



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, EMBRIOLOGIA E GENÉTICA
CURSO DE BACHAREL EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Santiago Caneppa Peralta

**Influência da manipulação pré-farmacológica sobre o comportamento de ansiedade das
linhagens isogênica SLA16 e SHR**

Florianópolis

2023

Santiago Caneppa Peralta

**Influência do manipulação pré-farmacológica sobre o comportamento de ansiedade das
linhagens isogênica SLA16 e SHR**

Trabalho Conclusão do Curso de Graduação em
Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Santa Catarina como requisito
para a obtenção do título de Bacharel em
Ciências Biológicas
Orientador: Dr. Geison de Souza Izídio

Florianópolis

2023

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

Caneppa Peralta, Santiago

Influência das manipulações pré-farmacológicas sobre o comportamento de ansiedade das linhagens isogênica SLA16 e SHR / Santiago Caneppa Peralta ; orientador, Geison Souza Izídio, 2023.

44 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. Manipulação. 3. Ansiedade. 4. Linhagens isogênicas. 5. Ratos. I. Souza Izídio, Geison . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

Santiago Caneppa Peralta

**Influência das manipulações pré-farmacológicas sobre o comportamento das linhagens
isogênica SLA16 e SHR**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de
Bacharel e aprovado em sua forma final pelo Curso de Ciências Biológicas

Florianópolis, 20 de junho de 2023.

Profa. Dra. Daniela Cristina de Toni
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

Prof., Dr. Geison de Souza Izídio
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

M^a. Letícia Corrêa Nakatsukasa Takasumi
Avaliadora
Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC

Dr^a. Natalli Granzotto

Avaliadora

Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC



Documento assinado digitalmente

Tiago Fernando Chaves

Data: 29/06/2023 06:11:04-0300

CPF: ***.468.509-**

Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

M^a. Tiago Fernando Chaves

Avaliador

Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC

Florianópolis

2023

Dedicado a mis padres, que siempre tuvieron la fuerza de mirarme sonriendo independiente de las dificultades.

AGRADECIMENTOS

A minha família, que tanto se orgulharam do caminho que segui independente do trajeto e que sempre mostram o apoio que eu precisava.

À minha companheira de viagens e de vida, que com sua presença e leveza sempre consegue me mostrar o lado positivo das coisas mesmo em épocas onde tudo parece dar errado.

Aos meus nerdolas, que estiveram presentes para me alegrar e livrar do estresse das longas rotinas de trabalho e estudo, seja por chamada ou presencialmente.

Ao meu amigo Yuri, que esteve sempre presente ouvindo meus desabafo pessoais e áudios longos sobre filmes, independente da distância.

A toda a equipe LGC, pelos ensinamentos durante toda minha graduação e que mesmo durante longos afastamentos, estiveram disponíveis para me acolher e ajudar no que precisasse.

Aos professores e professoras que passaram por esse caminho e que terei o prazer de levar comigo em minha memória e carreira.

À Universidade Federal de Santa Catarina e todo o quadro de funcionários que fazem a Universidade ter toda a excelência e qualidade na formação dos seus discentes.

*“Shhh.
Você não precisa se preocupar com isso por aqui.
Apenas seja uma pedra”
(JOY, “Tudo em Todo Lugar ao Mesmo Tempo” 2022)*

RESUMO

As linhagens de ratos isogênicas SHR e SLA16, apresentam praticamente todo o genoma idêntico, a não ser por uma região genômica diferencial (RGD), denominada *Anxrr16* localizada no cromossomo 4. Este *loci* foi associado com diferenças fenotípicas entre as linhagens, como, por exemplo, aprendizagem/memória, pressão arterial, consumo de álcool e principalmente comportamentos relacionados à ansiedade. Este último estabelece um padrão robusto e altamente reprodutível de menor ansiedade para a linhagem SLA16 quando comparada a sua parental SHR em aparatos como campo aberto (CA) e labirinto em cruz elevado (LCE). Entretanto, observou-se ao longo de alguns estudos, que quando essas linhagens eram submetidas a tratamentos agudos ou crônicos com injeção intraperitoneal (IP) o efeito comportamental diferencial podia ser mascarado ou não aparecer. Para este fenômeno foi proposta a hipótese que os genes da RGD sejam suscetíveis às manipulações pré-farmacológicas, como contenção para injeção, ou estímulo nociceptivo causado pela agulha da seringa. Assim, este estudo buscou avaliar a influência das manipulações pré-farmacológicas sobre o comportamento das linhagens isogênicas SLA16 e SHR. Para isso, os animais foram divididos em grupos experimentais que foram submetidos (I) apenas à contenção, sem receber injeção (MAN); ou (II) à contenção e injeção sem administração de substâncias (PUN); ou (III) à contenção e injeção de salina (SAL). Todos os indivíduos, após 8 minutos dos respectivos tratamentos, foram submetidos ao teste do CA e no LCE em dias consecutivos, sendo cada teste aplicado em um dia distinto. Em suma, os resultados apontaram efeitos comportamentais diferenciais entre as linhagens SLA16 e SHR frente a estímulos pré-teste. Estes eventos tiveram o poder de inverter diferenças comportamentais basais, ou equilibrar os níveis relativos à exploração de regiões aversivas, dos aparatos CA e LCE, principalmente para o tratamento punção. As intensidades de influência dos tratamentos analisados não foram iguais entre os grupos sexuais, indicando um possível efeitos de intensidade sexo-dependente que sustenta uma menor interferência dos estímulos no comportamento das fêmeas. Estes dados apontariam para possíveis diferenças neurobiológicas advindas da região genômica diferencial das linhagens que ao interagir aos estímulos externos podem ocultar possíveis diferenças de linhagem basais. Novos estudos visando observar as implicações de estímulos estressores agudos nas linhagens podem melhor elucidar os mecanismos atrás dos resultados observados.

Palavras chave: Salina. Ratos. Linhagens isogênicas. Ansiedade. Estresse.

ABSTRACT

The isogenic rat strains SHR and SLA16 present virtually identical genomes, except for a differential genomic region (DGR) called *Anxrr16* located on chromosome 4. This locus has been associated with phenotypic differences between the strains, such as learning/memory, blood pressure, alcohol consumption, and primarily anxiety-related behaviors. The latter establishes a robust and highly reproducible pattern of lower anxiety for the SLA16 strain, when compared to parental SHR rats, in behavioral tests such as the open field (OF) and elevated plus maze (EPM). However, it has been observed in several studies that when these strains were subjected to acute or chronic treatments with intraperitoneal (IP) injections, the differential behavioral effect could be masked or not appear. For this phenomenon, the hypothesis has been proposed that the genes within the DGR are susceptible to pre-pharmacological manipulations, such as restraint for injection or pain caused by the syringe needle. Thus, this study aimed to evaluate the influence of pre-pharmacological manipulations on the behavior of the isogenic strains SLA16 and SHR. For this purpose, the animals were divided into experimental groups that were subjected to (I) restraint only, without receiving an injection (MAN); or (II) restraint and injection without substance administration (PUN); or (III) restraint and injection of saline (SAL). After 8 minutes of the respective treatments, all individuals were subjected to the OF and EPM tests on consecutive days, with each test being applied on a different day. In summary, the results indicated differential behavioral effects between the SLA16 and SHR strains in response to pre-test stimuli. These events had the power to reverse baseline behavioral differences or balance the relative levels of exploration in aversive regions of the OF and EPM apparatus, especially for the puncture treatment. The intensities of influence from the analyzed treatments were not equal between the sexes, indicating a possible sex-dependent intensity effect that supports a lesser interference of stimuli on female behavior. These data suggest potential neurobiological differences arising from the differential genomic region of the strains, which, when interacting with external stimuli, may mask possible baseline strain differences. Further studies aiming to observe the implications of acute stressor stimuli on the strains may provide a better understanding of the mechanisms behind the observed results.

Keywords: Saline. Rats. Isogenic strains. Anxiety. Stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Representação figurativa da formação da linhagem SLA16 a partir das linhagens LEW e SHR	16
Figura 2- Campo Aberto.....	21
Figura 3- Aparato labirinto em cruz elevado	22
Figura 4- Desenho experimental esquematizado.....	24
Figura 5- Resultados do CA nos machos.....	26
Figura 6- Resultados do LCE para os machos.....	28
Figura 7- Resultados do CA para as fêmeas.....	30
Figura 8- Resultados do LCE para as fêmeas.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPA – α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropioni acid receptor

ANOVA – Análise de Variância

Anxrr16 – Anxiety related response QTL 16 (QTL para respostas relacionadas à ansiedade 16)

CA – Campo Aberto

CCE – Caixa Clara e Escura

Crhr2 - Corticotropin releasing hormone receptor 2

Grip2- Glutamate receptor-interacting protein 2

HPA – Hipófise-Pituitária-Adrenal

IP – Intraperitoneal

LCE – Labirinto em Cruz Elevado

LEW – Lewis

MAN – Manipulação (tratamento pré-farmacológico)

PUN – Punção (tratamento pré-farmacológico)

QTL – Locus para Características Quantitativas

RGD – Região Genômica Diferencial

ROUT - Robust regression and Outlier removal

SAL – Salina (tratamento pré-farmacológico)

SHR – Ratos Espontaneamente Hipertensos

SLA16 – SHR.Lewis/Anxrr16

TDAH- Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 CRITÉRIO DE REPRODUTIBILIDADE	14
1.2 MODELOS ANIMAIS E LINHAGENS ISOGÊNICAS	14
1.3 MANIPULAÇÃO PRÉ-FARMACOLÓGICA	17
2. OBJETIVOS	19
2.1 OBJETIVOS GERAIS.....	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 ANIMAIS	20
3.2 APARATOS	20
3.2.1 CAMPO ABERTO	20
3.2.2 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO	21
3.3 GRUPO DE PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	22
3.3.1 GRUPOS E PROTOCOLO	22
3.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS E REPRESENTAÇÃO GRÁFICA.....	24
4. RESULTADOS	25
4.1 MACHOS	25
4.1.1 CAMPO ABERTO	25
4.1.2 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO	27
4.2 FÊMEAS.....	29
4.2.1 CAMPO ABERTO	29
4.2.2 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO	31
5. DISCUSSÃO	33
6. CONCLUSÃO.....	40
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

1 INTRODUÇÃO

1.1 CRITÉRIO DE REPRODUTIBILIDADE

O critério de reprodutibilidade, postulado por Karl Popper (1959), implica na necessidade de um resultado ser replicável em locais e por experimentadores distintos para possuir uma relevância científica, sendo este um princípio fundamental na condução e validação da ciência experimental (CASADEVALL; FANG, 2010). Sendo assim, a padronização de protocolos, ambientes e testes, buscam atenuar fatores externos distintos dentro do ambiente na qual o experimento será replicado.

A abrangente compreensão do grau de interferência de fatores externos aos previstos pelo protocolo experimental, é uma consideração crucial para amenizar as distorções de uma replicação. Esta afirmação torna-se ainda mais essencial em áreas de estudo complexas, como no estudo de objetos *in vivo*, nos quais fatores externos frequentemente negligenciadas podem ter influências significativas (KAFKAFI *et al.*, 2018).

O campo da genética comportamental, por exemplo, apresenta alta sensibilidade na sua replicabilidade dos resultados. Uma vez que grande parte dos grupos de pesquisa estabelecem estudos utilizando populações de animais oriundos de uma manipulação genética, a reprodução de resultados em laboratórios distintos torna-se susceptível a perturbações por fatores ambientais diversas (ATTANASIO; D'ANGELO; CORSI, 2022), dificultando assim resultados semelhantes (KAFKAFI *et al.*, 2018). Devido a tal fator, o estudo e compreensão das metodologias experimentais básicas e suas influências, frente aos elementos genéticos, possuem extrema importância na clareza dos dados comportamentais (VAN DER STAAY; STECKLER, 2002; WAHLSTEN *et al.*, 2003).

