

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



*A Influência de Fatores Genéticos e Ambientais
em Modelos Animais de Ansiedade e sua Relação
com um Modelo de Alcoolismo*

Geison de Souza Izídio

Florianópolis, Abril de 2005.

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

**A Influência de Fatores Genéticos e
Ambientais em Modelos Animais de
Ansiedade e sua Relação com um Modelo
de Alcoolismo**

Geison de Souza Izídio

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

Orientador:

Prof. Dr. André de Ávila Ramos

Florianópolis, Abril de 2005.

“...como você define real?

Se você está falando do que você consegue sentir, cheirar, provar, ver, ouvir,
então real são simplesmente sinais elétricos interpretados pelo seu cérebro...”

Warner Bros. (Matrix I, 1999)

In memoriam

“Vivam o presente se preocupando apenas com cada instante e se esforcem para
fazer deste momento o mais feliz possível”

Bruno Rodrigo Gonçalves

AGRADECIMENTOS

Gostaria aqui de registrar meus mais sinceros agradecimentos a algumas pessoas que possibilitaram a realização de mais esta etapa da minha vida. Peço desculpas aos possíveis esquecidos desta lista.

- Ao professor Dr. André Ramos, pela amizade e pela oportunidade de trabalhar neste laboratório, que deu início a minha carreira científica. Também agradeço a excelente orientação dedicada a mim, sem a qual este trabalho não seria possível.
- A Dra. Silvana Chiavegatto que me recebeu no INCOR em São Paulo para um trabalho em colaboração, onde pude conhecer pela primeira vez outro laboratório, que já rendeu e ainda renderá excelentes resultados.
- Aos colegas de laboratório Douglas, Elayne, Fedra, Luiz e Thaís pela amizade e os bons momentos juntos, além da grande ajuda nas tarefas diárias, especialmente no momento da redação deste trabalho.
- A todos os meus amigos e amigas do Programa de Pós-graduação em Farmacologia especialmente a turma do futebol Rui, Luciano, Pamplona, Fabrício A., Fabrício H., Jarbas, Daniel, Inácio, Juliano, Rodrigo.
- Aos famosos “Calangueadores” Marcos Tortato, Tiago Juruá Damo Ranzi Fernando Luiz Hoffman Jr., Rafael Dornelles, Luiz Spricigo Jr., Marcos Pires, pelas inúmeras provas de verdadeira amizade e por todos os momentos de descontração proporcionados ao longo destes últimos anos.
- Aos professores e funcionários Diana, Goretti e Pedro do Departamento de Farmacologia da UFSC, que trabalham em favor de uma universidade pública,

gratuita e de qualidade.

- A minha namorada Carolina, por estar sempre ao meu lado em todos os momentos, de alegrias ou de dificuldades. A toda a sua família por me acolher e me apoiar nestes últimos anos, especialmente a sua mãe Dona Luci que muitos almoços me serviu durante estes dois anos.
- A minha grande família, especialmente, aos meus pais Nilson e Elisete, aos meus irmãos Juliana, Gustavo e Tatiana e as minhas avós Bárbara e Olinda, por todo o apoio e torcida para que tudo desse certo.
- Aos professores Drs. Reinaldo Naoto Takahashi, Silvana Chiavegatto e Thereza Christina Monteiro de Lima, por terem aceitado o convite para participar da avaliação deste trabalho e contribuir com melhorias para com o mesmo.
- Aos colegas de apartamento antigos, Reinaldo e Bruno, e atuais, Carazinho e Joel, com quem tanto pude aprender, descontraí-me e passar grandes momentos.
- Ao meu grande amigo Bruno Rodrigo Gonçalves, que tanto me ensinou nesta vida e que hoje não se faz mais presente.
- Aos “ratinhos” que são minha espécie de estudo e que me permitem ir a busca de conhecimento para o bem da nossa própria espécie.
- Ao apoio financeiro da CAPES, sem o qual esta etapa não teria sido completada.

IZÍDIO, Geison Souza A Influência de Fatores Genéticos e Ambientais em Modelos Animais de Ansiedade e sua Relação com um Modelo de Alcoolismo. Florianópolis, 2005. 1p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Programa de Pós Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: André de Ávila Ramos

Defesa: 22/02/05

Nós avaliamos a influência de fatores ambientais e genéticos sobre medidas comportamentais de ansiedade e alcoolismo. Para isso, testamos os ratos LEW e SHR em: (a) 3 testes comportamentais de ansiedade, com algumas variações no ambiente de laboratório, (b) um protocolo de alcoolismo e (c) medidas de expressão gênica. Os ratos Floripa H/L foram avaliados nos mesmos testes de ansiedade e alcoolismo. Os resultados mostraram que as linhagens LEW/SHR diferem no teste da caixa branca/preta (CBP), tanto na fase clara como na fase escura do ciclo circadiano, e no labirinto em cruz elevado (LCE), tanto no teste como no reteste 24h depois, com os animais LEW sendo mais “ansiosos” do que os SHR. A posição da gaiola no biotério e o estado comportamental (sono/vigília) do animal antes do teste influenciam os resultados dos testes de ansiedade. A linhagem mais “ansiosa” (LEW), foi a que consumiu maiores quantidades de etanol. Os ratos LEW apresentaram menores níveis de expressão gênica de NPY e maiores níveis de receptores 5-HT_{1A} em relação aos SHR no hipocampo. A linhagem Floripa L foi mais “ansiosa” e ingeriu mais etanol. Concluindo, (a) teste e reteste no LCE podem compartilhar componentes psicológicos comuns, (b) as diferenças genéticas entre ratos LEW e SHR são influenciadas por alguns detalhes do ambiente de laboratório, (c) parece existir uma correlação positiva entre a ansiedade e o alcoolismo e (d) o NPY e os receptores 5-HT_{1A} do hipocampo parecem estar envolvidos nestas patologias.

RESUMO

A influência da genética nas características relacionadas com os transtornos de ansiedade tem sido amplamente demonstrada tanto em humanos, quanto em modelos animais. No entanto, a comparação de linhagens de roedores em testes comportamentais de ansiedade/emocionalidade pode apresentar resultados não-reproduzíveis entre diferentes estudos e laboratórios, mesmo quando os genótipos são mantidos constantes. Então, além de se estudar os fatores genéticos, a identificação de fatores ambientais relevantes e as interações genótipo-ambiente parecem ser pontos importantes para aumentar a reprodutibilidade dos estudos genéticos e neurocomportamentais. Neste estudo, nós objetivamos avaliar a influência de fatores ambientais e genéticos sobre medidas comportamentais relacionadas à ansiedade e a possível relação entre modelos animais de ansiedade e alcoolismo. Para isso nós testamos um modelo genético animal (ratos das linhagens LEW e SHR) em: (a) três testes comportamentais de ansiedade, com algumas variações no ambiente de laboratório ou na situação de teste, (b) um protocolo de ingestão espontânea de etanol e (c) medidas de expressão gênica em duas regiões do cérebro relacionadas com comportamentos de ansiedade e alcoolismo. Além disso, um segundo modelo genético (ratos Floripa H e L) foi avaliado nos mesmos testes comportamentais de ansiedade e consumo de etanol. Os resultados mostraram que as linhagens LEW e SHR apresentaram diferenças relacionadas à ansiedade no teste da caixa branca/preta (CBP), tanto na fase clara como na fase escura do ciclo circadiano, e no labirinto em cruz elevado (LCE), tanto no teste como no reteste 24h depois, com os animais LEW parecendo mais “ansiosos” do que os animais SHR. Nós também mostramos que a posição

da gaiola no biotério e o estado comportamental (sono/vigília) do animal logo antes do teste têm influência nos resultados dos testes comportamentais de ansiedade, com algumas destas influências sendo genótipo-dependentes. Foi ainda demonstrado que a linhagem considerada a mais “ansiosa” (LEW) no nosso modelo genético, foi a que consumiu maiores quantidades de etanol quando este foi oferecido em livre escolha a concentrações de 6% e 10%. Além disso, foram encontrados menores níveis de expressão gênica de NPY e maiores níveis de expressão gênica de receptores 5-HT_{1A} no hipocampo, mas não no hipotálamo, dos ratos LEW em relação a ratos SHR. Outro gene investigado neste estudo, Grin2b, não diferiu no hipocampo ou no hipotálamo entre os ratos LEW e SHR. Finalmente, o protocolo de auto-administração de etanol aplicado às linhagens Floripa H e L sugeriu novamente uma correlação positiva entre os comportamentos de “ansiedade” e o consumo de álcool, pois a linhagem Floripa L, que foi a mais “ansiosa” neste modelo genético, também foi a que ingeriu maiores quantidades de etanol. Em conclusão, os resultados deste trabalho: (a) sugeriram que o teste e o reteste do LCE podem compartilhar componentes psicológicos comuns, (b) reforçaram as linhagens LEW e SHR como um importante modelo genético para o estudo da ansiedade, (c) mostraram que, apesar de sua robustez, as diferenças genéticas entre ratos LEW e SHR podem ser influenciadas por alguns detalhes do ambiente de laboratório, (d) sugeriram uma correlação positiva entre índices experimentais de ansiedade e consumo de etanol e (e) reforçaram a hipótese de participação do NPY e dos receptores 5-HT_{1A} do hipocampo nas variações genéticas nestes comportamentos.

ABSTRACT

The influence of genetics on anxiety-related traits has been thoroughly demonstrated both in humans and animal models. The comparison of rodent strains in behavioural tests of anxiety/emotionality can show non-reproducible results across different laboratories and studies, even when genotypes are kept constant. Therefore, identifying the relevant environmental factors and the genotype/environment interactions seem to be an important step to increase the confiability of both genetic and neurobehavioural studies. In this study, we aimed to evaluate the influence of environmental and genetic factors on anxiety-related measures and the possible relationship between anxiety and alcoholism experimental models. Thus, we evaluated one genetic animal model (LEW and SHR rats) in: (a) three anxiety behavioural tests with some variations in the environment of the laboratory or in the test situation (b) one ethanol self-administration procedure and (c) one gene expression test (Real-time RT-PCR) on two different anxiety and alcoholism-related brain regions. Furthermore, a second genetic model (Floripa H and L rats) was evaluated in the same anxiety and alcoholism behavioural tests. The results have shown that LEW and SHR rats present differences related to anxiety in the black/white box (BWB) in the dark phase of the circadian cycle and in the elevated plus-maze (EPM) in the test as well as in the retest 24h later, with LEW animals seeming more "anxious" than SHR animals. This suggests that the emotional differences between these strains are robust and not phase-dependent in the BWB and that the test/retest in the EPM can share common psychological components. We also showed that the

cage position inside the housing room and the rat's behavioral state before the test influence the results of anxiety tests, with some of these influences being genotype-dependent. Moreover, we demonstrated that the strain considered to be "more anxious" (LEW) in our genetic model was the one that consumed greater amounts of ethanol when offered in free-choice at concentrations of 6% and 10%. Moreover, LEW rats showed lower levels of gene expression of NPY and higher levels of 5-HT_{1A} receptor in the hippocampus, in relation to SHR rats. Finally, the self-administration protocol, applied to the Floripa H and L rat strains, suggested again a positive correlation between anxiety and alcoholism-related behaviors. The Floripa L strain, that was more emotionally reactive in this genetic model, was also the one that ingested higher amounts of ethanol. In conclusion, the results of this work suggested that (a) the test and retest of the EPM can share common psychological components, (b) LEW and SHR rats are an important genetic model for the study of the anxiety, (c) the genetic differences between them can be influenced by some variations in the laboratory environment, (d) there is a positive correlation between experimental indices of anxiety and ethanol consumption and (e) the participation of NPY and 5-HT_{1A} receptors in the hippocampus are important for the genetic variations observed in these behaviors.

LISTA DE ABREVIações

ACTH = Hormônio adrenocorticotrófico.

AMPA = ácido amino-3-hidroxi-5-metil 1-4 propiônico isoxazolinico.

ANOVA = análise de variância.

CA = campo aberto.

CBP = caixa branca/preta.

CRF = hormônio de liberação de corticotrofinas.

DNA = ácido desoxirribonucléico.

GABA = ácido γ -aminobutírico.

HPA = hipotálamo-pituitária-adrenal.

ICV = Intracerebroventricular.

LCE = labirinto em cruz elevado.

LEW = Lewis.

NAR = Núcleo arcuado.

NMDA = N-metil-D-aspartato.

NPV = Núcleo paraventricular.

NPY = Neuropeptídeo Y

NR2b = Subunidade 2b do receptor NMDA.

RNA = ácido ribonucléico.

RT-PCR = Reverse transcription-polymerase chain reaction.

SHR = Spontaneously Hypertensive Rats.

SNC = Sistema nervoso central.

SNP = Single nucleotide polymorphism.

TNF = Teste do nado forçado.

QTL = Quantitative trait loci.

WKY = Wistar-Kyoto.

5-HT = 5-hidroxitriptamina.

5-HTT = transportador de 5-hidroxitriptamina.

8-OH-DPAT = 8-hidroxi-2-(di-n-propilamino) tetralina.

ARTIGOS E RESUMOS ORIGINADOS POR ESTE TRABALHO

Artigos em revistas especializadas:

Izídio, G. S.; Spricigo Jr., L.; Ramos, A. (2005) Genetic differences in the elevated plus-maze persist after first exposure of inbred rats to the test apparatus. *Behav Processes*, 68: 129-134.

Izídio, G. S.; Lopes, D. M.; Spricigo Jr., L.; Ramos, A. (2005) Common variations in the pre-test environment influence genotypic comparisons in models of anxiety. *Genes, Brain Behav* (In print).

Resumos internacionais:

Ramos, A.; Izídio, G. S.; Bibancos, T.; Jardim, D. L.; Aneas, I.; Chiavegatto, S. (2004) Emotionality, Alcohol Intake and Gene Expression in the Lewis and SHR inbred rat strains. Society for Neuroscience meeting 2004, San Diego - USA.

Ramos, A.; Izídio, G. S.; Chiavegatto, S. (2004) Anxiety-related behaviors and 5-HT_{1A} receptor gene expression in Lewis and SHR inbred rats. The Biological Basis of Personality and Individual Differences, Long Island - USA.

Izídio, G. S.; Lopes, D. M.; Spricigo Jr., L.; Ramos, A. (2004) Variations in the environment of the laboratory can modify genotypic differences in behavioral models of anxiety. 4° Taller de Neurociencias, Vaquerías, Cordoba, Argentina.

Resumos nacionais:

Izídio, G. S.; Bruske, G. R.; Spricigo Jr, L.; Ramos, A. Comparação comportamental em testes de ansiedade de duas linhagens isogênicas de ratos em duas fases do ritmo circadiano de sono/vigília. FESBE, 2002, Salvador.

Izídio, G. S.; Bruske, G. R.; Spricigo Jr, L.; Ramos, A. Ratos Lewis e SHR, um modelo genético para o estudo da ansiedade, caracterizados no teste/reteste do labirinto em cruz elevado. FESBE, 2003, Curitiba, 2003.

Izídio, G. S.; Ramos, A.; Bibancos, T.; Jardim, D. L.; Aneas, I.; Chiavegatto, S. Expressão Gênica, Emocionalidade e Consumo de Álcool nas Linhagens de Ratos Isogênicas Lewis e SHR. 50° Congresso Brasileiro de Genética, 2004, Florianópolis.

Izídio, G. S.; Lopes, D. M.; Spricigo Jr, L.; Ramos, A. Variações no ambiente de laboratório podem mascarar diferenças genotípicas no modelo genético de ansiedade em ratos. 50° Congresso Brasileiro de Genética, 2004, Florianópolis.

Izídio, G. S.; Spricigo Jr, L.; Ramos, A. Índices experimentais de ansiedade e alcoolismo aparecem associados nas linhagens de ratos Lewis e SHR. XIX FESBE, 2004, Águas de Lindóia.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Ansiedade	2
1.1.1 Definição	2
1.1.2 Sintomas e tratamento da ansiedade	3
1.2 Roedores na pesquisa biomédica	4
1.3 Testes Comportamentais.....	6
1.3.1 Campo Aberto	8
1.3.2 Labirinto em Cruz Elevado	9
1.3.3 Caixa Branca/Preta	12
1.4 Modelos Genéticos Animais.....	14
1.4.1 Linhagens Lewis e SHR	16
1.4.2 Linhagens Floripa H e L	18
1.5 Ambiente	19
1.5.1 Ciclo Sono-Vigília	21
1.5.2 Teste/Reteste no LCE.....	22
1.5.3 Experimentador	22
1.5.4 Posição das gaiolas	23
1.5.5 Estado comportamental dos animais antes do teste	23
1.6 Alcoolismo	24
1.6.1 Etanol e os transtornos de ansiedade	25
1.7 Busca de Genes Candidatos	26
1.7.1 Neurotransmissores envolvidos na ansiedade e no alcoolismo	29
1.7.1.1 Neuropeptídeo Y	29
1.7.1.2 Glutamato	30
1.7.1.3 Serotonina	31
2. OBJETIVOS	33
2.1.Gerais	34
2.2.Específicos	34

2.2.1 Bloco Experimental 1	34
2.2.2 Bloco Experimental 2	34
2.2.3 Bloco Experimental 3	35
2.2.4 Bloco Experimental 4	35
3. MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1 Animais	37
3.2 Desenho Experimental	38
3.3 Testes Comportamentais	39
3.3.1 Campo Aberto	39
3.3.2 Labirinto em Cruz Elevado	41
3.3.3 Caixa Branca/Preta	42
3.3.4 Consumo espontâneo de etanol	43
3.4 Fatores Ambientais	45
3.4.1 Ritmo circadiano	45
3.4.2 Reteste no LCE	45
3.4.3 Experimentador	45
3.4.4 Posição da gaiola dentro do biotério	46
3.4.5 Estado comportamental antes do teste	47
3.5 Expressão Gênica	48
3.5.1 Extração de RNAm	48
3.5.2 Preparação dos <i>primers</i>	49
3.5.3 Síntese de cDNA	50
3.5.4 Análise da expressão gênica	50
3.6 Estatística	52
3.6.1 Bloco Experimental 1.....	52
3.6.2 Bloco Experimental 2	52
3.6.3 Bloco Experimental 3	53
3.6.4 Bloco Experimental 4	53
4. RESULTADOS	55

4.1 Bloco Experimental 1	57
4.1.1 Ritmos Circadianos (CBP)	57
4.1.2 Teste/Reteste (LCE)	60
4.2 Bloco Experimental 2	64
4.2.1 Efeito do experimentador	64
4.2.2 Posição das gaiolas dentro do biotério	64
4.2.3 Estado comportamental antes do teste	68
4.3 Bloco Experimental 3	71
4.3.1 Consumo espontâneo com LEW e SHR	71
4.3.2 Consumo espontâneo com Floripa H e L	75
4.4 Bloco Experimental 4	82
5. DISCUSSÃO.....	86
5.1 Variações ambientais	87
5.2 A relação entre “ansiedade” e “alcoolismo”	100
5.3 Expressão gênica	104
6. CONCLUSÕES.....	113
7. REFERÊNCIAS.....	116
ANEXOS	140

1-INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Ansiedade

1.1.1 Definição

A ansiedade é um dos clássicos tipos de emoções que, provavelmente, já foi experimentada por todos nós algumas vezes durante a vida. Por definição, ela significa o estado afetivo em que há sentimento de insegurança. Podemos caracterizá-la como um conjunto de respostas fisiológicas (aumento da atividade do sistema nervoso autônomo, taquicardia, sudorese) e comportamentais (aumento na vigília e na reatividade comportamental; esquiva) aumentadas que juntas protegem um indivíduo de um possível dano diante de uma situação potencialmente perigosa (File *et al.*, 1993; Lang *et al.*, 2000; Adamec *et al.*, 2001; Belzung e Griebal, 2001; Blanchard *et al.*, 2001a, 2001b; Dielenberg e McGregor, 2001; File, 2001).

Alguns pesquisadores sugerem que em sua forma não-patológica a ansiedade pode ser dividida em duas categorias: “ansiedade estado” e “ansiedade traço”. Estas refletiriam, respectivamente, as respostas de ansiedade aumentadas de um indivíduo em um momento particular, na presença de uma situação provocadora e a ansiedade constante através do tempo, como uma característica permanente do indivíduo (Lister, 1990). Já em sua forma patológica, segundo o DSM-IV (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 1994), a ansiedade é classificada em seis transtornos principais: transtorno de ansiedade generalizada, fobia social, fobia específica, transtorno de pânico, transtorno de stress pós-traumático e transtorno obsessivo-compulsivo.

Apesar de a ansiedade ser um fenômeno humano subjetivo, respostas fisiológicas e comportamentais semelhantes têm sido descritas em diversas espécies animais e parecem ser parte de um mecanismo universal através do qual os organismos se adaptam a condições adversas (Gross e Hen, 2004).

1.1.2 Sintomas e tratamento da ansiedade

Os transtornos de ansiedade podem interferir severamente na vida normal do indivíduo apresentando desde sintomas básicos como: inquietação, taquicardia, sudorese, distúrbios gastrintestinais e do sono, até os sintomas específicos de cada um dos seis transtornos que a compreendem. Existe uma estimativa de que 20% das pessoas são afetadas por algum destes transtornos em alguma fase da sua vida e que são gastos mais de 42 bilhões de dólares por ano, somente nos Estados Unidos, com tratamento e prejuízos causados pelos transtornos de ansiedade (Greenberg, 1999).

A ansiedade vem sendo tratada principalmente com drogas que deprimem o sistema nervoso central (álcool, barbitúricos, opióides, beta-bloqueadores e benzodiazepinas). Dentre estas, as benzodiazepinas são as mais específicas e efetivas e, portanto, são ainda as drogas mais utilizadas, atualmente, no tratamento destes transtornos (Shader e Greenblatt, 1993; Groenink *et al.*, 2003). Sabe-se que estas drogas atuam de maneira seletiva sobre os receptores GABA_A (ácido γ -aminobutírico), potencializando a abertura de canais de cloreto mediada pelo neurotransmissor GABA. Os efeitos mais importantes dos benzodiazepínicos

consistem em: redução da ansiedade e da agressão, sedação e indução do sono e redução do tônus muscular e da coordenação (Rang *et al.*, 2001).

Para que possamos desenvolver novos fármacos tão ou mais eficientes que os benzodiazepínicos para o tratamento da ansiedade, ou mesmo para que possamos aprender mais sobre a etiologia deste transtorno, é de essencial importância que disponhamos de testes comportamentais com animais não-humanos. Desta maneira, considerável esforço vem sendo feito ao longo dos últimos anos no intuito de desenvolver, validar e aperfeiçoar os testes comportamentais e os modelos animais de psicopatologias humanas.

