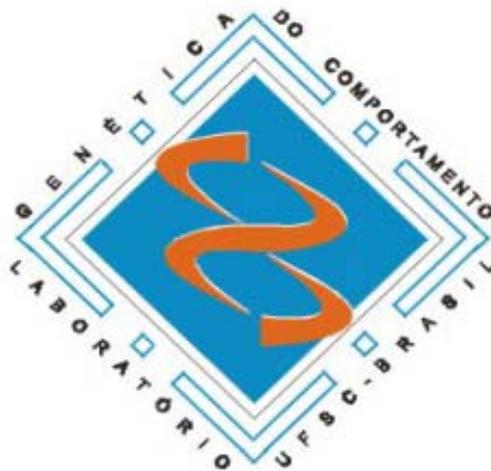


**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, EMBRIOLOGIA E GENÉTICA**

***Estudo comportamental de dois modelos genéticos para a  
emocionalidade***



**FEDRA OSMARA RODRÍGUEZ HINOJOSA**  
Orientador : Prof. Dr. ANDRÉ DE ÁVILA RAMOS



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, EMBRIOLOGIA E GENÉTICA**

***Estudo comportamental de dois modelos genéticos para a  
emocionalidade***

**FEDRA OSMARA RODRÍGUEZ HINOJOSA**

Trabalho apresentado à banca examinadora  
como requisito parcial para obtenção do título  
de Mestre em Neurociências e  
Comportamento.

**ORIENTADOR :**

***PROF. DR. ANDRÉ DE ÁVILA RAMOS***

Florianópolis, Fevereiro de 2005.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por ter permitido que mais esta etapa de minha vida fosse possível.

Aos meus pais, Juan Manuel e Maria Sandra (principalmente à minha mãe, por não ter deixado de me acompanhar nessa caminhada um único dia) e à minha irmã, Monica, pelo amor e apoio.

Ao meu orientador, Prof. Dr. André de Ávila Ramos, pelos conhecimentos passados com dedicação e paciência, e pela disponibilidade em me auxiliar sempre que necessário.

Aos professores Dr. José Marino Neto, Dr. Antônio de Pádua Carobrez e Dra. Ana Lúcia Severo Rodrigues pela gentileza de ler este trabalho e sugerir alterações para que ele pudesse ser aperfeiçoado.

Ao professor Dr. Newton Sabino Canteras, que permitiu que ampliássemos mais uma linha de pesquisa com nossas linhagens.

A todos os amigos que fiz nesses dois anos de Neurociências, pessoas maravilhosas que conheci e estarão sempre em meu coração.

Ao pessoal mais antigo do laboratório de Genética do Comportamento : Luiz, Geison e Gustavo, pelos momentos de trabalho e amizade que partilhamos nesses anos. E também ao pessoal mais novo : Douglas, Thaïs e Elayne, que apesar do pouco tempo de convívio que tivemos, já criamos laços de simpatia e carinho.

Ao Nivaldo, pela sua disposição e boa vontade ao me atender todas as vezes que pedi auxílio ou tinha qualquer dúvida.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

*“(...) Imagine um piano e um pianista; a certa altura tocando, o piano fica desafinado : uma tecla não bate mais e cordas quebram. O pianista obrigatoriamente , apesar de ótimo, tocará mal. O cérebro seria o piano e o pianista a alma, não é? É uma velha comparação...se o cérebro se deteriora, a alma, obrigatoriamente mostra-se atoleimada.”*

***Luigi Pirandello, em “O finado Mattia Pascal”***

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução .....</b>	<b>11</b>
<b>1.1. Depressão e ansiedade .....</b>	<b>12</b>
<b>1.2. Genética do comportamento .....</b>	<b>13</b>
<b>1.3. Modelos animais de ansiedade .....</b>	<b>14</b>
<b>1.3.1. Labirinto em cruz elevado .....</b>	<b>16</b>
<b>1.3.2. Teste do campo aberto .....</b>	<b>18</b>
<b>1.4. Modelos animais de depressão .....</b>	<b>20</b>
<b>1.4.1. Teste de nado forçado .....</b>	<b>23</b>
<b>1.4.2. Teste de suspensão da cauda .....</b>	<b>25</b>
<b>1.5. Ratos LEW e SHR .....</b>	<b>27</b>
<b>1.6. Seleção genética.....</b>	<b>30</b>
<b>1.7. Análise de atividade em gaiolas residenciais .....</b>	<b>33</b>
<b>1.8. Drogas antidepressivas .....</b>	<b>35</b>
<b>2. Justificativa .....</b>	<b>38</b>
<b>3. Objetivos .....</b>	<b>39</b>
<b>3.1. Objetivos gerais .....</b>	<b>39</b>
<b>3.2. Objetivos específicos .....</b>	<b>39</b>
<b>4. Materiais e Métodos .....</b>	<b>40</b>
<b>4.1. Animais .....</b>	<b>40</b>
<b>4.2. Labirinto em cruz elevado .....</b>	<b>41</b>
<b>4.3. Teste do campo aberto .....</b>	<b>41</b>
<b>4.4. Teste de nado forçado .....</b>	<b>42</b>
<b>4.5. Teste de suspensão da cauda .....</b>	<b>42</b>
<b>4.6. Análise de atividade em gaiolas de residência .....</b>	<b>42</b>
<b>4.7. Imipramina .....</b>	<b>44</b>
<b>4.8. Análise Estatística .....</b>	<b>44</b>

<b>5. Resultados .....</b>	<b>45</b>
<b>5.1. Análise comportamental em modelos de ansiedade e depressão .....</b>	<b>45</b>
<b>5.1.1. Primeiro grupo experimental .....</b>	<b>45</b>
<b>5.1.2. Segundo grupo experimental .....</b>	<b>49</b>
<b>5.1.3. Terceiro grupo experimental .....</b>	<b>52</b>
<b>5.1.4. Quarto grupo experimental .....</b>	<b>55</b>
<b>5.2. Análise de componentes principais .....</b>	<b>59</b>
<b>5.3. Análise de atividade em gaiolas de residência .....</b>	<b>61</b>
<b>5.4. Imipramina .....</b>	<b>69</b>
<b>6. Discussão .....</b>	<b>70</b>
<b>6.1. Modelos animais de ansiedade .....</b>	<b>70</b>
<b>6.2. Modelos animais de depressão .....</b>	<b>77</b>
<b>6.3. Análise de componentes principais .....</b>	<b>82</b>
<b>6.4. Análise de atividade em gaiolas de residência .....</b>	<b>87</b>
<b>6.5. Imipramina .....</b>	<b>90</b>
<b>6.6. Conclusão .....</b>	<b>94</b>
<b>APÊNDICE .....</b>	<b>95</b>
<b>7. Referências bibliográficas .....</b>	<b>101</b>

## ABREVIATURAS

ACP = Análise de componentes principais  
ANOVA = Análise de variância  
BA = Braço aberto  
EPM = Erro padrão da média  
HAB = ratos *High Anxiety Behavior*  
I = Imipramina  
IMAO = Antidepressivos inibidores da monoaminoxidase  
ISRS = Antidepressivos inibidores seletivos da recaptação de serotonina  
LAB = ratos *Low Anxiety Behavior*  
LCE = Labirinto em cruz elevado  
LEW = ratos Lewis  
MR = ratos *Maudsley* reativos  
MNRA = ratos *Maudsley* não reativos  
QTL = *Quantitative trait loci*  
RHA = ratos Romanos *High avoidance*  
RLA = ratos Romanos *Low avoidance*  
S = Salina  
SHR = *Spontaneously Hypertensive Rats*  
TC = Antidepressivos tricíclicos  
TCA = Teste do campo aberto  
TDAH = Transtorno de déficit de atenção e hiperatividade  
TNF = Teste de nado forçado  
TNFM = Teste de nado forçado modificado  
TSC = Teste de suspensão da cauda  
WKY = ratos *Wistar-Kyoto*

## RESUMO

As linhagens de ratos LEW e SHR foram propostas como ferramentas potencialmente úteis para o estudo da ansiedade por suas respostas contrastantes em modelos animais de ansiedade. Com o mesmo objetivo, um modelo genético alternativo foi proposto, as linhagens de ratos Floripa H e L, selecionadas para a locomoção central no campo aberto.

Este estudo teve como principal objetivo, a análise comportamental dos dois modelos genéticos acima citados, em testes comportamentais de depressão, o TNF e o TSC para avaliar sua possível utilidade para o estudo da comorbidade entre ansiedade e depressão. Animais de ambos os sexos e das quatro linhagens foram submetidos a quatro testes comportamentais: LCE, TCA, TNF e TSC. Nos dois modelos genéticos, as diferenças comportamentais verificadas em estudos anteriores, semelhantes à ansiedade, foram mantidas. O TNF evidenciou diferenças entre linhagens, o que não ocorreu com o TSC. Foi feita uma análise estatística multifatorial para avaliar a correlação entre as variáveis obtidas nos quatro testes comportamentais. Da análise emergiram os fatores 1 e 2, relacionados a medidas do LCE e TCA, respectivamente, e os fatores 3 e 4, relacionados a variáveis de testes comportamentais de ansiedade e de depressão. Com as linhagens LEW e SHR, realizou-se a análise de sua atividade em gaiolas de residência, onde sete variáveis foram registradas, entre elas locomoção e repouso. Constatou-se que não havia diferenças marcantes entre os grupos para estas variáveis. Além disso, ratos LEW e SHR tiveram avaliadas suas respostas ao antidepressivo tricíclico imipramina no TNF por tratamento agudo, onde se observou uma redução significativa no tempo de imobilidade apenas em LEW.

Com os dados obtidos, as sublinhagens brasileiras LEW e SHR consolidam-se como um excelente modelo genético para o estudo da comorbidade entre a ansiedade e a depressão, já que o TNF revelou diferenças entre linhagens, anteriormente observadas em testes de ansiedade. As respostas à imipramina e a análise do comportamento espontâneo apóiam a hipótese de que devem existir diferenças intrínsecas nessas linhagens no que diz respeito à emocionalidade, sendo, portanto, interessante ampliar os estudos com estas. As linhagens Floripa H e Floripa L, demonstraram ser contrastantes no TNF, tornando também importante o aprofundamento de pesquisas a seu respeito.

**Palavras-chave:** emocionalidade; ansiedade; depressão; linhagens de ratos; gaiolas de residência; imipramina; análise multifatorial.

#### **ABSTRACT**

LEW and SHR rat strains were proposed as potentially useful tools for the study of anxiety because of their contrasting responses in animal models of anxiety. For the same

purpose, an alternative genetic model was developed, the Floripa H and L rat lines, genetically selected for inner locomotion in the open field.

The main goal of the present study was the behavioral analysis of both genetic models in tests of depression, the FST and TST, to evaluate their possible usefulness to study anxiety and depression comorbidity. Animal from both sexes and the four strains were behaviorally observed in four tests: EPM, OFT, FST e TST. In both genetic models, the anxiety-related behavioral differences verified in previous studies were kept. The FST has shown contrasts between lines, however, the TST revealed no such differences. A multifactorial analysis was carried out to evaluate the correlation between variables obtained in all tests and it has revealed four independent axes. Factors 1 and 2 included emotionality measures from the EPM and OF, respectively; factor 3 included OF behaviors and FST immobility. Locomotion in the EPM and TST immobility loaded on factor 4. A home-cage observation was also carried out using the LEW and SHR rat strains and 7 parameters were considered, among them, locomotor activity and resting. No differences were observed between LEW and SHR rats for these variables. Moreover, LEW and SHR rats were evaluated in their responses to the antidepressant imipramine in acute treatment, where only LEW rats were sensitive to its antidepressant effects.

Taken together, these results consolidate the Brazilian substrains LEW and SHR as an excellent genetic model to study anxiety and depression comorbidity, since the FST revealed differences between lines, previously verified in animal models of anxiety. The responses to imipramine and home-cage observation support the hypothesis that there might be intrinsic differences in those rat strains related to emotionality, thus it would be very interesting to deepen researches with them. The Floripa H and L rat lines, have shown contrasting responses in the FST aswell, becoming important to carry out further studies with them.

**Keywords:** emotionality; anxiety; depression; rat strains; home-cage; imipramine; multifactorial analysis.

## ***1. Introdução***

O estresse tem sido objeto de inúmeras discussões e estudos através de uma variedade de enfoques, sendo que cada um apresenta sua própria forma de analisar este fenômeno (Ramos & Mormède, 1998). Podemos definir o estresse como algo comum aos seres vivos (Herman & Cullinan, 1997; LeDoux, 1998) e um estado que envolve um conjunto de processos fisiológicos e comportamentais que acontecem no indivíduo em resposta a um estímulo estressor que provoca alterações no equilíbrio interno (Ramos & Mormède, 1998). Esse estímulo pode, por sua vez, se originar de fontes externas, como a ameaça de um predador, ou de fontes internas, como pensamentos, sentimentos e até mesmo doenças (Hubbard & Workman, 1998). Sabe-se que o estresse exerce uma forte influência na fisiopatologia dos órgãos de cada sistema orgânico através do seu impacto nos processos cognitivos e fisiológicos do Sistema Nervoso Central (Fendt & Fanselow, 1999). O encéfalo reage ao estímulo estressor desencadeando uma série de alterações neuroendócrinas, neuroquímicas, metabólicas e comportamentais que podem ser adaptativas para o indivíduo (Chrousos & Gold, 1992; Herman & Cullinan, 1997), como aumento da atividade somatomotora, alterações na ingestão de alimentos (Macht et al., 2001), ativação do chamado eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) (Chrousos & Gold, 1998), aumento da vigilância, hipertensão e bradicardia, sendo que, comportamentalmente, o indivíduo pode lidar com esse estímulo de forma ativa ou passiva (Koolhaas et al., 1999; Keay & Bandler, 2001). As reações ao estresse podem resultar em conseqüências psicológicas e comportamentais (Hubbard & Workman, 1998), como a depressão e ansiedade (Albonetti & Farabollini, 1994; Kessler, 1997; Clément & Chapouthier, 1998; Nesse, 1999; Fava & Kendler, 2000).

Há ainda que ressaltar a presença de uma forte influência genética no desencadeamento de ditas reações comportamentais e em inúmeros distúrbios psiquiátricos. Alguns autores, entre eles, Gorwood (2004) e Flint (2004) em suas revisões, mostram evidências indiretas de que os mesmos genes atuam gerando variações em fenótipos tanto humanos como de roedores.

### ***1.1. Depressão e ansiedade***

Segundo a visão de alguns autores, entre eles, Sapolsky (1996), um indivíduo submetido a um estresse periódico, apresentará uma vigilância maior, que poderá se tornar supergeneralizada, levando o indivíduo a concluir que precisa se manter em constante alerta, até mesmo na ausência de estresse, adentrando, talvez desta forma, no quadro da ansiedade. Uma outra situação é que o estresse poderá não ser superado, dando origem ao sentimento de desamparo e gerando sensação de incapacidade; nesse caso a depressão passaria a figurar no indivíduo. Alguns autores sugerem ainda, que a depressão surgiria de uma interpretação confusa de informações cognitivas, de sorte que essas informações pareceriam muito mais negativas do que de fato são (Vollmayr & Henn, 2003).

O transtorno afetivo da depressão tem sido descrito pela humanidade há muitos anos. O termo “melancolia”, que significa “bile negra” em grego, foi primeiramente usado por Hipócrates 400 anos a.C. (Cordás, 2002; Nestler et al., 2002), e hoje em dia constitui-se em um importante problema de saúde pública. Calcula-se que 13 a 20% da população humana apresenta algum sintoma depressivo em determinado momento da vida, e que 2 a 3% da população encontra-se hospitalizada ou com as atividades diárias prejudicadas por essa doença afetiva (DSM-IV, 2000). Ao longo de vários estudos, foi demonstrado também que as pessoas do sexo feminino consistentemente apresentam maior risco de desenvolver a depressão do que os homens (Fava & Kendler, 2000).

É importante salientar que existem variações dentro do quadro psiquiátrico da depressão<sup>1</sup>. Esta pode ser de intensidade leve, moderada ou grave e sua duração é variável, podendo se estender por anos. A depressão pode fazer parte ainda de outros casos clínicos (Fava & Kendler, 2000), apresentando-se em comorbidade com outras alterações emocionais, como por exemplo, a ansiedade (Krishnan, 2003). Mais de 85% dos indivíduos depressivos experimentam sintomas significativos de ansiedade (Rihmer et al., 2001).

A ansiedade, traço complexo e multifatorial, apresenta como característica fundamental a preocupação excessiva ou permanente com problemas do cotidiano, como saúde, segurança, entre outros, sendo que essa preocupação pode ser considerada irrealista, desproporcional aos fatos ou apenas difícil de controlar (Connor & Davidson, 1998). Este transtorno apresenta-se associado a certos sintomas, como inquietação, fadiga, irritabilidade e sono fragmentado devido ao excesso de preocupação. O transtorno de

---

<sup>1</sup> Características da depressão maior e sintomatologia (ver Apêndice).

ansiedade generalizada é mais freqüente em mulheres do que em homens; os estudos de epidemiologia da doença mostram que 2/3 dos pacientes são do sexo feminino. A neurobiologia da ansiedade pode envolver anormalidades em uma gama de fatores neuroquímicos, neuroendócrinológicos e neurofisiológicos. Por exemplo, as evidências demonstram participação de vários neurotransmissores e sistemas, como o GABAérgico, serotoninérgico e noradrenérgico (Connor & Davidson, 1998).

Desta forma, depressão e ansiedade são as mais prevalentes condições psiquiátricas na comunidade (Rouillon, 1999); embora ainda seja difícil definir se ansiedade e depressão são um único transtorno misto ou dois transtornos diferentes eventualmente ocorrendo em comorbidade (Rouillon, 1999). Até agora, muitos estudos foram realizados demonstrando que existiriam taxas variáveis mas normalmente altas de comorbidade presente em muitos pacientes (Cox et al., 2001; Yerevanian et al., 2001).

### ***1.2. Genética do comportamento***

A grande maioria das enfermidades apresenta-se com um substrato genético significativo e isso também se aplica aos transtornos comportamentais e psiquiátricos, já que evidências de influência genética substancial têm sido encontradas para a grande maioria dessas alterações (Smoller et al., 2001; Clément et al., 2002; Cloninger, 2002; Caspi et al., 2003; Tsuang et al., 2004), embora nem todas sejam influenciadas no mesmo grau por fatores genéticos (Plomin et al., 1994; Snustad et al., 1997; Reif & Lesch, 2003). Os estudos no campo da Genética do Comportamento, mostram que as influências genéticas geralmente contribuem para diferenças no comportamento dos indivíduos, refletindo o efeito de múltiplos fatores genéticos e ambientais, possivelmente interagindo (Vink & Boomsma, 2002). Além disso, acredita-se que traços psicológicos sejam influenciados por um grande número de genes, cada um deles com um pequeno efeito, sem seguir os padrões de herança simples Mendeliana (Lander & Schork, 1994), sendo por isso mais complexos seu estudo e elucidação (Bearden et al., 2004). Desta forma, para revelar as bases genéticas do comportamento e de distúrbios psiquiátricos, algumas estratégias estão disponíveis atualmente. A genética molecular moderna passou a fornecer métodos para localizar genes de susceptibilidade a vários distúrbios psiquiátricos (Jones et al., 2002; Caspi et al., 2003), como por exemplo, a análise de loci para traços quantitativos (QTL, do

inglês, *quantitative trait loci*). Tendo em vista que os transtornos psiquiátricos são multifatoriais, influenciados por vários genes e fatores ambientais e ainda por processos epigenéticos não-lineares (Molenaar et al., 1993; Vink & Boomsma, 2002; Felsenfeld & Groudinein, 2003; Inoue & Lupski, 2003), esses traços são ditos quantitativos e cada um dos genes influenciando são chamados de poligenes. As regiões cromossômicas onde os poligenes podem ser encontrados são os QTL <sup>2</sup>.

Para auxiliar na compreensão da neurobiologia de doenças psiquiátricas, bem como de seu substrato genético, podemos observar que muitos estudos têm sido feitos usando as técnicas moleculares acima mencionadas, e também uma grande variedade de testes comportamentais que foram desenvolvidos ao longo do século XX para caracterizar animais de laboratório em relação às suas respostas a situações de emoção ou estresse (Ramos e Mormède, 1998).

Modelos animais são utilizados em várias áreas de pesquisa desde que Claude Bernard iniciou a Patologia Experimental, embora o uso de modelos animais em Psiquiatria e Neurociências seja bem mais recente. De qualquer forma, eles demonstram ser muito úteis em vários campos, pois podem simplificar desde o mapeamento de genes, assim evitando problemas decorrentes de estudos em humanos, como a heterogeneidade genética e fenocópias (Smoller et al., 2001) até o desenvolvimento e teste de drogas potencialmente eficazes. Essencialmente, os diferentes modelos de emocionalidade envolvem a exposição dos animais a um ou muitos estímulos adversos com a observação simultânea de seu comportamento (Ramos e Mormède, 1998).

### ***1.3. Modelos animais de ansiedade***

Essencialmente um modelo animal de ansiedade é utilizado como meio de detectar novos agentes terapêuticos e para auxiliar na compreensão dos mecanismos envolvidos na geração do comportamento observado (Lister, 1990). Para alguns pesquisadores (Calatayud & Belzung, 2001), um modelo experimental de ansiedade não deve ter somente validade preditiva (*predictive validity*), ou seja, ser especificamente sensível a drogas ansiolíticas já comprovadamente eficazes, mas também “validade de aparência” (*face validity*) para produzir reações nos animais experimentais semelhantes às reações humanas. Por sua vez,

---

<sup>2</sup> Mapeamento de QTL e genética quantitativa (ver Apêndice).

a validade de construção (*construct validity*) de um modelo animal de ansiedade é mais difícil de ser alcançada, já que ela implica diretamente em homologia entre o modelo e o traço que se quer estudar (Rodgers & Cole, 1993). Entretanto, alguns modelos que possuem um bom grau de validade preditiva ou farmacológica, não completam os outros critérios requeridos para um bom modelo experimental de ansiedade. De qualquer forma, há uma grande diversidade de modelos animais de ansiedade e eles são muito úteis como ferramenta para a identificação de compostos ansiolíticos e dos aspectos envolvidos na etiologia do distúrbio. Esses modelos estariam divididos em duas categorias: a) testes de comportamento espontâneo (labirinto em cruz elevado, caixa branca e preta, campo aberto, interação social, entre outros) e b) testes de comportamento induzido (esquiva ativa e passiva, vocalizações ultrassônicas condicionadas, o teste de Vogel e o conflito de Geller-Seifter) (Finn et al., 2003).

Alguns pesquisadores costumam considerar que modelos animais de ansiedade podem ser influenciados não apenas pelo estado emocional análogo à ansiedade, mas também por outras características não emocionais. Por exemplo, alguns modelos como o teste do campo aberto podem ser influenciados não apenas pelos níveis de medo, mas também de atividade locomotora pura e simples. Desta forma, um modelo genético deve ser avaliado em mais de um paradigma, para que os diferentes aspectos (cognitivo, comportamental e motor) possam ser amplamente avaliados (Finn et al., 2003).

Embora várias medidas comportamentais sejam consideradas nos modelos animais de ansiedade<sup>3</sup>, elas não guardam semelhança direta com manifestações da ansiedade clínica. Entretanto, o termo “ansiedade” aplicado a estudos realizados com animais de laboratório se refere às condições experimentais e os comportamentos observados nos testes que, de alguma forma, se parecem com as circunstâncias determinantes dos sintomas. Há ainda que ressaltar, que o termo “ansiedade” aplicado aos animais de laboratório está também relacionado com a compreensão dos mecanismos cerebrais que também poderiam estar participando da ansiedade humana, já que drogas ansiolíticas são capazes de atuar tanto nos modelos animais como na prática clínica. Portanto, quando utilizamos o termo “ansiedade” em roedores não queremos dizer que o animal sente ansiedade, estamos apenas nos referindo ao comportamento exibido pelo animal em testes comportamentais de ansiedade.

---

<sup>3</sup> Parâmetros comportamentais em modelos animais de ansiedade (ver Apêndice).

Os diferentes modelos animais de ansiedade podem se basear em respostas comportamentais não-condicionadas ou em paradigmas de aprendizado e memória <sup>4</sup> (Ramos & Mormède, 1998; Bouwknecht & Paylor, 2002).

Entretanto, não há um modelo animal de ansiedade que possa ser considerado ideal, visto que estão presentes em cada um desses testes comportamentais, algumas limitações consideradas significativas para alguns pesquisadores (Andreattini & Bacellar, 2000) como por exemplo, concordância entre as medidas obtidas por diferentes observadores, os métodos utilizados e a avaliação da estabilidade temporal do comportamento medido (Andreattini & Bacellar, 2000).

Um aspecto considerado controverso, é a dicotomia que separa a “ansiedade” estado e a “ansiedade” traço (Chapillon et al., 1999). Para alguns, essa separação é igualmente aplicável a animais e humanos, podendo oferecer uma base comum às análises comportamentais. Assim, a estabilidade temporal exibida pelo animal quando exposto a modelos animais de ansiedade estaria ligada ao conceito de “estado” e “traço” (Andreattini & Bacellar, 2000). A ansiedade “estado” (também chamada de indutiva) é considerada como sendo o que o indivíduo experimenta no momento em que é submetido ao teste (Calatayud & Belzung, 2001). Representa uma condição temporária, que pode exibir flutuações, principalmente na resposta ao estímulo estressor. Por sua vez, a ansiedade “traço” (também chamada de constitutiva) seria a tendência do indivíduo a reagir com elevado *estado* de ansiedade em uma ampla variedade de situações (Calatayud & Belzung, 2001; Wall & Messier, 2001) e não se alteraria de momento a momento, de forma que se apresentaria como uma característica do indivíduo (Lister, 1990). Nesse aspecto, foi sugerido que indivíduos da maioria das espécies de mamíferos provavelmente mantêm um certo nível de ansiedade “traço” sob diferentes circunstâncias (Wall & Messier, 2001).

### ***1.3.1. Labirinto em cruz elevado***

Como já mencionado anteriormente, têm sido propostos vários modelos animais de ansiedade, entre eles, o LCE, um teste bem validado e largamente utilizado, tanto farmacológica como etologicamente (Dawson & Tricklebank, 1995), sendo aplicado em várias espécies (Rodgers et al., 1997). Este paradigma é derivado do trabalho de

---

<sup>4</sup> Estímulos aversivos e modelos animais (ver Apêndice).

Montgomery (1955), o qual tinha como objetivo determinar se um estímulo novo, representado por uma espécie de ponte que ligava as gaiolas de residência dos animais testados a um braço aberto em elevação e um braço fechado, provocaria uma reação de medo levando ao comportamento de esquiva, ou de aproximação ao estímulo. Como resultado, Montgomery observou que os ratos notoriamente tinham altos índices de exploração no braço fechado em oposição à exploração do braço aberto, ou seja, o braço aberto provocava uma forte reação de medo nos animais, fazendo com que eles o evitassem.

Posteriormente, Handley e Mithani (1984), utilizaram um labirinto em cruz elevado a aproximadamente 70 cm do chão, com dois braços fechados e dois abertos. Com esse modelo eles observaram que drogas ansiolíticas como o diazepam aumentavam o número de entradas nos braços abertos, enquanto que ansiogênicos (picrotoxina), diminuía esse índice. Concluíram, então, que o labirinto em cruz elevado seria um modelo válido para o comportamento motivado pelo medo. No ano seguinte, Pellow e colaboradores (1985) realizaram também um estudo com o labirinto em cruz elevado, validando o teste não somente no âmbito da farmacologia, mas também do comportamento e da fisiologia.

Inúmeras medidas comportamentais podem ser registradas no LCE<sup>5</sup> e até mesmo parâmetros não-exploratórios (Finn et al., 2003), com o objetivo de facilitar a identificação de ações comportamentalmente seletivas (Rodgers et al., 1999). Algumas variantes deste modelo foram desenvolvidas e são atualmente aplicadas como testes comportamentais de ansiedade, como o labirinto em “T” elevado (Viana et al., 1993), o “zero-maze” (Shepherd et al., 1994) e o “braço aberto” (*open arm* - OA) (Salomé et al., 2004).

Desde o trabalho de Montgomery, ficou claramente estabelecido que roedores normalmente evitam os braços abertos do aparato e preferem se manter nos braços fechados do mesmo. O rato ou camundongo é colocado, portanto, numa situação de escolha entre os braços abertos em elevação, que representariam a exploração de um novo ambiente, ou os braços fechados por uma alta parede (Treit et al., 1993; File, 1995). Assim, o animal se encontra em um momento de conflito, no qual, o contato com o ambiente novo é deprimido pela esquiva gerada pelo medo (File, 1995). Quando os animais são obrigados a se manterem nos braços abertos, eles mostram reações comportamentais e fisiológicas de

---

<sup>5</sup> Descrição do labirinto em cruz elevado (ver Apêndice).

medo como: “congelamento”, defecação e aumento de corticosteróides plasmáticos (Treit et al., 1993). As drogas ansiolíticas, como benzodiazepínicos, aumentam o número de entradas nos braços abertos, bem como provocam uma elevação no tempo gasto nesse tipo de braço; os estímulos ansiogênicos por sua vez, promovem o efeito contrário (Cruz et al., 1994). Embora esteja claro que os roedores quando submetidos a este teste, o considerem um estímulo aversivo, a fonte precisa dessa aversão ainda não está bem elucidada. Para alguns autores (Treit et al., 1993), uma possibilidade seria que os animais teriam medo da elevação na qual o aparato se encontra do chão; para outros autores (Cruz et al., 1994), mais especificamente seria a impossibilidade de tigmotaxia que faria com que o labirinto representasse um estímulo estressor.

Apesar das vantagens do uso do LCE, como a simplicidade, a alta sensibilidade a drogas benzodiazepínicas e de sua popularidade como modelo animal de ansiedade (Rodgers et al., 1997), é comum encontrarmos diferenças na execução do teste entre laboratórios do mundo inteiro e este, para alguns autores, seria o fator-chave para a discrepância de resultados obtidos, já que haveria variações nos animais utilizados (espécie, idade, sexo e linhagem), no formato do aparato (altura, etc) e nos procedimentos adotados (iluminação, manipulação dos animais, exposição posterior a outro teste e muitos outros) (Hogg, 1996; Andrade et al., 2003). Contudo, outros trabalhos demonstraram que a exploração dos braços abertos não é influenciada pela altura em que se encontram e a alteração da intensidade da luz também não parece ter efeito (Becker & Grecksch, 1996).

### ***1.3.2. Teste do campo aberto***

Outro modelo animal que pode ser usado no estudo experimental de ansiedade é o teste do campo aberto (TCA), também conhecido como *open field*. Introduzido por Calvin Hall, em 1934, esse teste foi primeiramente usado para avaliar a emocionalidade. Hall define ainda em seu trabalho, o termo emocionalidade como um estado emocional formado por um grupo de reações orgânicas e expressivas que denotam uma condição de excitação no animal. Walsh e Cummings (1976), reformularam o conceito passando a defini-lo como “uma entidade com componentes afetivos não-específicos do comportamento”.

Em seus experimentos, Hall mostrou que quando ratos eram expostos a um ambiente estranho, a defecação e o ato de urinar seriam índices de um estado emocional. Um roedor

assustado e submetido a um estímulo estressor, representado por uma arena aberta, tenderia a “congelar”, defecar e urinar. Em 1936, ele realizou um novo experimento no campo aberto para examinar a relação existente entre a emocionalidade (medida pelos níveis de defecação) e a velocidade na atividade locomotora (medida pela distância atravessada por unidade de tempo). Como resultado, os ratos que mais se locomoviam, defecavam menos. Nos anos seguintes esses experimentos foram reproduzidos por outros pesquisadores e a maioria veio a confirmar os resultados anteriormente obtidos (Ossenkopp & Mazmanian, 1985). Todavia, outros trabalhos que tentavam relacionar locomoção e defecação não foram consistentes, como o experimento realizado por Paré em 1964, que demonstrou que os dois parâmetros comportamentais avaliados no teste do campo aberto eram independentes. Whimbey e Denenberg (1967) decidiram avaliar os dados que tinham sido obtidos anteriormente neste modelo, tendo em mente alguns critérios que tinham sido considerados por vários autores, os quais acreditavam que a atividade aumentada nos ratos expostos ao aparato poderia representar uma tentativa de fuga ao invés de exploração do ambiente novo. Seus experimentos demonstraram que uma correlação negativa entre atividade locomotora e defecação parecia estar restrita ao primeiro dia de exposição ao campo aberto. Apesar das controvérsias, quase 30 anos após o experimento inicial de Hall, Broadhurst selecionou ratos geneticamente para alta e baixa defecação no TCA, obtendo as linhagens de ratos Maudsley reativas e não-reativas. Essa seleção levou ainda a um outro resultado: os animais que defecavam mais, eram menos ativos. Outras hipóteses foram criadas levando-se em conta o trabalho de Broadhurst, entre elas a de que um substrato genético forte poderia estar atuando para gerar essa correlação negativa entre as duas variáveis comportamentais avaliadas no TCA (Flint, 2004).

Outro aspecto considerado por alguns autores e que talvez explicaria a variedade de resultados é a influência do ambiente e do procedimento aplicado no comportamento dos animais submetidos a este modelo experimental de ansiedade. O TCA representaria não somente um ambiente novo e aversivo, mas também envolveria variáveis como separação social, linhagem, sexo e idade dos animais testados (i.e.geralmente as fêmeas apresentam os maiores níveis de locomoção em relação aos machos) (Palanza, 2001), contato com o experimentador, tempo de duração do teste, iluminação, entre outras (Suárez & Gallup,

1981), que poderiam estar, de alguma forma, gerando resultados contrastantes (Walsh & Cummings, 1976).

A despeito dos resultados contraditórios obtidos ao longo das últimas décadas, o TCA é considerado como um bom modelo animal de ansiedade <sup>6</sup>, por sua sensibilidade bidirecional a tratamentos farmacológicos, podendo avaliar o comportamento semelhante à ansiedade em várias espécies, incluindo animais transgênicos e camundongos knockout (Carola et al., 2002). Além disso, o TCA pode também ser utilizado para examinar os efeitos de agentes físicos não-farmacológicos, como exposição ao predador e/ou procedimentos semelhantes, obtendo-se como resultado uma avaliação etológica detalhada (Choleris et al., 2001).

O TCA apresenta-se sensível a uma série de compostos ansiolíticos e antidepressivos: benzodiazepinas, agonistas parciais de 5-HT<sub>1A</sub> (buspirona, gepirona, ipsapirona), antidepressivos ISRS (fluoxetina) e antidepressivos TCs (imipramina) (Stefanski et al., 1992; Singh et al., 1996; Rex et al, 1996; Siemiatkowski et al, 2000; Durand et al., 2000). Entretanto, o TCA pode falhar no requisito “validade preditiva” para um modelo animal de ansiedade, já que algumas drogas, como o alprazolam e certos ISRSs, que são eficazes no tratamento de transtornos de ansiedade, como a síndrome do pânico, transtorno obsessivo-compulsivo e fobia social, não demonstraram ter qualquer ação sobre as principais variáveis medidas neste modelo experimental (Prut & Belzung, 2001). Desta forma, o TCA se apresentaria como um bom modelo de ansiedade generalizada, tendo em vista que é bastante sensível aos ansiolíticos clássicos, mas não a outras drogas que são usadas em prática clínica para outros transtornos de ansiedade, sendo necessária portanto, uma precaução quanto ao uso do termo “modelo de ansiedade”, enquanto as bases das ações farmacológicas dos compostos testados no TCA não são completamente elucidadas.

