the regulation of ovulation in the rat. Em E. B. Astwood (Org.), Recent progress in hormones research –

Proceeding of the 1968 Laurentian hormones Conference. Nova York, NJ: **Academic Press**. vol. 25. 1969.

SPIELBERGER, C. D.; GORSUCH, R. L.; LUSHENE, R.; VAGG, P. R.; JACOBS, G. A. Manual for the State-Trait Anxiety Inventory. Palo Alto, CA: **Consulting Psychologists Press**. 1983.

STERN, C. A. J.; CAROBREZ, A. P.; BERTOGLIO, L. J. Aversive learning as a mechanism for lack of repeated anxiolytic- like effect in the elevated plus-maze. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. 90: 545–550. 2008.

TREIT, D. Animal models for the study of anti-anxiety agents: a review. **Neurosci. Biobehav. Rev.** 9, 203–222. 1985.

TREIT, D. Animal models of anxiety and anxiolytic drug action. In: den Boer JA & Sitsen JMA (Editors), **Handbook of Depression and Anxiety**. Marcel Dekker, New York, 201-224. 1994.

TROPP, J.; MARKUS, E. J. Sex differences in the dynamics of cue utilization and exploratory behavior. **Behav Brain Res**. 119(2): 143–154. 2001.

TRULLAS, R.; SKOLNICK, P. Differences in fear motivated behaviors among inbred mouse strains. **Psychopharmacology**. 111: 323- 331. 1993.

VENDRUSCOLO, L. F.; TERENINA-RIGALDIE, E.; RABA, F.; RAMOS, A.; TAKAHASHI, R. N.; MORMÉDE, 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.

VOIKAR, V.; KOKS, S.; VASAR, E.; RAUVALA, H. Strain and gender differences in the behavior of mouse lines commonly used in transgenic studies. **Physiol Behav**. 72(1–2):271–281. 2001.

WALF AA, FRYE CA. Antianxiety and antidepressive behavior produced by physiological estradiol regimen may be modulated by

hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity.  
**Neuropsychopharmacology**. 30: 1288– 1201. 41. 2005.

WALF, A. A.; KOONCE, C.; MANLEY, K.; FRYE, C. A. Proestrous compared to diestrous wildtype, but not estrogen receptor beta knockout, mice have better performance in the spontaneous alternation and object recognition tasks and reduced anxiety-like behavior in the elevated plus and mirror maze. **Behav Brain Res**. 196(2):254–260. 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 (2). p.301-9. 2010.

WILLIAMS, T. D.; CARTER, D. A.; LIGHTMAN, S. L. Sexual dimorphism in the posterior pituitary response to stress in the rat. **Endocrinology**. 116(2):738–740. 1985.

WHO – World Health Organization. Cross-national comparisons of the prevalences and correlates of mental disorders. **WHO International Consortium in Psychiatric Epidemiology**. Bull World Health Organ, v.78, n.4, p.413-426. 2000.