1.2 MODELOS ANIMAIS E LINHAGENS ISOGÊNICAS

Com o objetivo de identificar um par de linhagens com maior contraste possível frente a testes como Campo Aberto (CA), Labirinto em Cruz Elevado (LCE) e Caixa Clara e Escura (CCE), Ramos e colaboradores propuseram em 1997, duas linhagens isogênicas, a *Spontaneously Hypertensive Rats* (SHR) e a Lewis (LEW). Estas apresentaram um maior contraste frente ao parâmetro de “comportamento tipo-ansioso”, um termo usado de forma a

simplificar a , quando submetidas a alguns aparatos validados e amplamente utilizados que empregam uma exposição a estímulos ansiogênicos (RAMOS *et al.*, 1997). Quando defrontadas, a linhagem LEW tendia a apresentar níveis maiores de comportamento tipo-ansioso, enquanto a linhagem SHR exibia níveis inferiores, caracterizados por exemplo, por um gasto superior de tempo na região central do CA, no braço aberto do LCE, ou região branca da CCE, nos animais SHR (RAMOS *et al.*, 1997) fatores estes que atribuem a linhagem SHR a caracterização de modelo ouro para estudos do Transtorno de Déficit de Atenção de Hiperatividade (TDAH).

Os aparatos CA e LCE, apresentam fatores semelhantes de intuito de exploração de regiões de maior ou menor aversão (região comumente assumida como perigosa ou de risco para o animal). Estas regiões de maior aversão no CA é representada pela região mais central do aparato e no LCE são as regiões dos braços abertos. As mensurações da exploração destas regiões somada a outras variáveis, permitem a medição de comportamentos de risco, que podem apontar diferenças ou alterações em padrões de comportamento defensivo com origens farmacológicas ou neurofisiológicas estudadas. Estes comportamentos apresentam homologia (em escala mais simplificada e de teor inato) a comportamentos de defesa de seres humanos que denominamos como ansiedade.

Posteriormente, Ramos e colaboradores (1999) aprofundaram-se nas origens genéticas e neurobiológicas das diferenças comportamentais observadas no estudo anterior. Este objetivo foi alcançado através da aplicação de técnicas de mapeamento de *loci* de características quantitativas (QTL, ou *Quantitative trait loci*) frente a populações de machos e fêmeas das linhagens LEW, SHR e híbridos F1 e F2 (RAMOS *et al.*, 1999). Tal trabalho de mapeamento do genoma inteiro das linhagens resultou, pela primeira vez, na identificação de uma região localizada no cromossomo 4, que apresentava alta influência sobre diversos comportamentos, como locomoção na região central do CA, um efeito relacionado à emocionalidade (RAMOS *et al.*, 1999). Além disso, estudos independentes e de distintos pesquisadores realizados a *posteriori*, reafirmaram a influência do cromossomo 4 frente a características comportamentais e neurobiológicas: como respostas ao estresse (POTENZA *et al.*, 2004), consumo de etanol (TERENINA-RIGALDIE; JONES; MORMÈDE, 2003) e aprendizado/memória (ANSELMINI *et al.*, 2016). Esta região, posteriormente foi nomeada como *Anxrr16* (*anxiety-related response 16*) pelo Rat Genome Database (<http://rgd.mcw.edu/>).

Mais tarde, objetivando-se uma maior imersão nas origens genéticas influentes nos comportamentos observados nas linhagens LEW e SHR, desenvolveu-se a linhagem congênica SHR.LEW-*Anxrr16* (ou SLA16). Esta, oriunda de uma sequência de retrocruzamentos entre as linhagens SHR (receptora) e LEW (doadora) (para detalhes do processo de criação da linhagem revisar MEDEIROS et al., 2013), apresenta o seu genoma idêntico ao da linhagem SHR a não ser pelo *locus* de interesse proveniente a linhagem LEW (parte do cromossomo 4). A figura 1 apresenta de maneira esquemática as bases genéticas das linhagens parentais e da SLA16. A ilustração apresenta as relações genéticas entre as três linhagens: SHR, LEW e SLA16. A linhagem SLA16 apresenta quase que por completo um genoma idêntico à linhagem SHR a não ser pelo *locus*, localizado no cromossomo 4, na qual se localiza (não exclusivamente) o QTL *Anxrr16*, idêntico ao da linhagem LEW (MEDEIROS et al., 2014).

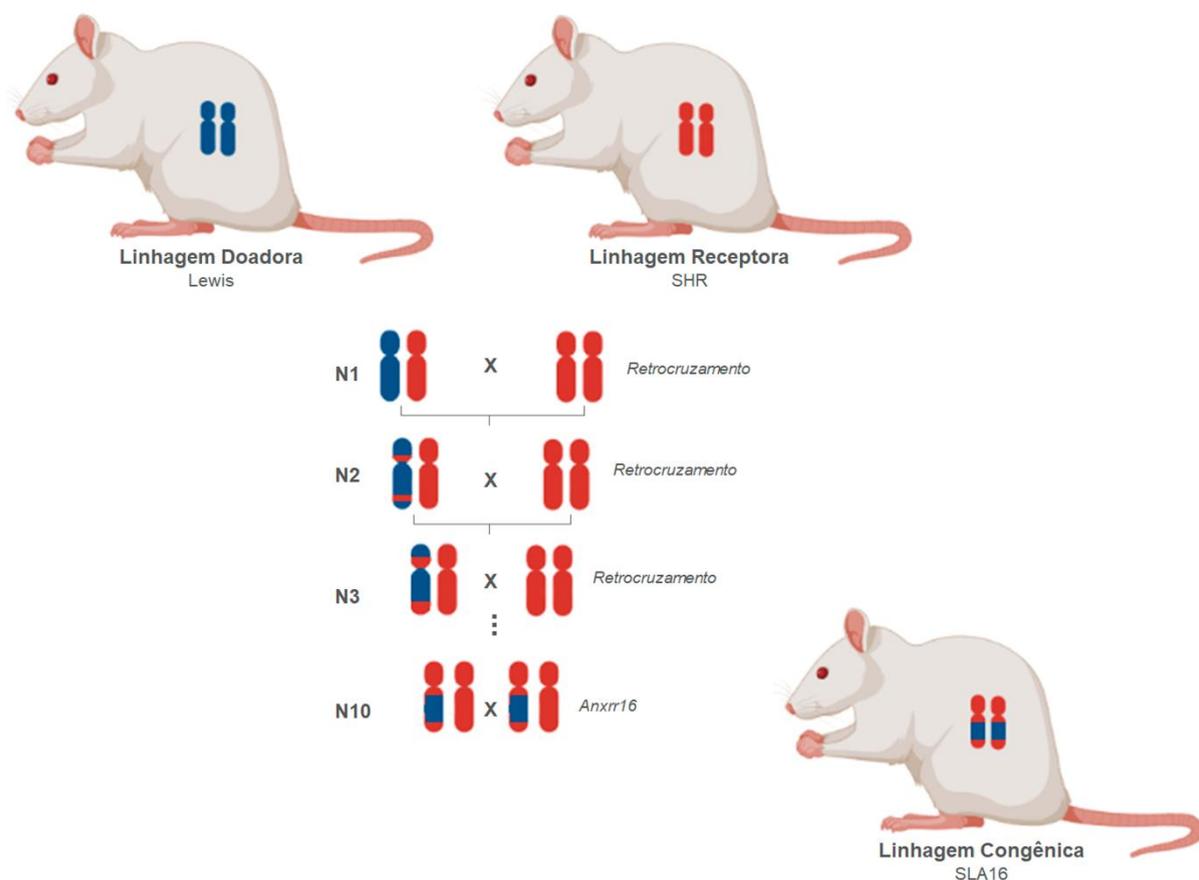


Figura 1- Figura representativa da formação da linhagem SLA16 a partir das linhagens LEW e SHR herdando maior parte de seu genoma da linhagem SHR (cromossomos vermelhos) a não ser por uma região no cromossomo 4 derivada da linhagem LEW (regiões azuis).

Após o estabelecimento da linhagem SLA16, realizaram-se inúmeros testes comportamentais buscando observar possíveis distinções neurobiológicas e comportamentais

entre as linhagens parentais e a recém desenvolvida. Constatou-se que a linhagem SLA16 apresentava menores índices de comportamento tipo-ansioso quando comparada à linhagem SHR (MEDEIROS *et al.*, 2014). Além de índices maiores de locomoção, quando submetida a situações de fator novidade (não familiares)(DE MEDEIROS *et al.*, 2013). Além disso, a linhagem SLA16 tende a apresentar uma pressão arterial menor que a linhagem SHR, naturalmente hipertensa (ANJOS *et al.*, 2022; FADANNI *et al.*, 2023). Com o decorrer dos distintos testes realizados a *posteriori*, o fenótipo comportamental da linhagem SLA16, como os baixos índices de ansiedade (em aparatos como CA e LCE) e locomoção superior, quando comparada às suas linhagens parentais, foram reforçados.

1.3 MANIPULAÇÃO PRÉ-FARMACOLÓGICA

Os padrões comportamentais decorrentes dos diversos testes comparativos entre as linhagens SLA16 e SHR, sendo a linhagem SLA16 a que mantém índices mais pronunciados na exploração das áreas mais aversivas (caracterizando um comportamento do tipo menos ansioso), tornaram-se um fenômeno de ampla reprodutibilidade em diversos trabalhos. Entretanto, um evento recorrente foi observado em experimentos que implicam tratamentos farmacológicos agudos, ou crônicos, aplicados por injeções intraperitoneais (IP). Constatou-se, em alguns casos, alterações do padrão comportamental comumente observado, ocorrendo o desaparecimento de diferenças estatísticas do fator linhagem em parâmetros como tempo no centro e locomoção central do aparato.

Para exemplificar o fenômeno descrito, pode-se citar o trabalho realizado por Granzotto (2016), no qual, ao testar as linhagens SHR e SLA16 em um protocolo de multi-exposição ao CA (5 dias consecutivos, 5 min/dia), sem nenhum tipo de tratamento prévio (*naive*), observaram-se diferenças de linhagem nos parâmetros de distância percorrida e locomoção central, com o SLA16 mantendo-se com níveis superiores aos do SHR, ao longo dos 5 dias de experimento. Contudo, ao efetuar protocolos que incluem tratamentos com injeções agudas e aplicação dos animais ao CA (20 min após a injeção), observou-se que os grupos controles não apresentaram as diferenças de linhagem no parâmetro de locomoção central (Granzotto, 2016).

Um evento semelhante foi observado em um trabalho (PÉRTILE *et al.*, 2017), que visava observar diferenças de reação da injeção sistêmica de dois agonistas dopaminérgicos em ratos machos das linhagens SLA16 e SHR. O experimento foi composto por grupos experimentais distintos, cada um comparando a reação de uma linhagem ao fármaco e ambos comparados ao grupo controle que receberia uma injeção IP de salina. Após a injeção dos fármacos, os animais foram testados no aparato do CA e no teste de LCE por 5 min. Novamente, no grupo controle observa-se o desaparecimento das diferenças estatísticas basais entre as linhagens. Tanto no parâmetro de locomoção total do campo aberto (para ambos os grupos controles utilizados dos testes), quanto para número de entradas no braço aberto, para um dos grupos controle utilizados (PÉRTILE *et al.*, 2017).

O fenômeno abriu suposições sobre suas possíveis causas, sendo levantada a hipótese de que os efeitos observados pudessem ser resultantes de possíveis efeitos associados às manipulações pré-farmacológicas, ou seja, contenção ou nocicepção relacionada à administração IP de fármacos. Algo já proposto na literatura por Lapin (1995), que mostrou efeitos ansiogênicos associados à injeção IP de salina (0,9% do peso do animal), como diminuição do número de entradas nos braços abertos do LCE.