#### ***1.4. Modelos animais preditivos de atividade antidepressiva***

Assim como os modelos animais de ansiedade, muitos modelos animais de depressão foram propostos. Porém, até o momento existem controvérsias sobre um modelo animal de depressão ideal; pois este deveria satisfazer alguns critérios (Borsini e Meli, 1988; Willner,

---

<sup>6</sup> Descrição do teste do campo aberto (ver Apêndice).

1997). McKinney e Bunney, em 1969<sup>7</sup>, propuseram os pré-requisitos essenciais para um modelo animal de depressão e alguns anos antes da proposta desses critérios, a maioria dos modelos animais de depressão se resumiam a experimentos de separação de primatas, que buscavam traçar um paralelo com quase todos os sintomas da depressão humana. Todavia, eram questionadas a utilidade e confiança do paradigma, já que este se baseava em princípios teóricos e segundo Cryan e colaboradores (2002), até mesmo esotéricos.

Mais tarde, Henn e McKinney, em 1987, resumiram o conceito apresentado em 1969, estabelecendo que os modelos animais em geral, devem ser avaliados pela sua adequação à questão que está se querendo estudar. Algumas técnicas foram desenvolvidas e aplicadas com considerável sucesso em modelos animais de várias condições neurológicas, como as doenças de Huntington e Parkinson, possibilitando a exploração de novas medicações que podem se opor ou reverter os mecanismos fundamentais dessas enfermidades (Nestler et al., 2002). Em relação à depressão, é muito difícil avaliar o real mecanismo através do qual as drogas antidepressivas atuam, ou mesmo encontrar compostos que revelem novos mecanismos antidepressivos. Além disso, está claro que cada modelo animal sensível a drogas antidepressivas representa apenas uma supersimplificação de um distúrbio altamente complexo em que muitos fatores estão envolvidos (Borsini & Meli, 1988), tendo em vista que a fisiopatologia da depressão ainda não está elucidada, tornando impossível para um modelo animal preencher todos os critérios de validação (Cryan et al., 2002).

Ao longo das últimas décadas, na busca por aproximar as dimensões da personalidade e distúrbios humanos com comportamento animal<sup>8</sup>, inúmeros modelos animais de depressão foram desenvolvidos com o objetivo de detectar novos fármacos com potencial atividade antidepressiva, como o modelo do “desamparo aprendido” (*learned helplessness*), o modelo do estresse crônico, o de estresse precoce (*early life stress*), a bulbectomia olfativa e os de retirada de droga (“*drug withdrawal*”, com déficits de interesse por substâncias palatáveis, como a sacarose). Alguns deles envolvem a aplicação de estresse incontrolável, o qual se espera que leve o indivíduo a uma condição semelhante à depressão. O modelo do desamparo aprendido foi desenvolvido por Overmier e Seligman, em 1967. Foi inicialmente aplicado a cães e, posteriormente, a outras espécies, incluindo os roedores. Consiste na aplicação de um estresse agudo e imprevisível, representado por um

---

<sup>7</sup> Pré-requisitos essenciais para um modelo animal de depressão (ver Apêndice).

estímulo aversivo, como um suave eletrochoque nas patas do animal. Esse estímulo induz uma condição comportamental cuja dimensão dependerá da sensibilidade da linhagem à qual o animal em experimentação pertence e também da intensidade do choque (Vollmayr & Henn, 2003). Foi observado que drogas antidepressivas fazem com que o animal desenvolva uma estratégia de fuga, ao contrário dos animais controle que não recebem qualquer fármaco (Sherman et al., 1982), sendo, portanto, um modelo animal preditivo de atividade antidepressiva. Para alguns autores ainda, o conceito de “desamparo aprendido” seria algo mais abrangente e representaria uma categoria de modelos animais de depressão nos quais estariam enquadrados o teste do nado forçado e o teste de suspensão da cauda, já que estes aplicam um estresse incontrolável do qual não há uma fuga possível (Stéru et al., 1985; Nestler et al., 2002). De qualquer forma, o atrativo do modelo de “desamparo aprendido” é que ele se baseia na teoria plausível de que funções cognitivas e outros aspectos neurobiológicos se confrontam com o estresse inescapável, levando o animal a aprender (“adaptativamente mal”) que ações voluntárias nesse caso não são efetivas (Nestler et al., 2002; Vollmayr & Henn, 2001; Vollmayr & Henn, 2003).

O modelo do estresse crônico foi originalmente desenvolvido em 1980, por Katz e Schmaltz. Nele, os roedores são expostos a uma gama de estímulos estressores relativamente suaves, por períodos prolongados. Apesar de provocar sintomas semelhantes à depressão (D’Aquila et al., 2000), desencadeados por estresses mais próximos do natural (Gambarana et al., 2001), esse modelo apresenta falhas para revelar a atividade antidepressiva de alguns compostos. Os efeitos de algumas drogas antidepressivas ainda precisam ser melhor estabelecidos também em modelos envolvendo manipulação do ambiente de animais nas primeiras etapas de vida (Cryan et al. 2002), como o estresse pré-natal, a manipulação pós-natal e o modelo do estresse precoce com separação materna (Caldji et al., 2000). Esses modelos produzem alterações comportamentais em roedores que persistem na vida adulta. Da mesma forma, efeitos de fármacos antidepressivos somente são observados após tratamento crônico em outro modelo utilizado, a bulbectomia olfativa, onde a remoção bilateral dos bulbos olfativos, resulta em marcantes alterações comportamentais que são correlacionadas com características da depressão (Porsolt, 2000). Por sua vez, os modelos de retirada de drogas representam um modelo animal do sintoma

---

<sup>8</sup> Modelos animais de psicopatologias e distúrbios humanos (ver Apêndice).

de anedonia, uma das características da depressão maior, mas possui duas desvantagens: requer mais estudos para validação e não avalia diferenças entre linhagens facilmente (Markou & Koob, 1991).

Apesar de existirem inúmeros modelos animais preditivos de atividade antidepressiva, como os acima descritos, atualmente os mais utilizados por pesquisadores do mundo inteiro são o teste de nado forçado e o teste de suspensão da cauda, por serem de alta especificidade e sensíveis a drogas antidepressivas, mesmo com tratamento agudo (Porsolt, 2000).

#### ***1.4.1. Teste de nado forçado***

O teste de nado forçado (TNF) introduzido por Porsolt em 1977 e aplicado em roedores<sup>9</sup>, se baseia na atividade motora seguida de imobilidade em uma situação onde não é possível uma fuga. No teste, após um período inicial de luta, o animal adota uma postura típica realizando apenas os movimentos necessários para manter sua cabeça fora da água. O tempo total em que o animal mostra este comportamento é então medido (Hédou et al., 2001). O significado desta conduta exibida pelo animal, originalmente chamada por Porsolt de “comportamento de desespero” (*behavioral despair*), têm sido discutido. Alguns pesquisadores consideram que a atividade na água seria um reflexo do tipo de estratégia adotada pelo animal quando se encontra em situação desfavorável (Martí & Armario, 1996). Já outros pesquisadores defendem a idéia de que o comportamento ativo na situação de nado forçado poderia ser um resultado de medo/ansiedade e representaria uma situação de pânico, característicos de distúrbios psicológicos (DePablo et al., 1989). Apesar das controvérsias, o TNF tem sido validado no mundo inteiro como modelo animal de depressão e muitos consideram que a pouca movimentação do animal na água pode ser considerada como análoga a um comportamento depressivo (Lahmame & Armario, 1996; Sariskova & Kulikov, 1999), já que drogas antidepressivas, eficazes em humanos, diminuem o tempo de imobilidade do animal (Andreatini & Bacellar, 2000). Deve-se destacar que outros tratamentos, como privação de sono REM e eletrochoques, também revertem o comportamento de imobilidade.

---

<sup>9</sup> Descrição do teste de nado forçado (ver Apêndice).

Existem drogas de outras categorias capazes de reduzir o tempo de imobilidade, como por exemplo, os estimulantes, que resultam em falsos positivos. Entretanto, existem testes secundários que medem a atividade motora e que permitem a identificação desse tipo de resultados (Nestler et al., 2002). Além disso, outros protocolos dentro deste mesmo modelo têm demonstrado serem eficazes na identificação farmacológica de falsos positivos, como a observação de outros parâmetros comportamentais que permitiriam uma detecção mais específica de drogas antidepressivas.

Assim, várias mudanças do protocolo original de Porsolt foram propostas para aumentar a responsividade do TNF a novos fármacos <sup>10</sup> (Detke & Lucki, 1996; Taghzouti et al., 1999), como por exemplo, uma avaliação mais completa de comportamentos exibidos pelos animais quando submetidos ao teste.

Nesse aspecto, uma avaliação etológica completa do teste foi realizada por Barros e Ferigolo (1998), na qual observou-se a frequência e a duração dos comportamentos exibidos pelos animais no TNF. Os autores desse trabalho verificaram que a frequência com a qual se alternam os comportamentos de imobilidade e os de atividade é alta, mas gradualmente reduz com o tempo e os animais tendem a se manter imóveis por maiores períodos de tempo. Embora esta análise etológica seja bastante abrangente, deve-se levar em conta que diferentes linhagens de ratos respondem de forma distinta ao mesmo estímulo estressor, neste caso representado pelo TNF (Bai et al., 2001). Da mesma forma, estão presentes diferenças entre sexos, onde as fêmeas parecem ser menos suscetíveis a exibir imobilidade do que os machos (Palanza, 2001).

Alguns outros fatores podem influenciar os resultados obtidos neste modelo. Muitos trabalhos demonstraram os efeitos fisiológicos e comportamentais desencadeados por diferentes profundidades da água no TNF (Armario et al., 1988; Abel, 1994). Imersão de ratos na versão modificada do TNF (TNFM), na qual a profundidade da água ultrapassa 40 cm e não permite que o animal tenha qualquer contato com o fundo do tanque, leva a um padrão diferente de comportamento, incluindo maior frequência de mergulhos e movimentos vigorosos, além de mudanças fisiológicas que poderiam não ocorrer quando os ratos são testados nos padrões originais do teste (Abel, 1994). A identificação das variáveis que afetam o comportamento dos animais submetidos ao TNF pode levar a um

---

<sup>10</sup> Teste de nado forçado modificado (TNFM) (ver Apêndice).

aperfeiçoamento do modelo experimental para torná-lo mais sensível e mais apurado na detecção de tratamentos antidepressivos. O TNFM apresenta uma vantagem sobre o tradicional: revela o efeito de agentes catecolaminérgicos que reduzem a imobilidade, aumentando a “escalada” e também de ISRSs que aumentam a “natação” (Lucki, 1997).

Apesar de todas essas características e de sua ampla utilização, o TNF apresenta algumas limitações. Os antidepressivos diminuem o tempo de imobilidade mesmo quando administrados em doses únicas, ao contrário do que se observa na prática clínica, onde são necessárias várias semanas de tratamento para se obter resultados. Portanto, o teste é sensível aos efeitos imediatos desses fármacos e pode não estar captando as mudanças de humor *per se* que esses fármacos produzem em pacientes humanos (Nestler et al., 2002). Outro problema observado neste modelo experimental, sobretudo na versão tradicional, é a dificuldade de detectar a ação de ISRSs, uma das classes mais usadas de antidepressivos no mundo inteiro (Borsini, 1995). Outra desvantagem, é o efeito colateral muitas vezes ignorado, da hipotermia severa, que pode ser medida no final do teste (Porsolt et al., 1979). A hipotermia mais dramática ocorre em camundongos, onde foi visto que após os 6 minutos do teste a temperatura retal se mantém em torno de 31°C, muito abaixo do valor normal de 37.5°C (Thierry et al., 1986). Apesar do efeito causado pela hipotermia ser difícil de avaliar, parece que o animal é submetido a um estresse bem mais severo do que se imaginava: aumento na defecação, maior frequência de vocalização e movimentos mais lentos no final do teste são provavelmente um indício desse desconforto (Thierry et al., 1986). No aspecto farmacológico, é possível que essa marcante queda na temperatura corporal tenha uma influência nos resultados quando administra-se uma droga antidepressiva, embora alguns antidepressivos que reduzem o tempo de imobilidade, como a imipramina, não parecem atuar por antagonismo à hipotermia (Porsolt et al., 1979; Thierry et al., 1986).

#### ***1.4.2. Teste de suspensão da cauda***

Outro modelo animal de depressão, originalmente proposto por Stéru e colaboradores em 1985, é o teste de suspensão da cauda (TSC) , largamente utilizado em camundongos e que sofreu adaptações, passando a ser usado também em ratos (Chermat et al., 1986) e em outras espécies como o gerbil (Varty et al., 2003). O TSC é um paradigma derivado do

mesmo conceito usado no TNF <sup>11</sup>, onde o animal se encontra numa situação aversiva de inescapabilidade, assim alternando períodos de agitação e de imobilidade (Chermat et al., 1986).

Os parâmetros comportamentais considerados como atividade no TSC são: a) movimentos freqüentes simulando corrida; b) torções do corpo com tentativas de alcançar o objeto (gancho ou fita) que prende o animal; d) suaves impulsos com o objetivo de desprender a cauda e e) “escalada” (*climbing*), na qual o roedor tenta subir auxiliando-se com a própria cauda presa. Entretanto, quando esta última medida comportamental é observada muito amiúde, passa a dificultar a observação do comportamento e do efeito de drogas antidepressivas (Mayorga & Lucki, 2001), sendo considerada uma desvantagem deste modelo. Dentre as suas principais vantagens estão: a facilidade em aplicar o teste, sua alta especificidade e a sensibilidade para detectar fármacos antidepressivos.

Embora o conceito principal no qual se baseiam o TSC e o TNF seja o mesmo, o espectro de compostos antidepressivos detectados pelos dois testes se sobrepõem mas não são idênticos (Yoshikawa et al., 2002). Antidepressivos tricíclicos, IMAOs, antidepressivos atípicos (como a mianserina), antagonistas funcionais de NMDA e potencializadores do receptor AMPA parecem desencadear efeitos semelhantes em ambos os modelos. Todavia ISRS, que geralmente não são eficazes na redução do tempo de imobilidade do TNF, ainda que em doses farmacologicamente elevadas, têm seus efeitos detectados no TSC.

Outros aspectos deste modelo foram motivo de debate do ponto de vista ético, pois o TSC representaria um modelo experimental causador de grande desconforto, além de ferir o animal. Entretanto, devemos considerar que roedores provavelmente não passam pelo mesmo desconforto que outros animais e até mesmo pessoas quando colocados nessa posição, graças a sua diferenciada hemodinâmica (Thierry et al., 1986). As posições nas quais o humano e o roedor vivem são a primeira diferença: o humano se mantém em posição vertical e, devido à gravidade, a pressão sangüínea sistólica se encontra em valores diferentes no corpo em relação ao encéfalo; qualquer movimento para baixo com a cabeça requer um reequilíbrio da pressão sangüínea. Outra diferença é o tamanho do encéfalo e o largo diâmetro das carótidas (Schmidt-Nielsen, 1996). Em contraste, o roedor vive na

---

<sup>11</sup> Aplicação do teste de suspensão da cauda (ver Apêndice).

posição horizontal e com seu pequeno tamanho não haveria desbalanço na hemodinâmica, de forma que parece improvável que o desconforto da posição na qual o animal se encontra no teste seja um fator muito estressante (Thierry et al., 1986).

Porsolt et al. (1978) notaram importantes diferenças entre as linhagens de ratos e camundongos utilizados nos testes, principalmente no TNF, com relação à resposta a antidepressivos. (Lahmame & Armario, 1996). Uma década depois, Paré (1989) estudou o comportamento de várias linhagens na busca de um modelo genético de depressão. Diferentes linhagens de animais de uma mesma espécie, respondem, em geral, de maneira diferente aos mesmos estímulos estressantes (Ramos e Mormède, 1998). Desta forma, o uso de linhagens isogênicas, que são geneticamente homogêneas, torna possível dissociar componentes genéticos e ambientais de um dado comportamento, já que os animais dentro de cada linhagem são idênticos em seu genótipo (Ramos & Mormède, 1998).

### ***1.5. Ratos LEW e SHR***

Duas linhagens de ratos, LEW e SHR foram recentemente propostas como modelo genético para o estudo da ansiedade.

Vários estudos demonstraram que os ratos SHR <sup>12</sup> apresentam respostas autonômicas exacerbadas em resposta a estímulos aversivos e também anormalidades endocrinológicas, em consequência da consangüinidade (Hendley, 2000). Embora essas características estejam presentes na linhagem SHR, ela demonstra ser de grande valia para o estudo de vários traços, já que exibe um perfil comportamental diferenciado. Durante a seleção genética de ratos SHR para pressão arterial elevada, uma série de características comportamentais parecem ter se fixado fortuitamente em seu genoma, fazendo com que os ratos desta linhagem se apresentem, por exemplo, espontaneamente hiperativos quando comparados com ratos WKY, sem qualquer intervenção cirúrgica, neurotóxica ou ambiental (Sagvolden et al., 1993; Hendley, 2000). Entretanto, foi relatado que essa linhagem apresenta dimorfismo sexual na herança da hipertensão e hiperatividade: os machos apresentam pressão arterial mais elevada do que as fêmeas e estas, por sua vez, mostram níveis mais altos de atividade do que os machos (Hendley et al., 1988).

---

<sup>12</sup> Desenvolvimento da linhagem de ratos SHR por Okamoto & Aoki (1963) (ver Apêndice).

Esta linhagem, apresenta características que permitem o estudo das causas, mecanismos e patologia de vários distúrbios, desde a hipertensão até desordens psiquiátricas (Meneses et al., 1996). Além disso, os processos neurohormonais constituem um fator importante no desencadeamento do seu comportamento hiperativo. Alguns autores demonstraram ainda, a presença de alterações em níveis de catecolaminas em várias regiões do encéfalo dos animais desta linhagem. Particularmente, a dopamina parece estar envolvida na geração das características comportamentais de ratos SHR (Van den Buuse, 1995), já que drogas dopaminérgicas provocam uma resposta comportamental diferenciada em SHR, comparando-se com WKY ou mesmo outras linhagens (Van den Buuse, 1995; Van den Buuse, 2004).

A linhagem SHR foi proposta como modelo para o estudo do transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) (Sagvolden et al., 1992; Sagvolden et al., 1993; Evenden & Meyerson, 1999; Fujita et al., 2003) e para desordens de aprendizado e memória (Meneses & Hong, 1998), em decorrência do seu perfil comportamental. Além disso, os ratos SHR vêm sendo utilizados freqüentemente em comparação com outras linhagens para a pesquisa de fenômenos como a ansiedade e o medo (LeDoux et al., 1983). Nesse aspecto, os ratos SHR apresentam respostas de medo reduzidas quando expostos a estímulos aversivos representados por vários testes comportamentais.

LeDoux et al. (1983) testaram ratos SHR, WKY e Sprague-Dawley no TCA e notaram que os ratos SHR exploraram livremente a arena, cruzaram mais quadrados e nunca defecaram. Foi constatado também que os ratos SHR diferem de outras linhagens (LEW, em especial) em testes como o *holeboard* (Lahmame & Armario, 1996; Martí & Armario; 1996) e o LCE (Ramos et al., 2002). Assim como em testes de ansiedade e de atividade exploratória/locomotora, nos quais os ratos SHR costumam ser mais ativos, em modelos experimentais de depressão esta linhagem também demonstra esse padrão comportamental (Armario et al., 1995).

A linhagem LEW<sup>13</sup>, por sua vez difere de algumas linhagens, sobretudo da histocompatível Fischer 344, em vários parâmetros, inclusive comportamentais (Paulus et al., 1998). Diferenças sensorimotoras também foram constatadas em ratos LEW, quando comparados a ratos Sprague-Dawley (Webb et al., 2003). Por sua vez, no aspecto

---

<sup>13</sup> Linhagem de ratos LEW e sua utilização (ver Apêndice).

neuroquímico, os ratos LEW possuem, em relação ratos Fischer 344 e Sprague-Dawley: menos neurônios dopaminérgicos espontaneamente ativos, menor quantidade de neurofilamentos e baixa liberação basal de dopamina, glutamato e serotonina em regiões do encéfalo. (Harris & Nestler, 1996; Selim & Bradberry, 1996).

No aspecto comportamental, a linhagem LEW apresenta um número maior de respostas comportamentais semelhantes à ansiedade quando submetidos à diferentes testes comportamentais (LCE, TCA, caixa branca e preta) em relação a outras linhagens, como a SHR (Ramos et al., 1997; 1998; 2002). Em alguns estudos utilizando modelos animais de depressão, os ratos LEW também exibiram um maior tempo de imobilidade comparando-se com SHR (Berton et al., 1998). Entretanto, muitas divergências foram encontradas nesse padrão de comportamento e isso talvez se deva à disponibilidade de diferentes sublinhagens de ratos LEW. Alguns estudos comportamentais, usando as sublinhagens SsNHsd e HANRijHsd, originadas de cruzamentos endogâmicos de ratos Wistar realizados pelo Dr. Lewis, que deu origem ao nome da linhagem, revelaram que essas sublinhagens diferiam comportamentalmente (Stöhr et al., 1999).

Um outro aspecto foi ainda observado, quando foram comparadas as linhagens LEW e SHR: um intercruzamento entre LEW/Nico e SHR/Nico foi usado para identificação e mapeamento de QTL para comportamentos relacionados à emocionalidade; um QTL principal foi identificado no cromossomo 4 do rato para locomoção central no campo aberto (Ramos et al., 1999). Esse locus, que somente afeta fêmeas, também abriga o gene *Tac 1r* para o receptor NK1, que parece estar envolvido na geração de traços relacionados à ansiedade em roedores (File, 1997). Por esta razão, e pelo fato de que a substância P e seu receptor NK1 estão envolvidos no fenômeno da dor, Ramos et al. (2002) investigaram a possível diferença entre LEW e SHR (sublinhagens brasileiras) nas medidas comportamentais de nocicepção. O trabalho de Ramos et al. (2002) demonstrou que os animais das duas linhagens diferem na dor de longa duração, o que está de acordo com a hipótese de que haveria distinção entre LEW e SHR nos receptores NK1.

Os ratos LEW e SHR apresentam respostas contrastantes aos mais diferentes tipos de ambientes estressores (Ramos et al., 1998). No trabalho realizado por Ramos et al., (1997), seis linhagens consangüíneas, entre elas LEW e SHR, foram avaliadas comportamentalmente em quatro modelos animais: o LCE, o TCA, a caixa branca e preta e

o teste de interação social. Foi observado no TCA que os ratos SHR exibiram maior locomoção no centro do aparato em relação aos ratos LEW, entretanto não diferiram em seus níveis de locomoção periférica. Da mesma forma, no LCE, os ratos SHR e LEW apresentaram os mais altos e os mais baixos índices de entradas nos braços abertos, respectivamente. Neste modelo, essas linhagens não diferiram no número total de entradas nem no número de entradas nos braços fechados, demonstrando que as linhagens LEW e SHR diferem em suas respostas em parâmetros clássicos de emocionalidade, mas não em seus níveis de locomoção. Os animais pertencentes à linhagem SHR apresentam uma aproximação maior aos estímulos considerados ansiogênicos, em oposição ao que se observa com os ratos LEW (Ramos et al., 1998). Em outro estudo realizado por Ramos et al. (1998), foi utilizada uma técnica de cruzamento para dissociar alguns dos componentes que explicariam as diferenças entre ratos LEW e SHR. Para tanto, eles utilizaram seis grupos genéticos (LEW, SHR, F1 de mãe LEW, F1 de mãe SHR, F2 de avó LEW e F2 de avó SHR), os quais foram testados no LCE e no TCA. Os resultados dessa análise genética confirmaram que os contrastes comportamentais previamente observados em ratos LEW e SHR eram genéticos na sua origem. Estas linhagens se apresentam, portanto, como uma ferramenta útil de aprofundamento em estudos moleculares e neurobiológicos de distúrbios emocionais.

### ***1.6. Seleção genética***

Ao longo das últimas décadas, muitos dos esforços realizados no campo da Genética do Comportamento, assim como em outras áreas, têm sido direcionados para demonstrar a existência de processos emocionais e neurobiológicos comuns/homólogos entre humanos e outras espécies animais, especialmente o rato. Este sempre foi muito usado nesta área de pesquisa e está entre os primeiros mamíferos domesticados e selecionados geneticamente para propósitos científicos (Brush & Driscoll, 2002). A evidência genética pode apoiar essa teoria se for possível demonstrar que a ação gênica é consistente com a mediação dos processos neurobiológicos esperados entre diferentes espécies (Flint, 2004). Com o interesse de encontrar essas bases genéticas e neurobiológicas, os pesquisadores desenvolveram várias ferramentas para investigar as diferenças na susceptibilidade e sensibilidade a inúmeras condições neuropsiquiátricas. Entre estas ferramentas, temos a

seleção genética bidirecional <sup>14</sup>, as linhagens consangüíneas (*inbred strains*) e os animais obtidos pela tecnologia do gene alvo.

Um exemplo do uso de técnicas como a seleção genética são as linhagens de ratos Maudsley reativas e não-reativas (MR e MNRA, respectivamente), citadas aqui anteriormente, desenvolvidas por Broadhurst na década de 60. O parâmetro usado nessa seleção foi a defecação no TCA. Ainda na década de 60, Bignami realizou uma seleção bidirecional para a performance de ratos no teste da “*shuttle box*”, estabelecendo duas linhagens de ratos conhecidos por ratos Romanos de alta esquivia (RHA) e de baixa esquivia (RLA) <sup>15</sup>. Ao longo das gerações o processo de seleção foi bem-sucedido e esse resultado somente poderia ocorrer se a hereditariedade fosse algo importante (Plomin, 1994). Posteriormente, DeFries e colaboradores usaram seleção artificial de camundongos para alta e baixa atividade no TCA. Depois de 30 gerações de seleção as linhagens “altas” apresentaram índices de atividade no TCA 30 vezes maiores do que as “baixas”, demonstrando que o papel da genética era preponderante.

Outro exemplo de seleção genética bidirecional são as linhagens de ratos Syracuse, derivadas da linhagem Long-Evans, que foram selecionadas para alta e baixa esquivia na “*shuttle box*” desde 1965, mas elas também diferem em outras características fenotípicas (Brush et al., 1999).

À luz dos experimentos anteriores realizados com seleção artificial, foram estabelecidas na Alemanha por Liebsch e colaboradores (1998) duas linhagens de ratos Wistar que diferem consistentemente em seu comportamento no LCE. Essas linhagens são conhecidas como HAB (“*high anxiety behaviour*”) e LAB (“*low anxiety behaviour*”). Inicialmente, ratos Wistar foram testados no LCE e os animais que obtiveram os mais altos índices de tempo gasto nos braços abertos foram inter cruzados dando origem aos LAB e os de mais baixos índices de tempo gasto nos braços abertos índices foram inter cruzados gerando os HAB.

Os experimentos feitos com seleção artificial não se limitam a testar as linhagens desenvolvidas no modelo experimental o qual as deram origem. Isso ocorre pelo objetivo de caracterizar essas linhagens mais extensivamente e elucidar a relação existente entre emocionalidade e outros parâmetros comportamentais e biológicos relacionados ao

---

<sup>14</sup> Aplicação da seleção genética (ver Apêndice).

estresse. Por exemplo, os ratos Romanos de Bignami foram submetidos a outros modelos animais de ansiedade como o TCA, onde verificou-se que os RLA em ambiente novo defecavam mais que os RHA. Por sua vez, os ratos MR diferiam dos MNRA quando submetidos à *shuttle box* e a outros modelos animais de ansiedade e também de depressão, como o TNF (Abel et al., 1992; Comissaris et al., 1996). O mesmo ocorreu com os ratos HAB e LAB, que foram submetidos a inúmeros testes comportamentais (LCE, caixa branca e preta, interação social e o TNF) e mostraram diferenças em todos os testes (Henniger et al., 2000; Salomé et al., 2002).

Com esses dados, poderíamos imaginar que variantes genéticas agiriam pleiotropicamente em diferentes medidas de emocionalidade (Flint, 2004), tendo em mente que a pleiotropia é uma condição na qual somente um gene influencia mais do que um traço/característica (Snustad et al., 1997). Verificando a importância da seleção genética para os estudos do Comportamento e com o objetivo de propor um bom modelo genético para o estudo da ansiedade, Ramos et al. (2003) desenvolveram duas linhagens de ratos que diferem na locomoção no centro do TCA. Primeiramente, foi criada uma população inicial (S0) com o máximo de variabilidade genética, a partir do cruzamento de três linhagens diferentes. Machos albinos Wistar foram cruzados com fêmeas pigmentadas Hooded, ambas linhagens não-consangüíneas. As fêmeas pigmentadas obtidas deste cruzamento (F1) foram cruzadas com machos LEW albinos (linhagem consangüínea), resultando em descendentes metade pigmentados e metade não pigmentados (F2). Apenas os ratos albinos foram então inter cruzados, com o objetivo de se evitar um padrão de segregação pela pigmentação, produzindo uma geração híbrida totalmente albina denominada de S0. Essa população inicial foi selecionada de acordo com os seus índices de locomoção no centro do TCA, gerando as linhagens Floripa H (alta locomoção central) e Floripa L (baixa locomoção central). A cada geração, os ratos das duas linhagens eram testados e os animais com mais altos níveis de locomoção central da linhagem Floripa H eram selecionados e inter cruzados, com o mesmo procedimento sendo aplicado aos ratos com os mais baixos índices de locomoção central da linhagem Floripa L. Atualmente essas linhagens já se encontram na 10<sup>a</sup>. geração de seleção.

---

<sup>15</sup> Experimento de Bignami utilizando a “shuttle-box” para seleção (ver Apêndice).

As linhagens Floripa H e Floripa L foram também estudadas em outros modelos animais de ansiedade (LCE, caixa branca e preta). No LCE, os ratos Floripa H e Floripa L de diferentes gerações (S1, S2 e S4) exibiram diferenças significativas em várias medidas, sendo que as mais marcantes foram observadas no número de entradas e no tempo gasto nos braços abertos. Para a porcentagem de entradas nos braços abertos, outra medida clássica de ansiedade, diferenças entre linhagens foram encontradas em animais da geração S1 (Ramos et al., 2003). Na caixa branca e preta, contrastes significativos entre ratos Floripa H e Floripa L apareceram ao longo das gerações (S1 a S4), em medidas clássicas de ansiedade do modelo, como o número de transições entre compartimentos e o tempo gasto no compartimento branco (Ramos et al., 2003). Esses dados ressaltam que a seleção genética realizada por Ramos et al. (2003) foi efetiva para produzir as duas novas linhagens de ratos, Floripa H e Floripa L, que divergem não apenas no comportamento para o qual foram selecionadas, mas também em medidas clássicas de ansiedade de outros modelos animais.

### ***1.7. Análise de atividade em gaiolas de residência***

Paralelamente à análise de roedores nos mais diversos testes comportamentais, alguns pesquisadores tiveram interesse em avaliar esses mesmos animais em ambientes familiares, para buscar a compreensão dos efeitos do habitat e das distintas estruturas sociais no comportamento de roedores (Tang et al., 2002). Entretanto, o desenvolvimento desse campo de pesquisa é algo recente, pois até há algumas décadas, os animais de laboratório não faziam parte do foco de estudos etológicos (Alcock, 2003; Olsson et al., 2003). Como foi mencionado anteriormente, sabe-se que não apenas o genótipo, mas também o ambiente onde os animais são mantidos, exercem influência nos resultados obtidos nos experimentos. Por conseguinte, muitos esforços são feitos para padronizar o ambiente e minimizar dentro do possível a variabilidade (Würbel, 2001). Desta forma, as condições residenciais de roedores de laboratório são estruturadas para incluir os aspectos necessários para a reprodução e a saúde física, sendo estas características mais ou menos padronizadas em laboratórios do mundo inteiro (Olsson et al., 2003). Sob condições padrão de laboratório, os roedores são mantidos em gaiolas plásticas ou de metal forradas com serragem, palha ou outro material similar, com água e comida disponível. Todavia para alguns autores, estas

seriam condições que poderiam interferir no repertório comportamental do animal, comprometendo os resultados obtidos nos testes comportamentais (Würbel, 2001). Por exemplo, o convívio de alguns animais (4 ou 5) restritos nas gaiolas, quando combinados com estressores agudos, como freqüente manipulação e experimentação usando estímulos aversivos, podem levar à supressão da função imune (Olsson et al., 2003). Para Blanchard e Blanchard (2003), se as medidas comportamentais são observadas na ausência de uma gama razoável de estímulos relevantes (o tradicional ambiente de laboratório), a eficiência da análise funcional seria reduzida. Entretanto, trabalhos como o de Barnett (1967), que avaliou grupos de *Rattus norvegicus* selvagens em gaiolas de residência, fornecem informações importantes sobre os efeitos da vida em grupo em gaiolas de residência, permitindo abrir o leque de informações sobre a análise etológica de animais de laboratório.

A idéia que a etologia tem muito a oferecer aos estudos em Psiquiatria e Neurociências vem sendo alimentada desde a década de 70 (Troisi, 1999). Desde então, a análise do comportamento espontâneo de roedores vêm dando importantes informações a respeito da influência das atividades diárias nas gaiolas de residência sobre os modelos experimentais de ansiedade e depressão. Além disso, ela busca determinar se um determinado perfil observado em um teste comportamental reflete uma característica intrínseca do indivíduo (vista também em seu ambiente normal) ou se é especificamente desencadeada pelo estímulo estressor do teste ao qual o animal foi submetido (Henniger et al., 2000). A principal utilidade em se observar o repertório comportamental espontâneo<sup>16</sup>, é o reconhecimento da freqüência das diversas categorias comportamentais avaliadas, tendo em mente que algumas medidas como “comer” ou “beber” não ocorrem isoladamente, mas em concerto com outros comportamentos adaptativos (Heinrichs, 2001).

Para avaliar o impacto da atividade locomotora espontânea e não-emocional nos modelos experimentais de ansiedade e depressão, esta pode ser medida em animais em suas próprias gaiolas residenciais. Outros parâmetros comportamentais relacionados com a atividade locomotora também podem ser avaliados como: o repouso/sono e a interação social. Esta última é considerada uma medida relevante de comportamento relacionado à ansiedade. É normalmente observado que animais com índices mais elevados em medidas clássicas de ansiedade em testes como o LCE, TCA e a caixa branca e preta, tenderiam a

---

<sup>16</sup> Etograma e sua importância (ver Apêndice).

mostrar menor interação com outros animais em seu ambiente residencial. Entretanto, alguns autores mostram que nem sempre esse padrão é observado, sendo possível se ver ratos que apresentam comportamentos semelhantes à ansiedade com alta interação social e até mesmo com luta e agressividade (Henniger et al., 2000).