## 9. APÊNDICE

### 9.1 Tempo gasto em cada aparato componente do Teste Triplo durante o experimento 3

TESTE TRIPLO	CA		LCE		CBP	
	Média	EP	Média	EP	Média	EP
<b>Machos Controle</b>						
SHR 1	345,50	34,84	285,00	25,54	180,20	31,07
SHR 2	327,10	50,21	275,10	37,86	244,00	33,92
SHR 3	416,60	48,77	273,60	31,17	182,90	35,79
SHR 4	418,20	27,10	297,80	39,58	146,00	22,54
SHR 5	353,70	25,16	282,60	22,90	208,20	24,89
SLA16 1	407,20	26,67	286,90	25,60	151,60	15,05
SLA16 2	333,10	41,28	282,80	33,80	249,20	46,07
SLA16 3	396,80	24,92	316,00	26,56	171,00	11,99
SLA16 4	390,10	16,16	291,60	25,52	161,70	15,13
SLA16 5	318,20	28,65	311,20	26,67	218,10	37,53
<b>Machos MDZ 0,5</b>						
SHR 1	331,70	43,63	288,80	30,45	241,20	46,07
SHR 2	306,90	42,42	283,60	20,71	250,00	29,92
SHR 3	331,10	32,05	294,80	25,46	249,90	39,25
SHR 4	397,00	33,25	264,30	23,16	216,20	24,49
SHR 5	414,30	59,04	246,40	37,67	219,80	41,15
SLA16 1	322,10	33,37	321,40	30,32	144,50	27,28
SLA16 2	305,00	40,01	400,90	33,36	145,10	23,73
SLA16 3	373,40	27,28	345,60	23,30	121,40	18,70
SLA16 4	381,90	28,01	333,40	20,14	137,00	21,70
SLA16 5	432,30	24,99	288,80	20,93	143,40	15,86
<b>Machos MDZ 0,75</b>						
SHR 1	436,44	64,98	314,44	40,19	116,77	25,55
SHR 2	397,88	60,75	286,22	43,68	166,77	34,38
SHR 3	374,77	23,80	336,22	32,26	155,00	18,98
SHR 4	373,00	47,17	319,00	54,20	169,66	17,21
SHR 5	426,33	31,25	229,22	23,30	216,00	27,69
SLA16 1	351,70	14,24	325,70	23,11	182,20	27,81
SLA16 2	344,90	21,91	319,80	24,75	195,00	25,12
SLA16 3	350,60	27,74	343,50	29,69	147,10	18,46
SLA16 4	346,90	33,94	389,60	28,13	119,70	17,70
SLA16 5	370,60	38,55	320,30	41,72	181,40	18,64

TESTE TRIPLA	CA		LCE		CBP	
	Média	EP	Média	EP	Média	EP
<b>Fêmeas Controle</b>						
SHR 1	344,90	44,45	302,60	22,14	215,90	27,70
SHR 2	333,50	42,59	298,50	34,73	227,60	42,87
SHR 3	449,50	55,29	266,50	31,77	163,30	27,80
SHR 4	375,80	44,41	301,40	46,01	195,40	18,15
SHR 5	374,00	52,37	296,70	31,04	202,70	39,80
SLA16 1	403,20	21,66	304,80	31,84	199,80	26,49
SLA16 2	404,00	32,08	295,50	44,93	193,30	30,61
SLA16 3	352,60	34,46	301,60	35,54	217,10	33,61
SLA16 4	363,90	41,60	325,50	44,00	180,70	25,34
SLA16 5	395,40	35,90	326,60	29,09	140,50	15,86
<b>Fêmeas MDZ 0,5</b>						
SHR 1	370,90	43,15	288,00	28,59	241,20	38,29
SHR 2	339,70	53,71	257,40	47,26	276,00	38,03
SHR 3	400,40	45,40	287,60	50,98	190,40	30,25
SHR 4	364,20	48,68	334,30	44,28	187,40	20,07
SHR 5	399,30	44,90	265,00	34,41	210,50	31,38
SLA16 1	422,10	32,71	285,50	25,45	205,90	36,21
SLA16 2	365,50	42,96	305,40	42,81	201,00	48,56
SLA16 3	365,50	49,58	344,30	38,01	137,50	13,18
SLA16 4	322,50	42,02	416,30	39,12	153,80	18,44
SLA16 5	345,00	42,71	323,40	44,11	195,30	39,04
<b>Fêmeas MDZ 0,75</b>						
SHR 1	406,50	44,80	272,40	28,46	240,50	33,57
SHR 2	318,10	32,95	300,40	30,54	233,90	34,90
SHR 3	371,60	52,48	328,70	44,96	172,10	30,31
SHR 4	303,60	40,45	383,40	46,28	197,20	28,43
SHR 5	366,00	39,67	317,00	42,33	186,00	29,16
SLA16 1	412,40	41,31	310,90	9,51	196,00	22,25
SLA16 2	328,70	40,49	302,60	34,66	160,90	19,82
SLA16 3	373,00	35,15	356,80	33,51	134,10	14,82
SLA16 4	321,60	44,32	356,50	39,76	190,10	30,31
SLA16 5	351,30	27,67	309,00	26,25	173,70	12,71

**9.1. Tabela de tempo gasto em cada área do TT-** Representa como média e erro padrão o tempo que cada linhagem SLA16 e SHR, gastou em cada dia (1, 2, 3, 4 e 5) em cada área do teste (CA, LCE, CBP).

