

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, EMBRIOLOGIA E GENÉTICA

LABORATÓRIO DE GENÉTICA DO COMPORTAMENTO

Estudo da associação entre duas regiões do genoma do rato, localizadas nos cromossomos 4 e 7, e a emocionalidade em duas linhagens de ratos selecionadas no teste do campo aberto

Thaís Müller Hameister

Dissertação apresentada como requisito

parcial à obtenção do título de Mestre ao

Curso de Pós-graduação em Neurociências

da Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Prof. Dr. André de Ávila Ramos

Florianópolis, fevereiro de 2008.

AGRADECIMENTOS

Gostaria aqui de registrar meus mais sinceros agradecimentos a algumas pessoas, que possibilitaram a realização desta etapa tão importante em minha vida. Peço desculpas aos possíveis esquecimentos.

Ao professor Dr. André Ramos, pela amizade e compreensão diante de algumas dificuldades passadas no decurso do trabalho. Mas principalmente pela oportunidade de trabalhar neste laboratório, o que propiciou meu desenvolvimento científico na área por mim tão almejada que é a genética do comportamento. Agradeço também pelo crédito e dedicação, tão importantes para meu desenvolvimento intelectual e científico.

A professora Ilíada Rainha de Souza que me recebeu no Laboratório de Polimorfismos Genéticos na UFSC, pelo acolhimento em seu laboratório e pelo carinho, o que possibilitou a aprendizagem e otimização de técnicas de biologia molecular essenciais para este trabalho. Também por orientar-me, e permitir à minha prática de ensino, na disciplina de Genética para Farmácia na UFSC.

Ao professor Paulo Hofmann, do Laboratório de Drosophilídeos na UFSC, pelas dúvidas esclarecidas e pelos comentários tão importantes a respeito deste trabalho.

Ao professor Victor Hugo Valiati, da Universidade do Vale do Rio dos Sinos, pela paciência, carinho, compreensão, pelas dúvidas esclarecidas, pelos comentários e orientações de quais caminhos tomar frente a resultados referentes à seleção artificial e evolução, imprescindíveis para a análise dos dados obtidos no presente trabalho.

Em especial ao meu colega de trabalho Geison de Souza Izídio, pelas horas e horas de colaboração, ajuda essencial, sem distinção de horários mesmo à noite ou nos finais de

semana. Pela troca de conhecimento e pelos debates sempre oportunos envolvendo temas tão apaixonantes como os transtornos de humor e suas comorbidades. Pelo carinho, paciência, amizade e também pelas boas risadas no fim do dia depois de horas de experimentos moleculares.

Aos demais colegas de laboratório Elayne, Gustavo, Leandro, Douglas, Francine, Ana Paula, Natália, Lígia, Fedra e Luís pela amizade e os bons momentos juntos além da ajuda nas tarefas diárias no decurso do mestrado.

Aos colegas do Laboratório de Polimorfismos Genéticos da UFSC, em especial ao Tiago, Sandra e Aninha, que usando o tempo destinados a suas pesquisas se dedicaram a me ensinar técnicas de biologia molecular, sem as quais este trabalho não teria sido realizado.

A minha mãe pelo amor, apoio, estímulo constante, conforto nas horas difíceis e por estar presente diariamente durante todo o curso. Por ter me dado “asas” para “voar” sozinha.

A minha grande e amada família pelo apoio durante este momento tão importante da minha vida. Principalmente aos meus tios Gilberto e Jurema, ao meu primo Bernardo, a Josiane minha cunhada e “irmã” postiça, que tanto me apoiaram durante toda minha vida e à minha avó amada Frida (*in memoriam*) que faleceu durante o mestrado, período em que menos me fiz presente na vida dela.

A minha sobrinha Vitória, pelo amor e pelos conselhos proferidos por uma menina tão novinha de forma tão sábia e madura. Por compreender de forma tão adulta que este passo findado é extremamente importante para minha vida.

Ao meu pai (in memoriam) que não está mais presente e que infelizmente conviveu durante toda sua vida com transtornos de humor, hoje meu objeto de estudo. Pelo amor e pelos vínculos estabelecidos em tão pouco tempo de convívio.

Em especial ao Dr. Flavio Vicente, cujo apoio foi fundamental para a finalização deste trabalho.

A todos os meus amigos em especial a Karina, Tatiana, Carolina, Joana, Celomar, Denise e Daniela, pela amizade e apoio em todos os momentos.

Ao Cassio pelo carinho e apoio na fase final do mestrado e por acreditar que este trabalho seria concluído.

Ao funcionário Nivaldo, da Pós-Graduação em Neurociências da UFSC, que trabalha em favor de uma universidade pública, gratuita e de qualidade, que tantos “galhos me quebrou” durante o curso.

Ao funcionário Marcos, do CCB da UFSC, que prontamente muitas vidrarias, microtubos e outros equipamentos autoclavou.

Aos “ratinhos” das linhagens Floripa H e Floripa L, o modelo animal que me permitiu conhecimento e conclusões fundamentais para o início do entendimento da influência da genética quantitativa nos transtornos de ansiedade. Também por permitir que despertasse em mim um sentimento pouco comum a humanos, o carinho pelos roedores.

Ao apoio financeiro da Capes, da Fapesc e do PRONEX, sem o qual esta etapa não teria sido concluída.

"A satisfação está no esforço feito para alcançar o objetivo, e não em tê-lo alcançado".

Mohandas Karamchand **Gandhi** (1869 – 1948)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	20
1.1. Emoção e emocionalidade	20
1.2. Ansiedade.....	20
1.3. Modelos animais de ansiedade	21
1.4. <i>Locus</i> para traços quantitativos (QTL) e comportamento	24
1.5. <i>Ofil1</i> e <i>Ofil2</i>, dois <i>loci</i> associados à emocionalidade	26
1.6. Linhagens de roedores selecionadas para comportamento.....	28
1.7. Floripa H e Floripa L, duas linhagens de ratos selecionadas para a emocionalidade	30
2 - OBJETIVOS	33
2.1.Gerais	33
2.2. Específicos.....	33
3 - MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1. Floripa H e Floripa L, duas linhagens de ratos selecionadas para a emocionalidade	34

3.2. Extração de DNA.....	34
3.3. Reação em cadeia da polimerase.....	35
3.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 8%	37
3.5 Eletroforese em gel de agarose a 3%.....	39
3.6. Análises estatísticas	39
3.6.1. Variação nas frequências alélicas da S0 a S4.....	39
3.6.2. Teste para o Equilíbrio de <i>Hardy-Weinberg</i>	40
3.6.3. Teste do X^2 de contingência para todas as gerações de seleção	41
3.6.4. Análises de correlação e regressão.....	41
4 – RESULTADOS	43
4.1. Tamanho dos alelos	43
4.2. Linhagem Floripa H	44
4.2.1. Dados de genotipagem para D4RAT59	44
4.2.2. Dados de genotipagem para D4MGH27	46
4.2.3. Dados de genotipagem para D7MGH11	48
4.2.4. Dados de genotipagem para D7RAT35	50

4.2.5. Correlação entre frequência alélica e locomoção central	51
4.3. Linhagem Floripa L.....	53
4.3.1. Dados de genotipagem para D4RAT59	53
4.3.2. Dados de genotipagem para D4MGH27	55
4.3.3. Dados de genotipagem para D7MGH11.....	57
4.3.4. Dados de genotipagem para D7RAT35	59
4.3.5. Correlação entre frequência alélica e locomoção central	60
4.4. Correlação entre a variação das frequências alélicas e a variação da locomoção central entre as linhagens Floripa H e Floripa L.....	61
5- DISCUSSÃO	65
6 – CONCLUSÃO	74
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75

ABREVIATURAS

CA (ou OF) = Campo aberto (ou *Open Field*)

CBP = Caixa branca e preta

DNA = Ácido desoxiribonucleico

GL = Graus de liberdade

HA = Linhagem de ratos *High Avoidance*

HAB = Linhagem de ratos *High Anxiety-related Behaviour*

HEP = Linhagem de ratos *High-Ethanol Preferring*

HOFT = Linhagem de camundongos *High Open-field Thigmotaxis*

LA = Linhagem de ratos *Low Avoidance*

LAB = Linhagem de ratos *Low Anxiety-related Behaviour*

LCE = Labirinto em cruz elevado

LEW = Linhagem de ratos Lewis

Locus = Região genômica, plural *loci*

LOD score = *Maximum logarithm of the likelihood for the QTL*

LOFT = Linhagem de camundongos *Low Open-field Thigmotaxis*

MNR = Linhagem de ratos *Maudsley Nonreactive*

MR = Linhagem de ratos *Maudsley Reactive*

NP = Linhagem de ratos *Alcohol-Nonpreferring*

Ofil1 = QTL para *Open field inner locomotion 1* no cromossomo 4 de ratos

Ofil2 = QTL para *Open field inner locomotion 2* no cromossomo 7 de ratos

P = Linhagem de ratos *Alcohol-Preferring*

PCR = Reação em cadeia da enzima polimerase

QTL = *locus* para traços quantitativos

QTG = Gene para traços quantitativos

RHA = Linhagem de ratos *Roman High Avoidance*

RLA = Linhagem de ratos *Roman Low Avoidance*

SHR = Linhagem de ratos *Spontaneously Hypertensive Rats*

sNP = Linhagem de ratos *Sardinian Alcohol-Nonpreferring*

sP = Linhagem de ratos *Sardinian Alcohol-Preferring*

UFSC = Universidade Federal de Santa Catarina

uTaq = Unidade de medida para Taq polimerase

WKY = Linhagem de ratos *Wistar-Kyoto*

χ^2 = Qui quadrado

RESUMO

As linhagens de ratos Floripa H e Floripa L, selecionadas bidirecionalmente para extremos de locomoção no centro do teste do campo aberto (CA), um comportamento relacionado à emocionalidade, foram propostas como um modelo animal para estudar a genética da ansiedade. As duas linhagens foram desenvolvidas no intuito de investigar a influência de dois *locus* para traços quantitativos (QTLs). Ambos QTLs foram previamente identificados em uma geração F2 resultante do acasalamento de ratos LEW e SHR afetando a atividade locomotora no centro do CA, o mesmo fenótipo foi utilizado como parâmetro de seleção nas linhagens Floripa. Os dois QTLs, um no cromossomo 4 e outro no 7, respectivamente, foram denominados de *open field inner locomotion QTL 1 (Ofil1)* e *open field inner locomotion QTL 2 (Ofil2)*. O presente estudo teve como objetivo verificar se os QTLs (*Quantitative Trait Locus*) *Ofil1* e *Ofil2*, sabidamente associados a comportamentos emocionais em ratos derivados das linhagens isogênicas LEW e SHR, estariam da mesma forma contribuindo para este fenótipo comportamental nas linhagens Floripa, selecionadas a partir de uma geração de animais resultante de um intercruzamento entre linhagens parentais ainda não investigadas do ponto de vista genotípico.

Com este objetivo, foram utilizados quatro marcadores moleculares do tipo microssatelite, dois flanqueando o pico de *Ofil1* (D4RAT59 e D4MGH27) e dois flanqueando o pico de *Ofil2* (D7MGH11 e D7RAT35), que se mostraram polimórficos para o modelo animal em estudo. Para verificar se o genótipo destas duas regiões estaria influenciando o fenótipo selecionado, ratos de cinco gerações foram genotipados para os quatro marcadores utilizados. Mudanças nas frequências alélicas e genotípicas ao longo do processo de seleção foram avaliadas para verificar se a seleção imposta ao fenótipo foi acompanhada por divergências genotípicas entre as linhagens.

Foram observadas alterações nas frequências genóticas em todos marcadores moleculares para ambos os QTLs, porém somente os genótipos para os marcadores no *locus Ofil1*, pareceram estar significativamente correlacionados com a variação no fenótipo selecionado. Este resultado sugere que nesta região do genoma deve existir um ou mais genes contribuindo para a variação interindividual na locomoção na área aversiva do teste do CA. As alterações nas frequências genóticas observadas para os marcadores do QTL *Ofil2*, por aparentemente não apresentarem correlação com o fenótipo, parecem ser resultado de deriva genética aleatória, talvez com pequena contribuição. Portanto, através deste trabalho, corrobora-se a influência do *locus Ofil1*, em diferentes linhagens de ratos, para um comportamento relacionado à emocionalidade, porém o efeito de *Ofil2* não pode ainda ser descartado.

ABSTRACT

The strains of rats named Floripa H and L, bidirectionally selected to extremes of locomotion in the centre of the test of open field (OF), an emotionality-related behavior, were proposed as an animal model to study the genetics of anxiety. The two strains were developed in order to investigate the influence of two quantitative trait *locus* (QTLs). Both QTLs were previously identified in a generation F₂, resulting from the mating of rats and LEW SHR, affecting the locomotor activity in OF test, the same phenotype was used as a parameter for selection in Floripa strains. The two QTLs, one on chromosome 4 and another at 7, respectively, were called open field inner locomotion QTL 1 (*Ofil1*) and open field inner locomotion QTL 2 (*Ofil2*). This study aimed to ascertain whether the QTLs (Quantitative Trait Locus) *Ofil1* and *Ofil2*, known associated with emotional behavior in rats isogenic lines derived from LEW and SHR, would be the same way contributing to this behavioral phenotype among strains Floripa, selected from of a generation of animals resulting from an intercruzamento between parental strains have not yet investigated the point of view genotypic. Two *loci* for central locomotion in the open field test (OF) were identified in the F₂ generation resulting from the intercross of LEW and SHR rats. A *locus* on chromosome 4 and another on chromossome 7, respectively, were named *Ofil1* and *Ofil2*. The present study aimed to verify whether the QTLs (Quantitative Trait *Locus*) *Ofil1* and *Ofil2*, known to be associated with emotional behaviors in rats derived from the strains LEW and SHR, would contribute to the same behavioral phenotype in Floripa H and L rats, selected from another population of animals.

With this objective, we used four molecular microsatellite markers, two flanking the peak of *Ofil1* (D4RAT59 and D4MGH27) and two flanking the peak of *Ofil2*

(D7MGH11 and D7RAT35), which were polymorphic for the animal population under study. To verify whether the genotype of these two regions would influence the selected phenotype, five generations of rats were genotyped for the four markers used. Changes in genotypic and allelic frequencies throughout the process of selection were evaluated to determine if the selection on the phenotype was accompanied by genotypic differences between the strains.

There were changes in genotypic frequencies in all molecular markers for both QTLs, but only the markers on *locus Ofil1*, seemed to be significantly correlated with the changes in the phenotype. This result suggests that this region of the genome may contain one or more genes contributing to the interindividual variation in locomotion in the aversive area test of the OF. The changes in genotypic frequencies observed for the QTL *Ofil2* markers, had apparently no correlation with the phenotype, as it appeared to be the result of random genetic drift, perhaps with little effect of selection. Therefore, through this work, we confirm the influence of the *locus Ofil1*, in different strains of rats, on an emotionality-related behavior, but the effect of *Ofil2* is not totally discarded.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Alelos encontrados para cada um dos marcadores utilizados em ratos da geração S0, que deu origem às linhagens Floripa H e L, e ratos isogênicos das linhagens controle LEW e SHR.

Tabela 2 - Total de indivíduos por classe genotípica/fenotípica, frequências alélicas e teste do χ^2 para testar o equilíbrio de Hardy-Weinberg para cada geração para o marcador D4RAT59 no cromossomo 4 ao longo de 5 gerações da linhagem de ratos Floripa H.

Tabela 3 - Total de indivíduos por classe genotípica/fenotípica, frequências alélicas e teste do χ^2 para testar o equilíbrio de Hardy-Weinberg para cada geração para o marcador D4MGH27 no cromossomo 4 ao longo de 5 gerações da linhagem de ratos Floripa H.

Tabela 4 - Total de indivíduos por classes genotípica/fenotípica, frequências genotípicas e alélicas e teste do χ^2 para testar o equilíbrio de Hardy-Weinberg para cada geração para os marcadores D7MGH11 e D7RAT35 do cromossomo 7 ao longo de 5 gerações da linhagem de ratos Floripa H.

Tabela 5 - Total de indivíduos por classe genotípica/fenotípica, frequências genóticas e alélicas e teste do χ^2 para testar o equilíbrio de Hardy-Weinberg para cada geração para o marcador D4RAT59 no cromossomo 4 ao longo de 5 gerações da linhagem Floripa L .

Tabela 6 - Total de indivíduos por classe genotípica/fenotípica, frequências genóticas e alélicas e teste do χ^2 para testar o equilíbrio de Hardy-Weinberg para cada geração para o marcador D4MGH27 no cromossomo 4 ao longo de 5 gerações da linhagem L.

Tabela 7. Total de indivíduos por classe genotípica/fenotípica, frequências genóticas e alélicas e teste do χ^2 para testar o equilíbrio de Hardy-Weinberg para cada geração para os marcadores D7MGH11 e D7RAT35 do cromossomo 7 ao longo de 5 gerações da linhagem L.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Locomoção central no teste do campo aberto para machos e fêmeas nas cinco primeiras gerações de seleção (S0 até S4) das linhagens de ratos Floripa H e Floripa L. Extraído de *Ramos et al.* (2003).

Figura 2 - Frequências alélicas por geração de seleção da linhagem de ratos Floripa H para o marcador D4RAT59, no cromossomo 4.

Figura 3 - Frequências alélicas por geração de seleção da linhagem de ratos Floripa H para o marcador D4MGH27, no cromossomo 4.

Figura 4 - Frequências alélicas por geração de seleção da linhagem de ratos Floripa H para o marcador D7MGH11, no cromossomo 7.

Figura 5 - Frequências alélicas por geração de seleção da linhagem de ratos Floripa H para o marcador D7RAT35, no cromossomo 7.

Figura 6 - Frequência do alelo 1 para o marcador D4RAT59 e do alelo 3 para o marcador D4MGH27, ambos no cromossomo 4, em comparação com a média de locomoção central nas gerações de seleção da linhagem de ratos Floripa H.