Outro parâmetro comportamental geralmente observado em etogramas é a auto-limpeza, a qual freqüentemente se observa quando ratos ou camundongos se encontram em uma situação estressante (Moyaho & Valencia, 2002). Tem sido proposto que esses animais exibem a auto-limpeza para reduzir a excitação. Ratos colocados em uma arena não-familiar realizam auto-limpeza freqüentemente durante os primeiros minutos de exposição (Moyaho et al., 1995). A ingestão de alimentos, outro parâmetro também considerado em etogramas, em roedores apresenta-se discretamente ao longo do dia e a quantidade de alimentos ingeridos é proporcional à freqüência alimentar. Se o alimento é seco (como as rações tradicionais, em *pellets*), o consumo de água acompanhará a ingestão de comida (Clifton, 2000). Estressores experimentais costumam suspender processos fisiológicos, entre eles a ingestão de comida, ao invés de mobilizar comportamentos de vigilância ou tentativas de fuga. Desta forma, a medida de ingestão alimentar considerada em etogramas, é de grande valia para a fenotipagem comportamental, sendo este parâmetro avaliado em análise de repertório comportamental até mesmo em camundongos mutantes (Heinrichs, 2001).

### ***1.8. Drogas antidepressivas***

Atualmente existem no mercado farmacêutico inúmeras drogas antidepressivas, pertencentes a diferentes classes <sup>17</sup> e que são prescritas para o tratamento não apenas da depressão maior como também de outros transtornos do humor, ansiedade e muitas outras enfermidades.

A descoberta do primeiro antidepressivo, a iproniazida, ocorreu na década de 50 por Nathan Kline. Esse fármaco, um inibidor da monoaminoxidase <sup>18</sup> (IMAO), que originalmente foi usada para o tratamento da tuberculose, constitui o passo inicial nesse campo de pesquisa e, desde então, essa e muitas outras classes de drogas antidepressivas vem sendo administradas a pacientes do mundo inteiro com eficácia (Lôo et al., 2004). Na década de 50, outra classe de drogas antidepressivas surgiu: os antidepressivos tricíclicos

---

<sup>17</sup> Classes de antidepressivos disponíveis atualmente (ver Apêndice).

(TCAs). Seu protótipo e primeiro composto sintetizado foi a imipramina, que originalmente foi administrada como agente antipsicótico. Esse grupo é utilizado como padrão farmacológico de tratamento e tem como principal ação o bloqueio da recaptação das monoaminas, como a serotonina, a noradrenalina e a dopamina. Além disso, tem eficácia comprovada e apresentam uma rápida e excelente absorção digestiva além de uma forte fixação a proteínas plasmáticas (Fava & Kendler, 2000; Lôo et al., 2004). Entretanto, os antidepressivos tricíclicos, principalmente nas primeiras semanas de tratamento, apresentam altas taxas de efeitos colaterais anticolinérgicos, como sedação, hipotensão e alteração da frequência cardíaca (Fava & Kendler, 2000). Porém, essa classe de fármacos atua de forma eficaz no tratamento de outros transtornos do humor e até mesmo da ansiedade e do pânico (Rouillon, 1999; Krishnan, 2003) e são considerados por alguns como superiores aos ISRS para o tratamento de depressão com sintomas de ansiedade (comorbidade) (Fava et al., 2000). Inicialmente, os tricíclicos foram considerados sem qualquer eficácia para o tratamento do distúrbio de ansiedade generalizada (GAD), todavia, as pesquisas mais recentes mostraram que administração crônica de TCAs em humanos pode ser ao menos tão eficaz quanto os benzodiazepínicos (Rickels et al., 1993).

A imipramina, um dos TCAs mais conhecidos e administrados na prática clínica, também é utilizado em modelos animais preditivos de atividade antidepressiva (Gambarana et al., 2001), como o TSC e o TNF, pois sua eficácia na redução do tempo de imobilidade é comprovada por vários estudos (Trullas et al., 1989; Vaugeois et al., 1996; Lahmame et al., 1997; Barros & Ferigolo, 1998; Bai et al., 2001; Sun & Alkon, 2003). Alguns autores observaram também, que além da redução no tempo de imobilidade, os animais submetidos ao TNF após administração dose-dependente de imipramina, demonstravam outros parâmetros comportamentais como escalada, mergulho e movimentos da cabeça (Barros & Ferigolo, 1998). Em animais usados para experimentação, entretanto, a imipramina pode produzir sedação, assim como outros TCAs, e é capaz de reverter o efeito de drogas depressoras como a reserpina. Embora a imipramina seja utilizada em modelos animais de depressão para validação farmacológica, ela apresenta-se ineficaz para algumas linhagens de roedores, entre elas WKY e SHR (Lahmame & Armario, 1996; Lahmame et al., 1997). Aparentemente, essas linhagens demonstram falhas na resposta a esta droga, sobretudo no

---

<sup>18</sup> Teoria monoaminérgica de Schildkraut (ver Apêndice).

tratamento agudo, talvez por alguma resposta adaptativa neuroquímica. A imipramina, ao contrário do que foi visto em humanos, não exerceu efeitos ansiolíticos em modelos animais de ansiedade, como o LCE e a caixa branca e preta (Durcan et al., 1988; Costall et al., 1989). Entretanto, deverá ser ressaltado que o efeito desencadeado por uma droga antidepressiva dependerá da dose, do tratamento e do modelo utilizado.

O conjunto de ferramentas que podem ser utilizadas para o estudo da neurobiologia e genética dos transtornos da ansiedade e depressão, como por exemplo, os modelos animais, as linhagens isogênicas, a seleção genética, a resposta a fármacos e a análise estatística multifatorial, contribuem para ampliar os conhecimentos sobre a etiologia dessas desordens, o que pode levar à descoberta de um tratamento mais adequado desses transtornos.

## ***2. Justificativa***

No estudo proposto, as linhagens de ratos LEW, SHR, Floripa H e Floripa L foram testadas em modelos animais de depressão, já que em estudos anteriores desenvolvidos pela equipe do nosso laboratório, elas apresentaram comportamentos distintos para os testes de ansiedade, como o LCE, o TCA e a caixa branca e preta.

Estudos baseando-se em diferentes métodos têm sido propostos para estudar as altas taxas de comorbidade presentes entre ansiedade e depressão (Rouillon, 1999). Uma comparação entre dados obtidos com diferentes linhagens de ratos em modelos animais de ansiedade e modelos animais de depressão pode ser bastante útil para aumentar a compreensão das bases da intersecção entre ansiedade e depressão na qual alguns pacientes se encontram. Os ratos LEW e SHR já tinham sido avaliados em suas respostas no TNF, mas não no TSC, por outros pesquisadores (Armario et al.; 1995; Lahmame e Armario, 1996; Berton et al., 1998) gerando resultados discrepantes. Entretanto as sublinhagens brasileiras criadas no biotério do nosso laboratório não tinham sido avaliadas em nenhum desses modelos. Com o objetivo de avaliar todos os dados obtidos com as quatro linhagens, realizou-se uma análise estatística multifatorial para observar quais parâmetros comportamentais dos quatro modelos animais apresentam correlação. Além disso, as linhagens LEW e SHR foram observadas em seu comportamento espontâneo em gaiolas de residência e foram avaliadas em suas respostas ao antidepressivo tricíclico imipramina. Desta forma, havia o interesse de observar as linhagens de ratos LEW, SHR, Floripa H e Floripa L em modelos animais de depressão, representados pelo TNF e TSC e verificar se os animais pertencentes a estas linhagens exibiriam respostas comportamentais contrastantes nesses modelos assim como nos modelos animais de ansiedade previamente estudados. Com isso, poderíamos avaliar o potencial dessas linhagens para o estudo não somente da ansiedade, mas também da depressão e investigar a possível correlação genética entre os comportamentos avaliados nos diferentes testes.

Neste estudo, as linhagens de ratos LEW e SHR (sublinhagens brasileiras) demonstraram comportamento distinto no TNF, além de manter as diferenças claras anteriormente verificadas nos modelos do LCE e TCA, e por esta razão foram avaliadas em seu repertório comportamental espontâneo em suas gaiolas de residência e suas respostas

ao antidepressivo clássico imipramina. Na primeira, havia especial interesse em avaliar a hipótese de que as respostas contrastantes exibidas por animais dessas linhagens seriam simples discrepâncias na atividade locomotora.

### **3. Objetivos**

**3.1. Gerais :** Verificar o perfil comportamental, tanto espontâneo quanto em situação de teste, de quatro linhagens de ratos, LEW e SHR; Floripa H e Floripa L, visando identificar uma possível correlação genética entre índices experimentais de ansiedade e depressão, bem como avaliar a potencial utilidade destas linhagens no estudo da comorbidade entre estes transtornos.

### **3.2. Específicos :**

1. Testar os ratos, tanto machos quanto fêmeas, das quatro linhagens, LEW, SHR, Floripa H e Floripa L, nos seguintes modelos de ansiedade e depressão, LCE, TCA, TNF e TSC.
2. Alternar a ordem dos modelos animais de depressão com o propósito de averiguar uma possível influência da seqüência dos testes nas respostas exibidas pelos animais.
3. Com os dados obtidos, realizar uma análise estatística multifatorial (análise de componentes principais), para identificar as principais dimensões psicológicas e comportamentais avaliadas pela série de testes utilizados, e verificar se índices experimentais de ansiedade e depressão podem compartilhar bases neurobiológicas comuns.
4. Avaliar as respostas dos ratos LEW e SHR, que apresentaram perfil mais consistente nos testes utilizados, ao antidepressivo imipramina.
5. Verificar o repertório comportamental espontâneo em gaiolas de residência dos ratos LEW e SHR, para testar a hipótese de que suas diferenças nos testes aplicados se devem a diferenças em seus níveis basais de atividade.
6. Verificar se as linhagens em questão, além de serem úteis ao estudo da ansiedade, também são potencialmente interessantes como um modelo genético de depressão.

#### **4. *Materiais e Métodos***

##### **4.1. *Animais***

Foi utilizado um total de 165 indivíduos pertencentes as quatro linhagens de ratos (LEW, SHR, Floripa H e Floripa L) de ambos os sexos na primeira etapa de experimentos, que envolveu os dois modelos animais de ansiedade (LCE e TCA) e os dois modelos animais de depressão (TNF e TSC). Os ratos LEW e SHR são consangüíneos e portanto, mantidos em nosso laboratório sob o sistema de cruzamento irmão-irmã. Os ratos Floripa H e Floripa L foram selecionados para alta e baixa locomoção no centro do TCA, de acordo com o método descrito por Ramos et al. (2003)

Os animais foram desmamados e separados por sexo com 4 semanas de idade e então mantidos em gaiolas de plástico coletivas (4-6 ratos por gaiola) com água e comida ad libitum, sob um ciclo claro-escuro de 12 horas (luzes acesas às 7:00h), a  $22 \pm 2^\circ\text{C}$

Entre 7 e 9 semanas de idade, os animais foram testados no LCE e TCA. Na semana seguinte os mesmos animais foram testados no TNF e TSC. Para cada rato, havia um intervalo de 2 dias entre os testes LCE e TCA e de 3 dias entre TNF e TSC. Antes de serem submetidos ao LCE, os animais nunca haviam sido previamente testados, sendo manipulados apenas para a limpeza e manutenção do biotério. Em função da ausência de diferenças entre linhagens no TSC, aplicado após o TNF nos primeiros experimentos realizados com nossas quatro linhagens, a ordem desses dois modelos foi invertida nos experimentos subseqüentes. Conseqüentemente, esta etapa de experimentos foi dividida em quatro blocos de acordo com as linhagens usadas e a ordem cronológica dos testes: i) LEW e SHR testados no LCE, TCA, TNF e TSC; ii) LEW e SHR testados no LCE, TCA, TSC e TNF; iii) Floripa H e Floripa L (geração S6) testados no LCE, TCA, TNF e TSC; iv) Floripa H e Floripa L (geração S7) testados no LCE, TCA, TSC e TNF.

Foram utilizados 139 ratos LEW e SHR de ambos os sexos, que nunca tinham sido submetidos a nenhum teste, na segunda etapa de experimentos que consistiu na observação do repertório comportamental espontâneo desses animais em suas gaiolas de residência (ver item 4.6).

Finalmente, um total de 60 ratos machos e fêmeas nunca testados anteriormente das linhagens LEW e SHR (n=7-8/sexo/linhagem/tratamento) foram testados no TNF seguindo tratamento farmacológico com droga antidepressiva (ver item 4.7).

Machos e fêmeas foram testados sempre em dias alternados, com todos os testes sendo feitos no período vespertino entre 13:00h e 18:00h. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas da CEUA/UFSC, número de licença 23080.001871/2003-54.

#### ***4.2. Labirinto em cruz elevado***

O aparato, descrito por Ramos et al. (2002), é feito de madeira coberta com fórmica preta e consiste em uma plataforma em cruz elevada a 52 cm do chão. Dois braços em oposição (50 x 10 cm) são fechados por paredes de 40 cm de altura, enquanto que os outros dois braços são abertos, com apenas uma pequena borda (1mm de espessura e 5 mm de altura) ao redor, para evitar uma possível queda dos animais. Os quatro braços apresentam em sua intersecção, uma plataforma central (10 x 13,5 cm) que permite o acesso a qualquer um dos quatro braços. No início de cada teste, o rato era colocado na plataforma central de frente para um dos braços abertos. Os comportamentos foram registrados por 5 minutos por um sistema de vídeo, contendo uma câmera colocada acima do aparato na sala de testes, conectada a um monitor de TV em uma sala adjacente, permitindo a observação e gravação. As variáveis observadas foram: número de entradas nos braços abertos e nos braços fechados (com as quatro patas), o tempo gasto em cada tipo de braço e a porcentagem de entradas nos braços abertos. Ao fim de cada teste, o aparato era limpo utilizando uma esponja úmida e seco com papel toalha.

#### ***4.3. Teste do campo aberto***

O aparato, descrito por Ramos et al. (2002), consiste em uma larga arena de madeira, coberta com fórmica branca e rodeada de paredes com 40 cm de altura. O chão de 100 x 100 cm encontra-se dividido por linhas pretas em 25 quadrados de 20 x 20 cm. A iluminação na sala de teste era de 7 lux medidos no centro do aparato. Cada rato foi colocado no centro do campo aberto por 5 minutos e as variáveis registradas foram: número de quadrados periféricos (adjacentes à parede) percorridos, número de quadrados centrais percorridos, tempo gasto na área central e número total de bolos fecais (defecação). Neste

teste, as variáveis comportamentais foram observadas e registradas pelo mesmo sistema de vídeo utilizado no LCE e a limpeza do aparato seguiu também o mesmo procedimento.

#### ***4.4. Teste de nado forçado***

O procedimento, adaptado de Porsolt et al. (1978), consistiu em colocar o rato duas vezes em um tanque cilíndrico de vidro (40 cm de altura e 18 cm de diâmetro) contendo água limpa mantida entre 24-26 °C a aproximadamente 25 cm da base. No primeiro dia, após 15 minutos de exposição forçada (pré-teste) sem qualquer observação comportamental, o animal era seco com uma toalha e aquecedor e recolocado em sua gaiola de residência. No segundo dia, 24 horas após o pré-teste, o rato era colocado mais uma vez no tanque de água (teste) nas mesmas condições da primeira sessão e o tempo total de imobilidade foi diretamente registrado (com o observador no próprio local do teste), por 5 minutos. O animal foi considerado imóvel somente quando permanecia flutuando ou realizando movimentos para manter a cabeça fora d'água.

#### ***4.5. Teste de suspensão da cauda***

Neste teste, originalmente desenvolvido por Stéru et al. (1985) e posteriormente adaptado por Chermat et al. (1986) para ser utilizado em ratos, o animal é suspenso usando-se uma fita adesiva presa na cauda à uma superfície vertical (a parede de uma bancada). Uma plataforma quadrada feita de compensado era posicionada horizontalmente 20 a 30 cm abaixo da bancada (dependendo do tamanho do animal), logo abaixo das patas dianteiras do rato, de forma que este a tocasse levemente com as pontas das patas para minimizar o peso sustentado pela cauda, evitando possíveis lesões. O tempo de imobilidade durante os 6 minutos de testes era registrado por observação direta. O animal era considerado imóvel quando não se debatia, não realizava torções de corpo ou tentativas de alcançar a fita adesiva.

#### ***4.6. Observação de atividade em gaiolas de residência***

A análise comportamental foi realizada com ratos LEW e SHR, com 7 semanas de idade, mantidos em suas gaiolas de residência (foram observadas 7 a 8 gaiolas/ linhagem/ sexo, cada uma contendo de 4 a 6 animais), as quais eram mantidas em prateleiras no biotério do Laboratório de Genética do Comportamento. O comportamento era então observado e devidamente registrado em fitas VHS através de uma câmera de vídeo

instalada no biotério e posicionada acima das gaiolas a serem analisadas. Durante o período de observação, o biotério foi mantido fechado, sem qualquer interferência externa. As gravações foram feitas duas vezes ao dia em dois períodos diferentes: das 4h às 10h e das 16h às 22h. No período da noite uma lâmpada vermelha de 40W foi instalada para facilitar a observação no interior do biotério, tendo em vista que esse tipo de luz é invisível aos ratos.

As gaiolas foram sempre observadas aos pares, sendo que cada uma destas continha animais de uma linhagem diferente. Para realizar a observação foi utilizado o método conhecido por “scan” para registro comportamental, que consiste em fazer observações instantâneas em intervalos de 5 minutos, de forma que a cada hora eram realizadas 12 observações. Os parâmetros comportamentais observados foram os seguintes: beber, comer, locomover (quando o animal se movia de um local da gaiola para outro), auto-limpeza (quando o rato realizava movimentos de auto-limpeza utilizando as patas dianteiras), coçar, repousar (quando o animal estava dormindo ou sem realizar qualquer tipo de atividade) e interação social (considerou-se interação social quando o rato cheirava, mordida, alisava, lambia ou lutava com outro da gaiola). Todos os dados obtidos foram devidamente anotados em planilhas específicas, nas quais se colocava o número de animais que exibiam qualquer um dos comportamentos acima descritos em cada observação instantânea. Esses resultados foram obtidos através da análise das fitas VHS. As frequências de observações de cada comportamento em cada hora foram somadas, os valores resultantes de cada hora foram divididos pelo número de animais contidos naquela gaiola (gerando assim uma frequência média) e por fim agrupados para formarem blocos de três horas. No total foram formados 4 blocos de 3 horas cada (4-7 h; 7-10 h; 16-19 h; 19-22 h), representando as 12 horas de observação. As frequências de cada medida comportamental foram transformadas em porcentagem através da fórmula:

$$\% \text{ do comportamento para cada bloco de 3h} = \frac{\text{Frequência média do bloco} \times 100}{36}$$

A conversão das frequências em porcentagem para o total de 12 h foi feita com a fórmula :

$$\% \text{ do comportamento para total de 12 h} = \frac{\text{Soma das frequências médias dos 4 blocos} \times 100}{144}$$

#### ***4.7. Imipramina***

Imipramina (Sigma) foi dissolvida em solução salina (NaCl 0,9%) e administrada intraperitonealmente (i.p.) na dose de 15mg/kg, 1 hora antes do teste TNF - tratamento agudo - nos ratos LEW e SHR de ambos os sexos, que tinham sido previamente submetidos ao pré-teste sem tratamento farmacológico. A dose de 15 mg/kg foi escolhida por duas razões: a) realizamos previamente um teste piloto com ratos SHR submetidos a duas doses (15 e 30 mg/kg de imipramina) e observamos uma resposta significativa, porém contrária (aumento do tempo de imobilidade) em animais que receberam a dose de 15 mg/kg; b) eficácia comprovada desta dose na redução do tempo de imobilidade em ratos segundo vários estudos (Lahmame et al., 1997; Barros & Ferigolo, 1998; Bai et al., 2001). O grupo controle (machos e fêmeas das duas linhagens) recebeu solução salina (NaCl 0,9%) 1 ml/kg, i.p. também 1 hora antes do teste.

#### ***4.8. Análise estatística***

Para a primeira e segunda etapas de experimentos, a análise estatística foi feita usando ANOVA de duas vias (sexo e linhagem), seguida do teste post-hoc LSD quando havia interação significativa entre linhagem e sexo. Para o experimento com a imipramina, uma ANOVA de três vias (sexo, linhagem e tratamento) foi utilizada, seguida de teste post-hoc LSD, quando uma interação entre fatores era detectada. Todas as análises estatísticas foram feitas com o software Statistica®. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos. Uma análise de componentes principais (ACP), seguida de rotação ortogonal Varimax a partir da matriz de correlação, foi usada para investigar a correlação entre todos os dados comportamentais obtidos na primeira etapa experimental (modelos animais de ansiedade e depressão) de forma que os fatores isolados fossem independentes uns dos outros. O peso de cada medida comportamental sobre um determinado fator fornece uma estimativa de quanto aquele fator reflete uma variável em particular; portanto, um peso de 1.00 representa uma correlação perfeita (positiva ou negativa) e um peso abaixo de 0.40 sugere que aquele parâmetro particular contribui pouco para aquele fator. Conseqüentemente, apenas os fatores acima de 0.40 foram mostrados.

## **5. Resultados**

### **5.1. Análise comportamental em modelos animais de ansiedade e depressão**

#### **5.1.1. LEW e SHR no LCE, TCA, TNF e TSC**

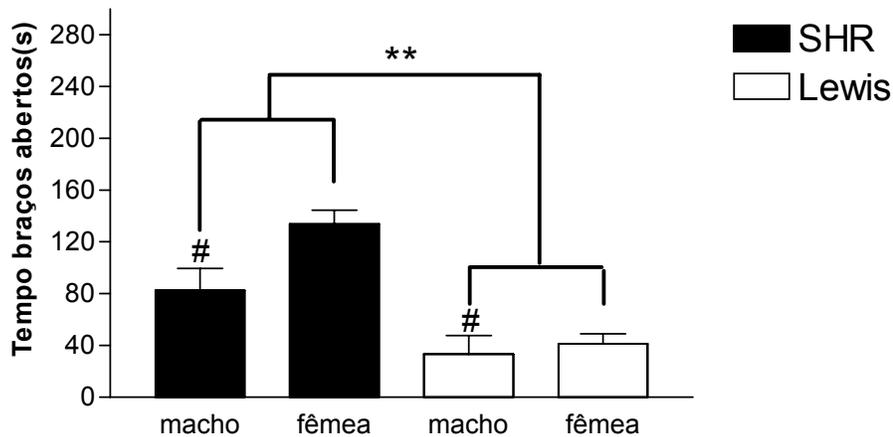
Os resultados obtidos com o primeiro grupo experimental nos modelos animais de ansiedade estão apresentados nas figuras 1 e 2 e na tabela 1. Os parâmetros comportamentais observados no LCE com as linhagens consangüíneas LEW e SHR, mostraram na ANOVA efeitos gerais significativos dos fatores sexo e linhagem, especialmente no número de entradas ( $F=11,79$ ;  $p<0,01$ ;  $F=24,39$ ;  $p<0,01$ ) (tab.1) e no tempo gasto nos braços abertos do aparato (fig.1) ( $F=4,81$ ;  $p<0,05$ ;  $F=27,91$ ;  $p<0,01$ ), onde os ratos da linhagem SHR apresentaram uma maior aproximação nos braços abertos do que os ratos LEW, as fêmeas, índices mais elevados do que os machos. Em outras variáveis observadas, como o tempo gasto nos braços fechados ( $F=54,12$ ;  $p<0,01$ ) e porcentagem de entradas nos braços abertos ( $F=19,56$ ;  $p<0,01$ ) foi detectado efeito geral significativo apenas do fator linhagem, onde observou-se que os ratos LEW gastavam mais tempo nos braços fechados, enquanto que os SHR apresentavam maior porcentagem de entradas nos braços abertos. No número de entradas nos braços fechados não houve efeito significativo nem de linhagem nem de sexo.

No TCA, a locomoção central mostrou na ANOVA efeitos gerais significativos dos fatores linhagem ( $F=37,78$ ;  $p<0,01$ ) e sexo ( $F=17,77$ ;  $p<0,01$ ), onde os animais SHR apresentaram maiores níveis do que os animais LEW e as fêmeas maiores níveis do que os machos (fig.2). Efeitos gerais de linhagem e sexo também foram obtidos na ANOVA para locomoção periférica ( $F=4,91$ ;  $p<0,05$ ;  $F=10,52$ ;  $p<0,01$ ; respectivamente), com LEW apresentando maiores índices em relação a SHR e fêmeas com maiores índices que os machos; e tempo gasto no centro do aparato ( $F=14,44$ ;  $p<0,01$ ;  $F=7,39$ ;  $p<0,05$ ). Neste último parâmetro, os ratos SHR tiveram resultados mais elevados e entre sexos, os maiores índices foram apresentados pelas fêmeas. Na locomoção total foi observada diferença significativa apenas entre sexos ( $F=18,07$ ;  $p<0,01$ ), onde as fêmeas apresentaram maior locomoção. No parâmetro defecação, considerado uma medida de emocionalidade, não houve efeito nem de sexo nem de linhagem.

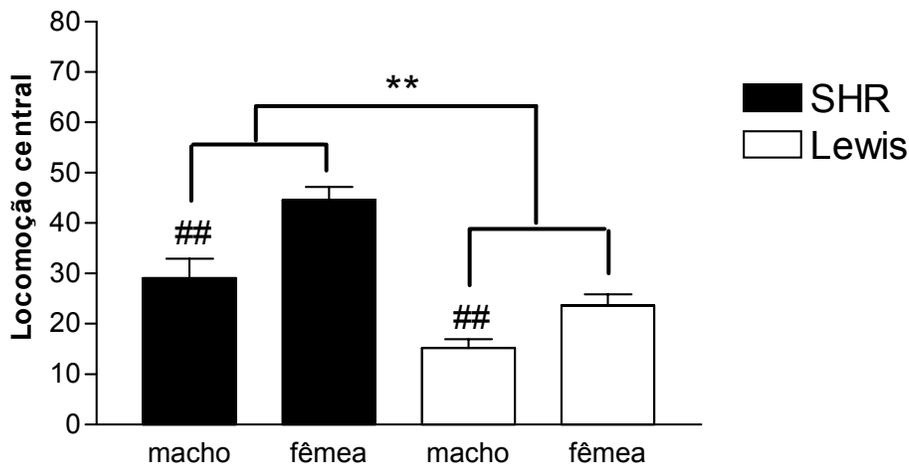
Tabela 1: Medidas comportamentais dos testes LCE e TCA (Médias±EPM) de ratos LEW e SHR de ambos os sexos do 1º. e 2º. grupos experimentais.

Variáveis	Machos		Fêmeas	
1º. grupo (SHR/LEW)	SHR(n=10)	LEW (n=9)	SHR (n=10)	LEW (n=8)
N. entradas braços abertos	###**5,10±0,58	2,77±0,74	8,2±0,49	4,13±0,79
Tempo braços fechados	**87,5±12,8	151,4±10,9	70,2±6,6	154,63±7,8
% entradas braços abertos	**44,29±5,3	25,9±5,4	55,2±2,6	32,02±0,5
N. entradas braços fechados	6,4±0,72	6,2±0,89	6,9±0,75	8±0,46
Locomoção periférica	## *89,9±7,1	112±6,3	119±7,8	127,3±5,3
Locomoção total	## 119±9,5	127,2±6,4	163,7±8,7	151,3±5,7
Tempo no centro	###**47,60±7,22	25±3,56	60,30±4,36	41,75±5,24
Defecação	0,60±0,43	0,22±0,23	0	0
2º. grupo (SHR/LEW)	SHR (n=10)	LEW (n=9)	SHR (n=12)	LEW (n=12)
N. entradas braços abertos	**3,29±0,52	2,40±0,67	4,36±0,55	1,45±0,73
Tempo braços fechados	**140,86±10,75	183±9,2	116,57±8,9	202,7±11,5
% entradas braços abertos	**29,11±3,87	20,01±4,82	34,12±2,8	11,22±4,5
N. entradas braços fechados	6,86±0,62	7,5±0,97	7,86±0,47	5,91±0,93
Locomoção periférica	**89,07±6,12	118,5±4,7	97,9±4,9	127±8,3
Locomoção total	#118,36±8,18	135,2±6,05	137,43±7,6	150,5±7,43
Tempo no centro	**47,86±4,3	29,8±3,52	53,35±3,6	36,36±5,33
Defecação	#0,29±0,28	1,0±0,49	0	0

Diferenças significativas entre linhagens são representadas por \* e \*\* (ANOVA,  $p<0,05$  e  $p<0,01$ ) e diferenças entre sexos são representadas por # e ## (ANOVA,  $p<0,05$  e  $p<0,01$ ).



**Figura 1 :** Tempo nos braços abertos no LCE para ratos machos e fêmeas das linhagens LEW e SHR. ("n" para todos os grupos estão mostrados na tabela 1). Histograma representa as médias e EPM dos animais agrupados por linhagem e sexo. Diferenças significativas entre linhagens estão representadas por \*\* (ANOVA,  $p < 0,01$ ). Diferenças significativas entre sexos estão representadas por # (ANOVA,  $p < 0,05$ )



**Figura 2 :** Locomoção central no TCA para ratos machos e fêmeas das linhagens LEW e SHR. ("n" para todos os grupos estão mostrados na tabela 1). Histograma representa as médias e EPM dos animais agrupados por linhagem e sexo. Diferenças significativas entre linhagens estão representadas por \*\* (ANOVA,  $p < 0,01$ ). Diferenças significativas entre sexos estão representadas por ## (ANOVA,  $p < 0,01$ ).

Nos modelos animais preditivos de atividade antidepressiva foram obtidos resultados significativos no TNF, onde uma interação entre linhagem e sexo foi identificada ( $F=15,99$ ;  $p < 0,01$ ). O teste *post-hoc* revelou efeito de linhagem apenas em machos (LEW > SHR;  $p < 0,01$ ) e efeito de sexo apenas em LEW (machos > fêmeas;  $p < 0,01$ ) para o tempo

de imobilidade (fig.3). Entretanto, verificou-se que o TSC não revelou diferenças comportamentais entre os grupos (fig.4).

Em resumo, foi possível observar que machos da linhagem LEW, que exibiram comportamento semelhante à ansiedade no LCE e TCA, também demonstraram comportamento semelhante à depressão no TNF neste 1º. grupo experimental.

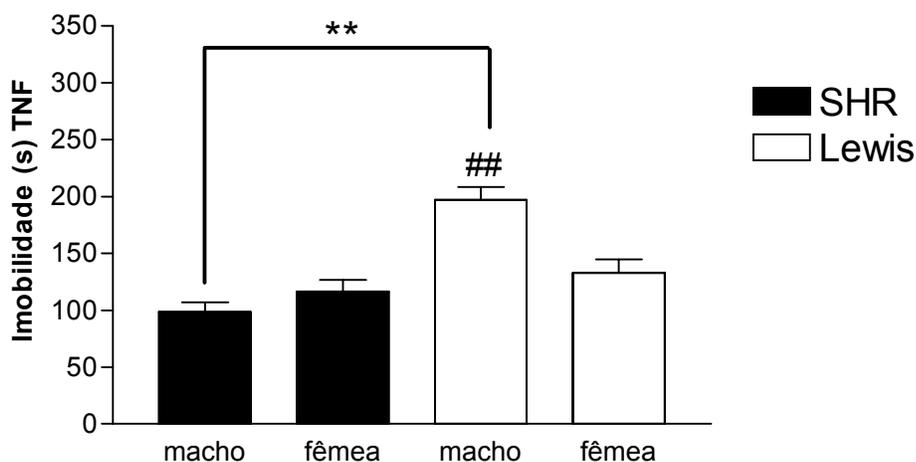


Figura 3 : Tempo de imobilidade no TNF para ratos machos e fêmeas das linhagens LEW e SHR. ("n" para todos os grupos são os mesmos mostrados na tabela 1). Histograma representa as médias e EPM dos animais agrupados por linhagem e sexo. Diferenças significativas entre linhagens para ratos machos estão representadas por \*\* (LSD,  $p < 0,01$ ). Diferenças significativas entre sexos para ratos LEW estão representadas por ## (LSD,  $p < 0,01$ ).

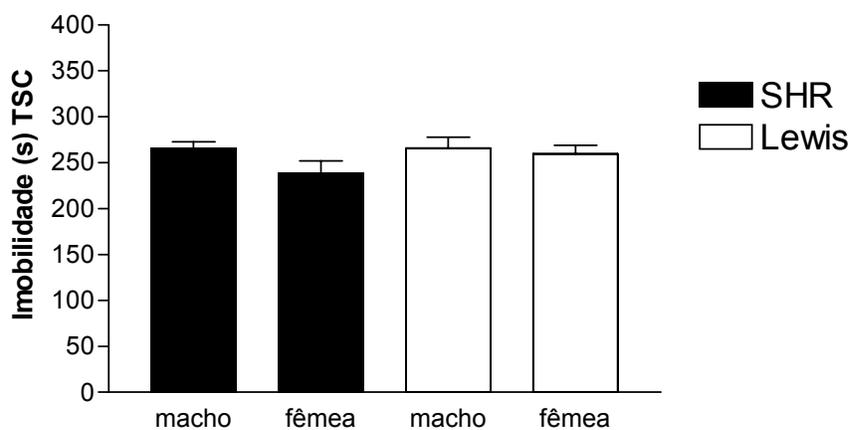


Figura 4 : Tempo de imobilidade no TSC para ratos machos e fêmeas das linhagens LEW e SHR. ("n" para todos os grupos são os mesmos mostrados na tabela 1). Histograma representa as médias e EPM dos animais agrupados por linhagem e sexo. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos.

### **5.1.2. LEW e SHR no LCE, TCA, TSC e TNF**

Os resultados do 2º grupo experimental estão mostrados nas figuras 5-8 e na tabela 1. O LCE revelou efeito geral de linhagem nos seguintes parâmetros comportamentais: tempo gasto nos braços abertos ( $F=19,76$ ;  $p<0,01$ ) (fig.5); número de entradas nos braços abertos ( $F=9,52$ ;  $p<0,01$ ) e porcentagem de entradas nos braços abertos ( $F=16,31$ ;  $p<0,01$ ), onde foi observado que os ratos pertencentes à linhagem SHR apresentaram índices mais altos em relação aos ratos LEW. A variável tempo gasto nos braços fechados revelou interação entre linhagem e sexo ( $F=4,51$ ;  $p<0,05$ ), onde a análise post-hoc mostrou que os ratos LEW tanto machos quanto fêmeas gastavam mais tempo nesse tipo de braço do que os ratos SHR ( $p<0,01$ ). O número de entradas nos braços fechados que não denotou nenhuma diferença entre os grupos.

No TCA, a ANOVA revelou efeitos gerais de linhagem apenas nas variáveis: tempo gasto no centro ( $F=16,63$ ;  $p<0,01$ ), onde os ratos SHR mostraram valores mais altos e locomoção periférica ( $F=22,24$ ;  $p<0,01$ ), onde os ratos LEW exibiram níveis mais elevados em relação à outra linhagem. Observaram-se efeitos do fator sexo em duas variáveis: locomoção total ( $F=4,98$ ;  $p<0,05$ ), onde as fêmeas se locomoveram mais; e defecação ( $F=6,04$ ;  $p<0,05$ ), onde os machos tiveram índices mais elevados. Foram vistas ainda diferenças entre linhagens ( $F=21,08$ ;  $p<0,01$ ; SHR > LEW); e sexo ( $F=7,55$ ;  $p<0,01$ ; fêmeas > machos) na variável locomoção central (fig.6).