1.2 Roedores na Pesquisa Biomédica

Como já foi comentado brevemente, os animais não humanos são de grande importância para a pesquisa biomédica. Dentre estes, os roedores assumem um papel de grande destaque, pois muitas das manipulações necessárias para a elucidação de mecanismos genéticos, bioquímicos ou fisiológicos envolvidos em patologias são realizadas neles. Isto se deve ao fato de que os roedores são também mamíferos e ainda apresentam diversas similaridades com os humanos como: plano de corpo, sistemas orgânicos e mecanismos de regulação psicológica (Tecott, 2003). Além disso, análises genômicas comparativas indicam que o ancestral comum de humanos e ratos/camundongos viveu a aproximadamente 75 milhões de anos atrás (Madsen *et al.*, 2001; Murphy *et al.*, 2001) e que a separação entre ratos e camundongos ocorreu há aproximadamente 25 milhões de anos (Rew, 2004), um evento recente quando falamos em termos evolutivos. Ainda podemos citar outras vantagens do

uso de roedores na pesquisa como: a disponibilidade de várias gerações em um mesmo ano, o controle de variáveis ambientais envolvidas, o grande número de indivíduos que podem ser mantidos em um laboratório e a possibilidade de manipulações genéticas controladas. Como exemplo desta última nós podemos citar as recentes metodologias de animais *knock-out*, *knock-in* e *transgênicos* que são realizadas em roedores. Estas técnicas auxiliam na investigação de genes importantes para funções cerebrais e transtornos mentais, dentre os milhares que foram identificados com o seqüenciamento do genoma humano (*The International Human Genome Mapping Consortium*, 2001; Venter *et al.*, 2001).

Dentre os roedores, o camundongo é o modelo preferido pelos geneticistas, por razões práticas (custo mais baixo, facilidades de armazenamento e de manipulação) e históricas (maior conhecimento acumulado, sendo o primeiro roedor com o genoma seqüenciado (Gregory *et al.*, 2002)). Porém, o rato tem ganhado maior atenção nos últimos anos entre os geneticistas, pois teve recentemente o seu genoma completamente seqüenciado (*Rat Genome Sequencing Project Consortium*, 2004). Além disso, há um acúmulo de conhecimento considerável em diversas áreas, inclusive com a possibilidade, através de bancos de dados gênicos, de se comparar regiões cromossômicas suas com humanos e camundongos.

Com 2,75 bilhões de pares de bases e 21 cromossomos, o rato apresenta um genoma um pouco menor do que o dos humanos (2,9 bilhões de pares de bases e 23 cromossomos) e um pouco maior do que o de camundongos (2,6 bilhões de pares de bases e 20 cromossomos). Entretanto, todas as três espécies apresentam cerca de 30 mil genes, sendo que 40% deles são muito próximos em

estrutura e função (Rew, 2004). Além disso, existem cerca de 1000 doenças hereditárias humanas documentadas atualmente, onde a participação genética não é bem entendida, sendo que 75% delas têm genes análogos em ratos (Rew, 2004).

No campo de pesquisa da ansiedade, existem diversos modelos de ratos e camundongos validados (Broadhurst, 1975; Plomin *et al.*, 1990; Fujita *et al.*, 1994; Ramos *et al.*, 1997; Driscoll *et al.*, 1998; Liebsch *et al.*, 1998; Brush *et al.*, 1999; Landgraf e Wigger, 2003; Ramos *et al.*, 2003). Estes animais são testados em diversos aparatos que induzem comportamentos de algum modo relacionados aos transtornos humanos. Devido ao exposto acima, fica claro, então, a grande importância de estudarmos os modelos genéticos animais para diferentes patologias ou transtornos como, por exemplo, a ansiedade.

1.3 Testes Comportamentais

Existem vários testes comportamentais descritos na literatura que tentam medir comportamentos relacionados à ansiedade em animais de laboratório (Hall, 1934; File e Hyde, 1978; Crawley, 1981; Pellow *et al.*, 1985; Blanchard *et al.*, 1990; Merali *et al.*, 2003). Eles apresentam uma grande importância na triagem ou no desenvolvimento de novas drogas ativas para o combate da ansiedade em humanos (Dawson e Tricklebank, 1995). Porém, quando diversos testes comportamentais são utilizados simultaneamente em uma mesma população de roedores, raramente são encontradas correlações estatísticas entre diferentes variáveis que deveriam medir a mesma característica emocional (Ramos *et al.*, 1997). Isto pode sugerir que (a) tais medidas não estão avaliando uma mesma

característica emocional (File, 1995), e que (b) diferentes testes comportamentais podem estar avaliando diferentes subtipos de “ansiedade”, até mesmo com o envolvimento de substratos biológicos distintos (Ramos e Mormède, 1998). Fica claro, então, que para a obtenção de um perfil emocional o mais completo possível dos animais a serem estudados, seria recomendável se utilizar diferentes testes e várias medidas comportamentais em uma mesma população (Ramos *et al.*, 1997), pois um animal poderia ser classificado como mais ansioso em relação a uma determinada medida e como menos ansioso em relação à outra. Porém, o uso de múltiplas medidas, apesar das vantagens citadas, gera uma situação complexa que dificulta a análise estatística, sendo muitas vezes necessário o uso de análises multivariadas (fatoriais) para melhor se compreender o conjunto total de resultados (Ramos e Mormède, 1998).

Normalmente, os diferentes testes comportamentais expõem o animal, por uma quantidade de tempo variável, a um ou vários estímulos aversivos enquanto o observador faz a análise simultaneamente. Estes estímulos podem ser classificados como físicos (temperaturas extremas, choques elétricos, privação de comida) ou psicológicos (ambientes inéditos, áreas fortemente iluminadas, espaços abertos, lugares altos; File, 1995; Ramos e Mormède, 1998).

Para que um teste possa ser considerado um modelo comportamental de ansiedade, ele deve permitir a mensuração de respostas quantitativas/qualitativas que devem responder à aplicação de drogas ansiolíticas/ansiógênicas no mesmo sentido que estas drogas atuam em humanos. Ou seja, drogas ansiolíticas (que reduzem a ansiedade em humanos) devem aumentar a exploração do ambiente aversivo do teste comportamental por parte dos animais e drogas ansiógênicas

(que aumentam a ansiedade em humanos) devem diminuir a exploração do mesmo ambiente aversivo. Além disso, o modelo não deve responder a outras classes de drogas (antidepressivos, antipsicóticos, etc.; File, 1987). Basicamente, são reconhecidos dois tipos de testes de ansiedade: (a) os baseados em respostas não condicionadas (exploratórios, de consumo e de comportamentos sociais) e (b) os baseados nos paradigmas de aprendizagem animal ou no condicionamento (esquiva ativa condicionada, desamparo aprendido) (Treit, 1985; Dawson e Tricklebank, 1995; Rodgers e Cole, 1995; Rodgers e Dalvi, 1997; Rodgers *et al.*, 1997).

No presente trabalho, nós enfocaremos três testes comportamentais de ansiedade que são comumente utilizados na pesquisa mundial, sendo que todos eles são baseados em respostas não condicionadas de medo/ansiedade.

1.3.1 Campo Aberto

O teste do campo aberto (CA) é provavelmente o mais popular teste de emocionalidade no mundo. Ele foi desenvolvido em 1934 por Calvin Hall (Hall, 1934) e desde então diversos trabalhos têm utilizado este aparato para avaliar os efeitos de manipulações ambientais, de drogas e de fatores genéticos sobre a emocionalidade de roedores. O aparato consiste de uma arena cercada por paredes onde o animal é colocado e pode explorar o aparato livremente por uma certa quantidade de tempo. Na literatura disponível sobre este aparato, encontramos freqüentemente diferenças na forma, cor, iluminação e métodos de avaliação (Walsh e Cummins, 1976; Sternberg *et al.*, 1992; Trullas e Skolnick, 1993; Castanon e Mormède, 1994; Ossenkopp *et al.*, 1994). Algumas destas

modificações na situação de teste podem prejudicar a reprodutibilidade dos resultados obtidos e até mesmo mascarar efeitos genéticos (Crabbe *et al.*, 1999; Chesler *et al.*, 2002; Wahlsten *et al.*, 2003). Pode ser medido um grande número de variáveis comportamentais no teste do CA como: locomoção, defecação, congelamento, alisamento, exploração de pé, vocalização, etc.: (Archer, 1973; Walsh e Cummins, 1976). Dentre estas medidas, as duas mais comumente aceitas como medidas de emocionalidade animal são: a locomoção e a defecação em resposta a um ambiente inédito (Gray, 1979; Lister, 1990; Ossenkopp *et al.*, 1994). Existem, ainda, outras medidas no teste do CA, que nem sempre são consideradas em estudos de emocionalidade (tempo e locomoção na área central e periférica), as quais são obtidas a partir da distinção deste aparato em área central e área periférica (Ramos e Mormède, 1998). A área central, como o próprio nome diz é a área que se localiza no centro do aparato desprovida de paredes, sendo a área periférica aquela adjacente às paredes do aparato e que permite a realização de tigmotaxia por parte do animal. Considera-se, classicamente, que a área central deste aparato seja a mais aversiva, pois drogas ansiolíticas tendem a aumentar a locomoção e o tempo de permanência nesta área, enquanto drogas ansiogênicas apresentam o resultado contrário (Gentsch *et al.*, 1987). Provavelmente, isto se deva ao fato de que os roedores evitam os espaços abertos onde não possam realizar tigmotaxia (movimento que o rato faz com as vibrissas no intuito de receber informações sensoriais do meio) (Treit *et al.*, 1993).

1.3.2 Labirinto em Cruz Elevado

O labirinto em cruz elevado (LCE), que consiste de um labirinto em forma

de cruz com quatro braços, sendo dois abertos e dois fechados (com paredes), é um dos modelos animais de ansiedade mais utilizados e foi desenvolvido baseado na observação de que os ratos evitam lugares abertos e elevados e que este comportamento de esquiva é gerado pelo medo (Montgomery, 1955). Simplificadamente, durante o teste o rato é colocado em uma plataforma central (região de intersecção entre os quatro braços), podendo ali permanecer ou dirigir-se a um dos braços (aberto ou fechado). Em um extenso estudo, Pellow *et al.* (1985) validaram este teste através do uso de abordagens farmacológicas, comportamentais e fisiológicas. Quando expostos ao LCE pela primeira vez, um rato ou camundongo *naïve* apresentará sinais de conflito, esquiva e fuga, sendo que o animal considerado como mais “ansioso” irá menos vezes e permanecerá por menos tempo nos braços abertos e desprotegidos do aparato. Esta esquiva aos braços abertos (região aversiva do aparato) é diminuída através de drogas ansiolíticas clássicas (clordiazepóxido, diazepam, midazolam, etanol) e aumentada por substâncias ansiogênicas (escopolamina, flumazenil, fluprazina, eltoprazina, naltrexona) (Pellow *et al.*, 1985; Lee e Rodgers, 1987; Lee e Rodgers, 1990; Rodgers *et al.*, 1992; Handley e McBlane, 1993; Rodgers e Cole, 1994; Rodgers e Cole, 1995).

Neste aparato, como em outros, pode-se realizar uma segunda exposição dos ratos algumas horas ou dias depois da primeira exposição. Nestes casos, que chamamos de reteste, observa-se normalmente um grande aumento na esquiva dos braços abertos. Segundo a literatura, não se sabe ao certo qual é o estímulo responsável pela redução de entradas e do tempo de permanência nos braços abertos na segunda exposição, porém sabe-se que as situações aversivas para o

rato no LCE podem ser diminuídas com um mínimo de mudanças no aparato. Por exemplo, Fernandes e File (1996) relataram que a introdução de bordas nos braços abertos do LCE alteram os resultados de manipulações farmacológicas.

No LCE, a resposta a drogas ansiolíticas tem mostrado diminuir ou mesmo desaparecer quando os animais são previamente expostos ao mesmo aparato de teste, um fenômeno conhecido como tolerância a uma exposição (*one-trial tolerance*) (File, 1990). Sugere-se que isso possa ser devido à liberação de agonistas inversos endógenos, que ocorreria durante a primeira exposição, alterando os receptores benzodiazepínicos em algumas regiões do cérebro e, mais tarde, induzindo-os a dessensibilização (Holmes e Rodgers, 1998). Este fenômeno não tem sido descrito apenas para as benzodiazepinas (Rodgers *et al.*, 1992; Treit *et al.*, 1993; File e Zangrossi, 1993; File *et al.*, 1998; 1999), mas também para outros ligantes do complexo receptor GABA_A como o etanol, fenobarbital e para os ligantes do receptor glicina-B/NMDA (N-metil-D-aspartato) (Bertoglio e Carobrez, 2002a; 2002b; 2003). Contudo, a significância psicológica exata desta mudança de comportamento dos animais entre teste e reteste ainda permanece obscura (Rodgers *et al.*, 1992; File *et al.*, 1993; Holmes e Rodgers, 1998). Os resultados obtidos no estudo de Bertoglio e Carobrez (2000) sugerem que é necessário que os ratos conheçam tanto os braços abertos quanto os braços fechados do aparato, para que eles adquiram medo dos braços abertos. Estas evidências dão suporte à idéia de alguns autores de que uma primeira exposição ao aparato sem tratamento de drogas provoca uma mudança qualitativa na reação ansiedade/medo, de uma forma de resposta não condicionada para uma forma de resposta de “fobia adquirida” (File e Zangrossi, 1993; Hogg e File,

1994). Outros autores, contudo, mesmo reconhecendo que existe uma mudança qualitativa no tipo de emocionalidade avaliado na segunda exposição ao LCE, consideram que a significância psicológica desta mudança não é clara (Holmes e Rodgers, 1998). Apesar de que diferentes abordagens farmacológicas têm sido usadas na tentativa de esclarecer este ponto, ao nosso conhecimento, ele nunca foi analisado antes a partir de uma perspectiva de comparação de linhagens isogênicas contrastantes. Então, se linhagens de roedores com perfis emocionais contrastantes forem diferentes entre si na primeira, mas não na segunda exposição ao LCE, ou vice-versa, isto proveria suporte adicional para a hipótese de que estas duas condições de teste avaliam diferentes formas de reação emocional.

1.3.3 Caixa Branca/Preta (CBP)

Outro teste comportamental utilizado no presente estudo foi a caixa branca/preta (CBP) (uma pequena caixa com dois compartimentos conectados: um branco e fortemente iluminado e outro preto somente com iluminação vermelha), onde o rato é colocado, no centro do compartimento branco, podendo então atravessar em direção ao compartimento preto ou permanecer no branco. Considera-se classicamente que o nível de exploração do compartimento branco e o número de transições entre os compartimentos dependem do nível de “ansiedade” do animal (Crawley, 1981). Segundo Crawley (1981), este teste possui algumas vantagens, como a rapidez e a simplicidade do método, a reprodutibilidade dos resultados e o pequeno tamanho do aparato. Ainda, a alta eficiência e a especificidade psicofarmacológica para medir os efeitos

comportamentais de agentes ansiolíticos (benzodiazepinas, álcool e nicotina) e ansiogênicos (FG7142), fazem deste teste um bom modelo para o estudo da ansiedade (Crawley, 1981; Costall *et al.*, 1989). Assim como no teste do CA, também na CBP algumas modificações na situação de teste já foram introduzidas em diferentes estudos (Costall *et al.*, 1989; Belzung e Le Pape, 1994; Belzung *et al.*, 1994), o que pode, como dito anteriormente, complicar a interpretação dos resultados.

Sabe-se, por outro lado, que os roedores apresentam um ritmo circadiano de sono/vigília, com a atividade prevalecendo durante a noite e o descanso durante o dia (Cipolla-Neto *et al.*, 1988; Gorka *et al.*, 1996). Entretanto, a maioria dos experimentos realizados neste aparato têm sido realizados durante o período diurno (Crawley, 1981; Smythe *et al.*, 1996; Chaouloff *et al.*, 1997; Ramos *et al.*, 1997, 1998, 2003), ignorando alguns estudos que sugerem uma possível correlação entre a ansiedade e os ritmos circadianos (Arushanian e Beer, 1999; Morin, 1999). Além disso, ainda existe o fato deste teste comportamental ter como principal componente aversivo a forte iluminação (Crawley, 1981), sugerindo até mesmo a participação do sistema visual, que faz com que ratos albinos e pigmentados apresentem diferenças quando testados (Ramos e Mormède, 1998). Então, poderíamos sugerir que, além das possíveis diferenças relacionadas aos ritmos circadianos *per se*, o desempenho dos animais poderia ser também afetado pelo fato de, anteriormente ao momento do teste, eles estarem sob condições de luz ou de escuridão (dia ou noite).

A seguir, comentaremos um pouco sobre uma das abordagens possíveis de serem utilizadas no estudo da ansiedade com roedores (os modelos genéticos compostos de duas linhagens) e que foi aplicada no presente estudo.

1.4 Modelos Genéticos Animais

A influência de fatores genéticos já foi amplamente demonstrada para comportamentos ligados à ansiedade, tanto em humanos como em roedores (Brodkin e Nestler, 1998; Ramos e Mormède, 1998; Ramos *et al.*, 1999; Henninger *et al.*, 2000; Toye e Cox, 2001; Turri *et al.*, 2001; Wood e Toth, 2001; Clément *et al.*, 2002). Sabe-se que diferentes linhagens de ratos ou camundongos podem responder de maneira diferente aos mesmos estímulos ambientais e que, então, a comparação simultânea destas linhagens pode revelar correlações genéticas entre diversas reações bioquímicas ou comportamentais (Ramos e Mormède, 1998). Portanto, o estudo comparativo de modelos genéticos pode representar uma ferramenta útil para o estudo dos mecanismos envolvidos nos transtornos relacionados à ansiedade (Trullas e Skolnick, 1993; Rex *et al.*, 1996). Estes modelos genéticos, normalmente compostos de duas linhagens contrastantes, podem ser originados a partir de: (a) características que se diferenciaram aleatoriamente por cruzamentos independentes realizados em diferentes populações ou linhagens ou (b) a partir de uma seleção genética bidirecional planejada sobre uma característica específica.

A primeira alternativa certamente é mais rápida e menos trabalhosa, pois trabalha com linhagens já estabelecidas, porém, pode ser menos informativa do que a segunda (Ramos e Mormède, 1998). Por exemplo, se trabalharmos com

populações isogênicas (consangüíneas), onde os animais são geneticamente idênticos, temos um maior controle das influências ambientais sobre o fenótipo. Porém, devemos estar atentos ao fato de que nem sempre os genes importantes para a característica em estudo são polimórficos entre as linhagens que compõem o modelo (Ramos e Mormède, 1998). Diversos estudos recentes têm demonstrado que linhagens isogênicas de roedores que não tinham sido intencionalmente selecionadas para características emocionais, podem constituir ferramentas interessantes no estudo destas características (Crawley e Davis, 1982; Trullas e Skolnick, 1993; Glowa e Hansen, 1994; Mathis *et al.*, 1994; Armário *et al.*, 1995; Guillot e Chapoutier, 1996; Lahmame e Armário, 1996; Rex *et al.*, 1996).

Já na segunda alternativa, a seleção bidirecional (seleção genética dos dois extremos de uma característica) numa dada população, tem a vantagem de maximizar as diferenças genéticas entre os grupos. Após muitas gerações de seleção, é esperado que uma das linhagens resultantes apresente quase todos os genes que afetam positivamente a característica de seleção, enquanto a outra linhagem teria a maioria dos genes que afetam negativamente a mesma característica (Ramos e Mormède, 1998). Então, as diferenças fenotípicas tenderiam ao máximo contraste (Okamoto e Aoki, 1963; Fujita *et al.*, 1994). São conhecidos na literatura vários exemplos desta abordagem como: as linhagens de camundongo DeFries H e L, os ratos Maudsley reactive e non-reactive, os ratos Roman *high* - e *low-avoidance*, os ratos Syracuse *high* - e *low-avoidance*, os ratos Tsukuba *high* - e *low-emotional*, os ratos HAB e LAB e os ratos Floripa H e L (Broadhurst, 1975; Plomin *et al.*, 1990; Fujita *et al.*, 1994; Driscoll *et al.*, 1998; Liebsch *et al.*, 1998; Brush *et al.*, 1999; Ramos *et al.*, 2003).

Nós realizamos o presente estudo utilizando as duas abordagens mencionadas, através do modelo genético constituído por linhagens isogênicas já estabelecidas Lewis (LEW) e SHR (*Spontaneously Hypertensive Rats*), que juntas mostraram-se úteis para o estudo experimental da ansiedade (Ramos *et al.*, 1997; 1998; 2002), e do modelo genético desenvolvido a partir de uma seleção genética bidirecional, que originou as linhagens Floripa H (alta locomoção central no teste do CA) e L (baixa locomoção central no teste do CA) (Ramos *et al.*, 2003).

1.4.1 Linhagens Lewis e SHR

A partir de um estudo com seis linhagens isogênicas de ratos, assim chamadas porque apresentam uma alta homologia de DNA entre seus indivíduos, Ramos *et al.* (1997) propuseram um novo modelo genético animal para o estudo da ansiedade. Ele era composto de duas linhagens de ratos, chamadas LEW e SHR, que diferiam em comportamentos relacionados a este transtorno em humanos.

A linhagem LEW foi originada através de cruzamentos consangüíneos de ratos da linhagem Wistar, realizados pelo Dr. Lewis, sendo freqüentemente usada como modelo de doenças autoimunes (Stohr *et al.*, 1999). Os ratos LEW apresentam uma baixa atividade do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) em resposta ao estresse (Calogero *et al.*, 1992; Sternberg *et al.*, 1992). Eles são considerados importantes no estudo do abuso de diferentes drogas tais como cocaína (Kosten *et al.*, 1994), morfina (Suzuki *et al.*, 1988a) e etanol (Suzuki *et al.*, 1988b). Sabe-se que a linhagem LEW, quando comparada com a linhagem SHR, vai pouco ao centro no teste do CA, mostra uma rápida saída do compartimento

branco no teste da CBP e passa menos tempo nos braços abertos e mais tempo nos braços fechados do LCE (Ramos *et al.*, 1997; 1998; 2002). Isto, aliado ao fato de que estas duas linhagens não diferem em medidas consideradas como índices de locomoção nos mais variados testes comportamentais, nos permite sugerir que, comparativamente, a linhagem LEW tem um perfil de maior “ansiedade experimental”, em relação à outra linhagem deste modelo genético.

A linhagem SHR é composta de ratos que desenvolvem, a partir de uma certa idade, hipertensão arterial, tendo sido também obtida através de cruzamentos consangüíneos a partir da linhagem Wistar (Okamoto e Aoki, 1963). Entretanto, uma população F₂ originária de um cruzamento entre as linhagens LEW e SHR, demonstrou que a pressão arterial não está associada aos comportamentos relacionados à ansiedade nestas linhagens (Ramos *et al.*, 1998). Sabe-se que os ratos SHR são mais sensíveis aos efeitos hipnóticos do etanol e também consomem maior quantidade deste líquido, quando comparados aos seus controles normotensos Wistar-Kyoto (WKY) (Khanna *et al.*, 1990). Contrariamente aos ratos LEW, que apresentam um hiporesponsividade no eixo HPA, os ratos SHR exibem um aumento maior e mais prolongado nos níveis de adrenalina e noradrenalina e também uma maior aumento na frequência cardíaca e pressão sanguínea em resposta a situações estressantes quando comparados a outras linhagens de ratos (Kirby *et al.*, 1989; Hendley e Ohlsson, 1991). A linhagem SHR também já foi sugerida como sendo um bom modelo para o estudo de comportamentos relacionados ao déficit de atenção e de hiperatividade (Mormède *et al.*, 2002). Entretanto, os SHR não diferem na locomoção total do teste do campo aberto, quando comparados com ratos F344 e Wistar (Paré, 1989).