Figura 7 - Frequência do alelo 1 para o marcador D7MGH11 e do alelo 2 para o marcador D7RAT35, em comparação com a média da locomoção central nas gerações de seleção da linhagem de ratos Floripa H.

Figura 8 - Frequências alélicas por gerações de seleção da linhagem de ratos Floripa L para o marcador D4RAT59, no cromossomo 4.

Figura 9 - Frequências alélicas por geração de seleção da linhagem de ratos Floripa L para o marcador D4MGH27, no cromossomo 4.

Figura 10 - Frequências alélicas por geração de seleção da linhagem de ratos Floripa L para o marcador D7MGH11, no cromossomo 7.

Figura 11 - Frequências alélicas por geração de seleção da linhagem de ratos Floripa L para o marcador D7RAT35, no cromossomo 7.

Figura 12 - Frequência do alelo 1 para o marcador D4RAT59 e do alelo 3 para o marcador D4MGH27, ambos no cromossomo 4 em comparação com a média de locomoção central nas gerações de seleção da linhagem de ratos Floripa L.

Figura 13 - Frequência do alelo 1 para o marcador D7MGH11 e do alelo 2 para o marcador D7RAT35, ambos no cromossomo 7, em comparação com a média da locomoção central nas gerações de seleção da linhagem de ratos Floripa L.

Figura 14 - Frequências do alelo 1 para o marcador D4RAT59 no cromossomo 4 nas gerações de seleção para as linhagens Floripa H e Floripa L.

Figura 15 - Frequências do alelo 3 para o marcador D4MGH27 no cromossomo 4 nas gerações de seleção para as linhagens Floripa H e Floripa L.

Figura 16. Delta interlinhagens para a locomoção central no teste do CA e para as frequências do alelo 1 de D4RAT59 ao longo das cinco gerações de seleção das linhagens Floripa H e Floripa L.

1. Introdução

1.1. Emoção e emocionalidade

Segundo Silveira Bueno (1965, p. 1498), no Grande Dicionário Etimológico Prosódico da Língua Portuguesa, o termo “emoção” (substantivo feminino) refere-se à impressão produzida no ânimo, enquanto “emocionalidade” (derivação do adjetivo emocional) é a qualidade do que pode ser emocionado. No campo científico, no entanto, Calvin Hall (1934), no seu estudo inicial com experimentações comportamentais em ratos, já havia definido que o termo emocionalidade não abrange todo o termo emoção. Segundo ele, emocionalidade seria definida como um estado de natureza emocional, acompanhada de alterações fisiológicas e bioquímicas que alteram a homeostase, associadas ou resultantes da estimulação emocional, podendo ser observada tanto em humanos quanto em outros animais. O termo emocionalidade, que pode ser considerado como uma reação emocional ao estresse (Eley; Plomim, 1997), vem sendo utilizado na psicologia experimental desde Calvin Hall, e normalmente se refere a estados psicológicos e fisiológicos relacionados ao medo e à ansiedade.

1.2. Ansiedade

A ansiedade é um fenômeno emocional comum em humanos (Clément *et al.*, 2002). Em sua forma patológica, pode afetar quase um terço da população, em algum período durante a vida (Anagnostaras *et al.*, 1999; Finn *et al.*, 2003; Gross; Hen, 2004). É um estado comportamental que envolve aumento da vigília e da reatividade comportamental e esquiva de situações aversivas. Além disso, envolve alterações fisiológicas que resultam no desequilíbrio homeostático do organismo (p.ex.: aumento da atividade do sistema nervoso autônomo simpático, taquicardia e sudorese) frente a condições ambientais aversivas (Lazarus, 1993; Ramos; Mormède, 1998; Belzung;

Griebel, 2001; Blanchard *et al.*, 2001; Gross; Hen, 2004). É, desta forma, considerada como a antecipação emocional a uma situação aversiva, difícil de prever ou controlar, cuja intensidade e natureza da resposta dependem das características de cada indivíduo.

Trabalhos realizados na última década mostram que alguns indivíduos apresentam uma predisposição genética a certos tipos de reações emocionais, que combinada com eventos estressantes, pode promover o desenvolvimento de psicopatologias específicas (Plomim *et al.*, 1994; Eley; Plomim, 1997). Ou seja, a reação emocional ao estresse tem sido proposta como um componente importante e um fator desencadeante de alguns transtornos psiquiátricos, como a ansiedade e depressão (Lazarus, 1993; Plomin *et al.*, 1994).

1.3. Modelos Animais de Ansiedade

Embora os transtornos de ansiedade sejam descritos em humanos, respostas fisiológicas e comportamentais semelhantes à ansiedade humana não patológica têm sido encontradas em diversas espécies animais e parecem ser parte de um mecanismo universal utilizado pelos organismos na adaptação ao ambiente (Gross; Hen, 2004). Estima-se que aproximadamente de 20 a 30% da variabilidade para traços relacionados à ansiedade possa ser explicada por fatores genéticos, sendo o restante resultado da influência ambiental (Kendler, 1995). Para o estudo destas respostas comportamentais, são desenvolvidos experimentos em laboratório com ambiente controlado, onde se procura minimizar a influência de fatores ambientais que possam interferir no fenótipo (Crabbe, 1999; Izídio *et al.*, 2005).

Modelos animais são preparações experimentais envolvendo diferentes espécies não humanas, com o objetivo de estudar fenômenos humanos. Para que seja validado como um modelo animal, é necessário que haja correspondência de estrutura do órgão

ou sistema envolvido (isomorfismo) com o fenômeno em humanos, assim como deve haver validade preditiva (correspondência de sensibilidade farmacológica), e a similaridade dos mecanismos neurobiológicos envolvidos (Treit, 1985; Rodgers *et al.*, 1997). Outro fator importante, no caso de modelos genéticos, é que a espécie candidata a modelo animal deve apresentar um ciclo de vida rápido, que permita a produção de várias gerações em um período curto de tempo, assim como deve ter uma alta fecundidade e alta taxa de sobrevivência (Lassale, 2007).

Com a finalidade de se investigar a ansiedade ou a emocionalidade, são desenvolvidos modelos comportamentais em várias espécies animais, entre elas os drosofilídeos (Belay; Sokolowski, 2007), nematódeos (Jansen; Ségalat, 2007) e roedores (Hall, 1934; Broadhurst, 1975; Porsolt, 1978; Crawley *et al.*, 1981; Treit; Fundytus, 1989; Trullas; Skolnick, 1993; Castanon *et al.*, 1995; Courvoisier *et al.*, 1996; Rex *et al.*, 1996; Ramos *et al.*, 1997/1998; Rodgers *et al.*, 1997; Crabbe, 1999; Lassale, 2007). Apresentando uma grande correspondência genética de estruturas e de respostas comportamentais (Broadhurst, 1975; Plomin, 1991; Fujita *et al.*, 1994; Ramos; Mormède, 1998/2007, Ramos *et al.*, 2003; Ramos; Mormède, 2007), ratos e camundongos são uma importante ferramenta para o estudo de transtornos psiquiátricos e para a investigação das bases moleculares envolvidas nestes transtornos (Castanon *et al.*, 1995; Flint, 2003; Hinojosa *et al.*, 2006; Willis-Owen; Flint, 2006). Variáveis comportamentais não condicionadas, como a resposta de um organismo à exposição forçada a estímulos aversivos ou à ambientes novos ainda não explorados, são amplamente usados em testes/paradigmas comportamentais desencadeadores de estresse em roedores (Hall, 1934; Montgomery, 1955; Treit; Fundytus, 1989; Rodgers *et al.*, 1997). Estes estudos experimentais constituem uma importante ferramenta para a identificação de traços de emocionalidade em animais não humanos (Pellow *et al.*,

1985; Blanchard; Blanchard, 1990; Cruz *et al.*, 1994; Angrini *et al.*, 1998). Exemplos dos testes comportamentais utilizados para se investigar traços de ansiedade e também utilizados para validação de drogas ansiolíticas (p.ex.: benzodiazepínicos) e ansiogênicas (p.ex.: naltrexona e pentilenotetrazol) (Pellow *et al.*, 1985; Treit, 1985; Cruz *et al.*, 1994; Nazar *et al.*, 1997; Ramos *et al.*, 1997), são o campo aberto (CA) (Hall, 1934; Angrini *et al.*, 1998; Nazar *et al.*, 1997), o labirinto em cruz elevado (LCE) (Montgomery, 1955; Pellow *et al.*, 1985), e a caixa branca e preta (CBP) (Crawley *et al.*, 1981).

O CA é um dos testes mais utilizados na pesquisa comportamental desde que Calvin Hall (1934; 1936), publicou seus trabalhos sobre emocionalidade em ratos. Um grande número de estudos utilizando o teste do CA tem investigado a influência de manipulações ambientais e fatores genéticos na emocionalidade em roedores (Ramos *et al.*, 1997/1998/1999; Ramos; Mormède, 1998). O LCE, desenvolvido por Montgomery (1955), é também um paradigma muito utilizado para testes de ansiedade em roedores, assim como a CBP, descrita por Crawley (1981) (Ramos *et al.*, 1997; Henniger *et al.*, 2000). O CA é uma arena grande e nova para o animal, tendo uma área central desprotegida e uma área periférica próxima às paredes. Já o teste do LCE apresenta dois braços abertos também desprotegidos de paredes laterais. Estas regiões são consideradas aversivas a roedores, que preferem espaços protegidos, familiares, pouco iluminados (Trullas; Skolnick, 1993; Flint, 2003) e próximos a paredes laterais, onde o animal pode encostar as vibrissas, o que chamamos de comportamento tigmotáxico (Treit; Fundytus, 1989). Assim, roedores tendem a se esquivar destas regiões nos testes comportamentais, preferindo localizar-se na periferia, ou nos braços fechados (no caso do LCE), perto dos muros laterais. Por estes motivos, a atividade locomotora nas áreas aversivas ao animal pode ser considerada uma medida de ansiedade experimental (Angrini *et al.*, 1998;

Ramos *et al.*, 1999) ou uma medida de medo/emocionalidade (Treit; Fundytus, 1989, Ramos; Mormède, 1998). Variáveis como o tempo e o número de entradas nas regiões aversivas dos paradigmas experimentais, são utilizadas como medidas de ansiedade/emocionalidade em modelos animais (Hall, 1934; Hall, 1936; Montgomery, 1955).

Com o intuito de se investigar as bases neurobiológicas e genéticas de traços psicológicos, podemos utilizar diferentes estratégias, sendo uma delas a análise de linhagens isogênicas de roedores que respondam aos mesmos estímulos de maneira contrastante (Ramos; Mormède, 1998; Crabbe, 1999). Apartir de um estudo com seis linhagens isogênicas de ratos, Ramos *et al.* (1997) propuseram um novo modelo genético animal de ansiedade, composto de duas linhagens de ratos, LEW (*Lewis*) e SHR (*Spontaneously Hypertensive Rat*), que foram escolhidas por diferirem em comportamentos relacionados ao medo/emocionalidade e não na atividade locomotora total. Como resultado, observou-se que a linhagem LEW apresenta menor locomoção nas áreas aversivas nos testes CA, LCE e CBP, quando comparada à linhagem SHR (Ramos *et al.*, 1997/1999/2002). A descoberta deste modelo genético possibilitou a busca por regiões genômicas envolvidas nos comportamentos relacionados ao medo/emocionalidade (Ramos *et al.*, 1999).

1.4. Locus para traços quantitativos (QTL) e comportamento

A maioria das variações individuais em características comportamentais é de natureza quantitativa, ou seja, é a herança poligênica sob influência do ambiente que resulta em um determinado comportamento que varia em intensidade na expressão do fenótipo. As regiões cromossômicas que contém variantes alélicas (genes polimórficos), que contribuem com pequeno efeito para um fenótipo quantitativo são denominadas de

loci para traços quantitativos (QTL). O principal desafio da genética quantitativa é saber quais *loci* e quais alelos contribuem para a variação quantitativa comportamental (Turri *et al.*, 2001; Flint, 2003).

O mapeamento de QTLs permite a identificação e localização de regiões genômicas discretas que afetam comportamentos relacionados à emocionalidade (Brodkin; Nestler, 1998; Ramos *et al.*, 1999). Este tipo de estratégia envolve o estudo genômico e pode fornecer informações sobre associações genéticas entre diversas características fenotípicas complexas, assim como possibilitam a avaliação dos mecanismos moleculares moduladores das características em estudo (Ramos; Mormède, 1998). Uma maneira de se identificar QTLs envolve o cruzamento entre indivíduos de duas linhagens parentais isogênicas contrastantes para uma característica fenotípica, originando animais F1 totalmente híbridos. Estes animais são novamente inter cruzados produzindo animais F2 segregantes, que serão usados em uma análise de varredura do genoma, correlacionando o fenótipo estudado com variações genotípicas, através da utilização de marcadores moleculares de DNA espalhados por todos os cromossomos (Ramos *et al.*, 1999; Flint, 2003).

Outra ferramenta utilizada para o estudo e a confirmação de QTLs previamente relacionados a traços comportamentais é a seleção artificial divergente de linhagens de roedores a partir de uma geração heterogênea e polimórfica. Para isto, utilizam-se populações parentais que apresentam polimorfismos para marcadores genéticos que serão posteriormente estudados, buscando-se estabelecer correlações entre os marcadores e as variações fenotípicas das linhagens selecionadas (Flint *et al.*, 1995; Buck *et al.*, 1997; Ramos *et al.*, 1999). Trabalhos posteriores ao mapeamento de QTLs podem ser utilizados para testar a influência destes *loci* em diferentes populações da mesma espécie. A partir da localização de QTLs pode-se fazer o mapeamento de genes

para traços quantitativos (QTGs) que podem ser localizados por homologia em cromossomos humanos (Disponível em RGD – Rat Genome Database).

As primeiras regiões cromossômicas (*loci*) influenciando respostas emocionais foram identificadas em camundongos por Flint *et al* (1995) e em ratos por Ramos *et al.* (1999). Na literatura, já existem diversas regiões descritas para várias medidas comportamentais de emocionalidade, de atividade locomotora, de abuso, preferência ou sensibilidade a drogas, ou ainda para algumas características fisiológicas em diferentes linhagens de roedores (Flint, 2003; Willis-Owen; Flint, 2006).

1.5. *Ofil1* e *Ofil2*, dois *loci* associados à emocionalidade

Quando as linhagens de ratos LEW e SHR são comparadas em testes comportamentais, a primeira apresenta menor aproximação e maior esquivas das áreas aversivas dos diferentes paradigmas utilizados. Por este motivo, a linhagem SHR é considerada “menos ansiosa” que a linhagem LEW. Considera-se este par de linhagens um bom modelo animal experimental para o estudo da genética da ansiedade (Ramos *et al.*, 1998). Ramos *et al.* (1999), cruzando entre si uma geração híbrida F1, proveniente de um intercruzamento inicial das linhagens isogênicas de ratos LEW e SHR, identificaram e mapearam, numa geração F2, pela primeira vez em ratos, dois QTLs localizados no cromossomo 4 e 7, com alto nível de significância. Ao QTL no cromossomo 4 foi dado o nome de *Ofil1* (para *Open field inner locomotion 1*). O segundo QTL, localizado no cromossomo 7, foi chamado de *Ofil2* (para *Open field inner locomotion 2*). Ele foi identificado como tendo efeito semelhante, porém menos marcante, que *Ofil1* (Ramos *et al.*, 1999). Os dois QTLs tinham forte influência na locomoção central no teste do CA, aparato previamente descrito por Calvin Hall (1934;

1936) para quantificar emocionalidade em roedores, através de medidas de locomoção e defecação.

A existência de *Ofil1* no cromossomo 4 foi corroborada por outro estudo posterior envolvendo as mesmas linhagens (Mormède *et al.*, 2002). Um outro trabalho recente, realizado por Vendruscolo *et al.* (2006), demonstrou que nesta região genômica devem existir genes contribuindo para traços não só relacionados à ansiedade, mas também relacionados ao consumo de etanol. Próximo ao locus do cromossomo 4, outros dois QTL já foram mapeados. O primeiro deles influenciava o consumo de etanol em ratos e foi encontrado em um estudo com as linhagens *Alcohol-Prefering* (P) e *Alcohol-Nonprefering* (NP) (Bice *et al.*, 1998; Carr *et al.*, 1998). O segundo influenciava o consumo de etanol e de sacarina e foi encontrado em um estudo com as linhagens de ratos *High-Ethanol Preferring Line* (HEP) e Wistar-Kyoto (WKY) (Terenina-Rigaldie *et al.*, 2003a).

Além destes, outros estudos sugeriram que o *locus* identificado por Terenina-Rigaldie *et al.* (2003a) tinha um efeito pleiotrópico (quando a variação devida a um gene se traduz em diferentes efeitos fenotípicos), atuando não somente na preferência ao etanol, mas também em medidas de emocionalidade, como a locomoção central no CA (Terenina-Rigaldie *et al.*, 2003b). É possível, portanto, que nesta região do genoma do rato no cromossomo 4, exista um ou mais genes com efeito simultâneo sobre a reatividade emocional e a preferência pelo etanol, o que a tornaria extremamente interessante no estudo da genética da comorbidade clínica freqüentemente observada entre ansiedade e alcoolismo.