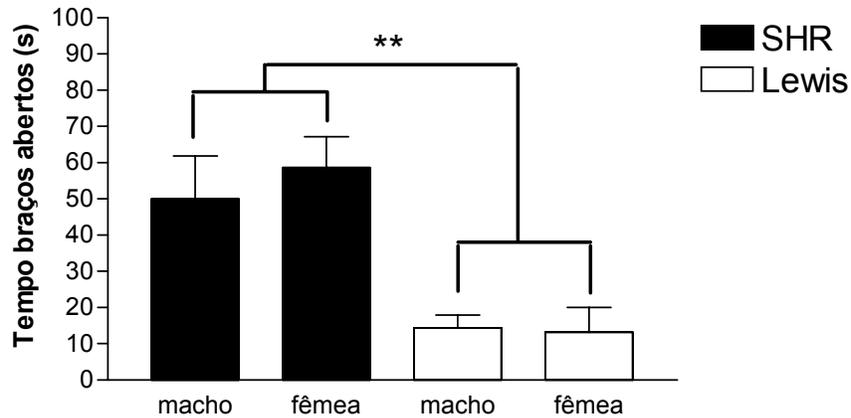


Figura 5: Tempo nos braços abertos no LCE para ratos machos e fêmeas das linhagens LEW e SHR. ("n" para todos os grupos estão mostrados na tabela 2). Histograma representa as médias e EPM dos animais agrupados por linhagem e sexo. Diferenças significativas entre linhagens estão representadas por \*\* (ANOVA,  $p < 0,01$ ).

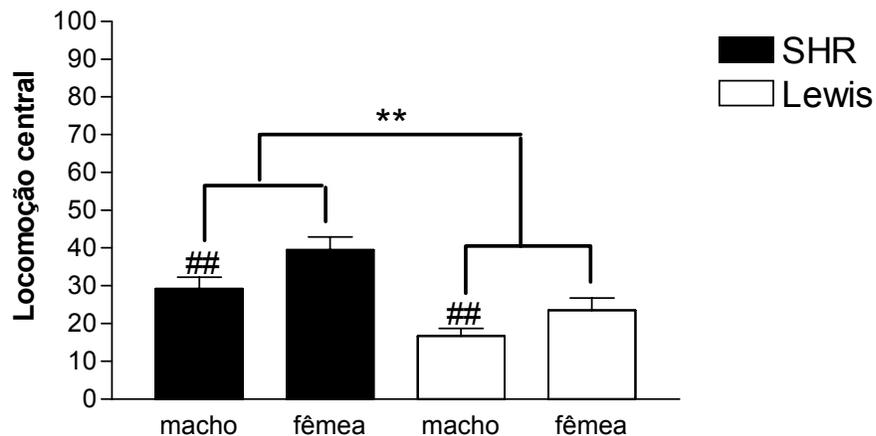


Figura 6: Locomoção central no TCA para ratos machos e fêmeas das linhagens LEW e SHR. ("n" para todos os grupos estão mostrados na tabela 2). Histograma representa as médias e EPM dos animais agrupados por linhagem e sexo. Diferenças significativas entre linhagens estão representadas por \*\* (ANOVA,  $p < 0,01$ ). Diferenças significativas entre sexos estão representadas por ## (ANOVA,  $p < 0,01$ ).

Nos modelos animais de depressão, o TSC mostrou efeito significativo apenas para o fator sexo ( $F = 15,73$ ;  $p < 0,01$ ), onde os machos se apresentaram mais tempo imóveis do que as fêmeas (fig.7). Por outro lado, o TNF revelou interação entre linhagem e sexo ( $F = 11,62$ ;  $p < 0,01$ ), onde os ratos LEW passaram mais tempo imóveis do que os ratos SHR

( $p < 0,01$ ) para ambos os sexos mas as diferenças entre sexos ocorreram apenas nos ratos LEW (machos > fêmeas;  $p < 0,01$ ) (fig.8).

Em resumo, neste grupo assim como no 1<sup>o</sup>, os animais da linhagem LEW, tanto machos quanto fêmeas, exibiram comportamento semelhante à ansiedade nos testes do LCE e TCA e passaram mais tempo imóveis em relação aos SHR no modelo animal de depressão do TNF.

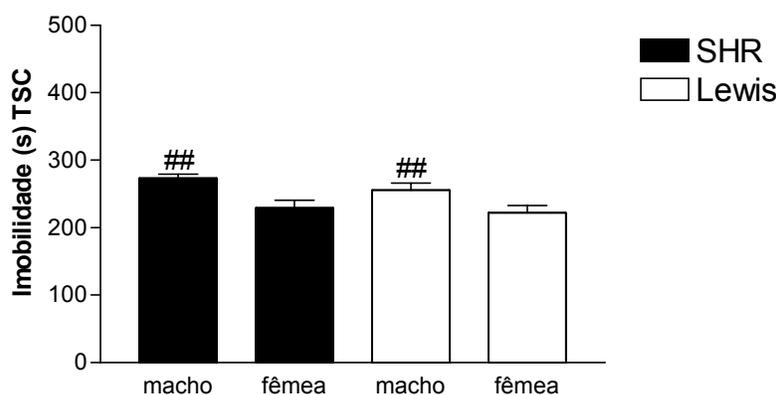


Figura 7: Tempo de imobilidade no TSC para ratos machos e fêmeas das linhagens LEW e SHR. ("n" para todos os grupos são os mesmos mostrados na tabela 2). Histograma representa as médias e EPM dos animais agrupados por linhagem e sexo. Diferenças significativas entre os sexos estão representadas por ## (ANOVA  $p < 0,01$ ).

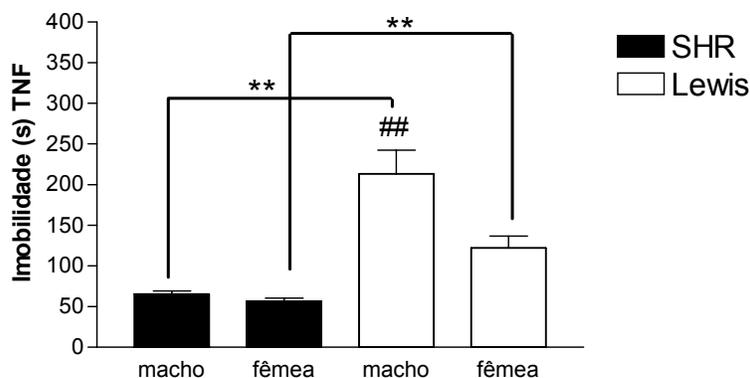


Figura 8 : Tempo de imobilidade no TNF para ratos machos e fêmeas das linhagens LEW e SHR. ("n" para todos os grupos são os mesmos mostrados na tabela 2). Histograma representa as médias e EPM dos animais agrupados por linhagem e sexo. Diferenças significativas entre linhagens estão representadas por \*\* (ANOVA  $p < 0,01$ ). Diferenças significativas entre sexos estão representadas por ## (ANOVA  $p < 0,01$ ).

### 5.1.3. Floripa H e Floripa L (S6) no LCE, TCA, TNF e TSC

Os resultados obtidos com o terceiro grupo experimental estão mostrados nas figuras 9-12 e na tabela 2. No LCE, foram observados efeitos gerais de linhagem no número de entradas nos braços fechados ( $F=10,99$ ;  $p<0,01$ ), onde os animais Floripa H mostraram maiores índices; e na porcentagem de entradas nos braços abertos ( $F=7,54$ ;  $p<0,05$ ) onde os ratos Floripa L tiveram índices mais altos. O número de entradas nos braços abertos ( $F=6,29$ ;  $p<0,05$ ) revelou um efeito geral de sexo, onde as fêmeas exibiram maior frequência que os machos. Não foram encontradas diferenças entre os grupos no tempo gasto nos braços abertos (fig.9).

No TCA, as cinco variáveis avaliadas demonstraram efeito geral de linhagem: para locomoção central ( $F=17,41$ ;  $p<0,01$ ) (fig.10); locomoção total ( $F=15,94$ ;  $p<0,01$ ); locomoção periférica ( $F=7,72$ ;  $p<0,05$ ) e tempo gasto no centro ( $F=16,54$ ;  $p<0,01$ ) os ratos Floripa H apresentaram índices mais elevados. No parâmetro “defecação”, também houve efeito de linhagem ( $F=21,07$ ;  $p<0,01$ ), mas aqui os animais Floripa L exibiram os resultados mais elevados.

Tabela 2: Medidas comportamentais dos testes LCE e TCA (Médias±EPM) de ratos Floripa H e L de ambos os sexos dos 3º. e 4º. grupos experimentais.

Variáveis	Machos		Fêmeas	
3º. grupo (Floripa H/L)	Floripa H(n=10)	Floripa L (n=9)	Floripa H (n=11)	Floripa L (n=8)
N. entradas braços abertos	2,90±0,71	2,88±0,54	4,27±0,66	4,87±0,72
Tempo braços fechados	149,6±17,3	167,55±21,38	126,36±9,16	157,1
% entradas braços abertos	25,35±6,2	36,63±4,96	30,8±2,9	46,03±4,76
N. entradas braços fechados	8,1±0,85	5,44±1,09	9±0,65	5,87±0,89
Locomoção periférica	82,8±7,27	57±6,9	90,18±5,54	73,37±11,3
Locomoção total	104,5±8,28	66,89±7,6	109,55±6,1	83±10,5
Tempo no centro	50,2±9,3	17,56±4,32	41±7,07	15,63±5,3
Defecação	1,2±0,63	3±0,71	0,09±0,09	2,88±0,35
4º. grupo (Floripa H/L)	Floripa H (n=10)	Floripa L(n=9)	Floripa H (n=12)	Floripa L (n=12)
N. entradas braços abertos	##2±0,47	2,1±0,57	5,66±0,92	2,08±0,66
Tempo braços fechados	*152,67±10,31	169,3±9,65	126,25±11,5	165,7±9,57
% entradas braços abertos	#20,7±5,02	21,19±4,56	36,17±4,2	17,64±4,8
N. entradas braços fechados	7,22±1,13	7±1,01	10,08±0,97	7±0,49
Locomoção periférica	**92±2,89	86,6±6,93	103,3±4,25	81,75±4,71
Locomoção total	#103,7±3,08	97,6±6,74	121,6±5,74	88,1±5,59
Tempo no centro	18,1±3,97	21,4±4,26	27,5±3,63	12,17±2,45
Defecação	1,55±0,44	1,1±0,5	0,33±0,32	1,08±0,56

Diferenças gerais entre linhagens encontradas no tempo nos braços fechados do LCE e na locomoção periférica do TCA são representados por \* e \*\* (ANOVA,  $p<0,05$  e  $p<0,01$ ). Diferenças específicas entre linhagens encontradas apenas em fêmeas estão

descritas no texto (ver item 5.1.4). Diferenças específicas entre sexos encontradas apenas em Floripa H estão representadas por # e ## (LSD,  $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ ).

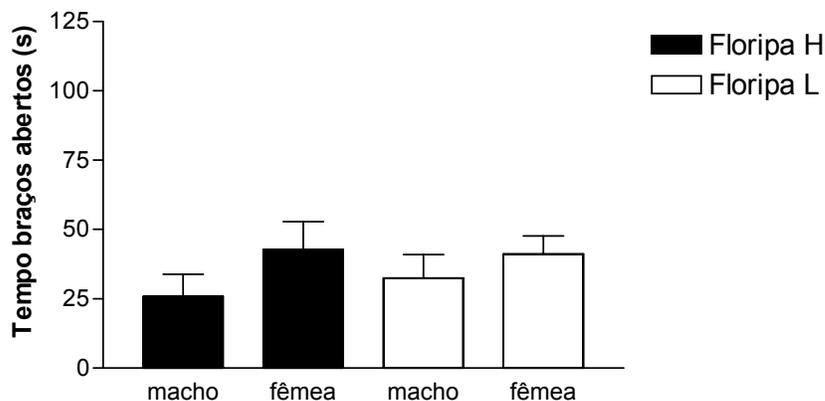


Figura 9 : Tempo nos braços abertos no LCE para ratos machos e fêmeas das linhagens Floripa H e Floripa L ("n" para todos os grupos estão mostrados na tabela 3). Histograma representa as médias e EPM dos animais agrupados por linhagem e sexo. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos

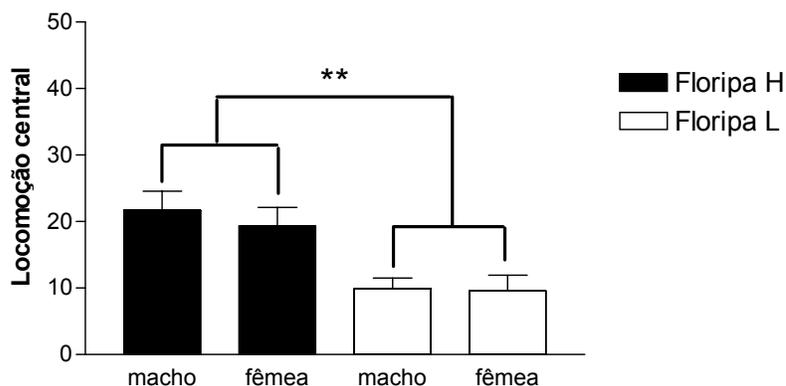


Figura 10 : Locomoção central no TCA para ratos machos e fêmeas das linhagens Floripa H e Floripa L ("n" para todos os grupos estão mostrados na tabela 3). Histograma representa as médias e EPM dos animais agrupados por linhagem e sexo. Diferenças significativas entre linhagens estão representadas por \*\* (ANOVA  $p < 0,01$ ).

Analisando os dados dos modelos animais de depressão, o efeito linhagem esteve presente na variável tempo de imobilidade no TNF ( $F=16,64$ ;  $p < 0,01$ ), com a linhagem Floripa L permanecendo mais tempo imóvel do que a Floripa H (fig.11). Por sua vez, o

tempo de imobilidade no TSC teve apenas efeito de sexo ( $F=8,41$ ;  $p<0,05$ ), onde observou-se que as fêmeas apresentavam maiores índices em relação aos machos (fig.12).

Em resumo, as diferenças entre Floripa H e L foram ao contrário do esperado, no LCE, onde em algumas variáveis, os animais Floripa L apresentaram índices mais elevados em relação à outra linhagem, em parâmetros clássicos de ansiedade. Entretanto, no TCA as diferenças entre linhagens estiveram de acordo com os resultados previamente publicados, especialmente na variável locomoção central. Nos modelos animais de depressão, novamente o TNF revelou diferenças entre linhagens, o que está de acordo com os resultados dos grupos experimentais com as linhagens consanguíneas LEW e SHR, da mesma forma que a ausência de diferenças entre linhagens no TSC.

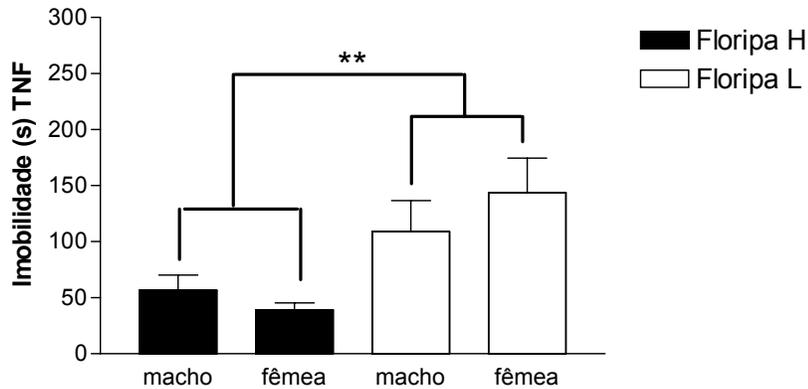


Figura 11 : Tempo de imobilidade no TNF para ratos machos e fêmeas das linhagens Floripa H e Floripa L ("n" para todos os grupos são os mesmos mostrados na tabela 3). Histograma representa as médias e EPM dos animais agrupados por linhagem e sexo. Diferenças significativas entre linhagens estão representadas por \*\* (ANOVA,  $p < 0,01$ ).

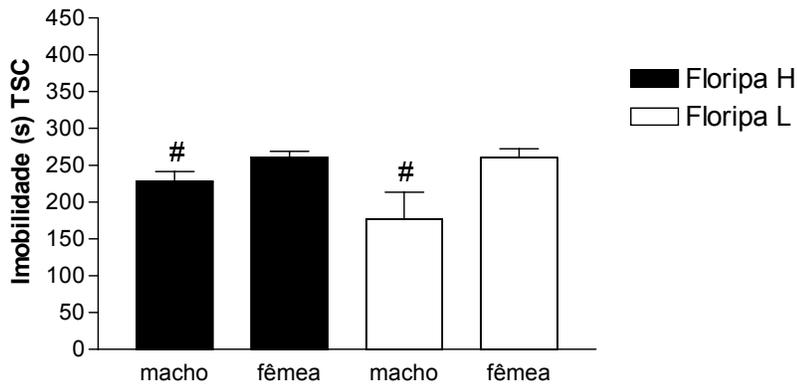


Figura 12 : Tempo de imobilidade no TSC para ratos machos e fêmeas das linhagens Floripa H e Floripa L ("n" para todos os grupos são os mesmos mostrados na tabela 3). Histograma representa as médias e EPM dos animais agrupados por linhagem e sexo. Diferenças significativas entre sexos estão representadas por # (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

#### 5.1.4. Floripa H e Floripa L (S7) no LCE, TCA, TSC e TNF

Os resultados do quarto grupo experimental estão mostrados nas figuras 13-16 e na tabela 2. No LCE, houve interação linhagem/sexo, para o tempo gasto nos braços abertos ( $F=8,28$ ;  $p < 0,01$ ) (fig.13) com diferenças entre linhagens aparecendo apenas em fêmeas (Floripa H > Floripa L;  $p < 0,01$ ) e diferenças entre sexos somente em Floripa H (fêmeas > machos;  $p < 0,01$ ); número de entradas nos braços abertos ( $F=6,53$ ;  $p < 0,05$ ), onde as diferenças entre linhagens novamente foram observadas somente entre fêmeas (Floripa H > Floripa L;  $p < 0,01$ ) e entre sexos somente em Floripa H (fêmeas > machos;  $p < 0,01$ ); porcentagem de entradas nos braços abertos ( $F=4,11$ ;  $p < 0,05$ ), com as diferenças vistas nos

parâmetros anteriores se repetindo neste (Floripa H > Floripa L, em fêmeas  $p < 0,01$ ) e (fêmeas > machos, em Floripa H;  $p < 0,05$ ). A variável tempo gasto nos braços fechados mostrou efeito geral de linhagem ( $F=7,11$ ;  $p < 0,05$ ), onde os ratos Floripa L tiveram mais altos resultados em relação à outra linhagem. Não foram encontradas diferenças entre os grupos no parâmetro número de entradas nos braços fechados.

Foram encontradas interações entre linhagem e sexo nas seguintes variáveis do TCA: locomoção central ( $F=7,58$ ;  $p < 0,05$ ) onde o teste post-hoc revelou diferença entre linhagens somente em fêmeas (Floripa H > Floripa L;  $p < 0,01$ ) (fig. 14) e diferença entre sexos somente em Floripa H (fêmeas > machos;  $p < 0,05$ ); locomoção total ( $F=5,86$ ;  $p < 0,05$ ), onde diferença entre linhagens foi evidenciada somente em fêmeas (Floripa H > Floripa L;  $p < 0,01$ ) e diferenças entre sexos apenas na linhagem Floripa H (fêmeas > machos;  $p < 0,01$ ); tempo gasto no centro ( $F=6,75$ ;  $p < 0,05$ ) onde novamente diferença entre linhagens foi vista apenas nas fêmeas (Floripa H > Floripa L;  $p < 0,01$ ), entretanto não houve diferença entre sexos. O parâmetro locomoção periférica apresentou efeito de linhagem ( $F=7,39$ ;  $p < 0,01$ ), onde os animais da linhagem Floripa H exibiram índices mais elevados. A variável defecação não revelou qualquer diferença entre os grupos.

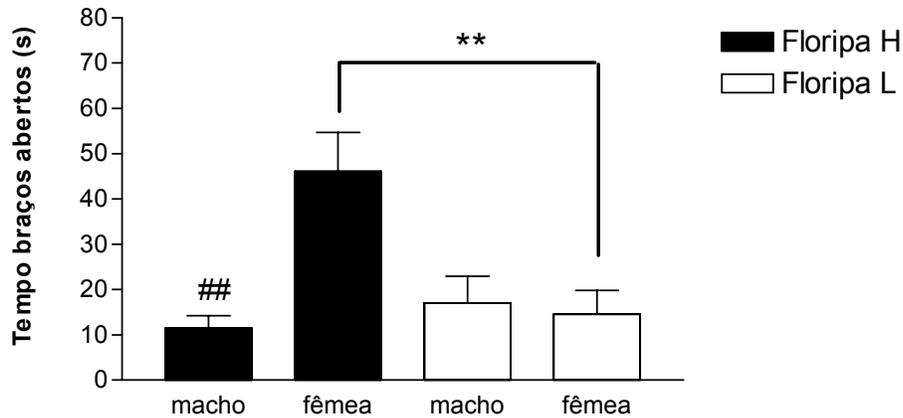


Figura 13: Tempo nos braços abertos no LCE para ratos machos e fêmeas das linhagens Floripa H e Floripa L ("n" para todos os grupos estão mostrados na tabela 4). Histograma representa as médias e EPM dos animais agrupados por linhagem e sexo. Diferenças significativas entre linhagens para ratos fêmeas estão representados por \*\* (LSD,  $p < 0,01$ ). Diferenças significativas entre sexos para ratos Floripa H estão representados por ## (LSD,  $p < 0,01$ ).

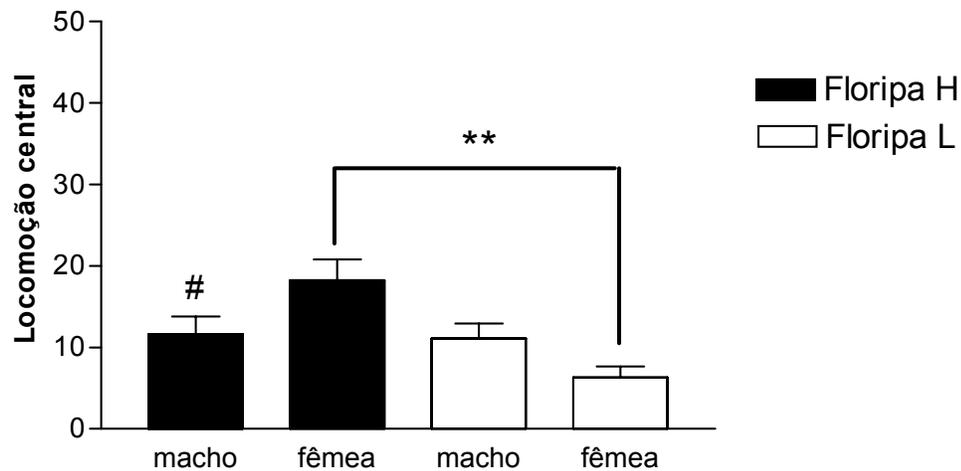


Figura 14: Locomoção central no TCA para ratos machos e fêmeas das linhagens Floripa H e Floripa L ("n" para todos os grupos estão mostrados na tabela 4). Histograma representa as médias e EPM dos animais agrupados por linhagem e sexo. Diferenças significativas entre linhagens para ratos fêmeas estão representados por \*\* (LSD,  $p < 0,01$ ). Diferenças significativas entre sexos para ratos Floripa H estão representados por # (LSD,  $p < 0,05$ ).

Nos modelos experimentais de depressão, o TSC não revelou qualquer efeito significativo (fig.15). Entretanto, a variável tempo de imobilidade do TNF mostrou efeito geral de linhagem ( $F=4,63$ ;  $p < 0,05$ ; Floripa L > Floripa H) e de sexo ( $F=21,92$ ;  $p < 0,01$ ), com machos permanecendo mais imóveis do que as fêmeas (fig.16).

Em resumo, neste grupo experimental, foram encontradas diferenças significativas entre linhagens para algumas variáveis dos modelos animais de ansiedade e novamente o TNF revela diferenças entre os grupos, mantendo o padrão visto anteriormente nos outros grupos experimentais: animais mais “ansiosos” são também mais “depressivos”.

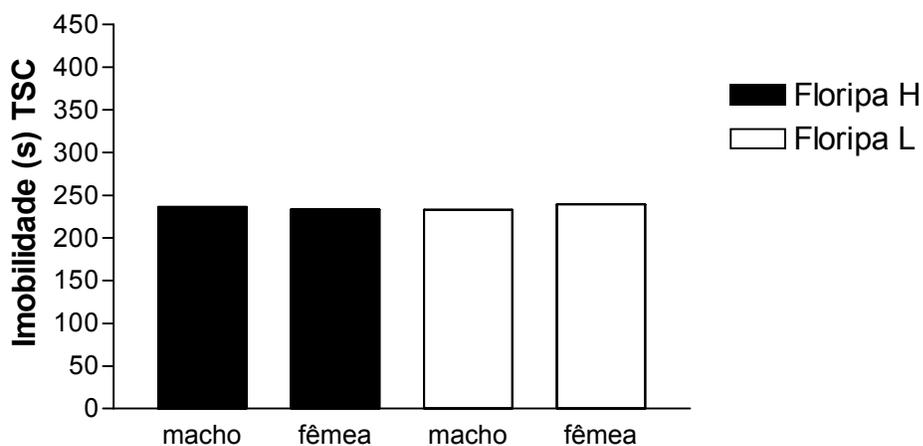


Figura 15: Tempo de imobilidade no TSC para ratos machos e fêmeas das linhagens Floripa H e Floripa L ("n" para todos os grupos são os mesmos mostrados na tabela 4). Histograma representa as médias e EPM dos animais agrupados por linhagem e sexo. Não foram encontradas diferenças entre os grupos.

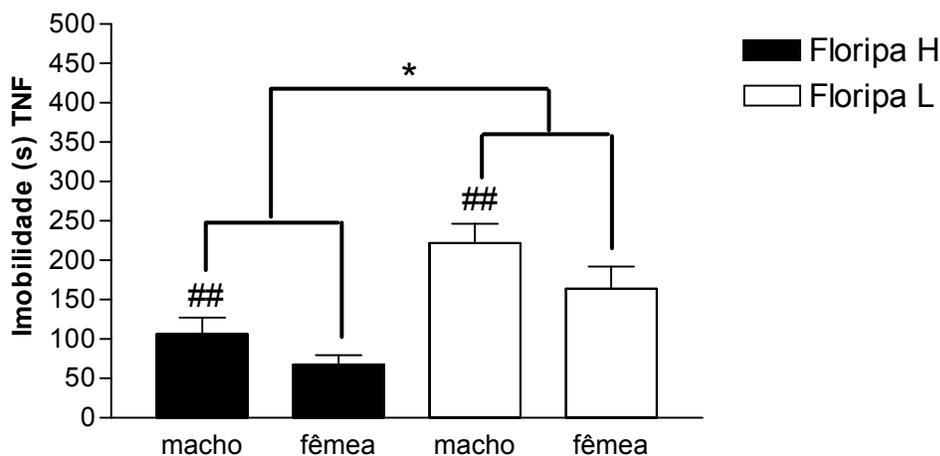


Figura 16: Tempo de imobilidade no TNF para ratos machos e fêmeas das linhagens Floripa H e Floripa L ("n" para todos os grupos são os mesmos mostrados na tabela 4). Histograma representa as médias e EPM dos animais agrupados por linhagem e sexo. Diferenças significativas entre linhagens estão representadas por \* (ANOVA,  $p < 0,05$ ). Diferenças significativas entre sexos estão representadas por ## (ANOVA,  $p < 0,01$ ).

## ***5.2. Análise de componentes principais***

As correlações obtidas entre as diferentes medidas comportamentais estão apresentadas na matriz de correlação da tabela 5. A ACP, após rotação Varimax, gerou quatro fatores com “*eigenvalues*” superiores a 1 e estes foram responsáveis por 74,5% da variância total dos dados (tabela 6). Cada índice comportamental se apresentou associado a um ou mais dos quatro fatores (tabela 6). O fator 1 está fortemente relacionado às principais medidas de ansiedade do LCE (tempo nos braços fechados, tempo e número de entradas nos braços abertos e % de entradas nos braços abertos). Por sua vez, o fator 2 está relacionado positivamente às medidas de locomoção (central, periférica e total) e negativamente à defecação do TCA. O tempo de imobilidade no TNF é negativamente relacionado ao fator 3, que recebe pesos positivos da locomoção e do tempo no centro do TCA. O fator 4 apresentou associação negativa com o número de entradas nos braços fechados do LCE e positiva com o tempo de imobilidade no TSC. As medidas foram obtidas dos quatro testes comportamentais aos quais os animais das quatro linhagens e de ambos os sexos foram submetidos: tempo nos braços fechados, tempo nos braços abertos, número de entradas nos braços abertos, porcentagem de entradas nos braços abertos, número de entradas nos braços fechados (LCE); locomoção central, locomoção periférica, locomoção total, tempo gasto no centro, defecação (TCA), tempo de imobilidade para TNF e TSC.

Uma segunda análise estatística multifatorial foi realizada, utilizando apenas uma variável relacionada com atividade locomotora e uma relacionada com comportamento semelhante à ansiedade dos testes LCE e TCA, além do parâmetro defecação, com o objetivo de evitar que certas correlações fossem superestimadas em função do elevado número de variáveis dos modelos animais de ansiedade na primeira ACP. Desta forma, a segunda ACP, gerou três fatores com “*eigenvalues*” superiores a 1, sendo estes responsáveis por 62,95% da variância total (tabela 7). O fator 1 correlacionou positivamente as duas variáveis que medem atividade locomotora dos dois modelos animais de ansiedade aplicados neste estudo, entradas nos braços fechados dos LCE e locomoção periférica do TCA. Estas variáveis por sua vez correlacionaram-se negativamente com a defecação. O fator 2 apresentou associação negativa entre as duas variáveis de comportamento semelhante à ansiedade, tempo gasto nos braços abertos do LCE e

locomoção central do TCA com o tempo de imobilidade do TNF. Por fim, o fator 3 apresentou associação apenas com o tempo de imobilidade do TSC.

**Tabela 5: Matriz de correlação das 12 medidas obtidas nos quatro testes comportamentais**

	T. fech.	T. ab.	E. fech.	E. ab.	%E. ab.	Loc cent.	Loc. tot.	Loc. per.	T. cent.	Defec .	Im. TNF	Im. TSC
T. fech.	1	-0,77	-0,37	-0,72	-0,58	-0,39	-0,17	-0,03	-0,36	0,24	0,18	-0,11
T. ab.		1	0,08	0,8	0,76	0,46	0,23	0,06	0,33	-0,19	-0,16	0,12
E. fech.			1	0,37	-0,02	0,16	0,27	0,27	0,15	-0,22	-0,16	-0,07
E. ab.				1	0,83	0,36	0,2	0,09	0,28	-0,15	-0,2	0,09
%E. ab.					1	0,25	-0,02	-0,13	0,19	0,04	-0,19	0,16
Loc cent.						1	0,64	0,29	0,79	-0,32	-0,27	-0,05
Loc. Tot.							1	0,89	0,37	-0,39	-0,07	-0,01
Loc. Per.								1	0,05	-0,34	0,04	-0,01
T.cent.									1	-0,32	-0,3	-0,01
Defec										1	0,07	-0,15
Im. TNF											1	0,07
Im. TSC												1

**Tabela 6 : Fatores ortogonais para as medidas obtidas nos modelos animais de ansiedade e depressão das linhagens LEW, SHR, Floripa H e Floripa L.**

	Fator 1	Fator 2	Fator 3	Fator 4
Tempo braços fechados	-0,83			
Tempo braços abertos	0,87			
Entr. braços fechados				-0,66
Entr. braços abertos	0,93			
%Ent. Braços abertos	0,87			
Locomoção central		0,43	0,77	
Locomoção total		0,90		
Locomoção perif.		0,91		
Tempo no centro			0,86	
Defecação		-0,58		
Imobilidade TNF			-0,55	
Imobilidade TSC				0,71
Eigenvalues	4,195	2,330	1,293	1,121
%Total variância	34,96	19,42	10,78	9,35

*\*Somente pesos ("factor loadings") acima de 0,40 estão mostrados*

**Tabela 7:** Fatores ortogonais para 7 medidas obtidas nos modelos animais de ansiedade e depressão das linhagens LEW, SHR, Floripa H e Floripa L.

	<b>Fator 1</b>	<b>Fator 2</b>	<b>Fator 3</b>
<b>Tempo aberto</b>		-0,77	
<b>Entr. fechado</b>	0,61		
<b>Loc. Central</b>		-0,73	
<b>Loc. Periférica</b>	0,82		
<b>Defecação</b>	-0,67		
<b>Imob. TNF</b>		0,65	
<b>Imob.TSC</b>			0,84
<b>Eigenvalues</b>	2,068	1,188	1,149
<b>% V. Total</b>	29,55	16,98	16,41

*\*Somente pesos (“factor loadings”) acima de 0,40 estão mostrados*

### **5.3. Análise de atividade espontânea em gaiolas de residência**

Os resultados obtidos com a análise do comportamento espontâneo em gaiolas de residência dos ratos LEW e SHR estão representados nas figuras 17 a 24.

No comportamento “beber” foi encontrado efeito geral de linhagem somente no 2º bloco (das 7:00h às 10:00h), ( $F=13,81$ ;  $p<0,01$ ), onde foi visto que os ratos SHR tiveram maior porcentagem deste comportamento do que os ratos LEW. Nos outros blocos não foram encontradas quaisquer diferenças (fig.17).

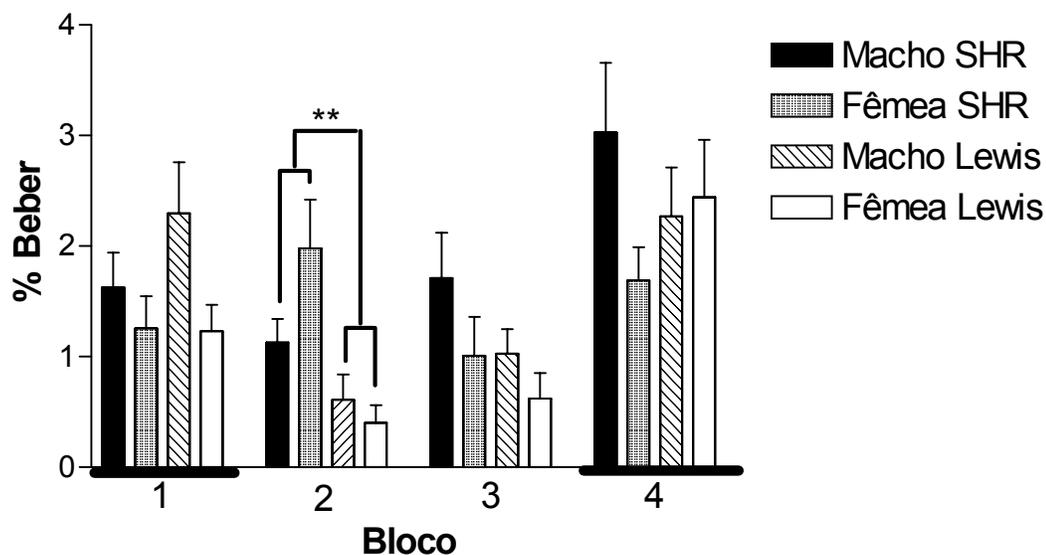


Figura 17: Porcentagem média do comportamento "beber" para ratos machos e fêmeas das linhagens LEW e SHR. ("n" de 7-8 gaiolas por grupo contendo 4-6 animais cada). Período de 12 horas dividido em 4 blocos de 3 horas cada (1° bloco - 4h às 7h; 2° bloco - 7h às 10h; 3° bloco - 16h às 19h; 4° bloco - 19h às 22h). 1° e 4° blocos correspondem ao período noturno (indicado com barra escura); 2° e 3° blocos correspondem ao período diurno. Efeito geral de linhagem está representado por \*\* (ANOVA  $p < 0,01$ ).

