

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

ELAYNE PEREIRA

**DESENVOLVIMENTO DE UMA LINHAGEM CONGÊNICA
PARA UM LOCUS NO CROMOSSOMO 4 DO RATO COM
EFEITO SOBRE A EMOCIONALIDADE**

Florianópolis, fevereiro de 2010

ELAYNE PEREIRA

**DESENVOLVIMENTO DE UMA LINHAGEM CONGÊNICA
PARA UM LOCUS NO CROMOSSOMO 4 DO RATO COM
EFEITO SOBRE A EMOCIONALIDADE**

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. André de Ávila Ramos

Florianópolis, fevereiro de 2010

**Só se pode alcançar um grande êxito quando nos mantemos fiéis a nós
mesmos.**

Friedrich Nietzsche

**Este trabalho é dedicado à minha família e ao meu marido
Iinei Pereira Filho, pelo amor incondicional e por todo o
apoio recebido ao longo destes anos.**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, eu gostaria de agradecer ao professor André de Ávila Ramos, meu orientador durante o doutorado, por ter me recebido em seu Laboratório e por todo o crescimento científico que me proporcionou durante estes anos. Em particular, agradeço pela compreensão demonstrada em momentos difíceis da minha vida.

Aos Professores Antonio de Pádua Carobrez, Reinaldo Takahashi, Rui Daniel Schröder Prediger, Andréa Peripato e Ana Lúcia Brunialti, pela disposição e paciência em analisar este trabalho, trazendo importantes contribuições para a sua finalização, bem como para a minha formação profissional.

Ao Professor Jamil Assreuy, por ter me recebido inicialmente em seu Laboratório, antes mesmo do início do doutorado. A você, toda a minha admiração e obrigada pelo incentivo em continuar na pesquisa.

À Professora Ilíada Rainha de Souza e aos colegas do Laboratório LAPOGE, por toda a amizade e por sempre demonstrarem disponibilidade para qualquer ajuda científica.

Aos Professores Paulo Hofmann, Sylvia Maestrelli, Vivian Leyser da Rosa e Milton Muniz por todo o carinho e amizade.

Agradeço aos professores do Departamento de Farmacologia da UFSC pela dedicação em ensinar e por sempre lutarem para o crescimento profissional dos pós-graduandos.

Aos funcionários da Farmacologia, em especial à Rita e à Diana por toda a ajuda e amizade ao longo desses anos.

Aos funcionários do BEG, em especial ao secretário Anselmo, por toda a ajuda e paciência.

Aos amigos do Laboratório de Genética do Comportamento: Letícia, Gustavo, Jonatas: Obrigada por todo o apoio e pelos bons momentos compartilhados. Em especial, agradeço às amigas Thaize e Gabriela, pela sincera amizade e por sempre estarem ao meu lado em todos os momentos que exigiram importantes decisões laboratoriais.

Aos meus amigos Geison S. Izídio e Leandro F. Vendruscolo, por todo o incentivo e por sempre estarem disponíveis para qualquer discussão científica.

Às ex-alunas de iniciação científica do Laboratório Genética do Comportamento, Ana Paula, Natália, Mariana, Lígia, Nina, que trabalharam diretamente comigo neste projeto. Obrigada toda a ajuda e disposição.

À minha querida amiga Lígia Sena, por toda a amizade e por sempre estar ao meu lado nos momentos mais difíceis da minha vida pessoal e profissional.

À minha amiga Janaína Gonsalves, pela sincera amizade e por todos os momentos agradáveis que temos passado juntas.

À Maria Alcina, minha amiga de todas as horas. Obrigada por sempre compartilhar seus pensamentos e estar sempre disponível.

À minha cunhada Ildenís e a minha sogra Maria, por sempre compreenderem a minha ausência nos almoços familiares dos finais de semana.

Ao meu marido, Iinei Pereira Filho, não há palavras que possam expressar todo o meu amor, respeito e admiração que sinto por você. Seu apoio incondicional foi essencial durante todo o meu doutorado. Obrigada por estar sempre tão presente em minha vida. Amo você! Enfim, meus agradecimentos são dedicados a minha família: aos meus pais Nério e Marley, e ao meu irmão Fábio e à Juliana, pelo apoio constante e por nunca permitirem que eu me afastasse dos meus sonhos pessoais e profissionais. O término deste doutorado é uma vitória nossa, pois vocês sempre proporcionaram condições materiais, afetivas e espirituais, para eu seguisse o meu caminho científico.

Agradeço ao CNPq pelo apoio financeiro.

RESUMO

Um inter cruzamento entre as linhagens isogênicas de ratos Lewis (LEW) e espontaneamente hipertensos (SHR) possibilitou a identificação de um QTL (*Quantitative Trait Locus*) chamado *Ofil1* (no cromossomo 4) com influência na locomoção central do campo aberto (CA), um índice experimental de ansiedade (RAMOS et al., 1999). O objetivo deste trabalho foi a construção de uma linhagem congênica para o *locus Ofil1* utilizando a linhagem LEW como doadora e a linhagem SHR como receptora, para confirmar a localização desse QTL e investigar sua expressão em um arcabouço genético SHR e sua influência sobre fenótipos associados com a ansiedade. A cada geração (N3 a N10), animais heterozigotos e homozigotos SHR para *Ofil1* foram avaliados no teste do CA e da caixa branca e preta (CBP). Além dessa estratégia, três linhagens semicongênicas para o *Ofil1* também foram produzidas, sendo duas a partir da geração N3 (homozigotos LEW e homozigotos SHR – grupos controle), avaliadas em diferentes testes de ansiedade, de depressão e de consumo de álcool, e uma terceira, proveniente da geração N6 (homozigotos LEW), comparada com linhagens puras LEW e SHR, grupos controle, e submetidas somente a testes de ansiedade. Animais homozigotos LEW também foram produzidos a partir da geração N10. Os resultados dos animais heterozigotos (N3 a N10) mostraram uma tendência desses animais a exibirem menores índices de emocionalidade em comparação aos homozigotos SHR, na maioria das gerações. Entretanto, diferenças significativas relacionadas ao fator genótipo, na medida de locomoção central, somente foram observadas na geração N6, e foram marginalmente significativas nas gerações N3 e N10, sendo que os animais heterozigotos exibiram menores índices de emocionalidade do que os animais

homozigotos SHR, como esperado. Apesar do efeito de *Ofil1* não ter apresentado resultados estatisticamente significantes em todas as dez gerações, efeitos significativos foram encontrados a partir de uma análise simultânea com os animais de todas as gerações (N3 a N10), análise esta que também revelou menores índices de emocionalidade dos animais heterozigotos em comparação aos animais homozigotos SHR. Os resultados dos animais semicongênicos das gerações N3 e N6 mostraram que *Ofil1* influencia medidas comportamentais de ansiedade e exibe um efeito pleiotrópico em medidas de diferentes testes. Nos animais homozigotos LEW da geração N3, fatores ambientais como o período do teste e a intensidade de iluminação interagiram com o *locus Ofil1* e promoveram modificações no efeito do genótipo sobre as medidas do CA, sendo estas dependentes do sexo e do período em que o teste foi realizado. Os animais homozigotos LEW da geração N10 também exibiram menores índices de emocionalidade do que os SHR puros em relação ao tempo gasto no centro do CA, medida esta também considerada um índice de emocionalidade.

Palavras-chave: *Locus* para características quantitativas, *Ofil1*, emocionalidade, Lewis, SHR, cromossomo 4, linhagem congênica.

ABSTRACT

An intercross between inbred strains of Lewis (LEW) and spontaneously hypertensive (SHR) rats has allowed the identification of a QTL (Quantitative Trait Locus) named *Ofil1* (on chromosome 4) affecting open field (OF) central locomotion, an experimental index of anxiety. (RAMOS et al, 1999). The objectives of this study were: the construction of congenic strains for *Ofil1* using LEW (donor strain) and SHR (receptor strain) strains to confirm the location of this QTL, and the investigation of its expression on an SHR genetic background and of its influence on phenotypes associated with the anxiety. At each generation (N3 to N10), heterozygous and homozygous SHR animals for *Ofil1* were evaluated in the open field and the black and white box tests. Besides this strategy, three semicongenic strains for *Ofil1* were also produced, two from the generation N3 (homozygous LEW and homozygous SHR), which were evaluated in different tests of anxiety, depression and alcohol consumption, and a third one from the generation N6 (homozygous LEW), which was compared with LEW and SHR pure strains in tests of anxiety only. The results of the heterozygous animals (N3 to N10) showed a tendency of these animals to exhibit lower levels of emotionality compared to homozygous SHR, in most generations. However, significant differences related to genotype, in central OF locomotion were only observed in the generation N6, but were marginally significant in the generations N3 and N10, with the heterozygous animals showing lower levels of emotionality than homozygous SHR animals, as expected. Even though the effect of *Ofil1* did not present statistically significant results in all ten generations, significant effects were found from a simultaneous

analysis of animals from all generations (N3 to N10). This analysis also revealed lower levels of emotionality in the heterozygous animals compared to homozygous SHR animals. The results of semicongenic animals from N3 and N6 generations, showed that *Ofil1* influences behavioral measures of anxiety and displays a pleiotropic effect in measures of different tests. In homozygous LEW animals from generation N3, environmental factors such as the period of test and the intensity of illumination interacted with the *Ofil1 locus* and promoted changes in the effect of genotype on measures of open field test, which were dependent on the sex and on the period in which the test was performed. Homozygous LEW animals from generation N10 also exhibited lower levels of emotionality compared to the pure SHR, in relation to the time spent in the center of open field test. This measure is also considered an index of emotionality.

Keywords: Quantitative trait locus, *Ofil1*, emotionality, Lewis, SHR, chromosome 4, congenic strain.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática dos retrocruzamentos realizados durante o desenvolvimento da linhagem congênica.

Figura 2 – Mapa genético do cromossomo 4 do rato.

Figura 3 – Representação esquemática das etapas de produção da linhagem congênica (SHR.LEW-*Ofi1*).

Figura 4 – Marcadores utilizados nas diferentes abordagens genéticas: desenvolvimento da linhagem congênica através de retrocruzamentos (N3 a N10), linhagens semicongênicas N3 e N6.

Figura 5 – Representação esquemática das etapas metodológicas realizadas desde a extração de DNA até a genotipagem dos produtos de PCR.

Figura 6 – Representação do genótipo heterozigoto ou homozigoto SHR, em gel de agarose, para o marcador D4Mgh6.

Figura 7 – Representação dos diferentes genótipos encontrados a partir do intercruzamento de animais heterozigotos provenientes da geração N10.

Figura 8 – Teste do campo aberto.

Figura 9 – Teste da caixa branca e preta.

Figura 10 – Teste do labirinto em cruz elevado.

Figura 11 – Teste do nado forçado.

Figura 12 – Sequência do protocolo experimental para os testes de consumo de quinino, sacarina e álcool.

Figura 13 – Locomoção central (A) e periférica (B) do teste do campo aberto com animais das gerações N3 a N10.

Figura 14 – Tempo gasto no centro do campo aberto dos animais das gerações N3 a N10.

Figura 15 – Número de transições (A) e tempo gasto no compartimento branco (B) da caixa branca e preta, dos animais das gerações N3 a N10.

Figura 16– Tempo gasto no compartimento preto da caixa branca e preta dos animais das gerações N3 a N10.

Figura 17 – Locomoção central (A) e periférica (B) do teste do campo aberto dos animais de todas as gerações (N3 a N10).

Figura 18 – Locomoção central (A) e periférica (B) do teste do campo aberto (10 lux) dos animais N3F1 homozigotos LEW.

Figura 19 – Locomoção central (A) e periférica (B) do teste do campo aberto (530 lux) dos animais N3F3 homozigotos LEW.

Figura 20 – Locomoção (B) e tempo gasto no compartimento branco (A) e número de transições (C) realizadas no teste da caixa branca e preta, por animais N3F1 homozigotos LEW.

Figura 21 – Porcentagem de entradas (A) e de tempo (A) nos braços abertos e número de entradas nos braços fechados (C) do teste do labirinto em cruz elevado, exibidas por animais N3F1 homozigotos LEW.

Figura 22 – Tempo de imobilidade (A) e número de defecações (B) no teste do nado forçado realizados por animais N3F1 homozigotos LEW.

Figura 23 – Preferência de sacarina (A) e de quinino (B) dos animais N3F2 homozigotos LEW.

Figura 24 – Consumo de álcool a 10% vs. água em livre escolha (A) e consumo de álcool em diferentes concentrações vs. água em livre escolha (B) por animais N3F2 homozigotos LEW.

Figura 25 – Locomoção central (A), periférica (B) e tempo gasto no centro (C) do campo aberto (10 lux) dos animais N6F4 homozigotos LEW.

Figura 26 – Porcentagem de entradas (A) e de tempo (B) nos braços abertos e tempo gasto nos braços fechados (C) do teste do labirinto em cruz elevado, exibidos por animais N6F4 homozigotos LEW.

Figura 27 –Tempo gasto no compartimento branco (A) e preto (B) do teste da caixa branca e preta, dos animais N6F4 homozigotos LEW.

Figura 28 – Locomoção central (A), periférica (B) e tempo gasto no centro (C) do campo aberto (10 lux) dos animais N10F1 homozigotos LEW.

Figura 29 – Número de transições (A) e tempo gasto no compartimento branco (B) da caixa branca e preta dos animais homozigotos N10.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Exemplos de genes que influenciam comportamentos no teste do campo aberto identificados a partir das tecnologias *knockout* e transgênicos.

Quadro 2 – Porcentagem do genoma proveniente da linhagem receptora ao longo do desenvolvimento de uma linhagem congênica.

Quadro 3 – Exemplos de linhagens congênicas desenvolvidas a partir do cromossomo 4 do rato.

Quadro 4 – Número de casais formados por animais heterozigotos e SHR, utilizados a cada geração do desenvolvimento da linhagem congênica.

Quadro 5 – Descrição das sequências nucleotídicas (5'-3') dos pares de *primers* (Forward e Reverse) utilizados durante o desenvolvimento da linhagem congênica.

Quadro 6 – Número de filhotes machos e fêmeas obtidos a cada geração (N3 a N10).

Quadro 7 – Número aproximado de genotipagens realizadas nas diferentes estratégias genéticas

Quadro 8 – Número de animais heterozigotos e homozigotos SHR para o *locus Ofil1*, das gerações N3 a N10, utilizados nos testes comportamentais do campo aberto e da caixa branca e preta.

Quadro 9 – Número de animais homozigotos LEW e homozigotos SHR utilizado nos testes comportamentais de ansiedade, depressão e consumo de álcool, da linhagem semicongênica N3.

Quadro 10 – Número de animais homozigotos LEW e homozigotos SHR, da linhagem semicongênica N3 utilizado no teste do campo aberto com alta iluminação.

Quadro 11 – Número de animais N6F4 homozigotos LEW e de seus respectivos controles parentais, LEW e SHR, utilizados nos testes comportamentais do campo aberto, da caixa branca e preta e do labirinto em cruz elevado.

Quadro 12 – Número de animais N10F1 homozigotos LEW e de seus respectivos controles parentais, LEW e SHR, utilizados nos testes comportamentais do campo aberto e da caixa branca e preta.

LISTA DE ABREVIACÕES

ANOVA - Análise de variância

BDNF - Fator neurotrófico derivado do cérebro

CA - Campo aberto

CBP - Caixa branca e preta

cM - Centimorgan

DNA - Ácido desoxirribonucléico

EDTA -Ácido etilenodiamino tetra-acético

EPM - Erro-padrão da média

ET – Etanol

GABA - Ácido gama-aminobutírico

LCE - Labirinto em cruz elevado

LEW - Lewis

mM - Milimolar

NPY - Neuropeptídeo Y

Of11 - Open field inner locomotion 1 / Locomoção central no campo aberto¹

PCR - Polymerase chain reaction / Reação em cadeia da polimerase

RGD - Rat genome database / Base de dados do genoma do rato

MGD - Mouse genome database / Base de dados do genoma do camundongo

QTL – Quantitative trait locus / Locus para características quantitativas

SHR - Spontaneously Hypertensive Rats/ Ratos espontaneamente hipertensos

TBE - Tris aminometano, ácido bórico e EDTA

TNF - Teste do nado forçado

SUMÁRIO

RESUMO	I
ABSTRACT	III
LISTA DE FIGURAS	V
LISTA DE QUADROS	IX
LISTA DE ABREVIACÕES	XI
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Fatores que Influenciam o Comportamento	1
1.2 O uso de Roedores na Pesquisa Médica	3
1.3 Teste do Campo Aberto: o fenótipo de interesse	8
1.4 Ratos LEW e SHR: modelo genético para o estudo da emocionalidade	15
1.5 Análise de QTL e a História do Locus <i>Ofil1</i>	18
1.6 Linhagens Congênicas (do QTL ao gene)	21
1.7 Justificativa e Hipóteses do Projeto	30
1.8 Objetivos	32
1.8.1 Objetivo geral	32
1.8.2 Objetivos específicos	32
2 MATERIAL E MÉTODOS	34
2.1 Animais	34
2.2 Estratégia para o Desenvolvimento da Linhagem Congênica: escolha das linhagens doadora e receptora	35
2.3 Desenvolvimento da Linhagem Congênica	36
2.4 Produção de Linhagens Semicongênicas N3 e da Geração N6	41
2.5 Extração de DNA e genotipagem	43
2.6 Testes Comportamentais	49
2.6.1 Teste do campo aberto	49
2.6.2 Teste da caixa branca e preta	50
2.6.3 Teste do labirinto em cruz elevado	51
2.6.4 Teste do nado forçado	52
2.6.5 Testes de consumo	53
2.7 Análise Estatística	55
3 RESULTADOS	56
3.1 Desenvolvimento de uma Linhagem Congênica	56
3.2 Resultados Comportamentais	57
3.2.1 Gerações N3 a N10	57
3.2.2 Resultados Comportamentais das Linhagens Semicongênicas N3	66
3.2.2.1 Testes de Emocionalidade (CA, CBP, LCE e TNF)	66
3.2.2.2 Testes de consumo	76
3.2.3 Resultados Comportamentais da Linhagem Semicongênica N6	80
3.2.4 Animais N10 homozigotos	87
4 DISCUSSÃO	92
4.1 Desenvolvimento de uma Linhagem congênica (N3 a N10)	93
4.2 Linhagens Semicongênicas N3	99
4.3 Linhagens Semicongênicas N6	106
4.4 Produção de animais homozigotos N10	110
5 CONCLUSÕES	115
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	118

1 INTRODUÇÃO

1.1 Fatores que Influenciam o Comportamento

Embora os mecanismos moleculares relacionados à etiologia dos transtornos psiquiátricos ainda sejam pouco conhecidos, estudos comparativos entre famílias, estudos com gêmeos e de famílias com adoção têm permitido estimar que a contribuição genética para a incidência desses transtornos tais como ansiedade, depressão, consumo de álcool, entre outros esteja entre 30% e 70%, dependendo da doença (INOUE; LUPSKI, 2003; KENDLER et al., 2003). A maioria desses fenótipos não se segrega como uma característica Mendeliana (herança dominante ou recessiva atribuída a um único *locus*), mas apresenta padrões consistentes com uma característica complexa, dependente de interações entre fatores genéticos (GESCHWIND; LEVITT, 2007; SKUSE, 2007) e ambientais (INOUE; LUPSKI, 2003). Os fenótipos complexos possuem origem poligênica, onde diferentes genes podem contribuir para o mesmo fenótipo, sendo que muitos destes genes podem participar, de forma individual, com apenas uma pequena contribuição (McALLISTER; SUMMERALL, 2003).

Fatores ambientais, principalmente situações que provocam traumas, são considerados importantes fatores de risco para o desenvolvimento dos transtornos mentais (CHAPMAN et al., 2004; KENDLER et al., 2000). Por isso, pesquisas sobre interações entre genes e ambiente no desenvolvimento neurocomportamental de humanos e roedores vêm sendo realizadas (CANLI; LESH, 2007; TUCCI et al., 2006; VALDAR et al., 2006). Um bom exemplo de efeito ambiental consiste na

interrupção do contato materno com os filhotes de roedores, que é capaz de provocar alterações hormonais e comportamentais que, conseqüentemente, podem influenciar intensamente na resposta ao estresse durante a fase adulta (ANISMAN et al., 1998; TREIMAN; LEVINE, 1969). Além disso, diferentes ambientes laboratoriais – a interferência dos experimentadores (LEWEJOHANN et al., 2006; WAHLSTEN et al., 2003); o alojamento dos animais (MAISONNETTE et al., 1993); os diferentes níveis de iluminação; o posicionamento das gaiolas nos biotérios (IZÍDIO et al., 2005) – também são capazes de alterar o comportamento dos animais em diferentes testes comportamentais.

Estudos clínicos realizados em humanos que correlacionam a susceptibilidade à depressão devida aos polimorfismos do gene transportador da serotonina (SERT) com eventos estressantes que ocorrem durante a vida mostram que as interações entre genes e fatores ambientais podem ser essenciais (CANLI; LESH, 2007; RUTTER et al., 2006). Indivíduos que exibem alelos curtos desse gene apresentam maior susceptibilidade para o desenvolvimento da depressão em comparação aos indivíduos que apresentam alelos longos apenas quando submetidos a diferentes eventos estressantes (CASPI; MOFFITT, 2006; CASPI et al., 2003). Estudos de herdabilidade, que avaliam a influência genética sobre os fenótipos complexos, mostram que os genes são responsáveis por 30% a 50% (FLINT, 1999; GERSHENFELD; PAUL, 1998), por 40% a 70% (KENDLER et al., 1995; KENDLER et al., 1995b) e por 50% a 60% (ENOCH; GOLDMAN, 2001; GOLDMAN et al., 2005) da susceptibilidade aos transtornos de ansiedade, depressão e consumo de etanol, respectivamente, tornando clara a participação de fatores tanto genéticos quanto ambientais.

Apesar dos esforços na identificação de genes presentes no genoma humano responsáveis por diferentes transtornos psiquiátricos, os resultados têm se mostrado limitados, e uma das razões para tal dificuldade pode ser a simplificação de que um gene e um comportamento possam ser reduzidos/estudados de uma maneira estritamente linear (HAMER et al., 2002). É importante ressaltar que o comportamento humano não é determinado por um único gene, e sim resultante de interações complexas entre mecanismos genéticos, celulares, anatômicos e funcionais associados às influências de vários fatores ambientais (SKLAR, 2002). Nesse sentido, a identificação de *loci* e genes bem como a capacidade de se avaliar, em conjunto, a participação de fatores ambientais na predisposição de doenças tornam-se imprescindíveis, pois permitirão o reconhecimento de novos caminhos na busca de mecanismos moleculares e alvos terapêuticos para os tratamentos de diferentes transtornos psiquiátricos.

1.2 O Uso de Roedores na Pesquisa Médica

Abordagens genéticas possibilitam um estudo diferencial das variações intraespecíficas, sejam elas normais, patológicas ou baseadas em diferentes métodos experimentais (LASSALE, 2007). Nesse sentido, a utilização de modelos animais é especialmente útil para o estudo das interações entre gene e ambiente no desenvolvimento de psicopatologias (BARR et al., 2003). Enquanto os experimentos com animais permitem o desenvolvimento de linhagens a partir de critérios específicos, em humanos a abordagem experimental é restrita à

abordagem natural, em que se incluem estudos familiares, de gêmeos e de adoção (LASSALE, 2007).

Os modelos animais representam uma ferramenta valiosa para o desenvolvimento de novas hipóteses e de novos testes neurobiológicos, e na identificação de genes candidatos para os transtornos psiquiátricos (LOW; HARDY, 2007; MOY; NADLER, 2008), além de oferecerem um refinamento das bases genéticas envolvidas e a capacidade de se estabelecer um paralelo com os aspectos clínicos (KAS; VAN REE, 2004), uma vez que tanto os animais como os humanos compartilham mecanismos fisiológicos e orgânicos (TECOTT, 2003) e determinantes genéticos comuns.

Em particular, ratos (*Rattus norvegicus*) e camundongos (*Mus musculus*) apresentam grande similaridade genética em relação às estruturas corporais e respostas comportamentais dos humanos (RAMOS; MORMEDE, 1998; MURPHY et al., 2001; RAMOS et al., 2003), além de esses animais serem fáceis de manipular e terem um ciclo de vida curto, o que permite rapidamente a produção de várias gerações (LASSALE, 2007). Por esses e outros motivos, discutidos a seguir, os modelos animais têm sido utilizados há mais de um século.

A utilização de modelos animais a partir de ratos e de camundongos tem permitido, em parte, o conhecimento dos fatores genéticos, neurobiológicos e ambientais envolvidos em comportamentos relacionados à ansiedade (RAMOS et al., 1999; HAMEISTER et al., 2008; IZÍDIO et al., 2005; VENDRUSCOLO et al., 2006a), à depressão (HINOJOSA et al., 2006), ao consumo de etanol (IZÍDIO; RAMOS, 2007), à sensibilidade a drogas (VENDRUSCOLO et al., 2009a) e à hipertensão (SIMKO; PECHANOVA, 2009). Entretanto, até o presente momento,

não há um modelo animal ideal e completo capaz de refletir todos os aspectos envolvidos em qualquer transtorno psiquiátrico.

O uso de modelos animais, em particular de linhagens isogênicas, tem uma vantagem muito importante sobre os estudos em humanos, que consiste na capacidade de minimizar o problema da heterogeneidade. Isso posto, a utilização de animais isogênicos (animais geneticamente iguais, que apresentam homozigose acima de 98% após 20 gerações de cruzamentos consanguíneos) permite comparar duas linhagens contrastantes para determinado fenótipo, cuja diferença, quando mantidas sob as mesmas condições ambientais (RAMOS et al., 1998), pode ser considerada de origem genética. Já a diferença encontrada entre os animais de uma mesma linhagem isogênica deve ser de origem ambiental. É interessante notar que, a partir de duas linhagens isogênicas, é possível produzir desde gerações híbridas F1 ou F2 até populações altamente complexas, tais como as linhagens congênicas, consômicas, recombinantes, congênicas recombinantes, entre outras, para o estudo dos mais variados fenótipos (SINGER et al., 2004; HORII et al., 2008; RAMOS et al., 1999; TOMIDA et al., 2009; STASSEN et al., 1996; VENDRUSCOLO et al., 2006). As linhagens isogênicas também são utilizadas para o mapeamento e para a identificação de genes, além de proporcionarem um excelente arcabouço genético (*background*) para o estudo de epistasias, ou seja, interações entre alelos de *loci* diferentes (PLOMIN et al., 1997), e de constituírem em uma poderosa ferramenta para a detecção de pleiotropismo e de interações entre o genótipo e o ambiente (FESTING, 1998; SILVER, 1995).

Embora os camundongos tenham se tornado a escolha preferencial para o delineamento de abordagens genéticas (AITMAN et al., 2008), desde o desenvolvimento da primeira linhagem isogênica de rato, realizada por King em

1909 (LINDSEY, 1979), mais de 500 linhagens isogênicas deste roedor já foram desenvolvidas, o que o tornou um modelo animal para o estudo de diversos processos biológicos (JACOB, 1999).

Em 1995, iniciou-se um projeto ambicioso, denominado Projeto Genoma do Rato que em colaboração com outros projetos, permitiu o total sequenciamento do genoma do rato (AITMAN et al., 2008) e, conseqüentemente, um aumento na utilização desse modelo animal pela comunidade científica. A partir desse projeto, inúmeras contribuições tornaram-se disponíveis à comunidade científica, como a identificação inicial de 5 mil marcadores genéticos para milhões de polimorfismos de base única (SNPs) entre diferentes linhagens de ratos e o desenvolvimento de novas metodologias para a avaliação do perfil de expressão gênica, bem como a criação de bancos de dados como o *Rat Genome Database* (RGD, 2009). Ressalta-se que o sequenciamento genômico do rato foi desenvolvido a partir de uma única linhagem, a Brown Norway, por ser uma linhagem pura, bem caracterizada, e por ser a linhagem fundadora de importantes painéis genéticos, incluindo tanto linhagens recombinantes (PRAVENEK et al., 1989) quanto linhagens consômicas, ou seja, linhagens isogênicas com um dos cromossomos substituídos pelo cromossomo homólogo de outra linhagem isogênica (COWLEY et al., 2004).

Outra importante contribuição do Projeto Genoma do Rato foi a comparação detalhada, pela primeira vez, das sequências genômicas do rato, do camundongo e do homem, proporcionando, dessa forma, novas informações sobre os genes e sobre os processos evolutivos do genoma (AITMAN et al., 2008). Destaca-se que os sequenciamentos do genoma humano, no ano de 2000, e do camundongo, em 2002, tinham como objetivos principais conhecer e desenvolver novos mecanismos para o estudo das diferenças individuais presentes no comportamento, bem como a

identificação de genes responsáveis por variações ou alterações comportamentais (GREGORY et al, 2002). Dessa forma, é possível dizer que o conhecimento biológico disponibilizado pelo genoma do rato, associado à riqueza de informações obtidas por meio do sequenciamento do genoma humano e dos camundongos nessa era genômica, abre novos caminhos para o desenvolvimento de outros métodos de diagnóstico, de prevenção e de tratamento para os mais variados fenótipos (DWINEL et al., 2008).

1.3 Teste do Campo Aberto: o Fenótipo de Interesse

Pelo fato de esta tese estudar alguns aspectos genéticos relacionados à emocionalidade de roedores, em particular os comportamentos relacionados à ansiedade, avaliados principalmente no teste do campo aberto (CA), torna-se importante, nesta seção, revisar alguns pontos relevantes sobre esse fenótipo e sobre o teste do CA propriamente dito.

Estudar os aspectos genéticos das emoções, seja em humanos, seja em modelos animais, é um desafio, pois as emoções são difíceis de serem definidas, medidas e, particularmente, analisadas geneticamente (RAMOS; MORMÉDE, 2007). A ansiedade é uma das emoções mais importantes tanto em humanos quanto em animais. Ela aparece mediante estímulos potencialmente ameaçadores, formados pela combinação de componentes somáticos, cognitivos, emocionais e comportamentais, normalmente acompanhada do aumento do tônus muscular, da frequência cardíaca e respiratória, e da pressão arterial e da dilatação de pupila. Essas reações são evolutivas, adaptativas e altamente conservadas em mamíferos. No caso de ratos e de camundongos, situações inesperadas como ruídos altos, movimentos bruscos, lugares altos e odores de predadores (BLANCHARD; BLANCHARD, 1972; KING, 1999) podem desencadear respostas defensivas, tais como o ato de evitar a ameaça, o estado de congelamento e a avaliação de risco, sinais que aparecem em situações de ameaça moderada. Em casos extremos, como o encontro físico com o predador, outros comportamentos tornam-se mais evidentes, como a luta, a ameaça ou o ataque, o que poderia ser considerado um estado emocional de extrema ansiedade ou pânico (BLANCHARD et al., 2003).

Calvin S. Hall (1934) foi o primeiro pesquisador a introduzir um teste comportamental, o teste do CA, para o estudo da emocionalidade em ratos. Esse teste consiste em colocar o animal em uma arena desconhecida, normalmente com forte iluminação, cercada por paredes que impedem sua fuga. Durante um período determinado, é permitida a livre exploração desse novo ambiente. O número de ambulações e de defecações no CA são frequentemente avaliadas e se correlacionam de forma negativa (quanto maior a ambulação, menor a quantidade de defecação), consideradas medidas de emocionalidade (HALL, 1934). Outros parâmetros comportamentais, tais como o tempo e a locomoção realizada no centro do aparato, também são importantes e nem sempre são considerados em estudos de emocionalidade experimental (MORMÈDE et al., 1998). A região central do CA, por ser desprotegida, é o local mais aversivo do aparato. Já a periferia consiste na área adjacente às paredes, onde o animal pode realizar tigmotaxia, caracterizada pelo movimento das vibrissas, a fim de receber informações sensoriais sobre o local onde se encontra (ENNANCEUR et al., 2006; RAMOS; MORMÈDE, 1998).

O teste do CA é amplamente utilizado na psicologia, na farmacologia e na genética (TAKAHASHI et al., 2006), bem como no estudo de locomoção, de novidade, de memória e de outras atividades que compreendem o comportamento exploratório do rato (ENNANCEUR et al., 2005; TAKAHASHI et al., 2006; WHISHAW; BROOKS, 1999). A validação desse teste ocorreu principalmente para ratos (HALL, 1934, 1936; BROADHURST, 1957), embora também seja muito utilizado para camundongos.

Apesar da ampla utilização do teste do CA na neurociência comportamental, a natureza exata dos padrões comportamentais envolvidos ainda não está completamente entendida (CALATAYUD et al., 2004; ENNANCEUR et al., 2006;

TAKAHASHI et al., 2006). No entanto, o fato do teste do CA permitir a medição de respostas quantitativas e qualitativas capazes de serem modificadas após a administração de drogas ansiogênicas e ansiolíticas, faz com que ele também seja aceito como um modelo comportamental de ansiedade (ANGRINI et al., 1998; NAZAR et al., 1997; TREIT; FUNDYTUS, 1988). Porém, os efeitos de determinadas drogas nas medidas obtidas no teste do CA devem ser equivalentes aos efeitos produzidos em humanos para que o modelo possa cumprir o critério de validade preditiva esperado para os testes comportamentais (FILE, 1987). Assim, drogas ansiolíticas que reduzem a ansiedade em humanos devem ser capazes de fazer os animais explorarem mais a região central do aparato, sem alterar sua locomoção total (PRUT; BELZUNG, 2003). Já as drogas ansiogênicas, que aumentam a ansiedade em humanos, devem diminuir a exploração nessa área aversiva do teste pelos animais (FILE, 1987).

Em uma ampla revisão sobre os efeitos de drogas no teste do CA, Prut e Belzung (2003) observaram que em 31% dos 380 estudos analisados não foram registrados efeitos significativos da administração aguda de drogas benzodiazepínicas (BDZ) em relação à locomoção do animal no centro do CA e que em 13% dos trabalhos essa droga exibiu efeito ansiogênico. Esses dados corroboram outros estudos em que também se tem observado a ausência de efeito das BDZ, avaliadas no CA, em especial o diazepam (ENNANCEUR et al., 2008; PEREIRA et al., 2009 dados não publicados). O conjunto desses estudos sugere que o teste do CA não parece ser um modelo ideal para o transtorno de ansiedade generalizada, entretanto pode ser utilizado para medir comportamentos relacionados à ansiedade não patológica, ou seja, é possível afirmar que esse teste pode ser utilizado para medir uma emocionalidade gerada por algum estímulo novo

relacionado à novidade da situação propriamente dita. Ademais, nota-se que o CA também é muito utilizado em amplas caracterizações farmacológicas, visando, principalmente, à avaliação do efeito de diferentes drogas sobre a locomoção geral dos animais (BROCCO et al., 2002; DIANA et al., 2007; RÉUS et al., 2008; WHIRLEY; EINAT, 2008).

Além desses aspectos sobre o CA, há estudos que destacam a importância de se entender o real significado das diferentes medidas avaliadas nos testes comportamentais (RAMOS 2008; ROY et al., 2009), tendo em vista que cada teste somente é capaz de avaliar de forma parcial a emocionalidade dos animais (RAMOS, 2008; RAMOS et al., 2008). Assim, uma versão modificada e integrada do CA, do LCE e da CBP, denominada teste triplo, foi desenvolvida em nosso laboratório e tem se mostrado eficaz tanto na avaliação simultânea do perfil emocional dos animais quanto no *screening* de drogas farmacológicas administradas de forma crônica (RAMOS et al., 2008). Em função do enorme volume de resultados gerados a partir de experimentos realizados no teste triplo e a partir do desenvolvimento da linhagem congênica, optou-se por apresentar neste trabalho somente os resultados referentes ao projeto dos congênicos, que permitiram estudar a influência de um *locus* no cromossomo 4 do rato sobre a emocionalidade avaliada em diferentes testes comportamentais.

A utilização de diferentes abordagens genéticas tem contribuído para a compreensão das medidas associadas ao CA. Entre elas, estão as análises de *locus* para características quantitativas (QTL), linhagens congênicas (discutidas adiante) e o desenvolvimento de camundongos transgênicos (CT) e *nocaut* (KO). Ressalta-se que a diferença entre uma análise de QTL, a tecnologia *nocaut* e a dos transgênicos, por exemplo, consiste no fato da análise de QTL buscar

variações que ocorrem naturalmente ao longo do genoma, capazes de exercer um efeito sobre um dado fenótipo complexo, ao contrário do que acontece com essas tecnologias, em que se utilizam manipulações genéticas específicas. A partir da estratégia *nocaute*, vários genes que influenciam comportamentos no CA têm sido identificados, como o gene Connexin 31.1, relacionado com a exploração dos roedores nesse teste e expresso em neurônios que participam do desenvolvimento cerebral e de processos de aprendizado e memória (DERE et al., 2008); e o gene ASIC1a (*acid sensing ion channel*), que pertence à família dos canais de Na⁺ e está expresso em sinapses excitatórias. Camundongos *nocaute* para este último gene exibem menos medo em relação ao centro do CA, sem alterar a locomoção total (CORYELL et al., 2007). *Nocaute* para o gene da subunidade p85 alfa fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) exibem maiores velocidade, distância percorrida e tempo no centro do CA, quando comparados aos camundongos que expressam o gene PI3K (TOHDA et al., 2009).