1.6. Linhagens de roedores selecionadas para comportamentos

Experimentos realizados em laboratório podem manipular a reprodução entre indivíduos que apresentam o extremo de um fenótipo, acima ou abaixo da média (Bignami, 1965; DeFries *et al.*, 1978; Futuyma, 1997 p. 96; Ramos *et al.*, 2003; Koundaurova *et al.*, 2006; Leppänen *et al.*, 2006). Quando indivíduos específicos de uma população heterogênea, que apresentam um determinado fenótipo comportamental em comum são acasalados entre si, sua prole tende a apresentar fenótipo mais parecido com o dos reprodutores selecionados do que com a população em geral se a variação selecionada for hereditária (Crabbe, 1999; Lassale, 2007). Linhagens de roedores são usualmente selecionadas em direções opostas (Plomim *et al.*, 1994; Crabbe, 1999), dando origem a linhagens que expressam um determinado fenótipo de forma divergente (Bignami, 1965; DeFries *et al.*, 1978; Ramos *et al.*, 2003; Koundaurova *et al.*, 2006; Leppänen *et al.*, 2006). Manipulações deste gênero são denominadas experimentos de seleção artificial bidirecional (Falconer, 1987; Futuyma, 1997, p. 200 – 205) e são desenvolvidos utilizando diferentes critérios e medidas comportamentais em paradigmas experimentais (DeFries *et al.*, 1978; Ramos *et al.*, 2003). Experimentos envolvendo seleção de fenótipos constituem uma importante ferramenta para análises comportamentais e o estudo comparativo de linhagens selecionadas artificialmente para traços de emocionalidade pode representar uma ferramenta útil para o estudo de mecanismos genéticos envolvidos nos transtornos relacionados à ansiedade (Trullas; Skolnick, 1993; Ramos *et al.*, 1997). O resultado esperado do acasalamento seletivo é o aumento da frequência dos alelos que contribuem positivamente para o traço fenotípico selecionado (Falconer, 1987; Futuyma, 1997, p. 220 - 223; Koundaurova *et al.*, 2006).

Exemplos de pares de linhagens de roedores selecionadas bidirecionalmente são:

* Ratos *Maudsley Reactive* (MR) e *Maudsley Nonreactive* (MNR) (Broadhurst, 1975), selecionados para extremos de defecação no teste do CA, medida descrita por Calvin Hall (1934).

* Camundongos HOFT e LOFT (Leppänen *et al.*, 2006), selecionados para medidas tigmotáticas no teste do campo aberto.

* Ratos *High Anxiety-related Behaviour* (HAB) e *Low Anxiety-related Behaviour* (LAB) (Landgraf; Wigger, 2002), selecionados para comportamentos relacionados à ansiedade no teste do LCE (Henninger *et al.*, 2000; Landgraf; Wigger, 2002).

* Ratos *Roman High Avoidance* (RHA) e *Roman Low Avoidance* (RLA) (Castanon *et al.*, 1995), selecionados para extremos de esquiva no teste “*Shuttle-Box*”.

* Ratos *Sardinian Alcohol-Preferring* (sP) e *Sardinian Alcohol-Nonpreferring* (sNP) (Colombo *et al.*, 1995), selecionados para extremos de consumo de etanol.

Análises genéticas destes modelos animais são importantes para o estudo de doenças complexas humanas (Jacob; Kwitek, 2002) e ajudam a dissecar traços psicológicos complexos em componentes mais simples (Ramos; Mormède, 1998). Estudos quantitativos de seleção artificial permitem uma avaliação de quanto dos traços estudados é herdado e quanto é influenciado por fatores ambientais (DeFries *et al.*, 1978; Buck *et al.*, 1997; Plomin *et al.*, 1997; Caspi; Moffitt, 2006), permitindo a identificação de bases moleculares responsáveis pela variabilidade nas respostas emocionais (Ramos; Mormède, 1998/2006; Crabbe, 1999; Belzung; Griebel, 2001; Lassale, 2007).

1.7. Floripa H e Floripa L, duas linhagens de ratos selecionadas para a emocionalidade

A seleção das linhagens de ratos (*Rattus norvegicus*) Floripa H e Floripa L iniciou-se em 1999 no Laboratório de Genética do Comportamento na Universidade Federal de Santa Catarina, com o intuito de verificar, entre outras coisas, a influência dos QTLs *Ofil1* e *Ofil2* em comportamentos relacionados à ansiedade em linhagens oriundas de uma população heterogênea de ratos diferente daquela na qual estes QTLs foram identificados. Iniciou-se com o inter cruzamento entre ratos das linhagens Wistar e Hooded, ambas linhagens não isogênicas. Cinco fêmeas resultantes deste cruzamento (F1) foram acasaladas com cinco machos LEW (linhagem isogênica), originando uma população da qual somente os animais albinos foram inter cruzados. Sessenta ratos albinos resultantes deste último cruzamento formaram uma população geneticamente heterogênea denominada Floripa S0.

Apartir desta população inicial, foram selecionados bidirecionalmente, para extremos de locomoção no centro do CA (o mesmo fenótipo afetado pelos QTLs descritos em 1999), cinco ratos machos e cinco fêmeas com maiores índices para o comportamento em questão e mais cinco machos e cinco fêmeas com os mais baixos índices para o mesmo fenótipo. Os casais com maiores índices para locomoção central no teste do CA geraram a linhagem de ratos Floripa H. Os casais com menores índices para locomoção central no teste do CA geram a linhagem Floripa L. A cada geração, os ratos das duas linhagens eram testados no aparato do CA. Os cinco machos e cinco fêmeas da linhagem H com mais altos níveis de locomoção na área central e aversiva do CA eram selecionados e inter cruzados, produzindo a geração seguinte de ratos Floripa H. A mesma prática era adotada para a linhagem Floripa L (Ramos *et al.*, 2003).

Como resultado desta seleção, diferenças significativas foram observadas não só na medida selecionada (Figura 1), mas também em outros testes comportamentais de ansiedade, o LCE e a CBP, além de um modelo de depressão, o teste do nado forçado (TNF). Nos três primeiros modelos os animais da linhagem H visitaram mais as áreas aversivas do que os animais da linhagem L, o que sugere que a seleção foi efetiva para o fenótipo. No TNF, os ratos da linhagem L permaneceram mais tempo imóveis do que os da linhagem H, sendo a imobilidade neste teste uma medida relacionada à depressão.

Este modelo animal sofreu algumas limitações ao longo do processo seletivo, como a baixa fertilidade, principalmente na linhagem Floripa H em gerações avançadas, provavelmente fruto de alelos recessivos e deletérios, fixados na população por endocruzamento. O cruzamento entre irmãos foi evitado nas gerações de seleção utilizadas no presente projeto.

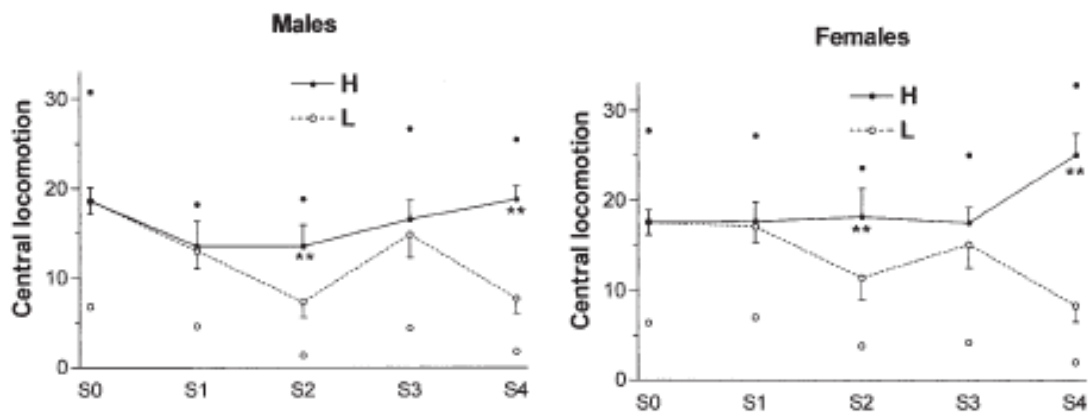


Figura 1. Média da locomoção central no teste do CA para machos e fêmeas das linhagens Floripa H e Floripa L durante as cinco primeiras gerações (S0 a S4). Os pontos em ambos os gráficos significam a média da locomoção central dos animais selecionados em cada geração. ** Representa diferenças significativas ($p < 0,01$) entre as linhagens.

Figura extraída de Ramos *et al.* (2003).

Em vista do exposto, fica clara a necessidade de se investigar mais profundamente as promissoras regiões do genoma do rato nos cromossomos 4 e 7, através de diferentes estratégias experimentais. A estratégia na qual baseia-se o presente trabalho é a utilização das linhagens Floripa H e Floripa L, selecionadas para extremos de atividade locomotora na área central do CA, como ferramenta em busca da confirmação da importância dos QTLs para emocionalidade (*Ofil1* e *Ofil2*) em diferentes populações. Para isto, utilizaremos dados genotípicos das cinco primeiras gerações oriundas da seleção genética bidirecional realizada com os ratos Floripa H e L (Ramos *et al.*, 2003).

Minha hipótese é de que as regiões cromossômicas denominadas *Ofil1* e *Ofil2* contém genes ainda não identificados capazes de influenciar as variações fenotípicas no teste do CA na população heterogênea de ratos (S0) que deu origem às linhagens Floripa H e Floripa L. Portanto, eu espero que o processo seletivo, realizado em laboratório, baseado em um comportamento relacionado à ansiedade, tenha ocasionado divergência nas frequências alélicas de marcadores polimórficos situados próximos a *Ofil1* e *Ofil2* entre estas duas linhagens. A futura identificação e clonagem dos genes envolvidos virá contribuir para a compreensão das bases moleculares das reações emocionais.

2. Objetivos

2.1. Gerais: O presente trabalho pretende confirmar experimentalmente a importância dos QTLs *Ofil1* e *Ofil2*, para o estudo da emocionalidade. Neste sentido, pretendemos avaliar a possível correlação entre estes *loci* e um comportamento relacionado à ansiedade/emocionalidade em um modelo animal desenvolvido em nosso laboratório, as linhagens de ratos Floripa H e L.

2.2. Específicos:

I. Identificar os diferentes alelos de dois marcadores moleculares (D4RAT59 e D4MGH27) mapeados no cromossomo 4, próximos ao *locus Ofil1* e dois outros marcadores (D7RAT35 e D7MGH11) mapeados no cromossomo 7, próximo ao *locus Ofil2*, na geração de ratos S0 que serviu de origem para as atuais linhagens Floripa H e L. Os marcadores no cromossomo 4 não apresentam segregação independente e estão a 13,4 centiMorgans (cM) de distância um do outro. Os marcadores no cromossomo 7 também estão ligados entre si, porém a uma distância de 6,2 cM (Ramos *et al.*, 1999; RGD – Rat Genome Database).

II. Identificar os alelos do mesmo grupo de marcadores nas quatro gerações subsequentes (S1 – S4) das linhagens Floripa H e Floripa L, através da análise genotípica de todos os animais, procurando relacionar a divergência fenotípica com a variação das frequências alélicas a partir da geração inicial S0 durante o processo de seleção, o que corroborará ou não, a influência dos QTLs sobre o fenótipo destas linhagens.

3. Materiais e Métodos

3.1. Floripa H e Floripa L

O processo seletivo das linhagens de ratos Floripa H e Floripa L iniciou-se com o intercruzamento entre ratos das linhagens Wistar e Hooded, que produziu a geração F1. Cinco fêmeas da F1 foram acasaladas com cinco machos LEW (linhagem isogênica) e originaram a geração inicial de seleção (S0) com um total de sessenta animais. A partir desta geração inicial foram selecionados de forma bidirecional, para extremos de locomoção no centro do CA, cinco machos e cinco fêmeas com maiores índices para o comportamento em questão e mais cinco machos e cinco fêmeas com os mais baixos índices para o mesmo fenótipo. Os casais com maiores índices para locomoção central no teste do CA produziram a geração S1 de ratos Floripa H. Os casais com menores índices deram origem à geração S1 dos Floripa L. A cada geração, o mesmo procedimento seletivo, para o cruzamento de animais com extremos do fenótipo analisado, foi aplicado a cada geração produzida até a geração S4 resultando nas linhagens Floripa H e L (Ramos *et al.*, 2003).

3.2. Extração de DNA

Foi utilizado para extração de DNA material coletado entre os anos de 2000 e 2001, do fígado e baço de 223 ratos, congelado a -20°C no Laboratório de Genética do Comportamento da UFSC. Os tecidos estavam acondicionados separadamente em tubos eppendorf de 1,5 mL e eram provenientes dos animais das primeiras cinco gerações de seleção de ratos das linhagens Floripa H e Floripa L (S0 a S4). O DNA foi extraído utilizando-se o kit e o protocolo DNazol da empresa Invitrogen Life Technologies. O kit era composto pela solução reagente DNazol e a solução tampão HEPES a 1M. Inicialmente o tecido era picado e então o reagente DNazol era adicionado a cada

amostra a ser macerada e centrifugada. Após a centrifugação o material genômico era separado e lavado com álcool a -4°C por até quatro vezes, passando por sucessivas centrifugações até que se obtivesse uma concentração mínima de 50 ng/uL de DNA, tamponada com a solução HEPES a 0,1 M na intenção de equilibrar o pH da amostra em 8.

3.3. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para amplificação das regiões genômicas específicas a serem estudadas, foi utilizado o aparelho Px2 Thermal Cycler da Thermo Electron Corporation, com programas específicos otimizados para cada marcador do tipo microsatélite. Para cada reação de PCR era utilizada uma microplaca de acrílico contendo 96 poços com capacidade para 0,2 mL de amostra distribuídos em 8 linhas e 12 colunas. Após a aplicação das amostras a microplaca era vedada com adesivo resistente a altas temperaturas, evitando a evaporação do produto de PCR. O processo de PCR envolve três etapas: primeiro a desnaturação do DNA original (separação das fitas em dupla hélice); em seguida o anelamento dos *primers* para, em fim, com o auxílio da enzima Taq polimerase, promover a formação das novas cadeias de DNA dos marcadores moleculares específicos que servirão de base para a produção das novas cadeias no ciclo seguinte.

Para todas as reações de PCR foi utilizado por amostra um volume final de 20 μL que continha 5 μL do DNA genômico previamente extraído e mantido à 50 ng/uL, 5 μL da solução de oligonucleotídeos (*primers* previamente preparados a partir das soluções *forward* e *reverse* para cada marcador específico) e 10 μL de uma solução PCR 2x (Biosystems) contendo 0,97 mL de água Milli-Q autoclavada, 250 μL de solução tampão PCR 2x (Biosystems), 75 μL de Cloreto de Magnésio a 50 mM (Biosystems) e 6,55 μL de solução contendo os desoxirribonucleosídeos trifosfatados a

25 mM (dATP; dTTP; dGTP; dCTP) (Amresco Inc.). À solução tampão PCR 2x previamente preparada, foi adicionado por último uma alíquota de 0,076 µL de Taq polimerase (Biossystems) correspondente a 0,38 uTaq por amostra.

Para todas as reações de PCR foi utilizado um programa básico onde se variou a temperatura de anelamento para cada marcador. O programa básico com temperaturas e o número de ciclos foi o seguinte: (i) um ciclo a 96°C por 5 minutos; (ii) 35 ciclos a 92°C por 30 segundos, 55,8°C-61,5°C (dependendo do microssatélite) por um minuto e 72°C por 30 segundos; (iii) um ciclo a 72°C por dois minutos. As temperaturas de anelamento, estabelecidas através de otimização do programa básico, variaram de acordo com o microssatélite utilizado e foram as seguintes: para o marcador D4RAT59 usou-se a temperatura de 61,5 °C e para o marcador D4MGH27 usou-se a temperatura de 55,8 °C. Para os demais marcadores utilizou-se a temperatura padrão de anelamento de 58 °C.

Para a síntese das soluções contendo os *primers* para cada marcador, foi utilizado: 12 µL de yellow tartrazine a 10 mg/mL e, 1268 µL de água Milli-Q autoclavada, 20 µL da solução *forward* e 20 µL da solução *reverse* específicas por marcador, cada *primer* a 66 µM. Os marcadores utilizados no cromossomo 4 (D4RAT59 e D4MGH27) flanqueiam o pico de *Ofil1*, enquanto os marcadores utilizados no cromossomo 7 (D7RAT35 e D7MGH11) flanqueiam o pico de *Ofil2*. Todos os marcadores utilizados no presente trabalho foram adquiridos da empresa WMED – World Medical Ltda. A seqüência de nucleotídeos presentes nas soluções *forward* e *reverse*, para cada marcador, encontram-se abaixo.

D4RAT59

Solução *forward*: GCGGAATGATAGTTACTACGGC

Solução *reverse*: GCAGTGTGTTTGGGGTAGCT

D4MGH27

Solução *forward*: TCCTTCACATACATGTGCATACC

Solução *reverse*: TGAGAAGGGCTGTCAGTGG

D7MGH11

Solução *forward*: GGAGCATCCAGATAACCCAA

Solução *reverse*: CTGGACAACACAGTAAGATTTTGC

D7RAT35

Solução *forward*: TCTTCCCACCAATCCTTTTG

Solução *reverse*: CCCTATGTTTCATTCAAGTAGCCC

D7MGH11

Solução *forward*: GGAGCATCCAGATAACCCAA

Solução *reverse*: CTGGACAACACAGTAAGATTTTGC

3.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 8%

Dois tamanhos de placas de vidro foram usadas para a corrida eletroforética vertical. Uma pequena de 30 cm por 20 cm e uma grande de 50 cm por 40 cm. O pente usado com as placas pequena continha 18 poços distribuídos equidistantes. O pente usado com as placas grandes continha 78 poços também distribuídos de forma equidistante. Também para esta técnica eletroforética utilizou-se um controle negativo (produto de PCR sem material genômico) e um controle positivo (produto de PCR conhecido das linhagens isogênicas LEW e SHR). Em gel de poliacrilamida foram genotipados inicialmente todos os animais da geração S0 para todos os marcadores utilizados, visto que esta metodologia permite uma melhor precisão na observação de polimorfismos muito pequenos, de até 2 pares de base (pb). Como as linhagens que deram origem aos animais da S0 ainda não haviam sido comparados a níveis

genotípicos, não se sabia qual seria a diferença em tamanho molecular entre os alelos para cada marcador investigado. Utilizou-se como metodologia para as gerações posteriores de ambas as linhagens, a genotipagem através da eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% para os marcadores que apresentaram polimorfismos menores ou iguais a 4 pb e para os demais marcadores a genotipagem da S1 a S4 foram realizadas através de eletroforese em gel de poliacrilamida 8%.