Essa ausência de diferença comportamental entre as linhagens, em alguns experimentos farmacológicos, poderia ser resultante de mecanismos neurobiológicos, ou pequenas variações fisiológicas distintas entre duas linhagens isogênicas, que são possivelmente relacionados aos genes da região genômica diferencial (RGD). Este pressuposto sustenta-se pelo fato da existência de genes candidatos relacionados ao estresse e a nocicepção (dor) no QTL (*Anxrr16*). Dentre estes, temos o gene candidato denominado gene para o receptor de hormônio liberador de corticotropina 2 (*corticotropin releasing hormone receptor 2 gene*, ou *Crhr2*) (MEDEIROS *et al.*, 2014). O *Crhr2*, de atuação no eixo hipófise-pituitária-adrenal (HPA), estaria associado às respostas de estresse e com influência sobre diversos parâmetros comportamentais e fisiológicos, como ansiedade (KISHIMOTO *et al.*, 2000), consumo de álcool (HEILIG; KOOB, 2007) e controle da pressão arterial (MIFFLIN; WANG; NGUYEN, 2018), alguns dos parâmetros que apresentam diferenças entre a linhagem SLA16 e SHR.

Outro possível gene candidato é o gene da proteína de interação com o receptor de glutamato 2 (*Glutamate Receptor-Interacting Protein 2 gene*, ou *Grip2*) (MEDEIROS *et al.*, 2014). A proteína expressa por este gene apresenta uma interação direta com as subunidades da proteína AMPA (*α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropioni acid receptor*, em inglês), receptor glutamatérgico envolvido na funcionalidade celular de aprendizado e memória

(HASELMANN *et al.*, 2018), além de interferir nas respostas comportamentais nociceptivas agudas e na dor crônica (GARRY *et al.*, 2003).

Com base no apresentado, propusemos a hipótese de que as manipulações pré-farmacológicas possam apresentar efeitos distintos entre os animais das linhagens SHR e SLA16. Portanto, essas manipulações estariam assumindo efeito de atenuação das diferenças comportamentais comumente observadas entre as linhagens, em animais não submetidos ao tratamento farmacológico.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar os efeitos das manipulações pré-farmacológicas sobre as diferenças comportamentais das linhagens isogênicas de ratos SLA16 e SHR.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar o efeito dos estímulos pré-teste: manipulação, punção e injeção de salina;
2. Comparar os efeitos dos estímulos sobre o comportamento de ratos machos SHR e SLA16 no campo aberto;
3. Comparar os efeitos dos estímulos sobre o comportamento de ratas fêmeas SHR e SLA16 no campo aberto;
4. Comparar os efeitos dos estímulos sobre o comportamento de ratos machos SHR e SLA16 no labirinto em cruz elevado;
5. Comparar os efeitos dos estímulos sobre o comportamento de ratas fêmeas SHR e SLA16 no labirinto em cruz elevado;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Ao todo foram utilizados 115 animais, sendo destes 61 machos (sendo dois indivíduos retirados das análises finais) e 54 fêmeas, todos com idade entre 5 a 6 meses (até os dias dos experimentos), da linhagem SHR (*Spontaneously Hypertensive Rats*, sublinhagem SHR/NCrlAnra) e SLA 16 (SHR.LEW *Anxrr16*), divididos em 3 levas para os machos e 3 levas para as fêmeas. Dois animais tiveram que ser retirados dos experimentos, um da linhagem SHR pertencentes ao mesmo grupo de tratamento punção (melhor explicado na sessão “Grupo e protocolo experimental”). Outro animal apresentou sangramento excessivo pelo nariz e locomoção debilitada (indicando adoecimento) e foi retirado do *n* final. O outro apresentou surgimento de tumores na região abdominal, sendo devidamente eutanasiado visando as boas práticas de manuseio humanitário dos animais laboratoriais. O *n* amostral final concluiu com 113 animais, sendo 59 machos e 54 fêmeas. Destes, a distribuição amostral dos machos foi composta por 10 animais SHR para o grupo Manipulação (MAN), 7 para o grupo punção (PUN) e 9 para o grupo salina (SAL). Enquanto os grupos da linhagem SLA16 tiveram 13 animais para o grupo manipulação, 10 para a punção e 10 para o grupo salina. Nas fêmeas, o grupo SHR apresentou 10 animais para o grupo manipulação, 8 para a punção e 8 para o grupo salina. E finalmente o grupo SLA16 foi composto por 10 animais do grupo manipulação, 9 para a punção e 9 para o grupo salina.

Os animais da linhagem SHR utilizados neste trabalho pertencem a geração 50 e 51, enquanto os da linhagem SLA16 pertencem às gerações 26 e 27. Os animais foram mantidos em caixas-moradia coletivas com cerca de 3-6 animais/caixa, em um biotério convencional com ciclo claro/escuro de 12h (luzes acesas às 07h00min), temperatura mantida em 22±2°C e com livre acesso à água e comida. Todos os procedimentos foram executados de acordo com a aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais em pesquisa da Universidade Federal de Santa Catarina – CEUA/UFSC, conforme protocolo de aprovação CEUA N° 6962250219.

3.2 APARATOS

3.2.1 CAMPO ABERTO

O teste do Campo Aberto (CA) se baseia em uma arena quadrada 100x100 cm, com paredes de 40 cm de altura. A estrutura é composta por madeira revestida por fórmica branca

nas paredes e preto fosco no chão. Ao serem submetidos ao teste, os animais foram colocados no centro do aparato, voltados sempre para o mesmo lado, e o comportamento foi gravado durante 5 minutos. Posteriormente, os vídeos foram analisados através do software ANYmaze® (Stoelting, USA). O CA foi realizado 8 minutos após a aplicação do estímulo, entre 13h00min e 18h00min, sob 12 lux (+/- 0,5 lux) de intensidade luminosa e em um ambiente com temperatura controlada (22°C - 24°C). Entre um animal e outro o aparato foi higienizado com solução 10% de etanol. Os parâmetros analisados foram: locomoção total, locomoção periférica, locomoção central, número de entradas no centro e tempo no centro (Figura 3).



Figura 2- Campo Aberto. Fonte: Laboratório de Genética do Comportamento

3.2.2 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

O teste do labirinto em cruz elevado (LCE) é composto por quatro braços (50 cm de comprimento e 10 cm de largura) ligados por uma região central (10 x 13,5 cm), formando uma cruz (elevada a cerca de 50 cm do chão). Toda a estrutura é composta por madeira revestida por fórmica preta. Dois desses braços (opostos entre si) são cercados por paredes de 40 cm de altura (braços fechados), enquanto o outro par de braços (braços abertos) possui apenas um anteparo (1 mm por 5 mm de altura) na borda. Cada animal foi posicionado no centro do LCE com a face voltada para o mesmo braço aberto e seu comportamento foi registrado por um sistema de câmeras por 5 minutos. Posteriormente, os vídeos foram analisados através do software ANYmaze® (Stoelting, USA). O LCE foi realizado 8 min após aplicação do estímulo, entre 13h00min e 18h00min, sob 12 lux (+/- 0,5 lux) de intensidade luminosa e em ambiente com

temperatura controlada (22°C - 24°C). Após cada sessão de teste, foi realizada a limpeza do aparato com solução de etanol 10%. Os parâmetros mensurados foram: número total de entradas nos braços abertos, número total nos braços fechados, e tempo em cada uma das regiões do aparato (Figura 4).



Figura 3- Aparato labirinto em cruz elevado. Fonte: Laboratório de Genética do Comportamento

3.3 GRUPO DE PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

3.3.1 GRUPOS E PROTOCOLO

O experimento separou animais machos e fêmeas em dois grupos experimentais com protocolo idêntico, sendo o mesmo baseado no experimento realizado por Lapin (1995), com leves adaptações. O n amostral foi alcançado através da aplicação de três levas experimentais para os machos e para fêmeas. Para cada sexo se manteve a mesma divisão de grupos e protocolos correspondentes, na qual os animais das linhagens SLA16 e SHR foram distribuídos em três grupos, sendo estes: (I) animais submetidos apenas a contenção, sem receber injeção (MAN); ou (II) submetidos à contenção e injeção sem administração de substâncias (PUN); ou (III) submetidos à contenção e injeção de salina (SAL).

No grupo MAN, cobriu-se os olhos dos animais usando uma flanela e manipulou-se os mesmos virando-os de barriga para cima (volteando o animal), no qual, usando o corpo de uma seringa sem agulha, realizou-se uma pressão na região inferior esquerda do ventre do animal, simulando uma injeção intraperitoneal (IP). No PUN, realizaram-se as mesmas etapas de manipulação do grupo anterior (cobrir e voltar), porém aplicou-se uma punção na região ventral inferior esquerda do animal, usando uma seringa com agulha (0,7 x 25 mm), sem pressão

do êmbolo evitando injeção de qualquer composto ou gases. Finalmente, o grupo SAL, passou pelos mesmos procedimentos do grupo PUN, recebendo, no entanto, uma injeção salina 0,9% a temperatura ambiente (cerca de 25°C) (agulha 0,7 x 25 mm) mantendo uma proporção do volume injetado de 1 ml a cada 1000g, para cada indivíduo.

Destaca-se a manutenção de alguns protocolos comuns entre os grupos buscando a restrição do máximo de fatores externos com possível influência entre os grupos. As flanelas utilizadas foram todas compostas de algodão, sendo únicas para cada linhagem e sexo dos grupos, evitando efeitos decorrentes de odores diversos. Após a cobertura com a flanela, buscou-se realizar a contenção dos animais usando a mesma manobra composta pela contenção da cabeça, entre os dedos indicador e médio do experimentador, e contenção da cauda usando os dedos anelar e mínimo. Para os protocolos PUN e SAL, nos quais ocorreu a penetração de uma agulha de seringa na região ventral inferior esquerda do animal, buscou-se manter a direção da abertura do bisel (forame da agulha) apontada para cima. Além de se realizar a troca da agulha a cada duas injeções ou penetrações, buscando manter o menor grau de interferência causado pelo distinto grau de desgaste da ponta da agulha. Todos os processos de pressão do corpo da seringa (MAN), penetração da agulha sem injeção (grupo PUN) e penetração da agulha com injeção salina (SAL), buscaram manter um tempo entre 5 e 7 segundos desde a contenção total até a retirada da agulha do animal, ou afastamento do corpo da seringa, objetivando manter o tempo médio necessário para se realizar uma injeção IP.

Todos os estímulos foram realizados pelo mesmo experimentador. Todos os animais, após 8 minutos dos respectivos tratamentos, foram submetidos ao teste do CA e ao LCE em dias consecutivos, sendo cada teste aplicado em um dia distinto (Figura 4). Na terceira leva experimental realizaram-se a eutanásia dos animais posteriormente ao término do teste no LCE (Figura 4).