Outra importante abordagem genética é a utilização de animais transgênicos. Camundongos que expressam diferentes níveis de alfa-sinucleína sugerem a participação dessa proteína em comportamentos associados com a ansiedade (GEORGE et al., 2008). Camundongos que exibem uma superexpressão neural do fator de liberação de corticotrofina (CRF) demonstram alterações de adaptação comportamental quando submetidos a um novo ambiente. Esse resultado tem contribuído para o entendimento das doenças psiquiátricas relacionadas ao estresse, uma vez que o CRF é o maior mediador envolvido nessas respostas (KASAHARA et al., 2007). Camundongos que exibem uma hiperexpressão de quinases do glicogênio-sintase 3 beta (GSK-3 beta) foram utilizados como um modelo de déficit de atenção e hiperatividade. Esses animais transgênicos

apresentaram aumento na locomoção geral do teste do CA e diminuição no comportamento de habituação, além de apresentarem diminuição de imobilidade no teste do nado forçado (TNF) (PRICKAERTS et al., 2006). O GSK-3 beta é uma serina treonina quinase e participa de processos celulares como a proliferação e a apoptose (KOTLIAROVA et al., 2008). Para uma ampla revisão sobre camundongos *nocaut* e transgênicos que afetam medidas comportamentais dos principais testes relacionados à ansiedade, recomenda-se a revisão de Finn et al. (2003). O Quadro 1 ilustra um resumo dos genes identificados a partir das tecnologias *nocaut* e transgênicos relacionadas com o CA.

Apesar das diferentes metodologias acima citadas permitirem um maior entendimento da relação entre cérebro e comportamento, pesquisadores chamam a atenção para conclusões precipitadas, principalmente quando se trata de genes candidatos regulando o comportamento (BALABAN et al., 1996), uma vez que este é influenciado por inúmeros fatores (RAMOS; MORMÈDE, 1998), discutidos anteriormente. Entretanto, vale ressaltar que a identificação de genes candidatos auxilia o desenvolvimento de novos tratamentos e de novos métodos para o diagnóstico de doenças. Particularmente sobre o teste do CA, a identificação de genes tem contribuído no estudo identificação de inúmeros mecanismos envolvidos em diversos comportamentos relacionados a esse aparato.

Por fim, destaca-se que, mesmo diante de um mundo globalizado, onde informações geradas por novas tecnologias surgem a todo instante, profundas reflexões sobre as descobertas do passado e do presente envolvendo o teste do CA são necessárias, com o intuito de se estabelecer uma “ponte” capaz de interligar todos os aspectos já conhecidos e, assim, buscar novas alternativas

experimentais, sejam elas etológicas, farmacológicas ou genéticas, para preencher as lacunas que ainda perduram sobre o comportamento de animais no teste do CA.

Quadro 1 – Exemplos de genes que influenciam comportamentos no teste do campo aberto, e identificados a partir das tecnologias *nocaut* e transgênicos.

Exemplos de camundongos <i>nocaut</i> relacionados ao teste do CA			
Fenótipos	Genes	Cromossomos	Referências
Participa do desenvolvimento cerebral e em processos de aprendizado e memória	Connexin 31.1	4 em camundongos, 1 em humanos e 5 em ratos	DERE et al., 2008
Comportamentos relacionados ao medo	ASIC1a (<i>acid sensing ion channel</i>)	15 em camundongos, 12 em humanos e 7 em ratos	CORYELL et al., 2007
Comportamentos relacionados ao teste do CA	Subunidade p85 alfa do PI3K-fosfoinositide-3 quinase	13 em camundongos, 5 em humanos e 2 em ratos	TOHDA et al., 2008
Exemplos de camundongos transgênicos relacionados ao teste do CA			
Comportamentos associados à ansiedade	Alfa-sinucleína	6 em camundongos, 4 em ratos e 4 em humanos	GEORGE et al., 2008
Comportamentos relacionados ao estresse	Fator de liberação de corticotrofina	3 em camundongos, 2 em ratos e 8 em humanos	KASAHARA et al., 2007
Atua na locomoção do teste do CA e na imobilidade do teste do NF	glycogen synthase kinase 3 beta (GSK-3 beta)	16 em camundongos, 11 em ratos e 3 em humanos	PRICKAERTS et al., 2006

1.4 Ratos LEW e SHR: modelo genético para o estudo da emocionalidade

Dentre as linhagens isogênicas e contrastantes utilizadas no estudo da emocionalidade em roedores, destacam-se, entre outras, as linhagens de ratos isogênicas LEW (Lewis) e SHR (*spontaneously hypertensive rats*). A linhagem LEW foi obtida originalmente a partir de cruzamentos consanguíneos de ratos Sprague-Dawley (BRINBERG et al., 2007); e a linhagem SHR, que desenvolve hipertensão arterial a partir de certa idade, surgiu a partir de cruzamentos consanguíneos e da seleção genética da linhagem Wistar (OKAMOTO; AOKI, 1963).

Ramos et al. (1997), ao realizarem um estudo com seis linhagens de ratos isogênicos, propuseram as linhagens LEW e SHR como um novo modelo genético para o estudo de comportamentos relacionados à ansiedade, uma vez que ambas foram contrastantes para as áreas mais aversivas de diferentes testes de emocionalidade tais como no CA, no LCE e na CBP. A linhagem SHR quando comparada com a linhagem LEW gasta mais tempo no centro do CA, nos braços abertos do LCE e no compartimento claro da CBP, porém não exibe diferenças em relação às medidas consideradas como índices de locomoção geral desses aparatos. Desta forma, sugere-se que comparativamente, a linhagem SHR exibe menores índices de emocionalidade em relação à linhagem LEW. No ano seguinte, esse mesmo grupo de pesquisa, ao utilizar animais segregantes F2 a partir dessas mesmas linhagens, sugeriu que a pressão arterial não estava associada a comportamentos relacionados à ansiedade (RAMOS et al., 1998). Ramos et al. (1999), a partir de uma análise de QTL (*locus* para características quantitativas) utilizando ratos LEW e SHR, identificaram um *locus* no cromossomo 4, com forte

influência na locomoção central do CA, capaz de influenciar comportamentos relacionados à ansiedade.

Além desses aspectos, os ratos LEW e SHR ainda exibem outras diferenças em inúmeros testes comportamentais, como o labirinto em cruz elevado (LCE) e a caixa branca e preta (CBP). Os ratos LEW exploram menos e permanecem menos tempo nas áreas aversivas desses testes em comparação aos ratos SHR (IZÍDIO et al., 2005; RAMOS et al., 1998, 2002). Já no TNF, os ratos LEW apresentam maior tempo de imobilidade do que os ratos SHR, sugerindo que os LEW exibem um perfil comportamental relacionado a comportamentos depressivos (HINOJOSA et al., 2006). Estudos em humanos também tem mostrado comorbidades entre os transtornos de ansiedade e depressão (KRISHNAN, 2003; YEREVANIAN et al., 2001). Em relação ao consumo de etanol, estudos mostram que a linhagem SHR é mais sensível à hipnose e aos efeitos do etanol, apesar de consumirem mais etanol em comparação aos ratos normotensos LEW (Da SILVA et al., 2004) e Wistar Kyoto (KHANNA et al., 1990). Além disso, estudos mostram uma comorbidade clínica entre o consumo de álcool e a ansiedade (PANDEY et al., 2005). Assim, com o intuito de compreender melhor os mecanismos envolvidos, estudos tem demonstrado uma correlação positiva entre estes transtornos sugerindo uma associação genética (SPANAGEL et al., 1995; VENDRUSCOLO et al., 2006a), entretanto outros estudos não corroboram esta hipótese (FERNÁNDEZ-TERUEL et al., 2002).

Estudos recentes mostram que a linhagem SHR também é considerada um bom modelo para estudar o déficit de atenção e a hiperatividade (SAGVOLDEN et al., 2009; VENDRUSCOLO et al., 2009), enquanto os ratos LEW são muito utilizados em pesquisas relacionadas a doenças autoimunes (FANG et al., 2009) e

ao abuso de drogas como a cocaína (KOSTEN et al., 1994), a morfina (SUZUKI et al., 1988) e o etanol (SUZUKI et al., 1988).

Devido à enorme variabilidade observada no comportamento emocional de diferentes linhagens de roedores, estratégias experimentais foram desenvolvidas para identificar suas possíveis causas. Nesse sentido, abordagens genéticas tais como seleção artificial de linhagens e outras metodologias, que serão discutidas posteriormente, foram desenvolvidas com o intuito de produzir novos modelos animais. Entre as linhagens selecionadas especialmente para as medidas comportamentais do teste do CA estão os camundongos De Fries (De FRIES et al., 1978), as linhagens de ratos Maudsley (BROADHURST, 1975) e as linhagens Floripa (RAMOS et al., 2003). Ressalta-se que outras linhagens selecionadas em outros testes comportamentais também apresentam diferenças em algumas medidas no teste do CA, como as linhagens de ratos Romanos (*Roman high avoidance – RHA* e *Roman low avoidance – RLA*) (BROADHURST, 1965), HAB (*high anxiety-related behavior*) e LAB (*low anxiety-related behavior*) (LANDGRAF, 2003) e Tsukuba (*Tsukuba low-emotional* e *Tsukuba high-emotional*) (FUJITA, 1984). A utilização desses modelos, associada a outras estratégias genéticas, como a tecnologia de animais *nocaute*, transgênicos, congênicos e consômicos, tem permitido novas descobertas na relação entre cérebro e comportamento, e nos processos neuropatológicos envolvidos em transtornos psiquiátricos e neurodegenerativos (CRYAN; HOLMES, 2005).

1.5 Análise de QTL e a História do *Locus Ofil1*

Loci para características quantitativas podem ser definidos como regiões ao longo do genoma que contêm genes capazes de influenciar determinadas características quantitativas, que variam de maneira contínua na população, como peso, altura, hipertensão, agressividade, entre outros. É importante salientar que, além dessas características serem afetadas por vários genes e, conseqüentemente, por diferentes mecanismos moleculares, elas também são fortemente afetadas por fatores ambientais (BRODKIN; NESTLER, 1998).

Os animais normalmente utilizados nas análises de QTL são oriundos de gerações segregantes (F2 ou retrocruzamentos) derivadas de duas linhagens isogênicas, que apresentam características fenotípicas contrastantes entre si. Marcadores genéticos polimórficos entre as linhagens parentais são utilizados ao longo de todo o genoma, a fim de caracterizar os animais F2 do ponto de vista de seu DNA (para revisão ver DARVASI, 1998; LANDER; KRUGLYAK., 1995; ZHENG et al., 1999). Posteriormente, análises estatísticas correlacionam os níveis das características estudadas e a presença ou ausência de determinada forma variante de um marcador genético em particular. Esse procedimento permite a identificação de *loci* que provavelmente contêm genes responsáveis por alterar fenótipos complexos (BRODKIN; NESTLER, 1998), como a hipertensão (GARRETT et al., 1998; NABICA et al., 2000; PRAVENEK et al., 2003; RAPP, 2000), as doenças autoimunes (JOHANNESSON, 2005), os tumores de pulmão (ZHANG, 2003), a hiperatividade comportamental com déficit de atenção (MORMÈDE et al., 2002), a sensibilidade a drogas (BERRETINI et al., 1994; CRABBE et al., 1999), o consumo

de álcool (CARR et al., 1998; RAMOS et al., 1999; TERENINA-RIGALDIE et al., 2003a) e a emocionalidade (RAMOS et al., 1999). A partir dessa estratégia genética, torna-se possível a identificação de *loci* que exibem comportamentos pleiotrópicos, ou seja, capazes de influenciar simultaneamente vários comportamentos (TERENINA-RIGALDIE et al., 2003b; VENDRUSCOLO et al., 2006a), ou mesmo outros *loci* que afetam comportamentos específicos (RAMOS et al., 1999).

Nesse contexto, vários estudos têm mapeado QTL associados com o comportamento de roedores, tendo sido FLINT et al. (1995) os primeiros autores a verificar QTL associados a comportamentos emocionais em camundongos. Já, os primeiros QTL para a emocionalidade em ratos foram mapeados por RAMOS et al. (1999), que utilizaram as linhagens isogênicas LEW e SHR.

Ramos et al. (1999), como mencionado acima, utilizando uma geração F2 proveniente de um intercruzamento entre linhagens isogênicas, de ratos LEW/CRLIFO e SHR/CRL, que diferem para traços relacionados à emocionalidade, identificaram e mapearam um QTL localizado no cromossomo 4, com forte influência na locomoção central do CA (medida potencial de ansiedade). Entretanto, esse efeito sobre a medida de locomoção central, além de ter sido observado somente em fêmeas F2, netas de avós LEW, também exibia um efeito oposto do esperado, ou seja, a presença de alelos LEW no *locus Ofil1* promovia um aumento dessa medida, ao invés de uma diminuição (efeito transgressivo/efeito contrário do esperado). A identificação de QTL que exibem efeitos opostos ao esperado é um fenômeno freqüentemente encontrado, já descrito por diferentes autores (KÓVACS et al., 1997; SILVA et al., 2007), principalmente por se tratar de características quantitativas em que há participação de muitos genes.

A existência desse QTL no cromossomo 4, chamado *Ofil1* (*open field inner locomotion* 1), foi corroborada por um segundo estudo que envolvia as mesmas linhagens (MORMÈDE et al., 2002). Posteriormente, algumas análises de QTL baseadas no intercruzamento de outros pares de linhagens contrastantes quanto ao consumo de etanol levaram à identificação de regiões, também no cromossomo 4, capazes de influenciar a preferência ao etanol (CARR et al., 1998; TERENINA-RIGALDIE, 2003a; VENDRUSCOLO et al., 2006a). Considerando que a ansiedade parece ser um dos fatores preditivos envolvidos no consumo de álcool (PANDEY, 2003), a combinação dos estudos descritos acima, em função da localização aproximada dessas regiões, levanta a hipótese de que a região cromossômica do *locus Ofil1* exibe um efeito pleiotrópico, ou seja, capaz de influenciar simultaneamente comportamentos relacionados tanto à ansiedade quanto ao consumo do álcool. Em contrapartida, estudos recentes em nosso laboratório, a partir de uma análise de QTL utilizando as linhagens brasileiras LEW e SHR, não conseguiram provar a existência desse efeito pleiotrópico pelo *locus Ofil1*, sugerindo que, pelo menos em animais segregantes (F2) a partir dessas linhagens, os comportamentos relacionados tanto à ansiedade quanto ao consumo de etanol atuam de forma independente (IZÍDIO et al., 2009).

Ainda em relação ao QTL *Ofil1*, vale destacar que, atualmente, esse *locus* possui um sinônimo, *Anxrr16*, definido pelo banco de dados RGD. A partir de uma busca realizada no RGD em outubro de 2009, foi possível localizar vinte e um QTL, incluindo o *Anxrr16*, já identificados no genoma do rato para comportamentos relacionados à ansiedade, que se encontram distribuídos em diferentes cromossomos: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10 e 18. Destaca-se que o *Anxrr16* possui o segundo maior *lod score* (7,2) entre os QTL pesquisados. Outro fato interessante é

que, a partir dessa busca, pode-se observar que 11 QTL exibem efeitos sobre a locomoção central do teste do CA e encontram-se localizados nos cromossomos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 18. Já em relação à preferência e aos efeitos do etanol (perda do reflexo postural e concentração de etanol no sangue), 37 QTL já foram identificados na maioria dos cromossomos, exceto no 17,18,19, 21, X e Y). É importante ressaltar que no RGD não há QTL cadastrados, até o presente momento, associados à depressão, embora haja estudos publicados sobre o assunto (TOMIDA et al., 2009). Esse fato acaba por dificultar o acompanhamento das novas descobertas, no genoma do rato, relacionadas à identificação de *loci* envolvidos com esse fenótipo. Já no Mouse Genome Database (MGD, 2009), há dez QTLs descritos e associados à depressão que se encontram localizados nos cromossomos 8, 11, 15 e 19 dos camundongos.

A partir do exposto acima, é possível compreender a complexidade que envolve as características poligênicas e a dificuldade na identificação de genes candidatos, bem como dos mecanismos envolvidos na interação entre esses genes e o restante do genoma. Além disso, novas abordagens genéticas mais eficientes e precisas tornam-se imprescindíveis.

1.6 Linhagens Congênicas (do QTL ao Gene)

Os métodos clássicos para a identificação de QTL, envolvendo fenotipagem e genotipagem de animais segregantes, apresentam baixo poder de resolução e acabam por mapear *loci* que correspondem a regiões cromossômicas muito

extensas (acima de 30 milhões de pares de bases). Como mencionado, características quantitativas são resultantes da participação de múltiplos genes que possuem efeitos individuais pequenos. Mesmo utilizando um maior número de indivíduos F2, com a finalidade de aumentar o poder estatístico na detecção do QTL, não é possível refinar o mapeamento a ponto de identificar importantes componentes genéticos envolvidos com o fenótipo em estudo, principalmente se no intervalo do QTL identificado há mais de um gene contribuindo para o efeito geral do *locus* (MOORE; NAGLE 2000). Portanto, após as análises iniciais de QTL, outra estratégia tem sido aplicada na tentativa de se refinar o mapa do *locus* de interesse, sendo esta baseada na construção de linhagens congênicas.

As linhagens congênicas são desenvolvidas, inicialmente, mediante o cruzamento de duas linhagens isogênicas contrastantes para um fenótipo já conhecido, sendo uma linhagem doadora e a outra receptora (aquela que recebe a região cromossômica de interesse), o que gera uma população híbrida F1. Essas linhagens são normalmente as mesmas utilizadas nas análises de QTL precedentes. A geração F1 é então retrocruzada (cruzamento realizado com uma das linhagens parentais) com a linhagem receptora, dando origem à geração N2 (N, nomenclatura utilizada para indicar o número de retrocruzamentos). A seguir, esses animais são genotipados com marcadores moleculares que flanqueiam o QTL em questão. Aqueles animais que estiverem carregando o QTL de interesse da linhagem doadora serão selecionados para o próximo retrocruzamento, novamente com a linhagem receptora, e assim sucessivamente. Normalmente, os retrocruzamentos são repetidos de 8 a 10 vezes (BRODKIN, 1998).

É importante salientar que cada retrocruzamento resulta, em média, na perda de 50% do material genético da linhagem doadora, fazendo com que,

progressivamente, o genoma da linhagem que está sendo construída se torne semelhante ao da linhagem receptora, exceto pelo *locus* de interesse, proveniente da linhagem doadora parental, que se apresentará em heterozigose. A porcentagem do genoma proveniente da linhagem receptora ao longo das gerações está ilustrada no Quadro 2.

Quadro 2 – Porcentagem do genoma proveniente da linhagem receptora ao longo do desenvolvimento de uma linhagem congênica.

Genoma ao longo dos retrocruzamentos	
	% Linhagem receptora
P	100
F1	50
N2	75
N3	87,5
N4	93,8
N5	96,9
N6	98,45
N7	99,2
N8	99,6
N9	99,8
N10	99,9

Fonte - Jackson Laboratory

Entretanto, ao final do processo, torna-se necessário o desenvolvimento de linhagens congênicas homozigotas para o *locus* em estudo, por meio de um inter cruzamento entre animais heterozigotos (irmão/irmã), pelo qual se espera que aproximadamente 25% (1/4) dos descendentes sejam homozigotos para o *locus* de interesse (COWLEY et al., 2004a). A partir dessa etapa, a linhagem congênica poderá ser mantida indefinidamente. Após a obtenção de animais homozigotos, a nomenclatura utilizada para identificar a linhagem congênica será: [linhagem receptora . linhagem doadora - nome do *locus* de interesse (número de retrocruzamentos seguido do número de cruzamentos consangüíneos (irmão e irmã)] (Mouse Genome Database, 2010). A Figura 1 ilustra o desenvolvimento de uma linhagem congênica, utilizando marcadores microssatélites que flanqueiam o *locus* de interesse.

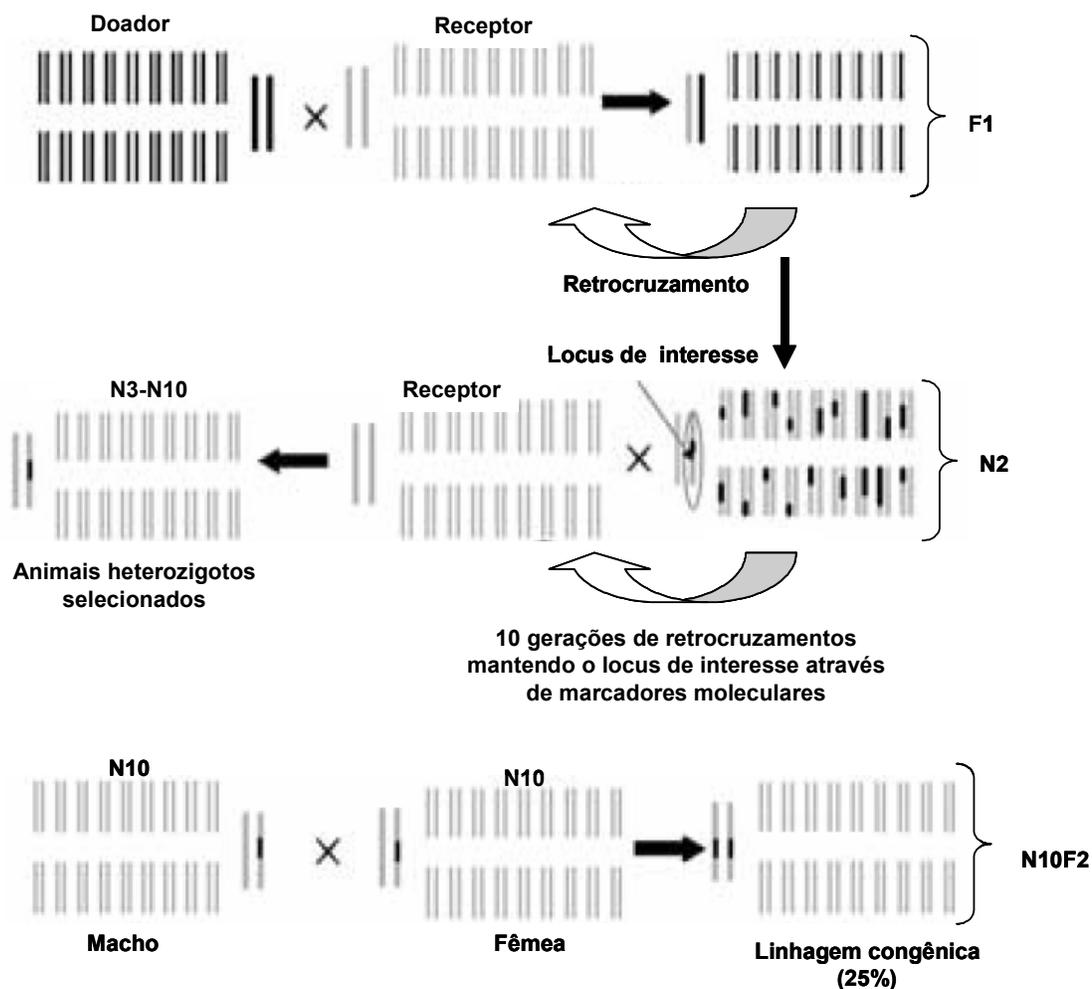


Figura 1: Esquema representativo dos cruzamentos realizados durante o desenvolvimento da linhagem congênica. As linhagens parentais inicialmente foram intercruzadas e originaram uma geração híbrida F1 heterozigota. Esses animais foram então retrocruzados com a linhagem receptora, originando a geração N2 e genotipada para marcadores moleculares no locus de interesse, sendo os animais heterozigotos novamente retrocruzados com a linhagem receptora, dando origem à geração N3, e assim sucessivamente, até a geração N10. Indivíduos heterozigotos da geração N10 foram novamente genotipados e posteriormente intercruzados, sendo seus descendentes homozigotos para o *locus* de interesse. Adaptado de Cowley et al. (2004).

Destaca-se que, através das diferenças fenotípicas encontradas entre a linhagem congênica final e a linhagem parental receptora, torna-se possível confirmar o efeito exibido pelo QTL, previamente identificado (ARMSTRONG et al., 2006).

Outro aspecto importante em relação à produção de animais congênicos é a qualidade da linhagem congênica final, sendo esta avaliada em relação à probabilidade de *gaps* (regiões de heterozigose provenientes de eventos recombinantes presentes em qualquer cromossomo da linhagem congênica final) não detectados no genoma. Por esse motivo, há a necessidade de se inserir um maior número de marcadores polimórficos entre os marcadores inicialmente utilizados para delimitar a região de interesse inicial e de se detectarem e eliminarem os alelos “contaminantes” provenientes da linhagem doadora (ARMSTRONG et al., 2006).

Inúmeros trabalhos têm utilizado, com sucesso, linhagens congênicas para estudar várias doenças poligênicas, relacionadas à ansiedade (KIM et al., 2009); ao consumo de álcool e a outras drogas (BENNET, 2000; BERRETTINI et al., 1994; CARR et al., 2006; MARKEL et al., 1997; PATEL et al., 1999; RODRIGUEZ et al., 1995; SIMPSON et al., 1998), à abstinência e aos efeitos sedativos do álcool (BENNETT; JOHNSON, 1998; BUCK et al., 1997), à depressão (CROWLEY et al., 2006; LAD et al., 2007; LIU et al., 2007; TURRI et al., 2001; YOSHIKAWA et al., 2002); à hipertensão (ISHIKAMA et al., 2008); à responsividade ao estresse (JAWAHAR et al., 2008), à diabetes mellitus (LORD et al., 1995), à epilepsia (FRANKEL et al., 1995), à susceptibilidade a tumores (FIJNEMAN et al., 1996), ao lúpus eritematoso sistêmico (MOREL et al., 1996) e às síndromes metabólicas (KLOTING et al., 2004). A partir desses trabalhos, é possível perceber que a

produção de linhagens congênicas vem sendo muito utilizada pela comunidade científica, haja vista que, a partir de uma rápida busca no site RGD, é possível encontrar 422 linhagens congênicas cadastradas a partir de diferentes linhagens de ratos. Algumas linhagens congênicas desenvolvidas para o cromossomo 4 do rato, encontram-se descritas no Quadro 3.

Quadro 3 – Exemplos de linhagens congênicas desenvolvidas para o cromossomo 4 do rato.

Fenótipos	Genes	Cromossomo	Linhagens congênicas	Referências
Síndrome metabólica/ Intolerância à glicose	Perk	4	BB.SHR	KLOTING et al., 2004
Síndrome metabólica	Repin1	4	BB.SHR	KLOTING et al., 2007
Resistência à insulina	Cd36	4	SHR. BN	AITMAN et al., 1999
Hipertensão	Cd36	4	SHR. BN	PRAVENEK et al., 2008
Preferência ao etanol	Alc22	4	P.NP	CARR et al.,2007
Diabetes	TCR Vbeta, Znf467 e Atp6v0 e 2	4	(**) BBDR.BBDP	FULLER et al., 2006
Resistência à diabetes	gimap5	4	BBDR.BBDP	FULLER et al., 2009
Desenvolvimento de artrite	X	4	DA.PVG.1AV1	BACKDAHL et al., 2004
Dislipidemia	X	4	BB.SHR	KOVACS et al., 2001
Hipertensão	X	4	SHR.BN	ANEAS et al 2009
Susceptibilidade à diabetes autoimune	X	4	WF.BBDR (*)	MORDES et al 2002
Peso corporal	X	4	BB.WOKW	KLOTING et al., 2005

Fonte: RGD (2009). BN, ratos da linhagem Brown Norway; BB/OK (BB), ratos espontaneamente diabéticos; BBDR (*), ratos que desenvolvem diabetes autoimune após alterações do sistema imunológico; WF, ratos que não desenvolvem espontaneamente a diabetes; DA, ratos susceptíveis ao desenvolvimento de artrite reumatoide; PVG.1AV1, ratos resistentes à artrite reumatoide; SHR, ratos espontaneamente hipertensos; WOKW (Wistar Ottawa Karlsburg RT1), ratos que desenvolvem síndrome metabólica com obesidade; BBDP, ratos espontaneamente diabéticos; BBDR (**), ratos resistentes à diabetes; P, ratos que preferem consumir álcool; e NP, ratos que preferem não ingerir álcool.

A análise de QTL tradicional, associada com a construção de linhagens congênicas, abre caminho para outra metodologia, as linhagens congênicas intervalo-específicas (ISCS), saturadas com marcadores polimórficos em pequenos intervalos, gerados a partir do cruzamento da linhagem congênica original com a linhagem parental receptora (CICILA et al., 2001; DARVASI 1997, 1998; FEHR et al., 2002; KOZELL et al., 2008; SHIRLEY et al., 2004). Nessa etapa, a manutenção do efeito fenotípico nas linhagens subcongênicas permitirá um refinamento ainda maior do *locus* em estudo (ARMSTRONG et al., 2006), em direção à identificação de genes responsáveis pela característica de interesse a partir de um QTL previamente identificado ou de potenciais efeitos pleiotrópicos atuando em comportamentos adicionais (BRODKIN; NESTLER, 1998; McBRIDE et al., 2004). Dessa forma, é compreensível a importância do desenvolvimento de linhagens congênicas, por permitir comparações fenotípicas rigorosas entre as linhagens e por tornar possível o estudo da influência do QTL de maneira isolada do restante do genoma em relação à perda ou ao ganho do fenótipo (COWLEY et al., 2004b).

Entre os genes identificados a partir da utilização de linhagens congênicas em associação a outras abordagens moleculares, é possível destacar Fehr et al. (2002), que mapearam um *locus* no cromossomo 4 de camundongo associado à abstinência aguda ao álcool e ao fenobarbital. Por meio de linhagens ISCS, os autores delimitaram ainda mais o intervalo do *locus* em estudo (região < 1 cM = 1,8 Mb, que contém aproximadamente 20 genes). Nesse estudo, cerca de 12 genes foram sequenciados para se identificarem polimorfismos entre as linhagens parentais, tornando possível a identificação do gene da proteína Mpdz, que exibiu um alto grau de polimorfismo, com 18 SNPs, capaz de influenciar a predisposição à dependência fisiológica tanto ao álcool quanto a um barbitúrico.

Outros estudos também conseguiram reduzir o QTL de interesse, a partir de linhagens ISCS a um intervalo de 0,5 Mb, e identificar o gene *Usp46* no cromossomo 5 de camundongos, capaz de influenciar a imobilidade tanto no teste de suspensão da cauda quanto no teste do nado forçado (TOMIDA et al., 2009). Já o gene *Oprm*, responsável por codificar o receptor μ -opióide, no cromossomo 10, também foi identificado a partir do mapeamento prévio do QTL *Mop2*, associado à preferência pela morfina (CRABBE et al., 1999). Em relação à hipertensão, vários genes candidatos também têm sido identificados a partir de linhagens congênicas (GRAHAM et al., 2007), tais como o gene candidato *Hao2* (L-2 hydroxy acid oxidase), localizado no cromossomo 2 de ratos, possivelmente relacionado à pressão arterial sanguínea (LEE et al., 2003).

Recentemente, a partir de um QTL identificado no cromossomo 4 de ratos que preferem (P) e que não preferem (NP) o etanol, foram desenvolvidas linhagens congênicas que, em associação a outras abordagens genéticas tais como a expressão gênica diferencial (*real time PCR*) e a global (*microarray*), permitiram a identificação de genes candidatos para o consumo de etanol, tais como o *Alc22*, relacionado particularmente à preferência ao etanol (CARR et al., 2007). Ainda sobre o cromossomo 4 do rato, outros genes também têm sido identificados, conforme ilustrado no Quadro 3 (página 27).

1.7 Justificativa e Hipóteses

Considerando a alta prevalência de doenças complexas, como a ansiedade, a depressão e o consumo de álcool e o importante papel da interação entre os fatores ambientais e genéticos na predisposição dos indivíduos a esses transtornos, o conhecimento dos mecanismos genéticos envolvidos a partir de diferentes estratégias experimentais torna-se imprescindível.

Após o advento dos métodos clássicos (DARVASI, 1998; LANDER; KRUGLYAK., 1995) a identificação de *loci* (análise de QTL) envolvidos com comportamentos emocionais, Ramos et al. (1999) identificaram uma região no cromossomo 4 do rato, denominada *Ofil1*, que influencia comportamentos relacionados à ansiedade. Entretanto, novas abordagens genéticas, como o desenvolvimento de linhagens semicongênicas e posteriormente congênicas tornam-se necessárias, para confirmar a localização desse QTL, analisar isoladamente sua influência sobre o fenótipo de interesse, verificar possíveis efeitos pleiotrópicos, delimitar o tamanho da região de interesse e, finalmente, auxiliar na busca de genes responsáveis.

Isso posto, algumas hipóteses foram estabelecidas:

- a) o efeito do *locus Ofil1*, de fato, está presente no cromossomo 4 do rato e influencia a locomoção central no CA;
- b) a diferença fenotípica de interesse, entre os animais heterozigotos e os SHR parental (ou seja, a linhagem isogênica pura), pode exibir variações ao longo das gerações, devido à inserção progressiva de alelos SHR e à

perda progressiva de alelos LEW nas demais regiões do genoma, ao longo das gerações;

- c) o *locus Ofil1* é capaz de influenciar comportamentos em outros testes comportamentais relacionados à ansiedade, como a CBP, além de outros fenótipos, como comportamentos relacionados à depressão e ao consumo de álcool, tendo, dessa forma, um efeito pleiotrópico;
- d) o efeito do *locus Ofil1* pode ser observado já nas linhagens semicongênicas N3 e N6, em que os animais serão homocigotos para o alelo LEW no QTL em questão, levando a um aumento na locomoção central do CA, em comparação às linhagens controle;
- e) os fatores ambientais podem interagir com o *locus Ofil1* e alterar o efeito do genótipo nos testes do CA e da CBP.

1.8 Objetivos

1.8.1 Objetivo geral

Desenvolver uma linhagem congênica a partir das linhagens isogênicas LEW e SHR, a fim de produzir futuramente um mapa de alta resolução do QTL *Ofil1* (*open field inner locomotion1*) localizado no cromossomo 4 do rato para estudar as influências desse *locus* em diversos fenótipos associados com a emocionalidade e com o consumo de etanol.

1.8.2 Objetivos específicos

- a) Construir uma linhagem congênica para o *locus Ofil1* utilizando a linhagem LEW como doadora e a linhagem SHR como receptora, para confirmar a exata localização desse QTL, sua interação com um arcabouço genético SHR e sua influência sobre fenótipos associados com a emocionalidade/ansiedade;
- b) caracterizar o fenótipo de todas as gerações (N3 a N10) nos testes comportamentais do CA e da CBP;

- c) produzir linhagens semicongênicas a partir das gerações N3 e N6, para acompanhar a influência do *locus Ofil1*, durante o desenvolvimento da linhagem congênica nos testes do CA, LCE, TNF, CBP e consumo de álcool;

- d) produzir animais totalmente congênicos, a partir do cruzamento de animais heterozigotos da geração N10 e caracterizá-los nos testes do CA e da CBP.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais

A linhagem congênica produzida e apresentada no presente trabalho foi desenvolvida a partir do cruzamento inicial das linhagens isogênicas LEW e SHR, as quais são mantidas em nosso laboratório sob um sistema de acasalamento consanguíneo (irmão/irmã) há mais de vinte gerações. A matriz da linhagem SHR foi obtida na Universidade Federal do Espírito Santo, em Vitória, que por sua vez a obteve na Universidade Estadual Paulista (Unesp), em Botucatu, SP, e é originária da Universidade de Harvard (Boston, MA), enquanto a linhagem LEW, originária da Harlan Spreague Dowley Inc. (Indianápolis, IN), foi obtida na Universidade Estadual de Campinas, SP. Os filhotes provenientes de cada retrocruzamento realizado durante o desenvolvimento da linhagem congênica (SHR.LEW-*Ofil1*) foram desmamados e separados com 28 dias de idade, sendo mantidos em gaiolas de polipropileno (41 cm x 34 cm x 16 cm) com população de 5 ratos por gaiola. Durante o experimento realizado para medir o consumo de etanol e de outras soluções, os ratos permaneceram em gaiolas individuais. Todos os animais foram mantidos em um biotério que possui temperatura controlada (22 ± 2 °C) e ciclo claro/escuro de 12 h (luzes acessas às 7h00), com acesso à água e ração *ad libitum*.