Para o preparo do gel de poliacrilamida foi produzida inicialmente uma solução “mãe” 19:1. Esta solução continha 38 g de acrilamida, 2 g de bisacrilamida mais o suficiente de água para obter uma solução final de 100 mL. A solução mãe era então filtrada utilizando-se papel filtro e acondicionada em recipiente de vidro com tampa a uma temperatura de aproximados -4 °C. A partir da solução mãe preparava-se uma solução de poliacrilamida contendo uréia, água destilada e tampão TBE 10x. A solução final de gel de poliacrilamida tinha concentração igual a 8%. Após o preparo da solução para o gel de poliacrilamida a 8% (sempre na hora do uso a partir da solução “mãe” 19:1, já pronta) acrescentava-se uma alíquota dos catalisadores persulfato de amônio e TEMED. Então a solução era depositada com o uso de seringa (20 mL) sem agulha no sanduíche de placas (espessura de 0,5 cm para as placas pequenas e 0,2 cm para as placas grandes). A corrida era feita por quatro a seis horas, variando de acordo com o tamanho das placas de vidro, a 2000 V, 50 mA e 300 W. Após a corrida eletroforética o DNA passava por um processo de fixação em solução de água destilada contendo ácido acético por 15 min, e a seguir pelo processo de revelação das bandas através da coloração com solução de nitrato de prata e formaldeído por 10 min.

3.5. Eletroforese em gel de agarose a 3%

A cuba para eletroforese em gel de agarose horizontal media 20 x 25 cm e continha dois pentes, com 21 poços cada, distribuídos equidistantemente. Para visualização do alelos através da eletroforese em gel de agarose a 3% foram adicionados 12,5 µL de brometo de etídeo a 250 mL de solução de agarose ainda líquida. Após o resfriamento a 55°C o gel era inserido na cuba, para que depois da solidificação permitisse a aplicação do produto de PCR nos poços individuais. A corrida eletroforética durava de 60 a 90 minutos, variando de acordo com o marcador utilizado, a 250 V, 140 mA e 150 W. Após a corrida as bandas eram visualizadas no transiluminador através de raios ultravioleta. Utilizou-se um controle negativo (produto de PCR sem material genômico) e um controle positivo (produto de PCR conhecido das linhagens isogênicas LEW e SHR). Com esta técnica foram genotipados os animais das linhagens Floripa H e L das gerações S1 a S4 para todos os marcadores exceto D4RAT59, que apresentou polimorfismo alélico menor que 4 pb.

3.6. Análises estatísticas

3.6.1. Variação nas frequências alélicas da S0 a S4

A variação total da frequência de cada alelo candidato (alelos 1 para o marcador D4RAT59, 3 para o marcador D4MGH27, 1 para o marcador D7MGH11 e 2 para o marcador D7RAT35) por linhagem e marcador da S0 a S4 foi calculada da seguinte forma: $(\text{frequência do alelo na geração S4} - \text{frequência do alelo na geração S0}) \times 100 / \text{frequência do alelo na geração S0}$. Estas análises serviram para verificar se houve ganho ou perda na frequência de cada alelo candidato ao longo do processo seletivo em cada linhagem.

3.6.2. Teste para o Equilíbrio de *Hardy-Weinberg*

Para todas as gerações de seleção (S0 a S4) foram calculadas, a partir do número de indivíduos obtidos em cada classe genotípica, as frequências alélicas e o número esperado de indivíduos por classe genotípica, de acordo com a hipótese do equilíbrio de Hardy-Weinberg. A partir dos valores esperados, calculou-se então o qui-quadrado (χ^2) para estimar se cada geração estava ou não em equilíbrio. Visto que o número de animais investigados era bastante pequeno, com 4 graus de liberdade (GL) para D4RAT59 e 1 GL para os demais marcadores, para evitar possíveis erros estatísticos, comuns em amostras pequenas, o χ^2 foi calculado utilizando a correção de Yates ($\sum [(animais\ obtidos\ por\ classe\ genotípica - animais\ esperados\ por\ classe\ genotípica) - 0,5]^2 / animais\ esperados\ por\ classe\ genotípica)$ (disponível em Answers.com – Correção de Yates; Biometria – Qui Quadrado). Valores significativos de χ^2 indicavam que a geração em questão não obedecia ao princípio do equilíbrio.

A frequência de cada alelo (denominada “p”, “q” ou “r”, no caso de haver até três alelos) era dada pela fórmula: [(número de indivíduos homocigotos x 2) + (número de indivíduos heterocigotos)] / (número total de indivíduos x 2). A partir disso, os valores esperados em cada classe genotípica eram calculados da seguinte maneira. No caso dos marcadores com apenas dois alelos (D4MGH27, D7RAT35 e D7MGH11), o número esperado de indivíduos homocigotos era calculado através de p^2 e q^2 multiplicados pelo total de indivíduos daquela geração; enquanto que o número esperado de indivíduos heterocigotos era dado por $2pq$ x total de indivíduos. No caso de D4Rat59, que continha três alelos diferentes (com frequências “p”, “q” e “r”), o número esperado de indivíduos para cada classe genotípica era calculado através da fórmula $p^2 + 2pq + 2pr + q^2 + 2qr + r^2$, multiplicando-se sempre pelo número total de indivíduos em cada geração.

3.6.3. Teste do χ^2 de contingência para todas as gerações de seleção

O cálculo do χ^2 de contingência comparou os números de animais com cada genótipo nas gerações S0 até S4 para cada um dos marcadores utilizados, D4RAT59, D4MGH27, D7RAT35 e D7MGH11. Isto nos permitiu avaliar se houve alterações nas proporções genotípicas ao longo do processo seletivo. Caso tenha ocorrido alteração significativa ($p < 0,05$) durante o processo de seleção, pode-se sugerir que houve influência de deriva genética aleatória ou da seleção artificial (Falconer, 1987). Estas análises foram feitas separadamente para cada uma das linhagens.

Para encontrar o χ^2 para o marcador D4RAT59, utilizou-se uma Tabela de 5 linhas x 6 colunas com $GL = 20$. Para os demais marcadores, utilizou-se Tabelas de 5 linhas x 3 colunas com $GL = 8$. Para todos os marcadores utilizados, o cálculo dos valores esperados de cada geração usou a seguinte fórmula: (total da linha x total da coluna) / total geral. Cada linha corresponde a uma geração e cada coluna a um genótipo.

3.6.4. Análises de correlação e regressão

Foram feitas análises de regressão para a frequência de cada alelo candidato em cada uma das linhagens durante as cinco gerações de seleção, para confirmar se houve variação significativa e consistente na frequência alélica ao longo do tempo. Também foram realizadas análises de correlação entre a frequência de cada um dos alelos candidatos e a média de locomoção central no CA nas linhagens de ratos Floripa H e L ao longo das cinco gerações de seleção. Primeiramente, encontrou-se a frequência de cada alelo durante o processo seletivo (gerações S0 a S4) por linhagem. Depois foi calculada, para cada linhagem, a correlação de Pearson (r) entre a frequência do alelo

estudado e a locomoção central no teste do CA por geração de seleção. Os dados fenotípicos foram obtidos de experimentos realizados no laboratório entre 2000 e 2001.

Considerando que fenótipos comportamentais são fortemente influenciados pelo ambiente e sabidamente flutuam de experimento para experimento, mesmo mantendo-se o genótipo constante, nós realizamos uma outra análise de correlação baseada nas diferenças genóticas e fenotípicas entre as linhagens Floripa H e L a cada geração. Com isso, o efeito de flutuações sazonais no comportamento de nossas linhagens seria minimizado. Para se encontrar o delta (Δ) da frequência alélica entre as duas linhagens a cada geração, o valor encontrado para as frequências alélicas na linhagem H era subtraído do valor encontrado para as frequências alélicas na linhagem L. Desta forma, foi encontrado o valor referente à variação nas frequências dos alelos entre as duas linhagens selecionadas. Para o cálculo do Δ da média fenotípica entre as linhagens, subtraiu-se, por geração de seleção, a média da locomoção central no teste do CA na linhagem Floripa H da média deste comportamento na mesma geração para a linhagem Floripa L. Por fim fez-se a correlação entre o Δ da frequência alélica e o Δ fenotípico entre as linhagens ao longo das gerações. Em todas as análises de correlação utilizou-se o programa Statistica 7.0.

4. Resultados

4.1. Tamanho dos alelos

Para cada marcador, os tamanhos dos diversos alelos foram estimados de forma indireta, através das bandas obtidas em gel de poliacrilamida 8% em comparação com os tamanhos descritos para os alelos das linhagens que utilizamos como controle, LEW e SHR, obtidos na base de dados RGD (Rat Genome Database, disponível em <http://rgd.mcw.edu/>). Tal estimativa foi feita inicialmente na geração S0, que deu origem às linhagens Floripa, tendo como controle no mesmo gel os produtos PCR amplificados a partir de ratos LEW e SHR. Os alelos encontrados em cada marcador foram denominados de 1 a n, sendo 1 o menor alelo e n o maior, incluindo as linhagens controle. Exceto pelo marcador D4RAT59, onde encontramos três alelos na geração S0, todos os outros revelaram apenas dois alelos nesta mesma geração. Desta forma, os dados referentes aos alelos de cada marcador, na geração S0 bem como nas linhagens controle, estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Alelos encontrados para cada um dos marcadores utilizados em ratos da geração S0, que deu origem às linhagens Floripa H e L, e em ratos isogênicos das linhagens controle LEW e SHR.

Marcador	alelo 1	alelo 2	alelo 3	alelo 4
D4Rat59	168 pb (LEW e S0)	174 pb (SHR)	+ 174 pb (S0)	+ 174 pb (S0)
D4Mgh27	252 pb (SHR)	+ 252 pb (S0)	258 pb (LEW e S0)	
D7Rat35	121 pb (LEW e S0)	+ 121 pb (S0)	150 pb (SHR)	
D7Mgh11	140 pb (LEW e S0)	162 pb (SHR)	+ 162 pb (S0)	

Os alelos de 1 a 4 seguem uma ordem crescente de tamanho. Os tamanhos dos alelos das linhagens controle LEW e SHR estão especificados em pares de base (pb). Entre parênteses estão especificadas as populações nas quais cada alelo foi encontrado no presente estudo. Os alelos encontrados na geração S0 estão marcados em negrito. O sinal + indica que aquele alelo tem tamanho superior a um determinado número de pares de base encontrado nas linhagens controle. Todos os marcadores na geração S0 foram genotipados em gel de poliacrilamida 8%.

Como pode ser visto na Tabela 1, os alelos LEW, como esperado, apareceram na geração S0 para todos os marcadores, enquanto que os alelos SHR, analisados aqui apenas como controle de tamanho, não apareceram em nenhum marcador.

4.2.Linhagem Floripa H

4.2.1. Dados de genotipagem para D4RAT59

Os resultados genotípicos e as frequências alélicas, assim como os χ^2 para testar o equilíbrio de Hardy-Weinberg por geração de seleção para o marcador D4RAT59, para a linhagem Floripa H estão sumarizados na Tabela 2 e na Figura 2. Como pode ser observado na Figura 2, a frequência do alelo 1, a partir da geração S0, sofreu um acréscimo de 50,57% até a S4. Quando feita a análise de regressão da frequência do

alelo 1 ao longo do processo seletivo, obteve-se um resultado significativo ($p < 0,05$; $r^2 = 0,87$), indicando aumento da frequência ao longo do tempo. As gerações S0, S1 e S4 não apresentaram o número de animais esperado de acordo com Hardy-Weinberg, portanto não se encontravam em equilíbrio (Tabela 2). Quando calculado o χ^2 de contingência, para verificar se houve variação nas proporções genótípicas ao longo das gerações de seleção, de S0 a S4, como esperado, o χ^2 foi significativo (GL = 20; $\chi^2 = 37,88$; $p < 0,01$), indicando que as proporções não são as mesmas entre as gerações.

Tabela 2. Total de indivíduos por classe genotípica/fenotípica, frequências alélicas e teste do χ^2 para testar o equilíbrio de Hardy-Weinberg para cada geração para o marcador D4RAT59 no cromossomo 4 ao longo de 5 gerações da linhagem de ratos Floripa H.

Geração		Genótipos (N)						Freq. alélica			χ^2 (GL=4)
		1/1	1/3	1/4	3/3	3/4	4/4	1	3	4	
S0 N = 52	Obs	16	25	7	2	0	2	0,615	0,279	0,106	10,600*
	Esp	19,692	17,822	6,749	4,032	3,054	0,578				
S1 N = 25	Obs	6	8	9	2	0	0	0,580	0,240	0,180	8,720
	Esp	8,410	6,960	5,220	1,440	2,160	0,810				
S2 N = 16	Obs	9	4	3	0	0	0	0,781	0,125	0,094	7,430
	Esp	9,766	3,125	2,344	0,250	0,375	0,140				
S3 N = 10	Obs	6	3	1	0	0	0	0,800	0,150	0,050	16,420*
	Esp	6,400	2,400	0,800	0,225	0,150	0,025				
S4 N = 27	Obs	23	3	1	0	0	0	0,926	0,055	0,019	38,050*
	Esp	23,149	2,778	0,925	0,083	0,056	0,009				

Geração: gerações de seleção da S0 a S4 da linhagem Floripa H. N: número total de animais na geração analisada para o marcador D4RAT59. Observado: número de animais encontrados por classe genotípica por geração de seleção. Esperado: número de animais esperados por Hardy-Weinberg por classe genotípica e geração de seleção. Genótipos (N): animais por geração que apresentaram cada um dos seis genótipos possíveis. Freq. alélica: frequência de cada alelo encontrado por geração de seleção. χ^2 : qui-quadrado obtido por geração de seleção de acordo com o esperado por Hardy-Weinberg. GL: graus de liberdade.

* χ^2 significativo ($p < 0,05$).

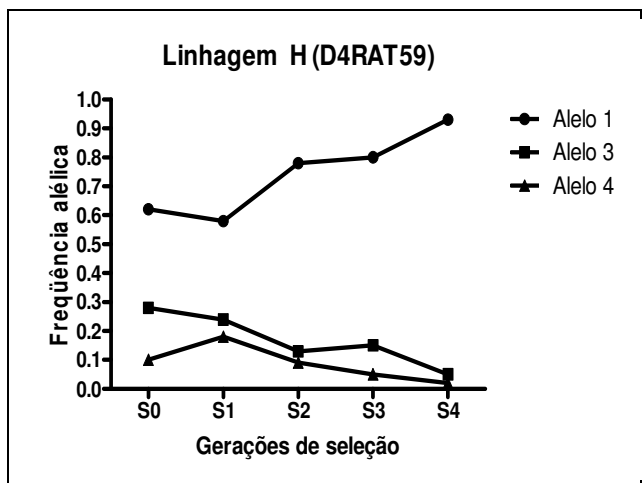


Figura 2. Frequências alélicas por geração de seleção da linhagem de ratos Floripa H para o marcador D4RAT59, no cromossomo 4.

4.2.2. Dados de genotipagem para D4MGH27

Os resultados genotípicos e as frequências alélicas, assim como os χ^2 para testar o equilíbrio de Hardy-Weinberg por geração de seleção para o marcador D4MGH27 para a linhagem de ratos Floripa H estão sumarizados na Tabela 3 e na Figura 3. Como pode ser observado na Figura 3, a frequência do alelo 3, a partir da geração S0, sofreu um acréscimo de 61,09% até a S4. Quando feita a análise de regressão da frequência do alelo 3 ao longo do processo seletivo o resultado obtido foi significativo, assim como para D4RAT59, ($p = 0,05$; $r^2 = 0,80$), indicando um aumento da frequência ao longo da seleção. As gerações S2 e S4 não se encontravam em equilíbrio (Tabela 3). O χ^2 de contingência foi altamente significativo ($GL = 8$, $\chi^2 = 34,91$ e $p < 0,001$), assim como ocorreu para D4RAT59, ambos localizados no cromossomo 4.

Tabela 3. Total de indivíduos por classe genotípica/fenotípica, frequências alélicas e teste do χ^2 para testar o equilíbrio de Hardy-Weinberg para cada geração para o marcador D4MGH27 no cromossomo 4 ao longo de 5 gerações da linhagem de ratos Floripa H.

Geração		Genótipos (N)			Freq. alélica		χ^2 (GL=1)
		2/2	2/3	3/3	2	3	
S0 N = 52	Observado	8	27	17	0,414	0,586	0,376
	Esperado	8,891	25,221	17,888			
S1 N = 25	Observado	3	7	15	0,260	0,740	1,450
	Esperado	1,690	9,620	13,690			
S2 N = 16	Observado	0	2	14	0,063	0,938	5,160*
	Esperado	0,063	1,875	14,062			
S3 N = 10	Observado	0	2	8	0,100	0,900	3,694
	Esperado	0,100	1,800	8,100			
S4 N = 27	Observado	0	3	24	0,056	0,944	4,148*
	Esperado	0,083	2,833	24,084			

Geração: gerações de seleção da S0 a S4 da linhagem Floripa H. N: número total de animais na geração analisada para o marcador D4MGH27. Observado: número de animais encontrados por classe genotípica por geração de seleção. Esperado: número de animais esperados por Hardy-Weinberg por classe genotípica e geração de seleção. Genótipos (N): animais por geração que apresentaram cada um dos seis genótipos possíveis. Freq. alélica: frequência de cada alelo encontrado por geração de seleção. χ^2 : qui-quadrado obtido por geração de seleção de acordo com o esperado por Hardy-Weinberg. GL: graus de liberdade.