Quando comparados aos ratos LEW, os SHR aproximam-se mais dos compartimentos aversivos de diferentes testes comportamentais, independentemente do sexo (Ramos *et al.*, 1997; 1998; 2002).

Apesar da caracterização comportamental, farmacológica e bioquímica que vimos realizando ao longo dos últimos anos, ainda existem dúvidas sobre o significado psicológico real das diferenças comportamentais entre as linhagens LEW e SHR. Por esta razão, é necessária uma melhor caracterização destas linhagens nos mais variados aspectos, a fim de se elucidar vias bioquímicas, mecanismos biológicos ou genes que estejam contribuindo para a expressão deste comportamento diferenciado entre elas. Com o melhor entendimento destes comportamentos, nós poderemos entender melhor os transtornos de ansiedade em humanos e até mesmo desenvolver medicamentos mais específicos e efetivos para cada um deles.

1.4.2 Linhagens Floripa “H” e “L”

É provável que os diferentes modelos genéticos desenvolvidos em cada laboratório não representem exatamente o mesmo conjunto de componentes genéticos e neurobiológicos, devido às suas diferentes origens e critérios de seleção, entre outras coisas. Isso tornaria cada modelo genético único e, portanto, importante no estudo das características emocionais (Ramos *et al.*, 2003).

As linhagens Floripa H e L foram selecionadas inicialmente a partir de uma população inicial (S0) derivada do cruzamento de três linhagens de ratos. Desde então, a cada geração, elas são testadas e os melhores animais de cada linhagem são selecionados, tendo como base a medida de locomoção central no CA (são

selecionados os ratos Floripa H com maior locomoção central no CA e os ratos Floripa L com menor locomoção central no CA). Até a quarta geração de seleção, estas linhagens mostravam diferenças não somente no teste onde foram selecionadas (CA), mas também em outros testes de “ansiedade” como o LCE e a CBP (Ramos *et al.*, 2003). Além disso, os ratos da linhagem Floripa L, que são os considerados mais “ansiosos”, também apresentaram um perfil considerado como mais “depressivo” quando comparados com os ratos da linhagem Floripa “H” (dados não publicados). Este resultado valida estas linhagens como um importante modelo genético para o estudo de comportamentos relacionados à ansiedade e outros transtornos/patologias possivelmente associados a ela (depressão, alcoolismo).

1.5 Ambiente

Durante as décadas passadas, os testes comportamentais em massa de múltiplas linhagens de roedores tornaram-se um passo chave na pesquisa na área das neurociências, particularmente no campo da genética comportamental. Quando populações de animais desenvolvidas através de cruzamentos entre irmãos (linhagens isogênicas), seleção genética, transgenia ou manipulações de genes alvo (*knockout*, *knockin*) começaram a ser caracterizadas, tornou-se evidente que dados comportamentais de diferentes laboratórios freqüentemente não eram reproduzíveis. Tais discrepâncias poderiam resultar, não somente de diferenças no *background* genético dos animais, mas também de variações no ambiente de laboratório (Chesler *et al.*, 2002; Van der Staay e Steckler, 2002; Würbel, 2002; Wahlsten *et al.*, 2003). Em pacientes humanos, mostrou-se que

alguns genes podem aumentar a prevalência de transtornos afetivos somente quando combinados com contextos ambientais específicos (algum estresse prévio, por exemplo) (Caspi *et al.*, 2003). Nos animais, a importância do contexto também se tornou óbvia quando diferentes testes comportamentais, os quais pensava-se medir o mesmo tipo de estado emocional (ansiedade ou medo), começaram a ser comparados uns aos outros. Múltiplos testes de emocionalidade (cada um deles com seus particulares contextos aversivos), quando aplicados aos mesmos grupos de animais, linhagens ou tratamentos farmacológicos, freqüentemente produzem resultados conflitantes, indicando que cada teste individual pode de fato se relacionar a uma distinta dimensão de reatividade emocional (Archer, 1973; File, 1991; Ramos e Mormède, 1998). Em um importante trabalho, Crabbe *et al.* (1999) mostraram que grandes esforços para padronizar o ambiente de laboratório ou a situação de teste não garantem consistência dos resultados comportamentais entre diferentes laboratórios. Por exemplo, as linhagens de camundongos A/J e 129/SvEvTac, quando comparadas uma com a outra, demonstraram maior ou menor resposta locomotora para cocaína, dependendo do laboratório onde foram testadas, apesar dos fatores ambientais terem sido rigorosamente controlados. Por um lado, estes dados revelam que, mesmo sutis, variações ambientais não controladas entre e dentro de laboratórios podem influenciar estudos comportamentais, farmacológicos e genéticos. Por outro lado, os efeitos de tal *background* ambiental permanecem grandemente indefinidos. Devido ao fato de que resultados que são únicos para um laboratório em particular podem estar refletindo questões específicas daquele laboratório (Würbel, 2002), identificar os fatores ambientais que são potencialmente relevantes para a maioria dos estudos

nos mais diferentes locais, é de grande importância para aumentar a replicabilidade dos resultados (Olsson *et al.*, 2003) e para revelar interações cruciais entre os genes e o ambiente. Este ponto não é certamente restrito aos estudos genéticos e não é limitado somente aos camundongos, já que os testes comportamentais também são essenciais na farmacologia, por exemplo, e porquê numerosos estudos usando linhagens isogênicas e transgênicas são realizados com ratos.

Diversas variáveis biológicas e ambientais são conhecidas por influenciar os resultados dos testes comportamentais. Elas são, portanto, equalizadas ou ao menos descritas/listadas na maioria das publicações. Entre elas, nós poderíamos mencionar: idade (Imhof *et al.*, 1993), sexo (Imhof *et al.*, 1993; Johnston e File, 1991), horário do teste (Gentsch *et al.*, 1982), nível de iluminação (Cardenas *et al.*, 2001), superfície do aparato (Morato e Castrechini, 1989), transporte à sala de teste (Morato e Brandão, 1997), experiência prévia no aparato (File, 1992; Treit *et al.*, 1993; Bertoglio e Carobrez, 2000), manipulação (Henderson, 1970) e agrupamento nas gaiolas (Maisonnette *et al.*, 1993). Outros fatores, contudo, apesar de serem potencialmente relevantes, raramente ou nunca são investigados.

1.5.1 Ciclo Sono-Vigília

Como já foi comentado brevemente, os roedores apresentam um ciclo circadiano de sono/vigília, com a atividade prevalecendo durante a noite e o descanso durante o dia (Cipolla-Neto *et al.*, 1988; Gorka, *et al.*, 1996). Apesar disso, todos os estudos comparando as linhagens LEW e SHR em estudos de

emocionalidade (incluindo a CBP, que tem uma forte luz branca como seu principal componente aversivo) têm sido realizados durante o período diurno, mesmo quando alguns estudos sugerem uma possível correlação entre ansiedade e ritmos circadianos (Arushanian e Beer, 1999; Morin, 1999). Portanto, no presente estudo, nós testamos as linhagens LEW e SHR na CBP em duas diferentes fases do ciclo circadiano, dia e noite, para verificar se suas diferenças previamente relatadas não são horário-específicas.

1.5.2 Teste/Reteste no LCE

No teste do LCE, existe o fenômeno chamado de “*one trial tolerance*”, que é caracterizado pela falta de efeito ansiolítico das benzodiazepinas em animais submetidos ao LCE pela segunda vez (File, 1990). Apesar de que diferentes abordagens farmacológicas têm sido usadas na tentativa de inferir o tipo de medo/ansiedade envolvido na primeira e segunda exposição do LCE, ao nosso conhecimento, este assunto nunca foi avaliado antes através de uma perspectiva de comparação de linhagens. Se as linhagens de roedores com perfis emocionais contrastantes forem diferentes umas das outras na primeira exposição ao LCE mas não na segunda, isto proveria suporte adicional para a hipótese que estas duas situações de teste avaliam diferentes formas de reação emocional. Então, no presente estudo as linhagens LEW e SHR foram avaliadas pela primeira vez em duas exposições subseqüentes no LCE.

1.5.3 Experimentador

O terceiro fator avaliado foi a possível influência do experimentador que realiza os testes comportamentais nos resultados de um teste de “ansiedade”. Esta influência já foi confirmada em testes de nocicepção (Chesler *et al.*, 2002). No presente estudo, este fator variou entre um sujeito que era familiar aos animais e tinha grande experiência com todas as práticas de laboratório e outro que nunca tinha ao menos entrado no biotério onde os animais foram criados e permaneceram até o momento do teste.

1.5.4 Posição das gaiolas

Outra variável medida foi a posição das gaiolas dentro do biotério. Em muitos laboratórios, este fator pode variar entre as mais ALTAS e as mais BAIXAS dentre os cinco andares das estantes, o que poderia submeter os animais a diferentes condições ambientais como: nível de iluminação, temperatura, composição de gases no ar e estímulos visuais, provocando mudanças na reatividade emocional dos animais. Por isso, o controle desta variável ambiental foi alvo de debate em um estudo não comportamental (Herzberg e Lagakos, 1992; Exner e Clark, 1993). Entretanto, até o presente, nenhum estudo avaliou esta variável sob uma perspectiva de comparação de linhagens.

1.5.5 Estado comportamental dos animais antes do teste

Também o estado comportamental do animal imediatamente antes do teste foi monitorado e analisado. Testes comportamentais de ansiedade são tipicamente curtos em tempo, mas são realizados durante sessões que levam algumas horas e envolvem muitos animais diferentes. Mesmo se estes indivíduos supostamente

não diferem na característica psicológica em questão, pode-se esperar que o seu estado comportamental (dormindo, comendo, lutando, etc.) no momento precedente ao teste pode variar aleatoriamente. Além disso, como sugerido por Lister (1990), a maioria dos modelos de ansiedade fornecem medidas de “ansiedade estado”, a qual é uma emoção de experiências subjetivas em um momento particular na presença de uma situação provocadora de ansiedade. Se tal estado ansioso não é uma característica permanente do indivíduo, nós podemos hipotetizar que ele pode ser influenciado pelo estado comportamental do animal imediatamente antes do teste. Nós estudamos este fator utilizando as linhagens LEW/SHR que estavam em estado de repouso ou vigília nas suas gaiolas por ao menos cinco minutos contínuos antes do teste do LCE.

1.6 Alcoolismo

Na sociedade ocidental, encontramos alguns tipos de drogas comumente utilizadas pelos humanos sem nenhuma receita médica (cafeína, etanol, nicotina). Não é nosso objetivo aqui discutir porque estas drogas passaram a ser consumidas a ponto de constituírem um problema social, mas sim, especificamente, descrever de forma sucinta a patologia causada pela dependência de uma delas, o etanol.

O alcoolismo é um tipo de abuso de drogas (Brady e Sonne, 1999; Ehlert *et al.*, 2001) que envolve uma dependência física e psicológica (Esel, 2003) pela droga psicotrópica etanol. A alta prevalência do abuso de etanol na sociedade humana impõe uma perda financeira estimada em 185 bilhões de dólares anuais somente nos EUA (Li *et al.*, 2004), devido ao tratamento e a mortalidade dos

dependentes e à redução de produtividade das empresas e indústrias. O alcoolismo e suas conseqüências (patologias psíquicas e somáticas e dependência) têm uma etiologia complexa, onde a participação de fatores genéticos é bem estabelecida em humanos e em animais de laboratório (Cloninger 1987; Dumont-Damien e Duyme, 1993; Crabbe, 1999; Foroud e Li, 1999; Terenina-Rigaldie *et al*, 2003a; Terenina-Rigaldie *et al*, 2003b). São reconhecidos dois tipos principais de alcoolismo: o tipo 1, caracterizado por traços de personalidade ansiosos e o rápido desenvolvimento de tolerância e dependência às propriedades ansiolíticas do álcool e o tipo 2, caracterizado por traços de personalidade anti-social e ingestão de álcool motivada por seus efeitos eufóricos (Cloninger *et al.*, 1988).

1.6.1 Etanol e os transtornos de ansiedade

O etanol atua no SNC como um depressor, através da facilitação da abertura dos canais de cloreto acoplados aos receptores GABA. Ele resulta em um decréscimo de tensão e inibição também da ansiedade (Esel, 2003). O etanol ainda afeta outros sistemas corporais, podendo causar irritação do trato gastrointestinal, cardiomiopatia, disfunção sexual, neuropatia e demência (Brady e Sonne, 1999). Existe, em humanos, uma hipótese de redução de tensão que prediz que indivíduos normalmente ansiosos ou estressados (em um estado sem droga), são mais sensíveis aos efeitos ansiolíticos do etanol e, portanto, mostram uma maior predisposição para consumirem esta droga (para revisão ver Cappell e Herman, 1972). Tem sido proposto também, que alguns indivíduos alcoólatras são predispostos a este comportamento devido à ansiedade inata (Schuckit e

Hesselbrock, 1994; Cornelius *et al.*, 2003) e estudos clínicos e epidemiológicos indicam uma comorbidade entre ansiedade e alcoolismo (Regier *et al.*, 1990; Schuckit, 1994). Enquanto alguns estudos clínicos apontam para esta possível correlação, existe alguma evidência de que o abuso crônico de etanol precede os transtornos de ansiedade e não o contrário (Allan, 1995).

Diversos experimentos com roedores foram realizados no intuito de se entender melhor a possível comorbidade entre estas duas patologias. Alguns deles têm demonstrado uma correlação positiva entre a ansiedade experimental e o consumo de etanol, sugerindo assim uma ligação genética entre elas (Colombo *et al.*, 1995; Möller *et al.*, 1997; Spanagel *et al.*, 1995; Stewart *et al.*, 1993). Porém, outros estudos não têm encontrado esta correlação positiva (Tuominen *et al.*, 1990; Viglinskaya *et al.*, 1995; Overstreet *et al.*, 1997; Fernández-Teruel *et al.*, 2002; Henniger *et al.*, 2002; Da Silva *et al.*, 2004). Em humanos, homens geralmente consomem mais álcool e tem uma maior prevalência de alcoolismo do que mulheres (Harford *et al.*, 1998). Entretanto, em roedores, as fêmeas têm mostrado consumir maiores quantidades de etanol (Almeida *et al.*, 1998; Cailhol e Mormède, 2002; Da Silva *et al.*, 2004) com sugerida participação de hormônios sexuais, como por exemplo o estradiol (Sandberg *et al.*, 1982; Marinelli *et al.*, 2003).

1.7 Busca de Genes Candidatos

Os transtornos de ansiedade são comportamentos complexos e que tem uma natureza quantitativa, ou seja, são influenciados por múltiplos genes. Existe uma ferramenta bastante útil para se identificar *loci* (plural de *locus*, que são

regiões cromossômicas que contêm um ou mais genes que influenciam uma característica) de interesse para uma característica quantitativa (peso, altura, ansiedade, depressão, alcoolismo, etc.). Esta ferramenta, que é chamada de análise de QTL (*quantitative trait loci*), é usada no nível genômico e pode fornecer informação adicional sobre a associação genética entre características fenotípicas e, também, informações sobre os mecanismos moleculares moduladores da característica em estudo (Ramos e Mormède, 1998). Estudos de QTL são um método de mapeamento de *loci*, ou regiões cromossômicas, que contêm genes que afetam características quantitativas através de uma busca ao longo de todo o genoma (Brodkin e Nestler, 1998). Estes estudos foram uma das técnicas de biologia molecular mais utilizadas na década de 90 na genética do comportamento. Na técnica de QTL, após a fenotipagem de um grande número de animais, é realizada uma análise de ligação genética através marcadores moleculares de DNA. Um grande número de marcadores é utilizado sendo que eles devem estar bem espalhados ao longo de todo o genoma do animal e também devem ser polimórficos (existir sob a forma de diferentes alelos) nas linhagens parentais. Depois da análise, podemos encontrar um ou mais QTL's relacionados com a característica quantitativa em estudo.

Através do uso de uma F2 proveniente de um inter cruzamento entre as linhagens LEW e SHR, Ramos *et al.*, (1999) identificaram e mapearam, pela primeira vez, um QTL para comportamentos relacionados à emocionalidade em ratos. Este QTL foi mapeado no cromossomo 4 do rato e afeta a locomoção central no CA, uma medida sugerida com sendo relacionada à ansiedade (Gentsch *et al.*, 1987; Treit e Fundytus, 1989; Simon *et al.*, 1994; Nazar *et al.*,

1997; Angrini *et al.*, 1998). Como sugerido por Lander e Kruglyak (1995), os resultados de um estudo de QTL devem ser replicados para serem realmente considerados válidos. Isto aconteceu quando Mormède *et al.* (2002) confirmaram a existência do QTL no cromossomo 4 para a locomoção central no CA, utilizando o mesmo par de linhagens do estudo original (LEW e SHR). Curiosamente, outros dois QTL's que parecem estar ligados ao consumo de etanol e sacarina (Bice *et al.*, 1998; Carr *et al.*, 1998; Terenina-Rigaldie *et al.*, 2003) foram encontrados nesta mesma região do cromossomo 4 do rato. Depois de confirmada a sua existência, o QTL deve ser investigado a fundo no intuito de descobrir qual/ quais genes estão abrigados dentro da sua região cromossômica e que podem ser os responsáveis pelo efeito do QTL. Uma das estratégias para confirmar a importância de um QTL é selecionar duas novas linhagens divergentes de animais que apresentem contraste para o fenótipo associado a ele, supondo que mudanças no fenótipo sejam acompanhadas por mudanças progressivas nas frequências alélicas na região do QTL. Esta foi uma das razões pelas quais as linhagens Floripa H e L foram desenvolvidas e por este motivo utilizaremos elas em parte do presente estudo.

Em uma tentativa de encurtar-se o longo caminho que se segue entre a identificação de um QTL e a descoberta do gene propriamente dito, pode-se tentar avaliar genes candidatos que estejam já mapeados naquela região cromossômica e que estejam descritos na literatura como potencialmente relacionados à característica fenotípica em estudo. Estes genes podem ser avaliados comparativamente entre as linhagens parentais (as que deram origem ao QTL) através: da análise de DNA (*Southern Blot*, análise de SNP,

sequenciamento gênico), da expressão de RNA mensageiro (RNAm) (*Microarrays*, *Real-Time RT-PCR*, *Northern Blot*, *Total gene expression analysis* (TOGA)) ou da quantificação da forma final da proteína (*Western Blot*, imunohistoquímica). Então, no quarto experimento deste estudo, nós escolhemos avaliar a expressão de RNAm de dois genes localizados próximos ao QTL do cromossomo 4 do rato (NPY e Grin2b), identificado por Ramos *et al.* (1999) (ver anexo 1), e outro localizado no cromossomo 3 do rato (portanto longe do QTL), mas fortemente relacionado com a ansiedade em humanos e roedores (receptor 5-HT_{1a}). Esta comparação foi realizada em duas regiões cerebrais importantes (hipocampo e hipotálamo) na etiologia da ansiedade utilizando o modelo genético LEW/SHR.

1.7.1 Neurotransmissores envolvidos na ansiedade e no alcoolismo

1.7.1.1 Neuropeptídeo Y

O NPY (Neuropeptídeo Y) é um peptídeo de 36 aminoácidos que é amplamente expresso no sistema nervoso central (SNC), incluindo áreas como o córtex cerebral, o hipocampo e o hipotálamo. Ele é sintetizado e liberado em duas regiões do hipotálamo, o núcleo arqueado (NAR) e o núcleo paraventricular (NPV), respectivamente (Dryden *et al.*, 1995). Os sistemas centrais de NPY são conhecidos por estarem envolvidos na regulação da alimentação e da homeostase energética, no crescimento, no comportamento reprodutivo e fisiológico, no ritmo circadiano, na mobilidade gastrointestinal, na memória, na nocicepção, na regulação da pressão sanguínea e nos transtornos de ansiedade e alcoolismo (Heilig *et al.*, 1989; Carr *et al.*, 1998; Hökfelt *et al.*, 1998; Gehlert 1999; Kalra *et al.*, 1999; Badia-Elder *et al.*, 2001; Kask *et al.*, 2002; Badia-Elder *et al.*, 2003). Sabe-

se que o NPY altera a expressão e a secreção de outros neurotransmissores como a norepinefrina (Ekblad *et al.*, 1984) e a serotonina (Shimizu e Bray, 1989). As várias funções do NPY são especificamente mediadas pela família de receptores que consiste de no mínimo cinco membros distintos (Y1, Y2, Y4, Y5 e Y6) (Blomqvist e Herzog, 1997), todos eles expressos em diferentes regiões no cérebro (Parker e Herzog, 1999). Alguns estudos têm sugerido uma correlação negativa entre os níveis de NPY e a emocionalidade (Heilig *et al.*, 1989; Stewart *et al.*, 1993; Ehlers *et al.* 1998), e também, entre os níveis de NPY e o alcoolismo (Badia-Elder *et al.*, 2001; Badia-Elder *et al.*, 2003).

1.7.1.2 Glutamato

O Glutamato é o principal transmissor excitatório no SNC (Cotman *et al.*, 1995). A transmissão glutamatérgica tem sido envolvida em muitos processos como: aprendizado e memória (Bliss e Collingridge, 1993; Sakimura *et al.*, 1995), mal de Alzheimer (Scheuer *et al.*1996), mal de Parkinson (Greenamyre e Porter, 1994) e ansiedade (Bergink *et al.*, 2004). Este transmissor liga-se a receptores acoplados a canais de íons: cainato, AMPA (amino-3-hidroxi-5-metil 1-4 ácido propiônico isoxazole) e NMDA (N-metil-D-aspartato) ou à proteína G. O receptor NMDA é acoplado a um canal de sódio/cálcio, sendo ativado pela ligação de glutamato no sistema nervoso central de mamíferos. Em roedores, foram definidos dois grupos de subunidades do receptor NMDA, chamados de NR1 e NR2 A-D/1-4 (Monyer *et al.*, 1992). A distribuição do RNAm da subunidade NR2B nos roedores é restrita ao prosencéfalo, ao hipocampo e alguns gânglios basais, que são patologicamente afetados em muitos transtornos neurodegenerativos (Monyer *et*

al., 1992; Kutsuwada *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 1995). Os ratos LEW e SHR são conhecidos por diferirem em diversos comportamentos relacionados à ansiedade, um dos quais (locomoção central no CA) é fortemente influenciado por um *locus* no cromossomo quatro. Esta região genômica também contém o gene da subunidade NR2b dos receptores NMDA, chamado de Grin2b em humanos (Mandich *et al.*, 1994).