Os experimentos foram desenvolvidos de acordo com as normas locais da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), sob o protocolo N° PP0029/CEUA.

2.2 Estratégia para o Desenvolvimento da Linhagem Congênica: escolha das linhagens doadora e receptora

Antes de se iniciar a produção da linhagem congênica, era necessário escolher, entre as linhagens LEW e SHR, qual seria a linhagem receptora, aquela responsável pelo fornecimento do arcabouço genético, e a doadora, aquela responsável por fornecer o *locus* diferencial (região de interesse) a ser estudado.

A partir de estudos anteriores, Ramos et al. (1999), ao utilizarem uma análise de QTL, identificaram o *locus Ofil1* que na presença de alelos LEW, produzia um aumento da locomoção central do teste do CA em uma geração segregante (F2), oriunda de um cruzamento entre as linhagens LEW e SHR.

Originalmente, a linhagem LEW exibe baixa locomoção central no teste do CA, quando comparada com a linhagem SHR (HINOJOSA et al., 2006; RAMOS et al., 1997, 1998). Portanto, seria esperado que alelos LEW no *locus Ofil1* ao serem inseridos em um arcabouço genético SHR produzissem escores ainda mais altos de locomoção central em comparação à linhagem receptora pura SHR, caso o *locus Ofil1*, de fato, fosse responsável por esse fenótipo.

A possibilidade alternativa seria a linhagem SHR ser a doadora e a linhagem LEW a receptora. Entretanto, ao serem inseridos em um arcabouço genético LEW, que exibe normalmente taxas muito baixas de locomoção central no CA, se esperaria que os alelos SHR diminuíssem ainda mais a locomoção central o que poderia ser impossível caso ocorresse um fenômeno de “piso.”

Com base nos argumentos acima, optou-se por desenvolver os retrocruzamentos conforme a primeira possibilidade, ou seja, a linhagem LEW foi escolhida para ser a doadora, e a linhagem SHR, a receptora.

2.3 Desenvolvimento da Linhagem Congênica

Iniciou-se o desenvolvimento da linhagem congênica a partir do cruzamento de fêmeas provenientes da linhagem LEW (doadora) e machos da linhagem SHR (receptora), gerando animais híbridos F1, que foram então retrocruzados com a linhagem receptora SHR, que originou a geração N2 (NX representando o número de retrocruzamentos, incluindo o cruzamento inicial (JAX, 2009). A partir desta geração, os ratos foram genotipados com três marcadores moleculares, *D4Mgh6*, 135 Mb; *D4Rat76*, 85 Mb; e *D4Mgh11*, 171 Mb para regiões microssatélites polimórficas que flanqueiam o *locus Ofil1* (seleção positiva), a fim de selecionar animais heterozigotos para a região de interesse, *Ofil1*. Machos e fêmeas heterozigotos da geração N2 foram retrocruzados com ratos da linhagem parental SHR, dando origem à geração N3, que, além de ser submetida à seleção positiva, também passou por uma seleção negativa, ou seja, marcadores moleculares distribuídos ao longo do genoma, um marcador para cada cromossomo, foram utilizados para selecionar os animais com a maior porcentagem do genoma proveniente da linhagem receptora (SHR), exceto para o *locus* diferencial. Utilizaram-se os marcadores *D1Mgh2*, *D2Wox8*, *D3Mgh9*, *D5Mgh2*, *D6Mit1*, *D7Rat32*, *D8Mgh4*, *D9Mgh5*, *D10Mgh13*, *D11Mit4*, *D12Mgh5*, *D13Mit4*, *D14Mgh1*,

D16Mit3, *D17Mgh5*, *D18Mgh4*, *D19Mgh3* e *D20Mhg2* para a seleção negativa. Em seguida, machos e fêmeas da geração N3, heterozigotos para o *locus Ofil1* (seleção positiva) e com porcentagem de homozigose (SHR) acima de 70% no restante do genoma (seleção negativa), foram retrocruzados com ratos SHR, originando a geração N4, que também foi submetida às seleções positiva e negativa, com os mesmos marcadores utilizados na geração anterior, sendo selecionados machos e fêmeas com porcentagem de homozigose acima de 90% no restante do genoma e, em seguida, retrocruzados com ratos SHR, dando origem à geração N5. A partir desta geração até a obtenção da geração N10, somente a seleção positiva continuou a ser aplicada, não sendo mais realizada a negativa.

A cada geração (N3 a N10), animais heterozigotos e homozigotos SHR foram avaliados nos testes do CA e da CBP com idades entre 11 e 12 semanas.

Na geração N10, os animais heterozigotos para o *locus Ofil1* foram intercruzados, a fim de se obter a primeira geração de animais N10F1 homozigotos (animais que possuem um arcabouço genético de aproximadamente 99,9% de alelos SHR e apenas a região de *Ofil1* em homozigose, proveniente da linhagem doadora LEW). Esses animais foram submetidos à seleção positiva, agora com os marcadores *D4Rat76*, *D4Mgh6* e *D4Rat59*. Em função do aparecimento de inúmeras dificuldades metodológicas quanto a genotipagem tanto em gel de agarose quanto em gel de poliacrilamida, o marcador *D4Mh11* foi substituído pelo *D4Rat59*, porque este era o único marcador polimórfico que se localizava no intervalo entre os marcadores *D4Mgh6* e *D4Mh11* disponível em nosso laboratório.

Devido ao baixo número de animais N10F1 homozigotos LEW para os três marcadores citados, tornou-se inviável a avaliação deles em qualquer teste comportamental e, por esse motivo, optou-se por testar apenas os animais N10F1

homozigotos LEW para o marcador *D4Mgh6*, que localiza-se no pico do QTL *Ofil1*, previamente identificado por Ramos et al.(1999) (Figura 2). Estes animais foram então avaliados no teste do CA e da CBP com 11 semanas de idade e um intervalo de 24 h foi mantido entre os testes comportamentais. A Figura 3 ilustra um esquema representativo das etapas de produção da linhagem congênica (SHR.LEW-*Ofil1*), e o Quadro 4 ilustra o número de casais utilizados em cada retrocruzamento.

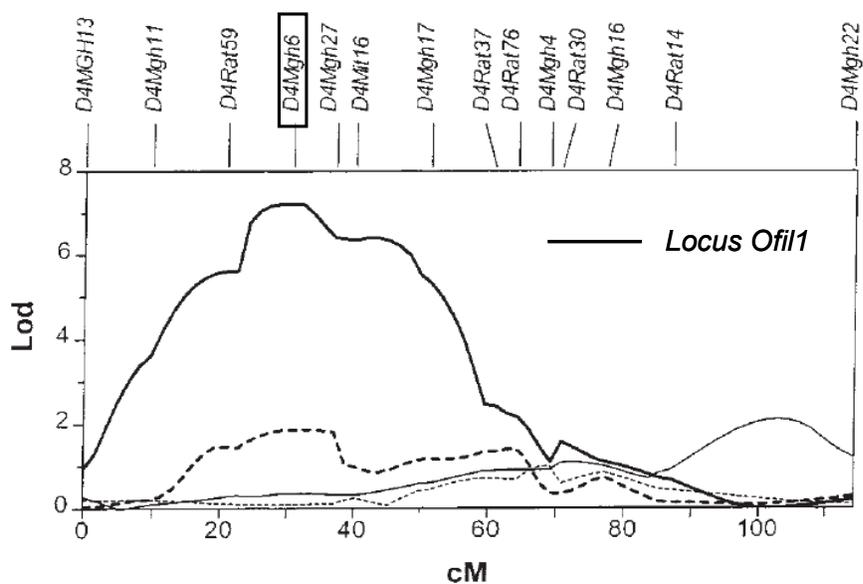


Figura 2: QTL significativo para a locomoção central do campo aberto identificado por Ramos et al. (1999). Este locus foi denominado *Ofil1* (open field inner locomotion) e o marcador molecular *D4Mgh6* representa o pico deste QTL.

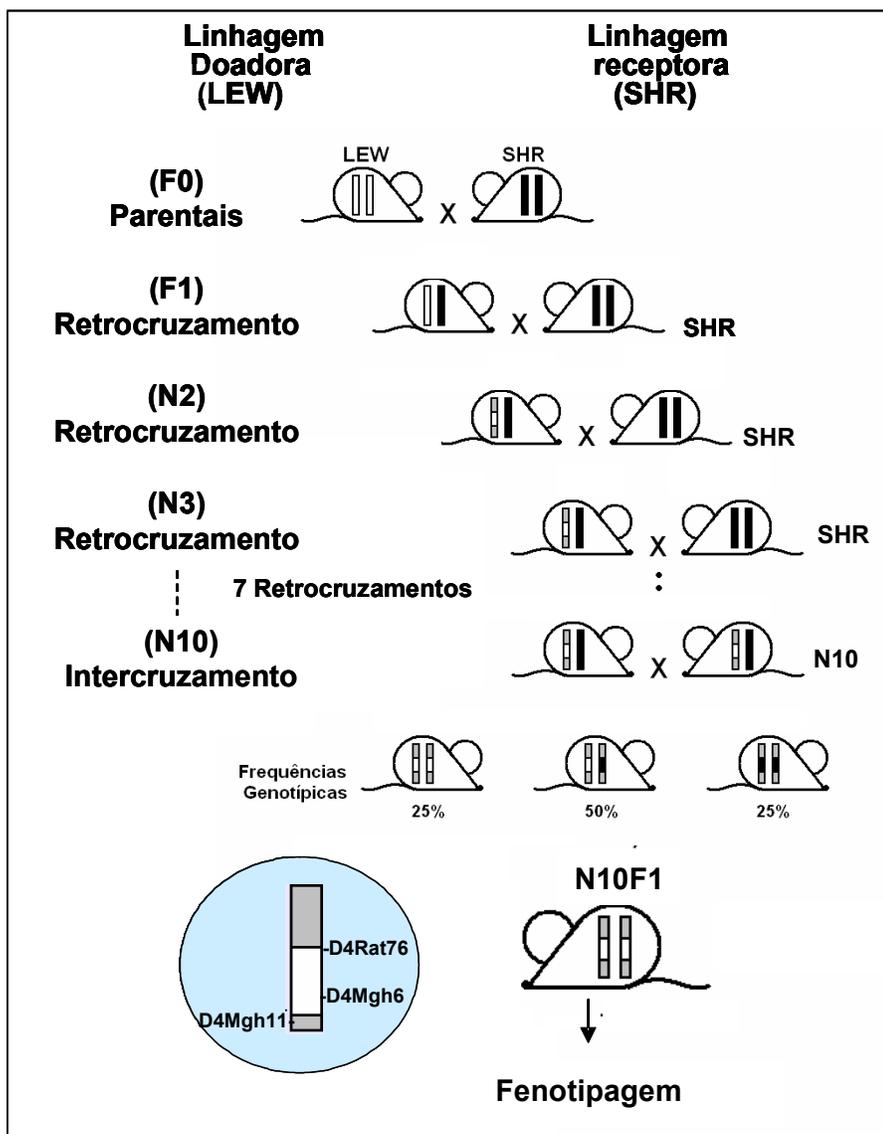


Figura 3 – Esquema representativo dos cruzamentos realizados durante o desenvolvimento da linhagem congênica. As linhagens LEW e SHR inicialmente foram inter cruzadas e originaram uma geração híbrida F1 heterozigota. Esses animais foram então retrocruzados com a linhagem receptora (SHR), originando a geração N2 e genotipada para três marcadores moleculares na região de *Ofil1*, sendo os animais heterozigotos novamente retrocruzados com a linhagem receptora, dando origem à geração N3, e assim sucessivamente, até a geração N10. Ratos heterozigotos da geração N10 foram novamente genotipados e posteriormente inter cruzados, sendo seus descendentes homozigotos LEW para o *locus Ofil1* (N10F1) e fenotipados em diferentes testes comportamentais. As regiões cromossômicas representadas em cinza referem-se a regiões do cromossomo 4, nas quais não houve um controle genotípico, além de ainda poder haver alguns alelos LEW devido a possíveis recombinações.

Quadro 4 – Quadro referente ao número de casais formados por animais heterozigotos e SHR, utilizados a cada geração do desenvolvimento da linhagem congênica.

Geração	Cruzamentos	Nº Casais
Parentais	LEW x SHR	(*) 8
F1	LS x SHR	16
N2	LS x SHR	12
N3	LS x SHR	15
N4	LS x SHR	17
N5	LS x SHR	19
N6	LS x SHR	16
N7	LS x SHR	20
N8	LS x SHR	23
N9	LS x SHR	20
N10	LS x LS	10

(*) Para o cruzamento inicial entre as linhagens parentais LEW e SHR utilizaram-se 8 fêmeas LEW e 8 machos SHR. Nos demais cruzamentos, o número de casais representa o número de animais heterozigotos (sendo a metade dos animais machos, e a outra metade, fêmeas) retrocruzados com animais SHR parental.

2.4 Produção de Linhagens Semicongênicas a partir da Geração N3 e da Geração N6

Em paralelo ao desenvolvimento da linhagem congênica descrito no item 2.3, duas linhagens semicongênicas a partir da geração N3 e duas a partir de N6 foram produzidas.

Animais heterozigotos da geração N3 (seleção positiva) que possuíam uma porcentagem de homozigose de alelos SHR no restante do genoma acima de 70% (seleção negativa) foram, então, os fundadores de duas linhagens semicongênicas, sendo uma homozigota para o alelo LEW e a outra homozigota para o alelo SHR para os marcadores *D4Mgh6* e *D4Rat76*. No período inicial da produção das linhagens semicongênicas N3, a genotipagem não foi realizada para o *D4Rat59*, entretanto, ao final da terceira geração de intercruzamentos necessários para a obtenção de um número suficiente de animais optou-se por verificar o genótipo desses ratos para o referido marcador. Infelizmente, nessa fase, como a maioria do DNA armazenado apresentava sinais de degradação, houve dificuldade na obtenção de um produto de PCR adequado, o que prejudicou o processo de genotipagem. Por esse motivo, a produção das duas linhagens semicongênicas N3 limitou-se à obtenção de animais homozigotos somente para os marcadores *D4Mgh6* e *D4Rat76*.

Em seguida, três sucessivas gerações N3F1, N3F2 e N3F3 provenientes de intercruzamentos entre animais homozigotos LEW, para o locus *Ofil1*, foram produzidas e utilizadas nos testes comportamentais. Os mesmos intercruzamentos aconteceram para a linhagem homozigota SHR. Animais de todos os grupos foram testados com idades entre 9-11 semanas. A primeira geração N3F1 foi avaliada no

teste do CA (baixa iluminação – 10 lux), no LCE, na CBP e no TNF, nessa ordem, com um intervalo de 24 h entre os testes. Todos esses testes foram realizados entre 13h30 e 18h00. A segunda geração N3F2 foi testada em um protocolo de sacarina, quinino e consumo de álcool, e a terceira N3F3 foi submetida ao teste do CA com alta iluminação (530 lux), tanto às 10h00 (fase clara), quanto à 1h00 (fase escura).

Em relação à linhagem semicongênica desenvolvida a partir da geração N6, é importante dizer que durante a genotipagem desses animais, o marcador *D4Mgh11* foi substituído pelo *D4Rat59*, pelos motivos explicados anteriormente. Assim, todos os animais homozigotos LEW (N6) foram genotipados para os marcadores *D4Mgh6*, *D4Rat76* e *D4Rat59*. Devido a problemas de fertilidade, cerca de quatro gerações (N6F1, N6F2, N6F3 e N6F4) foram necessárias para a obtenção de um número suficiente de animais homozigotos, para os três marcadores, para que os testes comportamentais pudessem ser realizados. Entretanto, os testes comportamentais CA, LCE e CBP foram realizados somente com animais N6F4 homozigotos LEW resultantes da quarta geração. Simultaneamente à produção dos N6F4, animais das linhagens parentais LEW e SHR foram produzidos e utilizados como grupos controle. Os ratos de todos os grupos (10-11 semanas de idade) foram submetidos ao teste do CA (iluminação de 10 lux), ao LCE e a CBP, consecutivamente, com um intervalo de 24 h entre os testes. Entre cada geração de animais homozigotos N6F1, N6F2, N6F3 e N6F4, houve um intervalo de 3 a 4 meses. O número de animais homozigotos LEW produzidos a partir das gerações N3 e N6 e de seus respectivos controles, avaliados nos diferentes testes comportamentais, encontra-se descrito na sessão de resultados.

2.5 Extração de DNA e Genotipagem

A extração de DNA foi realizada a partir de um pequeno fragmento tissular da cauda de cada rato (cerca de 5 mm), seccionada por volta de 28 a 30 dias de idade, com uma tesoura cirúrgica, sendo essa extração realizada com o auxílio de um *kit* comercial (DirectPCR Lysis Reagent (*tail*), Viagem Biotech Inc.), conforme instruções do fabricante. Utilizou-se um spray antisséptico contendo 21 mg/mL de cloridrato de lidocaina e 1,33 mg/mL de cloreto de benzetônio (Salvelox, São Paulo, Brasil) para profilaxia. O DNA extraído foi submetido à reação em cadeia da polimerase (PCR), realizada no termociclador *Px2 Thermo Cyclor* (Hybaid, EUA), utilizando-se *primers* para cada um dos marcadores moleculares polimórficos usados (ver sessões anteriores). As sequências nucleotídicas dos pares de *primers*, para cada um dos marcadores, estão descritas no Quadro 5. As temperaturas de anelamento dos *primers* encontram-se disponíveis no site Rat Genome Database (RGD, 2009).

Quadro 5 – Sequências nucleotídicas (5'-3') dos pares de *primers* (Forward e Reverse) para cada um dos 22 marcadores polimórficos utilizados na seleção positiva (*) e negativa durante o desenvolvimento da linhagem congênica (SHR.LEW-Ofil1)

Marcadores	Sequências nucleotídicas	Cromossomos
<i>D1Mgh2</i>	Forward: ACCTGGATGGGCCTCTGT Reverse: TGCATCAATAAAACCCTAACTGG	1
<i>D2Wox8</i>	Forward: GGAATTCAGAGACCTGTC Reverse: CTCCAATCTCTAAATCTCCC	2
<i>D3Mgh9</i>	Forward: GTATCTCTTATTCTGTGGGCTGG Reverse: CCCCTATGAGTTTTAATGATCCC	3
<i>D4Mgh6*</i>	Forward: GACATTTGGCGGAGCCTAAC Reverse: TAACTCCAGCAGGGTGACACAG	4
<i>D4Rat76*</i>	Forward: GTTAAGGAACCATGGGCTGA Reverse: GTATGTTTCCTTCCCTGCCCC	4
<i>D4Mgh11*</i>	Forward: CTCAACGAACAGGTTTTATTATG Reverse: AGAAGGGATGACAATTGGTACG	4
<i>D4Rat59*</i>	Forward: GCGGAATGATAGTTACTACGGC Reverse: GCAGTGTGTTTGGGGTAGCT	4
<i>D5Mgh2</i>	Forward: TACCTAGGAAGCGCAAGGC Reverse: AGCTTGGCTACAGCATGGTT	5
<i>D6Mit1</i>	Forward: TAGGAGAGAACTGAAAGTTGTCC Reverse: ATGGTGC ACTATGGTGGTCA	6
<i>D7Rat32</i>	Forward: TTCATTGTATCTCCTCCCGG Reverse: CAGAGTGAATGCAGGTGAA	7
<i>D8Mgh4</i>	Forward: AGTTAACCCAACA ACTCTAAGCC Reverse: CCCAATGCAGCAGTCTACA	8
<i>D9Mgh5</i>	Forward: CAAGGCAAACTAAATGAACTCA Reverse: TTGTTGATTTGAAAGGTCATTCC	9
<i>D10Mgh13</i>	Forward: TGTTCAGGTGGGACTGAA Reverse: TGTGAGCACAGGAACACACA	10
<i>D11Mit4</i>	Forward: CATCATATTA ACTGCAGGTGGTG Reverse: ATAAATCCAAACAATCGAGAGAA	11
<i>D12Mgh5</i>	Forward: CCACCCCTCAACTTGTGG Reverse: TGAAGAGTTTAAAGCACAGGAGG	12
<i>D13Mit4</i>	Forward: CACACATATTCACAAAGAAACACA Reverse: AGAAGGGAGACTCACTGATTACC	13
<i>D14Mgh1</i>	Forward: GAAGGTTTTTGTATCGTTCTGG Reverse: CCTTGTGGTGAACAGCACC	14
<i>D16Mit3</i>	Forward: ATAAATATCCACACACGCATGG Reverse: GTGACGTTACAGAAGCAACA	16
<i>D17Mgh5</i>	Forward: ATGGAGTGTGGACTGAAAATTG Reverse: CACCATGGTACAACCCAG	17
<i>D18Mgh4</i>	Forward: CCTAGGCAGTAGTTACCATGTGC Reverse: TGTTTCTGTTGCCCTCGAG	18
<i>D19Mgh3</i>	Forward: TAAGAGAAGCAAGGCAAGGC Reverse: CCCTTGAGCATGCACACATA	19
<i>D20Mgh2</i>	Forward: CCTAGGCAGTAGTTACCATGTGC Reverse: TGTTTCTGTTGCCCTCGAG	20

Fonte: Rat Genome Database

Os marcadores *D4Rat76*, *D4Rat59* e *D4Mgh11* flanqueiam a região do *locus Ofil1* (*locus* diferencial), enquanto o *D4Mgh6* localiza-se no pico deste QTL. Os demais marcadores da seleção negativa encontram-se distribuídos por todos os demais cromossomos. A Figura 4 ilustra os marcadores utilizados nas diferentes abordagens genéticas: desenvolvimento da linhagem congênica através de retrocruzamentos (N3 a N10), linhagens semicongênicas N3 (N3F1, N3F2 e N3F3) e linhagem semicongênica N6 (N6F4).

A solução submetida à PCR continha um volume de 20 μL , sendo 0,4 μL de DNA genômico, 4,6 μL de água Milli-Q, 5 μL (66 μM) de cada *mix* de *primers* e 0,076 μL (0,038 unidade) de enzima Taq polimerase (Promega, Charbonnière, França), em 10 μL de tampão PCR 2x (Promega Green Gotac, Charbonnière, França). A amplificação foi realizada com a seguinte programação: (a) um ciclo a 96 °C por 5 min; (b) trinta e cinco ciclos a 92 °C por 30 s, 58-60 °C (conforme o marcador) por 1 min e 72 °C por 31 s; e (c) um ciclo a 72 °C por 2 min. Por fim, as bandas resultantes dos produtos da PCR, formadas por variantes de tamanhos já conhecidos para os diferentes marcadores, foram separadas em eletroforese em gel de agarose a 3%, visualizados com brometo de etídio sob luz ultravioleta, genotipadas e fotodocumentadas. A Figura 5 ilustra todas as etapas metodológicas, desde a obtenção do tecido da cauda até o resultado em gel de agarose a 3%.

Destaca-se que, devido à metodologia dos retrocruzamentos, durante a genotipagem das gerações N3 a N10, não existiram animais homozigotos para o alelo LEW, sendo somente encontrados no *locus* diferencial animais homozigotos SHR ou animais heterozigotos (Figura 6). Já durante a produção de animais homozigotos provenientes das gerações N3, N6 e N10, era possível encontrar três genótipos: homozigotos LEW, homozigotos SHR ou heterozigotos LEW-SHR (Figura 7).

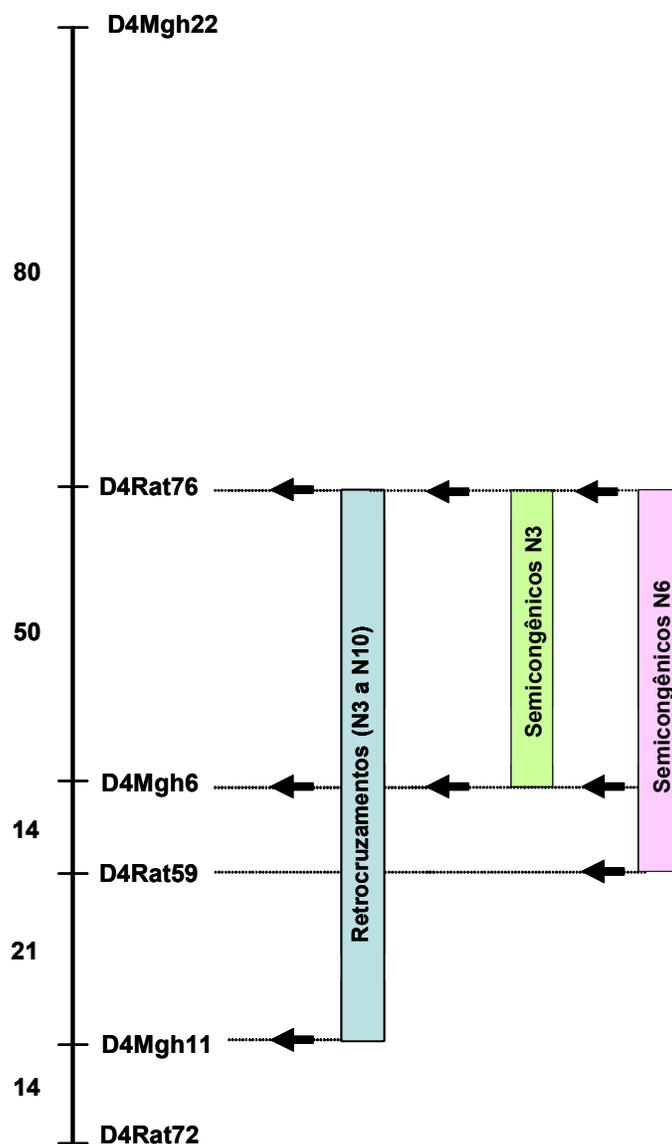


Figura 4 – Mapa genético do cromossomo 4 do rato com os marcadores utilizados na seleção positiva das diferentes abordagens genéticas utilizadas: desenvolvimento da linhagem congênica através de retrocruzamentos (N3 a N10), linhagens semicongênicas N3 (N3F1, N3F2, N3F3) e linhagem semicongênica N6 (N3F4). A distância dos marcadores está representada em megabases (Mb) de acordo com o RGD (2009).

A Figura 5 ilustra todas as etapas metodológicas, desde a obtenção do tecido da cauda até o resultado em gel de agarose a 3%.

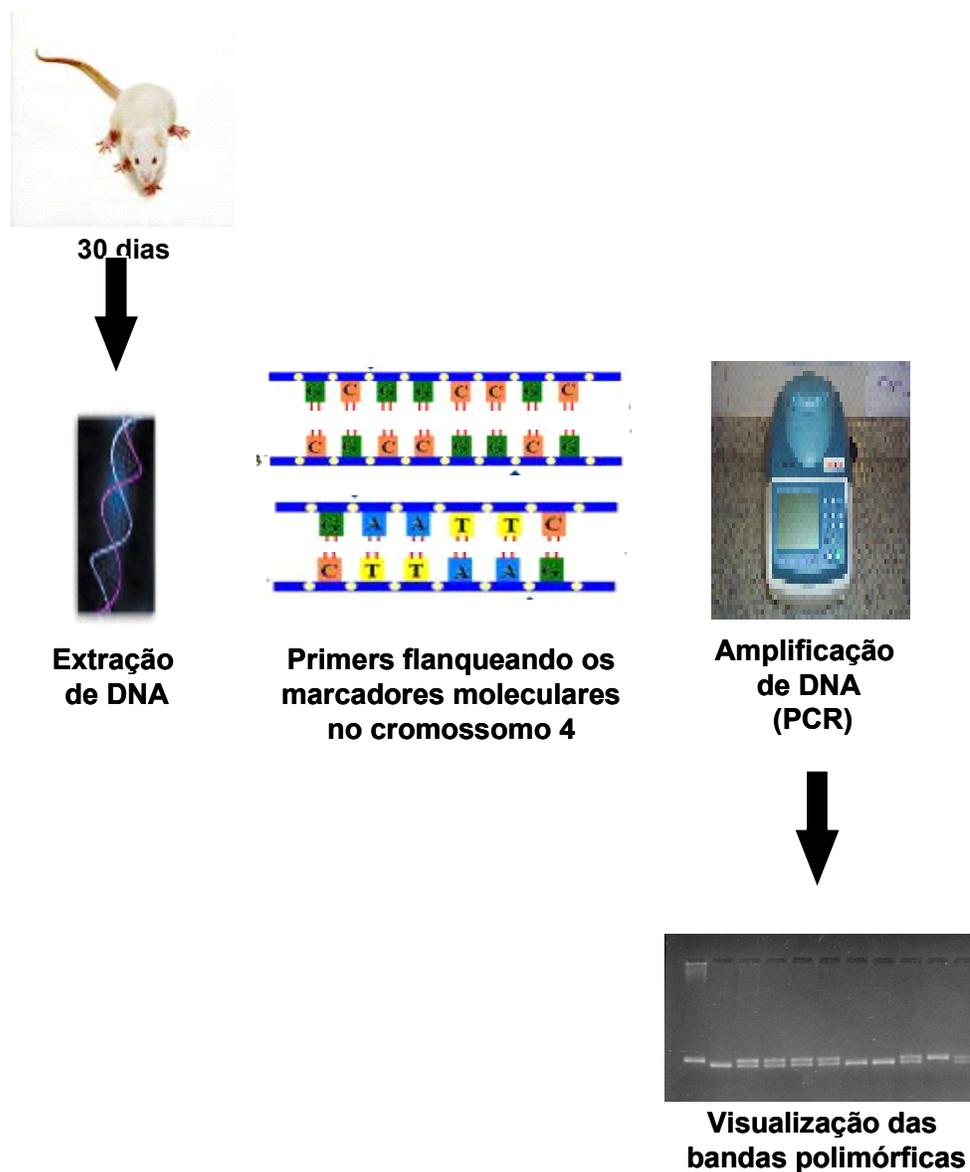


Figura 5 – Esquema dos procedimentos realizados desde a extração de DNA até a genotipagem das bandas polimórficas. DNA extraído a partir de um fragmento tissular da cauda do rato e amplificado pela reação em cadeia da polimerase (PCR) para diferentes marcadores moleculares, separados em gel de agarose a 3%, por eletroforese, e visualizados com brometo de etídeo sob luz ultravioleta.

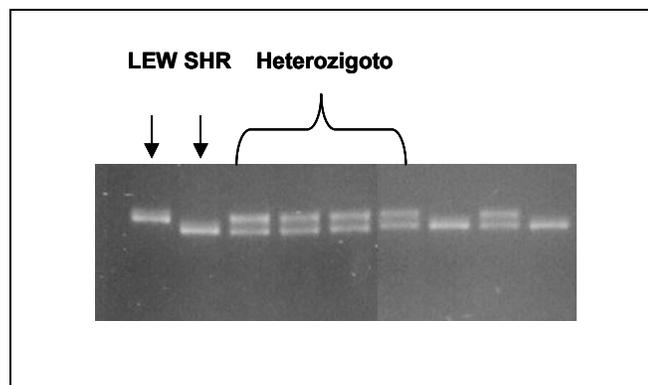


Figura 6 – Diferentes genótipos obtidos durante os retrocruzamentos entre ratos heterozigotos e a linhagem receptora SHR (N3 a N10). Genotipagem de ratos heterozigotos provenientes da geração N6. Os dois primeiros poços possuem produtos de PCR controle, resultantes das linhagens parentais LEW (homozigotos LEW-banda alta) e SHR (homozigotos SHR-banda baixa) respectivamente, para o marcador *D4Mgh6* localizado no pico do QTL *Ofil1*. Os demais poços referem-se aos produtos de PCR dos animais cujo genótipo está sendo analisado, neste caso animais com alelos heterozigotos (duas bandas) ou homozigotos SHR. (banda baixa).

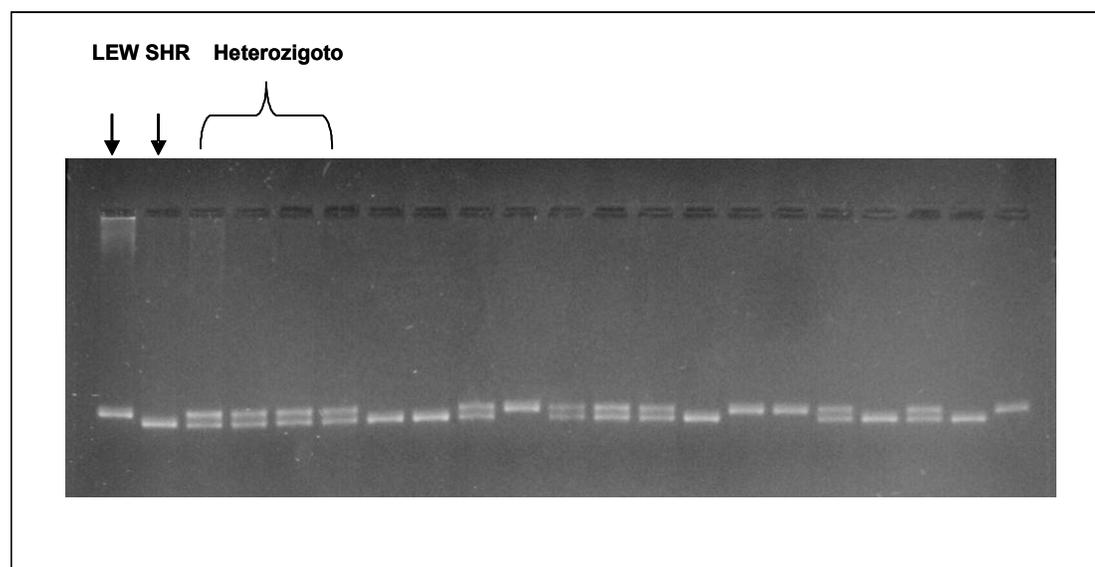


Figura 7 – Diferentes genótipos obtidos a partir do intercruzamento de animais heterozigotos da geração N10 para o marcador *D4Mgh6*. Os dois primeiros poços possuem produtos de PCR controle, resultantes das linhagens parentais LEW (homozigotos LEW-banda alta) e SHR (homozigotos SHR-banda baixa) respectivamente, para o marcador *D4Mgh6* localizado no pico do QTL *Ofil1*. Os demais poços referem-se aos produtos de PCR dos animais cujo genótipo está sendo analisado, neste caso animais com alelos heterozigotos (duas bandas), homozigotos SHR (banda baixa) e homozigotos LEW (banda alta).

2.6 Testes Comportamentais

2.6.1 Teste do campo aberto

O teste do CA, desenvolvido em 1934 por Calvin Hall (WEISS; GREENBERG, 1998), é considerado um teste clássico para medidas de emocionalidade em roedores (RAMOS; MORMEDE, 1998) e um dos mais populares do mundo (RAMOS, 2008). O aparato, ilustrado na Figura 8, consiste em uma arena de paredes e fundo brancos, medindo 1,0 m x 1,0 m de área, com 40 cm de altura. O fundo da arena é dividido em vinte e cinco quadrados de 20 cm x 20 cm delimitados por linhas pretas, sendo os quadrados adjacentes às paredes considerados a região periférica do aparato, e os demais, a região central. Cada animal foi posicionado no centro do aparato (10 lux), e o número de cruzamentos realizados na região periférica e central e o tempo gasto na região central foram quantificados durante 5 min. Entre essas medidas, a locomoção e a defecação são consideradas clássicas de emocionalidade (quanto maiores os escores de locomoção, menores os escores da defecação) em roedores, uma vez que o animal é submetido a um ambiente desconhecido (GRAY, 1979).



Figura 8 – Teste do campo aberto

2.6.2 Teste da caixa branca e preta

O teste da CBP é um aparato composto de dois compartimentos separados por uma parede: um branco, fortemente iluminado (660 lux), medindo 27 cm x 27 cm, cujo chão é dividido em nove quadrados (9 cm x 9 cm); e outro preto, iluminado por uma lâmpada vermelha (20 lux), medindo 27 cm x 18 cm, cujo chão é dividido em seis quadrados (9 cm x 9 cm), ambos cercados por paredes de 27 cm de altura, conforme ilustrado na Figura 9. A parede que divide os dois compartimentos e possui uma pequena abertura de 7 m x 7 cm no centro.

Nesse teste, cada rato foi inicialmente posicionado no compartimento branco e observado por 5 min, sendo registrados os seguintes comportamentos: locomoção no compartimento branco, tempo no compartimento branco e no preto e o número de transições realizadas entre os compartimentos branco e preto. Considera-se que o nível de exploração no compartimento branco e o número de transições entre os compartimentos sejam dependentes do nível de “ansiedade” do animal (CRAWLEY, 1981).