No parâmetro "comer", o efeito geral de linhagem esteve presente no 2° bloco ( $F=6,68$ ;  $p < 0,05$ ) e no 4° (das 19:00h às 22:00h) ( $F=8,56$ ;  $p < 0,01$ ) (fig.18), com SHR comendo mais no 2° bloco e menos no 4°.

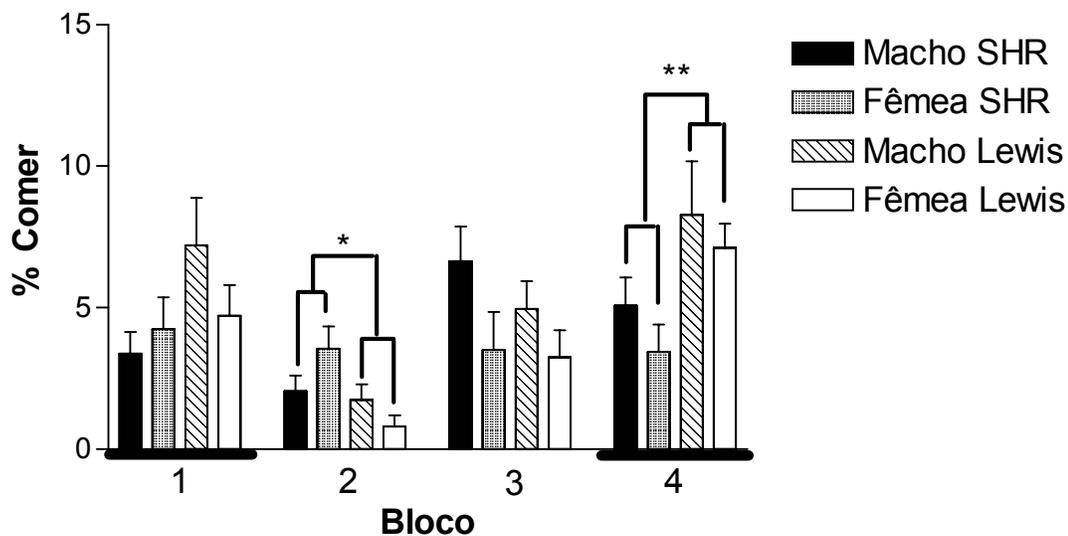


Figura 18: Porcentagem média do comportamento "comer" para ratos machos e fêmeas das linhagens LEW e SHR. ("n" de 7-8 gaiolas por grupo contendo 4-6 animais cada). Período de 12 horas dividido em 4 blocos de 3 horas cada (1° bloco - 4h às 7h; 2° bloco - 7h às 10h; 3° bloco - 16h às 19h; 4° bloco - 19h às 22h). 1° e 4° blocos correspondem ao período noturno (indicado com barra escura); 2° e 3° blocos correspondem ao período diurno. Efeito geral de linhagem está representado por \* e \*\* (ANOVA  $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ ).

Não foi encontrado qualquer efeito estatístico no comportamento "locomção" entre os grupos estudados (fig.19), apenas uma tendência não significativa ( $p > 0,05$ ) de efeito geral de linhagem (SHR locomovendo um pouco mais). Foi observado que frequência na exibição deste comportamento apresentava tendência a aumentar nos períodos escuros, como esperado, principalmente na linhagem LEW.

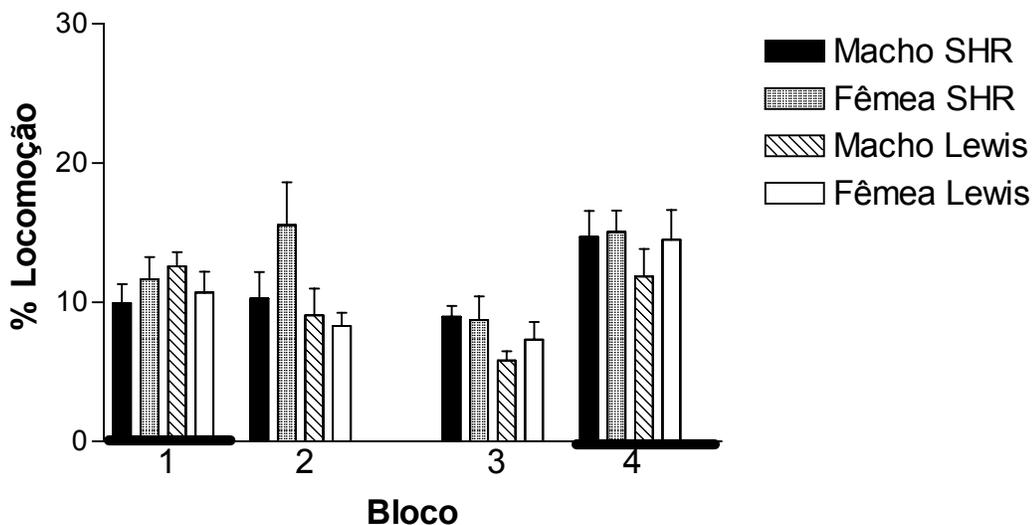


Figura 19: Porcentagem média do comportamento "locomoção" para ratos machos e fêmeas das linhagens LEW e SHR. ("n" de 7-8 gaiolas por grupo contendo 4-6 animais cada). Período de 12 horas dividido em 4 blocos de 3 horas cada (1° bloco - 4h às 7h; 2° bloco - 7h às 10h; 3° bloco - 16h às 19h; 4° bloco - 19h às 22h). 1° e 4° blocos correspondem ao período noturno (indicado com barra escura); 2° e 3° blocos correspondem ao período diurno. Não foram encontradas diferenças entre os grupos.

No parâmetro comportamental "auto-limpeza" (*grooming*), foi encontrada interação entre linhagem e sexo no 3° bloco (das 16:00h às 19:00h), ( $F=5,50$ ;  $p<0,05$ ) e através do teste *post-hoc* observaram-se diferenças significativas apenas na linhagem SHR, com os machos apresentando maior auto-limpeza do que as fêmeas. No 4° bloco foi encontrado efeito geral de linhagem ( $F= 6,07$ ;  $p<0,05$ ), onde observou-se que os animais LEW exibiram mais este comportamento do que os ratos SHR (fig.20).

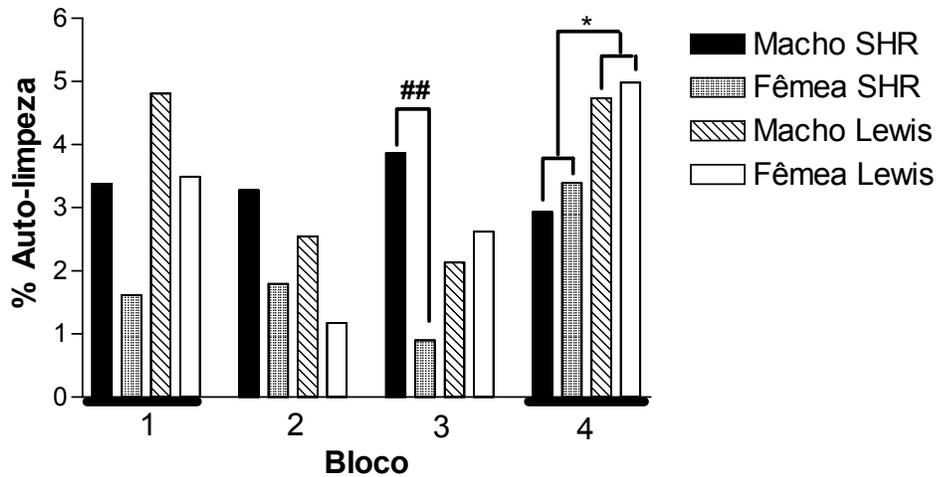


Figura 20: Porcentagem média do comportamento "auto-limpeza" para ratos machos e fêmeas das linhagens LEW e SHR. ("n" de 7-8 gaiolas por grupo contendo 4-6 animais cada). Período de 12 horas dividido em 4 blocos de 3 horas cada (1° bloco - 4h às 7h; 2° bloco - 7h às 10h; 3° bloco - 16h às 19h; 4° bloco - 19h às 22h). 1° e 4° blocos correspondem ao período noturno (indicado com barra escura); 2° e 3° blocos correspondem ao período diurno. Foi encontrada interação entre linhagem e sexo no 3° bloco (macho SHR > fêmea SHR, teste LSD, ANOVA  $p < 0,01$ ). Efeito geral de linhagem está representado por \* (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

Observando o comportamento "coçar", encontra-se efeito significativo de linhagem no 1° bloco (das 4:00h às 7:00h) ( $F=15,06$ ;  $p < 0,01$ ), com ratos LEW coçando-se mais amiúde que os ratos SHR e no 4° bloco ( $F=5,96$ ;  $p < 0,05$ ), onde os ratos LEW também exibiram mais vezes este comportamento (fig.21).

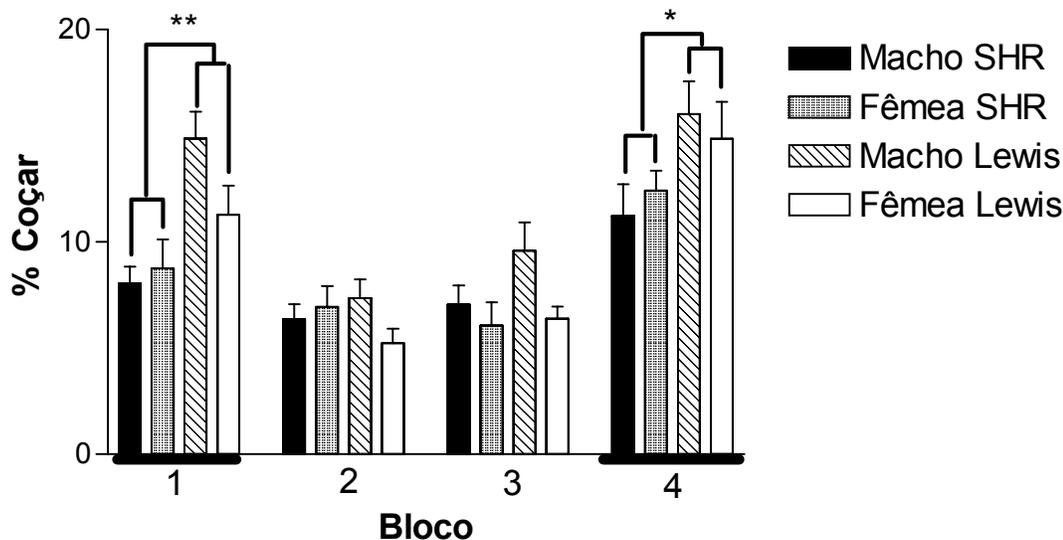


Figura 21: Porcentagem média do comportamento "coçar" para ratos machos e fêmeas das linhagens LEW e SHR. ("n" de 7-8 gaiolas por grupo contendo 4-6 animais cada). Período de 12 horas dividido em 4 blocos de 3 horas cada (1° bloco - 4h às 7h; 2° bloco - 7h às 10h; 3° bloco - 16h às 19h; 4° bloco - 19h às 22h). 1° e 4° blocos correspondem ao período noturno (indicado com barra escura); 2° e 3° blocos correspondem ao período diurno. Efeito geral de linhagem está representado por \* e \*\* (ANOVA,  $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ ).

Na figura 22, observam-se os resultados obtidos com a análise do comportamento "repouso". No 2° bloco foi encontrada uma interação entre linhagem e sexo ( $F=5,57$ ;  $p < 0,05$ ), onde o teste *post-hoc* revelou diferenças significativas entre linhagens somente em fêmeas (LEW > SHR;  $p < 0,01$ ). Nos outros blocos não foram encontradas diferenças significativas. Nesta figura pode-se observar que a porcentagem de exibição deste comportamento decai especialmente no bloco 4, de acordo com os resultados obtidos com a análise do comportamento "locomoção".

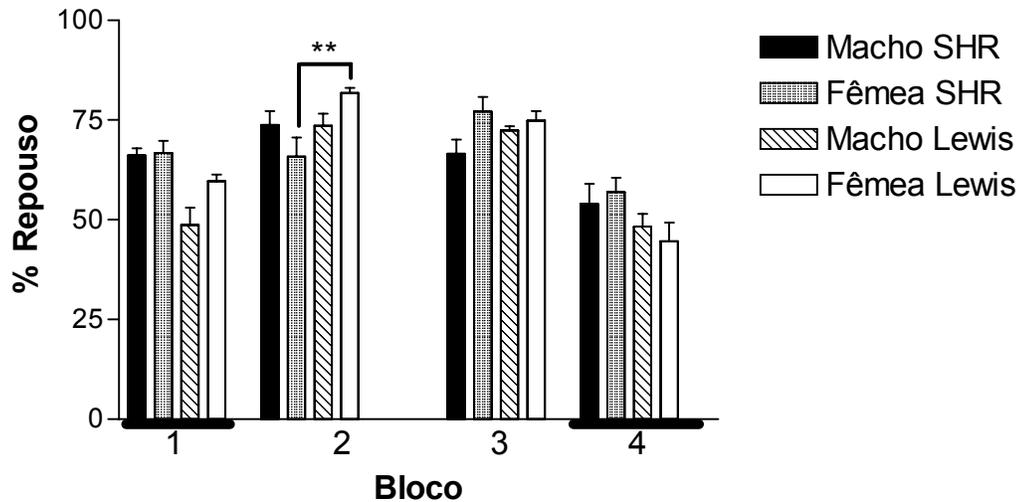


Figura 22: Porcentagem média do comportamento "repouso" para ratos machos e fêmeas das linhagens LEW e SHR. ("n" de 7-8 gaiolas por grupo contendo 4-6 animais cada). Período de 12 horas dividido em 4 blocos de 3 horas cada (1° bloco - 4h às 7h; 2° bloco - 7h às 10h; 3° bloco - 16h às 19h; 4° bloco - 19h às 22h). 1° e 4° blocos correspondem ao período noturno (indicado com barra escura); 2° e 3° blocos correspondem ao período diurno. Foi encontrada interação entre linhagem e sexo no 2° bloco (fêmea LEW > fêmea SHR, teste LSD,  $p < 0,01$ ).

Observando o parâmetro comportamental "interação social", encontra-se interação entre linhagem e sexo no 1° bloco ( $F=9,43$ ;  $p < 0,05$ ). A análise *post-hoc* revelou diferenças entre linhagens somente em machos (LEW > SHR;  $p < 0,01$ ) e entre sexos somente nos ratos LEW (machos > fêmeas;  $p < 0,01$ ). Nos outros blocos não foram encontrados quaisquer efeitos significativos (fig.23).

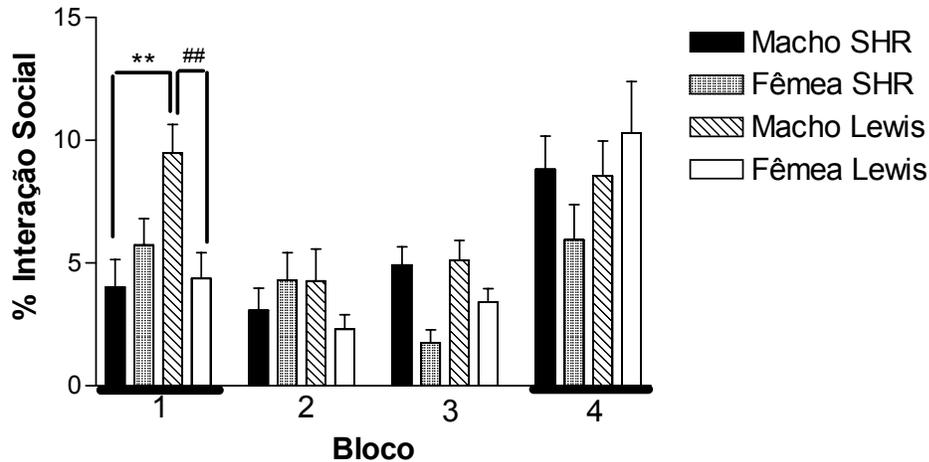
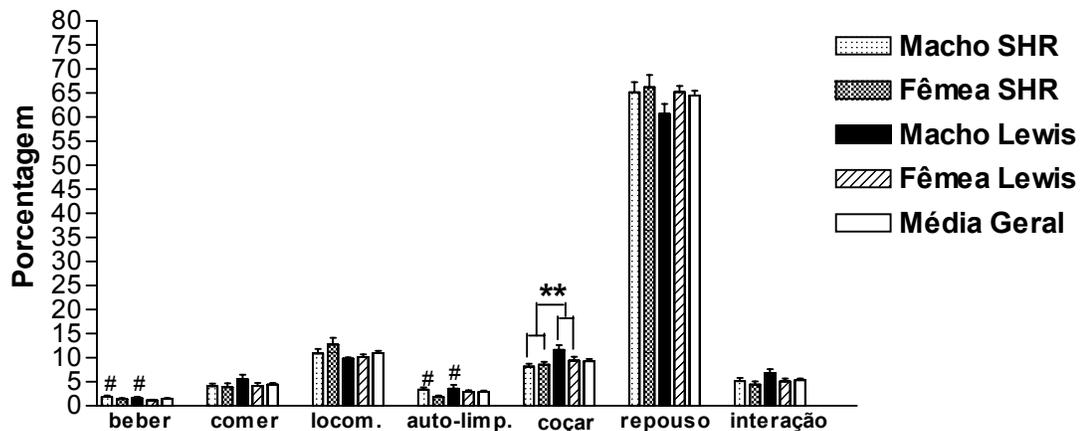


Figura 23: Porcentagem média do comportamento "repouso" para ratos machos e fêmeas das linhagens LEW e SHR. ("n" de 7-8 gaiolas por grupo contendo 4-6 animais cada). Período de 12 horas dividido em 4 blocos de 3 horas cada (1° bloco - 4h às 7h; 2° bloco - 7h às 10h; 3° bloco - 16h às 19h; 4° bloco - 19h às 22h). 1° e 4° blocos correspondem ao período noturno (indicado com barra escura); 2° e 3° blocos correspondem ao período diurno. Foi encontrada interação entre linhagem e sexo no 1° bloco (macho LEW > macho SHR, macho LEW > fêmea LEW, teste LSD,  $p < 0,01$ ).

As porcentagens médias dos comportamentos exibidos durante o total das 12 horas de observação estão apresentadas na figura 24. A figura mostra que dentre os sete parâmetros comportamentais analisados, o mais freqüente foi o de “repouso”, seguido dos comportamentos “locomover” e “coçar”. Foi encontrado um efeito geral para sexo na variável “beber” ( $F=4,29$ ;  $p < 0,05$ ), com machos bebendo mais vezes do que as fêmeas; e na variável auto-limpeza ( $F=4,72$ ;  $p < 0,05$ ) onde os machos também exibiam mais comumente este comportamento em relação às fêmeas. No comportamento “coçar” foi encontrado efeito significativo de linhagem ( $F=8,66$ ;  $p < 0,01$ ), onde observa-se que ratos LEW tem esse comportamento mais amiúde que ratos SHR.



#### 5.4. Imipramina

Como apresentado na figura 25, os ratos LEW e SHR de ambos os sexos exibiram diferentes respostas à atividade antidepressiva do tricíclico imipramina, quando testados no TNF. Foi encontrada interação entre tratamento e linhagem ( $F=15,62$ ;  $p<0,01$ ), onde foi possível observar um efeito significativo da imipramina tanto em machos LEW quanto em fêmeas LEW ( $p<0,05$ ), com ratos que tinham recebido imipramina exibindo menor tempo de imobilidade do que os grupos salina. Outro resultado interessante é que um sutil (não significativo) aumento no tempo de imobilidade foi visto em ratos SHR que receberam imipramina, ao contrário do esperado. Um contraste entre ratos LEW e SHR dos grupos controle (LEW com alta imobilidade em relação a SHR, de acordo com os experimentos prévios) foi observado em machos ( $p<0,05$ ) e em fêmeas ( $p<0,01$ ). Pode se observar na figura, que ratos LEW machos e fêmeas, quando tratados com o antidepressivo, se comportam como os ratos SHR dos grupos controle.

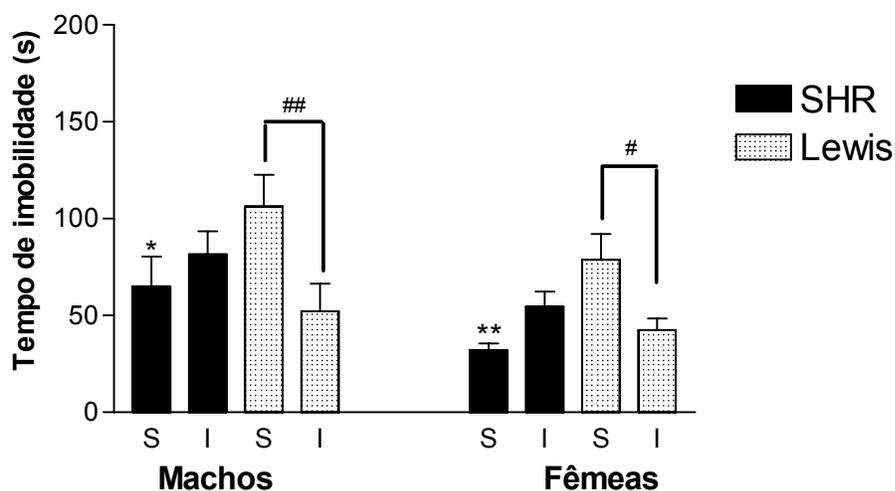


Figura 25 : Tratamento agudo com imipramina em ratos machos e fêmeas LEW e SHR testados no TNF ("n" de 7-8 animais por linhagem/sexo/tratamento). S= salina; I= imipramina. Diferenças entre linhagens dentro do grupo salina estão representadas por \* e \*\* (LSD  $p<0,05$  e  $p<0,01$ ). Diferenças entre salina e imipramina no mesmo grupo estão representadas por # e ## (LSD,  $p<0,05$  e  $p<0,01$ ).

## **6. Discussão**

O principal objetivo deste trabalho era avaliar as quatro linhagens de ratos criadas em nosso laboratório e que já foram propostas como modelos genéticos para o estudo da ansiedade, em modelos experimentais de depressão, o TNF e TSC e avaliar assim sua possível utilidade para o estudo da comorbidade entre ansiedade e depressão. Com o interesse de estabelecer possíveis correlações genéticas entre as medidas dos diversos modelos utilizados, foi aplicada a análise estatística multifatorial (análise de componentes principais), que é geralmente utilizada para descrever a relação entre as variáveis obtidas em diferentes testes comportamentais e revelar os seus fatores psicológicos e comportamentais subjacentes, como “ansiedade” e atividade locomotora. Foi realizado ainda, um estudo do repertório comportamental espontâneo em gaiolas de residência, nas linhagens de ratos LEW e SHR que se apresentaram consistentemente distintas nos dois testes de ansiedade e também no modelo do TNF. Por fim, essas linhagens consangüíneas foram submetidas ainda a uma avaliação de sua resposta a um antidepressivo tricíclico, a imipramina, no TNF.

### **6.1. Parâmetros analisados em testes experimentais de ansiedade**

Neste estudo, foi possível observar que as linhagens isogênicas LEW e SHR, mantiveram suas diferenças comportamentais já anteriormente descritas em vários estudos (Ramos et al., 1997; 1998; 2002; Berton et al., 1998), nas quais era evidenciada o contraste nas respostas a estímulos estressores (representados pelos modelos animais) entre ratos SHR e ratos LEW. Além disso, um contraste comportamental também se apresentou entre as linhagens LEW e SHR no modelo animal de depressão do TNF, onde os ratos LEW tiveram maior tempo de imobilidade em relação à outra linhagem.

A linhagem SHR foi originalmente desenvolvida a partir dos ratos Wistar para alta pressão arterial e tem sido muito utilizada como modelo de hipertensão. Entretanto, uma segunda linha de pesquisa envolvendo esta linhagem é a comportamental, tendo em vista que os ratos SHR apresentam uma gama de características comportamentais e fisiológicas consideradas “anormais” quando comparados aos animais de outras linhagens, como a WKY, a linhagem controle normotensa. Dentre esses elementos comportamentais figuram a hiperatividade, resposta comportamental elevada à estímulos ambientais, hiperreatividade à

situações de estresse, lenta habituação à estímulos novos e rápida aquisição de esquiiva ativa (Sagvolden et al., 1992). Essa linhagem consangüínea já foi proposta como modelo para o estudo de várias enfermidades como a hipertensão (para a qual foi originalmente criada), desordens de aprendizado/memória (Meneses & Hong, 1998) e transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) (Sagvolden et al., 1993; 1998; Fujita et al., 2003), entre outros.

A linhagem isogênica LEW, como já foi mencionado anteriormente, difere de sua linhagem histocompatível Fischer 344, em uma ampla gama de parâmetros bioquímicos, eletrofisiológicos e comportamentais. Os ratos LEW em vários modelos animais demonstram uma atenuada aquisição de resposta de esquiiva e passividade perante estímulos estressores (Lahmame & Armario, 1997; Stöhr et al., 1999), além de quedas na função serotoninérgica (Paulus et al., 1998).

As linhagens LEW e SHR foram analisadas nestes experimentos tendo como base os trabalhos não somente do nosso laboratório, mas também de outros estudos, que indicam que dentre seis linhagens consangüíneas de ratos, as linhagens LEW e SHR se mostravam como extremamente opostas em suas respostas comportamentais (Ramos et al., 1997; Berton et al., 1998). Quando submetidos ao tradicional modelo experimental de ansiedade, o LCE, os ratos SHR exploram mais os braços abertos do aparato e gastam mais tempo neste tipo de braço que outras linhagens, como a LEW ou WKY. No presente estudo, o comportamento das linhagens consangüíneas LEW e SHR foi comparado em várias medidas tanto do LCE quanto do TCA. Os resultados demonstraram que, como era esperado, os ratos SHR exibiram atividade exploratória total igual ou inferior à dos ratos LEW, mas índices mais elevados nos parâmetros clássicos de ansiedade de ambos os testes, nos dois grupos experimentais estudados. Foram observadas diferenças significativas entre linhagens, por exemplo na locomoção central do TCA, onde os ratos SHR apresentavam maior atividade em relação aos LEW, estando em acordo com trabalhos já publicados (Ramos et al., 1998; 2002). No trabalho realizado por Ramos et al. (1997), os ratos SHR exibiram os índices mais elevados de entradas nos braços abertos do LCE e um bom nível de exploração do compartimento branco da caixa branca e preta em relação à outras linhagens. Por sua vez, as fêmeas SHR mostraram maior locomoção central no TCA em relação às outras linhagens, especialmente LEW, que no LCE mostrou o mais baixo índice

de entradas nos braços abertos em comparação às outras linhagens. Os resultados apresentados no trabalho de Ramos et al. (1997) estão em acordo com os do presente estudo, no qual os animais LEW e SHR continuaram se mostrando em contraste comportamental.

Em outro estudo realizado, foi visto que quando os animais SHR eram colocados no TCA, passavam a explorar livremente o campo inteiro, cruzavam mais quadrados da arena em relação aos WKY e nunca defecavam, indicando que os SHR eram menos “medrosos” no TCA (LeDoux et al., 1983). Neste mesmo trabalho os ratos SHR foram submetidos ao teste de medo condicionado e de acordo com os resultados obtidos no TCA, o comportamento de medo se apresentou reduzido em SHR em relação aos WKY. Entretanto, no estudo feito por Sagvolden e colaboradores (1993), os ratos SHR comparados com ratos Wistar e Sprague-Dawley se mostraram menos ativos no TCA de livre exploração. Dados discrepantes em relação ao presente estudo foram obtidos por Ferguson e Cada (2004), onde comparando WKY e SHR no LCE não encontraram quaisquer diferenças nas medidas clássicas de ansiedade. Por outro lado, em um trabalho anterior realizado por Sagvolden e outros pesquisadores (1992), os ratos SHR demonstraram maior atividade no paradigma do TCA. Alguns autores, por sua vez, compararam os perfis comportamentais de ratos LEW e Fischer 344 e observaram que os ratos LEW apresentavam uma menor locomoção no centro do campo aberto (Glowa et al., 1992), mas não tinham diferenças significativas na esquiava do compartimento branco da caixa branca e preta (Chaouloff et al., 1995). No presente trabalho, observamos que os animais LEW no TCA, apresentaram alta locomoção na periferia do aparato e baixa locomoção central, evitando dessa forma, especificamente o ambiente aberto e aversivo. Tem sido especulado que os animais com índices mais elevados de esquiava em testes comportamentais, como o TCA, têm uma forte tendência a se manter em contato com objetos ou perímetros do ambiente e isso talvez se deva ao fato de que a tigmotaxia positiva seja parte do repertório defensivo comportamental (Treit & Fundytus, 1989). Considera-se ainda, que o comportamento tigmotático é significativamente elevado pela administração de um estímulo estressor. Esses aspectos estariam de acordo com o perfil comportamental apresentado por ratos LEW no TCA e no LCE, nos dois grupos experimentais, já que no LCE eles evitam fortemente os braços abertos mas se locomovem normalmente (igual aos

ratos SHR) nos braços fechados. Entretanto, enquanto o trabalho de Chaouloff e colaboradores (1995), demonstra uma menor atividade locomotora de ratos LEW em relação à Fischer 344, um estudo demonstrou o efeito inverso (Fischer 344 locomovia menos que LEW) (Camp et al., 1994). Stöhr et al. (1998), obtiveram como resultado da análise comportamental destas linhagens no TCA e no modelo do estresse crônico, uma resposta diferenciada. Quando comparam-se comportamentalmente os ratos LEW com Fischer 344, parecem existir algumas contradições entre dados obtidos em diferentes laboratórios, isso talvez se deva ao fato de que existem diferenças sensorimotoras entre essas linhagens (Webb et al., 2003). Todavia, o contraste entre os ratos LEW e SHR se faz presente em diferentes modelos aplicados, onde se observa que a linhagem LEW apresenta maior esquia de estímulos considerados aversivos e esse parece ser um sinal de medo/comportamento semelhante à ansiedade, como já mencionado anteriormente (Ramos et al., 1998).

Ao contrário de alguns autores que encontram altos índices de defecação no TCA, em animais de alta “ansiedade” (Paré, 1994), neste estudo não foram encontradas quaisquer diferenças para esta medida no 1º grupo experimental. Todavia, no trabalho realizado por Ramos et al. (1997), foi encontrado efeito geral significativo de linhagem para a defecação no TCA, onde os ratos SHR exibiram os menores índices de defecação. Por outro lado, não foi encontrado efeito geral de linhagem na variável defecação do TCA para ratos LEW e SHR no estudo feito por Ramos et al. (1998), estando de acordo com os resultados detectados no 1º e 2º grupos experimentais do presente estudo.

A defecação é uma medida registrada no TCA, desde a primeira avaliação da emocionalidade no rato feita por Calvin Hall em 1934 e foi até mesmo usada para gerar as linhagens de ratos Maudsley reativas e não reativas por Broadhurst (1962). Alguns autores encontraram correlação negativa entre atividade locomotora e defecação (Stöhr et al., 1998). Contudo, muitos outros estudos têm freqüentemente encontrado resultados contraditórios inter e intraespecíficos e ao longo dos testes (Paré, 1964; Suárez & Gallup, 1981; Ossenkopp & Mazmanian, 1985) e inclusive algumas linhagens selecionadas para diferir na locomoção não são distintas em seus níveis de defecação (Broadhurst, 1962). Paré (1964) avaliou os resultados obtidos nas diferentes medidas registradas no TCA e sugeriu que atividade ambulatoria e defecação no TCA são independentes. Analisando os

dados contraditórios obtidos ao longo de décadas por vários pesquisadores no que diz respeito à correlação entre atividade ambulatoria e defecação, surge uma hipótese que poderia explicar a razão de tais contradições: existiria um grande número de genes cada qual contribuindo com um pequeno efeito para a expressão de um determinado fenótipo sob determinadas circunstâncias, mas devido ao elevado número de estruturas neuroanatômicas envolvidas no processamento de uma expressão comportamental e à complexidade de suas interações torna-se bastante difícil identificar como os pequenos efeitos desses genes operam.

Neste estudo, assim como o TCA, o LCE evidenciou as diferenças comportamentais entre ratos LEW e SHR. A porcentagem de entradas nos braços abertos (um índice clássico de ansiedade), foi significativamente diferente entre as linhagens nos dois grupos experimentais, onde os ratos SHR apresentaram níveis mais elevados, confirmando o contraste presente entre as linhagens e confirmando os resultados obtidos no TCA. Um parâmetro comportamental no qual os ratos LEW demonstraram maiores índices nos dois grupos experimentais, foi o tempo gasto nos braços fechados; o que está de acordo com os demais resultados e com a característica comportamental de maior esquivia de estímulos aversivos presente nesta linhagem. Stöhr et al (2000) observaram o comportamento de ratos LEW em vários testes. No LCE, esses animais exibiram resultados mais elevados do que os ratos Fischer 344 em três medidas comportamentais: *head-dips* protegidos, posturas de alongamento com cautela (“*stretch-attend*”) e retornos aos braços fechados, permanecendo mais tempo nestes.