1.7.1.3 Serotonina

O sistema de neurotransmissão serotoninérgico tem um ligante endógeno, a 5-hidroxitriptamina (5-HT), porém ele é bastante complexo devido à existência de no mínimo 14 subtipos de receptores (Hoyer *et al.*, 1994), sendo a maioria deles acoplados à proteína G. Este é considerado um dos sistemas de neurotransmissão associados com os transtornos de ansiedade (López *et al.*, 1998; Pineyro e Blier, 1999; Groenink *et al.*, 2003), depressão (Mckittrick, *et al.*, 1995) e com a ingestão alimentar (Waldbillig *et al.*, 1981), com os estudos frequentemente focando no subtipo de receptor 5-HT_{1a} (De Vry, 1995; Barnes e Sharp, 1999; Chaouloff *et al.*, 1999; Toth, 2003; Groenink *et al.*, 2003). Este receptor tem sido bem caracterizado farmacologicamente, graças à disponibilidade de potentes agonistas e antagonistas seletivos. O receptor 5-HT_{1a} parece estar envolvido nos transtornos de ansiedade em humanos, por exemplo, já que um agonista parcial deste receptor, a buspirona, é efetiva no tratamento do transtorno de ansiedade generalizada humana (Davidson *et al.*, 1999). A ativação dos receptores 5-HT_{1a} pós-sinápticos resulta na inibição dos neurônios de vários sistemas de neurotransmissores, incluindo os interneurônios GABA-érgicos

(Barnes e Sharp, 1999). Entretanto, existem também receptores 5-HT_{1a} pré-sinápticos, que funcionam como reguladores da síntese, liberação e recaptação da 5-HT nas áreas de projeção (Boess e Martin, 1994). A distribuição dos neurônios que contêm 5-HT é bastante disseminada no SNC. As células formam vários agrupamentos na ponte e na porção superior do bulbo, que são conhecidos como núcleos da rafe. Estes núcleos projetam-se através do feixe prosencefálico medial para diversas áreas do cérebro, dentre elas, o hipocampo e o hipotálamo (Chaouloff *et al.*, 1999).

2-OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Gerais: O objetivo principal deste estudo foi avaliar a influência de fatores ambientais (diversas modificações no ambiente de laboratório ou na situação de teste) e genéticos (através de quatro linhagens diferentes de ratos: LEW, SHR, Floripa H e Floripa L e de estudos de expressão gênica) nas medidas comportamentais relacionadas à ansiedade e a possível relação destas com o consumo de etanol.

2.2 Específicos:

Bloco Experimental 1 (Modelo Genético LEW/SHR; variações na situação de teste):

- Verificar se as diferenças emocionais na CBP entre as linhagens LEW e SHR, já relatadas durante a fase diurna do ritmo circadiano de sono/vigília, persistem na fase noturna.
- Verificar se as linhagens são diferentes no reteste do LCE e avaliar a relação desta segunda exposição (reteste) com a primeira.

Bloco Experimental 2 (Modelo Genético LEW/SHR; variações no ambiente de laboratório):

- Avaliar a influência de um novo experimentador nos resultados de um teste de ansiedade, o CA.

- Avaliar a influência da posição das gaiolas dos ratos (alojamento) dentro do biotério, desde o momento do desmame até o dia do teste, nos resultados de três testes de ansiedade (CA, LCE e CBP).
- Avaliar a influência do estado comportamental do animal, imediatamente antes do teste, nos resultados do LCE.

Bloco Experimental 3 (Modelos Genéticos LEW/SHR e Floripa H/L; modelos de ansiedade e alcoolismo):

- Avaliar a possível relação entre modelos de ansiedade e um modelo de alcoolismo, através de três testes comportamentais de ansiedade e de um protocolo de auto-administração de etanol.
- Avaliar o efeito do sexo nos testes de comportamentais de ansiedade e no protocolo de auto-administração de etanol.

Bloco Experimental 4 (Modelo Genético LEW/SHR; expressão de genes candidatos):

- Comparar as duas linhagens em relação à expressão (através do RNAm) de dois genes ligados a um QTL do cromossomo 4 do rato (NPY e NR2b) e um gene capaz de influenciar comportamentos relacionados à ansiedade e ao alcoolismo (5-HT_{1A}).

3-MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

A colônia dos ratos SHR utilizada neste estudo é originária da Universidade de Harvard (Boston, MA) sendo obtida a partir da UNESP (Botucatu, SP, Brasil). A linhagem LEW utilizada é originária da *Harlan Sprague Dowley Inc.* (Indianápolis, IN), sendo obtida a partir da UNICAMP (Campinas, SP, Brasil).

As colônias de ratos LEW e SHR usadas neste estudo foram mantidas no nosso laboratório sob um sistema de acasalamento irmão/irmã como recomendado para todas as linhagens consangüíneas (ILAR, 1992). Já os animais das linhagens Floripa H e L pertenciam à décima geração de seleção bidirecional (S10) proveniente de uma população inicial (S0), que foi gerada através de cruzamentos entre três linhagens de ratos (Wistar, Hooded e Lewis) (ver anexo 2). Em resumo, o processo de seleção era o seguinte: em cada geração, eram selecionados os cinco animais Floripa H de cada sexo com maior locomoção central no teste do CA e os cinco animais Floripa L de cada sexo com menor locomoção central no CA, para serem os progenitores da próxima geração (Ramos *et al.*, 2003) (ver anexo 3).

Os animais foram desmamados e separados por sexo com quatro semanas de idade e, após isso, foram mantidos em gaiolas de plástico coletivas (cinco ratos/gaiola), exceto nos experimentos com etanol, onde os ratos permaneceram isolados. Comida e água estavam disponíveis *ad libitum*, sob um ciclo claro/escuro de 12 : 12h (luzes acessas às 07:00 h) com a temperatura sempre mantida à 22 ± 2 °C. Os experimentos realizados em nosso laboratório estavam de acordo com as

normas locais de uso dos animais na pesquisa (CEUA/UFSC) sob a permissão válida No. 23080.002412/2001-26.

3.2 Desenho Experimental

No primeiro bloco experimental, um total de 157 ratos LEW e SHR de ambos os sexos foram usados. Destes animais, 117 haviam sido previamente expostos, em outro estudo de nosso laboratório, a um CA e um LCE, após receberem uma única dose oral de clordiazepóxido ou de um antagonista do receptor NK-1 (NKP608). Os animais destes grupos prévios foram equitativamente distribuídos entre os tratamentos do presente experimento e um período de “wash out” de duas semanas foi respeitado para evitar eventuais efeitos das drogas. Estes animais, com 9-10 semanas de idade, foram expostos à CBP durante duas diferentes fases do ritmo circadiano (diurna: 16/linhagem/sexo; noturna: 12 machos LEW, 13 machos SHR e 14 fêmeas/linhagem). Os 40 animais (10/linhagem/sexo) restantes nunca haviam passado por nenhuma experimentação e foram testados, com 8-9 semanas de idade, somente no LCE, entre 14 e 17h, sendo retestados 24h após no mesmo aparato. Machos e fêmeas foram testados em dias separados.

No segundo bloco experimental, 78 animais LEW e SHR (9-10/linhagem/sexo/tratamento) foram testados no CA, LCE e CBP às 9, 10 e 11 semanas de idade, respectivamente, com machos e fêmeas sendo testados em diferentes dias. Conforme explicado mais adiante, três fatores ambientais foram avaliados: experimentador, posição da gaiola e estado de sono/vigília antes do teste. Todos os testes foram realizados entre 14:00 e 18:00 h.

No terceiro bloco experimental, 22 machos LEW e SHR (11/linhagem) de 11 semanas de idade foram submetidos a um protocolo de auto-administração que envolvia sacarina, quinino, etanol e água. Posteriormente, 57 ratos das linhagens Floripa H e L (Floripa L 15/sexo; Floripa H 15 machos e 12 fêmeas), da décima geração de seleção, foram submetidos a três testes de ansiedade (CA, LCE e CBP) com 9 semanas de idade. Cada teste foi realizado durante dois dias no período das 14:00 h às 18:00 h, sendo que os machos foram sempre testados um dia antes das fêmeas. Destes 57 animais, 40 (10 linhagem/sexo) foram selecionados a partir dos seus escores para a locomoção central no teste do CA (os Floripa H selecionados tinham os maiores escores e os Floripa L os menores) e foram submetidos ao mesmo protocolo de auto-administração de etanol usado para as linhagens LEW/SHR.

No quarto bloco experimental, 15 machos LEW e SHR (7-8/linhagem) foram testados, às 9 semanas de idade, no CA. Dentre estes animais, metade foi testada em um dia, das 13:30 às 15:00h e a outra metade no dia subsequente, no mesmo horário. Um dia após o término dos testes, os animais foram sacrificados e tiveram seu hipocampo e hipotálamo removidos para análise no Real-time RT-PCR (Reverse transcription-polymerase chain reaction). Os experimentos deste bloco experimental foram realizados no Instituto do Coração-SP (INCOR). Os ratos, criados no LGC, foram enviados ao INCOR uma semana antes dos experimentos, por via aérea.

3.3 Testes Comportamentais

3.3.1 Campo Aberto (CA)

O aparato (Fig 1) era feito de madeira coberta com fórmica impermeável possuindo uma área de 100 x 100 cm, com o chão branco, dividido em 25 quadrados de 20 x 20 cm (linhas divisórias pretas), 9 quadrados formavam a área central e 16 a área periférica; as paredes, também brancas, tinham 40 cm de altura. A luminosidade utilizada durante os testes foi de 7 Lux. Cada rato foi colocado no centro do aparato, o qual era inédito para o animal e observado por 5 min, sendo os seguintes comportamentos registrados: número de quadrados periféricos (adjacentes às paredes) e centrais (centro do aparato; sem paredes ao lado) atravessados com todas as quatro patas e o número de bolotas fecais depositadas. A partir destes dados foi então calculada a locomoção total (número total de quadrados atravessados) e a porcentagem da locomoção total que seria devida à locomoção central. Após cada animal ser testado, o aparato era limpo com esponja embebida em água e seco com papel toalha. O comportamento de cada animal foi gravado por uma câmera de vídeo posicionada acima do aparato, o que permitia o esclarecimento de qualquer dúvida posterior. Além disto, o monitoramento instantâneo possibilitava a retirada das medidas por um observador treinado localizado em outra sala, através de um circuito fechado de TV. Os métodos de limpeza e gravação foram os mesmos para todos os outros testes de ansiedade utilizados neste estudo.



Figura 1- Campo Aberto utilizado nos experimentos.

3.3.2 Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

O aparato (Fig 2), que era feito de madeira coberta com uma camada de fórmica preta, apresentava quatro braços, sendo dois fechados e dois abertos, distantes 52 cm do chão. Os dois braços fechados eram opostos, medindo 50 cm de comprimento por 10 cm de largura, com paredes de 42 cm de altura, formando uma cruz com os braços abertos, os quais também mediam 50 cm de comprimento por 10 cm de largura, sendo margeados por um anteparo de 0,5 cm de altura e 0,1 cm de espessura (para evitar a queda dos animais do aparato). Na interseção entre os braços fechados e abertos havia uma plataforma central medindo 13,5 x 10 cm que dava acesso a cada um dos quatro braços. Durante a realização dos experimentos, a intensidade luminosa foi de 65 lux na plataforma central, 70-90 lux nos braços abertos e 20 lux nos braços fechados. Cada rato foi colocado na plataforma central de frente para um braço aberto e seu comportamento foi observado por 5 min.



Figura 2- Labirinto em Cruz Elevado utilizado nos experimentos.

O número de entradas e o tempo passado (com as quatro patas) dentro de cada tipo de braço foram registrados e a porcentagem de entradas nos braços abertos foi calculada em relação ao número total de entradas.

3.3.3 Caixa Branca/Preta (CBP)

O aparato (Fig 3) era feito de madeira coberta com fórmica e apresentava dois compartimentos: um branco fortemente iluminado (1.000 Lux), medindo 27x27x27 cm, cujo chão era dividido em 9 quadrados (9x9 cm); e outro preto iluminado com luz vermelha de 40W, medindo 27x18x27 cm, cujo chão era dividido em 6 quadrados (9x9 cm). Os dois compartimentos eram conectados por uma pequena abertura de 7x7 cm. Diz-se que o compartimento preto é escuro, pois o comprimento de onda vermelho é invisível ao rato, embora exista uma fraca luminosidade advinda do compartimento branco (20 Lux). Ambas as lâmpadas eram localizadas 30 cm acima do piso do aparato. Cada rato foi colocado no

centro do compartimento branco e observado por 5 min. Os seguintes comportamentos foram registrados: latência para sair do compartimento branco; número de quadrados atravessados com as quatro patas e o tempo gasto em cada compartimento, além do número de transições entre os dois compartimentos (o que inclui sair do preto, entrar no branco com as quatro patas e voltar para o preto). A latência para sair do compartimento branco é considerada como o tempo que o animal, ao ser colocado neste compartimento, leva para deixar o mesmo, indo para o compartimento preto. O tempo gasto no compartimento branco não inclui esta latência inicial.



Figura 3- Caixa Branca/Preta utilizada nos experimentos.

3.3.4 Consumo espontâneo de etanol

Neste teste os animais permaneceram isolados em uma caixa plástica com tampa metálica medindo 21x28x19 cm, e cujo chão era coberto por maravalha (Fig

4). A caixa permitia que os animais tivessem movimentos livres e acesso *ad libitum* a ração e a uma ou duas garrafas de líquido, conforme o protocolo. O protocolo de auto-administração consistia de: dois dias de livre-escolha entre sacarina (7.5 mM) e água; dois dias de livre-escolha entre quinino (2 μ M) e água; dois dias de etanol forçado (10%) e livre-escolha entre etanol (2,4,6 e 10%) e água (2 dias para cada concentração com soluções v/v). O consumo de líquido (etanol, água, sacarina ou quinino) era medido diariamente (LEW e SHR) ou a cada dois dias (Floripa H/L), sempre a partir das 16:00h, através da pesagem das garrafas. No período da pesagem os animais permaneciam sem qualquer tipo de líquido para consumo. A cada dia as garrafinhas eram cuidadosamente trocadas de lado para evitar qualquer tipo de efeito da posição. O peso dos animais foi medido a cada dois dias, a partir do primeiro dia de etanol forçado (10%) até o final do experimento.



Figura 4- Caixa de auto-administração utilizada nos experimentos.

Os dados são apresentados sob a forma de consumo absoluto (ml), g de etanol/dia/kg do peso do corpo do animal, ou ainda de preferência do animal por uma solução (etanol, água, sacarina ou quinino) em relação ao consumo total de fluído (consumo da solução / consumo total de fluído) x 100.

3.4 Fatores Ambientais

3.4.1 Ritmo circadiano

Na CBP, no primeiro bloco experimental, aproximadamente metade dos animais LEW e SHR foi testada entre 16:00 h e 18:00 h (fase diurna do ritmo circadiano) e a outra metade entre 23:00 h e 01:00 h (fase noturna do ritmo circadiano).

3.4.2 Reteste no LCE

Nesta outra parte do primeiro bloco experimental, cada rato LEW e SHR foi submetido duas vezes ao LCE (teste e reteste) com um intervalo de 24 h entre as exposições. Em cada sessão os ratos LEW e SHR foram testados alternadamente, mas todos os machos foram testados e retestados antes das fêmeas.

3.4.3 Experimentador

No segundo bloco experimental, metade dos animais LEW e SHR testados no CA foram conduzidos ao teste (tirados das suas gaiolas, transportados até a sala de testes e colocados dentro do aparato) por um experimentador familiar aos

animais, que entrou no biotério todos os dias e foi a única pessoa que manipulou os animais na limpeza das gaiolas desde o desmame até o dia do teste. Um outro experimentador (não familiar aos animais), que nunca tinha entrado no biotério antes do início dos experimentos, conduziu ao teste a outra metade dos animais. Ambos os experimentadores eram do sexo masculino, não-fumantes e usavam jalecos de laboratório branco, luvas de látex e nenhum tipo de perfume durante os dias dos testes. Como nosso objetivo era avaliar a influência da familiaridade do animal com a pessoa que realiza os testes e não de eventuais diferenças de procedimentos, os movimentos foram padronizados entre os dois experimentadores, que treinaram anteriormente com outros animais em outra sala de laboratório. Todos os objetos que seriam movimentados antes do teste (gaiolas, tampas, mamadeiras de água, etc.) foram movimentados na mesma ordem e colocados sobre as mesmas posições na bancada sobre marcas pré-definidas. Um único observador treinado, localizado em uma sala adjacente, realizou a observação e a retirada das medidas comportamentais.

3.4.4 Posição da gaiola dentro do biotério

Os animais LEW e SHR do segundo bloco experimental foram alojados em gaiolas localizadas em estantes contendo cinco andares cada uma. Eles estiveram alojados, desde o desmame até o dia do teste, no mesmo biotério, no mais ALTO ou mais BAIXO andar, com ambos os sexos e linhagens sendo igualmente distribuídos entre estas duas condições. Os andares mais altos e mais baixos estavam localizados a 155 e 18 cm do chão, respectivamente. A iluminação medida nas áreas altas e baixas das estantes mostrou 240 e 12 lux,

respectivamente. A temperatura, por outro lado, não variava entre estas duas condições. Supõe-se que uma variação semelhante na posição das gaiolas é provavelmente encontrada (mas não controlada) em muitos laboratórios comportamentais. Os efeitos desta variável foram então avaliados no CA, LCE e CBP.

3.4.5 Estado comportamental antes do teste

Trinta minutos antes do início do teste no LCE, às 13:30 h, uma gaiola de cada linhagem LEW e SHR era removida da estante e cuidadosamente colocada na bancada dentro do biotério, onde um sistema de vídeo podia monitorar ambas as gaiolas. Assim, sem perturbar os animais, um observador localizado em uma sala adjacente podia observá-los continuamente. O estado comportamental do animal foi então classificado em duas categorias, denominadas “repouso” e “vigília”. A vigília incluía comportamentos ativos, onde movimento corpóreo podia ser observado (andar, comer, beber, brincar, alisar), e também estados de imobilidade, onde os olhos estavam abertos, não deixando nenhuma dúvida que o animal estava acordado. O estado de repouso, pelo contrário, era considerado quando o animal estava imóvel, com um tônus muscular relaxado, olhos fechados, em aparente estado de sono. Quando um indivíduo permanecia em um destes estados durante 5 min contínuos, registrados pelo observador, outro experimentador treinado entrava no biotério e retirava cuidadosamente o animal da sua gaiola e imediatamente o transportava para o aparato de teste (LCE), localizado em uma sala adjacente. Depois de testado, o rato era marcado com tinta nas suas costas (de maneira que isso pudesse ser reconhecido pelo

experimentador através do vídeo, evitando que o animal fosse novamente retirado para teste) e era devolvido a sua gaiola. Todos os machos foram testados anteriormente as fêmeas e os testes duraram quatro dias para cada sexo. Dentro de cada dia, ratos das duas linhagens e dos dois estados comportamentais tinham suas ordens balanceadas através do tempo.

3.5 Expressão Gênica

Os animais utilizados neste experimento foram testados em um CA, como aquele descrito anteriormente, exceto que este apresentava iluminação de 80 lux e o piso dividido em 36 quadrados ao invés de 25. Duas horas antes do momento do teste, os animais foram isolados em gaiolas de plástico 12x26x15cm para evitar qualquer tipo de influência de um animal no comportamento do outro. Um dia após a finalização do teste do CA, os animais foram sacrificados por decapitação e tiveram seus hipocampos e hipotálamos retirados, sendo estes imediatamente congelados em nitrogênio líquido e posteriormente transportados ao freezer -70°C para futura extração de RNAm. A expressão relativa dos genes codificadores do NPY, NR2b, 5-HT_{1a} e ciclofilina (cyph), como gene controle (*housekeeping gene*), no hipocampo e no hipotálamo dos ratos LEW e SHR, foi determinada através de Real-time RT-PCR com o sistema de detecção de seqüência ABI PRISM 7700 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

3.5.1 Extração de RNAm

As amostras foram obtidas do hipocampo e do hipotálamo dos animais LEW e SHR. O RNA total conforme o protocolo do fabricante foi extraído através do uso

de TRIZOL Reagent (Invitrogen). A quantificação do RNA total obtido em solução aquosa foi realizada no espectrofotômetro de luz UV nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm para a verificação de possíveis contaminações protéicas, onde a qualidade da extração é verificada através da proporção 260/280 que deve estar em torno de 2,0. Além disso, foi realizada eletroforese em gel de agarose 1% comprobatória para observação das bandas das subunidades 28 e 18.

3.5.2 Preparação dos primers

No presente estudo, todos os *primers sense* e *antisense*, específicos para os genes avaliados (NPY, 5-HT_{1A}, NR2b) foram desenhados com o auxílio do *Primer3 Software* (http://www.broad.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi), a partir do estudo das seqüências conservadas de cDNA desses genes, que estavam disponíveis no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>). Os *primers* foram selecionados pelo tamanho (18-22 nucleotídeos), conteúdo de G/C (Guanina/Citosina) ao redor de 50%, desenhados em diferentes éxons quando possível para evitar contaminação com DNA genômico, temperatura de anelamento entre 58-60°C, tamanho do amplicon entre 50-150 nucleotídeos com maior proximidade da terminação 3' e especificidade utilizando-se a *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). A síntese dos *primers* foi realizada pela *Invitrogen Technologies* (Brasil) e eles tinham as seguintes seqüências: NPYF 5' -ACT ACT CCG CTC TGC GAC A 3'; NPYR 5' -CCA TCA CCA CAT GGA AGG 3'; NR2BF 5' -GTT CCG GCA TTG CTT CAT 3'; NR2BR 5' -AGC AAG CGT AGG ATG TTG G 3'; 5-HT_{1A}F 5' -GGG CTA TCA CCG

ACC CTA T 3' e 5-HT_{1A}R 5' -AAG CCA ATG AGC CAA GTG A 3'.

3.5.3 Síntese de cDNA

A síntese do cDNA foi realizada através da reação de transcrição reversa (RT) em um volume reacional de 20 µl que continha 2 µg de RNA total previamente analisado, 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM de KCl, 2,5 mM de MgCl₂, 10 mM de DTT, 0,5 µg de oligo (dT), 0,5 mM de cada dATP, dGTP, dCTP, dTTP e 200 U da enzima *SuperScript II Reverse Transcriptase* (Invitrogen, Brasil). A mistura de RNA e oligo (dT) foi aquecida a 70°C por 10 min e imediatamente colocada no gelo para a adição dos demais componentes. Após isto, a reação foi incubada a 42°C por 1 hora e interrompida pelo aquecimento a 70°C por 15 min. O produto de cDNA foi tratado com 2 U de RNase H (Invitrogen) a 37°C por 20 min para remoção dos *templates* de RNA, com posterior inativação da enzima por aquecimento a 70°C por 15 min. As amostras foram armazenada a -20°C até o momento do uso.