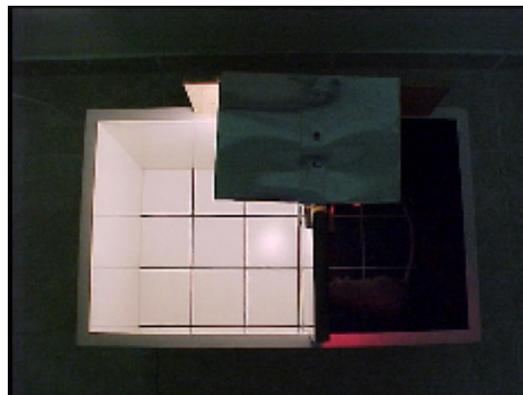


Figura 9 – Teste da caixa branca e preta

2.6.3 Teste do labirinto em cruz elevado

O teste do LCE consiste em um labirinto em cruz com quatro braços dispostos perpendicularmente: dois braços opostos fechados por paredes de 40 cm de altura e dois braços abertos. Na intersecção dos braços fechados e abertos, há uma plataforma central (10 cm x 13,5 cm), com uma iluminação de 10 lux, que oferece acesso a qualquer um dos quatro braços. Cada animal foi colocado na plataforma central com a face voltada para um braço aberto. Em seguida, alguns comportamentos foram registrados por 5 min, tais como a porcentagem de entradas e a porcentagem de tempo nos braços abertos, o número de entradas e o tempo gasto (com as quatro patas) dentro dos braços fechados. Assim, os animais que permanecerem menos tempo ou que frequentarem menos vezes os braços abertos do LCE serão considerados mais “ansiosos” (PELOW et al., 1985).



Figura 10 – Teste do labirinto em cruz elevado

2.6.4 Teste do nado forçado

O TNF consiste em colocar os ratos, individualmente, em um cilindro de vidro de 40 cm de altura e 18 cm de diâmetro, com 30 cm de água, à temperatura de 24-26 °C, por 15 min (pré-teste). Vinte e quatro horas mais tarde, esses mesmos animais são submetidos novamente ao teste, por mais 5 min, durante os quais são medidos o tempo de imobilidade (tempo que o animal permanece flutuando e/ou apenas com movimentos estritamente necessários para manter a cabeça fora da água) e o número de defecações. Entre essas medidas, o tempo de imobilidade parece ser a melhor medida comportamental para avaliar comportamentos relacionados à depressão. A iluminação da sala de testes, durante o experimento, era de 10 lux. O TNF tem por finalidade validar o efeito antidepressivo de drogas, uma vez que estas reduzem o tempo de imobilidade dos animais (HINOJOSA et al., 2006; PORSOLT et al., 1978).



Figura 11 – Teste do nado forçado

2.6.5 Testes de consumo

O protocolo utilizado para avaliar o consumo de álcool, quinino e sacarina foi padronizado e adaptado a partir de trabalhos anteriores (CHIAVEGATTO et al., 2009; TERENINA-RIGALDIE et al., 2003a, 2003b; VENDRUSCOLO et al., 2006a), com uma duração total de 22 dias. Iniciaram-se os testes de consumo após um período de 2 dias de adaptação, em que estava disponível somente uma garrafa de água. Os animais estavam alojados individualmente em gaiolas de polipropileno (21 cm x 28 cm x 19 cm), com maravalhas distribuídas no chão e tampa de aço inox.

Após o período de habituação, os animais tiveram livre escolha entre duas garrafas, uma com água e outra com quinino (2 $\mu\text{mol/L}$, quinino, ICN Biomedicals, Solon, Ohio, EUA) durante dois dias consecutivos. O consumo diário de cada solução foi medido sempre a partir das 15h00, por meio da pesagem das garrafas, que, em seguida, eram alternadas. A troca de posição das garrafas era realizada para que não houvesse influência da posição delas no consumo da solução. Os dados foram expressos em relação à preferência do animal pela solução em relação ao consumo total de líquido [(consumo da solução dividido pela consumo total de líquido) multiplicado por 100]. O mesmo protocolo foi utilizado para avaliar o consumo de livre escolha entre a água e a sacarina (7,5 mmol/L, sal sódico, Vetec Laboratórios, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). O consumo de sacarina e quinino (controles gustativos) foi avaliado para investigar a preferência dos animais por líquidos novos (busca pela novidade).

As soluções de etanol utilizadas neste protocolo foram preparadas a partir de etanol PA a 95% (Laboratório Nuclear, São Paulo, SP, Brasil). Após a exposição

dos animais ao consumo de sacarina, eles foram avaliados durante 10 dias quanto ao consumo de livre escolha entre o etanol a 10% (v/v) e a água. Imediatamente após esse período, os animais foram expostos a 6 dias de livre escolha entre o etanol (5%, 10% e 15%) e a água (2 dias para cada concentração). O consumo total de cada solução foi medido a cada 2 dias, a partir das 15h00, por meio da pesagem das garrafas. Durante a pesagem, os animais permaneceram sem nenhum tipo de líquido para consumo. Para evitar qualquer tipo de efeito quanto à posição das garrafas, estas foram trocadas cuidadosamente a cada 2 dias. Os pesos corporais foram registrados a cada 4 dias, e os dados foram apresentados como a média de consumo de álcool durante 2 dias em gramas de álcool por dia por quilograma de peso corporal.

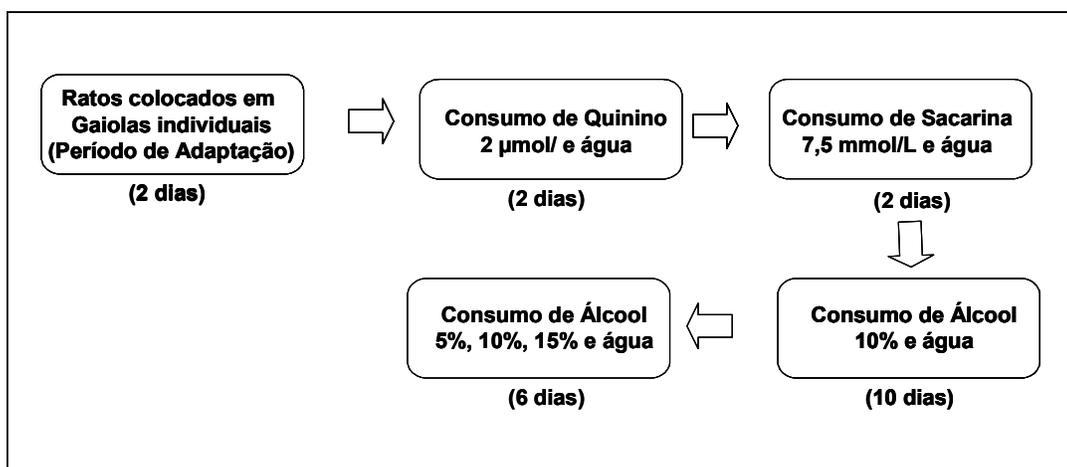


Figura 12 – Sequência do protocolo experimental para os testes de consumo de quinino, sacarina e álcool.

2.7 Análise Estatística

Os dados comportamentais obtidos a partir dos testes do CA e da CBP nas gerações N3 a N10 foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) de duas vias para os fatores sexo e genótipo (para cada geração separadamente), sendo calculados a média e o erro padrão da média dos animais de cada genótipo, heterozigotos (LS) ou homozigotos SHR, de ambos os sexos. Também se aplicou a ANOVA de duas vias para os mesmos fatores, acima citados, para as linhagens semicongênicas obtidas a partir da geração N3 para os testes do CA (10 lux), da CBP, do LCE e do TNF. Já no teste do CA (530 lux), a análise foi realizada separadamente para machos e fêmeas, sendo aplicada a ANOVA de duas vias para os fatores genótipo e hora do teste (10h00 vs. 01h00). No teste de livre escolha entre álcool e água em diferentes concentrações, compararam-se os dados entre as linhagens utilizando uma ANOVA de duas vias (sexo e genótipo) para medidas repetidas. Na linhagem semicongênica N6 e nos animais homozigotos obtidos a partir da geração N10, novamente foi aplicada uma ANOVA de duas vias (fatores sexo e genótipo), seguida do teste de comparação de médias (*post hoc*) Newman-Keuls, uma vez que, nesses animais, duas outras linhagens controle LEW e SHR também foram analisadas. Consideraram-se significativos valores de p menores que 0,05. Todas as análises foram realizadas com o software *Statistica* 6.0 (Statsoft, França, 2006).

3 RESULTADOS

3.1 Desenvolvimento de uma Linhagem Congênica

Como já explicado anteriormente, a cada geração (N3 a N10), animais heterozigotos para o *locus Ofil1* foram retrocruzados com animais SHR parental. O Quadro 6 ilustra o número de filhotes machos e fêmeas obtidos a cada geração. O Quadro 7 ilustra um número aproximado de genotipagens realizadas nas diferentes estratégias genéticas desenvolvidas neste trabalho.

Quadro 6 – Número de filhotes machos e fêmeas obtidos a cada retrocruzamento.

Geração	Cruzamentos	Total filhotes	Machos	Fêmeas
Parentais	LEW x SHR	100 (F1)	53	47
F1	LS x SHR	120 (N2)	58	62
N2	LS x SHR	126 (N3)	61	65
N3	LS x SHR	101 (N4)	48	53
N4	LS x SHR	116 (N5)	57	59
N5	LS x SHR	139 (N6)	84	55
N6	LS x SHR	114 (N7)	50	64
N7	LS x SHR	117 (N8)	64	53
N8	LS x SHR	101 (N9)	48	53
N9	LS x SHR	160 (N10)	85	75
N10	LS x LS	80	35	45
	TOTAL	1.274	643	631

LS: Animais heterozigotos para o *locus Ofil1*.

Quatro 7: Número de genotipagens realizadas durante as diferentes abordagens genéticas.

NÚMERO DE GENOTIPAGENS	
Desenvolvimento da linhagem congênica (N3 a N10)	7.728
Linhagens semicongênicas N3	510
Linhagens semicongênicas N6	450
Animais Homozigotos N10	240
TOTAL	8.928

3.2 Resultados Comportamentais

3.2.1 Gerações N3 a N10

Os resultados apresentados nas Figuras 13 a 16 referem-se às variáveis comportamentais no CA e CBP provenientes de animais heterozigotos e homozigotos SHR, para o *locus Ofil1*, selecionados a cada retrocruzamento (geração N3 a N10). As medidas comportamentais do teste do CA estão ilustradas nas Figuras 13 a 14, e as da CBP, nas Figuras 15 a 16. Já a Figura 17 refere-se às medidas de locomoção central e tempo gasto no centro do CA obtidas a partir de uma análise estatística realizada com todos os animais de todas as gerações. O

Quadro 8 ilustra o número de animais heterozigotos e homozigotos SHR para o *locus Ofil1* utilizado nos testes comportamentais do CA e da CBP das gerações N3 a N10.

Quadro 8 – Número de animais heterozigotos e homozigotos SHR para o *locus Ofil1* utilizado nos testes comportamentais do CA e da CBP das gerações N3 a N10.

Geração	Machos		Fêmeas	
	LS	SS	LS	SS
N3	6	9	10	10
N4	13	14	14	12
N5	17	11	20	16
N6	19	20	14	14
N7	10	10	11	11
N8	11-12	16	10	11
N9	18	10	8	9
N10	21	14	16	6
TOTAL	412 animais			

A ANOVA de duas vias revelou efeitos significativos para o fator sexo. As fêmeas de ambos os genótipos exibiram maiores escores em comparação aos machos para as medidas de locomoção central nas gerações N4 [$F_{(1,49)}=21,84$; $p<0,001$], N5 [$F_{(1,60)}=20,0$; $p<0,001$], N6 [$F_{(1,63)}=36,74$; $p<0,001$], N7 [$F_{(1,38)}=24,72$; $p<0,001$], N8 [$F_{(1,45)}=28,92$; $p<0,001$], N9 [$F_{(1,41)}=14,83$; $p<0,001$] e N10 [$F_{(1,53)}=5,42$; $p<0,05$]; e periférica nas gerações N3 [$F_{(1,31)}=8,63$; $p<0,01$], N4 [$F_{(1,49)}=30,10$; $p<0,001$], N5 [$F_{(1,60)}=12,09$; $p<0,001$], N6 [$F_{(1,63)}=40,01$; $p<0,001$], N7 [$F_{(1,38)}=60,78$; $p<0,001$], N8 [$F_{(1,45)}=17,02$; $p<0,001$], N9 [$F_{(1,41)}=17,94$; $p<0,001$] e N10 [$F_{(1,53)}=12,79$; $p<0,001$].

Em relação ao fator genótipo, diferenças significativas e marginalmente significativas foram encontradas somente para as gerações N6 [$F_{(1,63)}=6,37$; $p<0,05$] e N10 [$F_{(1,53)}=3,52$; $p=0,065$] respectivamente, para a medida de locomoção central do CA. Nenhum efeito significativo para esse fator foi detectado para a locomoção periférica em qualquer geração.

Já em relação ao tempo em que os animais permaneceram no centro do aparato, a ANOVA detectou diferenças em relação ao sexo: os machos exibiram maiores escores do que as fêmeas nas gerações N4 [$F_{(1,49)}=4,74$; $p<0,05$] e N10 [$F_{(1,53)}=4,36$; $p<0,05$]; na geração N6 [$F_{(1,61)}=3,70$; $p=0,050$], as fêmeas permaneceram mais tempo no centro do aparato do que os machos. Em relação ao fator genótipo, detectaram-se um efeito marginalmente significativo na geração N3 para o fator genótipo [$F_{(1,31)}=3,77$; $p=0,061$] e um efeito significativo na geração N6 [$F_{(1,61)}=4,40$; $p<0,05$], tendo os animais heterozigotos de ambas as gerações passado mais tempo na área aversiva do CA em comparação aos animais homozigotos SHR para o *locus Ofil1*.

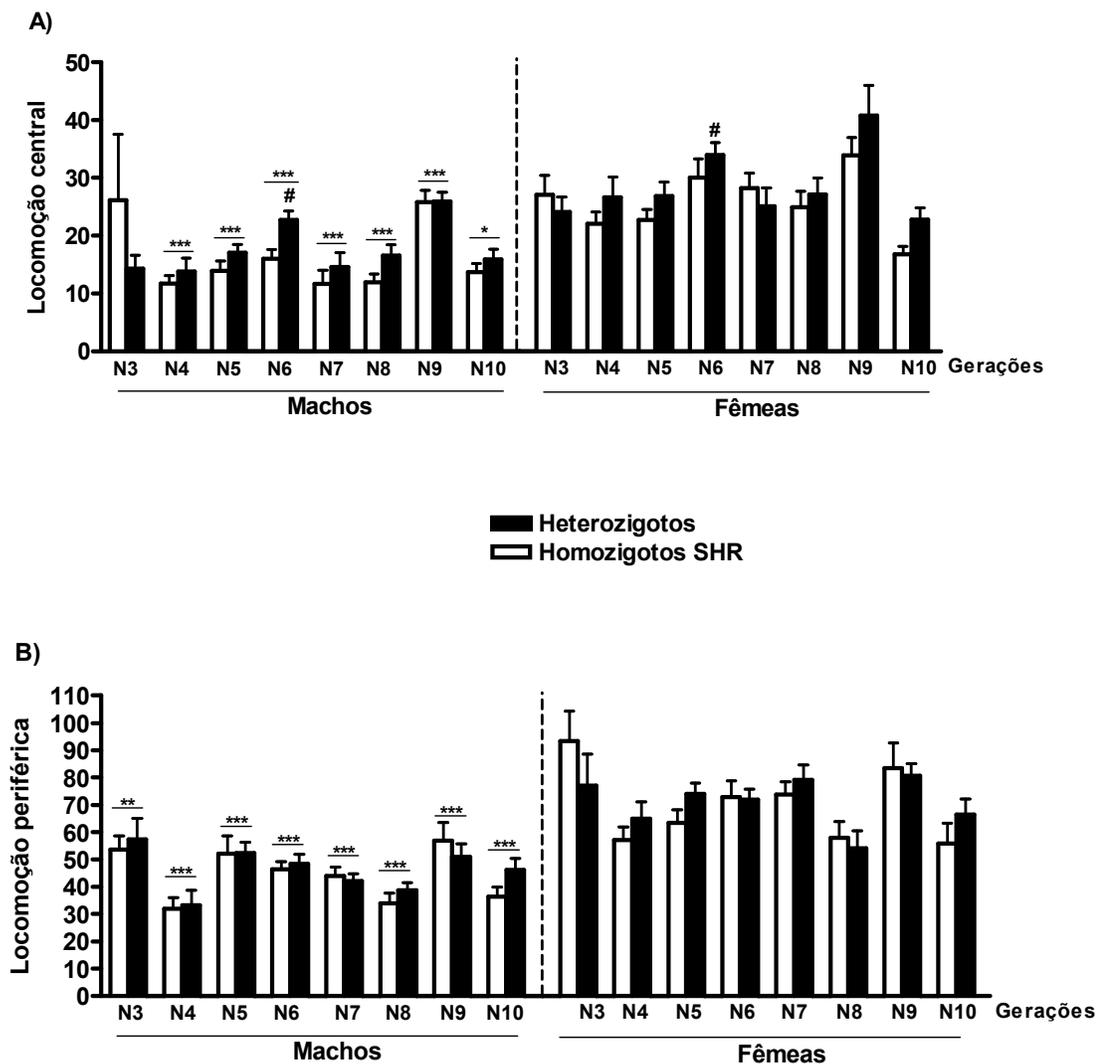


Figura 13 – Variáveis comportamentais do teste do campo aberto (10 lux) obtidas a partir das gerações N3 a N10. Locomoção central (A) e periférica (B) de machos e fêmeas de ambos os genótipos, heterozigotos e homozigotos SHR para o *locus Ofil1*. Barras e linhas verticais representam as médias e o erro padrão da média. (*), (**) e (***) representam diferenças significativas entre os sexos, $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$ respectivamente. (#) representa diferenças significativas entre os genótipos, $p < 0,05$. ANOVA de duas vias (fatores sexo e genótipo) para cada geração separadamente.

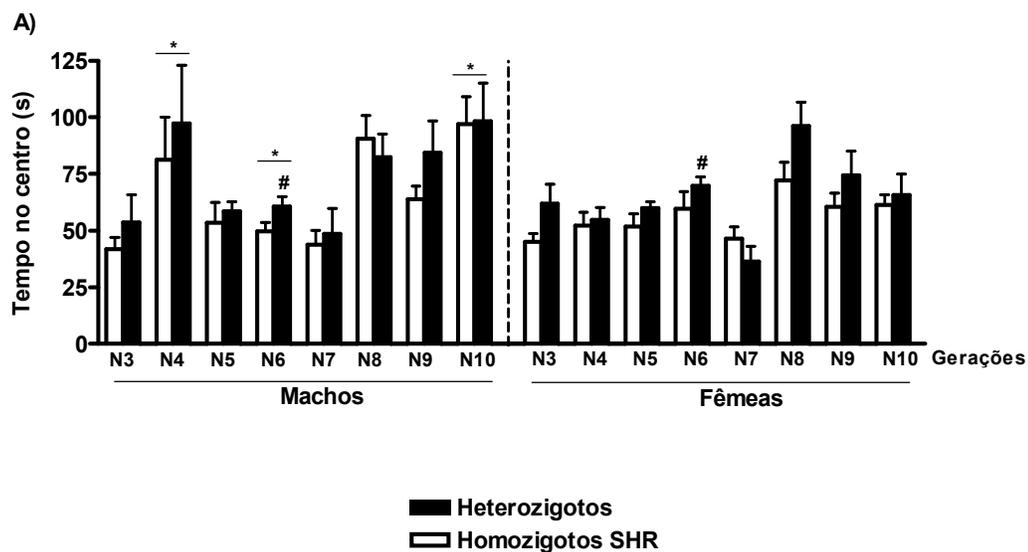


Figura 14 – Variáveis comportamentais do teste do campo aberto (10 lux) obtidas a partir das gerações N3 a N10. Tempo gasto no centro do aparato de machos e fêmeas (A) de ambos os genótipos, heterozigotos e homozigotos SHR para o *locus Ofil1*. Barras e linhas verticais representam as médias e o erro padrão da média. (*) representa diferenças significativas entre os sexos ($p < 0,05$). (#) representa diferenças significativas entre os genótipos ($p < 0,05$). ANOVA de duas vias (fatores sexo e genótipo) para cada geração separadamente.

Na CBP, a ANOVA de duas vias revelou efeitos significativos do fator sexo. As fêmeas de ambos os genótipos realizaram maior número de transições (Figura 15 A) entre os compartimentos do teste em comparação aos machos nas gerações N3 [$F_{(1,31)}=19,53$; $p<0,001$], N5 [$F_{(1,60)}=7,70$; $p<0,01$], N7 [$F_{(1,38)}=5,64$; $p<0,05$], N8 [$F_{(1,45)}=8,93$; $p<0,05$] e N10 [$F_{(1,53)}=17,26$; $p<0,001$]. Na geração N9, a ANOVA detectou uma interação genótipo vs. sexo para o número de transições realizadas na CBP [$F_{(1,41)}=6,44$; $p<0,05$], tendo o teste *post hoc* revelado que as fêmeas heterozigotas realizaram maior número de cruzamentos entre os compartimentos em comparação às fêmeas homozigotas SHR.

Já em relação ao tempo gasto no compartimento branco (Figura 15 B), a ANOVA detectou diferenças no fator sexo somente na geração N9, sendo que os machos exibiram maiores escores do que as fêmeas [$F_{(1,41)}=6,34$; $p=0,05$]. Em relação ao fator genótipo, uma diferença significativa foi encontrada somente na geração N8: os ratos heterozigotos permaneceram mais tempo no compartimento branco e aversivo [$F_{(1,45)}=5,52$; $p<0,05$] do que ratos homozigotos SHR.

Em relação ao tempo gasto no compartimento preto (Figura 16), diferenças sexuais foram encontradas nas gerações N3 [$F_{(1,31)}=5,41$; $p<0,05$] e N9 [$F_{(1,41)}=4,85$; $p<0,05$], sendo que na N3 os machos exibiram maiores escores que as fêmeas; e na N9, as fêmeas permaneceram mais tempo no compartimento preto em comparação aos machos.

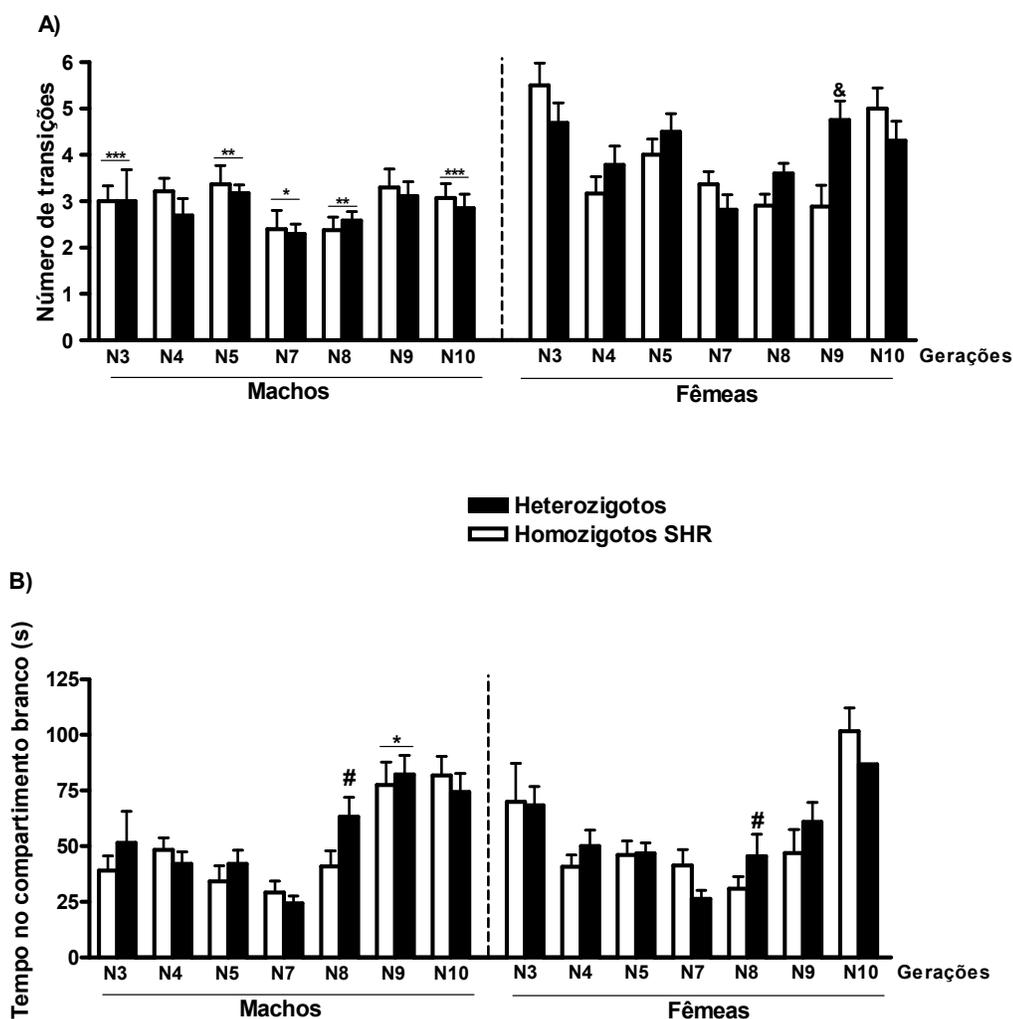


Figura 15 – Variáveis comportamentais da caixa branca e preta obtidas a partir das gerações N3 a N10. Número de transições entre os compartimentos (A) e tempo gasto no compartimento branco (B) de machos e fêmeas de ambos os genótipos, heterozigotos e homozigotos SHR para o *locus Ofil1*. Barras e linhas verticais representam as médias e erro padrão da média. (*), (**) e (***) representam diferenças significativas entre os sexos, $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$ respectivamente. (#) representa diferenças significativas entre os genótipos ($p < 0,05$). (&) representa diferença significativa entre fêmeas heterozigotas e homozigotas SHR e entre fêmeas heterozigotas e machos heterozigotos, $p < 0,05$. ANOVA de duas vias (fatores sexo e genótipo) para cada geração separadamente.

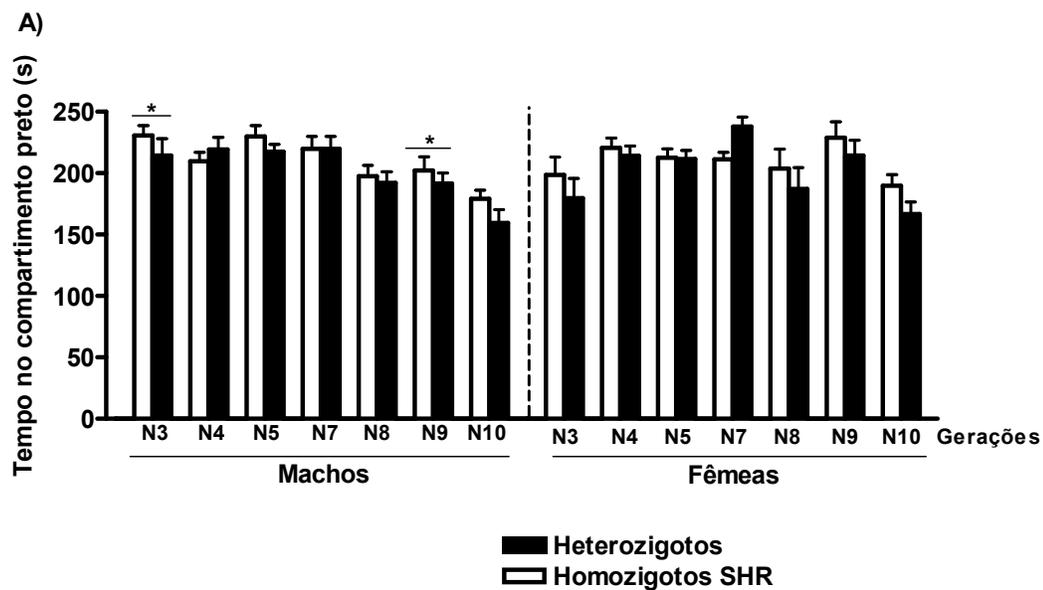


Figura 16 – Variáveis comportamentais da caixa branca e preta obtidas a partir das gerações N3 a N10. Tempo gasto no compartimento preto de machos e fêmeas (A) de ambos os genótipos, heterozigotos e homozigotos SHR para o *locus Ofil1*. Barras e linhas verticais representam as médias e o erro padrão da média. (*) representa diferenças significativas entre os sexos, $p < 0,05$. ANOVA de duas vias (fatores sexo e genótipo) para cada geração separadamente.

A ANOVA de duas vias revelou um efeito significativo para o fator sexo, sendo que as fêmeas realizaram maior número de cruzamentos no centro do aparato [$F_{(1,408)}=128,32$; $p<0,001$], porém gastaram menos tempo nessa região aversiva do CA [$F_{(1,408)}=8,54$; $p<0,01$] em comparação aos machos. Em relação ao fator genótipo, os heterozigotos de todas as gerações (N3 a N10) exibiram maiores escores de locomoção central [$F_{(1,408)}=9,12$; $p<0,01$;] e tempo gasto no centro do CA [$F_{(1,408)}=4,35$; $p<0,05$] do que os homozigotos SHR.

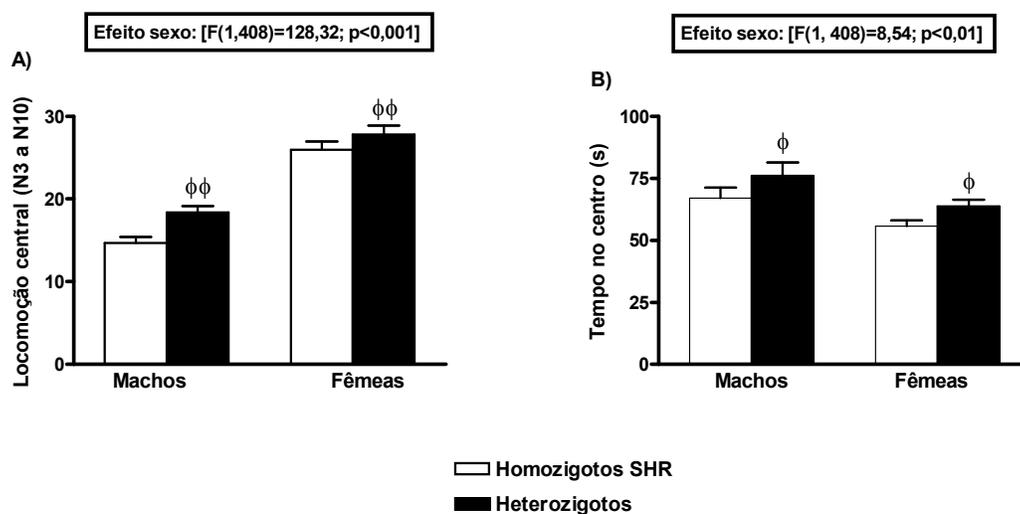


Figura 17 – Variáveis comportamentais do teste do campo aberto (10 lux) obtidas a partir de uma análise estatística realizada com todos os animais heterozigotos e homozigotos SHR de todas as gerações (N3 a N10). Locomoção central (A) e tempo gasto no centro do aparato de machos e fêmeas (B) de ambos os genótipos, heterozigotos e homozigotos SHR para o *locus Ofil1*. Barras e linhas verticais representam as médias e o erro padrão da média. (ϕ), indica o efeito de *Ofil1* (diferenças significativas entre os genótipos heterozigotos e homozigotos SHR), $p<0,05$. ANOVA de três vias (fatores sexo, genótipo e geração).

3.2.2 Resultados Comportamentais das Linhagens Semicongênicas N3

3.2.2.1 Testes de emocionalidade (CA, CBP, LCE e TNF)

O Quadro 9 mostra o número de animais homozigotos LEW e homozigotos SHR (N3F1 e N3F2) utilizado nos testes comportamentais do CA (10 lux), da CBP, do LCE, do TNF e do consumo de álcool e o Quadro 10, refere-se ao número de animais N3F3 utilizados no teste do CA (530 lux).

Quadro 9 – Número de animais homozigotos LEW e homozigotos SHR utilizado nos testes comportamentais das linhagens semicongênicas N3F1 e N3F2.

Gerações	Testes	Machos		Fêmeas	
		Homozigoto LEW	Homozigoto SHR	Homozigoto LEW	Homozigoto SHR
N3F1	CA (10 lux)	13	9	19	13
	CBP	12	9	19	13
	LCE	12	9	19	13
	TNF	12	9	19	13
N3F2	Consumo de álcool	10	10	8	10

Quadro 10 – Número de animais homocigotos LEW e homocigotos SHR, da linhagem semicongênica N3F3 utilizado no teste do CA com alta iluminação.

Geração N3F3	Teste do CA (530 lux)	Machos		Fêmeas	
		Homocigoto LEW	Homocigoto SHR	Homocigoto LEW	Homocigoto SHR
	10:00h	10	10	10	9
	01:00h	10	10	10	10

No CA com baixa iluminação (10 lux), os resultados da locomoção central (A) e periférica (B) no teste do CA são referentes à geração N3F1 e estão ilustrados na Figura 18. A ANOVA de duas vias demonstrou que ratos homocigotos LEW exibiram maior locomoção tanto no centro [$F_{(1,50)}=7,95$; $p<0,01$] quanto na periferia [$F_{(1,50)}=5,96$; $p<0,05$] do aparato, em comparação aos ratos controle homocigotos SHR. Além disso, um efeito geral para o fator sexo também foi observado tanto para a locomoção central [$F_{(1,50)}=9,37$; $p<0,01$] quanto para a locomoção periférica [$F_{(1,50)}=11,98$; $p<0,01$], com as fêmeas apresentando maiores escores em comparação aos machos.

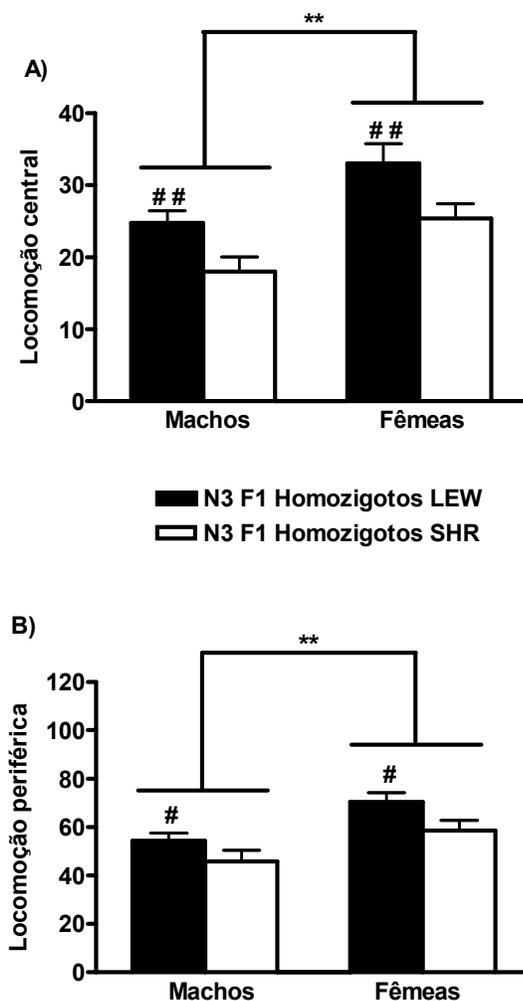


Figura 18 – Variáveis comportamentais do teste do campo aberto com baixa luminosidade (10 lux) das linhagens semicongênicas N3F1. Locomoção central (A) e locomoção periférica (B) de machos e fêmeas de ambos os genótipos (homozigotos LEW e homozigotos SHR) para o *locus Ofil1* (n=9-10 animais/sexo/genótipo). Barras e linhas verticais representam as médias e o erro padrão da média. (**) representa diferenças significativas entre os sexos, $p < 0,01$. (#) e (##) representam diferenças significativas entre os genótipos, $p < 0,05$ e $p < 0,01$ respectivamente. ANOVA de duas vias para os fatores sexo e genótipo.

No CA com alta iluminação e em diferentes horários (10h00 e 1h00), os resultados da locomoção central e periférica estão ilustrados na Figura 19 e referem-se à geração N3F3. Em machos, a ANOVA de duas vias revelou um efeito significativo para o fator genótipo, tendo homozigotos LEW exibido maior locomoção central [$F_{(1,36)}=5,42$; $p<0,05$] nos dois períodos (10h00 e 1h00) quando comparados com os homozigotos SHR. Para as fêmeas, a ANOVA revelou uma interação significativa entre os fatores genótipo e período [$F_{(1,34)}=8,80$; $p<0,01$], na qual as ratas homozigotas LEW exibiram maior locomoção central às 10h00 tanto em comparação às ratas homozigotas LEW à 1h00 quanto em relação às ratas homozigotas SHR às 10h00.