* χ^2 significativo ($p < 0,05$).

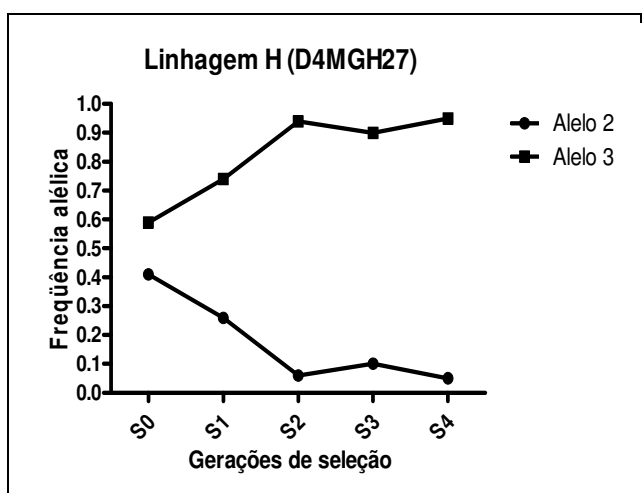


Figura 3. Frequências alélicas por geração de seleção da linhagem de ratos Floripa H para o marcador D4MGH27, no cromossomo 4.

4.2.3. Dados de genotipagem para D7MGH11

Os resultados genotípicos e as frequências alélicas, assim como os qui-quadrado para testar o equilíbrio de Hardy-Weinberg por geração de seleção para o marcador D7MGH11 para a linhagem de ratos Floripa H estão sumarizados na Tabela 4 e na Figura 4. Como pode ser observado na Figura 4, a frequência do alelo 1 diminuiu 3,66% durante o processo seletivo. Quando feita a análise de regressão da frequência do alelo 1 ao longo do processo seletivo o resultado não foi significativo ($p > 0,05$; $r^2 = 0,14$). As gerações S1 e S3 apresentaram variação significativa em relação às frequências de equilíbrio (Tabela 4), portanto, estas duas gerações de seleção não se mantiveram em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Quando calculado o χ^2 de contingência, este foi altamente significativo (GL = 8; $\chi^2 = 48,84$; $p < 0,001$).

Tabela 4. Total de indivíduos por classes genotípica/fenotípica, frequências genóticas e alélicas e teste do χ^2 para testar o equilíbrio de Hardy-Weinberg para cada geração para os marcadores D7MGH11 e D7RAT35 do cromossomo 7 ao longo de 5 gerações da linhagem de ratos Floripa H.

Geração		D7MGH11			Freq. alélica		χ^2 (GL=1)	D7RAT35			Freq. alélica		χ^2 (GL=1)
		Genótipos (N)			1	3		Genótipos (N %)			1	2	
		1/1	1/3	3/3				1/1	1/2	2/2			
S0	Observado	23	22	7	0,654	0,346	0,195	21	24	7	0,635	0,365	0,053
N = 52	Esperado	22,228	23,540	6,232				20,941	24,116	6,943			
S1	Observado	12	6	7	0,600	0,400	5,778*	14	9	2	0,740	0,260	0,150
N = 25	Esperado	9,000	12,000	4,000				13,690	9,620	1,690			
S2	Observado	1	9	6	0,344	0,656	1,531	4	8	4	0,500	0,500	0,156
N = 16	Esperado	1,891	7,219	6,890				4,000	8,000	4,000			
S3	Observado	1	0	9	0,100	0,900	4,559*	0	9	1	0,450	0,550	7,802*
N = 10	Esperado	0,100	1,800	8,100				2,025	4,950	3,025			
S4	Observado	13	8	6	0,630	0,370	3,232	7	13	7	0,500	0,500	0,093
N = 27	Esperado	10,703	12,593	3,704				6,750	13,500	6,750			

* χ^2 significativo ($p < 0,05$).

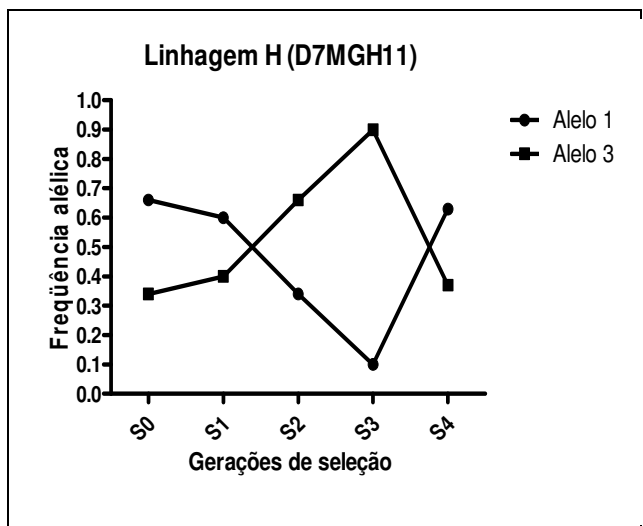


Figura 4. Frequências alélicas por geração de seleção da linhagem de ratos Floripa H para o marcador D7MGH11, no cromossomo 7.

4.2.4. Dados de genotipagem para D7RAT35

Os resultados genotípicos e as frequências alélicas, assim como os qui-quadrados para testar o equilíbrio de *Hardy-Weinberg* por geração de seleção para o marcador D7RAT35 para a linhagem de ratos Floripa H estão sumarizados na Tabela 4 e na Figura 5. Como pode ser observado na Figura 5, a frequência do alelo 2 teve um acréscimo de 36,99% durante o processo seletivo. Quando feita a análise de regressão da frequência do alelo 1 ao longo do processo seletivo o resultado não foi significativo ($p > 0,05$; $r^2 = 0,56$). Quando calculado o χ^2 para testar o equilíbrio de *Hardy-Weinberg*, observa-se que na geração S3 este foi significativo (Tabela 4). Portanto, nesta geração, não se manteve o equilíbrio de Hardy-Weinberg. O χ^2 de contingência encontrado não foi significativo (GL = 8; $\chi^2 = 14,06$; $0,10 > p > 0,05$).

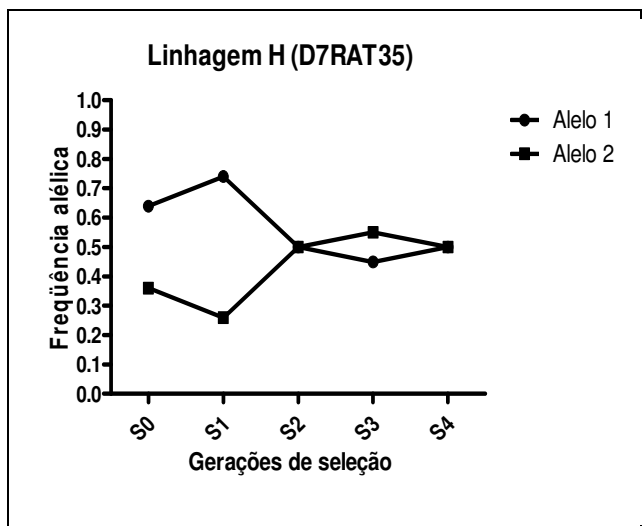


Figura 5. Frequências alélicas por geração de seleção da linhagem de ratos Floripa H para o marcador D7RAT35, no cromossomo 7.

4.2.5. Correlação entre frequência alélica e locomoção central

Foi calculada a correlação entre a locomoção central da linhagem H ao longo das gerações e as frequências do alelo 1 para o marcador D4RAT59 e do alelo 3 para o marcador D4MGH27, ambos dentro do intervalo de confiança do QTL *Ofil1* (Figura 6), e as frequências do alelo 1 para o marcador D7MGH11 e do alelo 2 para o marcador D7RAT35 (Figura 7), dentro do intervalo de confiança do QTL *Ofil2*. Estes alelos foram escolhidos com base nas evidências que apontam para a mais provável relação na variação das frequências destes alelos com a variação do traço fenotípico entre as gerações de seleção. Para os marcadores no cromossomo 4 (Figura 6), não foi encontrada nenhuma correlação significativa ($r = 0,60$ e $p = 0,28$ para D4RAT59; $r = 0,17$ e $p = 0,78$ para D4MGH27). Também para os marcadores localizados no cromossomo 7 (Figura 7) não foi encontrada nenhuma correlação entre o fenótipo e as frequências alélicas ($r = 0,46$ e $p = 0,44$ para D7MGH11; $r = 0,23$ e $p = 0,71$ para D7RAT35).

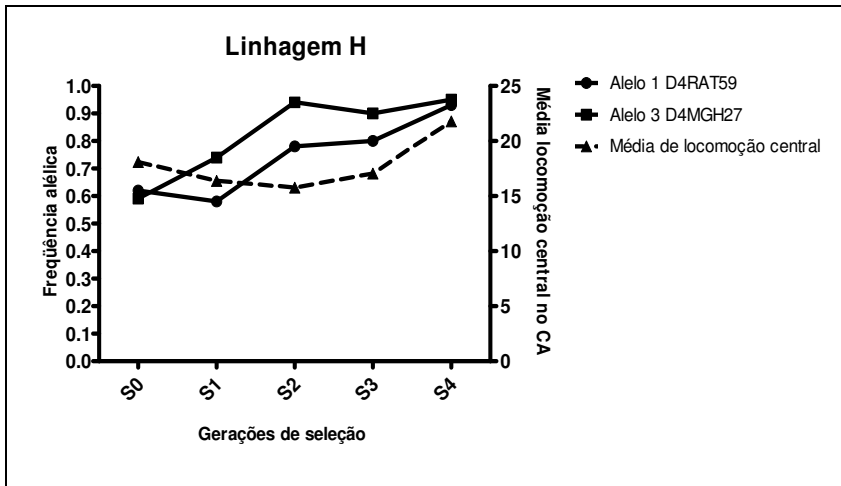


Figura 6. Frequência do alelo 1 para o marcador D4RAT59 e do alelo 3 para o marcador D4MGH27, ambos no cromossomo 4, em comparação com a média de locomoção central nas gerações de seleção da linhagem de ratos Floripa H.

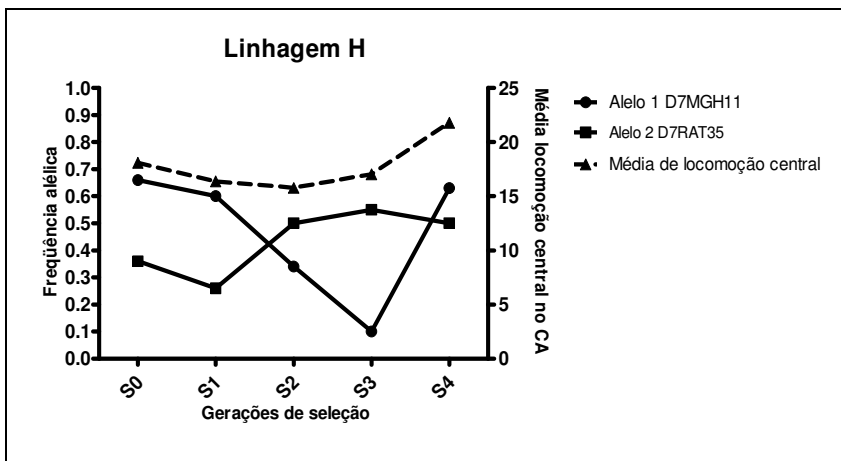


Figura 7. Frequência do alelo 1 para o marcador D7MGH11 e do alelo 2 para o marcador D7RAT35, ambos no cromossomo 7, em comparação com a média da locomoção central nas gerações de seleção da linhagem de ratos Floripa H.

4.3. Linhagem Floripa L

4.3.1. Dados de genotipagem para D4RAT59

Os resultados genotípicos e as frequências alélicas, assim como os qui-quadrado para testar o equilíbrio de Hardy-Weinberg por geração de seleção para o marcador D4RAT59 para a linhagem de ratos Floripa L estão sumarizados na Tabela 5 e na Figura 8. Como pode ser observado na Figura 8, a frequência do alelo 1, a partir da geração S0, diminuiu 39,84% até a S4. Quando feita a análise de regressão da frequência do alelo 1 ao longo do processo seletivo o resultado obtido não foi significativo ($p = 0,14$; $r^2 = 0,57$), diferente do que ocorreu para este marcador na linhagem H. Quando calculado o χ^2 para o equilíbrio de Hardy-Weinberg por geração, observamos que nas gerações S0, S3 e S4, o χ^2 foi significativo (Tabela 5). Portanto estas três gerações não estavam em equilíbrio. Quando calculado o χ^2 de contingência, o mesmo foi altamente significativo (GL = 20; $\chi^2 = 83,00$; $p < 0,001$).

Tabela 5. Total de indivíduos por classe genotípica/fenotípica, frequências genotípicas e alélicas e teste do χ^2 para testar o equilíbrio de Hardy-Weinberg para cada geração para o marcador D4RAT59 no cromossomo 4 ao longo de 5 gerações da linhagem Floripa L .

Geração		Genótipos (N %)						Freq. alélica			χ^2 (GL=4)
		1/1	1/3	1/4	3/3	3/4	4/4	1	3	4	
S0 N = 52	Observado	16	25	7	2	0	2	0,615	0,279	0,106	10,583 *
	Esperado	19,690	17,845	6,792	4,043	3,067	0,581				
S1 N = 34	Observado	10	12	5	2	5	0	0,542	0,309	0,148	3,834
	Esperado	9,989	11,390	5,456	3,247	3,110	0,745				
S2 N = 26	Observado	11	8	2	4	0	1	0,615	0,308	0,0769	4,629
	Esperado	9,846	9,846	2,462	2,462	1,231	0,154				
S3 N = 10	Observado	1	5	4	0	0	0	0,550	0,250	0,200	10,289*
	Esperado	3,025	2,750	2,200	0,625	1,000	0,400				
S4 N = 23	Observado	5	5	2	6	0	5	0,370	0,370	0,260	16,451*
	Esperado	3,1412	6,284	4,435	3,141	4,435	1,565				

Geração: gerações de seleção da S0 a S4 da linhagem Floripa L. N: número total de animais na geração analisada para o marcador D4RAT59. Observado: número de animais encontrados por classe genotípica por geração de seleção. Esperado: número de animais esperados por Hardy-Weinberg por classe genotípica e geração de seleção. Genótipos (N): animais por geração que apresentaram cada um dos seis genótipos possíveis. Freq. alélica: frequência de cada alelo encontrado por geração de seleção. χ^2 : qui-quadrado obtido por geração de seleção de acordo com o esperado por Hardy-Weinberg. GL: graus de liberdade.

* χ^2 significativo (p < 0,05)

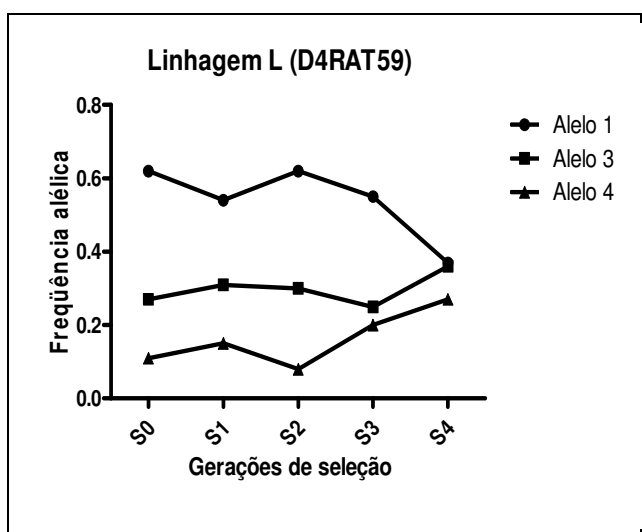


Figura 8. Frequências alélicas por gerações de seleção da linhagem de ratos Floripa L para o marcador D4RAT59, no cromossomo 4.

4.3.2. Dados de genotipagem para D4MGH27

Os resultados genotípicos e as frequências alélicas, assim como o χ^2 para testar o equilíbrio de Hardy-Weinberg por geração de seleção para o marcador D4MGH27 para a linhagem de ratos Floripa L estão sumarizados na Tabela 6 e na Figura 9. Como pode ser observado na Figura 9, a frequência do alelo 3, a partir da geração S₀, diminuiu 33,39% até a S₄. Quando feita a análise de regressão da frequência do alelo 3 ao longo do processo seletivo o resultado obtido foi, assim como para a linhagem H, altamente significativo ($p = 0,02$; $r^2 = 0,86$), sugerindo uma variação gradual e consistente nas frequências alélicas ao longo das gerações. O χ^2 calculado para testar o equilíbrio de Hardy-Weinberg foi significativo na geração S₄ (Tabela 6). O χ^2 de contingência foi significativo (GL = 8; $\chi^2 = 19,96$; $p < 0,02$). Os resultados sugerem uma possível relação entre as variações nas frequências dos alelos candidatos para os marcadores no cromossomo 4 nas linhagens H e L e o processo seletivo.

Tabela 6. Total de indivíduos por classe genotípica/fenotípica, frequências genotípicas e alélicas e teste do χ^2 para testar o equilíbrio de Hardy-Weinberg para cada geração para o marcador D4MGH27 no cromossomo 4 ao longo de 5 gerações da linhagem L.