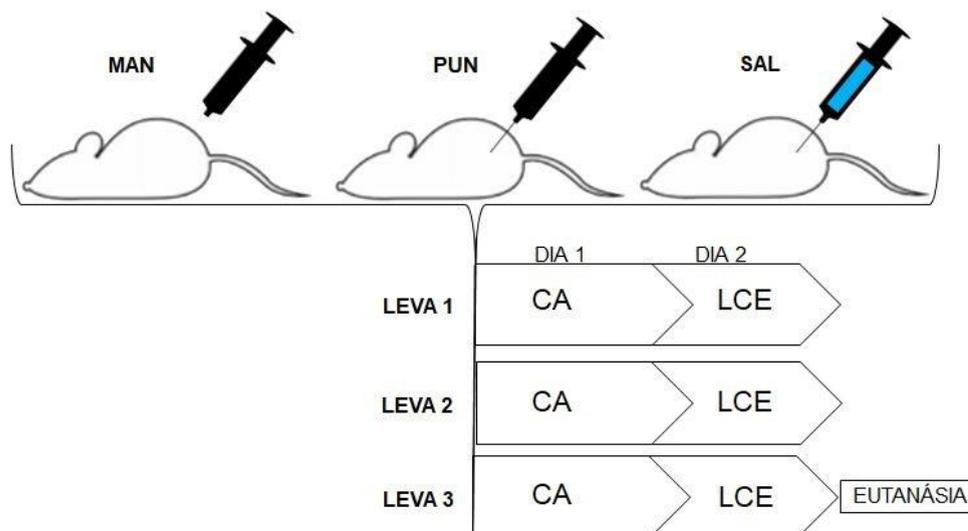


Figura 4- Desenho experimental esquematizado mostrando os grupos manipulação (MAN), punção (PUN) e salina (SAL) e os respectivos protocolos para cada dia de experimento.

3.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS E REPRESENTAÇÃO GRÁFICA

Todas as análises estatísticas foram realizadas via *software* Statistica 10 (StatSoft, Tulsa, OK, USA). Os dados foram testados quanto sua normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e homogeneidade de variância pelo teste de Levene. Encontrando-se quebras de normalidade, buscaram-se *outliers* utilizando o *software* Prism 8 (GraphPad Software, USA) usando o método ROUT (do inglês *Robust regression and Outlier removal*) baseado no desvio padrão da média. Importante destacar que os *outliers* encontrados ao longo dos experimentos foram removidos exclusivamente da variável correspondente a qual foram previamente apontadas na descrição dos resultados obtidos em cada aparato.

As análises estatísticas foram realizadas por meio de análise de variância (ANOVA) de duas vias (tratamento e linhagem como variáveis independentes), seguida de *post hoc* de Duncan quando necessário. Para representar os efeitos estatísticos $p \leq 0,05$ foi utilizado o símbolo (&) e símbolo (&&) para $p < 0,01$ para o fator linhagem. O símbolo (#) foi utilizado para indicar efeito estatístico entre os tratamentos PUN e SAL com o grupo MAN; e (*) foi utilizado para sinalizar efeito estatístico para a interação entre linhagem e tratamento. Todos os gráficos foram gerados pelo *software* GraphPad Prism e representados com erro padrão da média (E.P.M.).

4. RESULTADOS

4.1 MACHOS

4.1.1 CAMPO ABERTO

No teste de CA, a ANOVA de duas vias revelou alguns efeitos significativos para os parâmetros avaliados no aparato como também alguns efeitos marginais destacados a seguir, que serão posteriormente abordados na sessão “Discussão”.

Nos parâmetros associados à exploração da região aversiva (centro do aparato), como a variável número de entradas no centro observou-se uma interação entre linhagem e tratamento ($F(4, 98) = 2,9993, p = 0,022$; SLA16-SAL > SHR-SAL). Ao realizar o *post hoc* destacou-se uma diferença entre as duas linhagens exclusivamente nos grupos salina (SLA16-SAL e SHR-SAL) com maiores níveis de exploração para a linhagem SLA16 (Figura 5 A). Enquanto isso na distância no centro do aparato (Figura 5 B) não se constatou diferenças estatísticas relevantes. Entretanto, quanto ao parâmetro de tempo no centro, observou-se uma interação entre linhagem e tratamento ($F(2, 52) = 3,151, p = 0,05$; SHR-PUN > SLA16-PUN) (Figura 5 C). Ao realizar o *post hoc* destacou-se uma diferença entre as duas linhagens exclusivamente no grupo punção com maiores níveis de tempo no centro na linhagem SHR.

Referente aos parâmetros relacionados à locomoção, foi possível observar uma diferença estatística de linhagem com maiores valores da linhagem SLA16 tanto na variável distância periférica [$F(1, 53) = 4,687, p = 0,0349$; SLA16 > SHR] e distância percorrida total [$F(1, 53) = 3,860, p = 0,0471$; SLA16 > SHR] observáveis na figura 5 D e E respectivamente.

É importante destacar que ocorreu a remoção de *outliers* (identificados via métodos ROUT como descrito na sessão anterior) visando a remoção de elementos discrepantes que distorciam a curva normal. Extraíram-se 2 *outliers* da variável “entradas no centro” (um SLA16-MAN e um SLA16-PUN), 1 outlier da “distância do centro” (um SLA16-SAL) e 1 outlier da variável “tempo no centro” (um SHR-SAL).

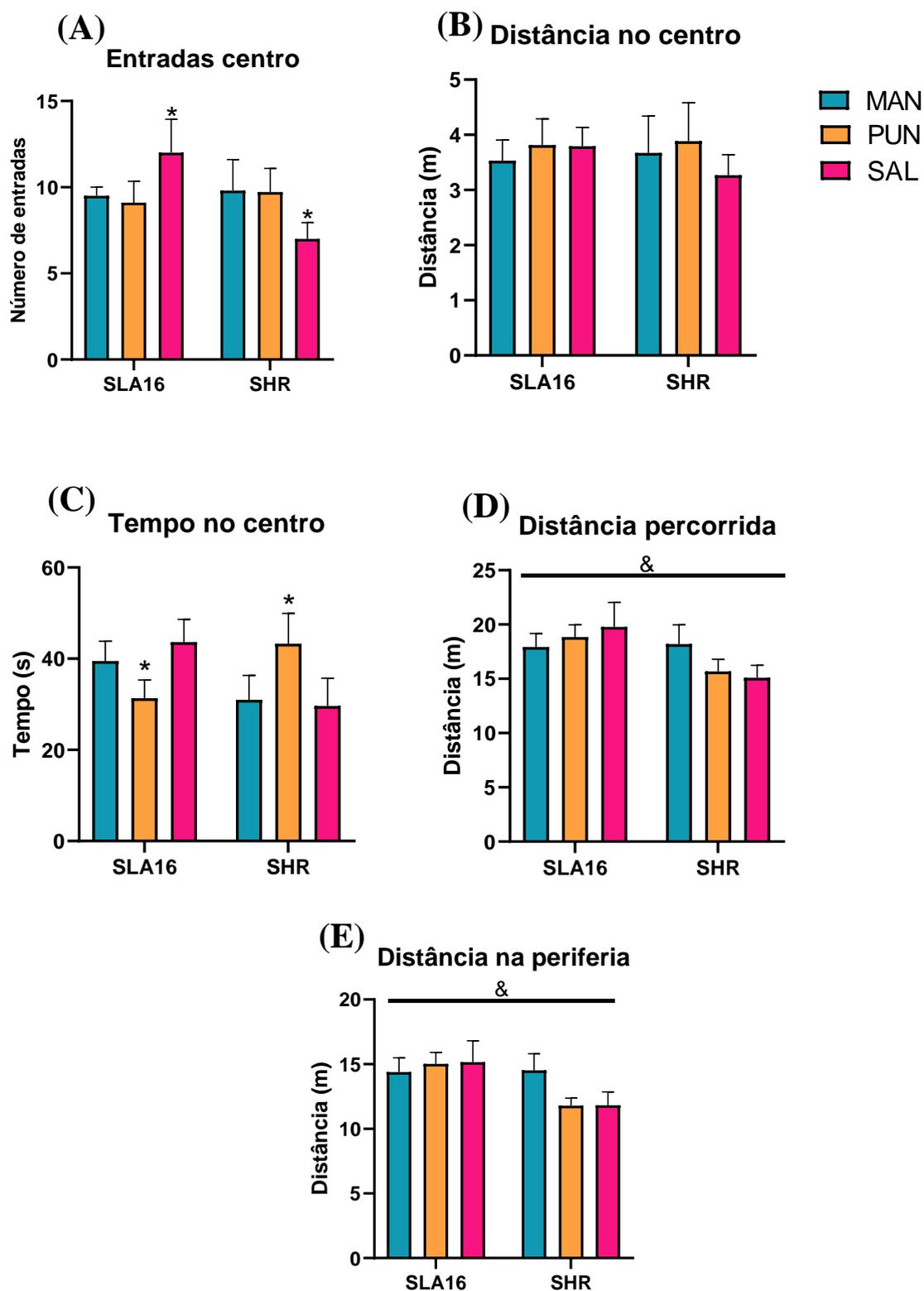


Figura 5- Resultados do Campo Aberto para observação de efeitos comportamentais após aplicação dos tratamentos (manipulação, punção e salina) nos machos. (A) entradas no centro, (B) locomoção central. (C) tempo no centro (destacando-se efeito entre linhagem e tratamento) (*), (D) distância percorrida na periferia (em metros), (E) distância percorrida total (em metros). Efeitos de linhagem (&). Resultados expressos como média erro padrão da média.

4.1.2 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

A ANOVA de duas vias revelou alguns efeitos significativos no teste do LCE destacados a seguir, que serão posteriormente abordados na sessão “Discussão”.

Nas variáveis referentes à exploração da região aversiva (braços abertos), como entradas no braço aberto [$F(1, 52) = 7,428, p=0.0087; SLA16>SHR$] e tempo no braço aberto [$F(1, 53) = 6,895, p=0.0113; SLA16>SHR$] (Figura 6 **A** e **B**, respectivamente) observamos um efeito de linhagem com maior exploração para a linhagem SLA16. Este último parâmetro também apresentou uma tendência de interação entre linhagem e tratamento ($p=0.0612$) mostrando maior tempo de permanência do braço aberto para o grupo SLA16-PUN e menos para o grupo SHR-PUN.

Não se observaram efeitos com significância estatística para o número de entradas no braço fechado (Figura 6 **C**), mesmo ocorrendo uma tendência para uma interação entre linhagem e tratamento [$F(2, 52) = 2,937, p=0.0623$]. Em contrapartida, detectaram-se efeitos estatísticos de linhagem na variável tempo no braço fechado [$F(2, 53) = 3,411, p=0.0041; SHR>SLA16$] (Figura 6 **D**) além de apresentar efeitos estatísticos de interação entre linhagem/tratamento [$F(2, 53) = 3,411, p=0.0404$], que após aplicação de teste *post hoc* (Duncan), evidenciaram um efeito entre os grupos punção ($p=0.0019; SHR-PUN>SLA16-PUN$), efeito corroborativo aos observados no braço aberto (melhor debatido na sessão “Discussão”).

No que abrange os efeitos de locomção total no aparato, observaram-se efeitos de linhagem [$F(1, 53) = 6,908, p=0.0112; SLA16>SHR$] com maiores taxas de locomoção percorrida pela linhagem SLA16 (Figura 6 **E**). Foram também observados efeitos de tratamento [$F(2, 53) = 11,64, p<0.0001$] e após a aplicação de teste *post hoc* obtiveram-se diferenças estatísticas entre os grupos MAN e PUN ($p=0.00018$) e entre MAN e SAL ($p=0.0065$) destacando uma diminuição dos níveis de locomoção para os tratamentos PUN e SAL comparados aos grupos MAN (como observado na Figura 6 **E**).

É importante destacar a exclusão de *outliers* visando a remoção de elementos discrepantes que distorciam a curva normal. Extraíram-se 1 *outlier* da variável “entradas no braço aberto” (um SLA-16-MAN), 1 *outlier* da variável “entradas no braço fechado” (um SLA16-PUN).