Em relação à locomoção periférica, a ANOVA revelou uma interação entre os dois fatores [$F_{(1,36)}=5,84$; $p<0,05$], com os machos homozigotos LEW testados à 1h00 exibindo maiores escores em comparação aos machos homozigotos LEW testados às 10h00 e também em relação aos machos homozigotos SHR testados à 1h00. Para as fêmeas, a ANOVA detectou um efeito significativo para o fator genótipo, sendo que as ratas homozigotas LEW apresentaram maiores escores nos dois períodos (10h00 e 1h00) quando comparadas com as ratas homozigotas SHR.

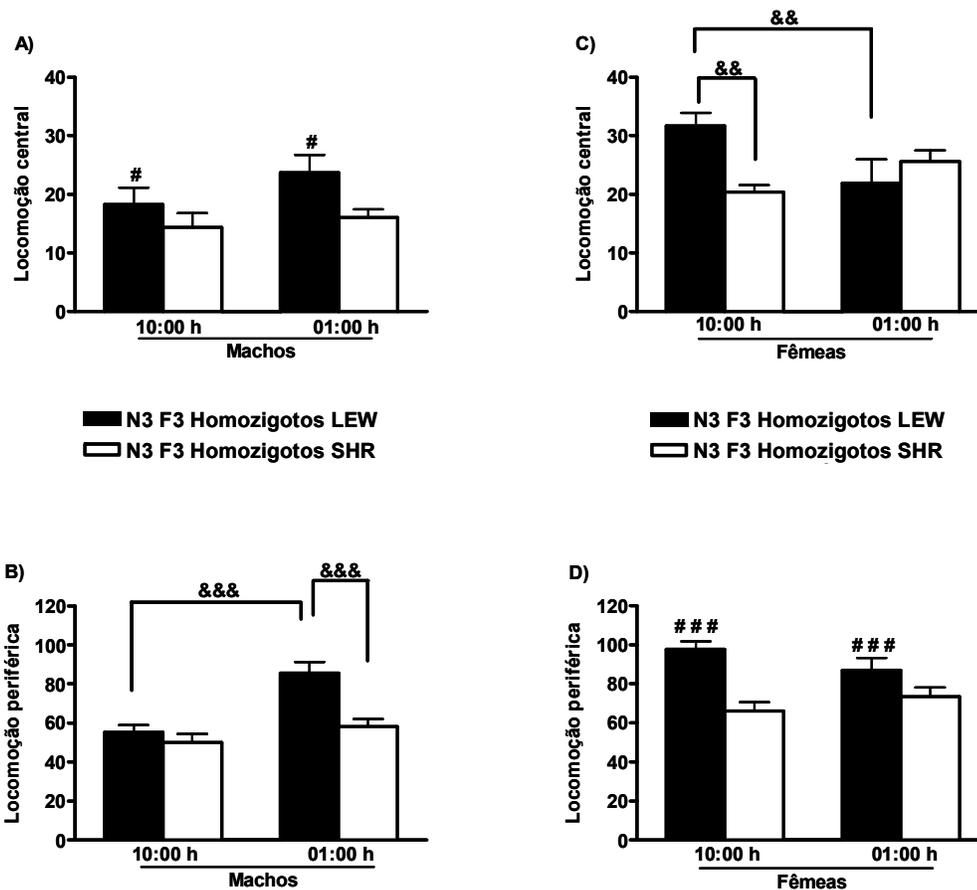


Figura 19 – Variáveis comportamentais do teste do campo aberto com alta luminosidade (530 lux) das linhagens semicongênicas N3F3. Locomoção central e locomoção periférica de machos (A e B) e fêmeas (C e D) com genótipos homozigotos LEW e homozigotos SHR para o *locus Ofil1*. Os animais foram divididos em dois grupos, sendo um grupo testado às 10h00, e o outro testado à 1h00 (n=9-10 animais/sexo/genótipo/período). Barras e linhas verticais representam as médias e o erro padrão da média. (#) e (###) representam diferenças significativas entre os genótipos, $p < 0,05$ e $p < 0,001$ respectivamente. (&&) e (&&&) representam diferenças significativas entre os subgrupos, $p < 0,01$ e $p < 0,001$ respectivamente. ANOVA de duas vias seguida de teste *post hoc* Newman-Keuls.

A Figura 20 ilustra os resultados dos animais N3F1 para o tempo gasto no compartimento branco (A), número de transições totais (B) e locomoção no compartimento branco (C) da CBP. A ANOVA revelou um efeito geral para o fator genótipo, tendo os ratos homozigotos LEW exibido maior número de transições [$F_{(1,49)}=4,80$; $p<0,05$] e passado mais tempo no compartimento branco [$F_{(1,49)}=3,92$; $p=0,05$] quando comparados aos ratos homozigotos SHR. Também se observou um efeito marginalmente significativo na locomoção no compartimento branco [$F_{(1,49)}=3,59$; $p=0,06$]. A ANOVA revelou ainda um efeito geral para o fator sexo: as fêmeas exibiram maior número de transições totais [$F_{(1,49)}=21,86$; $p<0,001$] e locomoção no compartimento branco [$F_{(1,49)}=18,43$; $p<0,001$] em comparação aos machos.

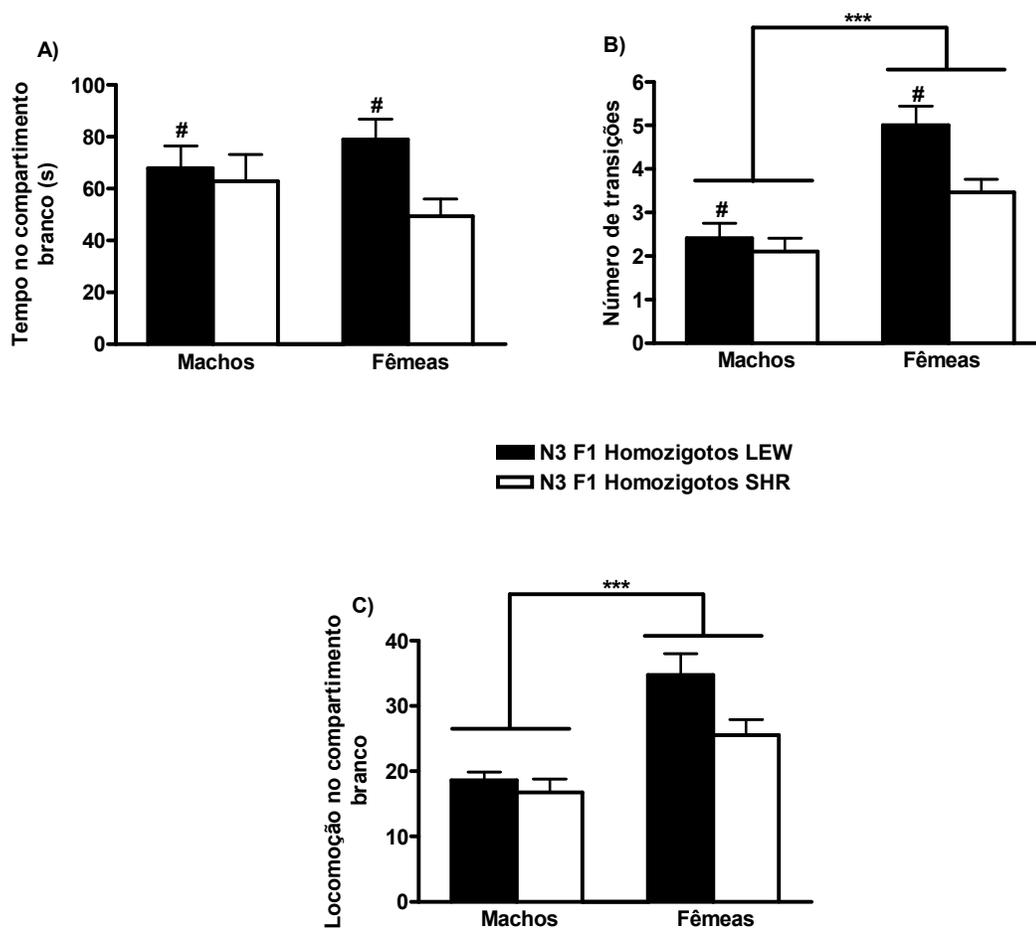


Figura 20 – Variáveis comportamentais do teste da caixa branca e preta das linhagens semicongênicas N3F1. Tempo gasto (A) e locomoção no compartimento branco (C), número total de transições (B) de ratos machos e fêmeas, dos genótipos homozigotos LEW e homozigotos SHR para o *locus Ofil1* (n=9-19 animais/sexo/genótipo). Barras verticais representam as médias e erro padrão da média. (***) representa diferença significativa entre os sexos, $p < 0,001$. (#) representa diferença significativa entre os genótipos, $p < 0,05$. ANOVA de duas vias para os fatores sexo e genótipo.

Os resultados referentes à porcentagem de entradas nos braços abertos (A), ao tempo gasto nos braços abertos (B) e ao número total de entradas nos braços fechados (C), da geração N3F1, avaliada no LCE estão ilustrados na Figura 21. A ANOVA de duas vias não revelou diferenças genotípicas entre os homozigotos LEW e os homozigotos SHR na porcentagem de entradas nos braços abertos ($F_{(1,49)}=0,18$; $p=0,66$), no tempo gasto nos braços abertos [$F_{(1,49)}=0,42$; $p=0,51$] e no tempo gasto nos braços fechados [$F_{(1,49)}=0,39$; $p=0,53$]. Além disso, um efeito geral para o fator sexo foi observado em relação ao número de entradas dos braços fechados: as fêmeas exibiram maiores índices em comparação aos machos [$F_{(1,49)}=8,49$; $p<0,01$].

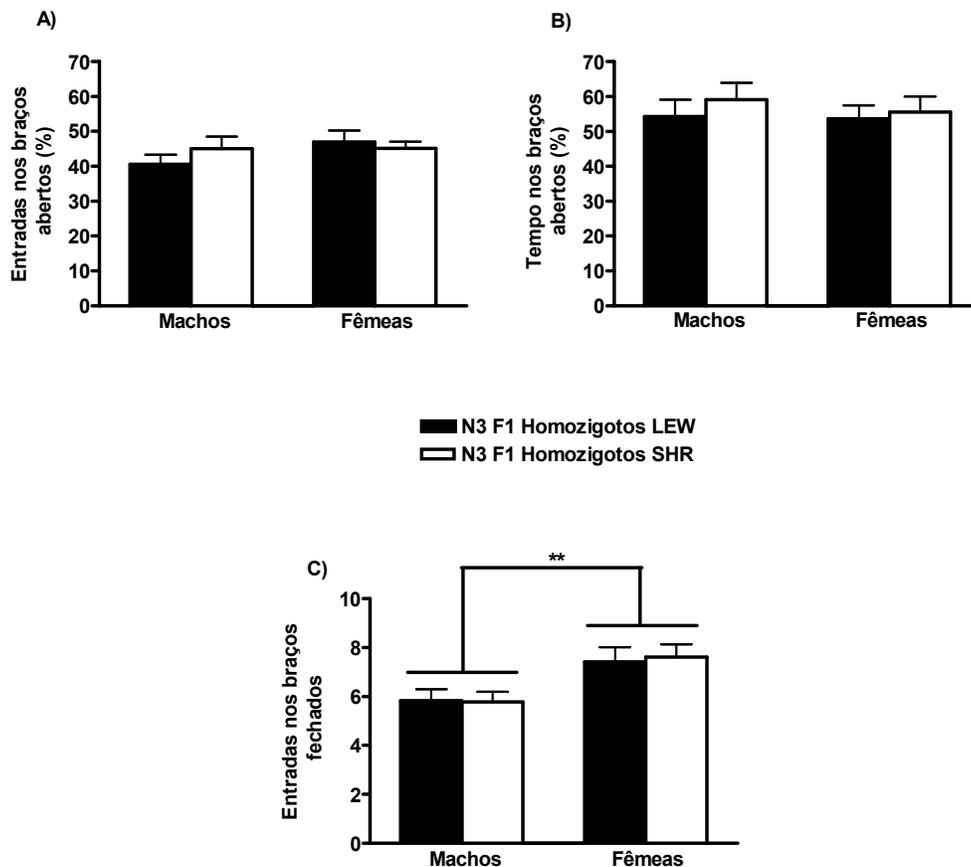


Figura 21 – Variáveis comportamentais do teste do labirinto em cruz elevado das linhagens semicongênicas N3F1. Porcentagem de entradas (A) e porcentagem de tempo nos braços abertos (B) e número total de entradas nos braços fechados (C) de ratos machos e fêmeas dos genótipos homozigotos LEW e homozigotos SHR para o *locus Ofil1* (n=9-19 animais/sexo/genótipo). Barras e linhas verticais representam as médias e erro padrão da média. (**) representa diferença significativa entre os sexos, $p < 0,01$. ANOVA de duas vias para os fatores sexo e genótipo.

Os resultados da geração N3F1 para o tempo de imobilidade em segundos (A) e o número de defecações (B) no TNF estão ilustrados na Figura 22. A ANOVA de duas vias revelou diferenças entre os sexos em ambas as variáveis, com os machos exibindo maior tempo de imobilidade [$F_{(1,49)}=10,79$, $p<0,01$] e maior número de bolos fecais [$F_{(1,49)}=11,39$, $p<0,01$] em comparação às fêmeas. Diferenças significativas entre os genótipos homozigotos LEW e homozigotos SHR não foram encontradas.

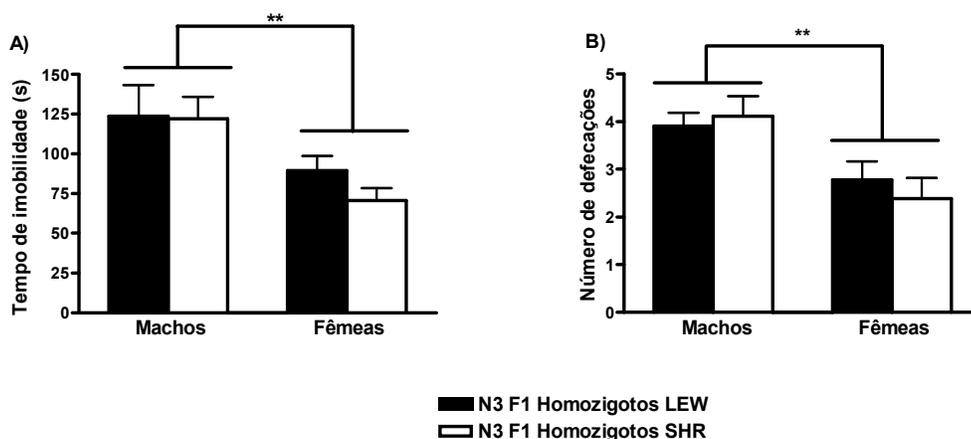


Figura 22 – Variáveis comportamentais relacionadas ao teste do nado forçado das linhagens semicongênicas N3F1. Tempo de imobilidade em segundos (A) e número de defecação (B) de ratos machos e fêmeas de ambos os genótipos homozigotos LEW e homozigotos SHR para o *locus Ofil1* (n=9-19 animais/sexo/genótipo). Barras e linhas verticais representam as médias e erro padrão da média. (*) e (**) representam diferenças significativas entre os sexos, $p<0,05$ e $p<0,01$ respectivamente. ANOVA de duas vias para os fatores sexo e genótipo.

3.2.2.2 Testes de consumo

Os resultados dos animais N3F2 referentes ao consumo de sacarina (A) e quinino (B) são mostrados na Figura 23. A ANOVA de duas vias não revelou nenhum efeito significativo diferença em relação ao consumo absoluto de quinino ($p>0,05$). Já em relação ao consumo de sacarina, a ANOVA revelou uma interação significativa entre os fatores sexo e genótipo [$F_{(1,34)}=5,69$; $p<0,05$]; entretanto, comparações *post hoc* Newman-Keuls não indicaram diferenças significativas entre os grupos.

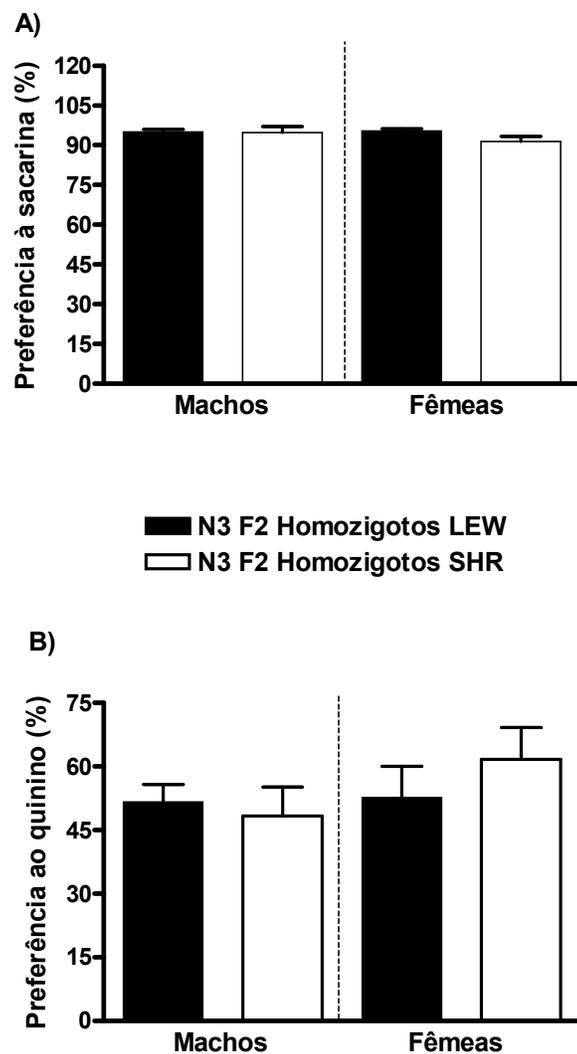


Figura 23 – Preferência de líquido induzido pela disponibilidade de sacarina (7,5 mM) (A) e quinino (2 μ M) (B) em livre escolha com água (média de 2 dias consecutivos) exibido por ratos machos e fêmeas de ambos os genótipos N3F2 homozigotos LEW ou N3F2 homozigotos SHR (n=8-10 animais/linhagem/sexo). Barras e linhas verticais representam as médias e erro padrão da média referente ao consumo de cada líquido.

Os resultados referentes ao consumo de etanol a 10% vs. água em livre escolha dos animais N3F2 estão ilustrados na Figura 24A. A ANOVA de medidas repetidas revelou um efeito geral para o fator sexo, tendo as fêmeas consumido maior quantidade de álcool (média de 5 blocos, sendo cada bloco formado de 2 dias de avaliação) [$F_{(1,34)}=37,23$; $p<0,001$] em comparação aos machos. Os resultados do consumo de água vs. álcool em diferentes concentrações (5%, 10% e 15%) estão ilustrados na Figura 24B. A ANOVA de medidas repetidas revelou um efeito geral para o fator sexo: as fêmeas exibiram maior consumo de álcool em todas as concentrações [$F_{(1,34)}=92,21$; $p<0,001$] em comparação aos machos. Uma interação significativa entre os fatores genótipo e concentração [$F_{(2,68)}=3,92$; $p<0,05$] também foi observada, entretanto comparações *post hoc* Newman-Keuls não revelaram qualquer efeito significativo entre os grupos.

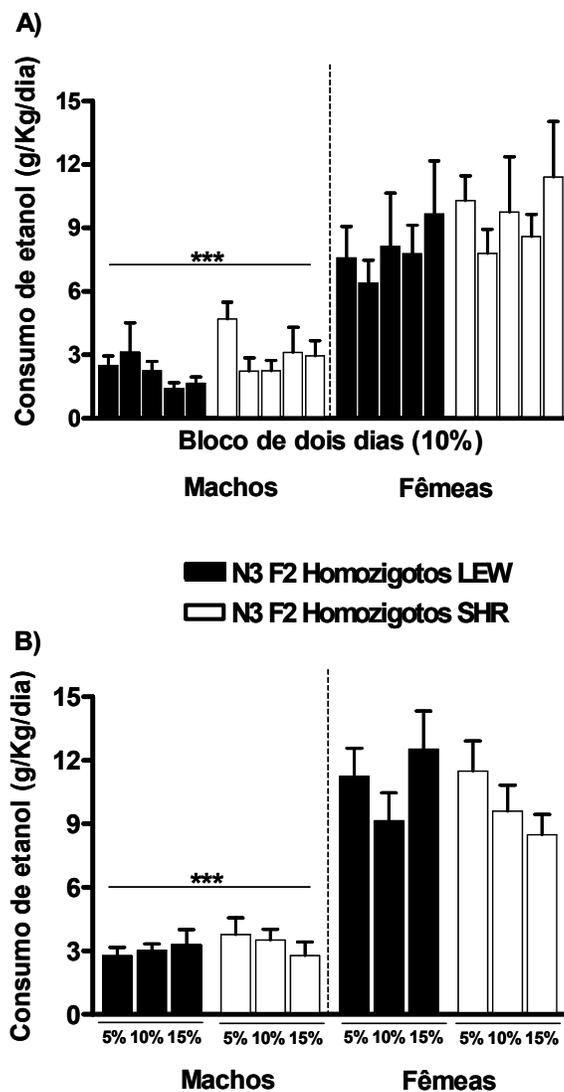


Figura 24 – Consumo de etanol a 10% vs. água (livre escolha) por um período de 10 dias (5 blocos de 2 dias) para ratos machos e fêmeas de ambos os genótipos (N3F2 homozigotos LEW e N3F2 homozigotos SHR) (A). Livre escolha entre água vs. álcool em diferentes concentrações (5%, 10% e 15%) (v/v) por um período de 2 dias para cada concentração, para ratos machos e fêmeas dos genótipos homozigotos LEW e homozigotos SHR (B). Os valores estão representados como a média do consumo de etanol em gramas por quilograma de peso corporal por dia (g/kg/dia) (n=8-10 animais/genótipo/sexo). Barras e linhas verticais representam as médias e erro padrão da média referentes ao consumo durante o período do teste. (***) representa diferenças entre os sexos, $p < 0,001$. ANOVA de duas vias com medidas repetidas (concentração), sendo os principais fatores sexo e genótipo.

3.2.3 Resultados Comportamentais da Linhagem Semicongênica N6

O Quadro 11 ilustra o número de animais N6F4 homozigotos LEW, da linhagem semicongênica, e de seus respectivos controles LEW parental e SHR parental, utilizados nos testes comportamentais do CA, da CBP e do LCE.

Quadro 11: Número de animais N6F4 homozigotos LEW (linhagem semicongênica) e de seus respectivos controles parentais, LEW e SHR, utilizados nos testes comportamentais.

LINHAGENS	MACHOS	FÊMEAS
Homozigotos LEW	20	20
SHR parental	8	8
LEW parental	16	17

Os resultados das variáveis comportamentais do teste do CA estão ilustrados na Figura 25 e referem-se aos animais N6F4. A ANOVA de duas vias revelou um efeito geral para o fator genótipo em todas as variáveis analisadas, locomoção central [$F_{(2,83)}=40,29$; $p<0,001$] e periférica [$F_{(2,83)}=77,02$; $p<0,001$], e tempo no centro [$F_{(2,83)}=42,59$; $p<0,001$]. Comparações *post hoc* Newman-Keuls indicaram que a presença de alelos LEW no *locus Ofil1* foi responsável por um maior número de cruzamentos tanto no centro ($p<0,01$) quanto na periferia ($p<0,01$) do aparato em comparação aos ratos SHR parental, porém nenhum efeito

significativo entre essas duas linhagens foi detectado para o tempo gasto no centro do CA.

Diferenças entre as linhagens parentais puras LEW e SHR também foram reveladas pelo teste *post hoc*, tendo a linhagem SHR (receptora) exibido maiores escores na locomoção central ($p < 0,001$) e no tempo gasto no centro do aparato ($p < 0,001$) em comparação à linhagem LEW (doadora). Contudo, os ratos SHR exibiram menores ($p < 0,001$) escores na locomoção periférica em comparação à linhagem LEW.

Além desses resultados genotípicos, a ANOVA também revelou um efeito geral para o fator sexo em todas as variáveis comportamentais: locomoção central [$F_{(1,83)}=35,25$; $p < 0,001$] e periférica [$F_{(1,83)}=17,02$; $p < 0,001$], e tempo gasto no centro do aparato [$F_{(1,83)}=23,36$; $p < 0,001$], com as fêmeas apresentando maiores escores em comparação aos machos.

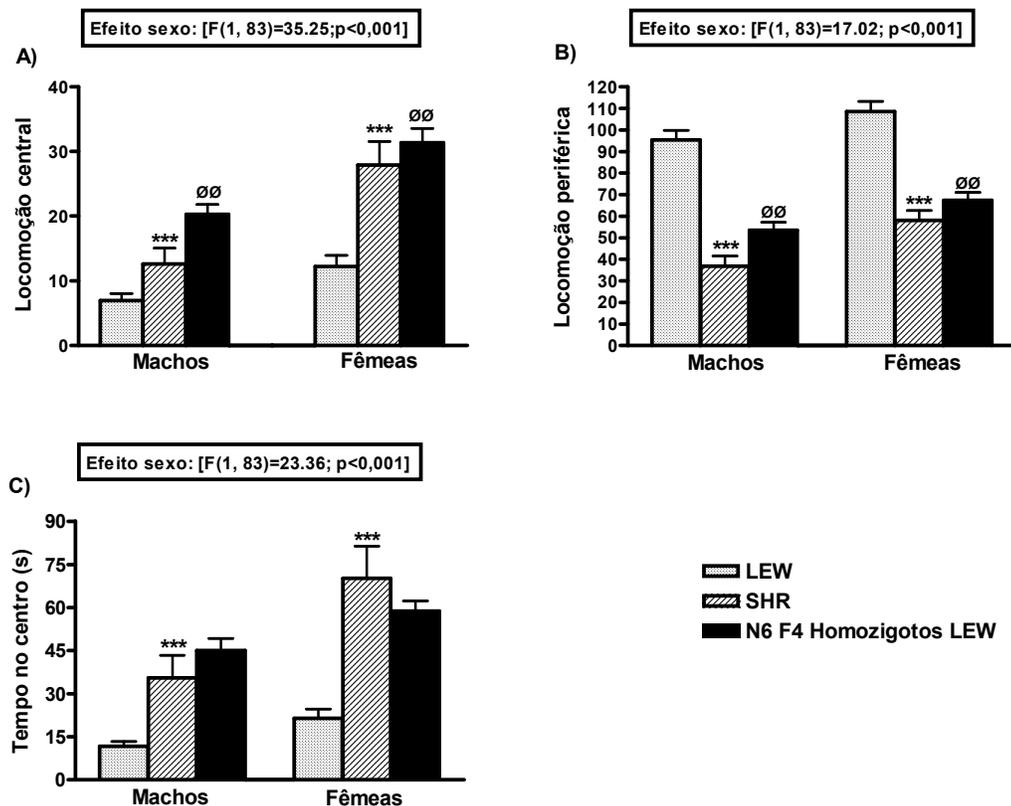


Figura 25 – Variáveis comportamentais do teste do campo aberto (10 lux). Locomoção central (A) e periférica (B) e tempo gasto no centro do aparato (C) por ratos LEW parental, SHR parental e N6F4 homozigotos LEW de ambos os sexos (n= 8-20 animais/sexo/genótipo). Barras e linhas verticais representam as médias e o erro padrão da média. A presença de diferenças significativas para o fator sexo está ilustrada no retângulo localizado acima dos gráficos. (***) representa diferença significativa entre LEW e SHR. (ØØ) indica o efeito de *Ofil1* (diferença significativa entre a N6 homozigota LEW e a linhagem SHR pura). ANOVA de duas vias para os fatores sexo e genótipo, seguida de teste *post hoc* (comparação entre as médias) Newman-Keuls.

Os resultados das variáveis comportamentais do LCE, da geração N6F4, estão ilustrados na Figura 26. A ANOVA de duas vias revelou um efeito geral para o fator genótipo em todas as variáveis apresentadas, porcentagem de tempo [F_(2,83)=10,26; p<0,001] e de entradas [F_(2,83)=9,44; p<0,001] nos braços abertos e tempo gasto nos braços fechados [F_(2,83)=25,15; p<0,001].

As comparações *post hoc* indicaram que a presença de alelos LEW no *locus Ofil1* da linhagem homocigota N6 proporcionou um aumento na porcentagem de entradas dos braços abertos (p<0,01) em comparação aos ratos SHR. Para as demais medidas nenhuma diferença significativa foi detectada entre essas duas linhagens. Diferenças entre as linhagens parentais puras LEW e SHR também foram detectadas, sendo que a linhagem SHR pura exibiu maior porcentagem de tempo nos braços abertos (p<0,01) e gastou menos tempo nos braços fechados (p<0,001) do LCE em comparação à linhagem doadora LEW. Além dos resultados genotípicos, a ANOVA de duas vias também revelou um efeito para o fator sexo em todas as variáveis comportamentais – porcentagem de entradas [F_(1,83)= 9,64; p<0,05] e porcentagem de tempo gasto nos braços abertos [F_(1,83)=26,50; p<0,001] e tempo gasto nos braços fechados [F_(1,83)=20,90; p<0,001], tendo as fêmeas apresentado maiores escores somente nas duas primeiras medidas comportamentais, em comparação aos machos.

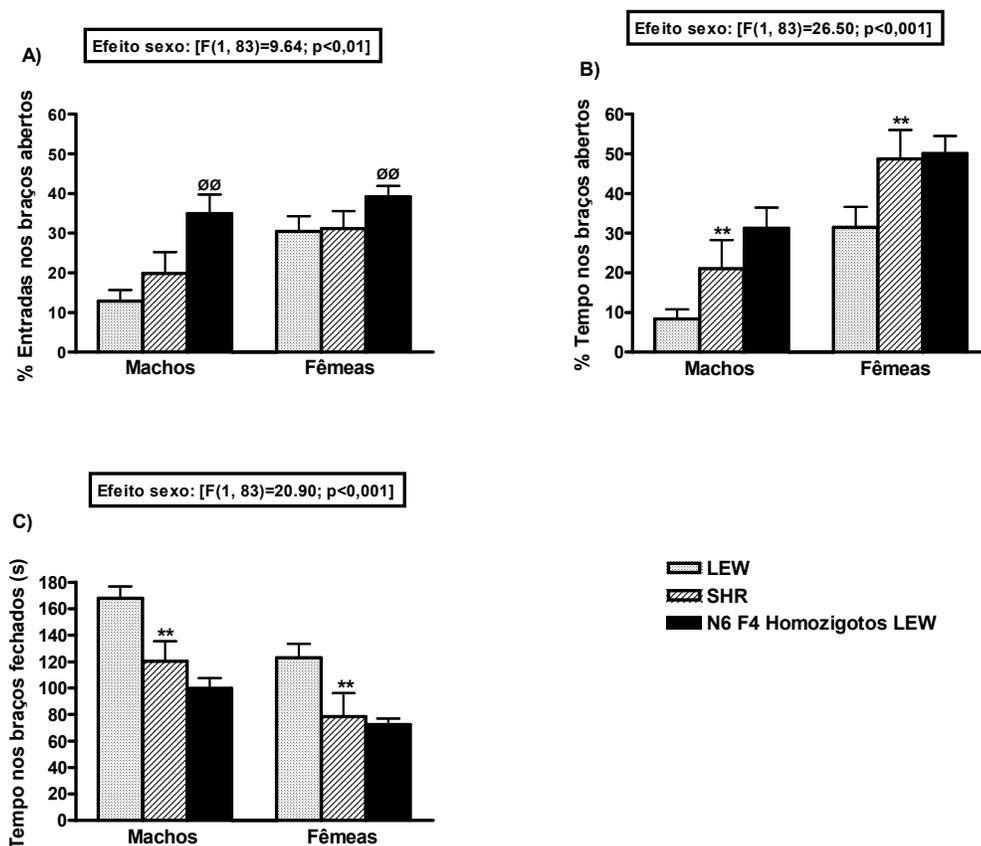


Figura 26 – Variáveis comportamentais relacionadas ao teste do labirinto em cruz elevado (10 lux). Porcentagem de entradas nos braços abertos (A), porcentagem de tempo gasto nos braços abertos (B) e tempo gasto nos braços fechados (C) por ratos LEW parental, SHR parental e N6F4 homozigotos LEW de ambos os sexos (n=8-20, animais/sexo/genótipo). A presença de diferença significativa para o fator sexo está ilustrada no retângulo localizado acima dos gráficos. Barras e linhas verticais representam as médias e erro padrão da média. (**) representa diferenças significativas entre LEW e SHR, p<0,01. (∅∅) indica o efeito de *Ofil1* (diferença significativa entre a N6 homozigota LEW e a linhagem SHR pura, p<0,01). ANOVA de duas vias para os fatores sexo e genótipo, seguida de teste *post hoc* (comparação entre as médias) Newman-Keuls.

Os resultados das variáveis comportamentais da CBP estão ilustrados na Figura 27. A ANOVA de duas vias revelou um efeito geral para o fator genótipo, para o tempo gasto nos compartimentos branco [$F_{(2,83)}=14,65$; $p<0,001$] e preto [$F_{(2,83)}=21,70$; $p<0,001$]. Já as comparações *post hoc* indicaram que a presença de alelos LEW no *locus Ofil1* da linhagem N6F4 foi responsável, de forma robusta, pelo aumento no tempo gasto no compartimento branco ($p<0,01$), em comparação aos ratos SHR. Para o tempo gasto no compartimento preto, nenhum efeito significativo foi detectado entre essas duas linhagens (dados não mostrados) e somente diferenças entre as linhagens parentais puras LEW e SHR foram reveladas pelo *post hoc*, tendo a linhagem SHR exibido menores escores em relação ao tempo gasto no compartimento preto ($p<0,001$) em comparação à linhagem LEW (dados não mostrados). Diferenças entre as linhagens parentais puras LEW e SHR para o tempo gasto no compartimento branco, não foram detectadas pelo *post hoc*. Além dos resultados genotípicos, a ANOVA também revelou um efeito geral para o fator sexo em relação ao tempo gasto no compartimento branco [$F_{(1,83)}=6,69$; $p<0,05$], com as fêmeas apresentando maiores escores comportamentais do que os machos.

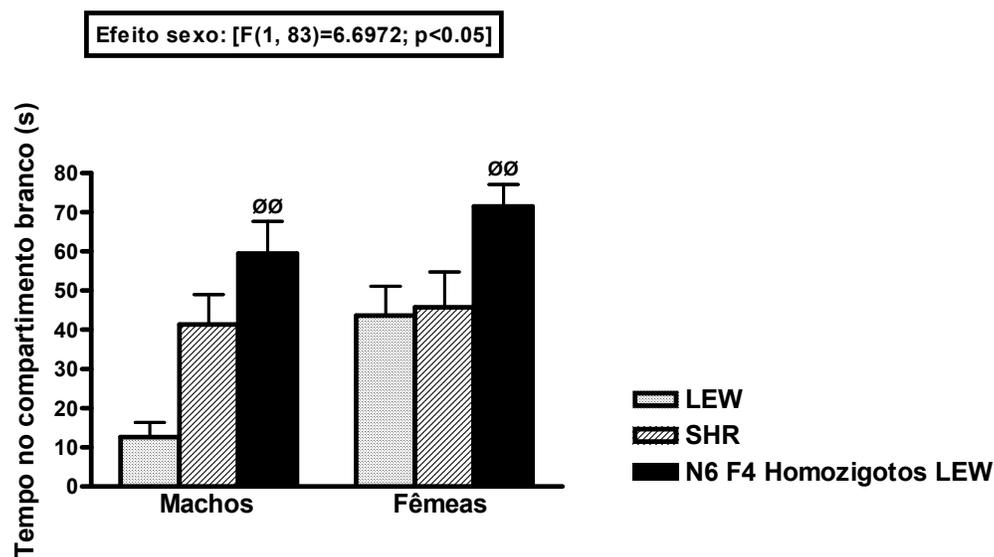


Figura 27 – Variáveis comportamentais do teste da caixa branca e preta. Tempo no compartimento branco (A) e preto (B) exibido por ratos LEW, SHR e N6F4 homozigotos LEW de ambos os sexos (n=8-20 animais/sexo/genótipo). A presença de diferença significativa para os fatores sexo e genótipo está ilustrada no retângulo localizado acima dos gráficos. Barras e linhas verticais representam as médias e o erro padrão da média. (∅∅) indica o efeito de *Ofil1* (diferença significativa entre a N6F4 homozigota LEW e a linhagem SHR, p<0,01). ANOVA de duas vias para os fatores sexo e genótipo, seguida de teste *post hoc* (comparação entre as médias) Newman-Keuls.