Geração		Genótipos (N %)			Freq. alélica		χ^2 (GL=1)
		2/2	2/3	3/3	2	3	
S0 N = 52	Observado	8	27	17	0,413	0,587	0,399
	Esperado	8,889	25,221	17,890			
S1 N = 34	Observado	6	19	9	0,456	0,544	0,749
	Esperado	7,066	16,868	10,066			
S2 N = 26	Observado	10	9	7	0,558	0,442	2,099
	Esperado	8,086	12,827	5,087			
S3 N = 10	Observado	5	3	2	0,650	0,350	1,003
	Esperado	4,225	4,550	1,225			
S4 N = 23	Observado	6	16	1	0,609	0,391	5,548*
	Esperado	8,522	10,956	3,522			

Geração: gerações de seleção da S0 a S4 da linhagem Floripa L. N: número total de animais na geração analisada para o marcador D4MGH27. Observado: número de animais encontrados por classe genotípica por geração de seleção. Esperado: número de animais esperados por Hardy-Weinberg por classe genotípica e geração de seleção. Genótipos (N): animais por geração que apresentaram cada um dos seis genótipos possíveis. Freq. alélica: frequência de cada alelo encontrado por geração de seleção. χ^2 : qui-quadrado obtido por geração de seleção de acordo com o esperado por Hardy-Weinberg. GL: graus de liberdade.

* χ^2 significativo ($p < 0,05$)

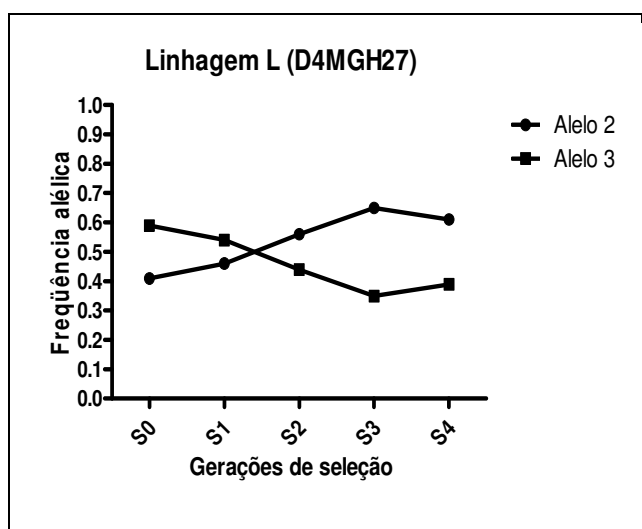


Figura 9. Frequências alélicas por geração de seleção da linhagem de ratos Floripa L para o marcador D4MGH27, no cromossomo 4.

4.3.3. Dados de genotipagem para D7MGH11

Os resultados genotípicos e as frequências alélicas, assim como o χ^2 para testar o equilíbrio de Hardy-Weinberg por geração de seleção para o marcador D7MGH11 para a linhagem de ratos Floripa L estão sumarizados na Tabela 7 e na Figura 10. Como pode ser observado na Figura 10, a frequência do alelo 1 diminuiu 23,55 % durante a seleção. Porém quando feita a análise de regressão da frequência do alelo 1 ao longo do processo seletivo o resultado não foi significativo ($p = 0,93$; $r^2 = 0,01$). O χ^2 calculado para testar o equilíbrio de Hardy-Weinberg foi significativo nas gerações S1 e S4 (Tabela 7). O χ^2 de contingência foi altamente significativo (GL = 8; $\chi^2 = 28,57$; $p < 0,001$). Os resultados sugerem uma variação aleatória na frequência do alelo 1 para D7MGH11 em ambas linhagens estudadas, provavelmente resultado de uma maior influência de deriva genética.

Tabela 7. Total de indivíduos por classe genotípica/fenotípica, frequências genotípicas e alélicas e teste do χ^2 para testar o equilíbrio de Hardy-Weinberg para cada geração para os marcadores D7MGH11 e D7RAT35 do cromossomo 7 ao longo de 5 gerações da linhagem L.

		D7MGH11			D7RAT35			D7MGH11			D7RAT35		
		Genótipos (N %)			Freq. alélica			Genótipos (N %)			Freq. alélica		
Geração		1/1	1/3	3/3	1	3	χ^2 (GL=1)	1/1	1/2	2/2	1	2	χ^2 (GL=1)
S0 N= 52	Observado	23	22	7	0,654	0,346	0,191	21	24	7	0,635	0,365	0,053
	Esperado	22,231	23,538	6,231				20,942	24,116	6,942			
S1 N= 34	Observado	4	24	6	0,471	0,529	6,399*	10	22	2	0,618	0,382	5,196*
	Esperado	7,529	16,941	9,530				12,971	16,059	4,970			
S2 N= 26	Observado	14	9	3	0,712	0,288	0,501	16	7	3	0,750	0,250	1,607
	Esperado	13,181	10,663	2,157				14,625	9,750	1,625			
S3 N= 10	Observado	7	3	0	0,850	0,150	2,410	4	6	0	0,700	0,300	2,980
	Esperado	7,225	2,550	0,225				4,900	4,200	0,900			
S4 N= 23	Observado	9	5	9	0,500	0,500	4,609*	8	15	0	0,674	0,326	5,900*
	Esperado	5,750	11,500	5,750				10,446	10,109	2,445			
* χ^2 significativo		p < 0,05											

Geração: gerações de seleção da S0 a S4 da linhagem Floripa L. N: número total de animais na geração analisada para os marcadores D7MGH11 e D7RAT35. Observado: número de animais encontrados por classe genotípica por geração de seleção. Esperado: número de animais esperados por Hardy-Weinberg por classe genotípica e geração de seleção. Genótipos (N): animais por geração que apresentaram cada um dos seis genótipos possíveis. Freq. alélica: frequência de cada alelo encontrado por geração de seleção. χ^2 : qui-quadrado obtido por geração de seleção de acordo com o esperado por Hardy-Weinberg. GL: graus de liberdade.

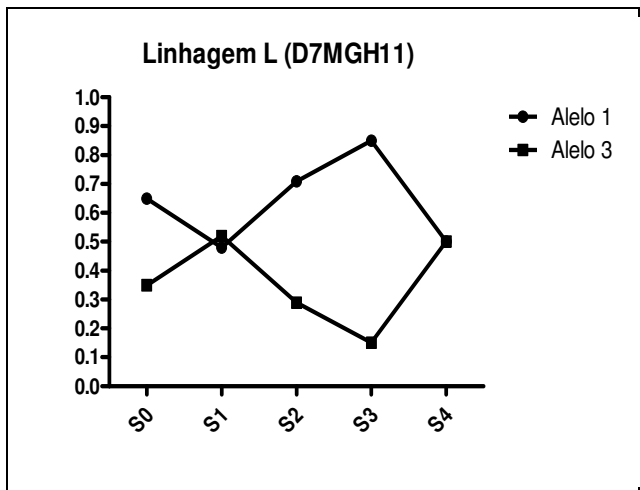


Figura 10. Frequências alélicas por geração de seleção da linhagem de ratos Floripa L para o marcador D7MGH11, no cromossomo 7.

4.3.4. Dados de genotipagem para D7RAT35

Os resultados genotípicos e as frequências alélicas, assim como os qui-quadrado para testar o equilíbrio de Hardy-Weinberg por geração de seleção para o marcador D7RAT35 para a linhagem de ratos Floripa L estão sumarizados na Tabela 7 e na Figura 11. Como pode ser observado na Figura 11, a frequência do alelo 2 teve um decréscimo de 10,69% durante o processo seletivo. Quando feita a análise de regressão da frequência do alelo 1 ao longo do processo seletivo o resultado não foi significativo ($p = 0,46$; $r^2 = 0,19$). O χ^2 calculado para testar o equilíbrio de Hardy-Weinberg só foi significativo para as gerações S1 e S4 (Tabela 7). O χ^2 de contingência não foi significativo (GL = 20; $\chi^2 = 16,12$; $p > 0,70$). Os resultados sugerem variação suave e aleatória nas frequências dos alelos candidatos no cromossomo 7, talvez resultado de deriva genética, porém sem descartar um pequeno efeito de seleção.

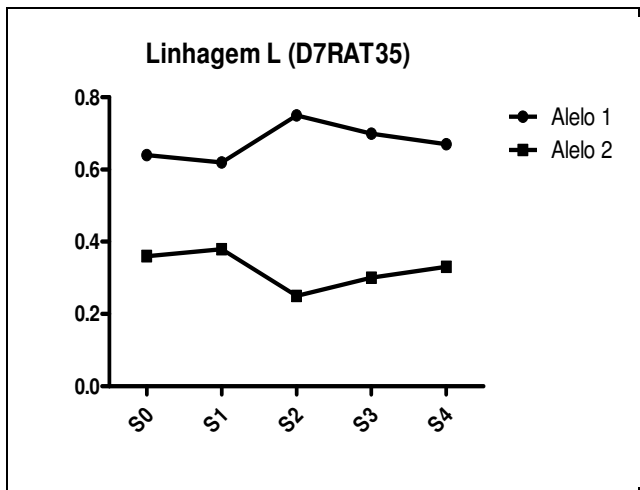


Figura 11. Frequências alélicas por geração de seleção da linhagem de ratos Floripa L para o marcador D7RAT35, no cromossomo 7.

4.3.5. Correlação entre frequência alélica e locomoção central

Foi calculada a correlação entre a locomoção central da linhagem L ao longo das gerações e a frequência do alelo 1 para o marcador D4RAT59 e do alelo 3 para o marcador D4MGH27 para o QTL *Ofil1* e a frequência dos alelos 1 para o marcador D7MGH11 e 2 para o marcador D7RAT35 para o QTL *Ofil2*. Procedeu-se desta maneira porquê estes alelos apresentaram variação mais semelhante às variações do traço fenotípico selecionado (Figuras 12 e 13). Para nenhum dos alelos analisados foi encontrada correlação significativa com o fenótipo comportamental ($r = 0,56$ e $p = 0,33$ para D4RAT59; $r = 0,60$ e $p = 0,28$ para D4MGH27; $r = 0,23$ e $p = 0,70$ para D7MGH11; $r = 0,57$ e $p = 0,31$ para D7RAT35).

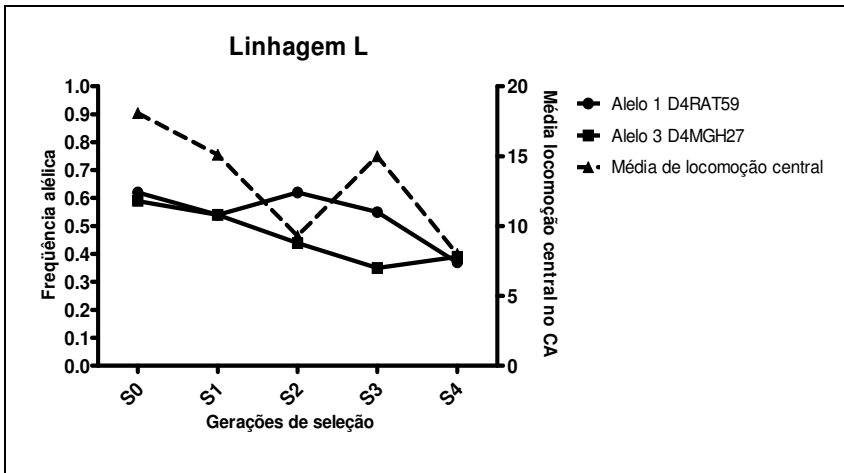


Figura 12. Frequência do alelo 1 para o marcador D4RAT59 e do alelo 3 para o marcador D4MGH27, ambos no cromossomo 4 em comparação com a média de locomoção central nas gerações de seleção da linhagem de ratos Floripa L.

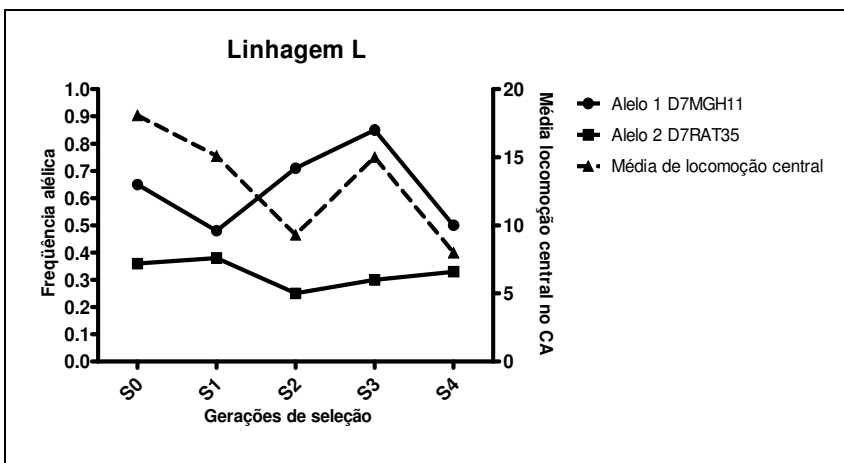


Figura 13. Frequência do alelo 1 para o marcador D7MGH11 e do alelo 2 para o marcador D7RAT35, ambos no cromossomo 7, em comparação com a média da locomoção central nas gerações de seleção da linhagem de ratos Floripa L.

4.4. Correlação entre a variação das freqüências alélicas e a variação da locomoção central entre as linhagens Floripa H e Floripa L

Quando analisamos as diferenças interlinhagens nas freqüências do alelo 1 para o marcador D4RAT59 e do alelo 3 para o marcador D4MGH27, vemos que houve uma divergência gradual e consistente entre as linhagens, durante o processo seletivo (Figuras 14 e 15). Por esta alteração nas freqüências alélicas ser compatível com a hipótese de associação entre o *locus Ofill* e o comportamento usado como critério de seleção, apesar de nenhuma das análises de correlação anteriores, realizadas separadamente para cada linhagem, ter se mostrado significativa, analisou-se a correlação entre o Δ das freqüências para cada um dos alelos entre as linhagens e o Δ da locomoção central no teste do CA por geração, também entre as linhagens. O único marcador cuja variação apresentou correlação significativa com a variação fenotípica foi D4RAT59 (o alelo 1 deste marcador) ($r = 0,91$ e $p = 0,03$) (Figura 16). Os demais marcadores não apresentaram correlação significativa com o fenótipo.

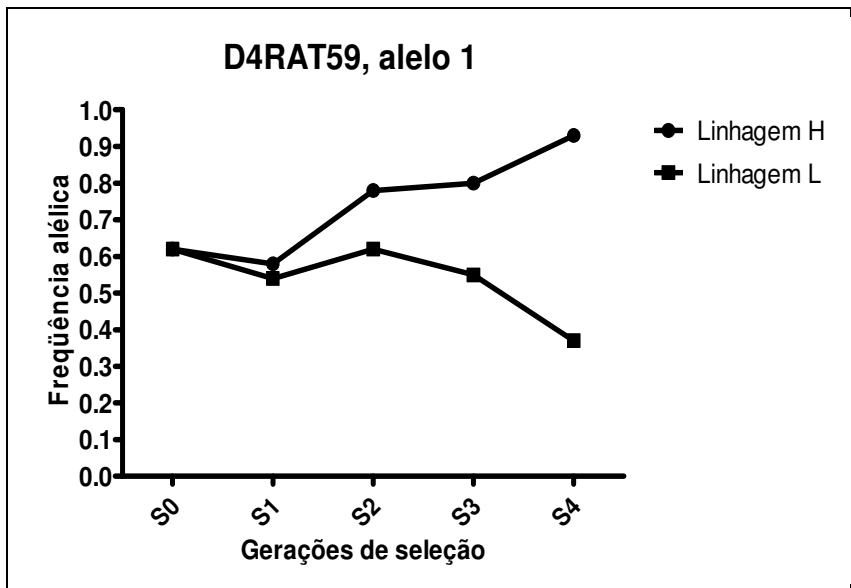


Figura 14. Frequências do alelo 1 para o marcador D4RAT59 no cromossomo 4 nas gerações de seleção para as linhagens Floripa H e Floripa L.

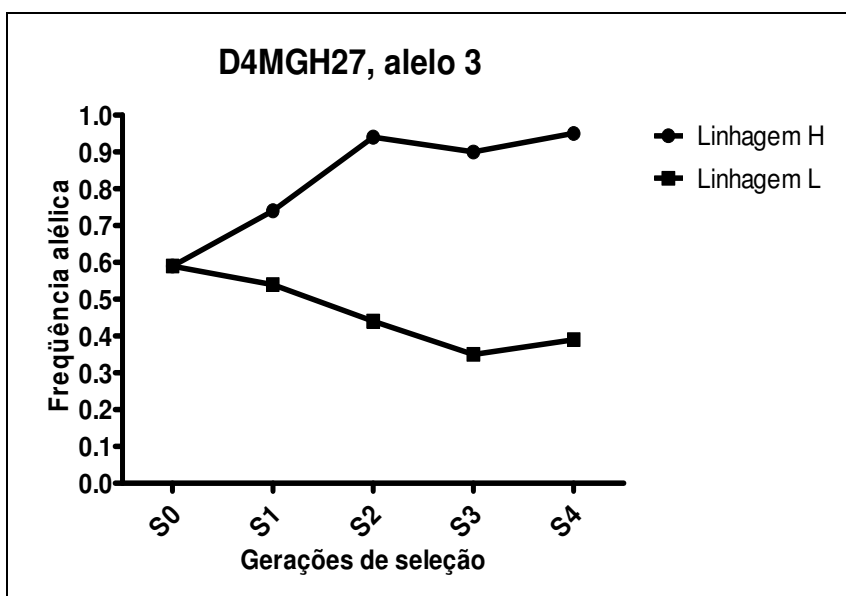


Figura 15. Frequências do alelo 3 para o marcador D4MGH27 no cromossomo 4 nas gerações de seleção para as linhagens Floripa H e Floripa L.