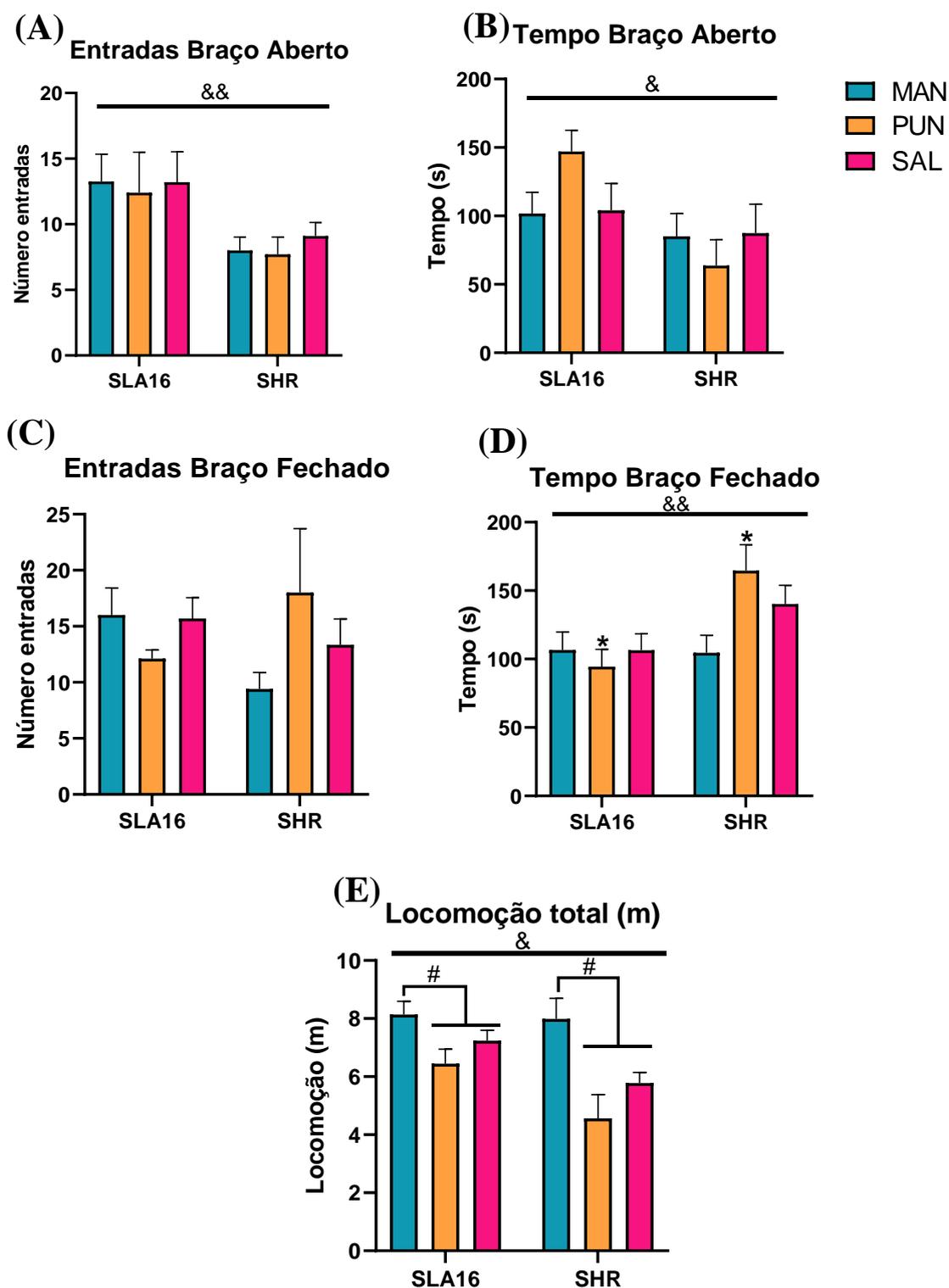


Figura 6- Resultados do labirinto em cruz elevado para observação de efeitos comportamentais após aplicação dos tratamentos (manipulação, punção e salina) para os machos. (A) Entradas no braço aberto, (B) tempo no braço aberto (em segundos), (C) entradas no braço fechado, (D) tempo no braço fechado (em segundos) e (E) locomoção total (em metros). Efeitos de linhagem (&) ($p < 0,05$) e (&&) ($p < 0,01$), efeito estatístico dos tratamentos comparados ao grupo MAN (#) ($p < 0,05$) e efeito de linhagem/tratamento (*) ($p < 0,05$). Resultados expressos em erro padrão da média.

4.2 FÊMEAS

4.2.1 CAMPO ABERTO

No teste de CA das fêmeas, a ANOVA de duas vias revelou alguns efeitos significativos para os parâmetros avaliados no aparato como também alguns efeitos marginais destacados a seguir, que serão posteriormente abordados na sessão “Discussão”.

No âmbito das propriedades associadas à exploração da região mais aversiva (centro do aparato) obteve-se um efeito de linhagem na avaliação de número de entradas no centro [F (1, 48) = 5,238, p=0.0265] apresentando aumento da linhagem SLA16 comparado à linhagem SHR (Figura 7 A). Referente ao parâmetro de tempo no centro, não ocorreram efeitos estatísticos relevantes (Figura 7 B).

Referente aos resultados que avaliam o comportamento locomotor dos animais, constataram-se efeitos de linhagem para os parâmetros de distância no centro [F (1, 48) = 4,618, p=0.0367; SLA16>SHR], distância na periferia [F (1, 48) = 7,598, p=0.0082; SLA16>SHR], e distância percorrida total [F (1, 48) = 8,844, p=0.0046; SLA16>SHR] (Figura 7 C, D e E, respectivamente), todos mostrando maior distância percorrida pela linhagem SLA16.

Os resultados para a variável velocidade máxima total (Figura 7 F) revelaram uma interação entre linhagem e tratamento [F (2, 46) = 3,194, p=0.05] que após o *post hoc* indicou um efeito entre os grupos SHR-PUN e SHR-SAL (p=0.0049) com maiores valores para o grupo SHR-SAL. Além de apresentar um efeito de tratamento [F (2,46) = 3,19, p=0.042], que pós teste *post hoc* apresentou diferenças estatísticas entre os grupos MAN e PUN (p=0.046; MAN>PUN) e SAL e PUN (p=0.026), mostrando uma velocidade máxima menor para o grupo PUN em ambos os efeitos apresentados.

É importante destacar a exclusão de *outliers* visando a remoção de elementos discrepantes que destorciam a curva normal. Extraíram-se dois *outliers* ambos localizados na variável “velocidade máxima total” (um SHR-MAN e um SLA16-PUN).

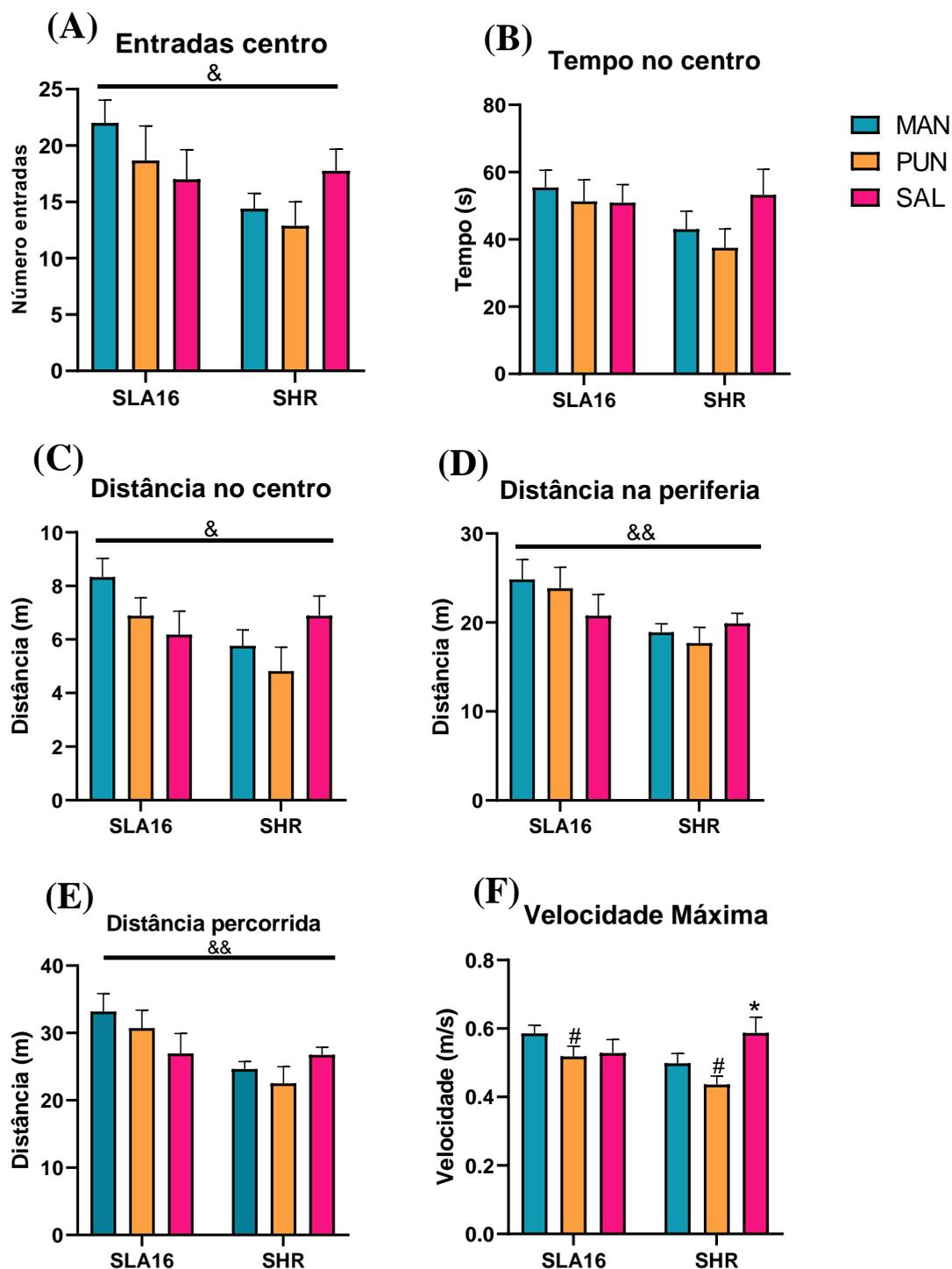


Figura 7- Resultados do campo aberto para observação de efeitos comportamentais após aplicação dos tratamentos (manipulação, punção e salina) para as fêmeas. (A) entradas no centro, (B) tempo no centro (em segundos) (C) distância centro (em metros), (D) distância percorrida na periferia (em metros), (E) distância percorrida total (em metros) e (F) velocidade máxima alcançada total no aparato (em m/s). Efeitos de linhagem destacado com (&) ($p < 0,05$) e (&&) ($p < 0,01$), efeito estatístico de tratamento comparado ao grupo manipulação (#) ($p < 0,05$). Resultados expressos como média erro padrão da média.

4.2.2 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

A ANOVA de duas vias revelou alguns efeitos significativos no teste do LCE destacados a seguir, que serão posteriormente abordados na sessão “Discussão”.

Nas variáveis referentes à exploração da região aversiva (braços abertos), como entradas no braço e tempo no braço aberto, observou-se um efeito de linhagem apenas para o número de entradas no braço aberto [$F(1, 48) = 8,328, p=0.0058$] mostrando maiores níveis de entradas no braço mais aversivo por parte da linhagem SLA16 (Figura 8 A).

E entradas no braço fechado e tempo no braço fechado (Figura 8 C e D) não apresentaram significância estatística. Entretanto, para este último, se observou a presença de uma tendência de interação entre linhagem e tratamento [$F(2, 46) = 3,058, p=0.0566$] (Figura 8 D). No que abrange os efeitos de locomoção total (Figura 8 E) não se observaram efeitos com significância estatística.

É importante destacar a exclusão de *outliers* visando a remoção de elementos discrepantes que distorciam a curva normal. Extraíram-se dois *outliers* para a variável “entrada no braço fechado (um SLA16-PUN e outro SLA16-SAL) e um para a variável “tempo no braço aberto” (SLA16-MAN).