3.5.4 Análise da expressão gênica

As reações de PCR foram realizadas no *ABI Prism 7700 Sequence Detection System* (Applied Biosystems, Foster City, CA). Para cada reação (equivalente a um poço da placa), utilizou-se um volume reacional de 20 µl contendo 1 µl de cDNA *template* (com concentração previamente definida através de curvas de diluição), uma concentração final de 200 nM dos *primers sense* e *antisense* específicos para cada gene (0,32 µl de cada *primer*), 10 µl do *2X SYBR*

Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA), e água isenta de RNase (7,96 µl). O *2X SYBR Green PCR Master Mix* contém a *AmpliTaq DNA Polymerase*, o *SYBR Green Buffer*, dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), *SYBR Green I* e a referência passiva, o corante fluorescente ROX. As reações foram incubadas a 95°C por 10 min para a ativação da *AmpliTaq DNA Polymerase*, seguido de 50 ciclos de 15 seg a 95°C, e 60 seg a 60°C (extensão e coleta do sinal de fluorescência). Foram utilizados controles negativos para cada gene ou para o normalizador através do controle sem *template* (ausência de cDNA) e o controle sem amplificação (ausência do par de *primers*). Todas as amostras dos diferentes grupos, incluindo os controles, foram sempre processadas em triplicata na mesma placa. Após a reação do *RT-PCR*, foi realizada uma curva de dissociação (*melting curve*) para cada corrida a partir da análise da temperatura de dissociação (*melting point* - T_m) da dupla fita de DNA. O ciclo de dissociação foi realizado através dos seguintes passos: (a) aquecimento a 95°C por 15 seg, (b) um decréscimo progressivo da temperatura de 95°C para 60°C e manutenção dessa temperatura por 20 seg, (c) um reaquecimento (dissociação) progressivo (19 min e 59 seg) de 60°C para 95°C, e manutenção da temperatura de 95°C por 15 seg. Eventuais produtos de PCR que apresentaram curvas de dissociação com picos de T_m abaixo do produto de PCR específico (formação de dímeros de *primer*), ou ainda picos diversos com diferentes T_m s ou platôs (formação de produtos não-específicos) foram descartados.

3.6 Estatística

3.6.1 Bloco Experimental 1

Como o principal objetivo deste estudo foi avaliar diferenças entre as linhagens e entre as situações de teste, os resultados foram analisados, separadamente para cada sexo, por uma ANOVA de duas vias para os fatores linhagem e fase circadiana (dia/noite) para a CBP. Os resultados do LCE foram analisados por uma ANOVA de duas vias de uma maneira similar, mas com as exposições (teste e reteste) sendo tratados como medidas repetidas. Nos casos onde interações significantes foram encontradas entre as linhagens e as variações dos testes, o teste *post hoc* LSD foi utilizado para comparar as médias dos grupos. Todas as análises foram realizadas com o software *Statistica* (Statsoft, France, 1996).

3.6.2 Bloco Experimental 2

Os resultados foram analisados, separadamente para cada fator ambiental, por uma ANOVA de três vias para os fatores linhagem (LEW/SHR), sexo (macho/fêmea) e variável ambiental (experimentador familiar/não familiar; gaiolas alojadas na parte alta/baixa; estado de repouso/vigília). Nos casos onde interações significantes foram identificadas, o teste de *post hoc* LSD foi utilizado para comparações entre os subgrupos. Todas as análises foram realizadas com o software *Statistica* (Statsoft, Tulsa, OK, 1998).

3.6.3 Bloco Experimental 3

Os resultados dos testes de consumo de etanol de ratos machos LEW e SHR foram analisados através do teste-t de Student para amostras independentes. Os dados dos testes de ansiedade e consumo de etanol de ratos Floripa H e L foram analisados por uma ANOVA de duas vias para os fatores linhagem e sexo. Nos casos onde interações significantes foram identificadas, o teste de *post hoc* LSD foi utilizado para comparações entre os subgrupos. Todas as análises foram realizadas com o software *Statistica* (Statsoft, Tulsa, OK, 1998).

3.6.4 Bloco Experimental 4

Os resultados dos testes do CA e Real-time RT-PCR foram analisados através do teste-t de Student para amostras independentes comparando as linhagens (LEW/SHR) com o software *Statistica* (Statsoft, Tulsa, OK, 1998). No caso do teste do Real-time RT-PCR, foram utilizadas como medidas as médias \pm erro padrão dos Δ Ct. A quantificação relativa da expressão gênica foi realizada no *Sequence Detector System 1.7* (Applied Biosystem, Foster City, CA). Os dados coletados foram plotados como sinal de fluorescência Δ Rn (eixo y) *versus* o número de ciclos da reação (eixo x). O Δ Rn foi calculado pelo *software* a partir da equação:

$$\Delta Rn = (Rn^+) - (Rn^-)$$

Rn^+ = é o sinal de fluorescência do produto em determinado tempo

Rn^- = é o sinal de fluorescência da linha de base entre os ciclos 3-15

A linha de *threshold* foi traçada no gráfico Δ Rn *versus* o número de ciclos,

no ponto correspondente a 10 vezes o desvio padrão do valor médio da linha de base. O valor de Ct foi definido como o número do ciclo no qual o ΔRn intercepta esse *threshold*. A quantificação relativa da expressão de cada gene, na linhagem LEW em relação à linhagem SHR foi dada a partir da equação:

$$\text{Variação: } 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

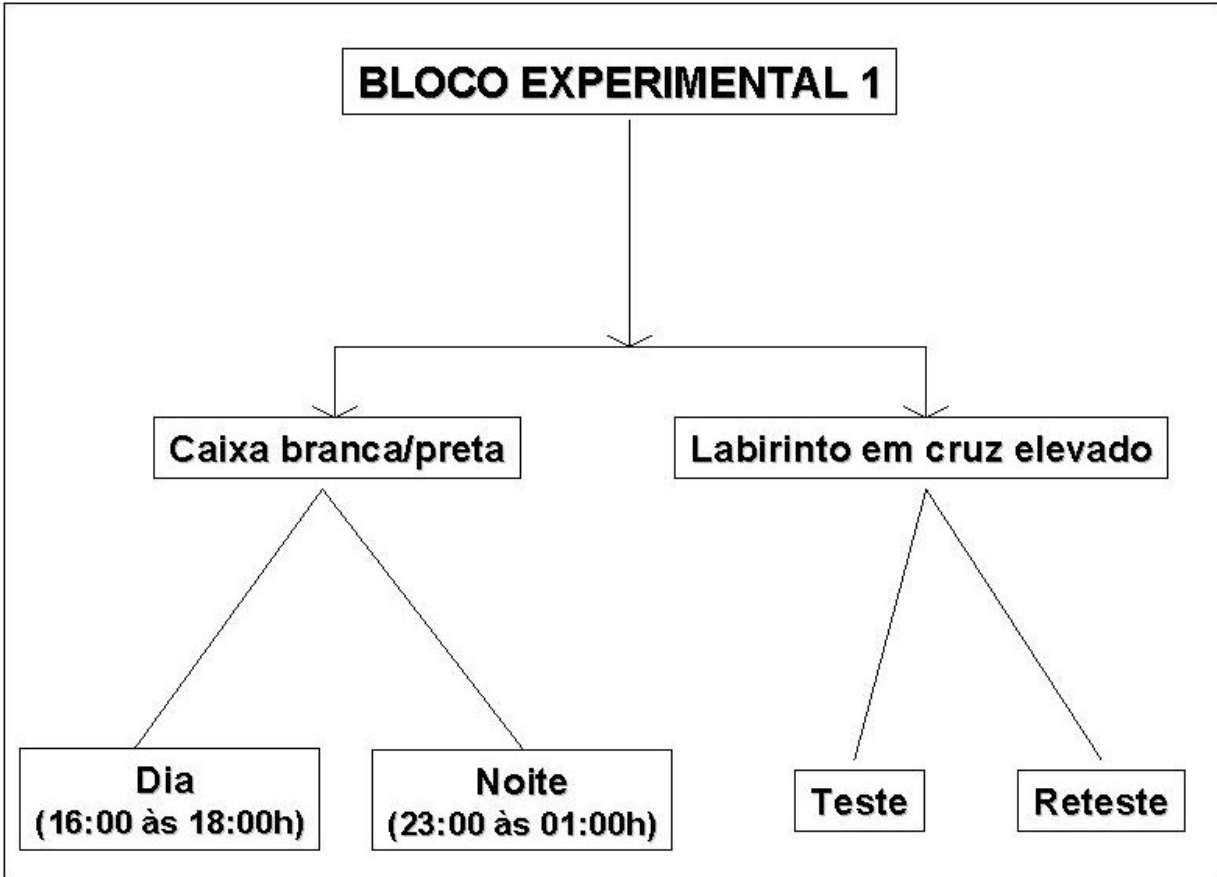
$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct - \Delta Ct \text{ calibrador}$$

$\Delta Ct \text{ calibrador} = \text{m\u00e9dia do } \Delta Ct \text{ do gene espec\u00edfico na linhagem LEW}$

$\Delta Ct = \text{m\u00e9dia do Ct do gene espec\u00edfico expresso nas linhagens (LEW ou SHR)} - \text{m\u00e9dia Ct do controle interno (cyph)}$

A quantificação relativa da expressão gênica, normalizada com o controle interno e relativo utilizando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, correlaciona-se com a quantificação gênica absoluta obtida usando-se a curva padrão (*User Bulletin n° 2 Applied Biosystems, Foster City, CA*).

4-RESULTADOS



4. RESULTADOS

4.1 Bloco Experimental 1

4.1.1 Ritmos Circadiano (CBP)

Os resultados da CBP estão sumarizados na Tabela 1 e Figura 5. Em machos, ocorreu um efeito geral significativo de linhagem em todas as medidas: tempo no compartimento branco (SHR > LEW; $F= 6.2$ e $p < 0.05$); locomoção no compartimento preto (LEW > SHR; $F= 59.2$ e $p < 0.01$); tempo no compartimento preto (LEW > SHR; $F= 20.2$ e $p < 0.01$); número de transições (SHR > LEW; $F= 9.5$ e $p < 0.01$) e locomoção no compartimento branco (SHR > LEW; $F= 8.9$ e $p < 0.01$). Em todos os casos, os ratos SHR aproximaram-se mais do compartimento branco e aversivo do que os ratos LEW. Não ocorreu nenhum efeito da fase circadiana em nenhuma medida comportamental.

Nas fêmeas, ocorreu um efeito geral de linhagem significativo em quase todas as medidas: tempo no compartimento branco (SHR > LEW; $F= 14.2$ e $p < 0.01$); locomoção no compartimento preto (LEW > SHR; $F= 30.3$ e $p < 0.01$); tempo no compartimento preto (LEW > SHR; $F= 36.2$ e $p < 0.01$) e locomoção no compartimento branco (SHR > LEW; $F= 8.5$ e $p < 0.01$). Não ocorreu nenhum efeito geral da fase circadiana. Contudo, ocorreu uma interação entre linhagem e fase circadiana no número de transições ($F= 6.1$ e $p < 0.05$), com as fêmeas SHR, mas não as LEW, diferindo entre as fases e fazendo mais transições durante a fase noturna. Como em machos, as fêmeas SHR aproximaram-se mais do compartimento branco e aversivo do que as LEW.

Tabela 1 – Medidas da caixa branca/preta (média \pm erro padrão) para ratos machos e fêmeas das linhagens Lewis e SHR, em duas fases do ritmo circadiano:

GRUPO	N	Tempo no preto (s)	Número de transições	Locomoção no branco
Machos				
LEW / dia	16	261.4 \pm 8.9 **	1.1 \pm 0.4 **	7.9 \pm 2.1 **
LEW / noite	12	265.3 \pm 9.4	1.0 \pm 0.4	6.4 \pm 1.8
SHR / dia	16	209.8 \pm 9.4	2.6 \pm 0.4	14.4 \pm 1.8
SHR / noite	13	214.0 \pm 17.1	2.7 \pm 0.6	13.3 \pm 3.0
Fêmeas				
LEW / dia	16	240.8 \pm 8.1 **	2.7 \pm 0.4	15.8 \pm 2.4 **
LEW / noite	14	248.2 \pm 10.9	2.6 \pm 0.6	14.5 \pm 2.9
SHR / dia	16	195.4 \pm 10.1	4.3 \pm 0.4	19.4 \pm 2.3
SHR / noite	14	177.0 \pm 9.4	7.0 \pm 0.5	25.0 \pm 1.7

** representa diferença entre linhagens, para machos ou fêmeas (ANOVA, $p < 0.01$).

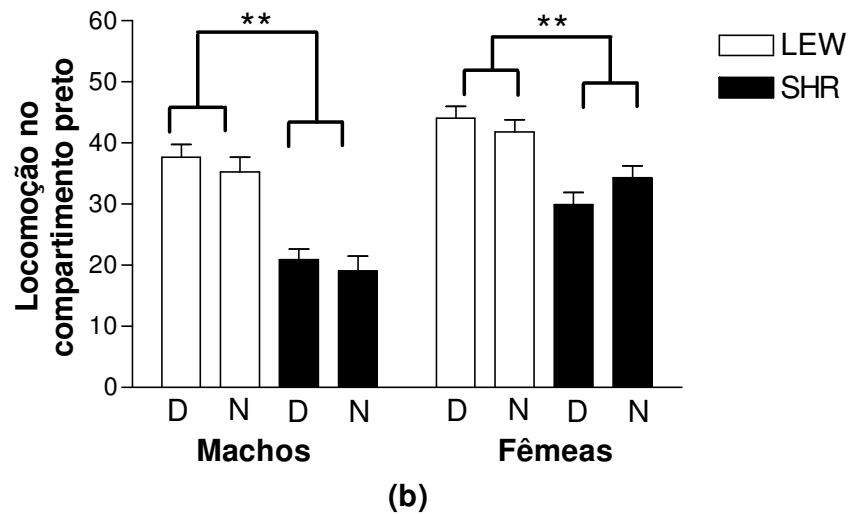
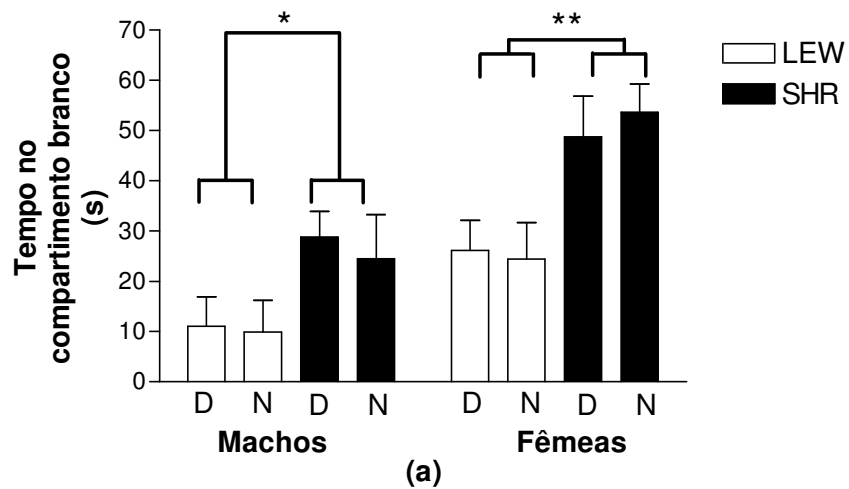


Figura 5- Tempo passado no compartimento branco (a) e locomoção no compartimento preto (b) da caixa branca/preta, para ratos LEW e SHR de ambos os sexos, (ver N na tabela 1), nas duas fases do ritmo circadiano, dia (D; das 16:00h às 18:00h) e noite (N; 23:00h às 01:00h). As barras representam os valores médios \pm erro padrão. Para cada sexo, * ou ** representam efeito geral de linhagem (ANOVA, $p < 0,05$ e $p < 0,01$; respectivamente).

4.1.2 Teste/Reteste (LCE)

Os resultados obtidos no LCE são mostrados nas Figura 6 e 7. Nos machos, ocorreu um efeito geral de linhagem apenas para o tempo passado nos braços abertos (SHR > LEW; $F=10.7$ e $p < 0.01$). Um efeito geral da exposição prévia (teste/reteste) foi encontrado nas medidas: tempo passado nos braços abertos (teste > reteste; $F=9.9$ e $p < 0.01$) e % de entradas nos braços abertos (teste > reteste; $F=11.6$ e $p < 0.01$). Além disso, ocorreram interações entre linhagem e exposição prévia para: o número total de entradas ($F=5.2$ e $p < 0.05$) e o número de entradas nos braços fechados ($F=7.3$ e $p < 0.05$), com os ratos LEW e SHR diferindo somente durante o reteste.

Nas fêmeas, ocorreu um efeito geral de linhagem para: tempo passado nos braços abertos (SHR > LEW; $F=48.7$ e $p < 0.01$); % de entradas nos braços abertos (SHR > LEW; $F=21.0$ e $p < 0.01$) e total de entradas (SHR > LEW; $F=7.6$ e $p < 0.05$). Um efeito geral da exposição prévia foi encontrado para: tempo passado nos braços abertos (teste > reteste; $F=14.6$ e $p < 0.01$); % de entradas nos braços abertos (teste > reteste; $F=14.2$ e $p < 0.01$); total de entradas (reteste > teste; $F=71.4$ e $p < 0.01$) e entradas nos braços fechados (reteste > teste; $F=118.2$ e $p < 0.01$). Não ocorreram interações significativas entre linhagem e exposição prévia para fêmeas.

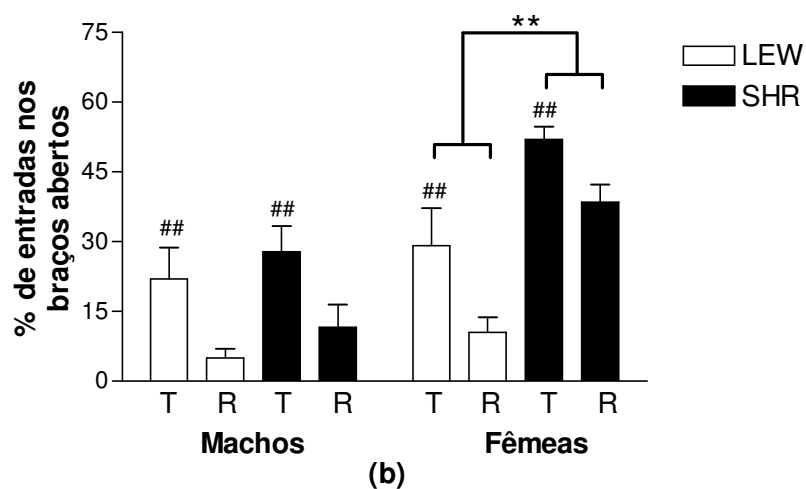
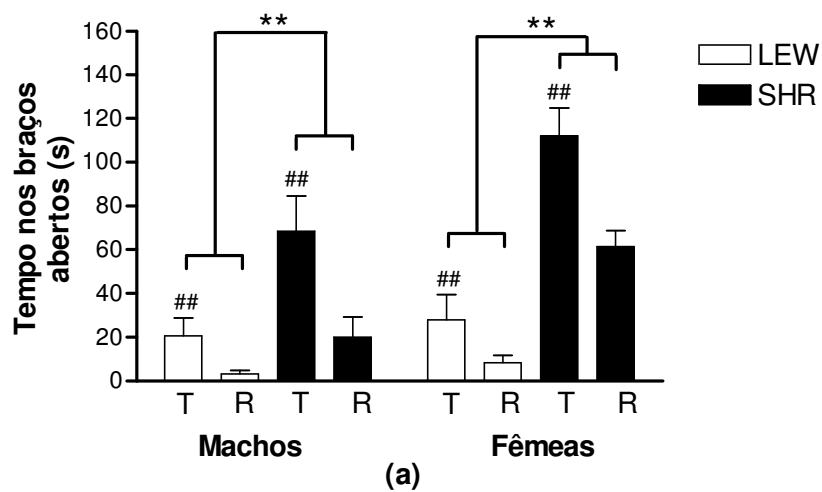


Figura 6- Tempo gasto (a) e % de entrada (b) nos braços abertos do labirinto em cruz elevado, para ratos LEW e SHR de ambos os sexos, (10/linhagem/sexo), no teste (T) e reteste (R) (24h após). As barras representam os valores médios \pm erro padrão. Para cada sexo, ** e ## representam, respectivamente, efeito geral de linhagem e exposição (ANOVA, $p < 0,01$).