Dentre os resultados aqui obtidos, foi observado o efeito do sexo na maioria dos parâmetros do TCA, no primeiro grupo experimental, como locomoção central, periférica, total e tempo gasto no centro do aparato. Da mesma forma, efeito significativo de sexo foi detectado em algumas variáveis do LCE para o primeiro grupo experimental como: número e porcentagem de entradas nos braços abertos e tempo gasto nesse tipo de braço. Em todas essas variáveis de ambos os testes as fêmeas exibiram índices mais elevados em relação aos machos, o que estaria de acordo com a literatura, tendo em vista que está bem documentado que fêmeas adultas mostram maiores índices de atividade ambulatoria em relação aos machos quando comparam-se os grupos em modelos animais de ansiedade (Alonso et al., 1991; Johnston & File, 1991; Abel, 1995). Considera-se essa elevada atividade locomotora

das fêmeas como um indicativo de reduzida emocionalidade, embora esse conceito seja bastante criticado pois existem inúmeras variáveis que poderiam estar influenciando para que essa diferença esteja presente. Dentre esses fatores, devem ser levados em conta os esteróides sexuais, que exercem forte influência no sistema nervoso, especialmente durante o período de desenvolvimento crítico e no início da fase adulta, através da organização e reorganização da circuitaria neuronal envolvida em funções neuroendócrinas e comportamentais (Palanza, 2001). As flutuações nos hormônios ovarianos poderiam atuar para alterar distintos aspectos do comportamento relacionados à “ansiedade”, já que ratas ovariectomizadas exibem índices mais elevados de comportamento “ansioso” (Palanza, 2001). A emocionalidade diferindo significativamente entre machos e fêmeas assim como os sistemas neuromodulatórios, potencialmente relacionados ao estresse e às estratégias adotadas para lidar com ele, tem sido documentada em uma grande variedade de mamíferos, incluindo roedores. Todavia, no 2º grupo experimental não foi identificado efeito de sexo em qualquer uma das medidas do LCE, mas apenas em três medidas do TCA: locomoção central, locomoção total e defecação. Os resultados um pouco distintos entre o 1º e o 2º grupo em relação a efeito de sexo em algumas variáveis dos modelos experimentais de ansiedade poderiam ser explicados por uma série de fatores, desde flutuações hormonais (Palanza, 2001) até fatores externos e/ou ambientais. Da mesma forma, outros trabalhos não encontraram diferenças entre gêneros. Pryce et al. (1999) compararam machos e fêmeas de várias linhagens no modelo de medo condicionado, entre elas a linhagem LEW, e como resultado não encontrou quaisquer diferenças em certas variáveis registradas. Courvoisier et al. (1996) testaram ratos das linhagens isogênicas WKHA e WKY no TCA e no LCE e não obtiveram qualquer efeito de sexo nas principais medidas do TCA, e por outro lado, no LCE ao contrário do esperado, as fêmeas de ambas as linhagens exibiram índices mais baixos no número de entradas nos braços abertos do aparato em relação aos machos.

Os resultados obtidos com as linhagens Floripa H e Floripa L nos modelos animais de ansiedade, no 3º grupo experimental (pertencente à geração S6) mostram que foi encontrado efeito de linhagem em todas as medidas registradas no TCA, onde observa-se que os ratos Floripa H apresentaram maiores índices de locomoção e tempo gasto no centro do aparato quando comparados com a outra linhagem. Entretanto, no parâmetro defecação,

o resultado, de acordo com o que poderia ser esperado, foi oposto. Ou seja, ratos Floripa L tiveram níveis mais elevados de defecação do que ratos Floripa H. Estas linhagens, originalmente selecionadas para diferenças em sua atividade locomotora no centro do campo aberto, já mostraram diferenças também em outras variáveis observadas neste mesmo modelo em outro estudo realizado, como a locomoção periférica em uma das gerações (S4). Foi previamente encontrado, também, um efeito do sexo para a locomoção periférica e a defecação em quatro gerações (S1 a S4), com as fêmeas apresentando maior locomoção e menor defecação (Ramos et al., 2003).

No modelo do LCE, surpreendentemente, foi encontrado um efeito de linhagem no número de entradas nos braços fechados (Floripa H > Floripa L), uma medida clássica de locomoção. Para a porcentagem de entradas nos braços abertos, os ratos Floripa L exibiram índices mais elevados do que os Floripa H, ao contrário do que se esperava. Outras conhecidas linhagens, desenvolvidas a partir de seleção genética, já foram caracterizadas tanto comportamental como fisiologicamente, nos fornecendo pistas de uma forte base genética associada com vários comportamentos. Entretanto, pouco se conhece sobre diferentes formas de lidar com situações aversivas (Koolhaas et al., 1999) e dentro dessas mesmas linhagens menos ainda se tem noção sobre a circuitaria neuronal envolvida no desencadeamento de certos padrões comportamentais. Desta forma, algumas discrepâncias podem ser encontradas nas respostas comportamentais de linhagens geneticamente selecionadas. Chaouloff et al. (1994) encontraram que as linhagens de ratos Romanos diferiam no LCE e na caixa branca e preta, mas não no teste de interação social. Por sua vez, Dichter et al (1996) utilizaram as linhagens USV High e Low, selecionadas pelas suas taxas de vocalização ultrassônica, em outros testes como o LCE e observaram que a linhagem que exibe reduzido comportamento semelhante à ansiedade (USV Low) não teve diferenças significativas em relação à outra linhagem nas principais medidas do LCE. Da mesma forma, Commissaris et al. (1996) aplicaram o paradigma do condicionamento para supressão de ingestão de líquidos em ratos MR e MNRA, originalmente criados por Broadhurst (1965) para alta e baixa defecação no TCA e observaram que eles não exibiram diferenças significativas nas primeiras semanas de experimentos. Gonzalez et al. (1998) também testaram linhagens geneticamente selecionadas para alta e baixa sensibilidade ao 8-OH-DPAT, os ratos HDS e LDS, no teste de interação social e no LCE. As linhagens

diferiram significativamente no teste de interação social, mas não mostraram diferenças em variáveis do LCE. Os dados obtidos por esses pesquisadores e o presente estudo nos levam a considerar que, de fato, diferentes modelos genéticos animais podem representar diferentes facetas da ansiedade/medo. Isso é confirmado por análises multifatoriais que geralmente mostram baixas correlações entre parâmetros de diferentes testes, sugerindo que a ansiedade não é um algo unidimensional (Ramos & Mormède, 1998).

Outro fator a ser considerado seria a condição experimental que pode exercer forte influência nos resultados alcançados, como por exemplo, manipulação dos animais para manutenção do biotério e até mesmo fatores como condições de iluminação (Bertoglio & Carobrez, 2002).

Uma possível explicação para as diferenças significativas entre Floripa H e Floripa L no TCA e a ausência desse mesmo tipo de contraste no LCE obtidas no 3º grupo experimental deste estudo, seria de que essas linhagens somente difeririam em seus níveis de locomoção, mas não em comportamento semelhante à ansiedade. Entretanto, podemos contra-argumentar que os ratos Floripa H e Floripa L, quando observados em suas gaiolas de residência não exibiram quaisquer diferenças em sua atividade locomotora (Spricigo, 2003). Além disso, diferenças significativas no LCE entre ratos Floripa H e Floripa L foram encontradas nas gerações S1, S3 e S4 na variável tempo gasto nos braços abertos (Ramos et al., 2003). Mais ainda, em outro modelo animal de ansiedade, a caixa branca e preta também revelou diferenças significativas entre linhagens, com ratos Floripa H gastando mais tempo no compartimento branco do aparato do que os ratos Floripa L (gerações S1, S2 e S4) (Ramos et al., 2003).

## ***6.2. Parâmetros analisados em testes experimentais de depressão***

Os ratos pertencentes às quatro linhagens foram submetidos a dois modelos animais preditivos de atividade antidepressiva, o TNF e o TSC. Este último foi originalmente proposto para ser utilizado em camundongos mas sofreu adaptações para poder ser aplicado em ratos (Chermat et al., 1986). No 1º grupo experimental, obtivemos resultados significativos no TNF: foi encontrada uma interação entre linhagem e sexo e a análise estatística revelou efeito de linhagem apenas em machos; com ratos LEW permanecendo mais tempo imóveis do que a outra linhagem. Dessa forma, observa-se que os animais

LEW, que anteriormente mostraram um comportamento semelhante à ansiedade (mais reativos emocionalmente), demonstram também em modelos experimentais de depressão, a característica de “comportamento de desespero” (*behavioral despair*). Lahmame e Armario (1996), compararam seis linhagens de ratos no TNF, entre elas LEW e SHR e observaram que, os ratos LEW mostraram índices mais elevados de imobilidade do que SHR e Fischer 344, o que está de acordo com os resultados obtidos nos experimentos realizados neste estudo. Contudo, dentre todas as linhagens, os ratos LEW não foram os que exibiram maior tempo de imobilidade. Em outro estudo, comparando-se quatro linhagens de ratos também no modelo do TNF, tanto os animais SHR quanto os LEW exibiram altos níveis de atividade (Martí & Armario, 1996). Lahmame et al. (1997) compararam também o comportamento de cinco linhagens no TNF e verificaram que os ratos LEW e SHR apresentavam níveis intermediários de atividade nesse modelo. Armario et al. (1995), realizaram um estudo para observar diferenças entre linhagens em suas respostas ao TNF e obtiveram como resultado ratos LEW com altos níveis de atividade dentre as cinco linhagens comparadas, o que está em discordância com nossos resultados e com os outros trabalhos acima descritos. Os resultados discordantes podem ser explicados pelas diferentes sublinhagens LEW utilizadas. Stöhr et al. (1999) demonstraram que diferentes sublinhagens de ratos LEW exibem profundas diferenças comportamentais, apesar de serem geneticamente muito semelhantes se não idênticas.

Deve-se também levar em conta outro aspecto quando comparamos o comportamento de diferentes linhagens, neste caso LEW e SHR, em um modelo animal de depressão, como o TNF: os fatores externos e os padrões de realização do experimento. Abel e colaboradores (1992) observaram que os ratos MR e MNRA exibiam um comportamento distinto quando eram submetidos ao TNF em água limpa ou em água previamente utilizada, demonstrando dessa forma, que inúmeras variáveis poderiam estar contribuindo para determinar um padrão comportamental analisado em uma linhagem. Nesse mesmo enfoque, Abel (1995) demonstrou que mudanças circanuais influenciam na duração do tempo de imobilidade de ratos expostos ao TNF, ou seja, ele observou que durante os meses de verão, os ratos exibiam menor imobilidade do que durante os meses de inverno e esse padrão estaria auxiliando para que fossem encontradas diferenças comportamentais nas mesmas linhagens expostas ao TNF.

Apesar disso, os resultados obtidos no TNF com ratos LEW e SHR no presente estudo estão de acordo com vários trabalhos que mostram que linhagens mais reativas emocionalmente em modelos animais de ansiedade, costumam manter esse perfil também em modelos animais de depressão. Commissaris et al. (1996) avaliaram as linhagens MR e MNRA em testes comportamentais de ansiedade (CSD) e depressão (TNF) e verificaram que apesar dos ratos MNRA e MR não exibirem diferenças significativas nas primeiras semanas de experimentos no paradigma do condicionamento para supressão de ingestão de líquidos, posteriormente essas diferenças foram se apresentando e acentuando e também foram mostradas no TNF. Esse mesmo perfil comportamental já havia sido observado por Abel et al. (1992).

No primeiro grupo experimental do presente estudo, não foram encontradas diferenças entre as linhagens no modelo do TSC, aplicado após o TNF. Esse modelo experimental de depressão foi originalmente desenvolvido para ser aplicado em camundongos, mas sofreu adaptações por Chermat et al. (1986) e passou a ser utilizado também em ratos. Assim como o teste de Porsolt (TNF), o tempo de imobilidade é registrado e este pode ser reduzido pela ação de drogas antidepressivas. Apesar do conceito deste paradigma ser o mesmo do TNF, que revelou diferenças comportamentais entre as linhagens LEW e SHR do nosso laboratório, o TSC não mostrou nenhuma diferença entre linhagens. Esse perfil foi observado em vários estudos, onde demonstrou-se a presença de diferenças dentro de uma mesma linhagem submetida aos dois testes (Vaugeois et al., 1997). Talvez isso se deva ao fato de que, algumas linhagens podem ser essencialmente resistentes à imobilidade induzida por um teste específico. Isso foi observado em linhagens de camundongos (Trullas et al., 1989), mas dado o resultado obtido no presente trabalho, poderíamos estender à linhagens de ratos. Apesar dos dois modelos (TNF e TSC) serem similares em alguns aspectos, o espectro de compostos farmacologicamente ativos nesses testes se sobrepõem mas não são idênticos; por exemplo, antidepressivos tricíclicos, atípicos e IMAOs são eficazes nos dois modelos, contudo ISRSs geralmente reduzem o tempo de imobilidade no TSC, mas não no TNF (Detke et al., 1995), o que nos leva a acreditar na hipótese de que as vias neuroquímicas que medeiam o comportamento no TNF e TSC não são idênticas (Yoshikawa et al., 2002). Bai et al. (2001) testaram diferentes linhagens de camundongos (NIH-Swiss e C57Bl/6) nos dois modelos e observaram que os

animais NIH-Swiss diferiam em seu tempo de imobilidade, passando 57% do tempo imóveis no TNF e apenas 8% no TSC, o que está de acordo com outros trabalhos que demonstraram a presença de diferenças comportamentais dentro de mesmas linhagens (Vaugeois et al., 1997).

As diferenças no perfil de resposta à drogas antidepressivas de mesmos animais submetidos aos TNF e TSC tornaram importante buscar compreender as bases genéticas da imobilidade nos dois testes e avaliar se são sobrepostas ou distintas. Com esse objetivo, Yoshikawa et al. (2002) buscaram loci genéticos ligados à propensão para o “comportamento de desespero” em camundongos. Eles obtiveram um resultado interessante: um QTL no cromossomo 8 exibiu efeito oposto no tempo de imobilidade no TNF e TSC; outro QTL, no cromossomo 11, cujas curvas “lod” se sobrepuseram quase completamente nos dois testes, pareceram agir em modos genéticos diferentes. Esses fatores devem contribuir para a baixa correlação presente entre os dois testes. Os dados evidenciados nos trabalhos acima descritos estão em acordo com os resultados obtidos no presente estudo.

Com o objetivo de verificar se a ordem dos testes (TNF e TSC) tiveram alguma influência nos resultados obtidos com o 1º grupo experimental, o TSC foi aplicado antes do TNF no 2º grupo experimental. Entretanto, assim como no 1º grupo, o TNF continuou evidenciando diferenças entre linhagens, mas não o TSC, demonstrando que provavelmente a ordem dos testes não estaria influenciando de forma significativa, já que os resultados dos dois grupos experimentais estiveram em concordância.

No segundo grupo experimental foram encontradas diferenças significativas no TNF entre fêmeas, onde a linhagem LEW ficou mais tempo imóvel em relação à outra linhagem e, dentro da linhagem LEW, os machos exibiram maior tempo de imobilidade quando comparados às fêmeas. Esses resultados estão de acordo com o do grupo experimental anterior, onde o TNF produziu o efeito esperado. Entretanto, no TSC foi encontrado apenas um efeito do sexo para a medida do tempo de imobilidade, onde foi visto que os machos mostraram-se imóveis por mais tempo do que as fêmeas. Esse resultado está de acordo com artigos publicados demonstrando a existência de diferenças entre sexos nos modelos animais de depressão, embora esses estudos não sejam conclusivos (Steenbergen et al., 1990; 1991; Alonso et al., 1991; Palanza, 2001). Foi constatado que no

modelo do desamparo aprendido, as fêmeas eram menos afetadas pelo choque do que os machos. Similarmente, a exposição ao estresse crônico aumenta até mesmo a atividade sexual em fêmeas e reduz em machos. Uma possível explicação para essa discrepância entre gêneros seriam as diferenças nas respostas hormonais; já que o efeito de drogas antidepressivas como a imipramina se torna mais ou menos aparente dependendo da fase do ciclo estral na qual a fêmea se encontra (Barros & Ferigolo, 1998). Contudo, uma das maiores preocupações sobre os modelos animais de depressão e diferenças entre sexos, decorre do fato que as fêmeas nesses testes são menos atingidas pelo estresse, mas as taxas de depressão maior em humanos são mais elevadas em mulheres; a razão dessa diferença ainda é praticamente desconhecida.

Nos grupos experimentais que avaliaram as linhagens Floripa H e Floripa L, o padrão foi similar ao observado em ratos LEW e SHR: no 3º grupo, o TNF detectou efeito de linhagem, onde os ratos Floripa H tiveram menos tempo de imobilidade em relação à outra linhagem. Assim como no 2º grupo experimental (LEW e SHR), o TSC revelou apenas efeito de sexo, mas desta vez as fêmeas exibiram maior tempo de imobilidade. Apesar deste resultado ser contrário ao obtido nos grupos experimentais anteriores e na maioria dos estudos realizados, deve-se levar em conta que flutuações hormonais costumam levar à alterações no perfil comportamental de fêmeas, tanto em modelos animais de ansiedade, como também de depressão. Além disso, foi observado que machos submetidos a um estresse moderado por 2 horas, tinham sua atividade locomotora reduzida e, após 5 dias submetidos ao mesmo estímulo estressor, esse efeito já não eram mais visto. Contrariamente, as fêmeas foram menos afetadas pelo estresse de 2 horas, contudo falharam para adaptar-se no procedimento do estresse repetido (Palanza, 2001). Essa poderia ser uma razão pela qual as fêmeas no presente estudo tiveram maior tempo de imobilidade que os machos no TSC nesse grupo experimental, já que foram submetidas ao teste dois dias após terem sido avaliadas no TNF.

Da mesma forma que nos grupos experimentais com as linhagens LEW e SHR, foi feita também uma alternância na ordem dos testes do 3º e 4º grupos experimentais (linhagens Floripa H e Floripa L) e aqui também aparentemente a ordem dos testes não influenciou de forma consistente os resultados de ambos os grupos experimentais, tendo em

vista que o TNF nos dois casos revelou diferenças entre Floripa H e Floripa L e o TSC não evidenciou contrastes entre linhagens.

No 4º grupo experimental, foi encontrado efeito de linhagem e sexo no tempo de imobilidade do TNF e em concordância com os dados anteriores, os ratos Floripa L apresentaram maior tempo de imobilidade que os Floripa H e os machos permaneceram mais tempo imóveis do que as fêmeas. No TSC, não foi encontrado qualquer efeito significativo, como ocorreu no 1º grupo experimental com as linhagens LEW e SHR. Os resultados obtidos no TNF com o 4º grupo experimental estão de acordo com dados publicados por outros pesquisadores que testaram linhagens selecionadas para um determinado fenótipo comportamental e que mantém esse mesmo perfil quando submetidas à outros modelos animais. As linhagens MR e MNRA, que já foram citadas anteriormente são um exemplo disso: Abel et al (1992) demonstraram que elas são distintas em suas respostas em modelos animais de ansiedade e no TNF. Da mesma forma, as linhagens HAB e LAB desenvolvidas na Alemanha e selecionadas para o seu padrão comportamental no LCE, se mostram também contrastantes em testes comportamentais de depressão (Landgraf, 2003). Nos dois casos e no presente trabalho, as linhagens tidas como mais “ansiosas” (exibindo maior comportamento semelhante à ansiedade) são também mais “depressivas” (“*depression-like*”). Os dados apresentados não somente neste estudo mas também nos trabalhos acima citados são consistentes com a hipótese de que possivelmente haveria uma base neurobiológica comum gerando os comportamentos semelhantes à ansiedade e depressão nos animais testados no LCE, TCA e TNF e talvez esses resultados forneçam pistas mais concretas para se chegar à compreensão da etiologia desses transtornos em humanos.

### ***6.3. Análise de Componentes Principais***

A análise estatística multivariada (análise fatorial) é uma técnica muitas vezes aplicada a traços relacionados à emocionalidade e consiste, neste caso, em avaliar comportamentalmente um grupo de indivíduos em um ou vários modelos animais e através de uma matriz de correlação, extrair alguns fatores principais que são formados pela específica combinação de variáveis (Griebel et al., 1996; Ramos & Mormède, 1998). A análise fatorial inclui a análise de componentes principais (ACP) que, quando aplicada a

um grupo de variáveis correlatas, produz índices (componentes principais) que, sendo ortogonais, não estão correlacionados entre si e representam as diferentes dimensões dos dados (Belzung & La Pape, 1994; Ramos & Mormède, 1998). Neste estudo, realizou-se uma análise multivariada, na qual os dados obtidos nos quatro testes comportamentais com as quatro linhagens de ratos foram agrupados para a realização da ACP, para verificar se os diferentes modelos animais aqui utilizados medem e discriminam diferentes fenômenos ou não. Como resultado, obtivemos uma matriz de correlação, a partir da qual emergiram quatro fatores com *eigenvalues* acima de 1. Os 12 índices comportamentais considerados estiveram correlacionados com um ou mais de um dos quatro fatores obtidos.

O fator 1, representando 35% da variância total, esteve primariamente associado às principais medidas comportamentais de ansiedade do LCE (tempo nos braços fechados, tempo e número de entradas nos braços abertos e % de entradas nos braços abertos). A variável tempo nos braços fechados tem uma correlação negativa forte com as outras três medidas, ou seja, ratos que tinham uma maior tempo gasto nos braços fechados exibiam menor número e porcentagem de entradas nos braços abertos e tempo gasto nesse tipo de braço do aparato. Esse mesmo tipo de correlação foi encontrada na análises multivariadas realizadas por Cruz et al. (1994), Rodgers e Johnson (1995), Fernandes e File (1996), Ramos et al. (1997) e Aguilar et al. (2002). Por causa da relação existente entre estas medidas do LCE e a emocionalidade ou comportamento semelhante à ansiedade, no presente estudo, o fator 1 pode ser razoavelmente interpretado como ligado à “ansiedade”. Entretanto, uma outra variável do LCE esteve representada no fator 4, o número de entradas nos braços fechados, ou seja, uma medida de atividade locomotora não associada com a maioria das medidas clássicas de ansiedade (representadas no fator 1), mas sim com uma medida de comportamento semelhante à depressão, representada pela imobilidade no TSC.

Por sua vez, o fator 2, contribuindo com 19% variabilidade fenotípica total, esteve relacionado às medidas de locomoção (central, periférica e total) e defecação do TCA de maneira que este fator poderia ser considerado como representando a emocionalidade tipicamente medida no TCA.

As medidas de locomoção e defecação estiveram correlacionadas negativamente, ou seja, ratos que apresentavam maior locomoção, defecavam menos. A usual interpretação do

TCA, desde o estudo realizado por Calvin Hall na década de 30, é a de que uma alta reatividade emocional é indicada por uma alta taxa de defecação, uma baixa atividade locomotora ou ambos, enquanto que o padrão oposto significa que o animal apresenta uma baixa reação de emocionalidade. O resultado mostrado na ACP aplicada aos dados comportamentais obtidos neste estudo, em especial o fator 2, está de acordo com esse conceito e com os resultados obtidos por Broadhurst (1965) com as linhagens de ratos *Maudsley*, onde animais que defecavam mais eram menos ativos. Resultado semelhante foi alcançado por DeFries (1978), utilizando camundongos selecionados geneticamente para alta e baixa atividade no TCA. Neste caso, baixa atividade locomotora ou alta reatividade emocional, estavam correlacionadas com altas taxas de defecação. Aguilar et al. (2002) também encontraram correlação negativa entre distância percorrida na arena e defecação, ainda que esta correlação tenha sido baixa (-0.17). Entretanto, muitos outros trabalhos demonstraram que não havia correlação entre defecação e locomoção no TCA. Whimbey e Denenberg (1967) observaram em sua análise fatorial que a atividade locomotora se correlacionava positivamente com os níveis de defecação no primeiro dia de exposição dos animais ao teste (ratos naïve). Da mesma forma, Paré (1964) através da análise multivariada, concluiu que atividade ambulatoria e defecação eram parâmetros independentes. No estudo realizado por Ramos et al. (1997) o fator 3 associou medidas de diferentes testes (TCA e caixa branca e preta) e foi constatado que a defecação estava positivamente correlacionada com a interação social. Contudo, se um animal exibe baixa interação social deveria ser considerado mais “ansioso” e portanto deveria exibir alta defecação. Dessa forma, o estudo realizado por Ramos et al. (1997) está de acordo com a hipótese de que as manifestações comportamentais podem ser afetadas por diversos fatores relativos ou não à emocionalidade.

As discrepâncias encontradas nas diferentes análises multivariadas aplicadas podem ser atribuídas às questões relacionadas com o procedimento utilizado no TCA (iluminação, tamanho e formato do aparato, ambiente, experiência anterior, entre outras), além de fatores genéticos (linhagem testada, geração de seleção) que estariam interagindo e desencadeando essas diferenças.

A locomoção e o tempo gasto no centro do campo aberto, além do tempo de imobilidade no TNF, foram relacionados ao fator 3. O tempo de imobilidade, a principal

medida do modelo do TNF correlacionou-se negativamente com as medidas do TCA, de maneira que, animais que exploravam mais o centro do aparato, também exibiam baixa imobilidade no TNF. Um efeito distinto foi observado por Alonso et al. (1991), que avaliou os resultados obtidos no TCA e no TNF e encontrou uma correlação não significativa entre locomoção no TCA e atividade no teste de Porsolt e concluiu que a atividade em cada teste estaria relacionada à fenômenos diferentes.

A partir dos resultados do presente estudo, podemos propor que o comportamento exibido no TNF (imobilidade) seria de natureza emocional, já que está correlacionada com a locomoção no centro do campo aberto e com o tempo gasto no centro. Estas são consideradas medidas relacionadas à reatividade emocional (Clément et al., 1997), já que ansiolíticos como o clordiazepóxido aumentam os valores dessas variáveis. Foi possível constatar ainda que as nossas linhagens não diferem para os seus níveis de locomoção em seu comportamento espontâneo, observado em suas gaiolas de residência. Uma grande controvérsia decorre do fato de que geralmente o comportamento semelhante à depressão exibido pelos animais no TNF é uma hipoatividade. Nesse aspecto este trabalho demonstra que existiriam outros fatores concernentes à emocionalidade, que estariam presentes neste modelo.

O tipo de emocionalidade representada pela locomoção central no TCA não está totalmente claro, tendo em vista que algumas análises fatoriais mostram que ela não está relacionada com medidas de ansiedade do LCE (Ramos et al., 1998). Entretanto, os resultados da análise fatorial do presente estudo, sugerem que a imobilidade no TNF, que é sensível a drogas antidepressivas e a locomoção central do TCA devem compartilhar alguns aspectos comuns. Futuros estudos farmacológicos usando drogas antidepressivas no TCA poderão auxiliar na busca por esses aspectos compartilhados.

O fator 4, que contribui com apenas 9% da variabilidade fenotípica total, mostrou correlação somente para duas variáveis: o número de entradas nos braços fechados do LCE e o tempo de imobilidade no TSC. O número de entradas nos braços fechados do LCE esteve negativamente correlacionado com a imobilidade no TSC; entretanto essa correlação apresentou-se muito fraca (-0.07). A partir desses resultados podemos considerar que esse fator estaria representando uma correlação muito fraca entre variáveis de dois testes, possivelmente refletindo componentes de atividade motora presentes nestes testes. Esse

resultado é compatível com o fato de que o TSC neste estudo, não revelou diferenças entre as linhagens isogênicas e nem entre as linhagens Floripa H e Floripa L, ao contrário do TNF, paradigma de mesmo conceito. Portanto, uma importante contribuição deste estudo foi demonstrar que esses dois modelos animais de depressão estariam avaliando aspectos comportamentais distintos. A baixíssima correlação entre imobilidade no TNF e no TSC e a presença de 2 fatores independentes na ACP (3 e 4) corroboram essa hipótese.

Por sua vez, da segunda análise estatística multifatorial emergiram três fatores: o fator 1, contribuindo com 29,55% da variância total, correlacionou positivamente duas medidas de atividade locomotora dos dois modelos animais de ansiedade aplicados (número de entradas nos braços fechados do LCE e locomoção periférica do TCA) e a estas o parâmetro defecação esteve correlacionado negativamente. Desta forma, este fator poderia ser chamado de “emocionalidade”, já que estaria de acordo com o conceito apresentado por Calvin Hall na década de 30, onde um animal que apresentasse alta locomoção teria baixos níveis de defecação. Como já foi mencionado anteriormente, esse conceito ainda é motivo de controvérsias pois essa correlação foi encontrada por alguns autores em seus estudos (Broadhurst, 1962; DeFries et al., 1978; Aguilar et al., 2002) entretanto por outros pesquisadores o mesmo não foi encontrado (Whimbey & Denenberg, 1967; Ramos et al., 1997). O fator 2, contribuindo com 16,98% da variância total correlacionou negativamente duas medidas de comportamento semelhante à ansiedade com o tempo de imobilidade registrado no TNF, um modelo animal de depressão. Esse fator apoiaria a hipótese de que de fato poderiam coexistir características comuns entre o comportamento observado nesses modelos de psicopatologias e dessa forma, estender o conceito aos transtornos humanos. Portanto, o fator 2 poderia ser denominado de “comorbidade”, pois mostra que animais que passam mais tempo imóveis no TNF, apresentam índices mais baixos de locomoção no centro do TCA e de tempo gasto nos braços abertos do LCE, ou seja, animais que apresentam comportamento semelhante à ansiedade nos testes comportamentais, também se apresentam como mais “depressivos”.

O último fator, contribuindo com 16,41% da variância total esteve apenas associado ao tempo de imobilidade no TSC. Esta segunda análise multifatorial também confirma os resultados previamente obtidos nos testes comportamentais, nos quais o TNF revelava diferenças entre linhagens, mas o TSC não. Dessa forma, com os resultados alcançados na

análise comportamental e com as duas ACPs realizadas, podemos considerar a hipótese de que possivelmente, as vias neuroquímicas e outros aspectos neurobiológicos que medeiam o comportamento no TNF e TSC não são idênticos (Yoshikawa et al., 2002).

#### **6.4. Observação comportamental em gaiolas de residência**

Na observação do comportamento espontâneo em gaiolas de residência dos ratos LEW e SHR, a chamada observação em “*home-cage*”, sete parâmetros comportamentais foram registrados: beber, comer, locomoção, auto-limpeza, coçar, repouso e interação social. Na primeira medida, beber, foi detectado efeito significativo de linhagem no 2º bloco (período diurno), onde SHR exibiu mais vezes esse comportamento em relação à LEW. Entretanto, em outros períodos do dia e na porcentagem média, não foram encontradas diferenças entre linhagens. No segundo parâmetro considerado, comer, foi identificado efeito de linhagem no 2º bloco, onde SHR ingeriu mais alimento em relação à LEW e no 4º bloco (período noturno), onde o efeito inverso foi observado: LEW alimentando-se mais quando comparado com SHR. Para alguns autores, o consumo de água ou alimento em ratos, pode ser significativamente diferente dependendo se estão vivendo em grupo, isolados ou em casais (Olsson et al., 2003). Contudo, essa não seria a razão destas diferenças entre linhagens detectadas neste estudo, tendo em vista que os animais (de todas as linhagens) em nosso laboratório são agrupados em 4 ou 5 ratos por gaiola. A ingestão de água ou alimentos pode ser modificada indiretamente por influências ambientais (Heinrichs, 2001), todavia, os animais que tiveram seu comportamento espontâneo avaliado neste estudo não tinham sido previamente submetidos a nenhum teste comportamental (ratos naïve), podendo dessa forma, ser considerada apenas a influência ambiental ou manipulação desses animais durante a manutenção do biotério como possível fator desencadeador dessas diferenças. Outros estudos compararam o comportamento espontâneo em gaiolas de residência de linhagens contrastantes em modelos animais. Meerlo et al. (1997) observaram alguns parâmetros comportamentais nas linhagens de ratos Romanos e encontraram diferenças basais significativas entre os ratos RHA e os ratos RLA. Os ratos RHA alimentaram-se consideravelmente mais vezes do que os RLA.

Na medida de locomoção não foi encontrada qualquer diferença em nenhum dos blocos e tampouco no total de 12h. Esse dado é bastante relevante, pois ele estaria apoiando

a hipótese de que as diferenças observadas nessas linhagens quando submetidas aos modelos animais de ansiedade e depressão, não seriam meros contrastes na atividade locomotora, mas diferenças intrínsecas das linhagens em suas respostas à estímulos estressores. A medida de atividade serviria como um indicador de um estado interno ou nível de motivação, onde a presença de contrastes entre linhagens estudadas teriam o potencial de influenciar nas respostas observadas nos testes comportamentais (Rodgers et al., 1997). O mesmo foi encontrado em outras linhagens de ratos que exibem comportamento distinto em testes comportamentais: as linhagens de ratos HAB e LAB, não demonstraram qualquer diferença na atividade locomotora (Henniger et al., 2000); os ratos romanos RLA e RHA também não foram diferentes na atividade locomotora em suas gaiolas de residência (Meerlo et al., 1997). Ratos SwLo e SwHi, selecionados para a atividade motora no TNF a partir da linhagem de ratos Sprague-Dawley, não mostraram quaisquer contrastes na atividade locomotora em suas gaiolas de residência (Weiss et al., 1998). No presente estudo foi possível observar também, que a atividade locomotora dos ratos de ambas as linhagens apresentou tendência a aumentar, especialmente no 4º bloco, no início do período escuro. Esse dado está de acordo não somente com a bibliografia (Murrough et al., 2000), mas com o padrão de atividade de roedores, que são animais noturnos. Entretanto, em um estudo realizado por Galani et al. (2001) os níveis de atividade registrados não mostraram efeitos significativos entre os grupos, nem nos períodos de dia e noite. Casadesus et al. (2001) observaram a atividade locomotora de ratos Fischer 344 e perceberam que esta decaía com a idade dos animais. Neste estudo esse aspecto não foi considerado, pois os animais que tiveram seu comportamento espontâneo observado tinham em média 7 semanas de idade.

Analisando outro parâmetro, auto-limpeza, foram encontradas diferenças significativas no 3º bloco (período diurno), onde detectou-se interação entre linhagem e sexo, machos SHR auto-alisaram mais frequentemente do que as fêmeas da mesma linhagem. Efeito significativo de linhagem foi encontrado no 4º bloco (período noturno), onde observou-se que os ratos LEW exibiram mais vezes esse comportamento. É importante ressaltar que o significado biológico da auto-limpeza ainda não está muito claro, embora acredite-se que ele represente um mecanismo que de alguma forma sirva à manutenção do equilíbrio interno, além de ser um padrão motor com funções adaptativas

muito mais do que um simples cuidado do pêlo (Moyaho et al., 1995). Alguns autores consideram ainda que a auto-limpeza seria uma ativação comportamental relacionada ao estresse (Murphy et al., 1996; Moyaho & Valencia, 2002; Weiss et al., 2004) e que animais que mostrassem maior frequência nesse padrão comportamental seriam mais emocionais. Esse conceito estaria em concordância com os resultados deste trabalho, já que os ratos LEW exibiram consideravelmente mais vezes a auto-limpeza do que os SHR. Da mesma forma, Moyaho et al. (1995) compararam duas linhagens de ratos que diferiam em seus níveis de atividade no TCA e observaram que os mais ativos apresentavam menores índices de auto-limpeza do que o outro grupo. Murphy et al. (1996) constataram que os animais submetidos a testes comportamentais se auto-limpavam mais amiúde. Contudo, no estudo realizado por Henniger et al. (2000), onde foi analisado o repertório comportamental espontâneo dos ratos HAB e LAB, resultados contrários foram obtidos: os ratos LAB (“menos ansiosos”) mostraram tendência a se auto-limparem mais vezes do que os HAB (“mais ansiosos”). Esses resultados estão em discordância com os obtidos pelo presente trabalho.

No 5º parâmetro comportamental analisado, coçar, foi detectado efeito de linhagem no 1º bloco (período noturno), onde foi visto que os ratos LEW mostraram esse comportamento mais vezes do que SHR, da mesma forma que no 4º bloco (também no período da noite) e na porcentagem média dos grupos. Foi possível notar também, que essa foi uma das medidas comportamentais mais frequentes no comportamento espontâneo dos ratos de ambas as linhagens. É mais comum ainda, os ratos exibirem esse padrão comportamental no período da noite, sobretudo LEW e esse dado está de acordo com o que observou-se na atividade locomotora. Quanto à diferença entre linhagens, poderíamos especular que os ratos LEW atingem sua máxima atividade no período da noite e início da manhã, onde exibem maior atividade em relação à SHR.