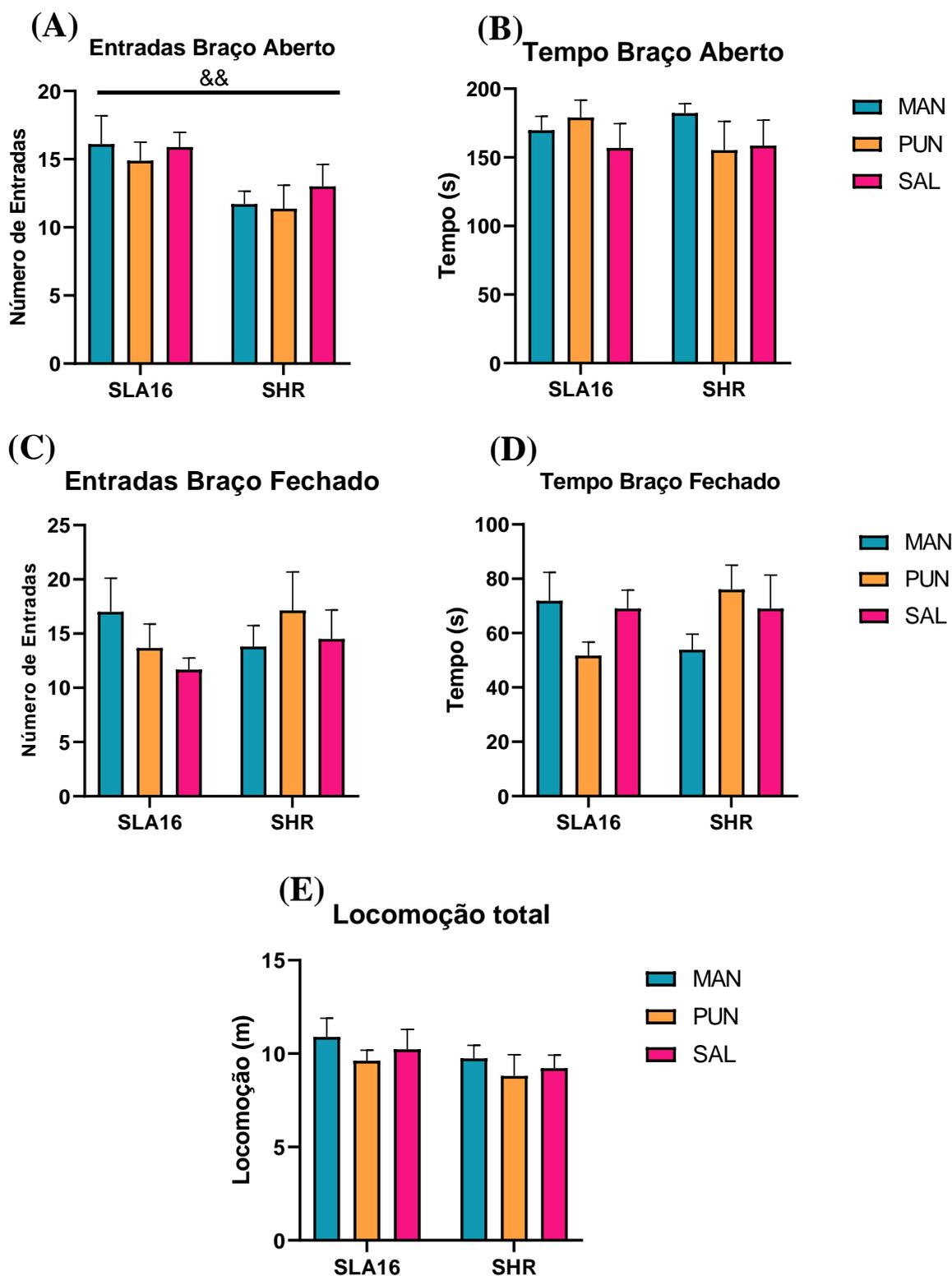


Figura 8- Resultados do LCE para observação de efeitos comportamentais após aplicação dos tratamentos (manipulação, punção e salina) para as fêmeas. (A) Entradas no braço aberto, (B) tempo no braço aberto (em segundos), (C) entradas no braço fechado, (D) tempo no braço fechado (em segundos) e (E) locomoção total (em metros). Efeitos de linhagem (&&) ($p < 0.01$). Resultados expressos em erro padrão da média.

5. DISCUSSÃO

O atual estudo busca averiguar possíveis influências de tratamentos pré-farmacológicos, via injeção IP, frente aos dados comportamentais das linhagens SLA16 e SHR, com grupos sexuais estudados separadamente. A aplicação de três estímulos distintos, buscou investigar se ocorrem diferenças estatísticas entre a aplicação de um estímulo por punção com agulha (PUN), a injeção de salina propriamente dita (SAL), comparados ao grupo de manipulação basal dos animais (MAN). Os resultados apresentaram distinções de intensidades e estratégias diferentes frente aos estímulos aplicados, afetando diferentemente os níveis locomotores e de exploração das regiões aversivas, nos diferentes grupos para ambos os aparatos. Este evento apontaria para possíveis diferenças neurobiológicas e/ou nociceptivas advindas da região genômica diferencial, que ao interagir aos estímulos externos poderia ocultar possíveis diferenças basais entre as linhagens.

No atual trabalho, observaram-se parâmetros que fomentam as diferenças entre as linhagens SHR e SLA16. Nos machos, a presença de efeitos de linhagem, em todas as variáveis de locomoção, pode ser observada tanto no CA quanto no LCE, ambos apresentando maiores níveis de locomoção para a linhagem SLA16. O mesmo é espelhado no grupo das fêmeas, apresentando maiores níveis de locomoção total, central e periférica, na linhagem SLA16, no CA. Estes eventos voltam a corroborar com padrões previamente observados em outros estudos (DE MEDEIROS *et al.*, 2013; FADANNI *et al.*, 2023; MEDEIROS *et al.*, 2014), mostrando níveis de superioridade na hiperatividade da linhagem SLA16 frente à sua linhagem controle.

Além das diferenças de locomoção basal, distinções de linhagem voltaram a ser observadas em parâmetros associados a exploração das regiões de maior aversão tanto no CA quanto no LCE. Nos machos, no LCE observaram-se efeitos de linhagem nos parâmetros entradas no braço aberto ($p=0.0087$) e tempo na mesma região ($p=0.0113$) favorecendo maiores níveis de exploração para a linhagem SLA16, quanto no tempo no braço fechado ($p=0.0041$) (Figuras 5 A, B e D respectivamente) mostram-se maiores níveis para o SHR. Para as fêmeas novamente no CA o número de entradas no centro ($p=0.0265$) (Figuras 7 A) apontaram para os maiores níveis para a linhagem SLA16. Ao mesmo tempo que no LCE, a mesma vantagem para a linhagem foi observada apenas no atributo entradas no braço aberto ($p=0.0058$) (Figura 8 A). Na literatura, a presença de maiores níveis exploratórios em regiões mais aversivas em aparatos como CA (GOULD; DAO; KOVACSICS, 2009) e LCE, são interpretados como comportamentos tipo menos ansiosos. Deste modo, os nossos dados corroboram com os estudos

precedentes (ACUÑA *et al.*, 2018; DE MEDEIROS *et al.*, 2013; FADANNI *et al.*, 2023; MEDEIROS *et al.*, 2014), que apontam menores níveis de ansiedades associados à linhagem SLA16, quando comparada à SHR.

Tradicionalmente, o TDAH apresenta fatores como prejuízos em funções executivas e hiperatividade em indivíduos com podendo ser atribuída a uma combinação de fatores neurobiológicos, cognitivos e comportamentais (SONG *et al.*, 2021). Neste âmbito, os sintomas do transtorno, como nível de hiperatividade superior e alterações da regulação emocional a resposta ao estresse, além da geração de uma impulsividade e desatenção ao ambiente, busca ser refletido no desenvolvimento de animais modelo para o TDAH (RAHI; KUMAR, 2021). Diante disso, considerando o amplo emprego da linhagem SHR como modelo padrão-ouro para o TDAH (SAGVOLDEN, 2000), a constatação de efeitos locomotores mais pronunciados e um nível reduzido de ansiedade na linhagem SLA16, observados neste estudo, reforçam a validade da utilização dessa linhagem como mais próxima aos comportamentos observados no TDAH (PREDIGER *et al.*, 2018).

O desaparecimento de efeitos de linhagem em alguns parâmetros de exploração, como entradas no centro do CA, em machos, e tempo nos braços do LCE, nas fêmeas, voltam a fomentar o poder de influência dos tratamentos pré-teste sobre o comportamento das linhagens. Como comentado anteriormente, efeitos de linhagem associados a variáveis exploratórias em aparatos como CA, LCE e CCE, são amplamente constatados na literatura (DE MEDEIROS *et al.*, 2013; MEDEIROS *et al.*, 2014; VELÁZQUEZ *et al.*, 2019), evidenciando maiores níveis exploratórios de áreas aversivas para a linhagem SLA16. O efeito de linhagem mostrando menores níveis de ansiedade a linhagem SLA16 ao ser comparada ao SHR, em testes com animais *naive*, mostrou-se inclusive resistente à exposição repetida a um ambiente novo (Granzotto, 2016). O contraste destas evidências com os resultados obtidos neste trabalho manifesta a sensibilidade das diferenças comportamentais das linhagens sobre qualquer interação prévia, amostrando efeitos de desaparecimentos, ou até inversões de comportamentos comumente observados em animais *naive*.

Seguindo este raciocínio, nos machos, as linhagens evidenciaram oposição tanto nas estratégias quanto nos graus de intensidade de reação entre grupos que sofreram os mesmos tratamentos prévios. Esta afirmação sustenta-se principalmente em reversões incomuns do comportamento das linhagens sobre a luz de um mesmo estímulo, gerando a inversão de comportamentos comuns na comparação das linhagens, ou nivelando parâmetros analisados. Nos resultados obtidos nos machos a interação entre linhagem e tratamento no parâmetro de tempo de permanência no centro (Figura 5 C) evidenciam tal afirmação. Aqui, os animais do

tratamento PUN apresentaram comportamentos diferenciais para cada linhagem ao serem comparados com os demais grupos internos às linhagens (MAN e SAL). Enquanto SLA16-PUN apresentou uma diminuição do tempo na região central, o grupo SHR-PUN apresentou um aumento do tempo de estadia na região. O mesmo pode ser observado nas tendências ou efeitos entre linhagem e tratamento dos parâmetros de tempo no braço aberto ($p=0.0612$) e no tempo no braço fechado ($p=0.00404$) (Figura 6 B e D respectivamente), que novamente amostram um contraste nos comportamentos dos grupos PUN entre as linhagens, inversamente proporcionais entre si.

No CA dos machos, o efeito entre linhagem e tratamento do tempo no centro aponta uma “inversão” da interpretação dos dados de menores níveis de ansiedade entre as linhagens, quando comparado aos demais grupos de tratamento. O caráter de menores níveis de ansiedade, que comumente é atribuído a linhagem SLA16, frente aos grupos PUN, é atribuída a linhagem SHR. O mesmo é fortalecido para o parâmetro de número de entradas no campo aberto (Figura 5 A) a qual ocorre a presença de um efeito entre linhagem e tratamento associado ao tratamento SAL, que gera uma diminuição das entradas na região para SHR contrastante ao aumento para SLA16. Evidenciando que ao interagir diferentemente aos estímulos aplicados os mesmos tem a capacidade de ocultar ou distorcer diferenças basais entre as linhagens.