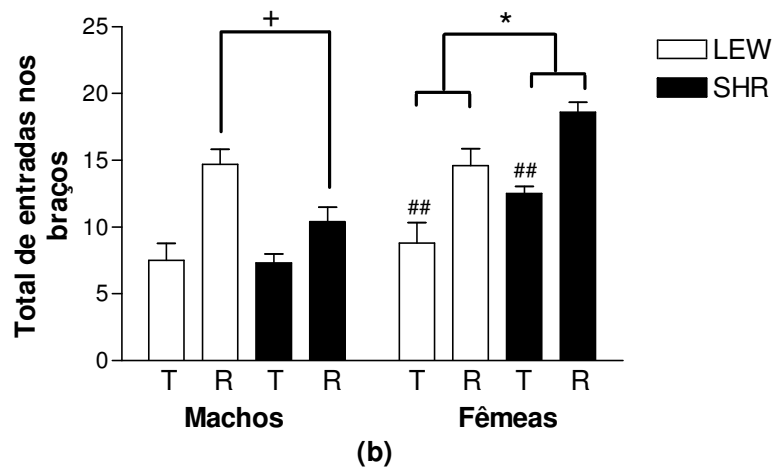
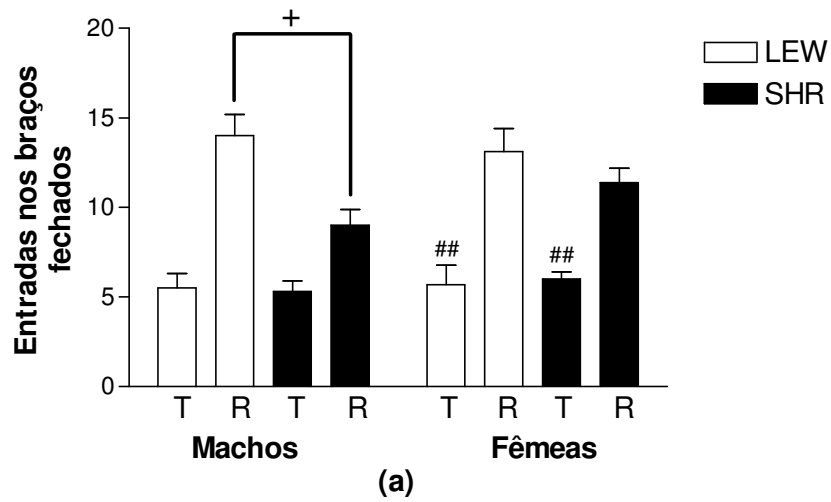
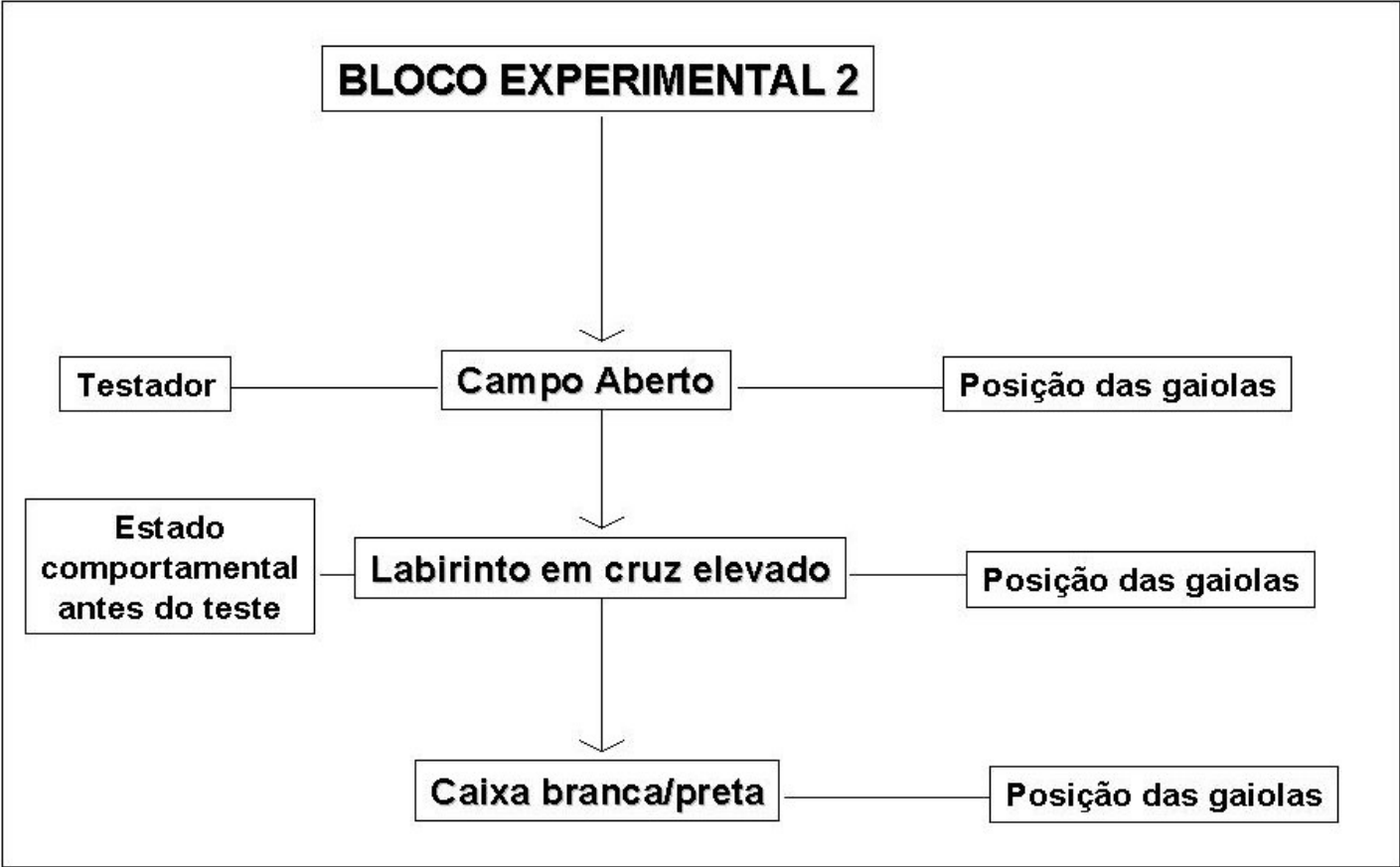


Figura 7- Entradas nos braços fechados (a) e entradas totais (b) do labirinto em cruz elevado, para ratos LEW e SHR de ambos os sexos, (10/linhagem/sexo), no teste (T) e reteste (R) (24h após). As barras representam os valores médios \pm erro padrão. Para cada sexo, * representa efeito geral de linhagem (ANOVA, $p < 0,05$) e ## representa efeito geral de exposição (ANOVA, $p < 0,01$). Diferenças entre os subgrupos no teste *post hoc* LSD, são mostradas por + ($p < 0,05$).



4.2 Bloco Experimental 2

4.2.1 O Efeito do experimentador (CA)

Nenhuma diferença significativa ($p > 0.05$) entre os experimentadores foi observada para qualquer medida comportamental do teste do CA (Fig 8a-b), mas grandes efeitos de linhagem ($F=78.0$ e $p < 0.001$) foram encontrados para a locomoção central no CA, com os ratos LEW mostrando menores escores do que os SHRs (Fig 8a). Um efeito geral do fator sexo ($F=9.61$ e $p < 0.01$) foi encontrado na locomoção total, com as fêmeas sendo mais ativas do que os machos (Fig 8b). Nenhuma interação ($p > 0.05$) foi encontrada entre os fatores.

4.2.2 Posição das gaiolas dentro do biotério

Devido ao fato de que nenhuma influência do experimentador foi encontrada no CA, os dados de ambos os experimentadores foram agrupados e analisados para três fatores: linhagem, sexo e posição das gaiolas. Um efeito geral de posição da gaiola ($F=4.35$ e $p < 0.05$) foi encontrado na locomoção central do CA, não importando a linhagem ou o sexo, com os ratos alojados no andar mais alto apresentando maiores escores do que aqueles alojados no andar mais baixo (Fig 9a). A posição da gaiola não afetou nenhuma outra medida do CA e nenhuma medida do LCE.

Diferentes medidas da CBP, que tem a luz como principal componente aversivo, foram afetadas pela posição das gaiolas. No tempo passado no compartimento branco (Fig 9b), ocorreu uma interação significativa ($F=10.65$ e $p < 0.01$) entre genótipo e ambiente. A análise *post hoc* revelou que os ratos SHR (mas não os LEW) de ambos os sexos foram afetados pela posição da gaiola, com

os animais alojados na parte baixa mostrando maior esquivia do compartimento branco do que aqueles alojados na parte alta. Devido a esta interação, diferenças de linhagem (LEW < SHR) dentro de sexo e tratamento, que foram altamente significantes ($p < 0.001$) para os outros subgrupos, não foram detectadas ($p > 0.05$) nos ratos machos alojados na parte baixa. Para esta mesma variável, ocorreu também um efeito geral do fator sexo ($F=7.19$ e $p < 0.01$), com as fêmeas passando mais tempo no compartimento branco do que os machos. Uma interação significativa ($F=7.26$ e $p < 0.01$) entre linhagem, sexo e posição da gaiola foi encontrada na locomoção no compartimento branco (Fig 9c). Aqui, somente machos SHR e fêmeas LEW tiveram seus escores significativamente alterados pela posição (alta > baixa), enquanto que as diferenças de linhagens foram significantes ($p < 0.05$) para todos os subgrupos de sexo/tratamento. Para o número de transições, ocorreu também uma interação entre linhagem, sexo e posição da gaiola ($F=5.84$ e $p < 0.05$), com as comparações de *post hoc* mostrando as mesmas diferenças que aquelas encontradas no tempo passado no compartimento branco.

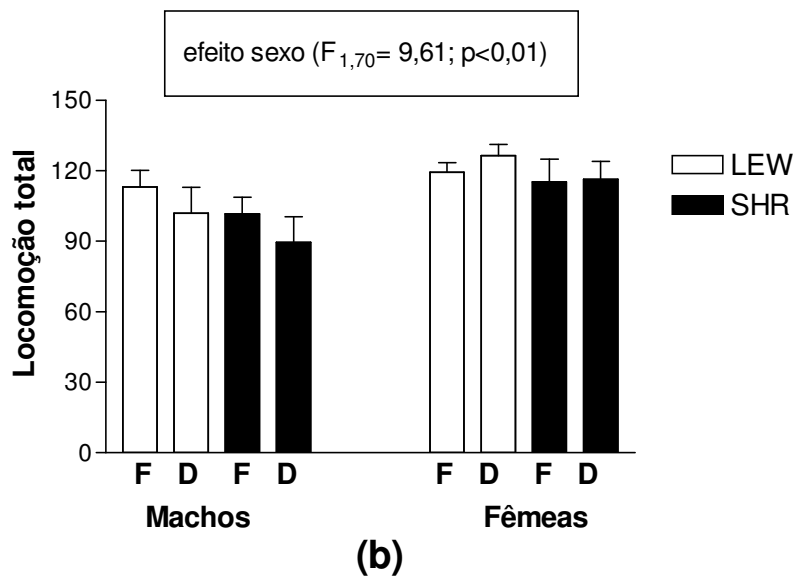
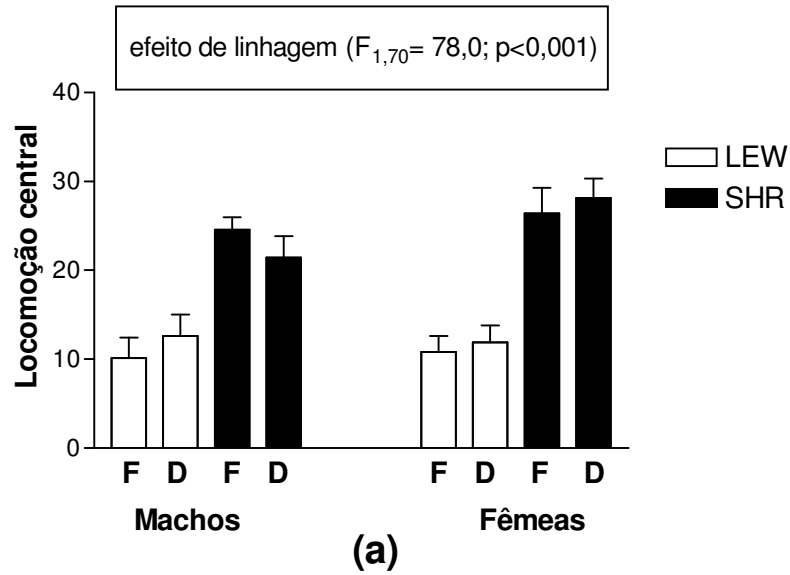


Figura 8- Locomoção central (a) e total (b) no campo aberto, para ratos LEW e SHR de ambos os sexos, (9-10/linhagem/sexo/tratamento), manipulados por cada um de dois experimentadores: familiar (F) e desconhecido (D). As barras representam os valores médios \pm erro padrão. Os efeitos significativos revelados pela ANOVA de três vias estão mostrados nas caixas.

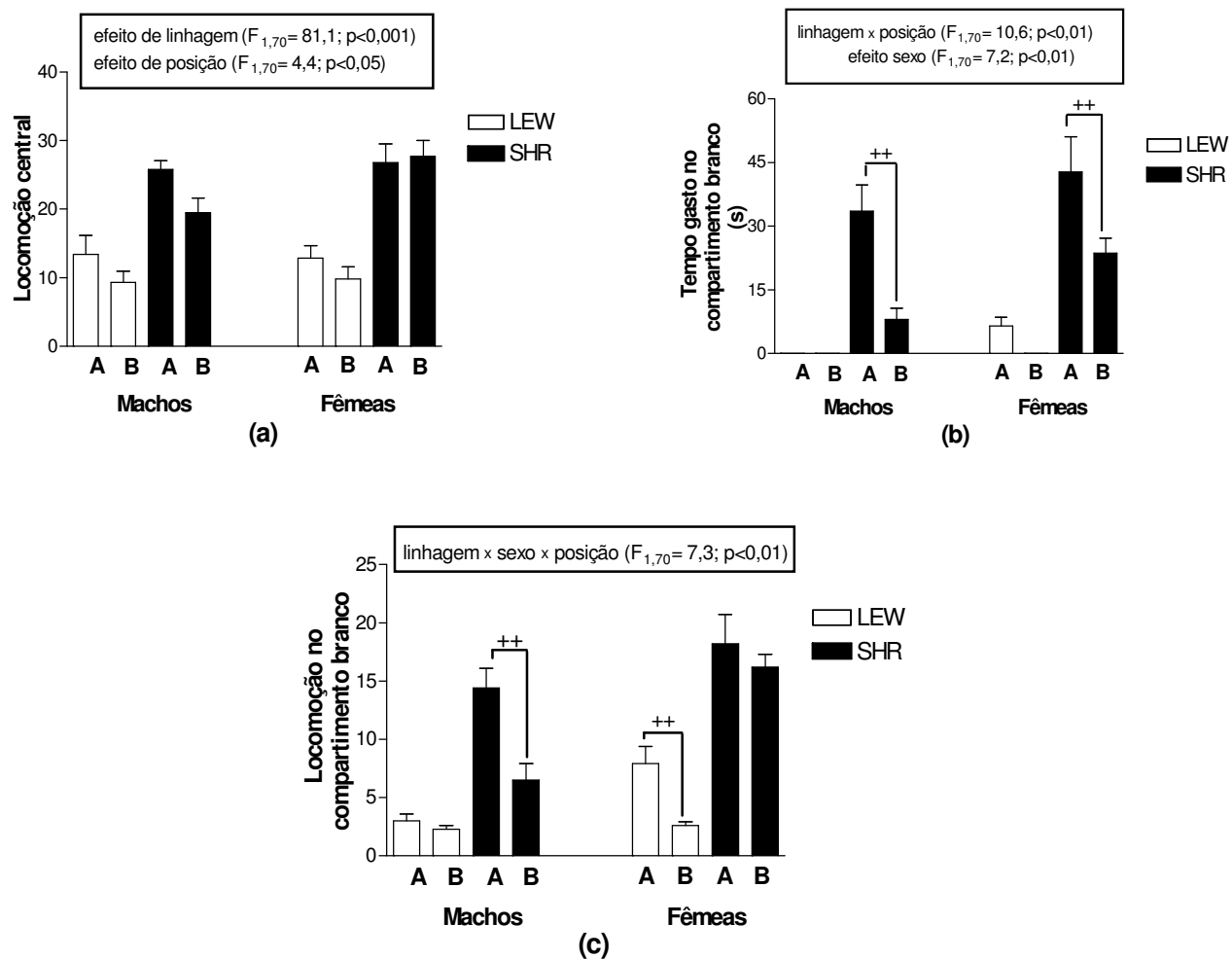


Figura 9- Locomoção central no campo aberto (a), tempo gasto (b) e locomoção no compartimento branco (c) da caixa branca/preta, para ratos LEW e SHR de ambos os sexos, (9-10/linhagem/sexo/tratamento), alojados em duas diferentes condições nas estantes do biotério: alto (A) e baixo (B). As barras representam os valores médios \pm erro padrão. Os efeitos significativos revelados pela ANOVA de três vias estão mostrados nas caixas. ++ representa diferenças entre os ratos alojados na parte alta e baixa dentro de cada linhagem e sexo (LSD; $p < 0,01$), quando interações significativas foram encontradas.

4.2.3 Estado comportamental antes do teste

Ocorreu um efeito geral de linhagem ($F=19.49$ e $p < 0.001$), mas também do estado comportamental em que o animal estava imediatamente antes do teste ($F=11.72$ e $p < 0.01$) sobre as entradas nos braços fechados no LCE, a principal medida de locomoção neste teste (Fig 10a). Os ratos LEW fizeram no geral mais entradas nos braços fechados do que os SHRs e os ratos em vigília foram no geral mais ativos do que os ratos em repouso. Ocorreu uma interação significativa entre o estado comportamental e a linhagem para duas das principais medidas relacionadas a comportamentos de ansiedade do LCE, denominadas tempo passado ($F=6.92$ e $p < 0.05$) e % de entradas ($F=6.03$ e $p < 0.05$) nos braços abertos. As análises *post hoc* revelaram que os ratos machos LEW e SHR diferiram entre si em ambas as variáveis comportamentais ($LEW < SHR$; $p < 0.05$) somente quando eles estavam em estado de vigília e não quando eles estavam em repouso imediatamente antes do teste (Fig 10b e 10c). Nas fêmeas, as diferenças entre linhagens no tempo passado nos braços abertos foram significantes ($p < 0.05$) em ambos os estados de repouso e vigília, enquanto que na % de entradas nos braços abertos, estas diferenças apareceram somente em animais no estado de vigília. A vigília mudou (aumentou) o tempo passado nos braços abertos somente nos ratos machos SHR, mas diminuiu a % de entradas nos braços abertos nas fêmeas LEW ($p < 0.05$).

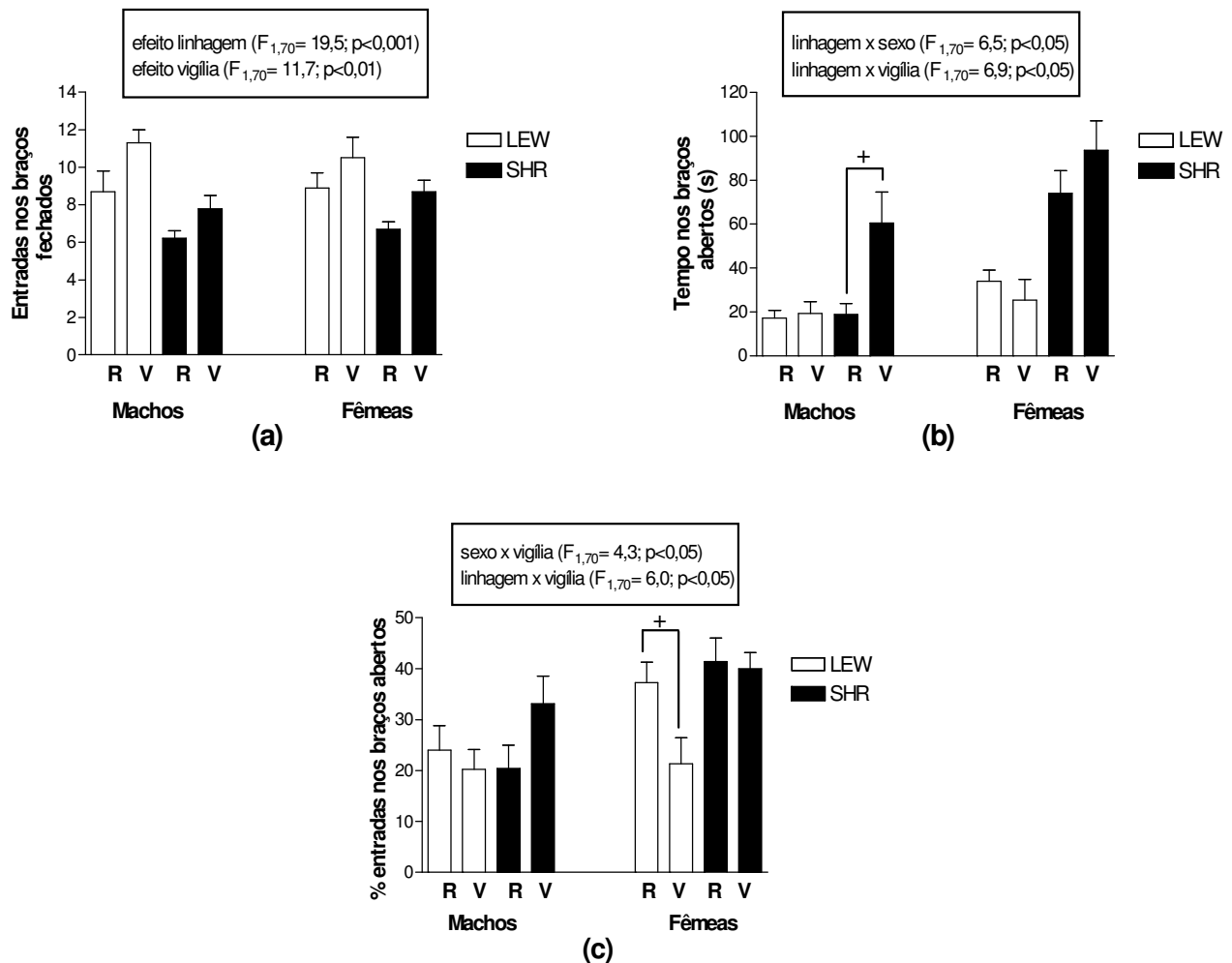
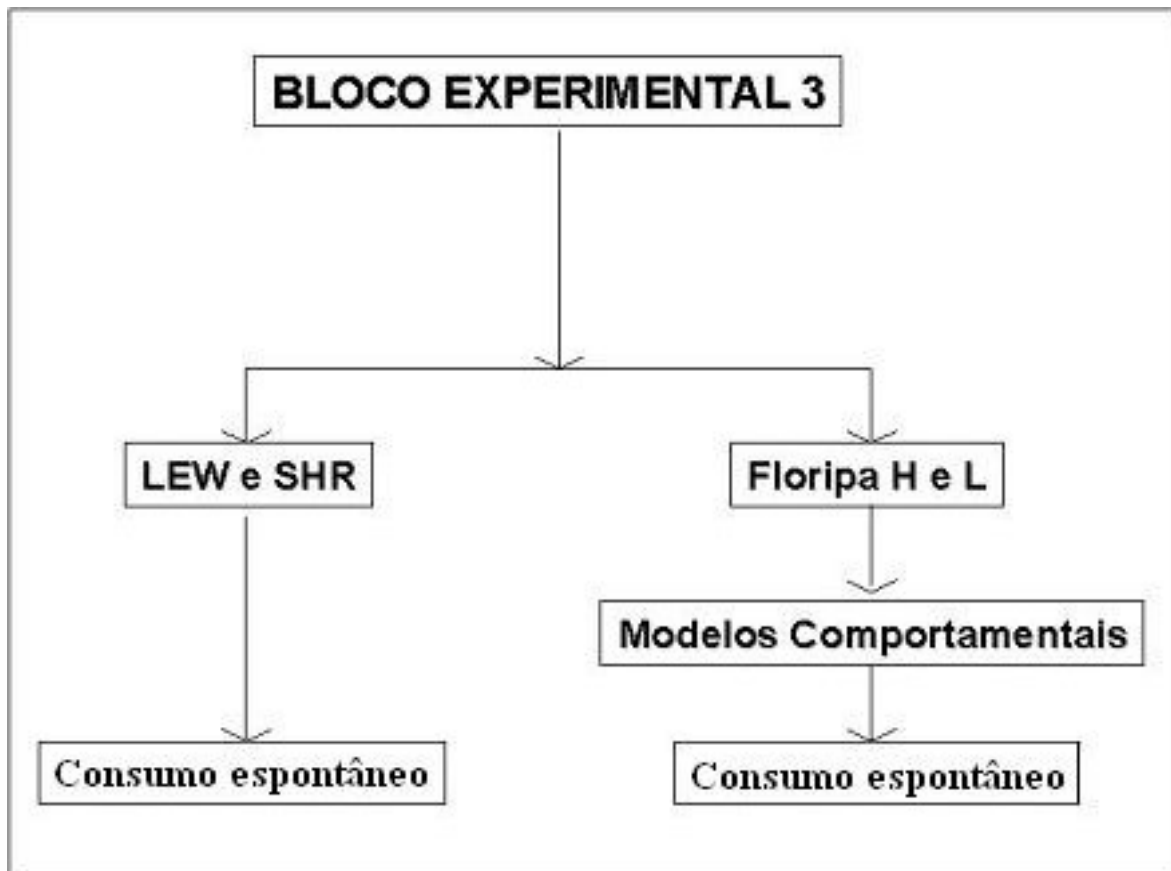


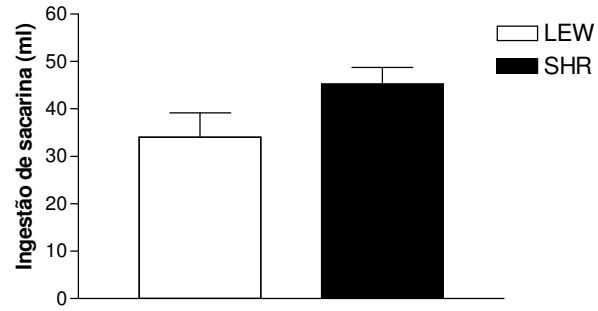
Figura 10- Número de entradas nos braços fechados (a), tempo gasto (b) e % de entradas (c) nos braços abertos do labirinto em cruz elevado, para ratos LEW e SHR de ambos os sexos, (9-10/linhagem/sexo/tratamento), divididos de acordo com seu estado comportamental antes do teste repouso (R) e vigília (V). As barras representam os valores médios \pm erro padrão. Os efeitos significativos revelados pela ANOVA de três vias estão mostrados nas caixas. + representa diferenças entre os ratos em repouso ou em vigília dentro de cada linhagem e sexo no teste *post hoc* LSD ($p < 0,05$), quando interações significativas foram encontradas.