## 9.2 Distribuição do tempo gasto nas áreas não aversivas e aversivas do Teste Triplo durante o experimento 3

TESTE TRIPLO MACHOS	CONTROLE		MDZ 0,5		MDZ 0,75	
	Média	EP	Média	EP	Média	EP
<b>Área não aversiva</b>						
SHR 1	666,50	36,34	706,90	31,13	697,55	38,36
SHR 2	715,90	32,30	702,80	23,55	751,00	40,32
SHR 3	747,80	19,06	691,10	20,96	712,33	22,20
SHR 4	729,20	28,44	707,90	29,39	702,00	28,16
SHR 5	696,70	26,05	763,10	22,40	729,88	23,27
SLA16 1	661,80	23,91	612,10	44,78	628,50	14,75
SLA16 2	719,70	25,55	694,70	41,16	661,20	31,20
SLA16 3	710,00	22,67	630,90	35,64	604,70	46,45
SLA16 4	651,60	17,99	637,10	32,55	585,30	44,73
SLA16 5	676,10	30,15	681,50	37,42	688,00	23,35
<b>Área aversiva</b>						
SHR 1	144,20	20,71	154,80	17,08	170,11	32,95
SHR 2	130,30	29,72	137,70	15,27	99,88	30,26
SHR 3	125,30	22,47	184,70	20,75	153,66	21,46
SHR 4	132,80	20,87	169,60	21,04	159,66	25,01
SHR 5	147,80	17,06	117,40	14,46	141,66	18,87
SLA16 1	183,90	10,47	175,90	22,38	231,10	11,14
SLA16 2	145,40	20,25	156,30	39,75	198,50	27,81
SLA16 3	173,80	21,72	209,50	31,76	236,50	27,72
SLA16 4	191,80	21,48	215,20	30,91	270,90	29,60
SLA16 5	171,40	16,90	183,00	32,37	184,30	22,99

TESTE TRIPLO FÊMEAS	CONTROLE		MDZ 0,5		MDZ 0,75	
Área não aversiva	Média	EP	Média	EP	Média	EP
SHR 1	695,90	37,77	722,40	26,23	694,40	37,11
SHR 2	736,50	22,75	745,20	20,87	720,90	15,86
SHR 3	778,00	23,92	707,90	29,15	681,20	23,67
SHR 4	708,50	33,08	684,90	30,96	650,00	32,81
SHR 5	731,30	40,18	730,40	41,72	711,50	21,84
SLA16 1	664,00	14,88	712,70	32,80	681,30	41,53
SLA16 2	703,60	31,15	665,10	37,73	585,60	45,16
SLA16 3	691,30	26,24	630,70	44,25	618,00	22,95
SLA16 4	648,30	27,13	603,30	23,96	614,80	33,48
SLA16 5	665,20	26,72	658,90	35,68	638,90	35,89
Área aversiva						
SHR 1	167,50	26,19	177,70	16,87	225,00	16,12
SHR 2	123,10	23,29	127,90	23,48	131,50	15,89
SHR 3	101,30	20,17	170,50	26,91	191,20	22,37
SHR 4	164,10	35,56	201,00	34,04	234,20	29,52
SHR 5	142,10	29,88	144,40	24,40	157,50	22,20
SLA16 1	243,80	19,90	200,80	32,03	238,00	15,39
SLA16 2	177,40	15,49	206,80	34,34	206,60	20,54
SLA16 3	180,00	31,37	216,60	26,00	245,90	19,75
SLA16 4	221,80	28,86	289,30	28,20	253,40	27,55
SLA16 5	197,30	23,49	204,80	36,02	195,10	18,72

**9.2. Tabela de tempo gasto nas áreas não aversivas e aversivas do TT-** Representa como média e erro padrão o tempo que cada linhagem SLA16 e SHR, gastou em cada dia (1, 2, 3, 4 e 5) nas áreas não aversivas (área periférica do CA, braços fechados do LCE e compartimento escuro da CBP) e nas áreas aversivas (área central do CA, braços abertos do LCE e compartimento branco da CBP) do TT