No LCE, os mesmos grupos de tratamento PUN mostram novamente distinções nos níveis de reação aos estímulos entre as linhagens. Neste, os efeitos entre linhagem e tratamento apontam menores níveis de ansiedade para a linhagem SLA16, em parâmetros como tempo no braço aberto, concordando com a literatura (MEDEIROS *et al.*, 2014). Entretanto, à luz do grupo PUN, ocorre uma intensificação dessas diferenças entre as linhagens, gerando um aumento do tempo no braço aberto para a linhagem SLA16. Simultaneamente a linhagem SHR apontou uma intensificação dos níveis de ansiedade para o grupo PUN gerando uma diminuição do tempo no braço aberto, gerando o efeito estatístico observado confirmado pelo *post hoc*. No parâmetro de tempo no braço fechado o efeito volta a ser observado nas mesmas intensidades, mostrando novamente estratégias distintas entre ambas as linhagens sobre os mesmos estímulos.

Em resumo, o atual trabalho indicou, nos machos, distinções de caráter comportamental entre as linhagens isogênicas, influenciadas por um mesmo estímulo em ambos os aparatos. Ao nos aprofundarmos nos significados atribuídos às variáveis destacadas, salientamos a relevância destes resultados na interpretação comportamental entre as linhagens isogênicas. A observação de distinções dos níveis de exploração, principalmente ligado aos

tratamentos mais invasivos (PUN e SAL), pelas linhagens SLA16 e SHR, indicam métodos distintos de enfrentamento ao ambiente por cada linhagem.

Intrigantemente, os efeitos comportamentais associados a ansiedade, ligados aos grupos PUN, parecem diferir não apenas entre as linhagens, mas também entre os testes. Para exemplificar, enquanto no CA o tratamento punção gerou maiores níveis do comportamento tipo ansioso para a linhagem SLA16 (apoiado pela variável tempo no centro), no LCE ocorreu uma inversão dos efeitos, gerando maiores níveis de ansiedade para a linhagem SHR. A não presença de um mesmo efeito do estímulo nos aparatos, de fato impedem uma interpretação linear para apoio de efeitos ansiogênicos ou ansiolíticos ligados a punção IP. Deste modo os efeitos observados parecem estar correlacionados a diferenças intrínsecas ao que cada aparato avalia.

Em busca de estudos anteriores para elucidar a condição divergentes em aparatos que buscam mensurar o comportamento tipo ansioso, identificamos estudos que corroboram com eventos de divergências em testes de ansiedade realizados em dias consecutivos (RUDOLFOVÁ *et al.*, 2022; SUDAKOV *et al.*, 2013). Em Rudolfová *et al* (2022), salienta-se que respostas comportamentais de uma mesma linhagem exposta em dias consecutivos no CA e LCE, diferiram nos níveis de ansiedade testados em ambos os aparatos. Um resultado semelhante foi obtido em Sudakov *et al.* (2013), a qual a testagem de três testes de ansiedade distintos evidenciou distinções entre os resultados ao aplicarem-se animais com graus de ansiedade contrastantes já caracterizados. A presença de efeitos comportamentais divergentes em aparatos de avaliação semelhante, em animais *naive*, já mostra a presença de uma complexidade de interpretação inerente a interferência de tratamentos prévios. No atual estudo, soma-se a presença de distinções relacionadas aos graus distintos de dor presentes na aplicação dos estímulos mais invasivos no primeiro dia, ao ser comparado ao segundo dia. Essas múltiplas variáveis aumentam os graus de complexidade de interpretação dos possíveis geradores dos eventos divergentes apresentados nos aparatos. A ausência desta interpretação, entretanto, não invalida o aparecimento de reações diferenciais ao estímulo punção, como apontado anteriormente, nos machos das linhagens parentais.

Nas fêmeas, a reatividade diferencial entre as linhagens, ligados aos estímulos aplicados, tendeu a ser menos proeminente do que aos dos machos. Efetivamente, nas fêmeas, observaram-se efeitos estatísticos apenas entre os grupos internos da linhagem SHR no parâmetro velocidade máxima no CA (Figuras 7 F). Estes evidenciaram distinções entre os grupos PUN e SAL, diferença não observada nos grupos da linhagem SLA16, destacando novamente distinções de reatividade locomotora associada aos estímulos entre as linhagens. Os

demais parâmetros, contudo, não expressaram efeitos entre linhagem e tratamento como evidenciado nos machos em nenhum dos aparatos. A falta de efeitos entre linhagem e tratamento nas fêmeas, quando comparados as evidências observadas nos machos, apontam para uma menor reatividade das fêmeas ao receberem os estímulos.

As divergências dos resultados observados entre machos e fêmeas, como citado anteriormente nesta sessão, apresenta antecedentes sobre observações entre as linhagens isogênicas que originaram a linhagem SLA16 (RAMOS *et al.*, 2002). Como já tem sido apontado em outros estudos (DONNER; LOWRY, 2013; KNIGHT *et al.*, 2021) as diferenças dos comportamentos de defesa como ansiedade parece ser de caráter sexo-dependente, podendo atribuir responsividade distintas a fármacos, ou estímulos, até mesmo dentro da mesma linhagem (DONNER; LOWRY, 2013). Os mecanismos pelos quais ocorre a regulação na transmissão de sinais celulares em distúrbios emocionais e como a influência do sexo afeta esses comportamentos, permanecem obscuros, devido à complexidade não apenas das vias neurais, mas também das interações dos hormônios sexuais no sistema nervoso central dos modelos experimentais empregados (DONNER; LOWRY, 2013; RUBINOW; SCHMIDT, 2019).

No atual trabalho os machos tenderam a apresentar maiores distinções de reatividade emocional, principalmente sob a influência do tratamento punção. O não aparecimento de uma conformidade dos efeitos obtidos em cada grupo sexual aponta um efeito com grau de sensibilidade sexo-dependente. No atual trabalho, ocorre uma menor reatividade a estímulos pré-farmacológicos em fêmeas aplicados igualmente em animais de ambas as linhagens. Este apresenta vantagens na sustentação de padrões comportamentais mais semelhantes com os observados em grupos *naive* na literatura. No contexto abordado, da comparação entre as linhagens SHR e SLA16, a utilização de fêmeas demonstra ser mais benéfica do que a utilização dos machos.

Mesmo com o aparecimento de efeitos diferenciais para ambos os grupos que sofreram tratamentos que envolvem a penetração da seringa via IP, o PUN e SAL, estes mostraram uma inesperada distinção das influências entre estímulo que diferem apenas pela presença da salina. Como apontado anteriormente, os eventos de reatividade diferencial entre as linhagens que pode ser observado nos machos, tanto no CA quanto no LCE, foram ligadas ao tratamento PUN, enquanto o tratamento SAL apresentou uma semelhança com o grupo MAN. Estas evidências apontam para uma diferenciação do grau de reatividade aos estímulos em alguns parâmetros avaliados em machos. Estes procedimentos, considerando a penetração da seringa para ambos os tratamentos, podem diferir na mudança dos níveis de desconforto causada pela injeção do fluido salina mais frio (por estar a temperatura ambiente), podendo gerar respostas de estresse

agudas diferenciais. O efeito divergente de níveis de estresse pode ser o fator que desencadeia a ativação com intensidade distinto neurobiológicos entre as linhagens isogênicas estudadas.

No atual trabalho, ao observarmos os efeitos gerados pelos grupos que receberam injeção salina, não mostraram dados consistentes que corroborem com efeitos ansiogênicos atribuídos ao estímulo. Ao observarmos os achados de Lapin (1995), de observações de efeitos ansiogênicos ligados a injeção salina, em paralelo com o atual trabalho, mostra-se uma concordância de efeitos ansiogênicos ligado a injeção salina apenas observáveis no CA avaliado em machos, no parâmetro entradas no centro e exclusivamente ligados a linhagem SHR. Em contrapartida, na mesma variável, a linhagem SLA16 mostrou uma intensificação do número de entradas no centro, mostrando uma inconstância de efeitos atribuídos a salina dependendo da linhagem utilizada. Os atuais achados, somados com a falta de efeitos de linhagem e tratamento no LCE, principal teste usado em seu trabalho, parecem não corroborar com as observações de efeito ansiogênicos apontados por Lapin (1995), mas sim observa-se mais uma vez a presença de distinções das estratégias de enfrentamento das linhagens frente ao estímulo estressor.

O estresse tem sido amplamente estudado como um fator que desempenha um papel significativo no desenvolvimento e na expressão de comportamentos relacionados à ansiedade em ratos de laboratório (DAVIU *et al.*, 2019). Vários mecanismos estão envolvidos nessa relação complexa, como compartilhamento de regiões encefálicas comuns, como *locus coeruleus*, amígdala basolateral e núcleo *accumbens* (DAVIU *et al.*, 2019; SUÁREZ-PEREIRA *et al.*, 2022). Estas vias apresentam conectividades em estruturas centrais no processamento de tomadas de decisão como córtex pré-frontal, além de mostrarem influências em circuitos retroalimentados associados a estruturas ligadas a sub-regiões hipotalâmicas (FELIX-ORTIZ *et al.*, 2013). Estas estruturas parecem ter papel de influência sobre as diferenças comportamentais associadas as linhagens SLA16 e SHR devido as distinções oriundas da RGD.

Estudos anteriores realizados entre as linhagens SLA16 e SHR, buscaram identificar distinções das taxas de marcadores no hipocampo associados ao estresse fundamentais na modulação de memória por proliferação celular, em jovens-adultos das linhagens SHR e SLA16 pós exposições a testes CA, LCE e teste de reconhecimento de objetos (VIEIRA, 2021). Este estudo não revelou diferenças relativas a tais marcadores entre as linhagens SHR e SLA16. Porém, o mesmo admite a necessidade de averiguação de produtos e marcadores do sistema do estresse sob a influência de estresse crônico e agudo nas linhagens, algo que pode ser atribuído em nosso estudo devido ao grau de intrusão atribuído ao tratamento punção.

Levando em consideração a ampla caracterização comportamental entre as linhagens SHR e SLA16, relativas ao comportamento tipo ansioso, o atual estudo, ao observar diferenças de respostas associadas a estímulos invasivos, pode sugerir um envolvimento de mecanismos neuroendócrinos de estresse ou de percepção de nocicepção, permitindo convergir alvos genéticos na região diferencial *Anxrr16*. Como já descrito por Medeiros *et al* (2014), alguns alvos genéticos presentes na região podem justificar a origem dos gatilhos das diferenças comportamentais entre as linhagens, inclusive apontadas neste estudo.

Uma primeira perspectiva futura está associada à conjectura de que os eventos de mudança estratégica das linhagens no atual trabalho, poderiam estar associadas a genes associados diretamente aos mecanismos neurobiológicos do estresse. Dentre estes pode-se apontar o gene *Crhr2*, expresso no hipocampo, este gene está diretamente envolvido no funcionamento do eixo HPA e com amplo envolvimento no sistema neurofisiológico da ansiedade e do estresse (REUL; HOLSBOER, 2002). Além disso, receptores CRHR (1 e 2) parecem ter um envolvimento apresentam envolvimento no ciclo de associação ansiedade/estresse que envolvida na ativação neuronal do *locus coeruleos* e amígdala basolateral (MCCALL *et al.*, 2015). Neste âmbito, estudos futuros visando a avaliação de diferenças associadas ao gene, poderiam ser avaliadas na mensuração de subprodutos do eixo HPA. Após estímulos estressores agudos, a mensuração das taxas de corticosterona, poderiam apontar distinções neuroendócrinas mais diretas entre as linhagens SLA16 e SHR.