3.2.4 Animais N10 homozigotos

O Quadro 12 ilustra o número de animais N10F1 homozigotos LEW, e de seus respectivos controles LEW parental e SHR parental, avaliados nos testes comportamentais do CA e da CBP.

Quadro 12: Número de animais N10F1 homozigotos LEW, e de seus respectivos controles LEW parental e SHR parental, utilizados nos testes do CA e da CBP.

LINHAGENS	MACHOS	FÊMEAS
N10F1 Homozigotos LEW	8	7
SHR parental	9	9
LEW parental	4	4

A Figura 28 ilustra os resultados das variáveis comportamentais do teste do CA relacionadas aos animais N10F1 homozigotos LEW para o marcador *D4Mgh6* e seus respectivos controles. A ANOVA de duas vias revelou um efeito geral para o genótipo em todas as variáveis apresentadas, locomoção central [$F_{(2,35)}=6,98$; $p<0,01$], periférica [$F_{(2,35)}= 15,49$; $p<0,001$] e tempo no centro [$F_{(2,35)}=13,07$; $p<0,001$]. Destaca-se que as comparações *post hoc* demonstraram que a linhagem N10F1 homozigota LEW permaneceu mais tempo na região central e aversiva do aparato em comparação à linhagem parental SHR pura. Diferenças genóticas entre as linhagens puras LEW e SHR também foram detectadas pelo *post hoc*, sendo que os ratos SHR exibiram maiores escores para o tempo ($p<0,01$) e para a

locomoção central ($p < 0,01$) e menores escores para a locomoção periférica ($p < 0,001$) em comparação aos ratos LEW.

A ANOVA também revelou um efeito geral para o fator sexo, sendo que as fêmeas exibiram maior locomoção central [$F_{(1,35)} = 9,89$; $p < 0,01$] do que os machos. Para as demais medidas comportamentais, diferenças para este fator não foram encontradas.

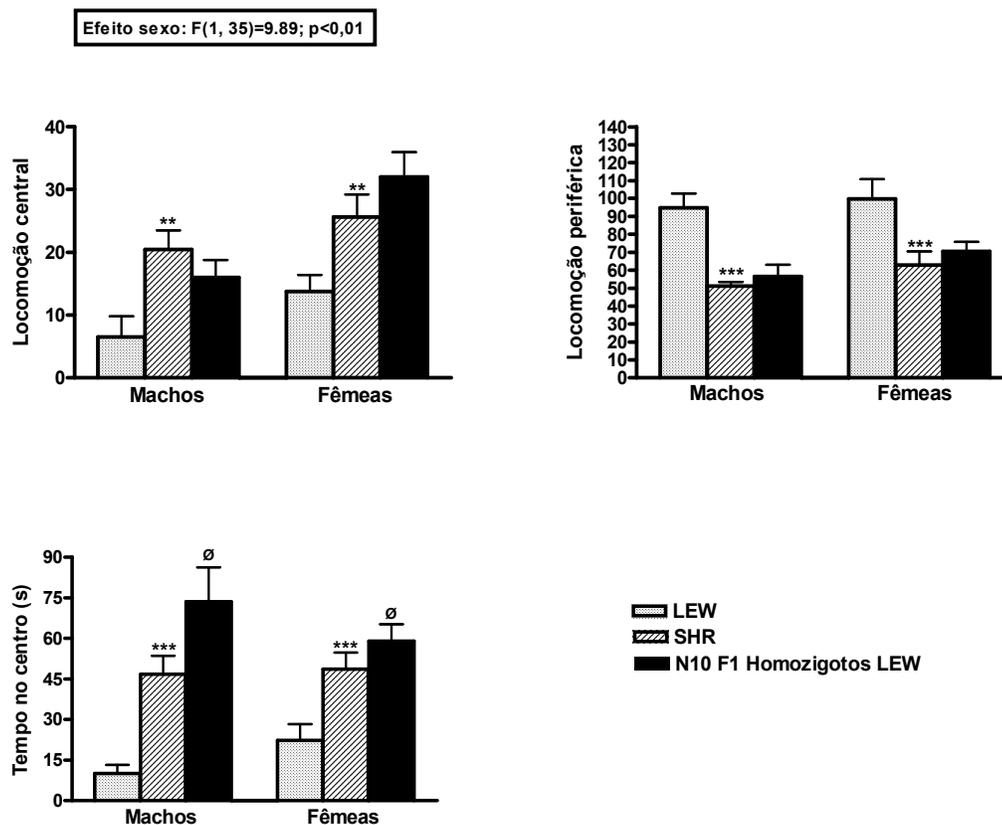


Figura 28 – Variáveis comportamentais do teste do campo aberto (10 lux). Locomoção central (A) e periférica (B) e tempo gasto no centro do aparato (C) por ratos LEW, SHR e N10F1 homozigotos de ambos os sexos ($n=4-9$ animais/sexo/genótipo). Barras e linhas verticais representam as médias e o erro padrão da média. A presença de diferença significativa para o fator sexo está ilustrada no retângulo localizado acima dos gráficos. (**) e (***) representam diferenças significativas entre LEW e SHR, $p<0,01$ e $p<0,001$ respectivamente. (^Ø) indica o efeito de *Off11* (diferença significativa entre a N10F1 homozigota LEW e a linhagem SHR, $p<0,05$). ANOVA de duas vias para os fatores sexo e genótipo, seguida de teste *post hoc* (comparação entre as médias) Newman-Keuls.

A Figura 29 ilustra os resultados das variáveis comportamentais do teste da CBP relacionadas aos animais N10F1 homozigotos LEW para o marcador *D4Mgh6*. A ANOVA de duas vias revelou um efeito geral para o fator genótipo nas variáveis comportamentais: número de transições [$F_{(2, 35)}=11,65$; $p<0,001$] e tempo gasto no compartimento branco [$F_{(2, 35)}=9,03$, $p<0,001$]. Em relação ao número de transições, os ratos SHR exibiram maior número de transições em comparação aos N10F1 homozigotos ($p<0,05$) e aos ratos LEW ($p<0,01$). No tempo gasto no compartimento branco, as comparações *post hoc* indicaram que os ratos LEW parental permaneceram menos tempo nesse compartimento em comparação aos ratos SHR ($p<0,001$). Nenhuma diferença para esta medida foi observada entre os N10F1 homozigotos LEW e os SHR.

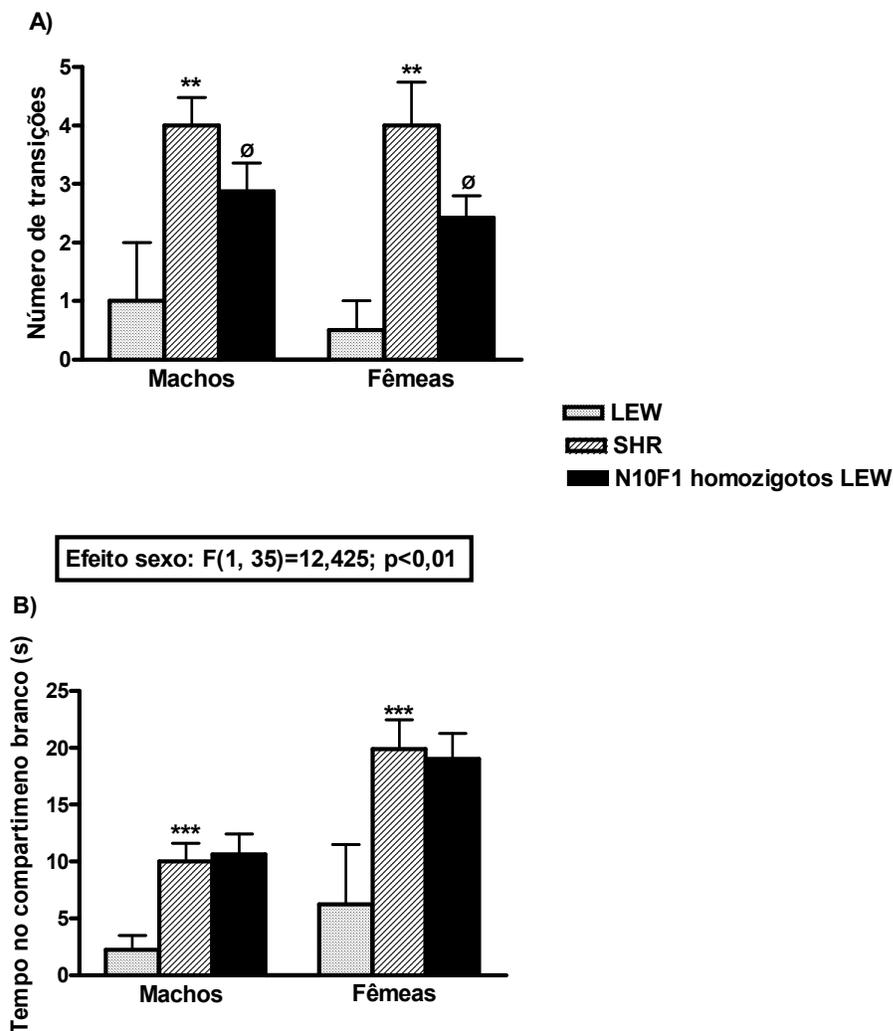


Figura 29 – Variáveis comportamentais do teste da caixa branca e preta. Tempo no compartimento branco (A) e número de transições realizadas entre os compartimentos (B), exibido por ratos LEW, SHR e N10F1 homozigotos LEW de ambos os sexos (n=4-9 animais/sexo/genótipo). A presença de diferença significativa para o fator sexo está ilustrada no retângulo localizado acima dos gráficos. Barras e linhas verticais representam as médias e o erro padrão da média. (**) e (***) representam diferenças significativas entre LEW e SHR, $p<0,01$ e $p<0,001$ respectivamente. (°) indica o efeito de *Ofil1* (diferença significativa entre N10F1 homozigota LEW e a linhagem SHR, $p<0,05$). ANOVA de duas vias para os fatores sexo e genótipo, seguida de teste *post hoc* (comparação entre as médias) Newman-Keuls.

4 DISCUSSÃO

O desenvolvimento deste trabalho teve como objetivo principal construir uma linhagem congênica para avaliar a influência genética do *locus Ofil1*, localizado no cromossomo 4 do rato, sobre a emocionalidade dos animais, em todas as gerações que precederam a obtenção de animais N10F1 homozigotos LEW. Destaca-se que, nas gerações N3 a N10, o efeito do *locus Ofil1* somente poderia ser observado em heterozigose, já que ratos homozigotos LEW não existiam nessas populações.

Em paralelo à construção dos congênicos, duas estratégias adicionais, que também se basearam na seleção genética por marcadores moleculares, foram desenvolvidas. A primeira se referiu ao desenvolvimento de linhagens denominadas semicongênicas N3 (N3F1,N3F2,N3F3) (animais homozigotos para os alelos LEW e SHR nos marcadores *D4Mgh6* e *D4Rat76*) e N6F4 (animais homozigotos para os alelos LEW para os marcadores *D4Mgh6*, *D4Rat76* e *D4Rat59*) cujo arcabouço genético era composto de 87,5% e 98,45% de alelos SHR (linhagem receptora) respectivamente, sugerindo que as diferenças comportamentais encontradas entre essas linhagens semicongênicas e seus respectivos controles seriam resultantes de variações alélicas presentes no *locus* diferencial.

A segunda estratégia consistiu no desenvolvimento de animais homozigotos LEW (N10F1) no marcador *D4Mgh6* (pico de *Ofil1*) provenientes do intercruzamento de animais heterozigotos da geração N10, obtidos após dez gerações de retrocruzamentos com a linhagem parental SHR. Nesta etapa do processo, o arcabouço genético desses animais possuía aproximadamente 99,9% de alelos SHR.

A fim de facilitar a discussão e a interpretação dos resultados, cada abordagem genética utilizada é tratada separadamente nas próximas seções.

4.1 Desenvolvimento de uma Linhagem Congênica (N3 a N10)

Destaca-se que, até o presente momento, não há trabalhos na literatura mostrando o fenótipo de todas as gerações (N3 a N10), produzidas pelos sucessivos retrocruzamentos durante o desenvolvimento de uma linhagem congênica, além de não haver registros no RGD de linhagens congênicas para o cromossomo 4 obtidas a partir das linhagens LEW e SHR. Esses fatos associados à existência de inúmeros estudos mostrando a participação de *Ofil1* em comportamentos relacionados à ansiedade (IZÍDIO, 2009; MORMÈDE et al., 2002; RAMOS et al., 1999) e a outros transtornos (VENDRUSCOLO et al., 2006a), justificaram o desenvolvimento deste trabalho. A obtenção de uma linhagem congênica denominada SHR.LEW-*Ofil1* permitirá, no futuro, avaliar e detalhar outros efeitos comportamentais e neurobiológicos exibidos pelo *locus Ofil1* em processos relacionados à ansiedade, à depressão, ao consumo de etanol, ao estresse, à hipertensão, aos distúrbios metabólicos, à dor, entre outros.

A partir dos resultados comportamentais do CA e da CBP, de todas as gerações (N3 a N10), é possível observar diferenças significativas entre os sexos, tendo as fêmeas de ambos os genótipos, de uma forma geral, exibido maiores escores do que os machos em todas as variáveis comportamentais apresentadas. Enquanto alguns estudos têm demonstrado a presença de diferenças intersexuais

em medidas comportamentais que envolvem emocionalidade em roedores (HINOJOSA et al., 2006; RAMOS et al., 1997, 1998, 2002), outros sugerem que diferenças comportamentais entre machos e fêmeas são frequentemente dependentes do teste ou do genótipo (ALONSO et al., 1991; JOHNSTON, FILE., 1991). Nesse sentido, estudos de herdabilidade realizados em nosso laboratório, a partir das linhagens LEW e SHR, mostram que os machos apresentam maiores índices de herdabilidade que as fêmeas, sugerindo que estas estariam mais susceptíveis às influências ambientais (IZÍDIO et al., 2009). Outro aspecto importante relaciona-se à influência dos hormônios sexuais em comportamentos relacionados à ansiedade, principalmente em fêmeas (FRYE et al., 2008; PALANZA, 2001).

Além das diferenças sexuais encontradas, algumas diferenças isoladas relacionadas ao fator genótipo também foram observadas. A presença de alelos LEW em apenas uma das duas cópias do cromossomo 4 nas gerações N3 a N10 (Figuras 11 a 14) não foi suficiente para influenciar um aumento significativo das principais medidas relacionadas à ansiedade no CA em comparação ao grupo homocigoto SHR (controle) na maioria das gerações. Entretanto, pode-se observar que um aumento significativo para a locomoção central realizada pelos animais heterocigotos ocorreu na geração N6 e que um aumento marginalmente significativo também foi exibido na geração N10. O mesmo efeito foi exibido nas gerações N3 e N6 em relação ao tempo em que os animais permaneceram no centro do aparato. Esses resultados eram esperados de acordo com a nossa hipótese, pois, os animais heterocigotos gastaram mais tempo na região central e aversiva do CA, apresentando, portanto, uma suposta diminuição da emocionalidade. Além disso, é importante dizer que nas gerações N3, N6 e N10

diferenças significativas entre os genótipos não foram encontradas para a locomoção periférica do CA (índice de locomoção), o que sugere um efeito específico de *Ofil1* sobre a emocionalidade e corrobora estudos prévios (RAMOS et al., 1999; VENDRUSCOLO et al., 2006a). Dessa forma, é possível sugerir que a locomoção central e a periférica refletem diferentes componentes comportamentais, corroborando assim outros estudos (FERNANDEZ-TERUEL et al., 2002; HINOJOSA et al., 2006; PRUT, BELZUNG, 2003).

Em relação aos testes comportamentais da CBP, também se observou a ausência de efeito de *Ofil1* para a maioria das medidas avaliadas. Somente na geração N8 os animais heterozigotos permaneceram mais tempo no compartimento branco em comparação aos ratos homozigotos SHR, como seria esperado pelo fato do compartimento branco ser considerado um local aversivo (CRAWLEY, 1981). Além desse resultado, apenas uma interação entre os fatores sexo e genótipo para o número de transições realizadas entre os compartimentos foi observada na geração N9, tendo fêmeas LS exibido maiores escores que as fêmeas SS.

A ausência de efeitos significativos do fator genótipo heterozigoto na maioria das variáveis comportamentais do CA e da CBP poderia ser explicada pelas seguintes hipóteses: a) alelos LEW poderiam ser recessivos em relação aos alelos SHR. Tal possibilidade parece não se sustentar totalmente, uma vez que, em algumas gerações, os animais heterozigotos exibiram menores índices de emocionalidade do que os animais homozigotos SHR em medidas clássicas dos testes do CA e da CBP; b) a presença de dominância incompleta do alelo SHR onde os animais heterozigotos poderiam apresentar um fenótipo intermediário, porém mais semelhante aos ratos SHR parental do que os ratos LEW parental. Se essa hipótese estiver correta, dificuldades na detecção de diferenças

estatisticamente significantes entre os animais heterozigotos e homozigotos SHR poderiam estar acontecendo em decorrência do pequeno tamanho amostral e/ou dos grandes efeitos ambientais que sabidamente existem nesse tipo de fenótipo (IZÍDIO et al.,2005; CARDENAS et al., 2001); c) efeito aditivo dos alelos LEW que teriam pequena magnitude, só detectável em amostras numerosas; d) finalmente, a perda de alelos LEW no *locus* diferencial durante os retrocruzamentos também deve ser considerada. Entretanto, esta hipótese é improvável com base nos resultados dos animais semicongênicos N6F4 e N10F1, discutidos mais adiante e no efeito estatisticamente significativo para a locomoção central do CA obtida após a análise simultânea de todas as gerações (N3 a N10), com os heterozigotos exibindo maiores escores que os animais homozigotos SHR para o locus *Ofil1* (Figura 15).

De acordo com Ramos et al. (1999), a hipótese “b” parece ser a mais aceitável, devido à provável existência de dominância incompleta do alelo SHR em animais heterozigotos, localizados em *Ofil1*. Entretanto, se considerarmos os resultados de Izídio (2009), a hipótese “c” parece ser a mais provável. Neste estudo, os animais heterozigotos exibiram escores intermediários de locomoção central em relação aos parentais e, por utilizarem um maior número amostral de animais, em comparação ao estudo de Ramos et al. (1999), foi possível uma melhor delimitação do limite de significância exibida pelo QTL *Ofil1*. Nos resultados apresentados, a presença de um efeito aditivo parece a hipótese mais aceitável até o presente momento, visto que efeitos significativos foram encontrados a partir de uma análise contendo o total de animais de todas as gerações (N3 a N10), análise esta que revelou menores índices de emocionalidade dos animais heterozigotos em comparação aos animais homozigotos SHR ($p < 0,01$). Outros estudos também

mostram a necessidade de se utilizar um grande número amostral de animais para assegurar a detecção do efeito esperado através de comparações estatísticas (CARR et al., 2007).

Outros dois aspectos também podem ter contribuído para a ausência de efeitos significativos na maioria das gerações. O primeiro seria a influência de fatores ambientais, tais como as diferentes estações do ano presentes a cada geração, diferentes indivíduos trabalhando na manutenção do biotério (bioteristas), diferentes experimentadores realizando o procedimento de retirada do animal de sua gaiola-residência até o teste comportamental e outros fatores que não foram possíveis de serem controlados, como o ciclo estral das ratas. Estudos prévios em nosso laboratório mostram que o posicionamento das gaiolas nas estantes dos biotérios pode interferir em comportamentos relacionados à ansiedade, tornando os animais mais emocionais quando mantidos em gaiolas localizadas nos andares com maior exposição à luz, geralmente os superiores (IZÍDIO et al., 2005). Já em relação ao ciclo estral, estudos muito recentes mostram que essa variável pode influenciar o efeito do *locus Ofil1* e, conseqüentemente, alterar o comportamento dos animais no CA e na CBP (IZÍDIO et al., 2009).

Embora inúmeras explicações tenham sido propostas para justificar a ausência de efeitos comportamentais significativos no sentido esperado e as flutuações comportamentais ao longo das gerações, deve-se evidenciar que essa heterogeneidade entre as gerações é um aspecto comum que já foi observado em outros estudos que utilizam protocolos experimentais de seleção genética (CRABBE et al., 1999; RAMOS et al., 2003). Além disso, a presença de efeitos epistáticos ao longo das gerações também pode ter contribuído para a ausência do

efeito esperado. Assim como a heterogeneidade, a epistasia também tem sido relatada em outros estudos (GALE et al., 2009).

Assim, ao final do desenvolvimento da linhagem congênica SHR.LEW-*Ofil1* (animais homozigotos para os marcadores *D4Mgh6*, *D4Rat76* e *D4Rat59*), espera-se observar o aparecimento do fenótipo desejado, principalmente em relação às medidas do CA e da CBP. A obtenção dessa linhagem congênica também permitirá estudar a influência desse *locus* diferencial sobre outros fenótipos complexos, como o consumo de álcool, modelos de depressão, a hipertensão e a dor, além de permitir o desenvolvimento de mapas de alta resolução, para reduzir ainda mais a região de interesse.

4.2 Linhagens Semicongênicas N3

O desenvolvimento de linhagens semicongênicas permitiu confirmar a influência do *locus Ofil1* sobre a locomoção na parte central e aversiva do teste do CA, um índice de emocionalidade (RAMOS et al., 1999). Os resultados do presente estudo também permitiram considerações adicionais, como por exemplo, a capacidade de *Ofil1* de modular comportamentos no CA em diferentes condições ambientais, como a presença de diferentes intensidades de iluminação e de diferentes períodos circadianos (fases clara e escura). Além desse aspecto, esse *locus* também exibiu um efeito em comportamentos relacionados à ansiedade na CBP, entretanto nenhuma influência foi observada em comportamentos relacionados à ansiedade no LCE, à depressão no TNF e ao consumo de álcool, sacarina e quinino, o que sugere que esses fenótipos são influenciados por diferentes genes presentes em outros *loci* do cromossomo 4 ou em outros cromossomos.

Confirmando um estudo prévio (MORMÈDE et al., 2002), *Ofil1* influencia de forma significativa à locomoção central no teste do CA em ratos de ambos os sexos, e a presença de alelos LEW (N3F1 e N3F3) contribui para o aumento desse fenótipo. Esse efeito invertido era esperado, pois Ramos et al. (1999), ao identificarem o *locus Ofil1* nas linhagens LEW e SHR, já haviam observado esse fenômeno. Outros autores também já relataram a identificação de QTL exibindo efeitos opostos ao esperado (KÓVACS et al., 1997; SILVA et al., 2007), sugerindo que tal fenômeno é encontrado, principalmente em características quantitativas em que há participação de muitos genes.

Ramos et al (1999) demonstraram que *Ofil1* era específico em fêmeas, resultado este que, posteriormente, foi confirmado por Vendruscolo et al (2006a). Recentemente, estudos em nosso laboratório mostraram, a partir de uma análise de QTL realizada com as linhagens brasileiras LEW e SHR, que *Ofil1* afetava somente os machos (IZÍDIO, 2009). Algumas hipóteses podem ser levantadas para explicar esses resultados discrepantes, tais como: a) fatores ambientais idiossincráticos específicos de cada estudo – nesse sentido, pesquisadores reforçam a necessidade dos fatores ambientais serem rigorosamente controlados (CRABBE et al., 1999; WAHLSTEN et al., 2003); b) diversidade genética (mutações acumuladas ao longo das gerações) entre as sublinhagens brasileiras e francesas LEW e SHR, uma vez que há mais de 15 sublinhagens LEW e SHR registradas (RGD, 2009); c) influência de fatores hormonais, pois estudos já demonstraram o efeito das diferentes fases do ciclo estral em comportamentos de ansiedade (GOUVEIA et al., 2004). Nesse sentido, estudos realizados em nosso laboratório sugeriram que diferentes fases do ciclo estral podem influenciar o efeito de *Ofil1*, as quais também podem ter contribuído para o aparecimento desses resultados contrastantes nos diferentes estudos (IZÍDIO, 2009).

Ainda sobre o resultado da locomoção central, nas gerações N3F1 e N3F3, sugere-se que haja a necessidade de alelos LEW nas duas cópias do cromossomo 4 para que o efeito de *Ofil1* possa ser claramente evidenciado. Também se observou efeito de *Ofil1* na locomoção periférica de ratos machos e fêmeas, dados esses que corroboram um estudo prévio (MORMÈDE et al., 2002). Embora a locomoção periférica seja considerada um índice de atividade locomotora, tal medida comportamental também pode ser modulada por diferentes níveis de ansiedade (MORMÈDE et al., 2002; ROY et al., 2008; WEISS et al., 1998). Além

disso, no teste do CA, assim como em outros testes comportamentais, é difícil separar completamente componentes relacionados à locomoção geral daqueles componentes comportamentais relacionados à emocionalidade (TAKAHASHI et al., 2006). Em estudos clássicos do teste do CA realizados por Calvin Hall (1934), animais considerados altamente emocionais exibem baixa locomoção geral em comparação aos animais considerados menos emocionais. Nos resultados aqui apresentados, o efeito de *Ofil1* não foi específico para a locomoção central, fato esse que não corrobora resultados de Ramos et al. (1999), porém é consistente com pesquisadores que sugerem uma correlação genética significativa entre a locomoção central e periférica no teste do CA (HALL, 1934; MORMÈDE et al., 2002).

Outro aspecto avaliado foi a influência de alguns fatores ambientais, tais como os níveis de luminosidade e o ritmo circadiano, bem como suas interações com o locus *Ofil1*. Estudos têm demonstrado a influência de ritmos circadianos em comportamentos relacionados à ansiedade (BERTOGLIO; CAROBREZ, 2002; HALL et al., 2000). Além disso, influências ambientais e circadianas sobre o comportamento de animais podem ser moduladas por fatores genéticos (IZÍDIO et al., 2005). Nesse contexto, os resultados aqui apresentados a partir da geração N3F3 (Figura 19), mostraram que *Ofil1* influenciou a locomoção central de ratos machos em ambos os períodos testados, fase clara (10h00) e fase escura (1h00), sendo este efeito mais robusto na fase escura. Já em fêmeas, o *Ofil1* afetou a locomoção central somente na fase clara. Em relação à locomoção periférica, nos machos a influência do *Ofil1* ocorreu somente na fase escura e nas fêmeas, por outro lado, *Ofil1* influenciou esta medida independentemente da fase circadiana. O conjunto de resultados indica que o efeito do locus *Ofil1* é robusto, porém

dependente do sexo e do ritmo circadiano. É interessante ressaltar que, se uma comparação for realizada entre o efeito do *Ofil1* exibido sobre a locomoção central de fêmeas N3F3 avaliada na fase clara com alta iluminação (Figura 19) e com baixa iluminação N3F1 (Figura 18), torna-se possível sugerir que, a presença de uma iluminação intensa durante o teste não potencializa o efeito de *Ofil1* sobre esta medida comportamental, como era esperado. O mesmo efeito também é observado em machos. Essas comparações permitem sugerir que pelo menos na fase clara, a utilização de diferentes intensidades de luz durante o teste não favorece o aparecimento de um efeito mais robusto do *Ofil1*. Já em relação à fase escura, novos experimentos precisam ser realizados para confirmar ou não esta hipótese.

É possível sugerir que genes capazes de influenciar ritmos circadianos, localizados no *locus* diferencial, podem ser direta ou indiretamente responsáveis pelos efeitos de *Ofil1*. Destaca-se que o gene *Prock2* (134Mb), por exemplo, que participa da regulação do ritmo circadiano (CHENG et al., 2005; ZHOU; CHENG et al., 2005) e localizado muito próximo a *Ofil1* (*D4mgh6*=134Mb), poderia estar envolvido nos efeitos observados no presente estudo. Além de *Prock2*, outro gene no cromossomo 4, o do neuropeptídeo Y (NPY-78Mb), cuja localização não se encontra no intervalo entre os marcadores *D4Mgh6* e *D4Rat76*, embora esteja localizado próximo ao *D4Rat76* (85Mb), já foi identificado como um gene capaz de participar de processos circadianos (KIM et al., 2008).

Estudos genéticos realizados em humanos têm demonstrado uma ligação entre transtornos de humor e ritmos circadianos. Por exemplo, a substituição de um aminoácido (leucina por serina) no gene *Npas2* foi associada a transtornos afetivos sazonais (JOHANSSON et al., 2003) caracterizados por sintomas de depressão que ocorrem somente nos meses de inverno (MAGNUSSON;BOIVIN, 2003). Outro

exemplo consiste na troca de um único nucleotídeo (T por C) na região 3' do gene CLOCK, associado a altas taxas de episódios bipolares (BENEDETTI et al., 2003).

De forma consistente com a ideia de que *Ofil1* influencia comportamentos relacionados à ansiedade, os resultados da CBP demonstram, pela primeira vez, que este *locus* é capaz de influenciar medidas relacionadas à ansiedade em outro teste comportamental além do CA. Ratos N3F1 homocigotos LEW no *Ofil1* exibiram um aumento no número de transições e no tempo gasto no compartimento branco da CBP em comparação aos ratos N3F1 homocigotos SHR, sendo esse resultado consistente com os resultados obtidos no CA. Tais achados sugerem que as medidas de emocionalidade do CA e da CBP podem estar geneticamente correlacionadas, podendo compartilhar mecanismos moleculares comuns.

Sobre o teste do LCE, os resultados do presente estudo mostraram que o *locus Ofil1* não afeta qualquer medida comportamental desse teste, confirmando, assim, resultados prévios (MORMÈDE et al., 2002; RAMOS et al., 1999; VENDRUSCOLO et al., 2006a). Recentemente, Ramos (2008) mostrou que a porcentagem de variância compartilhada entre medidas relacionadas à ansiedade do CA e da CBP é maior que a variância compartilhada entre as medidas do CA e do LCE, o que é consistente com os resultados aqui apresentados.

O fato de *Ofil1* exibir um efeito pleiotrópico nas linhagens semicongênicas N3F1 tanto no CA quanto na CBP é interessante, pois QTLs e genes que influenciam medidas de ansiedade em diferentes paradigmas experimentais são sugestivos de possuírem uma relevância clínica (RAMOS; MORMÈDE, 2007). Além disso, a falta de efeito de *Ofil1* sobre o número de entradas nos braços fechados na LCE corrobora a hipótese de que este *locus* não afeta simplesmente um tipo de locomoção geral.

Alguns estudos têm sugerido a existência de genes pleiotrópicos afetando transtornos relacionados à ansiedade e à depressão em humanos (GORWOOD, 2004) e modelos animais (ANDREATINI; BACELLAR, 1999; BERTON et al., 1998; FLINT et al., 2004). Recentemente, utilizando linhagens congênicas e subcongênicas, técnicas de sequenciamento e análise de expressão gênica, Tomida et al. (2009) reduziram o intervalo de um QTL, no cromossomo 5 de camundongos, a 0,5 Mb e identificaram o gene *Usp46* (*ubiquitin-specific peptidase 46*) como sendo capaz de regular comportamento de imobilidade em camundongos submetidos a dois testes que avaliam índices de depressão, o teste de suspensão da cauda e o nado forçado.

No presente estudo, o efeito de *Ofil1* nos animais N3F1 não afetou comportamentos relacionados à depressão no TNF. Esse resultado não corrobora estudos prévios (HINOJOSA et al., 2006) que mostram uma correlação genética positiva entre o CA, o LCE e o TNF e que sugerem que índices de ansiedade e de depressão podem compartilhar mecanismos moleculares comuns. Em particular, sobre as linhagens LEW e SHR, estudos mostram que elas não exibem diferença no tempo de imobilidade do TNF (ARMÁRIO et al., 1995; LAHMAME et al., 1997), embora outros pesquisadores demonstrem que ratos LEW apresentam maior tempo de imobilidade em comparação aos ratos SHR (BERTON et al., 1998). É possível sugerir que esses resultados contraditórios tenham ocorrido devido à utilização de diferentes sublinhagens LEW e SHR em diferentes estudos (STOHR et al., 1998, 1999).

Sobre o consumo de álcool dos animais N3F2, os resultados aqui apresentados sugerem que *Ofil1* não influencia esse comportamento. Esses resultados não estão de acordo com um estudo prévio (VENDRUSCOLO et al.,

2006a), que mostra um efeito significativo de *Ofil1* no consumo de etanol por ratas. As diferenças entre esses estudos podem ser atribuídas ao tamanho da região genômica analisada e aos genes envolvidos em ambos os estudos, considerando que a região avaliada por Vendruscolo et al (2006a) era maior em comparação ao presente estudo, além de possuir o gene NPY no intervalo analisado por esses autores. Assim, é possível sugerir que talvez outras regiões do genoma, além do *locus* de interesse do presente estudo, atuem nesses comportamentos de consumo, o que poderia explicar parte das diferenças encontradas entre esses estudos.

Outros pesquisadores identificaram um locus no cromossomo 4, a partir do intercruzamento de linhagens de ratos que exibem alta (P) e baixa (NP) preferência pelo álcool em uma região próxima ao gene NPY, que afeta o consumo de etanol (BICE et al., 1998). Nesse sentido, estudos mostram que ratos mutantes para o gene NPY consomem menos álcool em comparação aos ratos selvagens (controle), o que sugere um papel para esse gene na modulação do consumo do álcool (THIELE et al., 2004). Outros dados experimentais utilizando diferentes linhagens de ratos (HEP – alta preferência pelo álcool e WKY – Wistar Kyoto) também já confirmaram que essa mesma região do cromossomo 4 influencia comportamentos relacionados à ansiedade (TERENINA-RIGALDIE et al., 2003a, 2003b). É possível sugerir, portanto, que o gene NPY seja um dos genes responsáveis por esse efeito pleiotrópico, porém outros estudos são necessários para confirmar essa possibilidade.

Em resumo, os resultados aqui apresentados, a partir das dos animais N3F1, N3F2 e N3F3, confirmam o efeito do *locus Ofil1* em medidas comportamentais do teste do CA e revelam que tal efeito pode ser ainda detectado quando os ratos são

testados sob diferentes condições experimentais e em diferentes fases do ritmo circadiano. Além disso, o *Ofil1* exibe um efeito pleiotrópico em medidas relacionadas à ansiedade no teste da CBP. Contudo, no presente estudo, o *Ofil1* não mostrou efeito nas medidas comportamentais relacionadas à ansiedade no LCE, nas relacionadas à depressão no TNF e nas relacionadas ao consumo de álcool.

4.3 Desenvolvimento das Linhagens Semicongênicas N6

Como visto anteriormente, a partir dos resultados obtidos da geração N6 heterozigota, na qual o *locus Ofil1* influenciou a locomoção central no teste do CA, optou-se por desenvolver animais homozigotos LEW para o *locus* diferencial a partir dessa geração. As linhagens parentais LEW e SHR foram produzidas simultaneamente e considerados os grupos controle, visto que a porcentagem de alelos da linhagem receptora SHR já se apresentava em 98,45%.

Os resultados da geração N6F4 homozigota LEW confirmaram a influência de *Ofil1* sobre a locomoção central do CA por mostrar que os N6F4 exibiram maiores escores em comparação à linhagem parental SHR, embora esse resultado não tenha se confirmado em relação ao tempo no centro do aparato. Outro resultado interessante refere-se ao fato de que *Ofil1* também influenciou a locomoção periférica desses animais, assim como havia sido observado nas linhagens semicongênicas N3F1. Esses dados sugerem a presença de genes capazes de influenciar tanto a locomoção central quanto a locomoção periférica,

corroborando estudos prévios (MORMÈDE et al., 2002). A partir de uma análise de QTL realizada recentemente em nosso laboratório no cromossomo 4 das sublinhagens brasileiras LEW e SHR, um QTL significativo para a medida de locomoção periférica foi identificado (IZÍDIO, 2009), porém os resultados sugerem não se tratar do mesmo pico de *Ofil1* que influencia medidas de ansiedade. Os resultados apresentados a partir dos animais semicongênicos N3F1, N3F3 e N6F4 ainda não permitem corroborar esses dados, pois somente com a obtenção de linhagem congênica final será possível afirmar que *Ofil1* influencia locomoção periférica, e somente com o desenvolvimento de linhagens subcongênicas será possível informar qual a região, de fato, é responsável por influenciar a locomoção periférica e a central, ou ambas.

Diferenças entre os N6F4 homozigotos e a parental LEW também foram detectadas, o que era de se esperar, por se considerar que há outras regiões do genoma responsáveis pelas diferenças encontradas entre as linhagens LEW e SHR. Além disso, encontraram-se diferenças entre as linhagens parentais para essas medidas do CA, o que corrobora estudos prévios (RAMOS et al., 1997, 1998, 1999; VENDRUSCOLO et al., 2006a).