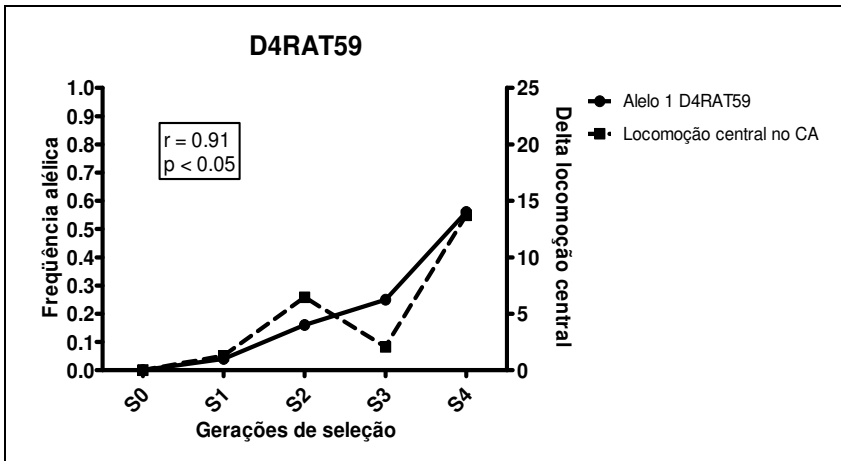


Figura 16. Delta interlinhagens (L - H) para a locomoção central no teste do CA e para as frequências do alelo 1 de D4RAT59 ao longo das cinco gerações de seleção das linhagens Floripa H e Floripa L.

5. Discussão

O principal objetivo deste trabalho foi investigar experimentalmente a influência dos QTLs *Ofill* e *Ofil2* para emocionalidade em ratos, previamente identificados em linhagens isogênicas não-selecionadas (Ramos *et al.*, 1999), em um outro modelo animal desenvolvido através de seleção bidirecional para locomoção central no teste do CA, um comportamento relacionado à ansiedade/emocionalidade (Ramos *et al.*, 2003). O modelo animal em estudo, os ratos das linhagens Floripa H e Floripa L, foram selecionados a partir de uma geração formada por descendentes de três linhagens diferentes, entre elas uma isogênica (LEW) e duas heterogêneas (Hooded e Wistar), usadas para produzir a geração inicial S0 (Ramos *et al.*, 2003). Portanto, os QTLs identificados a partir das linhagens LEW e SHR (Ramos *et al.*, 1999) não teriam necessariamente relevância em ratos das linhagens Floripa.

Como as linhagens que deram origem aos ratos das linhagens Floripa H e L não foram previamente comparadas em termos genotípicos, não se sabia se elas apresentariam ou não polimorfismos genéticos em relação aos marcadores investigados ou ao(s) gene(s) potencialmente envolvidos. Outros marcadores para os dois QTLs, não citados neste trabalho, foram inicialmente utilizados, mas não se mostraram polimórficos. Os marcadores moleculares que apresentaram polimorfismo no cromossomo 4 foram D4RAT59 e D4MGH27 e, no cromossomo 7, foram D7MGH11 e D7RAT35. Os dois primeiros flanqueiam o pico do QTL *Ofill*, enquanto os dois últimos flanqueiam o pico do QTL *Ofil2* (ver Ramos *et al.*, 1999). Os principais trabalhos de seleção para comportamento, utilizados como referência para nossas análises (Koundaurova *et al.*, 2006; Buck *et al.*, 1997), iniciaram os seus processos seletivos com o uso de linhagens parentais isogênicas, polimórficas entre si e

divergentes para os QTLs estudados. Tal estratégia é mais simples e mais facilmente interpretável do que a utilizada no presente trabalho, que, por limitações práticas na época, lançou mão de linhagens que nunca haviam sido comparadas genotípica ou fenotipicamente.

Com o interesse de estabelecer possíveis relações entre estas duas regiões genômicas (*Ofil1* e *Ofil2*) com comportamentos relacionados à ansiedade nas linhagens Floripa, foi aplicado o teste do χ^2 para testar se cada geração de seleção, individualmente por marcador, encontrava-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Desta forma, poderia se avaliar se as frequências alélicas e genotípicas sofreram alterações significativas durante o processo seletivo, como seria esperado caso a seleção imposta exercesse uma ação sobre os genes localizados nas duas regiões cromossômicas monitoradas. O cálculo do χ^2 para testar o equilíbrio de Hardy-Weinberg também foi uma ferramenta estatística utilizada por Kondaurova *et al.* (2006) após o processo seletivo para extremos de catalepsia em camundongos. Também com o intuito de verificar se houve alterações genotípicas significativas ao longo do processo seletivo, foi calculado para o conjunto das gerações de seleção, para cada marcador, o χ^2 de contingência. Quando este χ^2 é significativo, pode-se sugerir que houve influência do processo seletivo, ou ao menos de deriva genética aleatória, sobre os genótipos das regiões estudadas.

Procurando-se avaliar a correlação dos genótipos com o fenótipo selecionado, utilizou-se a análise de correlação entre a média do fenótipo, por geração e por linhagem, e as respectivas frequências alélicas. Visto que o alelo 1 para o marcador D4RAT59 e o alelo 3 para o marcador D4MGH27 apresentaram uma divergência durante o processo de seleção, mas que esta divergência não foi confirmada claramente por nenhuma das análises preliminares realizadas, foi calculada ainda a correlação entre

o Δ das frequências alélicas entre as linhagens selecionadas e a variação da atividade locomotora central no teste do CA entre as mesmas linhagens. Este procedimento foi adotado na tentativa de se minimizar o efeito do ambiente, que variou em termos de estação do ano, experimentador (que não foi o mesmo em todos os testes) e outros fatores ambientais que não foram possíveis de controlar. Tais efeitos podem ter influenciado os resultados comportamentais de forma independente do genótipo, fazendo-os flutuar ao longo das gerações, tanto na linhagem H quanto na L (Izídio *et al.*, 2005; Jones; Jones, 2007).

Partindo do princípio de que os fatores que alteram as frequências alélicas em uma população são mutação, migração, seleção e deriva genética aleatória, para saber quais eventos podem estar atuando nas gerações de cada linhagem estudada, desconsidera-se o efeito de mutações, visto que foram analisadas poucas gerações de seleção. Desconsidera-se também o efeito de migração por tratar-se de populações fechadas e isoladas. No entanto, aceita-se a influência de deriva genética, que são mudanças aleatórias nas frequências alélicas em populações pequenas, onde os alelos que aparecem na prole não são uma amostra perfeitamente representativa dos genes parentais (Falconer, 1987). Por outro lado, a seleção artificial também deve causar alteração nas frequências alélicas e genotípicas de genes e de regiões genômicas relevantes para o traço selecionado, devido ao cruzamento preferencial entre fenótipos semelhantes. O acasalamento não aleatório deve mudar as frequências dos genes especificamente envolvidos (Futuyma, 1997, p. 216) e, conseqüentemente, dos marcadores polimórficos localizados na vizinhança destes genes. Ou seja, animais usados na reprodução seletiva como progenitores, tendem a deixar para a progênie aqueles alelos que provavelmente estão relacionados à característica selecionada. Portanto, no presente trabalho, considerou-se como possíveis fatores atuantes nos

genótipos das populações estudadas, em ambas linhagens, a seleção e a deriva genética (Falconer, 1987).

Quanto ao QTL *Ofill* no cromossomo 4, quando avaliada a variação nas frequências dos alelos candidatos para os marcadores D4RAT59 e D4MGH27, a partir da geração S0 à S4, foi obtida uma variação significativa, gradual e divergente entre as linhagens. O alelo 1 para o primeiro marcador e o alelo 3 para o segundo aumentaram suas frequências na linhagem H enquanto diminuíram na linhagem L. Sendo que, com exceção do alelo 1 para D4RAT59 em Floripa L, todos os demais candidatos apresentaram um coeficiente de regressão significativo ao longo do processo seletivo, sugerindo a influência destes alelos no traço selecionado nas linhagens Floripa H e L.

Também foi observado, para o marcador D4RAT59, que as gerações S1, S3 e S4 em ambas as linhagens, não se encontravam em equilíbrio de Hardy-Weinberg, ou seja, nestas gerações de seleção, houve uma alteração significativa nas frequências genotípicas obtidas em relação às esperadas. Resultado semelhante para um marcador no cromossomo 13 de camundongos foi encontrado por Koundaurova *et al.* (2006), onde os autores observaram alterações nos genótipos das duas primeiras gerações de seleção, para catalepsia em camundongos, através do teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg, sugerindo influência simultânea do processo seletivo sobre o fenótipo e o genótipo da região estudada.

Quando calculado o χ^2 de contingência para os marcadores utilizados próximos à *Ofill*, comparando-se da primeira à última geração, observou-se que as duas linhagens sofreram alterações significativas nas suas frequências genotípicas, sugerindo que ao longo do processo seletivo, baseado em um comportamento relacionado à ansiedade, ocorreram alterações significativas nas frequências genotípicas. Quando calculamos a correlação entre o Δ das frequências alélicas para *Ofill* e o Δ do fenótipo selecionado,

entre as duas linhagens estudadas, o alelo 1 para o marcador D4RAT59 apresentou correlação significativa com o comportamento selecionado de forma divergente nas linhagens H e L.

De acordo com as evidências obtidas através dos resultados para os marcadores no cromossomo 4 no presente trabalho, pode-se sugerir o a influência da seleção artificial nas alterações genotípicas observadas em Floripa H e L na região do QTL *Ofil1*. Ou seja, *Ofil1* deve estar correlacionado à locomoção central no CA, um comportamento relacionado à ansiedade.

Em relação ao QTL *Ofil2* no cromossomo 7, a linhagem Floripa H apresentou variação entre o número de indivíduos obtidos e esperados por genótipo, de acordo com a hipótese de equilíbrio para o marcador D7MGH11, nas gerações S1 e S3, assim como na linhagem L as gerações S1 e S4 não se encontravam em equilíbrio. Para D7RAT35, na linhagem H a geração S3 e na linhagem L as gerações S1 e S4 também não estavam em equilíbrio, sugerindo a influência de algum fator evolutivo na região genômica onde se encontram estes marcadores. Quando calculado o χ^2 de contingência, observou-se uma grande significância das variações genotípicas ao longo do processo de seleção em ambas as linhagens. Porém de acordo com os números absolutos e a análise numérica bruta das variações alélicas não mostraram variações gradativas tampouco divergentes, mas sim de forma aleatória durante a seleção. Também não foi encontrada nenhuma correlação entre o genótipo e o fenótipo em nenhuma das linhagens estudadas (ou entre as linhagens) para os dois marcadores no cromossomo 7. As evidências sugerem variações aleatórias nas frequências alélicas para os marcadores no cromossomo 7 não relacionadas de forma significativa ao fenótipo, ao longo do processo de seleção das linhagens Floripa H e L. Sugerimos, portanto, que as alterações observadas nos

marcadores do QTL *Ofil2* podem ser efeito de deriva genética, sem descartar alguma influência do processo seletivo.

Um fator a ser considerado nas análises é o de que na geração S3, em ambas as linhagens, somente os animais selecionados tiveram seus tecidos extraídos e armazenados e posteriormente genotipados, devido a motivos práticos na época, portanto todas as análises genotípicas para esta geração tiveram apenas 10 animais por linhagem, enquanto as análises fenotípicas basearam-se no número de indivíduos total de 60 animais. As análises envolvendo a geração S3, portanto, podem ter sofrido influência do pequeno número de animais genotipados.

Os resultados do presente estudo sugerem que para as populações de ratos denominadas Floripa H e L, um *locus* localizado no cromossomo 4 exerce influência, a exemplo do que já foi demonstrado em ratos oriundos das linhagens LEW e SHR (Ramos *et al.*, 1999), sobre um comportamento relacionado ao medo ou à emocionalidade. O mesmo não pode ser concluído a respeito de *Ofil2*, um outro *locus* mapeado no cromossomo 7 e também associado à emocionalidade nas linhagens isogênicas LEW e SHR (Ramos *et al.*, 1999).

No trabalho de Ramos *et al.* (1999), quando comparamos os efeitos destes dois QTLs, vemos que o efeito de *Ofil2* (LOD = 3,66) sobre a locomoção central no CA não é tão significativo quanto o de *Ofil1* (LOD = 7,22). Este último explicava 50,4% da variação fenotípica de ratos F2, um efeito excepcionalmente elevado para este tipo de estudo. Portanto, podemos deduzir que, enquanto *Ofil1* tem uma importância maior e mais generalizável para outras populações de ratos (como as linhagens Floripa), *Ofil2* tem efeito mais modesto e/ou mais específico para certas linhagens. Um estudo com linhagens recombinantes derivadas das linhagens LEW e SHR, no entanto, confirmou o efeito de *Ofil1*, mas não de *Ofil2*, sobre a locomoção central no CA (Vendruscolo *et al.*,

2006). Portanto, é possível que o QTL *Ofil2* seja pouco importante para a atividade locomotora no centro do CA nas linhagens Floripa.

No entanto, é importante se reconhecer uma limitação da estratégia utilizada no presente trabalho, que é a de não se conhecer a ancestralidade do alelo para os marcadores estudados, visto que não se tratava de uma genealogia ou família provinda de ancestrais comuns. Assim, talvez animais com um mesmo alelo tenham herdado tal alelo de ancestrais diferentes, o que mascararia sua eventual ligação com o fenótipo. Neste caso, resultados falso-negativos poderiam ser obtidos, se um determinado alelo marcador ora estivesse associado a um efeito fenotípico positivo e ora estivesse associado a um efeito fenotípico negativo. Em suma, os presentes resultados não nos permitem descartar o potencial envolvimento de *Ofil2* no comportamento das linhagens Floripa H e L.

O pico do QTL *Ofill*, mapeado em 1999, se situava a cerca de 8 cM do marcador D4RAT59 e a cerca de 5,4 cM de D4MGH27, ou seja, mais próximo deste último (Ramos *et al.*, 1999). Além disso, o gráfico que representa os valores de LOD score (que indicam a probabilidade de ligação entre cada ponto do genoma e o fenótipo estudado), calculados para os diversos pontos do cromossomo 4, indicava um maior valor de LOD para D4MGH27. Estes dados não são confirmados pelo presente estudo, que aponta D4RAT59 como estando mais próximo do(s) gene(s) responsável(is) pelo efeito fenotípico de *Ofill*. Cabe salientar, no entanto, que os mapas de ligação utilizados em análises de QTL, que se baseiam em distâncias em cM, têm baixa precisão e podem variar de estudo para estudo, pois dependem do número observado de recombinações em uma dada população entre grupos de marcadores ligados.

Quando consideramos as distâncias físicas em pares de base, atualmente disponíveis graças ao seqüenciamento do genoma do rato, vemos que a distância entre

os dois marcadores do cromossomo 4 utilizados no presente estudo é bastante grande, ou seja, de 20,8 milhões de pares de base (ou 20,8 Mb). Como vimos, no entanto, podemos supor que o nosso gene de interesse esteja mais próximo de D4RAT59 do que de D4MGH27, provavelmente a menos de 10 Mb do primeiro (disponível em Rat Genome V3.4 at RGD – Rat Genome Browser). Estudos em andamento em nosso laboratório deverão refinar a posição de mapa de nosso locus *Ofil1*.

De acordo com o banco de dados RGD, vários QTLs já foram mapeados perto de *Ofil1*. Alguns QTLs relacionados a comportamentos localizados em regiões próximas aos dois marcadores utilizados no cromossomo 4, como consumo de álcool (*Alc14*, *Alc16*, *Alc18*) e ingestão de alimentos (*Fit1*). Dentro deste intervalo genômico encontram-se vários genes candidatos que têm funções importantes sobre o sistema nervoso central. Os genes *Tac1r* (*tachykinin receptor 1*) e *NPY* (*neuropeptide Y*) foram considerados candidatos no trabalho de 1999, mas estão relativamente distantes do pico do QTL. No intervalo entre os dois marcadores utilizados, encontram-se outros genes de interesse, entre eles o *Grid2* (*glutamate receptor, ionotropic, delta 2*); *Il12rb2* (*interleukin 12 receptor, beta 2*); *Grip2* (*glutamate receptor interacting protein 2*); *Trh* (*thyrotropin releasing hormone*); *Il5ra* (*interleukin 5 receptor, alpha*); *GRM7* (*glutamate receptor, metabotropic 7*); e o *Hrh1* (*histamine receptor H 1*). Em regiões mais próximas a *Ofil1* encontram-se ainda os genes *Syn2* (*synapsin II*) e *Grin2b* (*glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 2B*). Na região do marcador D4RAT59 encontra-se o gene *Gabarapl1* (*Gamma-aminobutyric acid (GABA(A)) receptor-associated protein-like 1*), que encontra-se no homem em região homóloga no cromossomo 3 e está associado a transtornos psiquiátricos. Na região do marcador D4MGH27 encontra-se o gene *Slc6a1* (*Solute carrier family 6 (neurotransmitter*

transporter, GABA), member 1), também homóloga em humanos no cromossomo 3 (disponível em Rat Genome V3.4 at RGD – Rat Genome Browser).

Até a presente data, não sabemos qual gene é de fato responsável pelos efeitos comportamentais de *Ofill*, mas é possível que um dos genes acima relacionados esteja envolvido nos resultados fenotípicos. Podemos sugerir para uma investigação futura dos possíveis QTGs em *Ofill* o estudo dos genes *Gabarapl1* e *Slc6a1*. Estes dois, por atuarem na neurotransmissão gabaérgica, são fortes candidatos à associação com transtornos de ansiedade, localizados em ratos na região próxima ao pico do QTL *Ofill*. Estudos em andamento e estudos futuros deverão investigar estas possibilidades, através de análises moleculares, fisiológicas e comportamentais de alguns destes genes candidatos.

Com base nos resultados obtidos, concluímos que a região genômica correspondente ao QTL *Ofill* deve conter um ou mais genes relacionados a traços de ansiedade, corroborando estudos anteriores com o mesmo QTL nas linhagens LEW e SHR (Ramos *et al.*, 1999; Mormède *et al.*, 2002; Vendruscolo *et al.*, 2006). Outros autores que realizaram seleção fenotípica também confirmaram regiões genômicas em camundongos contribuindo para comportamentos relacionados à ansiedade (Buck *et al.*, 1997; Koundaurova *et al.*, 2006). O estudo destas regiões genômicas, é uma promissora ferramenta para identificação e localização de genes que contribuam para comportamentos ligados à emocionalidade em roedores. O próximo passo seria então a identificação dos genes relacionados ao fenótipo e a localização destes genes em humanos, através da homologia da arquitetura genética (genes sintênicos) em comparação com a de roedores, o que pode futuramente proporcionar o desenvolvimento de drogas mais específicas para transtornos psiquiátricos relacionados à ansiedade.