Outra perspectiva está associada a possíveis diferenças na sensibilidade de nocicepção entre as linhagens, desencadeando níveis diferenciais de estresse agudo justificando as diferentes reatividades aos estímulos. Dentre os genes responsáveis por esta distinção, pode-se apontar o gene *Grip2*, a proteína expressa por este gene apresenta uma interação direta com a subunidade GluA2 da proteína AMPA. Como comentado anteriormente, A ativação dos receptores AMPA está associada à transmissão sináptica excitatória e à plasticidade neuronal, influenciando diversos processos cognitivos, como aprendizado e memória (HASELMANN *et al.*, 2018), elemento diferencial já apontado entre as linhagens em estudos anteriores (VELÁZQUEZ *et al.*, 2019). O mesmo receptor, além disso, apresenta interferência nas respostas comportamentais nociceptivas agudas e na dor crônica (GARRY *et al.*, 2003).

Esta perspectiva é apoiada pela presença de interferências em parâmetros locomotores, como locomoção total no LCE em machos (Figura 6 E), apresentando efeitos de tratamento com reatividade diferencial entre as linhagens, o mesmo evento sendo observado em velocidade máxima no CA em fêmeas (Figura 7 F) que corrobora com a presença de efeitos de linhagem e tratamento apenas para a linhagem SHR entre os grupos PUN e SAL. Estes dados podem

evidenciar diferenças na nocicepção entre as linhagens, associadas a sensibilidade diferencial do receptor AMPA ao glutamato, causada por diferenças estruturais da proteína Grip2 entre as linhagens. Neste âmbito, estudos futuros visando a avaliação de diferenças associadas ao gene, poderiam apontar distinções neurobiológicas mais pontuais entre as linhagens SLA16 e SHR.

6. CONCLUSÃO

Os dados obtidos neste trabalho sugerem efeitos comportamentais diferenciais entre as linhagens SLA16 e SHR frente a estímulos pré-teste. Estes eventos tiveram o poder de inverter diferenças comportamentais basais, ou equilibrar os níveis relativos à exploração de regiões aversivas, dos aparatos CA e LCE, principalmente nos machos, apoiando a hipótese inicial do trabalho. As reatividades dos grupos de tratamento analisados não foram iguais entre os grupos sexuais, indicando um possível efeitos de intensidade sexo-dependente que sustenta uma maior interferência dos estímulos sobre os machos. Estes dados apontariam para possíveis diferenças neurobiológicas e/ou nociceptivas advindas da região genômica diferencial das linhagens que ao interagir aos estímulos externos podem ocultar possíveis diferenças de linhagem basais. Novos estudos visando observar as implicações de estímulos estressores agudos nas linhagens podem melhor elucidar os mecanismos atrás dos resultados observados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACUÑA, Lucía Raily *et al.* **Effects of Repeated Treatment with Midazolam in SHR and SLA16 Rat Strains in the Triple Test.** Behavior Genetics, [s. l.], v. 48, n. 6, p. 440–450, 2018.

ANJOS, Pâmela Andressa Ramborger *et al.* **The influence of chromosome 4 on high ethanol consumption and blood pressure.** Alcohol, [s. l.], v. 102, p. 1–10, 2022.

ANSEMI, Mayara *et al.* **Genetic evidence for chromosome 4 loci influencing learning and memory.** Neurobiology of Learning and Memory, [s. l.], v. 131, p. 182–191, 2016.

ATTANASIO, Chiara; D'ANGELO, Livia; CORSI, Luisa. **Methods of handling and procedures.** Practical Handbook on the 3Rs in the Context of the Directive 2010/63/EU, [s. l.], p. 113–149, 2022. Disponível em: Acesso em: 15 maio 2023.

CASADEVALL, Arturo; FANG, Ferric C. **Reproducible science**. [S. l.: s. n.]: Infection and Immunity, 2010.

DAVIU, Nuria *et al.* **Neurobiological links between stress and anxiety**. [S. l.]: Elsevier Inc, 2019.

DE MEDEIROS, Gabriela Ferreira *et al.* **Low-Anxiety rat phenotypes can be further reduced through genetic intervention**. PLoS ONE, [s. l.], v. 8, n. 12, 2013.

DONNER, Nina C.; LOWRY, Christopher A. **Sex differences in anxiety and emotional behavior**. [S. l.: s. n.]: Pflugers Arch, 2013.

FADANNI, Guilherme Pasetto *et al.* **Genetic effects in a progressive model of parkinsonism induced by reserpine**. [S. l.]: Psychopharmacology, 2023.

FELIX-ORTIZ, Ada C. *et al.* **BLA to vHPC inputs modulate anxiety-related behaviors**. Neuron, [s. l.], v. 79, n. 4, p. 658–664, 2013.

GARRY, Emer M. *et al.* **Specific involvement in neuropathic pain of AMPA receptors and adapter proteins for the GluR2 subunit**. Molecular and Cellular Neuroscience, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 10–22, 2003.

GOULD, Todd D.; DAO, David T.; KOVACSICS, Colleen E. **The open field test**. [S. l.]: Humana Press, 2009.

GRANZOTTO, Natalli. **Efeitos farmacogenéticos do tratamento com cafeína em ratos isogênicos SHR e SLA16**. 2016. 104 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Departamento de Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/176673>. Acesso em: 20 jul. 2021.

HASELMANN, Holger *et al.* **Human Autoantibodies against the AMPA Receptor Subunit GluA2 Induce Receptor Reorganization and Memory Dysfunction**. Neuron, [s. l.], v. 100, n. 1, p. 91-105.e9, 2018.

HEILIG, Markus; KOOB, George F. **A key role for corticotropin-releasing factor in alcohol dependence**. [s. l.]: Trends in Neurosciences, 2007.

KAFKAFI, Neri *et al.* **Reproducibility and replicability of rodent phenotyping in preclinical studies**. [S. l.]: Elsevier Ltd, 2018.

KISHIMOTO, Toshimitsu *et al.* **Deletion of Crhr2 reveals an anxiolytic role for corticotropin-releasing hormone receptor-2**. Genetics Nature [S. l.: s. n.], 2000.

KNIGHT, Parker *et al.* **Sex differences in the elevated plus-maze test and large open field test in adult Wistar rats.** *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, [s. l.], v. 204, 2021.

LAPIN, I. P. **Only controls: Effect of handling, sham injection, and intraperitoneal injection of saline on behavior of mice in an elevated plus-maze.** *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, [s. l.], v. 34, n. 2, p. 73–77, 1995. Disponível em: Acesso em: 15 maio 2023.

MCCALL, Jordan G. *et al.* **CRH Engagement of the Locus Coeruleus Noradrenergic System Mediates Stress-Induced Anxiety.** *Neuron*, [s. l.], v. 87, n. 3, p. 605–620, 2015.

MEDEIROS, Gabriela Ferreira de *et al.* **The Long Way from Complex Phenotypes to Genes: The Story of Rat Chromosome 4 and Its Behavioral Effects.** *World Journal of Neuroscience*, [s. l.], v. 04, n. 03, p. 203–215, 2014.

MIFFLIN, Steve W; WANG, Lei A; NGUYEN, Dianna H. **CRHR2 (Corticotropin-Releasing Hormone Receptor 2) in the Nucleus of the Solitary Tract Contributes to Intermittent Hypoxia-Induced Hypertension Nervous System.** *AHA/ASA Journals* [s. l.], 2018. Disponível em: <https://www.ahajournals.org/doi/suppl/10.1161/HYPERTENSIONAHA>.

PÉRTILE, R. A.N. *et al.* **The Quinpirole Hypolocomotive Effects are Strain and Route of Administration Dependent in SHR and SLA16 Isogenic Rats.** *Behavior Genetics*, [s. l.], v. 47, n. 5, p. 552–563, 2017.

POPPER, Karl R; TOULMIN, Stephen E. **Review Reviewed Work(s): The Logic of Scientific Discovery.** *Scientific American* [s. l.], v. 200, n. 5, p. 189–196, 1959.

POTENZA, Marc N. *et al.* **Genomic regions controlling corticosterone levels in rats.** *Biological Psychiatry*, [s. l.], v. 55, n. 6, p. 634–641, 2004.

PREDIGER, Rui Daniel *et al.* **The Use of Object Recognition Task in Animal Models of Attention-Deficit Hyperactivity Disorder.** *Em: Handbook of Behavioral Neuroscience*. [S. l.]: Elsevier B.V., 2018. v. 27, p. 341–357.

RAHI, Vikrant; KUMAR, Puneet. **Animal models of attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD).** [S. l.]: John Wiley and Sons Inc, 2021.

RAMOS, André *et al.* **A multiple-test study of anxiety-related behaviours in six inbred rat strains.** *Behavioural Brain Research*, [s. l.], v. 85, n. 1, p. 57–69, 1997. Disponível em: Acesso em: 15 maio 2023.

RAMOS, André *et al.* **Evaluation of Lewis and SHR rat strains as a genetic model for the study of anxiety and pain** *Behavioural Brain Research*. [S. l.: s. n.] Elsevier, 2002.

RAMOS, A *et al.* **Identification of female-specific QTLs affecting an emotionality-related behavior in rats** *Molecular Psychiatry*. [S. l.: s. n.] Molecular Psychiatry, 1999.

REUL, Johannes M.H.M.; HOLSBOER, Florian. **On the role of corticotropin-releasing hormone receptors in anxiety and depression**. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 31–46, 2002.

RUBINOW, David R.; SCHMIDT, Peter J. **Sex differences and the neurobiology of affective disorders**. [S. l.]: Nature Publishing Group, 2019.

RUDOLFOVÁ, Veronika *et al.* **Inter-individual differences in laboratory rats as revealed by three behavioural tasks**. *Scientific Reports*, [s. l.], v. 12, n. 1, 2022.

SAGVOLDEN, Terje. **Behavioral validation of the spontaneously hypertensive rat (SHR) as an animal model of attention-deficit/hyperactivity disorder (AD/HD)**. [S. l.: s. n.], [s. d.]. Disponível em: www.elsevier.com/locate/neubiorev.

SONG, Peige *et al.* **The prevalence of adult attention-deficit hyperactivity disorder: A global systematic review and meta-analysis**. *Journal of Global Health*, [s. l.], v. 11, p. 1–9, 2021.

SUÁREZ-PEREIRA, Irene *et al.* **The Role of the Locus Coeruleus in Pain and Associated Stress-Related Disorders**. [S. l.]: Elsevier Inc., 2022.

SUDAKOV, S K *et al.* **Estimation of the Level of Anxiety in Rats: Differences in Results of Open-Field Test, Elevated Plus-Maze Test, and Vogel's Conflict Test** *Translated from Byulleten' Eksperimental'noi Biologii i Meditsiny*. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* [s. l.], v. 155, n. 3, 2013.

TERENINA-RIGALDIE, E.; JONES, B. C.; MORMÈDE, P. **Pleiotropic effect of a locus on chromosome 4 influencing alcohol drinking and emotional reactivity in rats**. *Genes, Brain and Behavior*, [s. l.], v. 2, n. 3, p. 125–131, 2003.

VAN DER STAAY, F. J.; STECKLER, T. **The fallacy of behavioral phenotyping without standardisation**. *Genes, Brain and Behavior* [s. l.], v. 1, p. 9-13, 2002.

VELÁZQUEZ, Ana Magdalena *et al.* **The influence of chromosome 4 on metabolism and spatial memory in SHR and SLA16 rat strains**. *Behavioural Brain Research*, [s. l.], v. 370, 2019.

VIEIRA, Ana Carolina da Silva. **Investigação da relação de biomarcadores hipocâmpais com o comportamento emocional em linhagens isogênicas de ratos SHR e SLA16**. 2021. 72 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Departamento de Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2021. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/229777>. Acesso em: 12 maio 2023.

WAHLSTEN, Douglas *et al.* **Different data from different labs: Lessons from studies of gene-environment interaction**. *Journal of Neurobiology* [s. l.], v. 54, n. 1, p. 283-311, 2003.