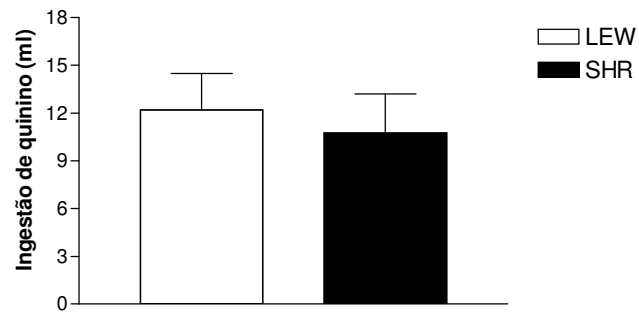
4.3 Bloco Experimental 3

4.3.1 Consumo espontâneo com LEW e SHR

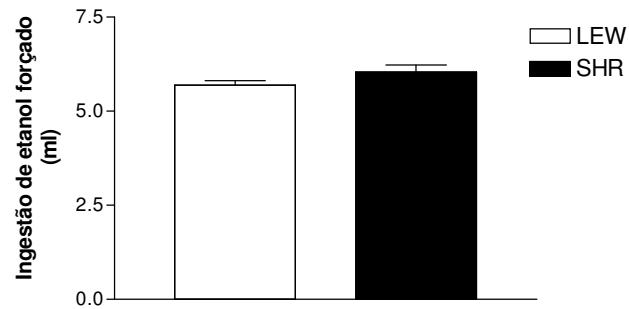
Nenhuma diferença entre ratos machos LEW e SHR foi observada no consumo de sacarina e quinino em livre escolha; de etanol forçado (10%) (Fig 11a-c), ou de etanol a 2% e 4% em livre escolha ($p > 0.05$) (Fig 12a). Porém, os ratos LEW ingeriram mais etanol do que os SHR, quando este foi oferecido em livre escolha nas concentrações de 6% ($p < 0,05$) e 10% ($p < 0,01$) (Fig 12a). Nenhuma diferença foi observada na preferência a sacarina, quinino (Fig 13a-b), ou livre escolha a 2% e 4% de etanol ($p > 0.05$) (Fig 12b). Além disso, os animais LEW e SHR diferiram na preferência ao etanol, quando este foi oferecido a concentrações de 6% ($p < 0,01$) e 10% ($p < 0,01$), com a diferença indo ao encontro dos dados de consumo absoluto (Fig 12b).



(a)



(b)



(c)

Figura 11- Ingestão de sacarina (7.5 mM) livre escolha (a) de quinino (2 μ M) livre escolha (b) e etanol forçado (10%) (c), para ratos LEW e SHR machos, (11/linhagem), no protocolo de consumo espontâneo de etanol. As barras representam os valores médios \pm erro padrão.

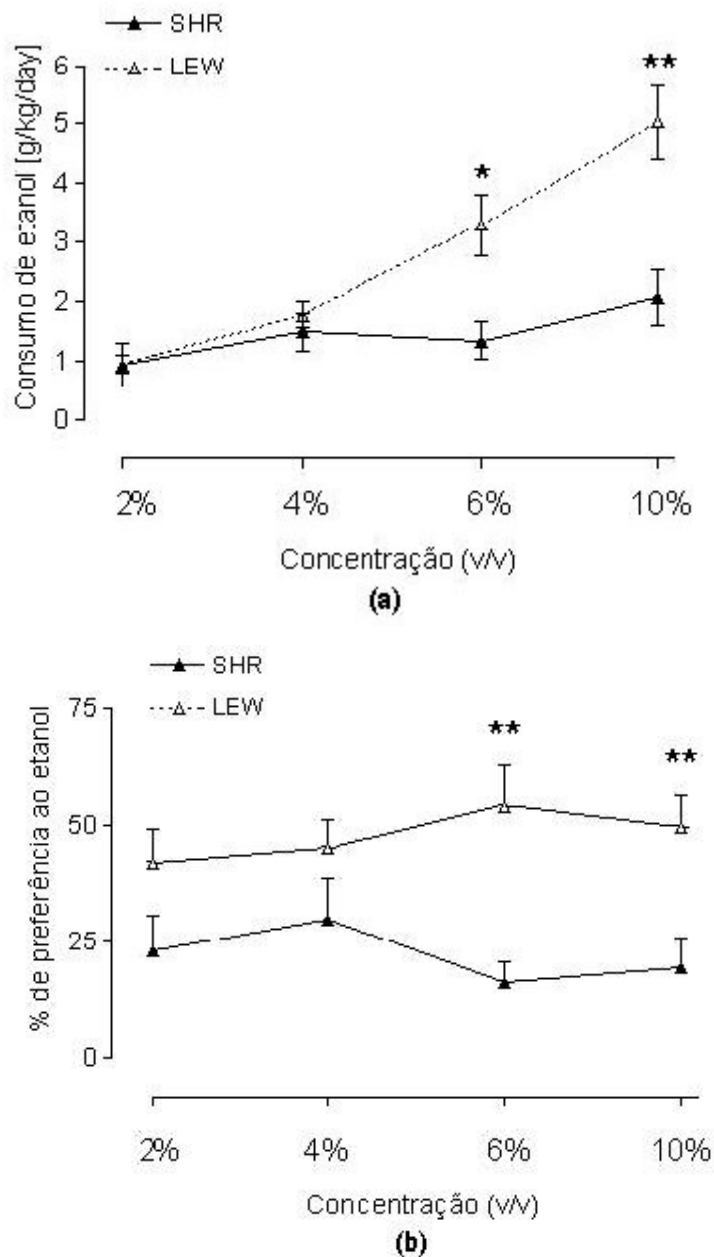
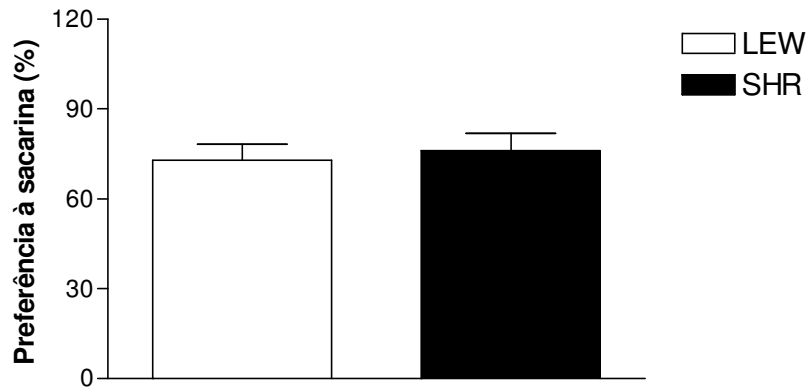
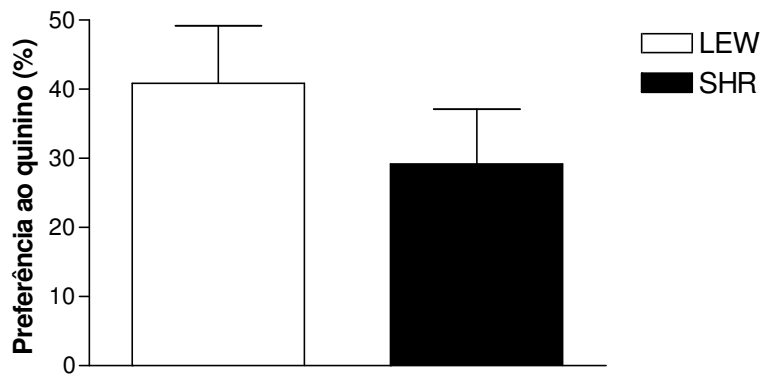


Figura 12- Consumo (g/kg/dia) (a) e preferência (%) (b) ao etanol em livre escolha nas concentrações de 2, 4, 6 e 10%, para ratos LEW e SHR machos, (11/linhagem), no protocolo de consumo espontâneo de etanol. Os valores estão representados como média \pm erro padrão. Diferenças significativas entre linhagens são representadas por ** (teste-t de Student, $p < 0,01$).



(a)



(b)

Figura 13- Preferência à sacarina (7.5 mM) (a) e ao quinino (2μM) (b) em livre escolha, para ratos LEW e SHR, (11/linhagem), no protocolo de consumo espontâneo de etanol. Os valores estão representados como média ± erro padrão.

4.3.2 Consumo espontâneo com Floripa H e L

Os 40 animais das linhagens Floripa H e L selecionados para o estudo de auto-administração de etanol, apresentaram diferenças em diversas medidas relacionadas à ansiedade. Ocorreu uma interação entre o fator linhagem e sexo na medida locomoção central no CA ($F=4.40$ e $p < 0.05$), com os ratos Floripa H de ambos os sexos locomovendo-se mais nesta área aversiva do que os ratos Floripa L, mas com fêmeas apresentando maiores escores do que machos apenas na linhagem Floripa H (Fig 14a). No teste do LCE ocorreu um efeito significativo do fator linhagem na medida tempo gasto nos braços abertos ($F=4.60$ e $p < 0.05$) com os ratos da linhagem Floripa H passando mais tempo neste ambiente aversivo do que os ratos Floripa L (Fig 14b). Na CBP, os ratos Floripa H locomoveram-se mais no compartimento branco do que os ratos Floripa L ($F=53.61$ e $p < 0.001$) (Fig 14c).

Os ratos Floripa H e L não diferiram no consumo de sacarina, quinino, ou álcool forçado (10%) ($p > 0.05$) (Fig 15a-c). Porém, os ratos Floripa L ingeriram mais etanol do que os Floripa H, quando este foi oferecido em livre escolha nas concentrações de 2% ($F=6.07$ e $p < 0,05$) e 10% ($F=4.12$ e $p < 0,05$) (Fig 16a). Além disso, ocorreram interações entre o fator linhagem e o fator sexo na livre escolha ao etanol nas concentrações de 4% ($F=9.19$ e $p < 0,01$) e 6% ($F=6.35$ e $p < 0,05$) (Fig 16a). Estas interações revelaram que a diferença entre linhagens aparece unicamente em fêmeas, com as ratas da linhagem Floripa “L” ingerindo mais etanol do que as da linhagem Floripa “H”. Ocorreu ainda um efeito geral do fator

sexo com as fêmeas ingerindo menos sacarina ($F=5.72$ e $p < 0.05$) e mais etanol na livre escolha (10%) ($F=17.21$ e $p < 0.01$) do que os machos.

Os ratos Floripa L apresentaram maior preferência ao etanol do que os da linhagem Floripa H quando este foi oferecido em livre escolha na concentração de 2% ($F=5.57$ e $p<0,05$) (Fig 16b). Ainda ocorreram interações entre os fatores linhagem e sexo na preferência a concentrações de 4% ($F=6.69$ e $p<0,05$) e 6% ($F=7.27$ e $p<0,05$), que revelaram que a diferença entre linhagens somente ocorreu nas fêmeas. Além disso, as fêmeas preferiram menos sacarina ($F=6.02$ e $p<0,05$) (Fig 17a) e mais etanol na concentração de 10%, independentemente da linhagem ($F=13.33$ e $p<0,01$) (Fig 16b) do que os machos e nenhuma diferença na preferência ao quinino foi observada (Fig 17b).

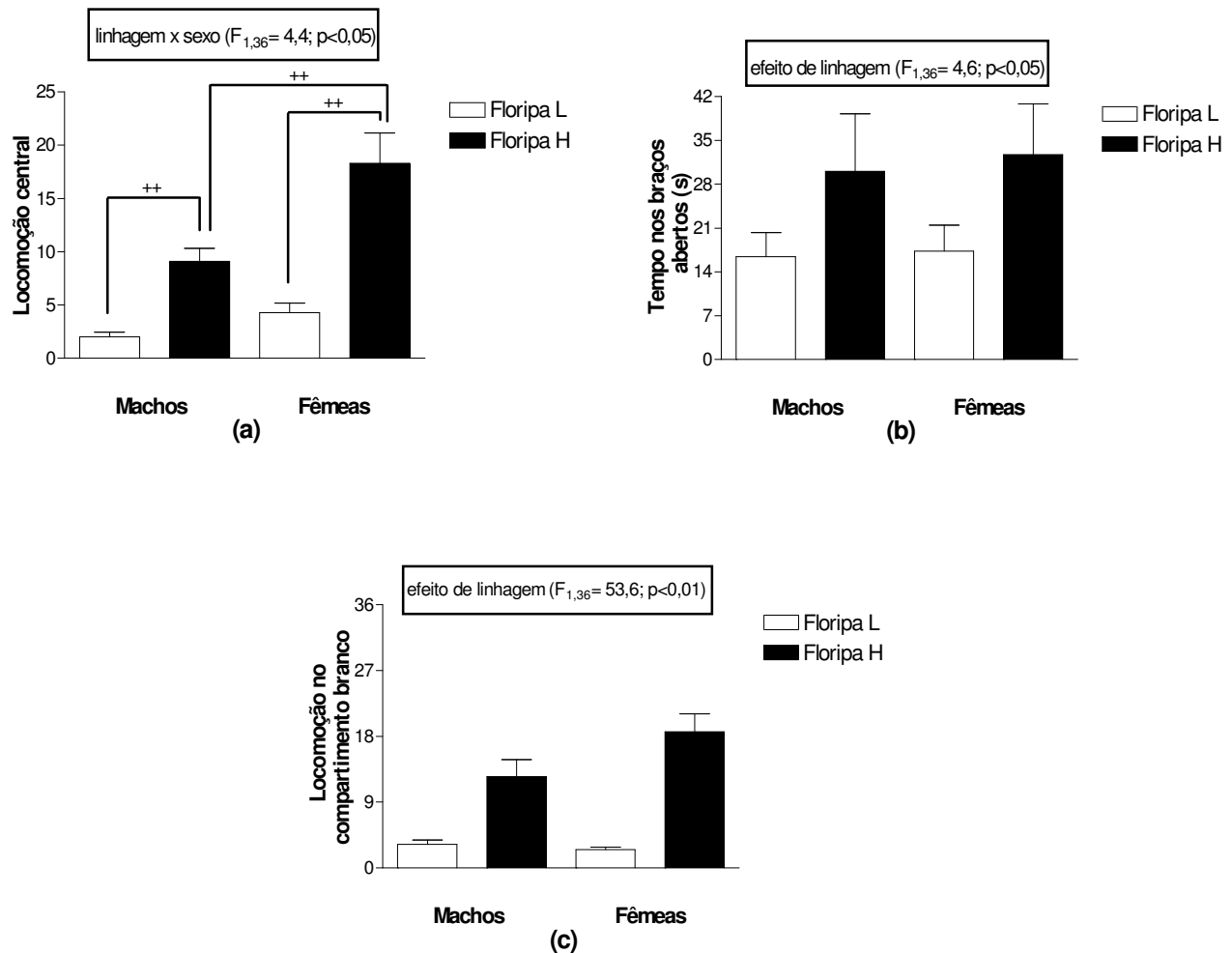


Figura 14- Locomoção central no campo aberto (a) tempo nos braços abertos no labirinto em cruz elevado (b) e locomoção no compartimento branco da caixa branca/preta (c), para ratos Floripa H e L, (10/linhagem/sexo). As barras representam os valores médios \pm erro padrão. Efeitos significativos revelados pela ANOVA de duas vias estão mostrados nas caixas. Diferenças entre os subgrupos no teste *post hoc* LSD são representados por ++ ($p < 0,01$).

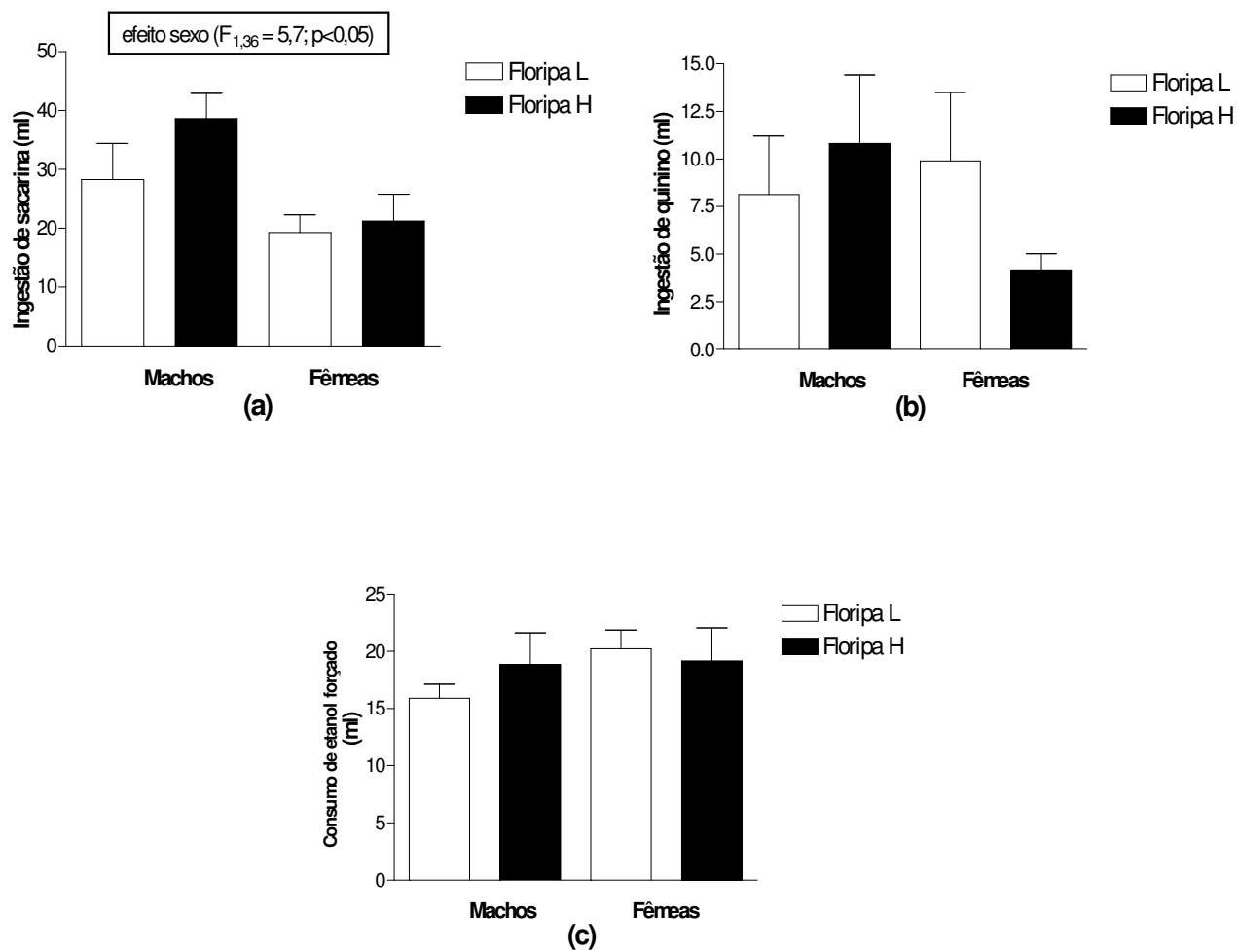


Figura 15- Ingestão de sacarina (7.5 mM) livre escolha (a) de quinino (2 μ M) livre escolha (b) e etanol forçado (10%) (c), para ratos Floripa H e L, (10/linhagem/sexo), no protocolo de consumo espontâneo de etanol. As barras representam os valores médios \pm erro padrão. Efeitos significativos revelados pela ANOVA de duas vias estão mostrados nas caixas.

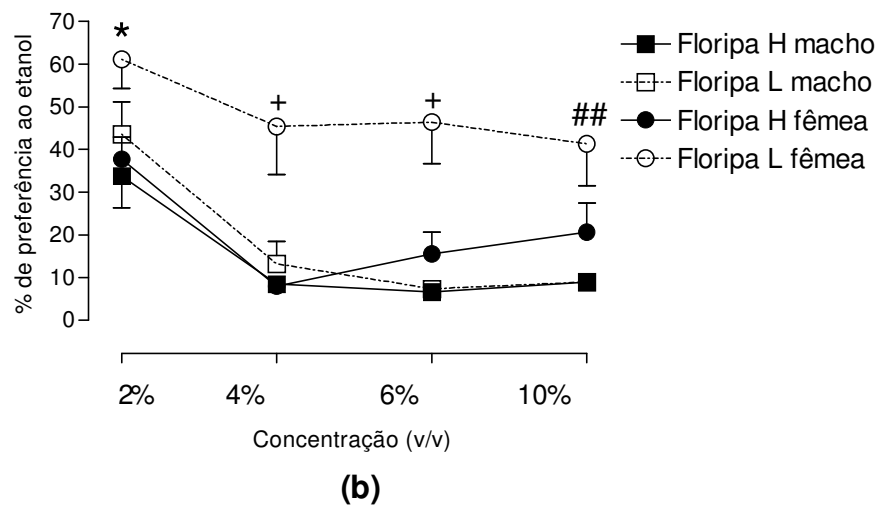
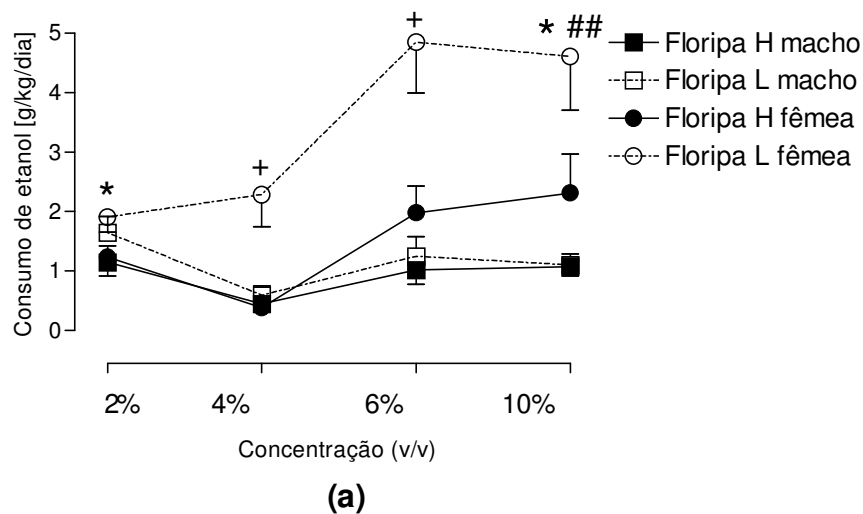


Figura 16- Consumo (g/kg/dia) (a) e % de preferência (b) ao etanol nas concentrações de 2, 4, 6 e 10%, para ratos Floripa H e L, (10/linhagem/sexo), no protocolo de consumo espontâneo de etanol. Os valores estão representados como média \pm erro padrão. Efeitos significativos das linhagens revelados pela ANOVA de duas vias são representados por * ($p < 0,05$) e dos sexos por ## ($p < 0,01$). Diferenças entre linhagens observadas somente em fêmeas são representadas por + (LSD; $p < 0,05$).