6. Conclusão

Através da análise dos resultados obtidos, concluímos que a seleção para a locomoção na área central e aversiva do teste do CA, um comportamento relacionado à ansiedade, parece ter atuado alterando as frequências alélicas nas linhagens de ratos Floripa H e L na região onde se encontram os marcadores D4RAT59 e D4MGH27, dentro do intervalo de confiança do QTL *Ofil1*. Este QTL mostrou correlação significativa com o fenótipo selecionado, o que nos leva a sugerir que a seleção fenotípica influenciou as variações genótípicas na região de *Ofil1*. Isto indica que nesta região genômica em ratos deve existir um ou mais genes contribuindo para um comportamento relacionado à ansiedade nas linhagens estudadas. Os marcadores utilizados neste trabalho para investigar a influência de *Ofil2* também apresentaram alterações nos genótipos, porém esta variação aparentemente é resultado do efeito de deriva genética, sem descartar totalmente uma possível contribuição do processo seletivo.

7. Referências Bibliográficas

- Anagnostaras, S.G.; Craske, M.G.; Fanselow, M.S. Anxiety: at intersection of genes and experience. **Nature Neuroscience**, New York, v. 2, n. 9, p. 780-782, sept. 1999.
- Angrini, M.; Leslie, J.C.; Shephard, R.A. Effects of propranolol, buspirone, pCPA, reserpine, and chlordiazepoxide on open-field behavior. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, Oxford, v. 59 n. 2, p. 387-397, feb.1998.
- Belay, A.T.; Sokolowski, M.B. Genetic Analysis of Food Search Behavior in the Fruit Fly (*Drosophila melanogaster*) In: **Neurobehavioral Genetics Methods And Applications**. 496. p. 121-138. 2 ed. Florida: CRC Press, 2007.
- Belzung, C.; Griebel, G. Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review. **Behavioural Brain Research**, Amsterdam, v. 125, n. 1-2, p. 141-149, nov. 2001.
- Bice, P.; Foroud, T.; Bo, R.; Castelluccio, P.; Lumeng, L.; Li, T.K.; Carr, L.G. Genomic screen for QTLs underlying alcohol consumption in the P and NP rat lines. **Mammalian Genome**, New York, v. 9, n. 12, ,p. 949-955, dec. 1998.
- Bignami, G. Selection for high and low rates of avoidance conditioning in the rat. **Animal Behaviour**, London, v. 13, n. 2, p. 200-221; apr./jul. 1965.
- Blanchard, R.J.; Blanchard, D.C.; Weiss, S.M. Ethanol effects in an anxiety/defense test battery. **Alcohol**, New York, v. 7, n. 5,p. 375-381, sep./oct. 1990.
- Blanchard, D.C.; Griebel, G.; Blanchard, R.J. Mouse defensive behaviors: Pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. **Neuroscience Biobehavioral Reviews**, New York, v. 25, n. 3, p. 205-218, may. 2001.
- Broadhurst, P.L. The maudsley reactive and nonreactive strains of rats: A survey. **Behavior Genetics**, New York, v. 5, n. 4, p. 299-319, oct. 1975.
- Brodkin, E.S.; Nestler,E.J. Quantitative trait locus analysis: A new tool for psychiatric genetics. **Neuroscience Update**, v. 4, p. 317-323, 1998.

- Buck, K.J.; Metten P.; Belknap, J.K.; Crabbe, J.C. Quantitative trait loci involved in genetic predisposition to acute alcohol withdrawal in mice. **The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience**, Washington, v. 17, n. 10, p. 3946-3955, may. 1997.
- Bueno, F.S. **Grande Dicionário Prosódico da Língua Portuguesa: Vocábulo, Expressões da Língua Geral e Científica-sinônimos, Contribuições do Tupi-Guarani**. 1. ed. SP: Saraiva, 1965. v 3, p. 1498.
- Carr, L.G.; Foroud, T.; Bice, P.; Gobbett, T.; Ivashina, J.; Edenberg, H.; Lumeng, L.; Li, T.K. A quantitative trait locus for alcohol consumption in selectively bred rat lines. **Alcoholism, Clinical and Experimental Research**, New York, v. 22, n. 4, p. 884-887, jun. 1998.
- Caspi, A.; Moffit, T.E. Gene-environment interactions in psychiatry: joining forces with neuroscience. **Nature Reviews. Neuroscience**, London, v. 7, n. 7, p. 583-590; jul. 2006.
- Castanon, N., Perez-Dias, F., Mormède, P. Genetic analysis of relationships between behavioral and neuroendocrine traits in roman high and low avoidance rat lines. **Behavior genetics**, New York, v. 25, n 4, 371-384, jul. 1995.
- Clément, Y.; Calatayud, F.; Belzung, C. Genetic basis of anxiety-like behaviour: A critical review. **Brain Research Bulletin**, New York, v. 57, n. 1, p. 57-71, jan. 2002.
- Colombo, G.; Agabio, R.; Lobina, C.; reali, L.; Zocchi, A.; Fadda, F.; Gessa, G.L. Sardinian alcohol-preferring rats: a genetic animal model of anxiety. **Physiology & Behavior**, New York, v. 57, n. 6, p. 1181-1185, jun. 1995.
- Courvoisier, H., Moisan, M.P., Sarrieau, A., Hendley, E.D., Mormède, P. Behavioral and neuroendocrine reactivity to stress in the WKHA/WKY inbred rat strains: a multifactorial and genetic analysis. **Brain Research**, Amsterdam, v. 743, n. 1-2, p. 77-85, dec. 1996.
- Crabbe, J.C. Animal Models in Neurobehavioral Genetics: Methods for Estimating Genetic Correlation In: **Neurobehavioral Genetics Methods And Applications**. 1 ed. Florida: CRC Press, 1999. p. 121-138.

- Crawley, J.N.; Patel, J.; Marangos, P.J. Behavioral characterization of two long-lasting adenosine analogs: sedative properties and interaction with diazepam. **Life Sciences**, New York, v. 29, n. 25: p. 2623-2630, dec. 1981.
- Cruz, A.P.M.; Frei, F.; Graeff, F.G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, Oxford, v. 49, n. 1, p. 171-176; sep. 1994.
- Defries, J.C.; Gervais, M.C.; Thomas, E.A. Response to 30 generations of selection for open-field activity in laboratory mice. **Behavior Genetics**, New York, v. 8, n. 1, p. 3-13, jan. 1978.
- Eley, T.C.; Plomin, R. Genetic analyses of emotionality. **Current Opinion in Neurobiology**, London, v. 7, n. 2, p. 279-284, apr. 1997.
- Falconer, D.S. **Introdução à Genética Quantitativa**. 1ed. Viçosa, MG: UFV. 1987. 279 p.
- Finn, D.A.; Rutledge-Gorman, M.T.; Crabbe, J.C. Genetic animal models of anxiety. **Neurogenetics**, Oxford, v. 4, n. 3, p. 109-135, apr. 2003.
- Flint, J.; Corley, R.; DeFries, J.C.; Fulker, D.W.; Gray, J.A.; Miller, S.; Collins, A.C. A simple basis for a complex psychological trait in laboratory mice. **Science**, Washington, v. 269, n. 5229, p. 1432-1435; sep. 1995.
- Flint, J. Animal models of anxiety and their molecular dissection. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, London, v.14, n. 1, p. 37-42, feb. 2003.
- Fujita, O.; Annen, Y.; Kitaoka, A. Tsukuba high- and –emotional strains of rats (*Rattus norvegicus*): an overview. **Behavior Genetics**, New York, v. 24, n. 4, p. 389-415, jul. 1994.
- Futuyma, D.J. **Biologia Evolutiva**. 2 ed. Ribeirão Preto, SP: Sociedade Brasileira de Genética/CNPq. 1997. p. 631.
- Gross, C.; Hen, R. The developmental origins of anxiety. **Nature Reviews Neuroscience**, London, v. 5, n. 7, p. 545-551, jul. 2004.

- Hall, C.S. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in the emotionality. **Journal of Comparative Psychology**, Washington, v. 18, p. 385-403, 1934.
- Hall, C.S. Emotional behavior in the rat. III. Defecation and urination as measures of individual differences in the emotionality. **Journal Comparative Psychology**, Washington, v. 22, p. 345-352, 1936.
- Henninger, M.S.H.; Ohl, F.; Hölter, S.M.; Weinßenbacher, P.; Toschi, N.; Lörscher, P.; Wigger, A.; Spanagel, R.; Landgraf, R. Unconditioned anxiety and social behaviour in two rat lines selectively bred for high and low anxiety-related behaviour. **Behavioural Brain Research**, Amsterdam, v. 111, n. 1-2, p. 153-163, jun. 2000.
- Hinojosa, F.R.; Spricigo, L.Jr.Izídio, G.S.; Brüske, G.R.;Lopes, D.M.; Ramos, A. Evaluation of two genetic animal model in behavioural tests of anxiety and depression. **Behavioural Brain Research**, Amsterdam, v. 168, n. 1, p. 127-136, mar. 2006.
- Izídio, G.S.; Lopes, D.M.; Spricigo, L. Jr.; Ramos, A. Common variations in the pretest environment influence genotypic comparisons in models of anxiety. **Genes, Brain, and Behavior**, Oxford, v. 4, n. 7, p. 412-419, oct. 2005.
- Jacob, H.J.; Kwitek, A.E. Rat genetics: Attaching physiology and pharmacology to the genome. **Nature Reviews. Genetics**, v. 3, n. 1, p. 33-41, jan. 2002.
- Jansen, G.; Ségalat, L. Behavioral Genetics in the Nematode In: **Neurobehavioral Genetics Methods And Applications**. 2 ed. Florida: CRC Press; 2007. p. 121-138.
- Jones, B.C.; Jones, L.C. Gene-environment interactions. In: **Neurobehavioral Genetics Methods And Applications**. 2 ed. Florida: CRC Press; 2007. p. 189-199.
- Kendler, K.S. Genetic epidemiology in psychiatry. Taking both genes and environment seriously. **Archives of General Psychiatry**, Chicago, v. 52, n. 11, p. 895-899, nov. 1995.
- Koundaurova, E.M.; Bazovkina, D.V.; Kulikov, A.V.; Popova, N.K. Selective breeding for catalepsy changes the distribution of microsatellite D13Mit 76 alleles linked to the 5-HT1A serotonin receptor gene in mice. **Genes, Brain, and Behavior**, Oxford, v. 5, n. 8, p. 596-601, nov. 2006.

- Landgraf, R.; Wigger, A. High vs low anxiety-related behavior rats: an animal model of extremes in trait anxiety. **Behavior Genetics**, New York, v. 32, n. 5, p. 301-313, sep. 2002.
- Lassalle, J-M. Animal Resources in Behavioral Neurogenetics In: **Neurobehavioral Genetics Methods And Applications**. 2 ed. Florida: CRC Press; 2007. p. 121-138
- Lazarus, R.S. From psychological stress to emotions: A History of Changing Outlooks. **Annual Review of Psychology**, California, v. 44, n 1, p. 1-21, 1993.
- Leppänen, P.K.; Ravaja, N; Ewalds-Kvist, S.B. Twenty-three generations of mice bidirectionally selected for open-field thigmotaxis: selection response and repeated exposure to the open field. **Behavioural Processes**, Amsterdam, v. 72, n. 1, p. 23-31, mar. 2006.
- Montgomery, K.C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behaviour. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, Washington, v. 48, n. 4, p. 254-260, aug. 1955.
- 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**, Oxford, v. 1, n. 2, p. 111-116, may. 2002.
- Nazar, M.; Jessa, M.; Plaznik, A. Benzodiazepine-GABAA receptor complex ligands in two models of anxiety. **Journal of Neural Transmission**, Austria, v. 104, n. 6-7, p. 733-746, 1997.
- Pellow, S.; Chopin, P.; File, S.E.; McGuffin, P. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in rat. **Journal of Neuroscience Methods**, Amsterdam, v. 14, n. 3, p. 149-167, aug. 1985.
- Plomin, R. Behavioral Genetics. **Research publications - Association for Research in Nervous and Mental Disease**, New York, v. 69, p. 165-180, 1991.
- Plomin, R.; Owen, M.J.; McGuffin, P. The genetic basis of complex human behaviors. **Science**, New York, v. 264, n. 5166, p. 1733-1739, jun. 1994.
- Plomin, R.; DeFries, J.C., McClearn, G.E. Rutter, M. **Behavioral Genetics**, 3 edn. W. H. Freeman: New York. 1997.

- Porsolt RD, Anton G, Blavet N, Jalfre M. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 47, n. 4, p. 379-391, feb. 1978.
- Ramos, A.; Berton, O.; Mormède, P.; Chaouloff, F. A multiple test study of anxiety-related behaviours in six inbred rat strains. **Behavioural Brain Research**, Amsterdam, v. 85, p. 57-69, 1997.
- Ramos, A.; Mormède, P. Stress and emotionality: A multidimensional and genetic approach. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, New York, v. 22, n. 1, p. 33-57, 1998.
- Ramos, A.; Mellerin, Y.; Mormède, P.; Chaouloff, F. A genetic and multifactorial analysis of anxiety-related behaviours in Lewis and SHR intercrosses. **Behavioural Brain Research**, Amsterdam, v. 96, n. 1-2, p. 195-205, nov. 1998.
- Ramos, A; Moisan, M.P.; Chaouloff, F.; Mormède, C.; Mormède, F. Identification of female-specific QTLs affecting an emotionality-related behavior in rats. **Molecular Psychiatry**, New York, v. 4, n. 5, p. 453-462, sep. 1999.
- Ramos, A.; Kangerki, A.L.; Basso, P.F.; Santos, J.E.D.S.; Assreuy, J.; Vendruscolo, L.F.; Takahashi, R.N. Evaluation of Lewis and SHR rat strains as a genetic model for the study of anxiety and pain. **Behavioural Brain Research**, Amsterdam, v. 129, n. 1-2, p. 113-123, feb. 2002.
- Ramos, A.; Correia, E.C.; Izidio, G.S.; Brüske, G.R. Genetic selection of two new rat lines displaying different levels of anxiety-related behaviors. **Behavior Genetics**, New York, v. 33, n. 6, p. 657-668, nov. 2003.
- Ramos, A; Mormède, P. Genetic Analysis of Emotional Behaviors Using Animal Models In: **Neurobehavioral Genetics Methods And Applications**. 2 ed. Florida: CRC Press; 2007. p. 291 - 306.
- Rex, A.; Sondern, U.; Voigt, J.P.; Franck, S.; Fink, H. Strain differences in fear-motivated behavior of rats. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, New York, v. 54, n. 1, p. 107-111, may. 1996.

- Rodgers, R.J., Cao, B.J., Dalvi, A., Holmes, A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Brazil, v. 30, n. 3, p. 289-304, mar. 1997.
- Terenina-Rigaldie, E.; Jones, B.C.; Mormède, P. Pleiotropic effect of a locus on chromosome 4 influencing alcohol drinking and emotional reactivity in rats. **Genes, Brain, and Behavior**, Oxford, v. 2, n. 3, p. 125-131, jun. 2003a.
- Terenina-Rigaldie, E.; Moisan, M-P.; Colas, A.; Beaugé, F.; Shah, K.V.; Jones, B.C.; Mormède, P. Genetics of behaviour: phenotypic and molecular study of rats derived from high- and low-alcohol consuming lines. **Pharmacogenetics**, London, v. 13, n. 9, p. 543-554, sep. 2003b.
- Treit, D. Animal models for the study of anti-anxiety agents: a review. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, New York, v. 9, n. 2, p. 203-202, summer. 1985.
- Treit, D.; Fundytus, M. Thigmotaxis is a test for anxiolytic activity in rats. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, New York, v. 31, n. 4, p. 959-966, dec. 1989.
- Trullas, R.; Skolnick, P. Differences in fear motivated behaviors among inbred mouse strains. **Psychopharmacology**, Germany, v. 111, n. 3, p. 323-331, 1993.
- Turri, M.G.; Datta, S.R.; DeFries, J.; Henderson, N.D.; Flint, J. QTL analysis identifies multiple behavioral dimensions in ethological tests of anxiety in laboratory mice. **Current Biology**, England, v. 11, n. 10, p. 725-734, may. 2001.
- Vendruscolo, L.F.; Terenina-Rigaldie, E.; Raba., F.; Ramos, A.; Takahashi, R.N.; Mormède, P. Evidence for female-specific effect of chromosome 4 locus on anxiety-related behaviors and ethanol drinking in rats. **Genes, Brain, and Behavior**, Oxford, v. 5, n. 6, p. 441-450, aug. 2006.
- Willis-Owen, S.A.G.; Flint, J. The genetics basis of emotionally behaviour in mice. **European Journal of Human Genetics**, London, v. 14, n. 6, p. 721-728, jun. 2006.

Referências eletrônicas:

Answers.com. **Correção de Yates.** Disponível em: <<http://www.answers.com/topic/yates-correction-for-continuity?cat=technology>>. Acesso em 30 março 2008.

Biometria – **Qui Quadrado.** Disponível em <C:\Documents and Settings\Thaïs Hameister\Meus documentos\Resultados dissertação\Biometria - Qui Quadrado.htm>. Acesso em 30 março 2008.

RGD. **Rat Genome Database.** Disponível em: <<http://rgd.mcw.edu>>. Acesso em: 30 março 2008.

Rat Genome V3.4 at RGD. **Rat Genome Browser.** Disponível em: <http://mcnally.hmgc.mcw.edu/gb/gbrowse/rgd_904/>. Acesso em: 30 março 2008.