Observando o tempo de repouso, encontramos efeito de linhagem e sexo no 1º bloco (período noturno), onde SHR repousou mais tempo em relação à LEW e as fêmeas mais do que os machos. Esse dado está de acordo com a especulação sobre o período preferencial de atividade de LEW e SHR, ou seja, no período onde LEW exibiu maior atividade (coçar), SHR repousou mais. Estes resultados estão em desacordo com outros estudos que compararam o comportamento de linhagens contrastantes: Henniger et al.

(2000) observaram que os ratos HAB repousavam significativamente mais do que os LAB, ao contrário do que observou-se com LEW e SHR. Por outro lado, o resultado deste trabalho, que mostra que os ratos SHR repousaram mais do que LEW, apóia a hipótese de que essas linhagens isogênicas criadas em nosso laboratório, quando submetidas a modelos animais de ansiedade ou depressão, revelam características intrínsecas à emocionalidade que não devem ter qualquer relação com atividade locomotora. Esta hipótese é reforçada pelo fato de que no TCA e no LCE, os ratos LEW e SHR ou não apresentaram diferenças nas medidas de locomoção ou, os ratos LEW foram ainda mais ativos do que os ratos SHR, ao contrário do que acontece em quase todos os outros modelos genéticos de emocionalidade conhecidos.

A última variável considerada, interação social, produziu resultado significativo somente no 1º bloco, onde encontrou-se interação entre linhagem e sexo e a análise post-hoc revelou diferenças entre machos (LEW interagindo mais do que SHR) e em LEW (machos com maiores índices de interação social do que as fêmeas). Este resultado está parcialmente de acordo com os dados apresentados no estudo realizado por Henniger et al. (2000), onde os ratos HAB (de comportamento semelhante à ansiedade) mostraram mais auto-limpeza social que os ratos LAB, contudo os LAB apresentaram maior comportamento de luta e ameaça aos companheiros de gaiola do que os HAB. Entretanto, deve-se levar em consideração que respostas sociais como comunicação olfativa entre outras, são mecanismos geneticamente determinados (Olsson et al., 2003), de forma que linhagens não-isogênicas e ratos selvagens se utilizam de diferentes padrões para comunicação e interação social. Recentes evidências apontam para o fato de que em linhagens consangüíneas as relações sociais podem ser bastante instáveis assim como os níveis hierárquicos dentro dos grupos (Olsson et al., 2003). Dessa forma, podemos observar linhagens que demonstram maior esquia perante situações de estresse com maior ou menor agressividade ou interação social em ambientes familiares do que outras linhagens que não apresentam comportamentos semelhantes à ansiedade ou depressão.

### **6.5. Imipramina**

Os ratos LEW e SHR tiveram suas respostas ao antidepressivo tricíclico imipramina avaliadas e foi possível constatar que machos LEW que receberam imipramina

permaneceram menos tempo imóveis do que os que receberam salina, o mesmo sendo observado nas fêmeas. Esse resultado está de acordo com outros estudos realizados, onde uma única dose de antidepressivo antes do teste pode reduzir significativamente o tempo de imobilidade no TNF. Porsolt et al. (1978) já haviam demonstrado que o tratamento agudo com imipramina reduzia a variável do TNF de forma dose-dependente e que efeitos mais consistentes ainda poderiam ser obtidos através de tratamento crônico ou subcrônico, como no estudo realizado por Commissaris et al. (1996), no qual o tratamento repetido diminuiu significativamente o tempo de imobilidade dos ratos MR e MNRA. DePablo et al. (1989) encontraram resultados semelhantes em ratos Wistar. No que diz respeito à linhagem de ratos LEW e aos antidepressivos tricíclicos, Lahmame e Armario (1996) encontraram que os ratos LEW tiveram seu tempo de imobilidade significativamente reduzido pela dose de 15 mg/kg de desipramina em tratamento agudo e esses dados concordam com os obtidos pelo presente estudo.

Entretanto, alguns autores demonstram a variabilidade de respostas à imipramina em diferentes linhagens de roedores, de sorte que, os resultados obtidos em determinado estudo podem depender não só da dose aplicada, mas também do tipo de tratamento, da linhagem de ratos ou camundongos utilizada no estudo e do modelo animal aplicado (Beaufour et al., 1999; Liu & Gershenfeld, 2003). Um exemplo disso é que a imipramina teve sua eficácia como ansiolítico avaliada e observou-se que em tratamento agudo não era eficiente, contudo através da administração crônica a droga teve seus efeitos ansiolíticos revelados (Beaufour et al., 1999).

A dose de imipramina aplicada também pode influenciar na resposta comportamental. Bai et al. (2001) administraram diferentes doses de imipramina e outros fármacos e observaram que em doses de 15 mg/kg e acima desse valor a duração do tempo de imobilidade retornava a resultados não significativamente diferentes de animais tratados com veículo. O mesmo foi observado por Wainstein et al. (1990), onde tratamento agudo com imipramina somente reduziu o tempo de imobilidade de ratos Wistar com uma dose de 10 mg/kg.

Devemos considerar ainda um outro aspecto no que diz respeito à validade preditiva do uso de fármacos antidepressivos em modelos animais de depressão e sua extensão à humanos: o tratamento adequado da depressão em humanos é de longa duração e os efeitos

das drogas antidepressivas só começam a ser detectados após 2 ou 3 semanas de tratamento, sendo que de 40 a 60% dos medicamentos administrados podem falhar na redução dos sintomas da depressão (Borsini & Meli, 1988; Masand, 2003). Portanto, quando aplicamos certo composto em modelos animais devemos administrá-lo mais de uma vez e em tratamento crônico antes de descartá-lo como inativo, ou se ele se apresentar eficaz, antes de considerá-lo adequado de forma definitiva para o tratamento da depressão (Dixon & Fisch, 1999). De qualquer forma, o antidepressivo tricíclico imipramina é bastante eficaz em modelos animais de depressão (em várias linhagens de roedores), o que está de acordo com os resultados do presente estudo nos ratos LEW, e também na prática clínica.

Outro resultado presente neste estudo e que convém frisar é a ineficácia da droga na redução do tempo de imobilidade em ratos SHR, levando até a uma tendência (não significativa) em aumentar o tempo de imobilidade nesses animais. Anteriormente à realização desta parte experimental, foi realizado um teste-piloto com ratos SHR e duas doses de imipramina (15 e 30 mg/kg) em tratamento repetido (24h, 5h e 1h antes da segunda sessão do TNF) e observou-se que na dose de 15 mg/kg os ratos SHR exibiam maior tempo de imobilidade em relação ao grupo controle, ou seja, a droga desencadeou um efeito contrário ao esperado. Entretanto, devemos levar em conta que esse experimento piloto utilizava outra forma de tratamento (repetido ao invés de agudo) não sendo possível, portanto, comparar diretamente seus resultados com os do presente estudo. Neste estudo, outra razão para a escolha de uma dose única de imipramina, foi a disponibilidade limitada de animais para experimentação. Contudo, estudos futuros poderão aplicar outras doses da mesma droga e também outros antidepressivos, em tratamento agudo para comparar os resultados do presente estudo.

A ineficácia da droga na redução do tempo de imobilidade em ratos SHR observada neste trabalho, está em concordância com os estudos realizados por Lahmame e Armario (1996), nos quais ratos SHR e WKY, que são geneticamente próximos, falharam na resposta ao tratamento agudo com doses padrão de desipramina, um outro antidepressivo tricíclico, em termos de aumento de comportamento ativo no TNF. Aparentemente, essas linhagens são insensíveis à administração aguda de drogas antidepressivas, o que está de acordo com outros dados da literatura que mostram que certas linhagens de roedores

respondem de forma diferente a tratamentos com compostos antidepressivos (Trullas et al., 1989). Segundo Lahmame et al. (1997), a falta de resposta adequada à administração aguda de um composto antidepressivo observada em modelos animais pode estar relacionada à demora na resposta de pacientes ao tratamento com esse tipo de medicação, ou seja, é necessária uma administração por um período mais longo para que os efeitos do tratamento sejam evidenciados, como já mencionou-se anteriormente. Por conseguinte, é de interesse avaliar em tratamento crônico uma linhagem de ratos que não responde ao tratamento agudo com a mesma droga, antes de considerá-la resistente à antidepressivos (Lahmame et al., 1997).

Algumas linhagens de ratos, como a Flinders Sensitive, que apresenta baixos níveis de atividade no TNF, mostram resposta eficaz ao tratamento crônico com uma droga, mas essa resposta positiva não é evidenciada no tratamento agudo (Schiller et al., 1992; Detke et al.; 1995). Esse talvez seja também o perfil de ratos SHR, já que neste estudo não foi encontrada resposta efetiva à imipramina. Além disso, nenhum resultado pode ser conclusivo antes que uma avaliação mais ampla (doses, compostos, tratamentos) seja realizada com ratos SHR. Para alguns autores, os efeitos psiconeuroendócrinos de antidepressivos dependem fortemente do status genético do indivíduo. Por exemplo, a fluoxetina, um SSRI, através de administração aguda 1 hora antes do teste do LCE, dispara hipolocomoção e ansiedade em ratos SHR (Durand et al., 1999; Durand et al., 2000). Foi visto que a enzima citocromo P450 2D1, a principal enzima envolvida no metabolismo de drogas como a imipramina, exibe atividade semelhante em ratos SHR e WKY, embora estas linhagens possam às vezes responder de forma distinta ao mesmo fármaco. Provavelmente as vias metabólicas também estejam participando e influenciando as diferentes respostas ao mesmo antidepressivo em SHR e WKY (Hoffmann et al., 1998). A falta de responsividade a certas drogas antidepressivas pode também não estar envolvida somente com diferenças na farmacocinética, mas também com alterações específicas em neurotransmissores em certas regiões do encéfalo que atuam no controle do comportamento exibido no TNF (Lahmame et al., 1997). Assim, a variabilidade genética na farmacocinética de drogas entre muitos outros aspectos, devem ser levados em conta quando se examinam os efeitos desses fármacos em diferentes linhagens de roedores.

## **6.6. Conclusão**

Observando-se conjuntamente todos os resultados alcançados neste estudo, foi possível notar que as diferenças comportamentais detectadas em trabalhos anteriores utilizando as linhagens Lewis, SHR, Floripa H e Floripa L, foram mantidas em grande parte dos testes realizados. Nos modelos animais de depressão, apenas no TNF esse contraste entre as linhagens de ratos se mostrou evidenciado; isso talvez se deva ao fato de que, apesar de serem paradigmas similares, o TNF e o TSC podem estar avaliando diferentes aspectos comportamentais ou podem ser influenciados por fatores distintos.

As linhagens LEW e SHR mostram-se como um excelente modelo genético para o estudo da ansiedade e também da depressão, visto que o TNF evidenciou diferenças entre elas; que a imipramina foi eficaz para a redução do tempo de imobilidade dos ratos LEW, considerados os mais emocionalmente reativos; que as diferenças para medidas de ansiedade foram claras e consistentes; e que os ratos LEW e SHR não diferiram quanto à locomoção espontânea. Apesar desses dados bastante positivos, é necessário ampliar cada vez mais os estudos concernentes às diferenças entre essas linhagens, buscando outros aspectos ainda não pesquisados para chegar a uma definição conclusiva. As linhagens Floripa H e Floripa L não se mostraram tão contrastantes em algumas variáveis de certos modelos animais, mas foram distintas em suas respostas no TNF, sendo portanto, necessário averiguar mais profundamente seu perfil comportamental.

## ***APÊNDICE***

1. O termo depressão pode significar um sintoma que faz parte de inúmeros distúrbios emocionais sem ser exclusivo de nenhum deles e pode significar uma síndrome traduzida por muitos e variáveis sintomas somáticos com marcantes alterações afetivas. Os sintomas da depressão humana poderiam ser agrupados em duas categorias: a) relativos à cognição, como humor deprimido, culpa, desespero, anedonia e b) relativos às funções somáticas, como a anorexia, insônia, retardo psicomotor e perda de peso, entre outros (Blazer, 2000). Além destes sintomas mencionados, há ainda o alto risco de tentativas de suicídio, associadas a pensamentos de morte, que podem culminar com o próprio ato, que se apresenta entre 15 e 30% dos casos de depressão maior (Blazer, 2000). como a distimia, um transtorno do humor com sintomas depressivos mais leves do que os da depressão maior (também chamado de transtorno afetivo unipolar). Apresenta-se também em outro transtorno do humor, o transtorno afetivo bipolar, no qual o paciente, como o próprio nome implica, alterna-se entre o pólo depressivo e outro pólo do humor, chamado mania (Plomin et al., 1997). Mania envolve euforia, insônia, excessiva eloquência, hiperatividade e comportamento disperso (Plomin et al., 1997).

2. Transtornos psiquiátricos são traços quantitativos e cada um dos genes influenciando são chamados de poligenes. As regiões cromossômicas onde os poligenes podem ser encontrados são os QTL. Assim, o mapeamento de QTL é definido como o posicionamento de fragmentos cromossômicos contendo genes relacionados com fenótipos quantitativamente medidos (Plomin et al., 1997). A identificação inicial de QTLs envolve a observação de vários indivíduos, correlacionando-se a posse de alelos específicos em marcadores genéticos colocados ao longo do genoma com o grau de expressão do traço quantitativo (Snustad et al., 1997; Bordkin & Nestler, 1998; Crabbe et al., 1999). A genética quantitativa, portanto, permite a avaliação da “linha de base” de efeitos genéticos transmissíveis no comportamento, apesar do grande número de genes envolvidos, da complexidade de sua interação e da influência de fatores não-genéticos (Plomin et al., 1994; Turri et al., 2001).

3. Os modelos animais de ansiedade exploram uma ampla variedade de parâmetros comportamentais, como esquiva, defecação, entre outros, dentro do repertório natural dos roedores, passando a ser interpretados como “ansiedade” (em inglês, *anxiety-like*).

4. Os inúmeros modelos animais de ansiedade se baseiam na exposição dos animais, por um determinado período de tempo, a vários estímulos aversivos, onde se observa a exploração espontânea ou a esquiva nessa situação nova, assim como a forma de lidar com o estressor (Ramos & Mormède, 1998; Finn et al., 2003; Andrade et al., 2003). Os estímulos aversivos usados nos testes comportamentais de ansiedade, podem ser de diferente natureza: física (temperaturas extremas, privação de alimento, choques elétricos, entre outros), química (drogas ansiogênicas, aminoácidos excitatórios, etc.) ou psicológica (áreas abertas, alta iluminação, alturas, etc.) (Ramos & Mormède, 1998; Ohl et al., 2002).

5. O aparato, em forma de cruz, apresenta quatro braços (dois fechados e dois abertos) distantes do chão, com uma plataforma central ao meio. Os animais são colocados nessa plataforma por 5 minutos e medidas comportamentais são registradas, como o número de entradas nos dois tipos de braços e a porcentagem de entradas nos braços abertos, esta última sendo um parâmetro clássico do modelo, usada como medida de resposta de medo (Ramos & Mormède, 1998).

6. As características físicas do aparato são variáveis, sendo possível encontrá-lo em formato circular, quadrado ou retangular. O chão do aparato pode apresentar-se dividido em seções, sendo sempre circundado por paredes (Walsh & Cummings, 1976). O procedimento consiste em colocar o animal geralmente no centro do aparato por um determinado período de tempo, onde uma série de parâmetros comportamentais são então registrados: locomoção na área central (longe das paredes), tempo gasto na área central, locomoção periférica, locomoção total, defecação, “congelamento”, auto-limpeza, vocalização, avaliação de risco, tigmotaxia e levantar-se sobre as patas traseiras (Treit & Fundytus, 1989; Abel, 1995; Ramos & Mormède, 1998; Choleris et al., 2001).

7. Pré-requisitos essenciais para um modelo animal de depressão: a) ser razoavelmente análogo ao transtorno humano em suas manifestações ou sintomatologia, b) apresentar uma mudança comportamental que possa ser monitorada objetivamente, c) as mudanças comportamentais devem ser revertidas por tratamentos que se aplicam em humanos e d) deve ser possível reproduzi-lo em qualquer laboratório do mundo e por qualquer pesquisador.

8. Os modelos animais de depressão buscam traçar uma linha de ligação entre o transtorno humano e o comportamento animal (Knapp et al., 2002). Uma ligação entre a depressão humana e o comportamento submisso de animais foi estudado (Zagrodzka et al., 1985) demonstrando-se que os animais subordinados apresentam comportamento defensivo elevado, perda de peso e alterações significativas no sono, na ingestão de alimentos e atividades. Algumas pesquisas demonstraram que animais submissos se tornavam dominantes após tratamento com drogas antidepressivas, como a imipramina (Zagrodzka et al., 1985).

9. O TNF consiste em colocar o animal em um tanque com água. No procedimento, quando realizado com camundongos, uma exposição é suficiente para gerar uma imobilidade estável que pode ser reduzida por tratamento agudo com agentes antidepressivos, por razões ainda não totalmente esclarecidas (Cryan et al., 2002). Todavia, quando ratos são utilizados no experimento, o TNF é geralmente dividido em uma pré-exposição (pré-teste) com duração de 15 minutos e 24 horas depois, um teste de 5 minutos, para avaliar os níveis de atividade/imobilidade.

10. Parâmetros do TNFM: comportamento de escalada (“*climbing*”), definido como movimentos vigorosos de propulsão para cima com as patas dianteiras colocadas contra a parede do tanque; o comportamento de natação, geralmente em posição horizontal, pelo qual o animal se locomove em círculos na cuba cilíndrica; os movimentos da cabeça (“*head-shakes*”), que consistem em suaves sacudidelas que o animal exhibe freqüentemente; defecação, onde o número de bolos fecais deixados no tanque após o teste são registrados e por fim, o comportamento de mergulho (“*diving*”), que o animal mostra ao nadar até o

fundo da cuba, para alguns autores talvez buscando uma saída (Armario et al., 1988; Detke & Lucki, 1996; Barros & Ferigolo, 1998; Gambarana et al., 2001).

11. No TSC, os animais são suspensos pela cauda e sob suas patas dianteiras é colocada uma plataforma (Izumi et al., 1997), que minimiza o peso sustentado pela cauda para evitar ferimentos. Considera-se a imobilidade como um comportamento farmacologicamente relacionado à depressão (Stéru et al., 1985), já que pode ser reduzido pelo uso de drogas antidepressivas (Thierry et al., 1986; Trullas et al., 1989; Pal & Dandiya, 1993; Yoshikawa et al., 2002; Ripoll et al., 2003). Do ponto de vista etológico, essa alternância entre movimento e passividade possui um valor adaptativo, pois um indivíduo submetido a uma situação aversiva sem solução pode escolher dois padrões de comportamento: buscar uma solução através de atividade motora intensa e gasto de energia ou esperar uma solução acontecer, através da imobilidade e economia energética. Para a grande maioria dos indivíduos, a melhor opção é alternar os dois padrões. Chermat et al. (1986) propuseram que as drogas antidepressivas modificariam o balanço entre espera e busca, reduzindo o período de espera.

12. A linhagem SHR, foi originalmente selecionada para o estudo da hipertensão humana por Okamoto & Aoki (1963), a partir do cruzamento de um macho Wistar que exibia pressão arterial muito elevada (“hipertensão espontânea”) com uma fêmea também Wistar com pressão arterial um pouco acima da média. Desta forma, os ratos SHR apresentam tendência a desenvolver a hipertensão arterial, ao contrário de sua linhagem controle WKY, normotensa. O maior fator no desenvolvimento da hipertensão durante a primeira etapa de vida é um aumento na atividade simpática, assim como o aumento na espessura da camada muscular dos vasos sanguíneos (Hendley et al., 1988).

13. A linhagem de ratos LEW é utilizada como modelo tanto para doenças autoimunes e inflamatórias (encefalomielite, artrite) como para transtornos comportamentais. Essa vulnerabilidade a doenças autoimunes decorre da baixa reatividade do seu eixo HPA (Glowa et al., 1992). Os ratos LEW têm sido usados para avaliar a influência genética na resposta imune, regulação do eixo HPA, padrões comportamentais e

até mesmo dependência a drogas (Camp et al., 1994). Neste último item, tem sido documentado que os animais desta linhagem exibem uma alta propensão ao abuso de drogas psicoativas (Camp et al., 1994).

14. Os experimentos que envolvem seleção comportamental dão uma clara evidência da influência genética no comportamento, já que se um traço é hereditário, deve ser possível aumentá-lo ou diminuí-lo através da seleção de indivíduos extremos para aquele traço (Plomin et al., 1994). Esses experimentos tipicamente selecionam linhagens para alta e baixa expressão de um determinado fenótipo comportamental, a chamada seleção bidirecional.

15. Na década de 60, foi realizada uma seleção bidirecional para a performance de ratos no teste da “*shuttle box*”. Os animais eram treinados para associar a luz (estímulo condicionado) com a liberação de choque e assim evitá-lo, movendo-se para o outro compartimento do aparato (esquiva ativa). Bignami, a partir do comportamento analisado (velocidade de aquisição do comportamento de esquiva), estabeleceu as duas linhagens ratos Romanos de alta esquiva (RHA) e baixa esquiva (RLA) e, após 5 gerações de seleção, os ratos RHA eram mais rápidos e melhores na fuga do que os RLA. Ou seja, ao longo das gerações o processo de seleção foi bem-sucedido e esse resultado somente poderia ocorrer se a hereditariedade fosse algo importante (Plomin, 1994).

16. No etograma inúmeras funções comportamentais são consideradas: locomoção, repouso, interação social, ingestão de alimentos, auto-limpeza, entre outras (Heinrichs, 2001; Galani et al., 2001). Dentre os diferentes aspectos comportamentais avaliados nas baterias de testes, usados como modelos de ansiedade e depressão, encontra-se a atividade locomotora, um componente significativo em vários modelos animais. Existe realmente uma forte ligação entre emocionalidade e atividade motora (Galani et al., 2001; Tang et al., 2002) e a determinação da atividade locomotora em um roedor experimental pode ser bastante útil quando avaliada em paralelo com outras funções comportamentais (Casadesus et al., 2001; Galani et al., 2001).

17. As drogas antidepressivas estão classificadas em quatro categorias: a) inibidores da monoaminoxidase; b) tricíclicos; c) inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS) e d) antidepressivos “atípicos”.

18. Na década de 60, Schildkraut propôs um teoria neuroquímica de transtornos afetivos, a hipótese monoaminérgica, que estabelece que um déficit funcional dos transmissores da monoamina em algumas regiões do encéfalo levaria à depressão (Rang et al., 2001). A monoaminoxidase (MAO) é uma enzima envolvida no metabolismo da serotonina e dos neurotransmissores catecolaminérgicos, tais como adrenalina, noradrenalina e dopamina (Fava & Kendler, 2000). A teoria de Schildkraut se baseou na observação de que agentes antidepressivos como os IMAO (isocarboxazida, tranilcipromina, iproniazida, entre outros) facilitavam a transmissão monoaminérgica enquanto que outras drogas como a reserpina, levavam a distúrbios de humor. No início, essa hipótese considerava a noradrenalina e, mais tarde, através de inúmeras pesquisas realizadas, foi visto que a serotonina (5-HT) seria a substância principal. Evidências farmacológicas demonstraram que a hipótese monoaminérgica da depressão, em sua forma mais sucinta, não é sustentável, embora atualmente, as drogas utilizadas para o tratamento de transtornos afetivos tenham como alvo as monoaminas no encéfalo (Licínio & Wong, 2001).

## ***7. Referências Bibliográficas***

ABEL, E.L.; ALTMAN, H.J.; COMMISSARIS, R.L. Maudsley reactive and nonreactive rats in the forced swim test: comparison in fresh water and soiled water. **Physiology and Behavior**, 52: 1117-1119; 1992.

ABEL, E.L. Behavioral and physiological effects of different water depths in the forced swim test. **Physiology & Behavior**, 56 (2): 411-414; 1994.

ABEL, E.L. Circannual changes in the duration of the immobility response of rats in the forced swim test. **Physiology and Behavior**, 58 (3): 591-593; 1995.

AGUILAR, R.; FLINT, J.; GRAY, J.A.; DAWSON, G.R.; DRISCOLL, P.; GIMÉNEZ-LLORT, L.; ESCORIHUELA, R.M.; FERNÁNDEZ-TERUEL, A.; TOBEÑA, A. Learned fear, emotional reactivity and fear of heights: a factor analytic map from a large F2 intercross of Roman rat strains. **Brain Research Bulletin**, 57 (1): 17-26; 2002.

ALBONETTI, M.E.; FARABOLLINI, F. Social stress by repeated defeat: effect on social behavior and emotionality. **Behavior Brain Research**, 62: 187-193; 1994.

ALONSO, S.J.; CASTELLANO, M.A.; AFONSO, D.; RODRIGUEZ, M. Sex differences in behavioral despair: relationships between behavioral despair and open field activity. **Physiology and Behavior**, 49: 69-72; 1991.

ALCOCK, J. A textbook history of animal behaviour. **Animal Behaviour**, 65: 3-10; 2003.

ANDRADE, M.M.M.; TOMÉ, M.F.; SANTIAGO, E.S.; SANTOS, A.L.; ANDRADE, T.G.C.S. Longitudinal study of daily variation of rats' behavior in the elevated plus-maze. **Physiology and Behavior**, 78: 125-133; 2003.

ANDREATINI, R.; BACELLAR, L. F. S. Animal models: Trait or state measure? The test-retest reliability of the Elevated Plus Maze and Behavioral Despair. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, 24 (4): 549-560; 2000.

ARMARIO, A.; GAVALDÀ, A.; MARTÍ, O. Forced swimming test in rats: effect of desipramine administration and the period of exposure to the test on struggling behavior, swimming, immobility and defecation rate. **European Journal of Pharmacology**, 158: 207-212; 1988.

ARMARIO, A.; GAVALDÀ, A.; MARTÍ, O. Comparison of the behavioural and endocrine response to forced swimming stress in five inbred strains of rats. **Psychoneuroendocrinology**, 20 (8): 879-890; 1995.

BAI, F.; CLAY, M.; LINDSTROM, T.; SKOLNICK, P. Intra and interstrain differences in models of "behavioral despair". **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 70: 187-192; 2001.

BARNETT, S.A. Rats. **Scientific American**, 216: 79-85; 1967.

BARROS, H.M.T.; FERIGOLO, M. Ethopharmacology of imipramine in the forced-swimming test: gender differences. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 23: 279-286; 1998.

BEARDEN, C.E.; REUS, V.I.; FREIMER, N.B. Why genetic investigation of psychiatric disorders is so difficult? **Current Opinion in Genetics and Development**, 14: 280-286; 2004.

BEAUFOUR, C.C.; BALLON, N.; LE BIHAN, C.; HAMON, M.; THIÉBOT, M.H. Effects of chronic antidepressants in an operant conflict procedure of anxiety in the rat. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 62 (4): 591-599; 1999.

BECKER, A.; GRECKSCH, G. Illumination has no effect on rats' behavior in the elevated plus-maze. **Physiology and Behavior**, 59 (6): 1175-1177; 1996.

BELZUNG, C.; LE PAPE, G. Comparison of different behavioral test situations used in psychopharmacology for measurement of anxiety. **Physiology and Behavior**, 56 (3): 623-628; 1994.

BERTOGLIO, L.J.; 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. **Behavioral Brain Research**, 132(2): 135-143; 2002.

BERTON, O.; AGUERRE, S.; SARRIEAU, A.; MORMÈDE, P.; CHAOULOFF, F. Differential effects of social stress on central serotonergic activity and emotional reactivity in Lewis and Spontaneously Hypertensive rats. **Neuroscience**, 82 (1): 147-159; 1998.

BIGNAMI, G. Selection for high rates and low rates of avoidance conditioning in the rat. **Animal Behaviour**, 13: 221-227; 1965.

BLANCHARD, R.J.; BLANCHARD, D.C. Bringing natural behaviors into the laboratory: a tribute to Paul McLean. **Physiology and Behavior**, 79: 515-524; 2003.

BLAZER, D.G. Mood disorders: epidemiology. **In Comprehensive Textbook of Psychiatry**, B.J. Sadock and V.A. Sadock, eds., New York; Lippincott, Williams & Wilkins, 2000.

BORSINI, F.; MELI, A. Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity? **Psychopharmacology**; 94: 147-160; 1988.

BORSINI, F. Role of serotonergic system in the forced swimming test. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 19: 377-395; 1995.

BOUWKNECHT, J.A.; PAYLOR, R. Behavioral and physiological mouse assays for anxiety : a survey in nine mouse strains. **Behavioral Brain Research**, 136: 489-501; 2002.

BROADHURST, P.L. A note on further progress in a psychogenetic selection experiment. **Psychological Reports**, 10: 65-66; 1962.

BRODKIN, E.S.; NESTLER, E.J. Quantitative trait locus analysis: a new tool for psychiatric genetics. **Neuroscientist**, 4: 317-323; 1998.

BRUSH, F.R.; GENDRON, C.M.; ISAACSON, M.D. A selective genetic analysis of the Syracuse high and low avoidance (SHA/Bru and SLA/Bru) strains of rats (*Rattus norvegicus*). **Behavioural Brain Research**, 106: 1-11; 1999.

BRUSH, F.R.; DRISCOLL, P. Selective breeding programs with rats: introduction. **Behavior Genetics**, 32 (5): 275-276; 2002.

CALATAYUD, F.; BELZUNG, C. Emotional reactivity in mice, a case of nongenetic heredity? **Physiology and Behavior**, 74: 355-362; 2001.

CALDJI, C.; DIORIO, J.; MEENEY, M.J. Variations in maternal care in infancy regulate de development of stress reactivity. **Biological Psychiatry**, 48: 1164-1174; 2000.

CAMP, D.M.; BROWMAN, K.E.; ROBINSON, T.E. The effects of methamphetamine and cocaine on motor behavior and extracellular dopamine in ventral striatum of Lewis versus Fischer 344 rats. **Brain Research**, 668: 180-193; 1994.

CAROLA, V.; D'OLIMPIO, F.; BRUNAMONTI, E.; MANGIA, F.; RENZI, P. Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice. **Behavioural Brain Research**, 134: 49-57; 2002.

CASADESUS, G.; SHUKITT-HALE, B.; JOSEPH, J.A. Automated measurement of age related changes in the locomotor response environmental novelty and home-cage activity. **Mechanisms of Ageing and Development**, 122: 1887-1897.

CASPI, A.; SUGDEN, K.; MOFFITT, T.E.; TAYLOR, A.; CRAIG, I.W.; HARRINGTON, H.; McCLAY, J.; MILL, J.; MARTIN, J.; BRAITHWAITE, A.; POULTON, R. Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. **Science**, 301: 386-389, 2003.

CHAOULOFF, F.; CASTANON, N.; MORMÈDE, P. Paradoxical differences in animal models of anxiety among the Roman rat lines. **Neuroscience Letters**, 182: 217-221; 1994.

CHAOULOFF, F.; KULIKOV, A.; SARRIEAU, A.; CASTANON, N.; MORMÈDE, P. Male Fischer 344 and Lewis rats display differences in locomotor reactivity but not in anxiety-related behaviors : relationship with the hippocampal serotonergic system. **Brain Research**, 693: 169-178; 1995.

CHAPILLON, P.; MANNECHÉ, C.; BELZUNG, C.; CASTON, J. Rearing environmental enrichment in two inbred strains of mice: 1. Effects on emotional reactivity. **Behavior Genetics**, 29(1): 41-46; 1999.

CHERMAT, R.; THIERRY, B.; MICO, J.A.; STÉRU, L.; SIMON, P. Adaptation of the tail suspension test to the rat. **Journal de Pharmacologie**, 17 (3): 348-350; 1986.

CHOLERIS, E.; THOMAS, A.W.; KAVALIERS, M.; PRATO, F.S. A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 25: 235-260; 2001.

CHROUSOS, G.P.; GOLD, P.W. The concepts of stress and stress system disorders: Overview of physical and behavioral homeostasis. **Journal of the American Medical Association**, 267: 1244-1252, 1992.

CHROUSOS, G.P.; GOLD, P.W. A healthy body in a healthy mind- and *vice-versa*-The damaging power of “uncontrollable” stress. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, 83(6): 1842-1845; 1998.

CLÈMENT, Y.; PROESCHEL, M.F.; BONDOUX, D.; GIRARD, F.; LAUNAY, J.M.; CHAPOUTHIER, G. Genetic factors regulate processes related to anxiety in mice. **Brain Research**, 752: 127-135; 1997.

CLÈMENT, Y.; CHAPOUTHIER, G. Biological bases of anxiety. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 22(5): 623-633, 1998.

CLÈMENT, Y.; CALATAYUD, F.; BELZUNG, C. Genetic basis of anxiety-like behaviour: a critical review. **Brain Research Bulletin**, 57 (1): 57-71; 2002.

CLIFTON, P.G. Meal patterning in rodents: psychopharmacological and neuroanatomical studies. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 24: 213-222; 2000.

CLONINGER, C.R. The discovery of susceptibility genes for mental disorders. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 99 (21): 13365-13367; 2002.

COMMISSARIS, R.L.; VERBANAC, J.S.; MARKOVSKA, V.L.; ALTMAN, H.J.; HILL, T.J. Anxiety-like and depression-like behavior in Maudsley reactive (MR) and non-reactive (NMRA) rats. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, 20: 491-501; 1996.

CONNOR, K.M.; DAVIDSON, J.R.T. Generalized anxiety disorder: neurobiological and pharmacotherapeutic perspectives. **Biological Psychiatry**, 44: 1286-1294; 1998.

CORDÁS, T.A. **Depressão : da bile negra aos neurotransmissores. Uma introdução histórica.** 1ª edição, São Paulo, Lemos Editorial; 2002.

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

COURVOISIER, H.; MOISAN, M.P.; SARRIEAU, A.; HENDLEY, E.D.; MORMÈDE, P. Behavioral and neuroendocrine reactivity to stress in the WKHA/WKY inbred rat strains: a multifactorial and genetic analysis. **Brain Research**, 743: 77-85; 1996.

COX, B.J.; ENNS, M.W.; FREEMAN, P.; WALKER, J.R. Anxiety sensitivity and major depression: examination of affective state dependence. **Behaviour Research and Therapy**, 39: 1349-1356, 2001.

CRABBE, J.C.; PHILIPS, T.J.; BUCK, K.J.; CUNNINGHAM, C.L.; BELKNAP, J.K. Identifying genes for alcohol and drug sensitivity: recent progress and future directions. **Trends in Neuroscience**, 22(4): 173-178; 1999.

CRUZ, A.P.M.; FREI, F.; GRAEFF, F.G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 49 (1): 171-176; 1994.

CRYAN, J.F.; MARKOU, A.; LUCKI, I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. **Trends in Pharmacological Sciences**, 23 (5): 238-245; 2002.

D'AQUILA, P.S.; PEANA, A.T.; CARBONI, V.; SERRA, G. Exploratory behaviour and grooming after repeated restraint and chronic mild stress: effects of desipramine. **European Journal of Pharmacology**, 399: 43-47, 2000.