Em relação ao efeito de *Ofil1* sobre o LCE, na geração N6F4, pela primeira vez se observou a influência desse *locus* sobre as medidas comportamentais obtidas com esse teste, mostrando que o *locus* diferencial, de fato, exibe um efeito pleiotrópico sobre medidas emocionais de diferentes testes comportamentais. Entretanto, novos experimentos precisam ser realizados para confirmar esse resultado, uma vez que, até o presente momento, não havia estudos sugerindo que esse *locus*, de fato, influencia comportamentos no LCE.

Os dados obtidos na CBP, provenientes dos animais N6F4, corroboram os resultados encontrados nas linhagens semicongênicas N3F1 e N3F3, o que sugere uma importante participação de *Ofil1* em outros testes comportamentais, uma vez que a presença de alelos LEW, em comparação à linhagem parental SHR, proporcionou aumento no tempo gasto no compartimento branco, um local considerado aversivo aos animais, devido à alta luminosidade presente nele.

O conjunto dos resultados apresentados a partir dos animais N3F1 e N6F4 sugere que as medidas de emocionalidade avaliadas no CA, no LCE e na CBP podem estar correlacionadas geneticamente, dados estes que corroboram em parte os resultados apresentados por outros autores que sugerem uma correlação genética entre o CA e o LCE (HINOJOSA et al., 2006), embora outros estudos sugeriram uma ausência de correlação genética entre as medidas comportamentais desses testes (RAMOS et al., 1998) em animais segregantes F2 resultantes do cruzamento de ratos LEW e SHR (RAMOS et al., 1998). Essa ausência de efeito parece ser específica de algumas linhagens, uma vez que a presença de correlação genética entre o teste do CA e o do LCE já foi observada em outras linhagens, tais como a HAB (*high anxiety-related behavior*) e a LAB (*low anxiety-related behavior*) (LIEBSCH et al., 1998). Novos estudos precisam ser realizados, especialmente com a linhagem congênica SHR.LEW-*Ofil1* a ser obtida, para confirmar se, de fato, esses três aparatos, que avaliam comportamentos relacionados à ansiedade, são modulados por mecanismos moleculares comuns.

Observa-se que muitos dos QTL detectados para fenótipos complexos são responsáveis somente por uma pequena porção do efeito genético, o que, associado com a baixa resolução dos métodos de ligação e com a ampla extensão das regiões genômicas identificadas, acaba por dificultar a identificação de

variações alélicas importantes responsáveis pelo fenótipo (FLINT; MOTT, 2001). Contudo, é importante enfatizar que *Ofil1* apresenta o segundo maior *lod score* (7,22) entre os 26 QTL para comportamentos relacionados à ansiedade, previamente descritos no genoma inteiro (RGD, 2009). Em regiões próximas de *Ofil1*, 63 QTL para diferentes fenótipos já foram descritos, tais como aqueles para consumo de álcool, açúcar e comida, comportamentos relacionados à ansiedade, pressão sanguínea, massa cardíaca, responsividade ao estresse, níveis de glicose, colesterol e triglicerídeos, e artrite induzida pelo colágeno (RGD, 2009). Na mesma região de *Ofil1*, mais de 400 genes já foram identificados, tais como genes que codificam a subunidade NR2b (*Grin2b*) do receptor NMDA potencialmente envolvido em fenótipos comportamentais avaliados no presente estudo (DE SOUZA SILVA et al., 2007; NAGY, 2004).

No cromossomo 4 do rato, outro importante gene, o SNCA, também já foi identificado, que codifica a proteína α -sinucleína, amplamente expressa no sistema nervoso central, e que pode participar na modulação de comportamentos relacionados à ansiedade (CHIAVEGATTO et al., 2009). Estudos com camundongos transgênicos que expressam diferentes níveis de α -sinucleína já confirmaram o envolvimento dessa proteína em comportamentos relacionados à ansiedade (GEORGE et al., 2008).

4.4 Produção de Animais N10 Homozigotos

O principal resultado obtido a partir dos animais N10F1 homozigotos LEW foi o aumento do tempo gasto no centro do CA em relação à linhagem parental SHR. Diferenças entre os N10F1 homozigotos LEW e a linhagem parental LEW, assim como entre as parentais controle, isto é, entre LEW e SHR, também foram encontradas para essa medida comportamental. O fato dos animais N10F1 homozigotos LEW permanecerem mais tempo em uma região aversiva do CA mostra que esse resultado ocorreu conforme o esperado, por se considerar que o alelo LEW de *Ofil1* contribui para a diminuição da emocionalidade.

Em relação às medidas comportamentais avaliadas no teste da CBP, os animais N10F1 homozigotos LEW não apresentaram diferenças significativas em comparação à linhagem parental SHR, embora diferenças significativas em comparação à linhagem parental LEW tenham sido detectadas como seria o esperado. Já em relação ao número de transições, diferenças significativas foram encontradas entre todos os grupos avaliados, porém não foi no sentido esperado, uma vez que os animais N10F1 homozigotos LEW deveriam apresentar escores ainda maiores do que os SHR parental. Algumas hipóteses foram levantadas para tentar explicar a ausência de efeito para algumas medidas do CA e da CBP. A primeira está baseada no fato dos animais N10F1 homozigotos possuírem alelos LEW somente no marcador *D4Mgh6* (pico de *Ofil1*), uma vez que, nesta etapa do trabalho, não houve animais suficientes com genótipo LEW também nos marcadores *D4Rat59* e *D4Rat76*. É possível que o gene responsável pelo efeito de

Ofil1 esteja mais próximo a esses marcadores do que do *D4Mgh6*, e por isso, parte do efeito de *Ofil1* tenha se perdido. É possível que a presença de alelos LEW nessas outras regiões (*D4Rat76* e *D4Rat59*) seja essencial para o aumento das medidas de ansiedade/emocionalidade nos testes do CA e da CBP, uma vez que as linhagens semicongênicas N3F1 e N6F4, que eram homozigotos também para os marcadores *D4Rat76* e *D4Rat59*, exibiram um aumento na locomoção central do CA e no tempo gasto no compartimento branco da CBP.

A segunda hipótese refere-se ao fato de que, a cada retrocruzamento, tanto alelos LEW são perdidos quanto alelos SHR são adquiridos no restante do genoma, o que poderia influenciar a ausência desse fenótipo, pois outras regiões críticas também estão sendo modificadas e interações epistáticas a cada geração podem surgir ou simplesmente deixar de ocorrer. Dados da literatura mostram que a epistasia é um efeito comum em *loci* que influenciam fenótipos comportamentais (GALE et al., 2009) e outros fenótipos complexos (CICILA et al., 2009; MORENO et al., 2007). Se esta hipótese estiver correta, talvez nenhum efeito seja observado na futura linhagem congênica finalizada, o que representaria um resultado bastante negativo após um projeto de tão longa duração.

É interessante notar que a presença de alelos LEW no *locus Ofil1* tem um efeito contrário ao esperado (RAMOS et al., 1999), ou seja, os animais LEW mostram um aumento na locomoção central em comparação aos animais SHR, quando, na verdade, se esperaria que a presença de alelos LEW diminuísse essa medida, conforme o comportamento observado em ratos LEW parental (HINOJOSA et al., 2006; RAMOS et al., 1997). Os resultados das linhagens semicongênicas N3F1 e N6F4 confirmam a presença desse efeito invertido e mostram, de forma consistente que, alelos LEW contribuem para um aumento da locomoção central do

teste do CA em comparação aos alelos SHR. Embora os animais homocigotos N10F1 não tenham exibido um aumento nessa medida comportamental, eles permaneceram mais tempo no centro do aparato em comparação aos ratos da linhagem parental SHR, medida esta que também é considerada um índice relacionado à emocionalidade (PRUT; BELZUNG, 2003).

Os resultados apresentados até o presente momento permitem inferir que o desenvolvimento de uma linhagem congênica, a ser ainda concluída, e de linhagens semicongênicas, é uma ferramenta promissora para o estudo pré-clínico de diferentes transtornos psiquiátricos, além de permitir a abertura de novas linhas de pesquisa sobre o *locus* diferencial de interesse. Buscas no site RDG revelaram a existência de genes associados a síndromes metabólicas no cromossomo 4. Essas informações permitem novas investigações sobre possíveis associações dessas síndromes com transtornos de ansiedade e alcoolismo. Estudos mostram que indivíduos com maiores índices emocionais consomem maiores quantidades de álcool (PANDEY et al., 2005; WEINBERG; KLONSKY, 2009). Outros estudos indicam que sintomas de ansiedade e de depressão podem ser considerados fatores de risco para o aparecimento de diabetes tipo 2 (ENGUM, 2007).

Outro exemplo é a presença de um gene, o PK2 (*Prok2*), já citado anteriormente, que atua no ritmo circadiano (CHENG et al., 2005; ZHOU; CHENG, 2005) e encontra-se localizado no *locus Ofil1*, delimitado pelos marcadores *D4Mgh6* e *D4Rat76*. Novos estudos precisam ser realizados após a obtenção da linhagem congênica, a fim de se avaliar o envolvimento desse gene nas diferenças encontradas nas linhagens semicongênicas N3F1,N3F2,N3F3. Estudos mostram que a utilização de linhagens congênicas desenvolvidas a partir de camundongos contribuíram para a confirmação de um *locus* no cromossomo 3, que contém genes

capazes de prolongar períodos circadianos e influenciar a atividade locomotora (KERNEK et al., 2004).

Como toda pesquisa, o presente trabalho apresentou diferentes tipos de limitações e dificuldades. Uma das principais consistiu no volume de reações moleculares, tais como as reações de PCR, géis de agarose e genotipagens, que precisam ser feitas a cada geração. No presente trabalho, ao se considerar a seleção positiva, em todas as gerações, e a seleção negativa realizada nas gerações N3 e N4 dos animais heterozigotos, cerca de 8.928 reações de PCR foram realizadas, fato que ilustra a necessidade de várias pessoas envolvidas no projeto. Outra limitação que merece destaque é a dificuldade de manter os números marcados na cauda de cada animal até a leitura final das genotipagens de cada marcador em cada geração, o que, no presente estudo, era compensada com a remarcação duas vezes por semana.

O delineamento do tamanho da região de interesse é outro aspecto importante que precisa ser considerado antes do desenvolvimento inicial de uma linhagem congênica, pois a escolha de regiões doadoras muito pequenas pode levar à perda de alelos no *locus* de interesse durante os processos de recombinação gênica. Além disso, é possível que, durante os retrocruzamentos, o efeito fenotípico esperado também seja perdido, principalmente se esse efeito for de natureza epistática. Nesse sentido, o acompanhamento fenotípico a cada geração torna-se uma medida preventiva, por permitir o acompanhamento do efeito exibido pelo *locus* diferencial a cada geração e, assim, oferecer a oportunidade de decidir pela continuação ou não do desenvolvimento da linhagem congênica. Dados da literatura mostram a perda ou o descarte de algumas linhagens congênicas

exatamente pela ausência do efeito fenotípico esperado ao final da obtenção da linhagem congênica (CARR et al., 2007; ELIOPOULOS et al., 2005).

Com o advento das novas tecnologias moleculares, em associação ao fato de que parte das abordagens utilizadas visa à identificação de genes candidatos aos mais variados fenótipos, torna-se imprescindível à associação entre diferentes estratégias genéticas e alta tecnologia.

Após a obtenção de linhagens congênicas, o próximo passo consiste no desenvolvimento de linhagens subcongênicas, com o objetivo de reduzir o tamanho da região de interesse mediante a utilização de uma grande quantidade de marcadores moleculares (NABIKA et al., 2000), seguido da utilização de técnicas de escaneamento genômico para a identificação de genes candidatos. Na literatura, um maior número de informações sobre genes e EST (*expressed sequence tags*) em camundongos e em humanos está disponível quando se compara com ratos. A principal consequência disso é a obtenção de um bom mapa comparativo entre essas espécies, o que pode fornecer novos conhecimentos sobre as regiões homólogas existentes entre essas espécies. A partir da obtenção de uma linhagem congênica, ficarão claros os limites da região onde está localizado o QTL previamente identificado. Se esse *locus* for relativamente pequeno, é possível fazer um comparativo entre os mapas de ratos, camundongos e humanos. Além disso, a tecnologia de *micro-array* tem permitido o estudo da expressão de milhões de genes simultaneamente (NABIKA et al., 2000).

5 CONCLUSÕES

O conjunto de resultados obtidos a partir da caracterização comportamental das gerações N3 a N10 permitiu concluir que esta avaliação foi útil no acompanhamento do efeito de *Ofil1* sobre as variáveis comportamentais do CA e da CBP, e demonstrou uma tendência dos animais heterozigotos a exibirem menores índices de emocionalidade em comparação aos homozigotos SHR, na maioria das gerações. Entretanto, a ausência de efeitos no genótipo heterozigoto desses animais pode ter ocorrido em função: a) da perda de interações epistáticas devido a inserção progressiva de alelos SHR e a perda progressiva de alelos LEW nas demais regiões do genoma a cada geração se considerarmos que o efeito de *Ofil1* identificado por Ramos et al.(1999) foi dependente de uma interação epistática; b) da possível presença de um efeito aditivo constituído de genes com pouca magnitude. Neste sentido, uma análise estatística realizada com os animais de todas as gerações (N3 a N10) demonstrou que, a partir de uma amostra numerosa heterozigota, é possível detectar o efeito de *Ofil1* no cromossomo 4 sobre medidas relacionadas a emocionalidade, sugerindo assim a existência de um ou mais genes de pequeno efeito no locus de interesse. Desta forma, tanto a presença de uma possível epistasia quanto a presença de genes de pequena magnitude podem ter dificultado a visualização do efeito de *Ofil1* sobre as variáveis estudadas ao longo das gerações.

Já os resultados das linhagens semicongênicas produzidas a partir das gerações N3 (N3F1, N3F2 e N3F3) e N6 (N6F1), e dos homozigotos N10 (N10F1), permitiram as seguintes conclusões: a) animais homozigotos para o alelo LEW no

locus Ofil1 das gerações N3 e N6 exibem um aumento na locomoção central do CA em comparação às suas respectivas linhagens controle, independentemente do sexo; b) fatores ambientais como o período do teste e a intensidade de iluminação podem interagir com o *locus Ofil1* e promover modificações no efeito do genótipo sobre as medidas comportamentais do CA, sendo estas dependentes do sexo e do período em que o teste é realizado; c) *Ofil1* também é capaz de influenciar diferentes medidas comportamentais em outros testes de ansiedade, o que mostra um efeito pleiotrópico sendo exibido por esse *locus*; d) o efeito de *Ofil1* exibido sobre as medidas de locomoção central e periférica talvez indique que esse *locus* não seja específico para medidas relacionadas à emocionalidade, porém somente após a obtenção da linhagem congênica final e de linhagens subcongênicas será possível confirmar ou não esse dado; e) O *Ofil1* não exibiu efeito sobre comportamentos relacionados à depressão e ao consumo de álcool, pelo menos na linhagem semicongênica N3F2 proveniente das linhagens parentais brasileiras LEW e SHR; f) a exata localização de *Ofil1* ainda não pode ser confirmada, embora o gene responsável pelo efeito de *Ofil1* talvez esteja mais próximo dos marcadores *D4Rat59* e *D4rat76*, com base nos resultados das linhagens homozigotas N3 e N6, além da presença de alelos LEW nessas outras regiões parecer essencial para o aumento das medidas de emocionalidade, principalmente do CA e da CBP; g) a partir dos animais homozigotos N10F1 é possível sugerir que a presença de alelos LEW nestas outras regiões (*D4Mgh6* e *D4Rat59*) seja essencial para o aumento das medidas de emocionalidade nos testes do CA e da CBP.

Os resultados aqui apresentados indicam que o efeito de *Ofil1* está presente no cromossomo 4 e influencia medidas relacionadas à emocionalidade. A partir das diferentes abordagens, utilizadas ao longo do desenvolvimento da linhagem congênica, foi possível realçar a complexidade da interação entre genes e ambiente no aparecimento do fenótipo em estudo, e permitiu a abertura de novas linhas de pesquisa sobre o efeito do *locus Ofil1*.

A obtenção da linhagem congênica denominada SHR.LEW-*Ofil1* permitirá, no futuro, avaliar e detalhar outros efeitos comportamentais e neurobiológicos, exibidos pelo *locus Ofil1*, em diferentes fenótipos complexos tais como nos processos relacionados à ansiedade, à depressão, ao consumo de etanol, ao estresse, aos distúrbios metabólicos, entre outros. Além disso, a partir desta linhagem congênica, será possível desenvolver linhagens subcongênicas a fim de reduzir ainda mais a região de interesse para que futuramente, potenciais genes candidatos presentes nesta promissora região genômica possam ser identificados.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aitman, T. J., Critser, J. K., Cuppen, E., Dominiczak, A., Fernandez-Suarez, X. M., Flint, J., Gauguier, D., Geurts, A. M., Gould, M., Harris, P. C., Holmdahl, R., Hubner, N., Izsvak, Z., Jacob, H. J., Kuramoto, T., Kwitek, A. E., Marrone, A., Mashimo, T., Moreno, C., Mullins, J., Mullins, L., Olsson, T., Pravenec, M., Riley, L., Saar, K., Serikawa, T., Shull, J. D., Szpirer, C., Twigger, S. N., Voigt, B. e Worley, K. Progress and prospects in rat genetics: a community view. Nat Genet, v.40, n.5, May, p.516-22. 2008.

Aitman, T. J., Glazier, A. M., Wallace, C. A., Cooper, L. D., Norsworthy, P. J., Wahid, F. N., Al-Majali, K. M., Trembling, P. M., Mann, C. J., Shoulders, C. C., Graf, D., St Lezin, E., Kurtz, T. W., Kren, V., Pravenec, M., Ibrahimi, A., Abumrad, N. A., Stanton, L. W. e Scott, J. Identification of Cd36 (Fat) as an insulin-resistance gene causing defective fatty acid and glucose metabolism in hypertensive rats. Nat Genet, v.21, n.1, Jan, p.76-83. 1999.

Alonso, S. J., Castellano, M. A., Afonso, D. e Rodriguez, M. Sex differences in behavioral despair: relationships between behavioral despair and open field activity. Physiol Behav, v.49, n.1, Jan, p.69-72. 1991.

Andreatini, R. e Bacellar, L. F. The relationship between anxiety and depression in animal models: a study using the forced swimming test and elevated plus-maze. Braz J Med Biol Res, v.32, n.9, Sep, p.1121-6. 1999.

Aneas, I., Rodrigues, M. V., Pauletti, B. A., Silva, G. J., Carmona, R., Cardoso, L., Kwitek, A. E., Jacob, H. J., Soler, J. M. e Krieger, J. E. Congenic strains provide evidence that four mapped loci in chromosomes 2, 4, and 16 influence hypertension in the SHR. Physiol Genomics, v.37, n.1, Mar 3, p.52-7. 2009.

Angrini, M., Leslie, J. C. e Shephard, R. A. Effects of propranolol, buspirone, pCPA, reserpine, and chlordiazepoxide on open-field behavior. Pharmacol Biochem Behav,

v.59, n.2, Feb, p.387-97. 1998.

Anisman, H., Zaharia, M. D., Meaney, M. J. e Merali, Z. Do early-life events permanently alter behavioral and hormonal responses to stressors? Int J Dev Neurosci, v.16, n.3-4, Jun-Jul, p.149-64. 1998.

Armario, A., Gavaldà, A. e Martí, J. Comparison of the behavioural and endocrine response to forced swimming stress in five inbred strains of rats. Psychoneuroendocrinology, v.20, n.8, p.879-90. 1995.

Armstrong, N. J., Brodnicki, T. C. e Speed, T. P. Mind the gap: analysis of marker-assisted breeding strategies for inbred mouse strains. Mamm Genome, v.17, n.4, Apr, p.273-87. 2006.

Backdahl, L., Ribbhammar, U. e Lorentzen, J. C. Mapping and functional characterization of rat chromosome 4 regions that regulate arthritis models and phenotypes in congenic strains. Arthritis Rheum, v.48, n.2, Feb, p.551-9. 2003.

Balaban, E., Alper, J. S. e Kasamon, Y. L. Mean genes and the biology of aggression: a critical review of recent animal and human research. J Neurogenet, v.11, n.1-2, Dec, p.1-43. 1996.

Barr, C. S., Newman, T. K., Becker, M. L., Parker, C. C., Champoux, M., Lesch, K. P., Goldman, D., Suomi, S. J. e Higley, J. D. The utility of the non-human primate; model for studying gene by environment interactions in behavioral research. Genes Brain Behav, v.2, n.6, Dec, p.336-40. 2003.

Benedetti, F., Serretti, A., Colombo, C., Barbini, B., Lorenzi, C., Campori, E. e Smeraldi, E. Influence of CLOCK gene polymorphism on circadian mood fluctuation and illness recurrence in bipolar depression. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, v.123B, n.1, Nov 15, p.23-6. 2003.

Bennett, B. Congenic strains developed for alcohol- and drug-related phenotypes. Pharmacol Biochem Behav, v.67, n.4, Dec, p.671-81. 2000.

Bennett, B. e Johnson, T. E. Development of congenics for hypnotic sensitivity to ethanol by QTL-marker-assisted counter selection. Mamm Genome, v.9, n.12, Dec, p.969-74. 1998.

Berrettini, W. H., Ferraro, T. N., Alexander, R. C., Buchberg, A. M. e Vogel, W. H. Quantitative trait loci mapping of three loci controlling morphine preference using inbred mouse strains. Nat Genet, v.7, n.1, May, p.54-8. 1994.

Bertoglio, L. J. e Carobrez, A. P. Behavioral profile of rats submitted to session 1-session 2 in the elevated plus-maze during diurnal/nocturnal phases and under different illumination conditions. Behav Brain Res, v.132, n.2, May 14, p.135-43. 2002.

Berton, O., Aguerre, S., Sarrieau, A., Mormede, P. e Chaouloff, F. Differential effects of social stress on central serotonergic activity and emotional reactivity in Lewis and spontaneously hypertensive rats. Neuroscience, v.82, n.1, Jan, p.147-59. 1998.

Bice, P., Foroud, T., Bo, R., Castelluccio, P., Lumeng, L., Li, T. K. e Carr, L. G. Genomic screen for QTLs underlying alcohol consumption in the P and NP rat lines. Mamm Genome, v.9, n.12, Dec, p.949-55. 1998.

Blanchard, D. C., Griebel, G. e Blanchard, R. J. The Mouse Defense Test Battery: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. Eur J Pharmacol, v.463, n.1-3, Feb 28, p.97-116. 2003.

Blanchard, R. J. e Blanchard, D. C. Effects of hippocampal lesions on the rat's reaction to a cat. J Comp Physiol Psychol, v.78, n.1, Jan, p.77-82. 1972.

Brimberg, L., Flaisher-Grinberg, S., Schilman, E. A. e Joel, D. Strain differences in 'compulsive' lever-pressing. Behav Brain Res, v.179, n.1, Apr 16, p.141-51. 2007.

Broadhurst, P. L. Determinants of emotionality in the rat. I. Situational factors. Br J Psychol, v.48, n.1, Feb, p.1-12. 1957.

Broadhurst, P.L The Maudsley reactive and nonreactive strains of rats: a survey. Behav Genet, v.5, n.4, Oct, p.299-319. 1975.

Broadhurst, P. L. e Bignami, G. Correlative Effects of Psychogenetic Selection: a Study of the Roman High and Low Avoidance Strains of Rats. Behav Res Ther, v.3, Apr, p.273-80. 1965.

Brocco, M., Dekeyne, A., Veiga, S., Girardon, S. e Millan, M. J. Induction of hyperlocomotion in mice exposed to a novel environment by inhibition of serotonin reuptake. A pharmacological characterization of diverse classes of antidepressant agents. Pharmacol Biochem Behav, v.71, n.4, Apr, p.667-80. 2002.

Brodkin, E. S. e Nestler, E. J. Quantitative Trait Locus Analysis: A New Tool for Psychiatric Genetics. Neuroscientist, v.4, n.5, September 1, 1998, p.317-323. 1998.

Buck, K. J., Metten, P., Belknap, J. K. e Crabbe, J. C. Quantitative trait loci involved in genetic predisposition to acute alcohol withdrawal in mice. J Neurosci, v.17, n.10, May 15, p.3946-55. 1997.

Calatayud, F., Belzung, C. e Aubert, A. Ethological validation and the assessment of anxiety-like behaviours: methodological comparison of classical analyses and structural approaches. Behav Processes, v.67, n.2, Sep 30, p.195-206. 2004.

Canli, T. e Lesch, K. P. Long story short: the serotonin transporter in emotion regulation and social cognition. Nat Neurosci, v.10, n.9, Sep, p.1103-9. 2007.

Cardenas, F., Lamprea, M.R., Morato, S. Vibrissal sense is not the main sensory modality in rat exploratory behavior in the elevated plus-maze. Behav Brain Res, v.122, n.2, Aug 1, p.169-74. 2001.

Carr, L. G., Foroud, T., Bice, P., Gobbett, T., Ivashina, J., Edenberg, H., Lumeng, L. e Li, T. K. A quantitative trait locus for alcohol consumption in selectively bred rat lines. Alcohol Clin Exp Res, v.22, n.4, Jun, p.884-7. 1998.

Carr, L. G., Habegger, K., Spence, J. P., Liu, L., Lumeng, L. e Foroud, T. Development of congenic rat strains for alcohol consumption derived from the alcohol-preferring and nonpreferring rats. Behav Genet, v.36, n.2, Mar, p.285-90. 2006.

Carr, L. G., Kimpel, M. W., Liang, T., McClintick, J. N., McCall, K., Morse, M. e Edenberg, H. J. Identification of candidate genes for alcohol preference by expression profiling of congenic rat strains. Alcohol Clin Exp Res, v.31, n.7, Jul, p.1089-98. 2007.

Caspi, A. e Moffitt, T. E. Gene-environment interactions in psychiatry: joining forces with neuroscience. Nat Rev Neurosci, v.7, n.7, Jul, p.583-90. 2006.

Caspi, A., Sugden, K., Moffitt, T. E., Taylor, A., Craig, I. W., Harrington, H., McClay, J., Mill, J., Martin, J., Braithwaite, A. e Poulton, R. Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. Science, v.301, n.5631, Jul 18, p.386-9. 2003.

Chapman, D. P., Whitfield, C. L., Felitti, V. J., Dube, S. R., Edwards, V. J. e Anda, R. F. Adverse childhood experiences and the risk of depressive disorders in adulthood. J Affect Disord, v.82, n.2, Oct 15, p.217-25. 2004.

Cheng, M. Y., Bittman, E. L., Hattar, S. e Zhou, Q. Y. Regulation of prokineticin 2 expression by light and the circadian clock. BMC Neurosci, v.6, p.17. 2005.

Chiavegatto, S., Izidio, G. S., Mendes-Lana, A., Aneas, I., Freitas, T.A., Torrão, A. S., Conceição, I. M., Britto, L. R. G., Ramos, A. Expression of α -synuclein is increased in the hippocampus of rats with high levels of innate anxiety. Mol. Psychiatry, v.14, p. 894-905.2009.

Cicila, G. T., Garrett, M. R., Lee, S. J., Liu, J., Dene, H. e Rapp, J. P. High-resolution mapping of the blood pressure QTL on chromosome 7 using Dahl rat congenic strains. Genomics, v.72, n.1, Feb 15, p.51-60. 2001.

Cicila, G. T., Morgan, E. E., Lee, S. J., Farms, P., Yerga-Woolwine, S., Toland, E. J., Ramdath, R. S., Gopalakrishnan, K., Bohman, K., Nestor-Kalinowski, A. L., Khuder, S. A. e Joe, B. Epistatic genetic determinants of blood pressure and mortality in a salt-sensitive hypertension model. Hypertension, v.53, n.4, Apr, p.725-32. 2009.

Coryell, M. W., Ziemann, A. E., Westmoreland, P. J., Haenfler, J. M., Kurjakovic, Z., Zha, X. M., Price, M., Schnizler, M. K. e Wemmie, J. A. Targeting ASIC1a reduces innate fear and alters neuronal activity in the fear circuit. Biol Psychiatry, v.62, n.10, Nov 15, p.1140-8. 2007.

Cowley, A. W., Jr., Roman, R. J. e Jacob, H. J. Application of chromosomal substitution techniques in gene-function discovery. J Physiol, v.554, n.Pt 1, Jan 1, p.46-55. 2004a.

Cowley, A. W., Jr., Liang, M., Roman, R. J., Greene, A. S. e Jacob, H. J. Consomic rat model systems for physiological genomics. Acta Physiol Scand, v.181, n.4, Aug, p.585-92. 2004b.

Crabbe, J. C., Wahlsten, D. e Dudek, B. C. Genetics of mouse behavior: interactions with laboratory environment. Science, v.284, n.5420, Jun 4, p.1670-2. 1999.

Crawley, J. N. Neuropharmacologic specificity of a simple animal model for the behavioral actions of benzodiazepines. Pharmacol Biochem Behav, v.15, n.5, Nov, p.695-9. 1981.

Crowley, J. J., Brodtkin, E. S., Blendy, J. A., Berrettini, W. H. e Lucki, I. Pharmacogenomic evaluation of the antidepressant citalopram in the mouse tail suspension test. Neuropsychopharmacology, v.31, n.11, Nov, p.2433-42. 2006.

Cryan, J. F. e Holmes, A. The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. Nat Rev Drug Discov, v.4, n.9, Sep, p.775-90. 2005.

Da Silva, G. E., Ramos, A. e Takahashi, R. N. Comparison of voluntary ethanol intake by two pairs of rat lines used as genetic models of anxiety. Braz J Med Biol Res, v.37, n.10, Oct, p.1511-7. 2004.

Darvasi, A. Interval-specific congenic strains (ISCS): an experimental design for mapping a QTL into a 1-centimorgan interval. Mamm Genome, v.8, n.3, Mar, p.163-7. 1997.

Darvasi A. Experimental strategies for the genetic dissection of complex traits in animal models. Nat Genet. v.18, n.1, Jan; p.19-24. 1998.

De Souza Silva, M. A., Marchetti, L., Eisel, U. L., Huston, J. P. e Dere, E. NR2C by NR2B subunit exchange in juvenile mice affects emotionality and 5-HT in the frontal cortex. Genes Brain Behav, v.6, n.5, Jul, p.465-72. 2007.

Defries, J. C., Gervais, M. C. e Thomas, E. A. Response to 30 generations of selection for open-field activity in laboratory mice. Behav Genet, v.8, n.1, Jan, p.3-13. 1978.

Dere, E., Zheng-Fischhofer, Q., Viggiano, D., Gironi Carnevale, U. A., Ruocco, L. A., Zlomuzica, A., Schnichels, M., Willecke, K., Huston, J. P. e Sadile, A. G. Connexin31.1 deficiency in the mouse impairs object memory and modulates open-field exploration, acetylcholine esterase levels in the striatum, and cAMP response element-binding protein levels in the striatum and piriform cortex. Neuroscience, v.153, n.2, May 2, p.396-405. 2008.

Diana, G., Capasso, A., Quaranta, E. e De Feo, V. Differential effects of three species of Hypericum in an open field test. Phytother Res, v.21, n.3, Mar, p.215-9. 2007.

Dwinell, M. R., Worthey, E. A., Shimoyama, M., Bakir-Gungor, B., Depons, J., Laulederkind, S., Lowry, T., Nigram, R., Petri, V., Smith, J., Stoddard, A., Twigger, S. N. e Jacob, H. J. The Rat Genome Database 2009: variation, ontologies and pathways. Nucleic Acids Res, v.37, n.Database issue, Jan, p.D744-9. 2009.

Eliopoulos, V., Dutil, J., Deng, Y., Grondin, M. e Deng, A. Y. Severe hypertension caused by alleles from normotensive Lewis for a quantitative trait locus on chromosome 2. Physiol Genomics, v.22, n.1, Jun 16, p.70-5. 2005.

Endler, J. A. Defense against predators. In: Feder, M. E. e Lauder, G. V. (Ed.). Predator-prey relationships: perspectives and approaches from the Study of Lower Vertebrates. Chicago: University of Chicago Press, 1986.

Engum, A. The role of depression and anxiety in onset of diabetes in a large population-based study. J Psychosom Res, v.62, n.1, Jan, p.31-8. 2007.

Ennaceur, A., Michalikova, S., Bradford, A. e Ahmed, S. Detailed analysis of the behavior of Lister and Wistar rats in anxiety, object recognition and object location tasks. Behav Brain Res, v.159, n.2, Apr 30, p.247-66. 2005.

Ennaceur, A., Michalikova, S. e Chazot, P. L. Models of anxiety: responses of rats to novelty in an open space and an enclosed space. Behav Brain Res, v.171, n.1, Jul 15, p.26-49. 2006.

Ennaceur, A., Michalikova, S., Van Rensburg, R. e Chazot, P. L. Are benzodiazepines really anxiolytic? Evidence from a 3D maze spatial navigation task. Behav Brain Res, v.188, n.1, Mar 17, p.136-53. 2008.

Enoch, M. A. e Goldman, D. The genetics of alcoholism and alcohol abuse. Curr Psychiatry Rep, v.3, n.2, Apr, p.144-51. 2001.

Fang, C., Ballet, C., Dugast, A. S., Godard, A., Moreau, A., Usal, C., Smit, H., Vanhove, B., Brouard, S., Harb, J. e Souillou, J. P. Autoimmune responses against renal tissue proteins in long-term surviving allograft recipients. Transpl Int, v.22, n.11, Nov, p.1091-9. 2009.

Fehr, C., Shirley, R. L., Belknap, J. K., Crabbe, J. C. e Buck, K. J. Congenic mapping of alcohol and pentobarbital withdrawal liability loci to a <1 centimorgan interval of murine chromosome 4: identification of Mpdz as a candidate gene. J Neurosci, v.22, n.9, May 1, p.3730-8. 2002.

Fernandez-Teruel, A., Driscoll, P., Gil, L., Aguilar, R., Tobena, A. e Escorihuela, R. M. Enduring effects of environmental enrichment on novelty seeking, saccharin and ethanol intake in two rat lines (RHA/Verh and RLA/Verh) differing in incentive-seeking behavior. Pharmacol Biochem Behav, v.73, n.1, Aug, p.225-31. 2002.

Festing, M. F. W. Inbred strain of mice and their characteristics. In: *Mouse Genome Informatics* (MGI), 1998. Disponível em: <<http://www.informatics.jax.org>>. Acesso em: 10 nov. 2009

Fijneman, R. J., De Vries, S. S., Jansen, R. C. e Demant, P. Complex interactions of new quantitative trait loci, Sluc1, Sluc2, Sluc3, and Sluc4, that influence the susceptibility to lung cancer in the mouse. Nat Genet, v.14, n.4, Dec, p.465-7. 1996.

File, S. E. The contribution of behavioural studies to the neuropharmacology of anxiety. Neuropharmacology, v.26, n.7B, Jul, p.877-86. 1987.

Finn, D. A., Rutledge-Gorman, M. T. e Crabbe, J. C. Genetic animal models of anxiety. Neurogenetics, v.4, n.3, Apr, p.109-35. 2003.

Flint, J., Corley, R., DeFries, J. C., Fulker, D.W., Gray, J.A., Miller, S., Collins, A.C. A simple genetic basis for a complex psychological trait in laboratory mice. Science, v.269 (5229), Sep, p. 81432-5. 1995

Flint, J. The genetic basis of cognition. Brain, v.122 (Pt 11), Nov, p.2015-32. 1999.

Flint, J. e Mott, R. Finding the molecular basis of quantitative traits: successes and pitfalls. Nat Rev Genet, v.2, n.6, Jun, p.437-45. 2001.

Flint ,J. The genetic basis of neuroticism. Neurosci Biobehav Rev, v.28,n.3, May,p. 307-16. 2004

Frankel, W. N., Johnson, E. W. e Lutz, C. M. Congenic strains reveal effects of the epilepsy quantitative trait locus, EI2, separate from other EI loci. Mamm Genome, v.6, n.12, Dec, p.839-43. 1995.

Frye, C. A., Paris, J. J. e Rhodes, M. E. Exploratory, anti-anxiety, social, and sexual behaviors of rats in behavioral estrus is attenuated with inhibition of 3alpha,5alpha-THP formation in the midbrain ventral tegmental area. Behav Brain Res, v.193, n.2, Nov 21, p.269-76. 2008.

Fujita, O. Tsukuba Emotionality: new selected rats. Rat News Lett., v.13, p.31. 1984.