DAWSON, G.R.; TRICKLEBANK, M.D. Use of the elevated plus maze in the search for novel anxiolytic agents. **Trends in Pharmacological Sciences**, 16: 33-36; 1995.

DeFRIES, J.C.; GERVAIS, M.C.; THOMAS, E.A. Response to 30 generations of selection for open field activity in laboratory mice. **Behavior Genetics**, 8: 3-13; 1978.

DePABLO, J.M.; PARRA, A.; SEGOVIA, S.; GUILLAMÓN, A. Learned immobility explains the behavior of rats in the forced swimming test. **Physiology and Behavior**, 46: 229-237; 1989.

DETKE, M.J.; RICKELS, M.; LUCKI, I. Active behaviors in the rat forced swimming test differentially activated by serotonergic and noradrenergic antidepressants. **Psychopharmacology**, 121: 66-72; 1995.

DETKE, M.J.; LUCKI, I. Detection of serotonergic and noradrenergic antidepressants in the rat forced swimming test: the effects of water depth. **Behavioral Brain Research**, 73: 43-46; 1996.

DIAGNOSTIC AND STATISTICAL MANUAL OF MENTAL DISORDERS - IV. American Psychiatric Press, Washington D.C., 2000.

DICHTER, G.S.; BRUNELLI, S.A.; HOFER, M.A. Elevated plus-maze behavior in adult offspring of selectively bred rats. **Physiology and Behavior**, 60 (1): 299-304; 1996.

DIXON, A.K.; FISCH, H.U. Animal models and ethological strategies for early drug-testing in humans. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 23: 345-358; 1999.

DURAND, M.; BERTON, O.; AGUERRE, S.; EDNO, L.; COMBOURIEU, L.; MORMEDE, P.; CHAOULOFF, F. Effects of repeated fluoxetine on anxiety-related behaviours, central serotonergic systems and the corticotropic axis in SHR and WKY rats. **Neuropharmacology**, 38: 893-907; 1999.

DURAND, M.; AGUERRE, S.; FERNANDEZ, F.; EDNO, L.; COMBOURIEU, I.; MORMEDE, P.; CHAOULOFF, F. Strain-dependent neurochemical and neuroendocrine effects of desipramine, but not fluoxetine or imipramine, in Spontaneously Hypertensive and Wistar-Kyoto rats. **Neuropharmacology**, 39: 2464-2477; 2000.

DURCAN, M.J.; LISTER, R.G.; ECKHARDT, M.J.; LINNOILA, M. Behavioral interactions of fluoxetine and other 5-hydroxytryptamine uptake inhibitors with ethanol in tests of anxiety, locomotion and exploration. **Psychopharmacology**, 96: 528-533; 1988.

EVENDEN, J.; MEYERSON, B. The behavior of Spontaneously Hypertensive and Wistar-Kyoto rats under a paced fixed consecutive number schedule of reinforcement. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 63 (1): 71-82; 1999.

FAVA, M.; KENDLER, K.S. Major depressive disorder. **Neuron**, 28: 335-341; 2000.

FAVA, M.; ROSENBAUM, J.F.; HOOG, S.L.; TEPNER, R.G.; KOPP, J.B.; NILSSON, M.E. Fluoxetine versus sertraline and paroxetine in major depression: tolerability and efficacy in anxious depression. **Journal of Affective Disorders**, 59: 119-126; 2000.

FELSENFELD, G.; GROUDINEIN, M. Controlling the double helix. **Nature**, 421 (23): 448-453; 2003.

FENDT, M.; FANSELOW, M.S. The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 23: 743-760; 1999.

FERGUSON, S.A.; CADA, A.M. Spatial learning/memory and social and nonsocial behaviors in the Spontaneously Hypertensive, Wistar-Kyoto and Sprague-Dawley rat strains. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 77: 583-594; 2004.

FERNANDES, C.; FILE, S.E. The influence of open arm ledges and maze experience in the elevated plus-maze. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 54 (1): 31-40; 1996.

FILE, S.E. Animal models of different anxiety states. **GABA<sub>A</sub> Receptors and anxiety. From neurobiology to treatment.** Raven Press, New York; 1995.

FILE, S.E. Anxiolytic action of neurokinin 1 receptor antagonist in the social interaction test. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 58 : 747-752; 1997.

FINN, D.A.; RUTLEDGE-GORMAN, M.; CRABBE, J.C. Genetic animal models of anxiety. **Neurogenetics**, 4: 109-135; 2003.

FLINT, J. The genetic basis of neuroticism. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 28: 307-316; 2004.

FUJITA, S.; OKUTSU, H.; YAMAGUCHI, H.; NAKAMURA, S.; ADACHI, K.; SAIGUSA, T.; KOSHIKAWA, N. Altered pre and postsynaptic dopamine receptor functions in spontaneously hypertensive rat: an animal model of attention-deficit hyperactivity disorder. **Journal of Oral Science**, 45 (2): 75-83; 2003.

GALANI, R.; DUCONSEILLE, E.; BILDSTEIN, O.; CASSEL, J.C. Effects of room and cage familiarity on locomotor activity measures in rats. **Physiology and Behavior**, 74: 1-4; 2001.

GAMBARANA, C.; SCHEGGI, S.; TAGLIAMONTE, A.; TOLU, P.; DeMONTIS, M.G. Animal models for the study of antidepressant activity. **Brain Research Protocols**, 7: 11-20; 2001.

GLOWA, J.R.; STERNBERG, E.M.; GOLD, P.W. Differential behavioral response in LEW/N and F344/N rats: effects of corticotropin releasing hormone. **Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry**, 16: 549-560; 1992.

GONZÁLEZ, L.E.; FILE, S.E.; OVERSTREET, D.H. Selectively bred lines of rats differ in social interaction and hippocampal 5-HT<sub>1A</sub> receptor function: a link between anxiety and depression ? **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 59 (4): 787-792; 1998.

GRIEBEL, G.; BLANCHARD, D.C.; BLANCHARD, R.J. Evidence that the behaviors in the mouse defense test battery relate to different emotional states: a factor analytic study. **Physiology and Behavior**, 60 (5): 1255-1260; 1996.

HALL, C.S. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. **Journal of Comparative Psychology**, 18: 385-403; 1934.

HALL, C.S. Emotional behavior in the rat. III. The relationship between emotionality and ambulatory activity. **Journal of Comparative Psychology**, 22: 345-352; 1936.

HANDLEY, S.L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze exploration model of “fear” motivated behavior. **Naunyn Schmiedebergs Archives of Pharmacology**, 327 (1): 1-5; 1984.

HARRIS, H.W.; NESTLER, E.J. Immunohistochemical studies of mesolimbic dopaminergic neurons in Fischer 344 and Lewis rats. **Brain Research**, 706: 1-12; 1996.

HÉDOU, G., PRICE, C., Di IORIO, L., HEIDBREDER, C. A., FELDON, J. An automated analysis of rat behavior in the forced swim test. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 70: 65-76; 2001.

HEINRICHS, S.C. Mouse feeding behavior: ethology, regulatory mechanisms and utility for mutant phenotyping. **Behavioural Brain Research**, 125: 81-88; 2001.

HENDLEY, E.D.; CIERPIAL, M.A.; McCARTY, R. Sympathetic-adrenal medullary response to stress in hyperactive and hypertensive rats. **Physiology and Behavior**, 44: 47-51; 1988.

HENDLEY, E.D.; OHLSSON, W.G.; MUSTY, R.E. Interstrain aggression in hypertensive and/or hyperactive rats: SHR, WKY, WKHA, WKHT. **Physiology and Behavior**, 51: 1041-1046; 1992.

HENDLEY, E. D. WKHA rats with genetic hyperactivity and hyperreactivity to stress: a review. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 24 : 41-44, 2000.

HENN, F.A.; MCKINNEY, W.T. **Animal models in psychiatry. Psychopharmacology: the third generation of progress.** H.Y. Meltzer, Raven Press, New York; 1987.

HENNIGER, M.S.H.; OHL, F.; HÖLTER, S.M.; WEISSENBACHER, P.; TOSCHI, N.; LÖRSCHER, P.; WIGGER, A.; SPANAGEL, R.; LANDGRAF, R. Unconditioned anxiety and social behaviour in two rat lines selectively bred for high and low anxiety-related behaviour. **Behavioural Brain Research**, 111: 153-163; 2000.

HERMAN, J.P.; CULLINAN, W. E. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. **Trends in Neuroscience**, 20: 78-84; 1997.

HOFFMANN, O.; PLESAN, A.; WIESENFELD-HALLIN, Z. Genetic differences in morphine sensitivity, tolerance and withdrawal in rats. **Brain Research**, 806: 232-237; 1998.

HOGG, S. A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 54: 21-30; 1996.

HUBBARD, J.R.; WORKMAN, E.A. **Handbook of Stress Medicine: An organ system approach.** 6<sup>th</sup> edition; Copyright Clearance Center, Boca Raton, FL; USA; 1998.

INOUE, K.; LUPSKI, J.R. Genetics and genomics of behavioral and psychiatric disorders. **Current Opinion in Genetics and Development**, 13: 303-309; 2003.

IZUMI, J., WASHIZUKA, M., KUWABARA, Y. H., YOSHINAGA, K., TANAKA, Y., IKEDA, Y., KIUCHI, Y., OGUCHI, K. Evidence for a depressive-like state induced by repeated saline injections in Fischer 344 rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 57 (4): 883-888; 1997.

JOHNSTON, A.L.; FILE, S.E. Sex differences in animal tests of anxiety. **Physiology and Behavior**, 49: 245-250; 1991.

JONES, I.; SCOURFIELD, J.; McCANDLESS, F.; CRADDOCK, N. Attitudes towards future testing for bipolar disorder susceptibility genes: a preliminary investigation. **Journal of Affective Disorders**, 71: 189-193; 2002.

KATZ, R.J.; SCHMALTZ, K. Dopaminergic involvement in attention. A novel animal model. **Progress in Neuropsychopharmacology**, 4: 585-590; 1980.

KATZ, R.J. Animal models and human depressive disorders. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 5: 231-246; 1981.

KEAY, K.A., BANDLER, R. Parallel circuits mediating distinct emotional coping reactions to different types of stress. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 25: 669-678; 2001.

KESSLER, R.C. The effects of stressful life events on depression. **Archives of General Psychiatry**, 56: 322-327; 1997.

KLENEROVÁ, V.; KAMINSKÝ, O.; SÍDA, P.; KREJČÍ, I.; HLINÁK, Z.; HYNIE, S. Impaired passive avoidance acquisition in Sprague-Dawley and Lewis rats after restraint and cold stress. **Behavioural Brain Research**, 136: 21-29; 2002.

KNAPP, R.J.; GOLDENBERG, R.; SHUCK, C.; CECIL, A.; WATKINS, J.; MILLER, C.; CRITES, G.; MALATYNSKA, E. Antidepressant activity of memory-enhancing drugs in the reduction of submissive behavior model. **European Journal of Pharmacology**, 440: 27-35; 2002.

KOMOROWSKA, J.; PELLI, S.M. Regulatory mechanisms underlying novelty-induced grooming in the laboratory rat. **Behavioural Processes**, 67: 287-293; 2004.

KOOLHAAS, J.M.; KORTE, S.M.; DeBOER, S.F.; VanDerVEGT, B.J.; VanREENEN, C.G.; HOPSTER, H. DeJONG, I.C.; RUIS, M.A.W.; BLOKHUIS, H.J. Coping styles in animals: current status in behavior and stress-physiology. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 23: 925-935; 1999.

KRISHNAN, K.R.R. Comorbidity and depression treatment. **Biological Psychiatry**, 53: 701-706; 2003.

LAHMAME, A., ARMARIO, A. Differential responsiveness of inbred strains of rats to antidepressants in the forced swimming test: are Wistar Kyoto rats an animal model of subsensitivity to antidepressants? **Psychopharmacology**, 123: 191-198; 1996.

LAHMAME, A.; DEL ARCO, C.; PAZOS, A.; YRITIA, M.; ARMARIO, A. Are Wistar Kyoto rats a genetic model of depression resistant to antidepressants? **European Journal of Pharmacology**, 337: 115-123; 1997.

LANDER, E.S.; SCHORK, N.J. Genetic dissection of complex traits. **Science**, 265: 2037-2048; 1994.

LANDGRAF, R. HAB/LAB rats: an animal model of extremes in trait anxiety and depression. **Clinical Neuroscience Research**, 3v: 239-244; 2003.

LeDOUX, J.E., SAKAGUCHI, A., REIS, D.J. Strain differences in fear between Spontaneously Hypertensive and Normotensive rats. **Brain Research**, 277:137-143; 1983.

LeDOUX, J.E. The neural circuits underlying anxiety and fear. Fear and the brain: where have we been, and where are we going? **Biological Psychiatry**, 44: 1229-1238; 1998.

LICINIO, J.; WONG, M.L. The pharmacogenomics of depression. **The Pharmacogenomics Journal**, 1: 175-177; 2001.

LIEBSCH, G.; MONTKOWSKI, A.; HOLSBOER, F.; LANDGRAF, R. Behavioural profiles of two Wistar rat lines selectively bred for high or low anxiety-related behaviour. **Behavioural Brain Research**, 94: 301-310; 1998.

LISTER, R. G. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. **Pharmacol. Ther.**, 46: 321-340; 1990.

LIU, X.; GERSHENFELD, H.K. An exploratory factor analysis of the tail suspension test in 12 inbred strains of mice and an F2 intercross. **Brain Research Bulletin**, 60: 223-231; 2003.

LÔO, H.; GALINOWSKI, A.; POIRIER, M.F.; HARTMANN, F.; KREBS, M.O.; CHAUCHOT, OLIÉ, J.P. Antidépresseurs. Historique. **EMC Psychiatrie**, 1: 243-245; 2004.

LÔO, H.; POIRIER, M.F.; CHAUCHOT, F.; GALINOWSKI, A.; HARTMANN, F.; KREBS, M.O.; OLIÉ, J.P. Antidépresseurs. Données sur les propriétés pharmacocinétiques. **EMC Psychiatrie**, 1: 260-265; 2004.

LUCKI, I. The forced swimming test as a model for core and component behavioral effects of antidepressant drugs. **Behavioural Pharmacology**, 8: 523-532; 1997.

MACHT, M.; KREBS, H.; WEYERS, P.; JANKE, W. Effect of stress on feeding behavior in rats : individual differences. **Personality and Individual Differences**, 30: 463-469, 2001.

MARKOU, A.; KOOB, G.F. Post cocaine anhedonia. An animal model of cocaine withdrawal. **Neuropsychopharmacology**, 4: 17-26; 1991.

MARTÍ, J., ARMARIO, A. Forced Swimming Behavior is not related to the corticosterone levels achieved in the test: A study with four inbred rat strains. **Physiology and Behavior**, 59 (2): 369-373; 1996.

MASAND, P.S. Tolerability and adherence issues in antidepressant therapy. **Clinical Therapeutics**, 25 (8): 2289-2304; 2003.

MAYORGA, A.J.; LUCKI, I. Limitations on the use of the C57BL/6 mouse in the tail suspension test. **Psychopharmacology**, 155: 110-112; 2001

McKINNEY, W.T.; BUNNEY, W.E. Animal model of depression: review of evidence and implications for research. **Archives of General Psychiatry**, 21: 240-248; 1969.

MEERLO, P.; OVERKAMP, G.J.F.; KOOLHAAS, M. Behavioural and physiological consequences of a single social defeat in Roman high and low avoidance rats. **Psychoneuroendocrinology**, 22 (3): 155-168; 1997.

MENESES, A.; CASTILLO, C.; IBARRA, M.; HONG, E. Effects of aging and hypertension on learning, memory and activity in rats. **Physiology and Behavior**, 60: 341-345; 1996.

MENESES, A.; HONG, E. Spontaneously hypertensive rats. A potential model to identify drugs for treatment of learning disorders. **Hypertension**, 31: 968-972; 1998.

MOLENAAR, P.C.M.; BOOMSMA, D.I.; DOLAN, C.V. A third source of developmental differences. **Behavior Genetics**, 23(6): 519-531; 1993.

MONTGOMERY, K.C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, 48: 254-260; 1955.

MOYAHU, A.; EGUIBAR, J.R.; DIAZ, J.L. Induced grooming transitions and open field behaviour differ in high- and low-yawning sublines of Sprague-Dawley rats. **Animal Behavior**, 50: 61-72; 1995.

MOYAHU, A.; VALENCIA, J. Grooming and yawning trace adjustment to unfamiliar environments in laboratory Sprague-Dawley rats. **Journal of Comparative Psychology**, 116 (3): 263-269; 2002.

MURPHY, C.A.; DiCAMILLO, A.M.; HAUN, F.; MURRAY, M. Lesion of the habenular efferent pathway produces anxiety and locomotor hyperactivity in rats: a comparison of the effects of neonatal and adult lesions. **Behavioural Brain Research**, 81: 43-52; 1996.

MURROUGH, J.W.; BOSS-WILLIAMS, K.A.; EMERY, M.S.; BONSALE, R.W.; WEISS, J.M. Depletion of brain norepinephrine does not reduce spontaneous ambulatory activity of rats in the home cage. **Brain Research**, 883: 125-130; 2000.

NESSE, R.M. Proximate and evolutionary studies of anxiety, stress and depression: synergy at the interface. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 23: 895-903, 1999.

NESTLER, E.J.; BARROT, M.; DiLEONE, R.J.; EISCH, A. J.; GOLD, S.J.; MONTEGGIA, L.M. Neurobiology of depression. **Neuron**, 34: 13-25, 2002.

NESTLER, E.J.; GOULD, E.; MANJI, H.; BUCAN, M.; DUMAN, R.S.; GERSHENFELD, H.K.; HEN, R.; KOESTER, S.; LEDERHENDLER, I.; MEANEY, M.J.; ROBBINS, T.; WINSKY, L.; ZALCMAN, S. Preclinical models: status of basic research in depression. **Biological Psychiatry**, 52: 503-528; 2002.

OHL, F.; ROEDEL, A.; STORCH, C.; HOLSBOER, F.; LANDGRAF, R. Cognitive performance in rats differing in their inborn anxiety. **Behavioral Neuroscience**, 116(3): 464-471; 2002.

OKAMOTO, K.; AOKI, K. Development of a strain of Spontaneously Hypertensive rats. **Japanese Circulation Journal**, 27: 282-293; 1963.

OLSSON, I.A.S.; NEVISON, C.M.; PATTERSON-KANE, E.G.; SHERWIN, C.M.; VAN DE WEERD, H.A.; WÜRBEL, H. Understanding behaviour: the relevance of ethological approaches in laboratory animal science. **Applied Animal Behaviour Science**, 81: 245-264; 2003.

OSSENKOPP, K.P.; MAZMANIAN, D.S. The principle of aggregation in psychobiological correlational research: an example from the open field test. **Animal Learning and Behavior**, 13 (4): 339-344; 1985.

OVERMIER, J.B.; SELIGMAN, M.E. Effects of inescapable shock upon subsequent escape and avoidance responding. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, 63: 28-33; 1967.

PAL, S.N.; DANDIYA, P.C. Comparative study of imipramine, maprotiline, fluvoxamine, trazodone and alprazolam in some animal models of depression. **Indian Journal of Pharmacology**, 25: 204-208; 1993.

PALANZA, P. Animal models of anxiety and depression: how are females different? **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 25: 219-233; 2001.

PARÉ, W.P. Relationship of various behaviors in the open field test of emotionality. **Psychological Reports**, 14: 19-22; 1964.

PARÉ, W.P. "Behavioral despair" test predicts stress ulcer in WKY rats. **Physiology and Behavior**, 46: 483-487; 1989.

PARÉ, W.P. Open field, learned helplessness, conditioned defensive burying and forced swim tests in WKY rats. **Physiology and Behavior**, 55 (3): 433-439; 1994.

PAULUS, M.P.; GEYER, M.A.; STERNBERG, E. Differential movement patterns but not amount of activity in unconditioned motor behavior of Fischer, Lewis and Sprague-Dawley rats. **Physiology and Behavior**, 65 (3): 601-606; 1998.

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

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

PLOMIN, R.; DeFRIES, J.C.; McCLEARN, G.E.; RUTTER, M. **Behavioral Genetics**, Third Edition, New York, W.H. Freeman and Company; 1997.

PORSOLT, R.D.; LePICHNON, M.; JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatment. **Nature**, 277: 730-732; 1977.

PORSOLT, R.D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. "Behavioral despair" in rats and mice: strain differences and the effects of imipramine. **European Journal of Pharmacology**, 51: 291-294; 1978.

PORSOLT, R.D.; DENIEL, M.; JALFRE, M. Forced swimming test in rats: hypothermia, immobility and the effects of imipramine. **European Journal of Pharmacology**, 57: 431-436; 1979.

PORSOLT, R.D. Animal models of depression: utility for transgenic research. **Reviews in Neuroscience**, 11: 53-58; 2000.

PRUT, P; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European Journal of Pharmacology**, 463: 3-33; 2001.

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

RAMOS, A.; MORMÈDE, P. Stress and Emotionality: a Multidimensional and genetic approach. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 22(1): 33-57;1998.

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

RAMOS, A.; MOISAN, M.P.; CHAOULOFF, F.; MORMÈDE, C.; MORMÈDE, P. Identification of female-specific QTLs affecting an emotionality related behavior in rats. **Molecular Psychiatry**, 4: 453-462; 1999.

RAMOS, A.; KANGERSKI, A. L.; BASSO, P. F.; SANTOS, J. E. S.; ASSREUY, J.; VENDRUSCOLO, L. F.; TAKAHASHI, R. N. Evaluation of Lewis and SHR rat strain as a genetic model for the study of anxiety and pain. **Behavioural Brain Research**, 129: 113-123; 2002.

RAMOS, A., CORREIA, E. C., IZÍDIO, G. S., BRÜSKE, G. R. Genetic selection of two new rat lines displaying different levels of anxiety-related. **Behavior Genetics**, 33 (6): 657-668; 2003.

REIF, A.; LESCH, K.P. Toward a molecular architecture of personality. **Behavioural Brain Research**, 139: 1-20; 2003.

REX, A.; STEPHENS, D.N.; FINK, H. "Anxiolytic" action of diazepam and abecarnil in a modified open field test. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 53: 1005-1111; 1996.

RICKELS, K.; DOWNING, R.; SCHWEIZER, E.; HASSMAN, H. Antidepressants for the treatment of generalized anxiety disorder. **Archives of General Psychiatry**, 50: 884-895; 1993.

RIHMER, Z., SZADOCZKY, E., FÜREDI, J., KISS, K., PAPP, Z. Anxiety disorders comorbidity in bipolar I, bipolar II and unipolar major depression: results from a population-based study in Hungary. **Journal of Affective Disorders**, 67: 175-179; 2001.

RIPOLL, N.; DAVID, D.J.P.; DAILLY, E.; HASCOËT, M.; BOURIN, M. Antidepressant like effects in various mice strains in the tail suspension test. **Behavioural Brain Research**, 143: 193-200; 2003.

RODGERS, R.J.; COLE, J.C. Influence of social isolation, gender, strain and prior novelty on plus-maze behaviour in mice. **Physiology and Behavior**, 54: 729-736; 1993.

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

RODGERS, R.J.; CAO, B.J.; DALVI, A.; HOLMES, A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 30: 289-304; 1997.

RODGERS, R.J.; HALLER, J.; HOLMES, A.; HALASZ, J.; WALTON, T.J.; BRAIN, P.F. Corticosterone response to the plus-maze: high correlation with risk assessment in rats and mice. **Physiology and Behavior**, 68: 47-53; 1999.

ROUILLON, F. Anxiety with depression: a treatment need. **European Neuropsychopharmacology**, 9 (3): 587- 592; 1999.

SAGVOLDEN, T., PETTERSEN, M.B.; LARSEN, M.C. Spontaneously Hypertensive rats (SHR) as a putative animal model of childhood hyperkinesia: SHR behavior compared to four other rat strains. **Physiology and Behavior**, 54: 1047-1055; 1993.

SAGVOLDEN, T. A Behavioral Validation of the Spontaneously Hypertensive Rat (SHR) as an Animal Model of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (AD/HD). **Presented at INABIS '98 - 5th Internet World Congress on Biomedical Sciences at McMaster University, Canada, Dec 7-16th. Invited Symposium, 1998.**

SALOMÉ, N.; VILTART, O.; DARNAUDÉRY, M.; SALCHNER, P.; SINGEWALD, N.; LANDGRAF, R.; SEQUEIRA, H.; WIGGER, A. Reliability of high and low anxiety-related behaviour: influence of laboratory environment and multifactorial analysis. **Behavioural Brain Research**, 136: 227-237; 2002.

SALOMÉ, N.; SALCHNER, P.; VILTART, O.; SEQUEIRA, H.; WIGGER, A.; LANDGRAF, R.; SINGEWALD, N. Neurobiological correlates of High (HAB) versus low anxiety-related behavior (LAB): differential Fos expression in HAB and LAB rats. **Biological Psychiatry**, 55: 715-723; 2004.

SAPOLSKY, R.M. Why stress is bad for your brain? **Science**, 273 (5276): 749-50; 1996.

SARISKOVA, K. Y., KULIKOV, M.A. The WAG/Rij strain of rats: a new genetically based animal model of depression? **The WAG/Rij rat model of absence epilepsy: the Nijmegen - Moscow research**, Nijmegen Univ. Press, Nijmegen, Netherlands; 2000.

SCHILLER, G.D.; PUCILLOWSKY, O.; WIENICKE, C.; OVERSTREET, D.H. Immobility-reducing effects of antidepressants in genetic animal model of depression. **Brain Research Bulletin**, 28 : 821-823; 1992.

SCHMIDT-NIELSEN, K. **Fisiologia Animal: adaptação e meio ambiente**. 5ª edição, Santos Livraria Editora, São Paulo; 1996.

SELIM, M.; BRADBERRY, C.W. Effect of ethanol on extracellular 5-HT and glutamate in the nucleus accumbens and prefrontal cortex: comparison between Lewis and Fischer 344 rat strains. **Brain Research**, 716 : 157-164; 1996.

SHEPHERD, J.K.; GREWAL, S.S.; FLETCHER, A.; BILL, D.J.; DOURISH, C.T. Behavioural and pharmacological characterisation of the elevated “zero-maze” as an animal model of anxiety. **Psychopharmacology**, 116: 56-64; 1994.

SHERMAN, A.D.; SACQUITNE, J.L.; PETTY, F. Specificity of the learned helplessness model of depression. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 16: 449-454; 1982.

SIEMIATKOWSKI, M.; SIENKIEWICZ-JAROSZ, H.; CZLONKOWSKA, A.I.; BIDZINSKI, A.; PLAZNIK, A. Effects of buspirone, diazepam and zolpidem on open field behavior, and brain [3H] muscimol binding after buspirone pretreatment. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 66: 645-651; 2000.

SINGH, Y.; JAISWAL, A.K.; SINGH, M.; BHATTACHARYA, S.K. Behavioural effects of prenatal diazepam administration on anxiety patterns in rats. **Indian Journal of Experimental Biology**, 34: 1095-1099; 1996.

SMOLLER, J. W., ACIERNO Jr., J. S., ROSENBAUM, J. F., BIEDERMAN, J., POLLACK, M. H., MEMINGER, S., PAVA, J. A., CHADWICK, L. H., WHITE, C., BULZACCHELI, M., SLAUGENHAUPT, S. Targeted genome screen of panic disorder proneness using homology to murine QTL regions. **American Journal of Medical Genetics (Neuropsychiatry Genetics)**, 105: 195-206; 2001.

SNUSTAD, D.P., SIMMONS, M.J.; JENKINS, J.B. **Principles of Genetics**. New York, USA. John Wiley & Sons, Inc.; 1997.

SPRICIGO, L.Jr. Estudo do repertório comportamental espontâneo das linhagens de ratos (*Rattus norvegicus*) Floripa H e L. **Trabalho de Conclusão de Curso**, UFSC/CCB; 2003.

STEENBERGEN, H.L.; HEINSBROEK, R.P.W.; VAN HEST, A.; VAN DE POLL, N.E. Sex-dependent effects of inescapable shock administration on shuttlebox-escape performance and elevated plus-maze behavior. **Physiology and Behavior**, 48: 571-576; 1990.

STEENBERGEN, H.L.; FARABOLLINI, F.; HEINSBROEK, R.P.W.; VAN DE POLL, N.E. Sex-dependent effects of aversive stimulation on holeboard and elevated plus-maze behavior. **Behavioural Brain Research**, 43: 159-165; 1991.

STEFANSKI, R.; PALEJKO, W.; KOSTOWSKI, W.; PLAZNIK, A. The comparison of benzodiazepine derivatives and serotonergic agonists and antagonists in two animal models of anxiety. **Neuropharmacology**, 31: 1251-1258; 1992.

STÉRU, L.; CHERMAT, R.; THIERRY, B.; SIMON, P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology**, 85: 367-370; 1985.

STÖHR, T.; WERMELING, D.S.; WEINER, I.; FELDON, J. Rat strain differences in open field behavior and the locomotor stimulating and rewarding effects of amphetamine. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 59 (4): 813-818; 1998.

STÖHR, T.; SZURAN, T.; PLISKA, V.; FELDON, J. Behavioural and hormonal differences between two Lewis rat lines. **Behavioural Brain Research**, 101 : 163-172; 1999.

STÖHR, T.; SZURAN, T.; WELZL, H.; PLISKA, V.; FELDON, J.; PRYCE, C.R. Lewis/Fischer rat strain differences in endocrine and behavioural responses to environmental challenge. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 67: 809-819; 2000.

SUÁREZ, S.D.; GALLUP, G.G. An ethological analysis of open-field behavior in rats and mice. **Learning and Motivation**, 12: 342-363; 1981.

SUN, M.K.; ALKON, D. Open space swimming test to index antidepressant activity. **Journal of Neuroscience Methods**, 126: 35-40; 2003.

TAGHZOUTI, K.; LAMARQUE, S.; KHAROUBY, M.; SIMON, H. Interindividual differences in active and passive behaviors in the forced swimming test: implications for animal models of psychopathology. **Biological Psychiatry**, 45: 750-758; 1999.

TANG, X.; ORCHARD, S.M.; SANFORD, L.D. Home cage activity and behavioral performance in inbred and hybrid mice. **Behavioural Brain Research**, 136: 555-569; 2002.

THIERRY, B., STÉRU, L., SIMON, P., PORSOLT, R.D. The tail suspension test: Ethical considerations. **Psychopharmacology**, 90: 284-285; 1986.

TREIT, D.; FUNDYTUS, M. Thigmotaxis as a test for anxiolytic activity in rats. **Physiology and Behavior**, 31: 959-962; 1989.

TREIT, D.; MENARD, J.; ROYAN, C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 44: 463-469; 1993.

TROISI, A. Ethological research in clinical psychiatry: the study of nonverbal behavior during interviews. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 23: 905-913; 1999.

TRULLAS, R., JACKSON, B., SKOLNICK, P. Genetic differences in a tail suspension test for evaluating antidepressant activity. **Psychopharmacology**, 99: 287-288; 1989.

TSUANG, M.T.; TAYLOR, L.; FARAONE, S.V. An overview of the genetics of psychotic mood disorders. **Journal of Psychiatric Research**, 38: 3-15, 2004.

TURRI, M.G.; DATTA, S.R.; DeFRIES, J.; HENDERSON, N.D.; FLINT, J. QTL analysis identifies multiple behavioral dimensions in the ethological tests of anxiety in laboratory mice. **Current Biology**, 11: 725-734; 2001.

VAN DEN BUUSE, M. Differential effects of quinelorane and pergolide on behavior, blood pressure and body temperature of spontaneously hypertensive rats and Wistar-Kyoto rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 50: 389-397; 1995.

VAN DEN BUUSE, M. Prepulse inhibition of acoustic startle in spontaneously hypertensive rats. **Behavioural Brain Research**, 154: 331-337; 2004.

VARTY, G.B.; COHEN-WILLIAMS, M.E.; HUNTER, J.C. The antidepressant-like effects of neurokinin NK1 receptor antagonists in a gerbil tail suspension test. **Behavioural Pharmacology**, 14: 87-95; 2003.

VAUGEOIS, J.M.; ODIÈVRE, C.; LOISEL, L.; COSTENTIN, J. A genetic mouse model of helplessness sensitive to imipramine. **European Journal of Pharmacology**, 316: R1-R2; 1996.

VINK, J.M.; BOOMSMA, D.I. Gene finding strategies. **Biological Psychology**, 61: 51-73, 2002.

VOLLMAYR, B.; HENN, F.A. Learned helplessness in the rat: improvements in validity and reliability. **Brain Research Protocols**, 8: 1-7; 2001.

VOLLMAYR, B.; HENN, F.A. Stress models of depression. **Clinical Neuroscience Research**, 3: 245-251, 2003.

WAINSTEIN, M.; TANNHAUSER, M.; BARROS, H.M.T. Lack of tolerance to imipramine or mianserine in two animal models of depression. **Pharmacology**, 41: 327-332; 1990.

WALL, P.M.; MESSIER, C. Methodological and conceptual issues in the use of the elevated plus-maze as a psychological measurement instrument of animal anxiety-like behavior. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 25: 275-286; 2001.

WALSH, R.N.; CUMMINS, R.A. The open-field test: a critical review. **Psychological Bulletin**, 83 (3): 482-504; 1976.

WEBB, A.A.; GOWRIBAI, K.; MUIR, G.D. Fischer (F-344) rats have different morphology, sensorimotor and locomotor abilities compared to Lewis, Long-Evans, Sprague-Dawley and Wistar rats. **Behavioural Brain Research**, 144: 143-156; 2003.

WEISS, J.M.; CIERPIAL, M.A.; WEST, C.H.K. Selective breeding of rats for high and low motor activity in a swim test: toward a new animal model of depression. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 61 (1): 49-66; 1998.

WHIMBEY, A.E.; DENENBERG, V.H. Two independent behavioral dimensions in open-field performance. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, 63 (3): 500-504; 1967.

WILLNER, P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression : a 10-year review and evaluation. **Psychopharmacology**, 134: 319-329; 1997.

WÜRBEL, H. Ideal homes? Housing effects on rodent brain and behavior. **Trends in Neuroscience**, 24: 207-211; 2001.

YEREVANIAN, B., KOEK, R. J., RAMDEV, S. Anxiety disorders comorbidity in mood disorder subgroups: data from a mood disorders clinic. **Journal of Affective Disorders**, 67: 167-173; 2001.

YOSHIKAWA, T.; WATANABE, A.; ISHITSUKA, Y.; NAKAYA, A.; NAKATANI, N. Identification of Multiple Genetic Loci linked to the propensity for "behavioral despair" in mice. **Genome Reserach**, 12 (3): 357-366; 2002.

ZAGRODZKA, J.; FONBERG, E., BRUDNIAS-SEPOWKSA, Z. The effect of imipramine treatment on the predatory dominance in cats. **Acta Neurobiol.Exp.**, 5: 203-209; 1985.

ZANGROSSI, H.; GRAEFF, F.G. Behavioral validation of the elevated T-maze, a new animal model of anxiety. **Brain Research Bulletin**, 44 (1): 1-5; 1997.