Fuller, J. M., Bogdani, M., Tupling, T. D., Jensen, R. A., Pefley, R., Manavi, S., Cort, L., Blankenhorn, E. P., Mordes, J. P., Lernmark, A. e Kwitek, A. E. Genetic dissection reveals diabetes loci proximal to the gimap5 lymphopenia gene. Physiol Genomics, v.38, n.1, Jun 10, p.89-97. 2009.

Fuller, J. M., Kwitek, A. E., Hawkins, T. J., Moralejo, D. H., Lu, W., Tupling, T. D., Macmurray, A. J., Borchardt, G., Hasinoff, M. e Lernmark, A. Introgression of F344 rat genomic DNA on BB rat chromosome 4 generates diabetes-resistant lymphopenic BB rats. Diabetes, v.55, n.12, Dec, p.3351-7. 2006.

Gale, G. D., Yazdi, R. D., Khan, A. H., Lusic, A. J., Davis, R. C. e Smith, D. J. A genome-wide panel of congenic mice reveals widespread epistasis of behavior quantitative trait loci. Mol Psychiatry, v.14, n.6, Jun, p.631-45. 2009.

Garrett, M. R., Dene, H., Walder, R., Zhang, Q. Y., Cicila, G. T., Assadnia, S., Deng, A. Y. e Rapp, J. P. Genome scan and congenic strains for blood pressure QTL using Dahl salt-sensitive rats. Genome Res, v.8, n.7, Jul, p.711-23. 1998.

George, S., Van Den Buuse, M., San Mok, S., Masters, C. L., Li, Q. X. e Culvenor, J. G. Alpha-synuclein transgenic mice exhibit reduced anxiety-like behaviour. Exp Neurol, v.210, n.2, Apr, p.788-92. 2008.

Gershenfeld, H. K. e Paul, S. M. Towards a genetics of anxious temperament: from mice to men. Acta Psychiatr Scand Suppl, v.393, p.56-65. 1998.

Geschwind, D. H. e Levitt, P. Autism spectrum disorders: developmental disconnection syndromes. Curr Opin Neurobiol, v.17, n.1, Feb, p.103-11. 2007.

Goldman, D., Oroszi, G. e Ducci, F. The genetics of addictions: uncovering the genes. Nat Rev Genet, v.6, n.7, Jul, p.521-32. 2005.

Gouveia, A. Jr., dos Santos U. D., Felisbino, F. E., de Afonseca, T. L., Antunes, G., Morato, S. Influence of the estrous cycle on the behavior of rats in the elevated T-maze. Behav Processes, v.67, n.2, p.167-71. 2004.

Gorwood, P. Generalized anxiety disorder and major depressive disorder comorbidity: an example of genetic pleiotropy? Eur Psychiatry, v.19, n.1, Feb, p.27-33. 2004.

Graham, D., McBride, M. W., Gaasenbeek, M., Gilday, K., Beattie, E., Miller, W. H., McClure, J. D., Polke, J. M., Montezano, A., Touyz, R. M. e Dominiczak, A. F. Candidate genes that determine response to salt in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat: congenic analysis. Hypertension, v.50, n.6, Dec, p.1134-41. 2007.

Gregory, S. G., Sekhon, M., Schein, J., Zhao, S., Osoegawak, K., Scott, C. E., Evans, R., Burridge, P., Cox, T. V., et al. A physical map of the mouse genome. Nature, v. 418, Aug, 15,p.743-749.

Hall, C. S. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. J Comp Psychol, v.18, n.3, p.385-403. 1934.

Hall, C. S. Emotional behavior in the rat. III The relationship between emotionality and ambulatory activity. J Comp Psychol, v.22, p.345–452. 1936.

Hameister, T. M., Izídio, G. S., Valiati, V. H. Ramos, A. Association of a locus on rat chromosome 4 with anxiety-related behaviors in two selectively bred rat lines. Gen. Mol. Biol., v.31,n.4, p. 843-849. 2008.

Hamer, D. Genetics. Rethinking behavior genetics. Science, v.298, n.5591, Oct 4, p.71-2. 2002.

Hinojosa, F. R., Spricigo, L., Jr., Izidio, G. S., Bruske, G. R., Lopes, D. M. e Ramos, A. Evaluation of two genetic animal models in behavioral tests of anxiety and depression. Behav Brain Res, v.168, n.1, Mar 15, p.127-36. 2006.

Horii, Y., Yamasaki, N., Miyakawa, T. e Shiosaka, S. Increased anxiety-like behavior in neuropsin (kallikrein-related peptidase 8) gene-deficient mice. Behav Neurosci, v.122, n.3, Jun, p.498-504. 2008.

Inoue, K. e Lupski, J. R. Genetics and genomics of behavioral and psychiatric disorders. Curr Opin Genet Dev, v.13, n.3, Jun, p.303-9. 2003.

Ishikawa, N., Harada, Y., Maruyama, R., Masuda, J. e Nabika, T. Genetic effects of blood pressure quantitative trait loci on hypertension-related organ damage: evaluation using multiple congenic strains. Hypertens Res, v.31, n.9, Sep, p.1773-9. 2008.

Izidio, G. S., Lopes, D. M., Spricigo, L., Jr. e Ramos, A. Common variations in the pretest environment influence genotypic comparisons in models of anxiety. Genes Brain Behav, v.4, n.7, Oct, p.412-9. 2005.

Izidio, G. S. e Ramos, A. Positive association between ethanol consumption and anxiety-related behaviors in two selected rat lines. Alcohol, v.41, n.7, Nov, p.517-24. 2007.

Izídio, G. S. Análise de QTL com estudo de genes candidatos para comportamentos relacionados à emocionalidade e ao consumo de etanol usando um modelo genético composto pelas linhagens de ratos Lewis e SHR, Florianópolis, 2009. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Universidade Federal de Santa Catarina.

Jacob, H. J. Functional genomics and rat models. Genome Res, v.9, n.11, Nov, p.1013-6. 1999.

Jawahar, M. C., Brodnicki, T. C., Quirk, F., Wilson, Y. M. e Murphy, M. Behavioural analysis of congenic mouse strains confirms stress-responsive Loci on chromosomes 1 and 12. Behav Genet, v.38, n.4, Jul, p.407-16. 2008.

Johannesson, M., Karlsson, J., Wernhoff, P., Nandakumar, K. S., Lindqvist, A. K., Olsson, L., Cook, A. D., Andersson, A. e Holmdahl, R. Identification of epistasis through a partial advanced intercross reveals three arthritis loci within the Cia5 QTL in mice. Genes Immun, v.6, n.3, May, p.175-85. 2005.

Johansson, C., Willeit, M., Smedh, C., Ekholm, J., Paunio, T., Kieseppa, T., Lichtermann, D., Praschak-Rieder, N., Neumeister, A., Nilsson, L. G., Kasper, S., Peltonen, L., Adolfsson, R., Schalling, M. e Partonen, T. Circadian clock-related polymorphisms in seasonal affective disorder and their relevance to diurnal preference. Neuropsychopharmacology, v.28, n.4, Apr, p.734-9. 2003.

Johnston, A. L. e File, S. E. Sex differences in animal tests of anxiety. Physiol Behav, v.49, n.2, Feb, p.245-50. 1991.

Kas, M. J. e Van Ree, J. M. Dissecting complex behaviours in the post-genomic era. Trends Neurosci, v.27, n.7, Jul, p.366-9. 2004.

Kasahara, M., Groenink, L., Breuer, M., Olivier, B. e Sarnyai, Z. Altered behavioural adaptation in mice with neural corticotrophin-releasing factor overexpression. Genes Brain Behav, v.6, n.7, Oct, p.598-607. 2007.

Kendler, K. S., Kessler, R. C., Walters, E. E., Maclean, C., Neale, M. C., Heath, A. C. e Eaves, L. J. Stressful life events, genetic liability, and onset of an episode of major depression in women. Am J Psychiatry, v.152, n.6, Jun, p.833-42. 1995.

Kendler, K. S., Myers, J. e Prescott, C. A. Parenting and adult mood, anxiety and substance use disorders in female twins: an epidemiological, multi-informant, retrospective study. Psychol Med, v.30, n.2, Mar, p.281-94. 2000.

Kendler, K. S., Prescott, C. A., Myers, J. e Neale, M. C. The structure of genetic and environmental risk factors for common psychiatric and substance use disorders in men and women. Arch Gen Psychiatry, v.60, n.9, Sep, p.929-37. 2003.

Kendler, K. S., Walters, E. E., Neale, M. C., Kessler, R. C., Heath, A. C. e Eaves, L. J. The structure of the genetic and environmental risk factors for six major psychiatric disorders in women. Phobia, generalized anxiety disorder, panic disorder, bulimia, major depression, and alcoholism. Arch Gen Psychiatry, v.52, n.5, May, p.374-83. 1995.

Kernek, K. L., Trofatter, J. A., Mayeda, A. R. e Hofstetter, J. R. A locus for circadian period of locomotor activity on mouse proximal chromosome 3. Chronobiol Int, v.21, n.3, May, p.343-52. 2004.

Khanna, J. M., Kalant, H., Chau, A. K. e Sharma, H. Initial sensitivity, acute tolerance and alcohol consumption in four inbred strains of rats. Psychopharmacology (Berl), v.101, n.3, p.390-5. 1990.

Kim, H. J. e Harrington, M. E. Neuropeptide Y-deficient mice show altered circadian response to simulated natural photoperiod. Brain Res, v.1246, Dec 30, p.96-100. 2008.

King, S. M. Escape-related behaviours in an unstable elevated and exposed environment. I. A new behavioural model of extreme anxiety. Behav Brain Res, v.98, n.1, Jan, p.113-26. 1999.

Kishi, T., Kato, M., Shimizu, T., Kato, K., Matsumoto, K., Yoshida, S., Shiosaka, S. e Hakoshima, T. Crystal structure of neuropsin, a hippocampal protease involved in kindling epileptogenesis. J Biol Chem, v.274, n.7, Feb 12, p.4220-4. 1999.

Kloting, N., Wilke, B. e Kloting, I. Phenotypic and genetic analyses of subcongenic BB.SHR rat lines shorten the region on chromosome 4 bearing gene(s) for underlying facets of metabolic syndrome. Physiol Genomics, v.18, n.3, Aug 11, p.325-30. 2004.

Klötting, N., Wilke, B., Klötting, I. Alleles on rat chromosome 4 (D4Got41-Fabp1/Tacr1) regulate subphenotypes of obesity. Obes Res, v.13, n.3, Mar, p.589-95. 2005.

Klötting, N., Wilke, B., Klötting, I. Triplet repeat in the Repin1 3'-untranslated region on rat chromosome 4 correlates with facets of the metabolic syndrome. Diabetes Metab Res Rev, v.23, n.5, Jul, p.406-10. 2007.

Kovács, P.; Voigt, B.; Klötting, I. Alleles of the spontaneously hypertensive rat decrease blood pressure at loci on chromosomes 4 and 13. Biochem Biophys Res Com, v. 238, p. 586-589. 1997.

Kosten, T. A., Miserendino, M. J., Chi, S. e Nestler, E. J. Fischer and Lewis rat strains show differential cocaine effects in conditioned place preference and behavioral sensitization but not in locomotor activity or conditioned taste aversion. J Pharmacol Exp Ther, v.269, n.1, Apr, p.137-44. 1994.

Kotliarova, S., Pastorino, S., Kovell, L. C., Kotliarov, Y., Song, H., Zhang, W., Bailey, R., Maric, D., Zenklusen, J. C., Lee, J. e Fine, H. A. Glycogen synthase kinase-3 inhibition induces glioma cell death through c-MYC, nuclear factor-kappaB, and glucose regulation. Cancer Res, v.68, n.16, Aug 15, p.6643-51. 2008.

Kovacs, P., Van Den Brandt, J., Bonne, A. C., Van Zutphen, L. F., Van Lith, H. A. e Kloting, I. Congenic BB.SHR rat provides evidence for effects of a chromosome 4 segment (D4Mit6-Npy approximately 1 cm) on total serum and lipoprotein lipid

concentration and composition after feeding a high-fat, high-cholesterol diet. Metabolism, v.50, n.4, Apr, p.458-62. 2001.

Kozel, F. A., Trivedi, M. H., Wisniewski, S. R., Miyahara, S., Husain, M. M., Fava, M., Lebowitz, B., Zisook, S. e Rush, A. J. Treatment outcomes for older depressed patients with earlier versus late onset of first depressive episode: a Sequenced Treatment Alternatives to Relieve Depression (STAR*D) report. Am J Geriatr Psychiatry, v.16, n.1, Jan, p.58-64. 2008.

Kozell, L., Belknap, J. K., Hofstetter, J. R., Mayeda, A. e Buck, K. J. Mapping a locus for alcohol physical dependence and associated withdrawal to a 1.1 Mb interval of mouse chromosome 1 syntenic with human chromosome 1q23.2-23.3. Genes Brain Behav, v.7, n.5, Jul, p.560-7. 2008.

Lad, H. V., Liu, L., Paya-Cano, J. L., Fernandes, C. e Schalkwyk, L. C. Quantitative traits for the tail suspension test: automation, optimization, and BXD RI mapping. Mamm Genome, v.18, n.6-7, Jul, p.482-91. 2007.

Lahmame, A., Del Arco, C., Pazos, A., Yritia, M. e Armario, A. Are Wistar-Kyoto rats a genetic animal model of depression resistant to antidepressants? Eur J Pharmacol, v.337, n.2-3, Oct 22, p.115-23. 1997.

Lander, E., Kruglyak, L. Genetic dissection of complex trait: guidelines for interpreting and reporting linkage results. Nat Genet, v.11, p.241-247. 1995.

Landgraf, R. e Wigger, A. High vs low anxiety-related behavior rats: an animal model of extremes in trait anxiety. Behav Genet, v.32, n.5, Sep, p.301-14. 2002.

Lassalle, J.M. Animal Resources in Behavioral Neurogenetics. In: Jones, B. C. e Mormède, P. (Ed.). Neurobehavioral Genetics: Methods and Applications: Taylor & Francis Group, 2007. p.129-147.

Lee, S. J., Liu, J., Qi, N., Guarnera, R. A., Lee, S. Y. e Cicila, G. T. Use of a panel of congenic strains to evaluate differentially expressed genes as candidate genes for

blood pressure quantitative trait loci. Hypertens Res, v.26, n.1, Jan, p.75-87. 2003.

Lewejohann, L., Reinhard, C., Schrewe, A., Brandewiede, J., Haemisch, A., Gortz, N., Schachner, M. e Sachser, N. Environmental bias? Effects of housing conditions, laboratory environment and experimenter on behavioral tests. Genes Brain Behav, v.5, n.1, Feb, p.64-72. 2006.

Liebsch, G., Montkowski, A., Holsboer, F. e Landgraf, R. Behavioural profiles of two Wistar rat lines selectively bred for high or low anxiety-related behaviour. Behav Brain Res, v.94, n.2, Aug, p.301-10. 1998.

Lindsey, J. R. Historical foundations in the laboratory rat. In: Baker, H. J., Lindsey, J. R. e Weisbroth, S. H. (Ed.). The laboratory rat. New York: Academic Press, 1979. p.1-36.

Liu, X., Stancliffe, D., Lee, S., Mathur, S. e Gershenfeld, H. K. Genetic dissection of the tail suspension test: a mouse model of stress vulnerability and antidepressant response. Biol Psychiatry, v.62, n.1, Jul 1, p.81-91. 2007.

Lord, C. J., Bohlander, S. K., Hopes, E. A., Montague, C. T., Hill, N. J., Prins, J. B., Renjilian, R. J., Peterson, L. B., Wicker, L. S., Todd, J. A. e Et Al. Mapping the diabetes polygene Idd3 on mouse chromosome 3 by use of novel congenic strains. Mamm Genome, v.6, n.9, Sep, p.563-70. 1995.

Low, N. C. e Hardy, J. What is a schizophrenic mouse? Neuron, v.54, n.3, May 3, p.348-9. 2007.

Magnusson, A. e Boivin, D. Seasonal affective disorder: an overview. Chronobiol Int, v.20, n.2, Mar, p.189-207. 2003.

Maisonnette, S., Morato, S. e Brandao, M. L. Role of resocialization and of 5-HT1A receptor activation on the anxiogenic effects induced by isolation in the elevated plus-maze test. Physiol Behav, v.54, n.4, Oct, p.753-8. 1993.

Markel, P. D., Bennett, B., Beeson, M., Gordon, L. e Johnson, T. E. Confirmation of quantitative trait loci for ethanol sensitivity in long-sleep and short-sleep mice. Genome Res, v.7, n.2, Feb, p.92-9. 1997.

Mcallister, T. W. e Summerall, L. Genetic polymorphisms in the expression and treatment of neuropsychiatric disorders. Curr Psychiatry Rep, v.5, n.5, Oct, p.400-9. 2003.

Mcbride, M. W., Charchar, F. J., Graham, D., Miller, W. H., Strahorn, P., Carr, F. J. e Dominiczak, A. F. Functional genomics in rodent models of hypertension. J Physiol, v.554, n.Pt 1, Jan 1, p.56-63. 2004.

Medical College of Wisconsin. RGD - Rat Genome Database. Disponível em: <<http://www.mcw.edu/HMGC.htm>>. Acesso em: 14 set. 2009.

Moore, K. J. e Nagle, D. L. Complex trait analysis in the mouse: The strengths, the limitations and the promise yet to come. Annu Rev Genet, v.34, p.653-686. 2000.

Mordes, J. P., Leif, J., Novak, S., Descipio, C., Greiner, D. L. e Blankenhorn, E. P. The iddm4 locus segregates with diabetes susceptibility in congenic WF.iddm4 rats. Diabetes, v.51, n.11, Nov, p.3254-62. 2002.

Morel, L., Yu, Y., Blenman, K. R., Caldwell, R. A. e Wakeland, E. K. Production of congenic mouse strains carrying genomic intervals containing SLE-susceptibility genes derived from the SLE-prone NZM2410 strain. Mamm Genome, v.7, n.5, May, p.335-9. 1996.

Moreno, C., Kaldunski, M. L., Wang, T., Roman, R. J., Greene, A. S., Lazar, J., Jacob, H. J. e Cowley, A. W., Jr. Multiple blood pressure loci on rat chromosome 13 attenuate development of hypertension in the Dahl S hypertensive rat. Physiol Genomics, v.31, n.2, Oct 22, p.228-35. 2007.

Mormede, P., Courvoisier, H., Ramos, A., Marissal-Arvy, N., Ousova, O., Desautes, C., Duclos, M., Chaouloff, F. e Moisan, M. P. Molecular genetic approaches to

investigate individual variations in behavioral and neuroendocrine stress responses. Psychoneuroendocrinology, v.27, n.5, Jul, p.563-83. 2002.

Mormede, P., Moneva, E., Bruneval, C., Chaoulhoff, F. e 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 Behav, v.1, n.2, May, p.111-6. 2002.

Moy, S. S. e Nadler, J. J. Advances in behavioral genetics: mouse models of autism. Mol Psychiatry, v.13, n.1, Jan, p.4-26. 2008.

Murphy, W. J., Eizirik, E., Johnson, W. E., Zhang, Y. P., Ryder, O. A. e O'brien, S. J. Molecular phylogenetics and the origins of placental mammals. Nature, v.409, n.6820, Feb 1, p.614-8. 2001.

Nabika, T., Kobayashi, Y. e Yamori, Y. Congenic rats for hypertension: how useful are they for the hunting of hypertension genes? Clin Exp Pharmacol Physiol, v.27, n.4, Apr, p.251-6. 2000.

Nagy, J. The NR2B subtype of NMDA receptor: a potential target for the treatment of alcohol dependence. Curr Drug Targets CNS Neurol Disord, v.3, n.3, Jun, p.169-79. 2004.

National Institutes of Health. MGD - Mouse Genome Database. Disponível em: <<http://www.nih.gov/science/models/mouse/resources/mgd.html>>. Acesso em: 14 set. 2009.

Nazar, M., Jessa, M. e Plaznik, A. Benzodiazepine-GABAA receptor complex ligands in two models of anxiety. J Neural Transm, v.104, n.6-7, p.733-46. 1997.

Okamoto, K. e Aoki, K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. Jpn Circ J, v.27, Mar, p.282-93. 1963.

Palanza, P., Gioiosa, L. e Parmigiani, S. Social stress in mice: gender differences and effects of estrous cycle and social dominance. Physiol Behav, v.73, n.3, Jun, p.411-20. 2001.

Pandey, S. C. Anxiety and alcohol abuse disorders: a common role for CREB and its target, the neuropeptide Y gene. Trends Pharmacol Sci, v.24, n.9, Sep, p.456-60. 2003.

Pandey, S. C., Zhang, H., Roy, A. e Xu, T. Deficits in amygdaloid cAMP-responsive element-binding protein signaling play a role in genetic predisposition to anxiety and alcoholism. J Clin Invest, v.115, n.10, Oct, p.2762-73. 2005.

Patel, N. V. e Hitzemann, R. J. Detection and mapping of quantitative trait loci for haloperidol-induced catalepsy in a C57BL/6J x DBA/2J F2 intercross. Behav Genet, v.29, n.5, Sep, p.303-10. 1999.

Pellow, S., Chopin, P., File, S. E. e Briley, M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. J Neurosci Methods, v.14, n.3, Aug, p.149-67. 1985.

Plomin, R., De Fries, J. C., Mc Cleary, G. E. e Rutter, M. Behavioral genetics. New York: W. H. Freeman and Company, 1997

Pravenec, M., Churchill, P. C., Churchill, M. C., Viklicky, O., Kazdova, L., Aitman, T. J., Petretto, E., Hubner, N., Wallace, C. A., Zimdahl, H., Zidek, V., Landa, V., Dunbar, J., Bidani, A., Griffin, K., Qi, N., Maxova, M., Kren, V., Mlejnek, P., Wang, J. e Kurtz, T. W. Identification of renal Cd36 as a determinant of blood pressure and risk for hypertension. Nat Genet, v.40, n.8, Aug, p.952-4. 2008.

Pravenec, M., Klir, P., Kren, V., Zicha, J. e Kunes, J. An analysis of spontaneous hypertension in spontaneously hypertensive rats by means of new recombinant inbred strains. J Hypertens, v.7, n.3, Mar, p.217-21. 1989.

Pravenec, M., Landa, V., Zidek, V., Musilova, A., Kazdova, L., Qi, N., Wang, J., St Lezin, E. e Kurtz, T. W. Transgenic expression of CD36 in the spontaneously hypertensive rat is associated with amelioration of metabolic disturbances but has no effect on hypertension. Physiol Res, v.52, n.6, p.681-8. 2003.

Prickaerts, J., Moechars, D., Cryns, K., Lenaerts, I., Van Craenendonck, H., Goris, I., Daneels, G., Bouwknecht, J. A. e Steckler, T. Transgenic mice overexpressing glycogen synthase kinase 3beta: a putative model of hyperactivity and mania. J Neurosci, v.26, n.35, Aug 30, p.9022-9. 2006.

Prut, L. e Belzung, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. Eur J Pharmacol, v.463, n.1-3, Feb 28, p.3-33. 2003.

Ramos, A. Animal models of anxiety: do I need multiple tests? Trends Pharmacol Sci, v.29, n.10, Oct, p.493-8. 2008.

Ramos, A., Berton, O., Mormede, P. e Chaouloff, F. A multiple-test study of anxiety-related behaviours in six inbred rat strains. Behav Brain Res, v.85, n.1, Apr, p.57-69. 1997.

Ramos, A., Correia, E. C., Izidio, G. S. e Bruske, G. R. Genetic selection of two new rat lines displaying different levels of anxiety-related behaviors. Behav Genet, v.33, n.6, Nov, p.657-68. 2003.

Ramos, A., Kangerski, A. L., Basso, P. F., Da Silva Santos, J. E., Assreuy, J., Vendruscolo, L. F. e Takahashi, R. N. Evaluation of Lewis and SHR rat strains as a genetic model for the study of anxiety and pain. Behav Brain Res, v.129, n.1-2, Feb 1, p.113-23. 2002.

Ramos, A., Mellerin, Y., Mormede, P. e Chaouloff, F. A genetic and multifactorial analysis of anxiety-related behaviours in Lewis and SHR intercrosses. Behav Brain Res, v.96, n.1-2, Nov, p.195-205. 1998.

Ramos, A., Moisan, M. P., Chaouloff, F., Mormede, C. e Mormede, P. Identification of female-specific QTLs affecting an emotionality-related behavior in rats. Mol Psychiatry, v.4, n.5, Sep, p.453-62. 1999.

Ramos, A. e Mormede, P. Stress and emotionality: a multidimensional and genetic approach. Neurosci Biobehav Rev, v.22, n.1, p.33-57. 1998.

Ramos, A. Genetic analysis of emotional behaviors using animal models. In: Jones, B. C. e Mormède, P. (Ed.). Neurobehavioral Genetics: Methods and Applications: Taylor & Francis Group, 2007. p.291-306.

Ramos, A., Pereira, E., Martins, G. C., Wehrmeister, T. D. e Izidio, G. S. Integrating the open field, elevated plus maze and light/dark box to assess different types of emotional behaviors in one single trial. Behav Brain Res, v.193, n.2, Nov 21, p.277-88. 2008.

Rapp, J. P. Genetic analysis of inherited hypertension in the rat. Physiol Rev, v.80, n.1, Jan, p.135-72. 2000.

Reus, G. Z., Valvassori, S. S., Machado, R. A., Martins, M. R., Gavioli, E. C. e Quevedo, J. Acute treatment with low doses of memantine does not impair aversive, non-associative and recognition memory in rats. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, v.376, n.5, Jan, p.295-300. 2008.

Rodriguez, J., Cortinas, J., Barcena, M., Ginesta, V. e Alvarez, J. Bradycardia and asystole following atropine-neostigmine administration after caesarean section in a parturient receiving methyldopa for pregnancy-induced hypertension. Int J Obstet Anesth, v.4, n.1, Jan, p.55-7. 1995.

Roy, V., Chapillon, P., Jeljeli, M., Caston, J. e Belzung, C. Free versus forced exposure to an elevated plus-maze: evidence for new behavioral interpretations during test and retest. Psychopharmacology (Berl), v.203, n.1, Mar, p.131-41. 2009.

Rutter, M., Moffitt, T. E. e Caspi, A. Gene-environment interplay and psychopathology: multiple varieties but real effects. J Child Psychol Psychiatry, v.47, n.3-4, Mar-Apr, p.226-61. 2006.

Spanagel, R.; Montkowski, A.; Allingham, K.; Stohr, T.; Shoaib, M.; Holsboer, F.; Landgraf, R. Anxiety: a potential predictor of vulnerability to the initiation of ethanol self-administration in rats. Psychopharmacology, v. 122, p.369-373, 1995.

Sagvolden, T., Johansen, E. B., Woien, G., Walaas, S. I., Storm-Mathisen, J., Bergersen, L. H., Hvalby, O., Jensen, V., Aase, H., Russell, V. A., Killeen, P. R., Dasbanerjee, T., Middleton, F. A. e Faraone, S. V. The spontaneously hypertensive rat model of ADHD--the importance of selecting the appropriate reference strain. Neuropharmacology, v.57, n.7-8, Dec, p.619-26. 2009.

Shirley, R. L., Walter, N. A., Reilly, M. T., Fehr, C. e Buck, K. J. Mpdz is a quantitative trait gene for drug withdrawal seizures. Nat Neurosci, v.7, n.7, Jul, p.699-700. 2004.

Silva, G. J.; Pereira, A. C.; Krieger, M.; Krieger R, J. E. Genetic mapping of a new heart rate QTL on chromosome 8 of spontaneously hypertensive rats. BMC Med Genet, v. 8, p. 17, 2007.

Silver, L. E. Mouse genetics, concepts and applications, 1995. New York: Oxford University Press. Disponível em: <<http://www.complextrait.org>>. Acesso em: out.2009.

Simko, F. e Pechanova, O. Recent trends in hypertension treatment: perspectives from animal studies. J Hypertens, v.27 Suppl 6, Aug, p.S1-4. 2009.

Simpson, V. J., Rikke, B. A., Costello, J. M., Corley, R. e Johnson, T. E. Identification of a genetic region in mice that specifies sensitivity to propofol. Anesthesiology, v.88, n.2, Feb, p.379-89. 1998.

Singer, J. B.; Hill, A. E., Burrage, L. C., Olszens, K.R., Song, J., Justice, M., O'Brien, W. E., Conti, D.V., Witte, J.S., Lander, E.S., Nadeau, J.H. Genetic dissection of complex traits with chromosome substitution strains of mice. Science. v.16, n.304, Mar, p. 445-8. 2004.

Sklar, P. Linkage analysis in psychiatric disorders: the emerging picture. Annu Rev Genomics Hum Genet, v.3, p.371-413. 2002.

Skuse, D. H. Rethinking the nature of genetic vulnerability to autistic spectrum disorders. Trends Genet, v.23, n.8, Aug, p.387-95. 2007.

Stohr, T., Schulte Wermeling, D., Weiner, I. e Feldon, J. Rat strain differences in open-field behavior and the locomotor stimulating and rewarding effects of amphetamine. Pharmacol Biochem Behav, v.59, n.4, Apr, p.813-8. 1998.

Stohr, T., Szuran, T., Pliska, V. e Feldon, J. Behavioural and hormonal differences between two Lewis rat lines. Behav Brain Res, v.101, n.2, Jun, p.163-72. 1999.

Suzuki, T., George, F. R. e Meisch, R. A. Differential establishment and maintenance of oral ethanol reinforced behavior in Lewis and Fischer 344 inbred rat strains. J Pharmacol Exp Ther, v.245, n.1, Apr, p.164-70. 1988.

Suzuki, T., Otani, K., Koike, Y. e Misawa, M. Genetic differences in preferences for morphine and codeine in Lewis and Fischer 344 inbred rat strains. Jpn J Pharmacol, v.47, n.4, Aug, p.425-31. 1988.

Stassen, A. P.; Groot, P.C.; Eppig, J. T.; Demant, P. Genetic composition of the recombinant congenic strains. Mamm Genome, v7,n.1,p.55-8. 1996.

Takahashi, A., Kato, K., Makino, J., Shiroishi, T. e Koide, T. Multivariate analysis of temporal descriptions of open-field behavior in wild-derived mouse strains. Behav Genet, v.36, n.5, Sep, p.763-74. 2006.

Tecott, L. H. The genes and brains of mice and men. Am J Psychiatry, v.160, n.4, Apr, p.646-56. 2003.

Terenina-Rigaldie, E., Jones, B. C. e Mormede, P. Pleiotropic effect of a locus on chromosome 4 influencing alcohol drinking and emotional reactivity in rats. Genes Brain Behav, v.2, n.3, Jun, p.125-31. 2003.

Terenina-Rigaldie, E., Moisan, M. P., Colas, A., Beauge, F., Shah, K. V., Jones, B. C. e Mormede, P. Genetics of behaviour: phenotypic and molecular study of rats derived from high- and low-alcohol consuming lines. Pharmacogenetics, v.13, n.9, Sep, p.543-54. 2003.

The Jackson Laboratory. JAX Mice and Services, Disponível em: <<http://jaxmice.jax.org/>>. Acesso em: 10 set. 2009.

Thiele, T.E., Sparta, D.R., Hayes, D.M., Fee, J. R. A role for neuropeptide Y in neurobiological responses to ethanol and drugs of abuse. Neuropeptides, v.38, n.4, Aug, p.235-43. 2004.Review.

Tohda, C., Nakanishi, R. e Kadowaki, M. Hyperactivity, memory deficit and anxiety-related behaviors in mice lacking the p85alpha subunit of phosphoinositide-3 kinase. Brain Dev, v.31, n.1, Jan, p.69-74. 2009.

Tomida, S., Mamiya, T., Sakamaki, H., Miura, M., Aosaki, T., Masuda, M., Niwa, M., Kameyama, T., Kobayashi, J., Iwaki, Y., Imai, S., Ishikawa, A., Abe, K., Yoshimura, T., Nabeshima, T. e Ebihara, S. Usp46 is a quantitative trait gene regulating mouse immobile behavior in the tail suspension and forced swimming tests. Nat Genet, v.41, n.6, May 24. 2009.

Treiman, D. M. e Levine, S. Plasma corticosteroid response to stress in four species of wild mice. Endocrinology, v.84, n.3, Mar, p.676-80. 1969.

Treit, D. e Fundytus, M. Thigmotaxis as a test for anxiolytic activity in rats. Pharmacol Biochem Behav, v.31, n.4, Dec, p.959-62. 1988.

Tucci, V., Lad, H. V., Parker, A., Polley, S., Brown, S. D. e Nolan, P. M. Gene-environment interactions differentially affect mouse strain behavioral parameters. Mamm Genome, v.17, n.11, Nov, p.1113-20. 2006.

Turri, M. G., Datta, S. R., Defries, J., Henderson, N. D. e Flint, J. QTL analysis identifies multiple behavioral dimensions in ethological tests of anxiety in laboratory mice. Curr Biol, v.11, n.10, May 15, p.725-34. 2001.

U. S. National Library of Medicine e National Institutes of Health. PubMed. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>>. Acesso em: 20 nov. 2009.

Valdar, W., Solberg, L. C., Gauguier, D., Cookson, W. O., Rawlins, J. N., Mott, R. e Flint, J. Genetic and environmental effects on complex traits in mice. Genetics, v.174, n.2, Oct, p.959-84. 2006.

Vendruscolo, L. F., Izidio, G. S. e Takahashi, R. N. Drug reinforcement in a rat model of attention deficit/hyperactivity disorder--the Spontaneously Hypertensive Rat (SHR). Curr Drug Abuse Rev, v.2, n.2, May, p.177-83. 2009.

Vendruscolo, L. F., Terenina-Rigaldie, E., Raba, F., Ramos, A., Takahashi, R. N. e Mormede, P. Evidence for a female-specific effect of a chromosome 4 locus on anxiety-related behaviors and ethanol drinking in rats. Genes Brain Behav, v.5, n.6, Aug, p.441-50. 2006.

Vendruscolo, L. F., Vendruscolo, J. C., Terenina, E., Ramos, A., Takahashi, R. N. e Mormede, P. Marker-assisted dissection of genetic influences on motor and neuroendocrine sensitization to cocaine in rats. Genes Brain Behav, v.8, n.3, Apr, p.267-74. 2009.

Wahlsten, D., Metten, P., Phillips, T. J., Boehm, S. L., 2nd, Burkhart-Kasch, S., Dorow, J., Doerksen, S., Downing, C., Fogarty, J., Rodd-Henricks, K., Hen, R., e Crabbe, J. C. Different data from different labs: lessons from studies of gene-

environment interaction. J Neurobiol, v.54, n.1, Jan, p.283-311. 2003.

Weinberg, A. e Klonsky, E. D. Measurement of emotion dysregulation in adolescents. Psychol Assess, v.21, n.4, Dec, p.616-21. 2009.

Weiss, S. M., Wadsworth, G., Fletcher, A. e Dourish, C. T. Utility of ethological analysis to overcome locomotor confounds in elevated maze models of anxiety. Neurosci Biobehav Rev, v.23, n.2, p.265-71. 1998.

Whirley, B. K. e Einat, H. Taurine trials in animal models offer no support for anxiolytic, antidepressant or stimulant effects. Isr J Psychiatry Relat Sci, v.45, n.1, p.11-8. 2008.

Whishaw, I. Q. e Brooks, B. L. Calibrating space: exploration is important for allothetic and idiothetic navigation. Hippocampus, v.9, n.6, p.659-67. 1999.

Yalcin, B., Willis-Owen, S. A., Fullerton, J., Meesaq, A., Deacon, R. M., Rawlins, J. N., Copley, R. R., Morris, A. P., Flint, J. e Mott, R. Genetic dissection of a behavioral quantitative trait locus shows that Rgs2 modulates anxiety in mice. Nat Genet, v.36, n.11, Nov, p.1197-202. 2004.

Yoshikawa, T., Watanabe, A., Ishitsuka, Y., Nakaya, A. e Nakatani, N. Identification of multiple genetic loci linked to the propensity for "behavioral despair" in mice. Genome Res, v.12, n.3, Mar, p.357-66. 2002.

Zhang, Z., Futamura, M., Vikis, H. G., Wang, M., Li, J., Wang, Y., Guan, K. L. e You, M. Positional cloning of the major quantitative trait locus underlying lung tumor susceptibility in mice. Proc Natl Acad Sci U S A, v.100, n.22, Oct 28, p.12642-7. 2003.

Zeng, Z. B., Kao, C. H., Basten, C. J.Genet Res. Estimating the genetic architecture of quantitative traits. V.74, n.3, Dec, p.279-89. 1999.

Zhou, Q. Y. e Cheng, M. Y. Prokineticin 2 and circadian clock output. Febs J, v.272, n.22, Nov, p.5703-9. 2005.