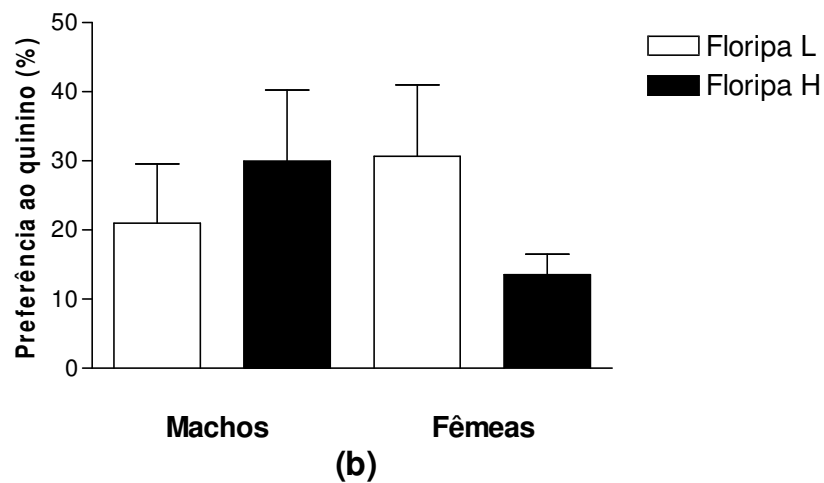
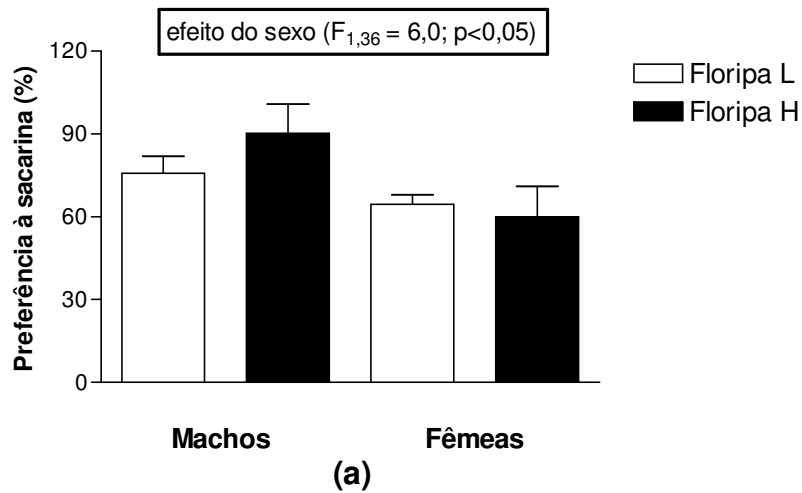
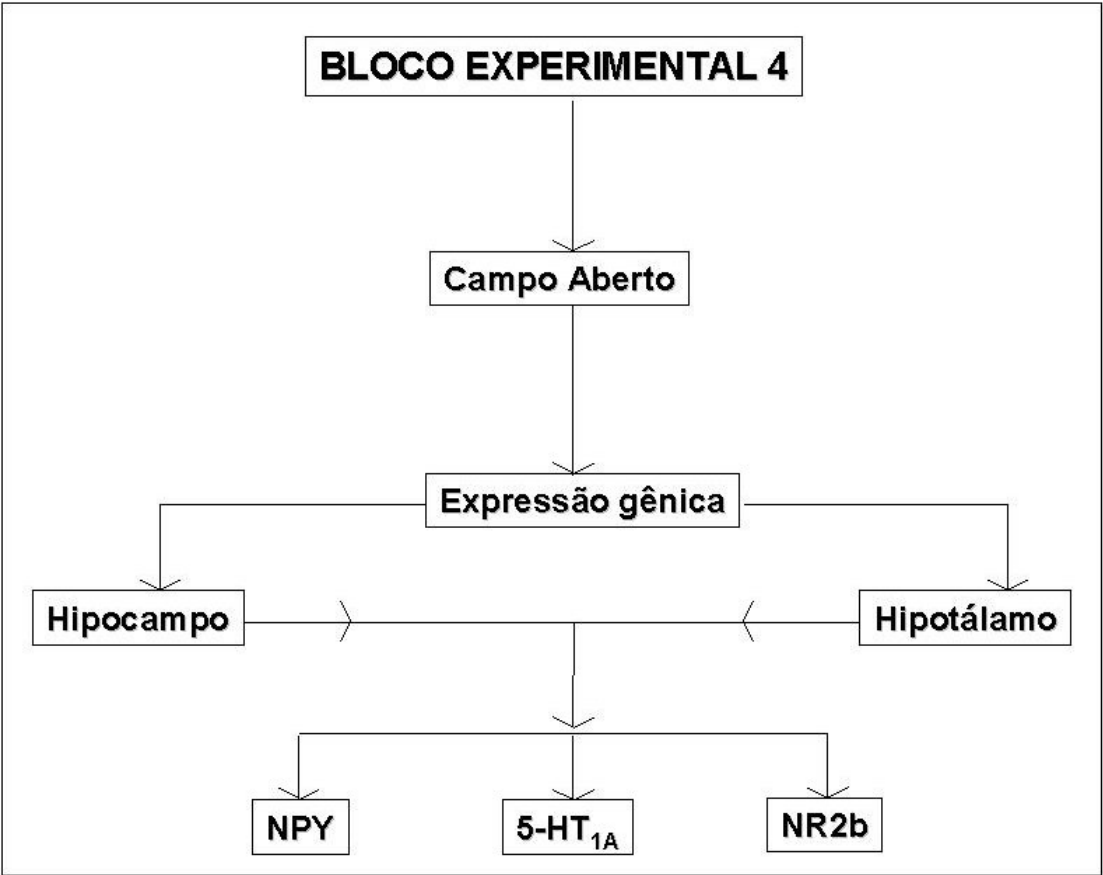


Figura 17- Preferência à sacarina (7.5 mM) livre escolha (a) e ao quinino (2 μ M) livre escolha (b), para ratos Floripa H e L, (10/linhagem/sexo), no protocolo de consumo espontâneo de etanol. Os valores estão representados como média \pm erro padrão. Efeito significativo do sexo revelado pela ANOVA de duas vias é mostrado na caixa.



4.4 Bloco Experimental 4

Neste bloco experimental, antes dos ratos LEW e SHR serem sacrificados, eles foram submetidos a um teste do CA como controle comportamental. Nele, os ratos SHR mostraram maior porcentagem de locomoção central ($p < 0.01$) (ou menor emocionalidade) (Fig 18a) e nenhuma diferença quanto à locomoção total ($p > 0.05$) quando comparados com os ratos LEW (Fig 18b).

Os testes de expressão gênica através da técnica do Real-time RT-PCR revelaram que, no hipocampo, os ratos LEW mostraram uma expressão do gene para o NPY aproximadamente 40% menor ($p < 0,01$) (Fig 19a), expressão do gene do receptor 5-HT1a aproximadamente 60% maior ($p < 0.05$) (Fig 19b) e expressão do gene NR2b semelhante ($p > 0.05$) (Fig 19c), quando comparados aos ratos SHR. Já no hipotálamo, nenhum dos três genes apresentou diferença estatística significativa entre as duas linhagens (Fig 20a-c).

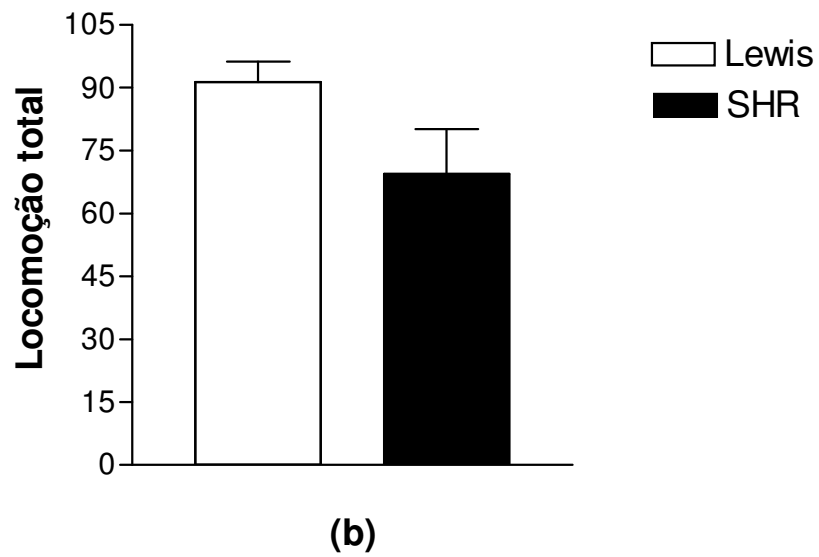
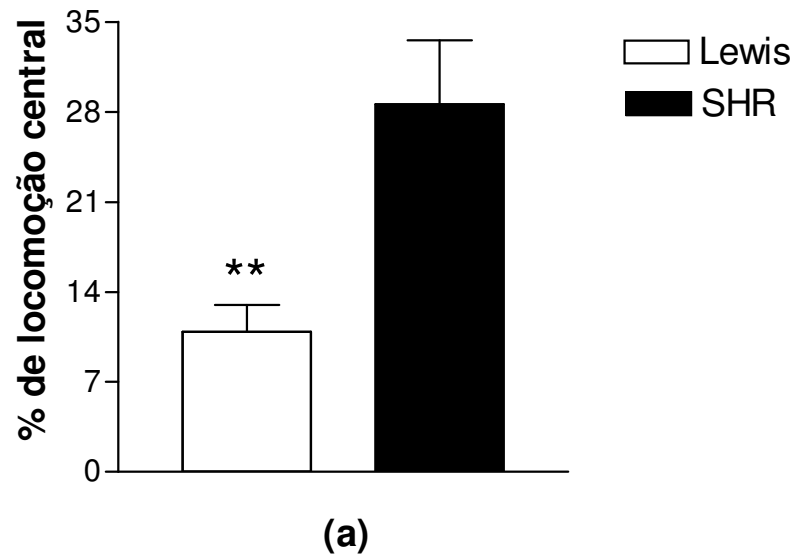


Figura 18- Porcentagem de locomoção central (a) e locomoção total (b) no campo aberto, para ratos machos LEW e SHR, (7-8/linhagem). As barras representam os valores médios \pm erro padrão. Diferenças significativas interlinhagens reveladas pelo teste-t de Student são representadas por ** ($p < 0,01$).

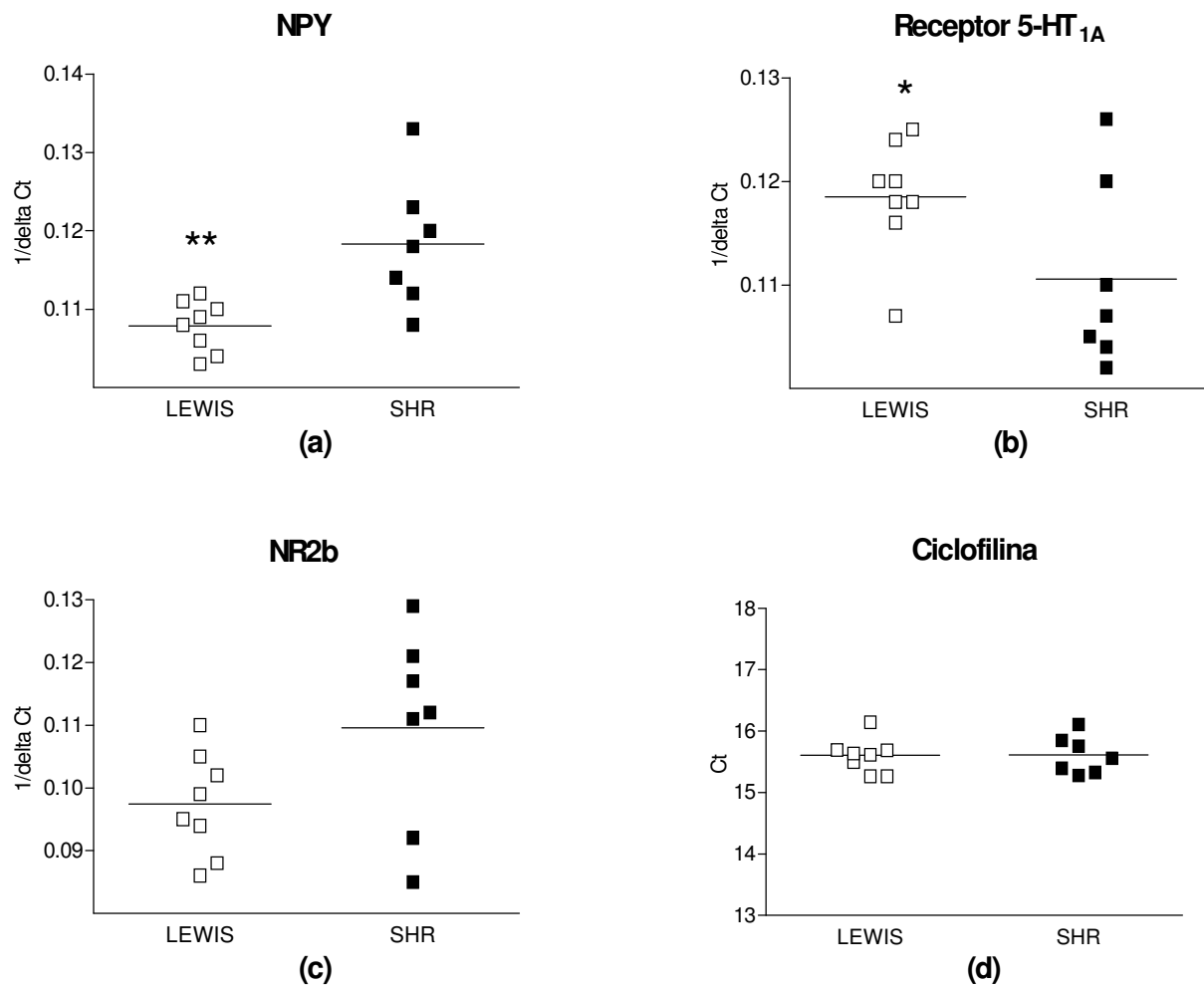


Figura 19- Expressão gênica através da técnica do Real-time RT-PCR do gene do NPY (a) receptor 5-HT_{1A} (b) subunidade NR2b do receptor NMDA (c) e ciclofilina como gene normalizador (d) de ratos machos LEW e SHR (7-8/linhagem), no hipocampo. Os quadrinhos demonstram o valor médio das três triplicatas de cada indivíduo. Nos três primeiros genes os valores estão representados em 1/ Δ Ct para melhor compreensão dos resultados. Diferenças significativas interlinhagens reveladas pelo teste-t de Student são representadas por * ou ** ($p < 0,05$ e $p < 0,01$; respectivamente).

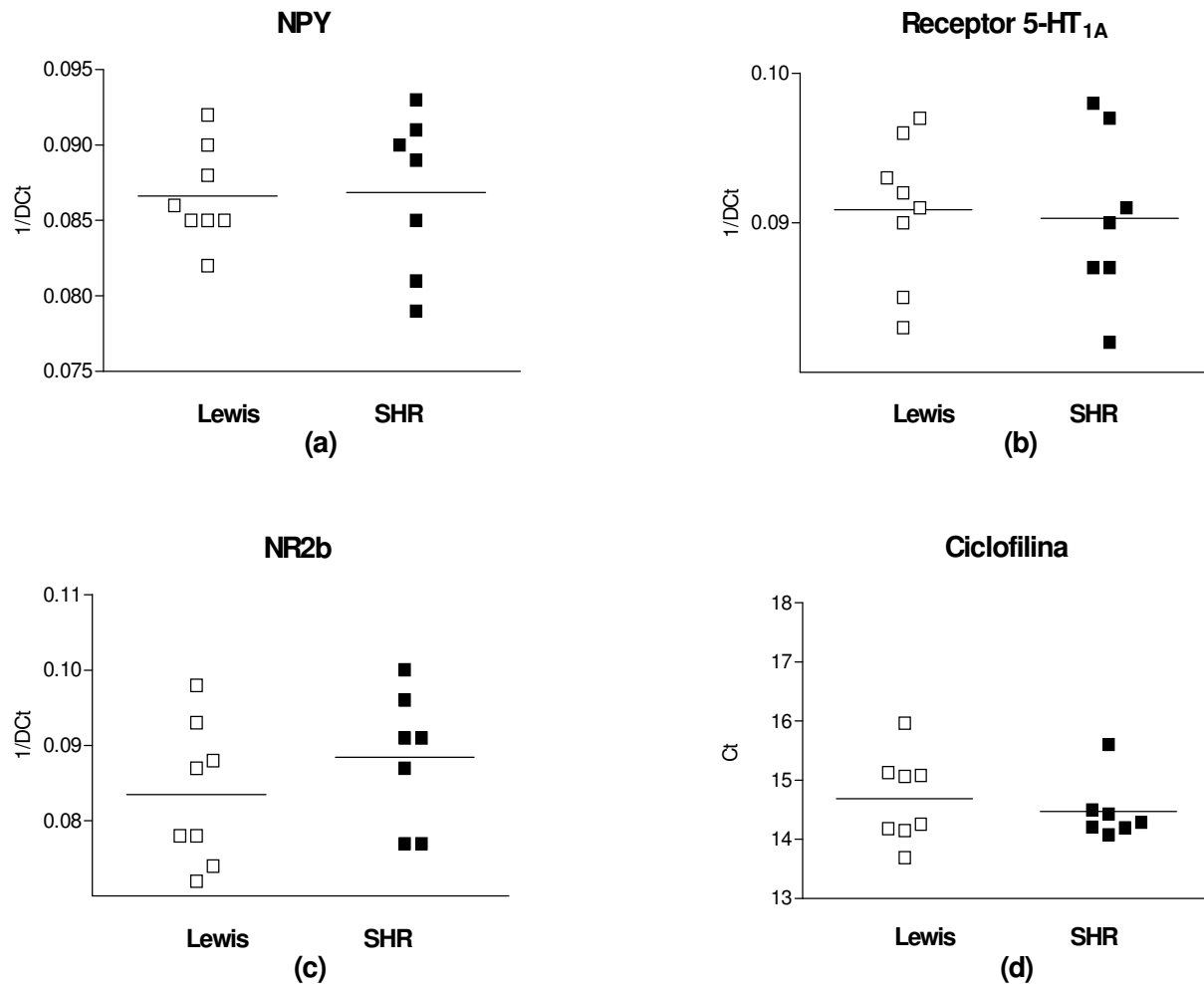


Figura 20- Expressão gênica através da técnica do Real-time RT-PCR do gene do NPY (a) receptor 5-HT_{1A} (b) subunidade NR2b do receptor NMDA (c) e ciclofilina como gene normalizador (d) de ratos machos LEW e SHR (7-8/linhagem), no hipotálamo. Os quadrinhos demonstram o valor médio das três triplicatas de cada indivíduo. Nos três primeiros genes os valores estão representados em 1/ΔCt para melhor compreensão dos resultados.

5-DISSCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Neste estudo nós objetivamos avaliar a influência de fatores ambientais e genéticos sobre medidas comportamentais relacionadas à ansiedade e a possível correlação entre elas e o consumo de álcool. Para isso, nós testamos linhagens de ratos usadas como modelos genéticos animais em: (a) três testes comportamentais de ansiedade com algumas variações no ambiente de laboratório ou na situação de teste (b) um protocolo de auto-administração de etanol e em (c) um teste de ansiedade seguido de análise da expressão de três genes candidatos em duas regiões do cérebro relacionadas com comportamentos de ansiedade e alcoolismo.

5.1 Variações ambientais

Vários estudos demonstram que os ritmos circadianos influenciam padrões fisiológicos e comportamentais em animais (Bertoglio e Carobrez, 2002; Gorka *et al.*, 1996; Morin, 1999). Portanto, no primeiro experimento deste trabalho, nós objetivamos comparar as linhagens de ratos LEW e SHR em um teste de ansiedade, a CBP, em duas fases diferentes do ritmo circadiano de sono/vigília (dia e noite). Os presentes resultados revelaram diferenças significativas entre as duas linhagens testadas, corroborando diferenças encontradas anteriormente entre elas (Ramos *et al.*, 1997; Ramos *et al.*, 1998; Ramos *et al.*, 2002). Por exemplo, o tempo gasto e a locomoção no compartimento branco da CBP, mostram claramente que ratos SHR locomovem-se mais e passam mais tempo neste compartimento do que ratos LEW. Isto sugere que ratos SHR são menos

“ansiosos” do que ratos LEW neste teste. Segundo Crawley (1981), o compartimento branco é muito aversivo aos roedores devido à forte iluminação e à novidade do ambiente.

Um ponto a ser levantado é a diferença observada entre as linhagens (LEW > SHR) para a locomoção no compartimento preto, pois esta é, às vezes, considerada como medida de locomoção geral. Poderia ser sugerido, baseado nisso, que a linhagem SHR é menos ativa do que a linhagem LEW, já que ratos SHR locomovem-se menos do que ratos LEW neste compartimento pouco aversivo. Porém, alguns autores sugerem que a locomoção no compartimento preto não é uma boa medida de atividade locomotora neste teste, pois ela é afetada por compostos ansiolíticos (Costall *et al.*, 1989; Smythe *et al.*, 1996; Chaouloff *et al.*, 1997; Ramos *et al.*, 1997), tendo assim algum componente emocional. Como exemplo, vemos que a administração do agente FG7142 (um ansiogênico) aumenta a locomoção no compartimento preto da CBP, o que está associado com a redução do tempo passado no compartimento branco (Costall *et al.*, 1989). Ainda neste teste, ocorreram diferenças significativas entre os sexos e estas podem ser consideradas normais, pois diversos estudos demonstram diferenças intersexuais em relação a medidas de emocionalidade em ratos ou camundongos (Gray, 1979; Johnston e File, 1991; Ramos *et al.*, 1997; 1998; 2002), normalmente com os machos locomovendo-se menos do que as fêmeas em ambientes estressantes ou aversivos.

Em um estudo genético com camundongos, envolvendo diversos testes comportamentais, foram encontrados dois QTLs, um no cromossomo 11 e outro no 14, que influenciam especificamente comportamentos no teste da CBP (Turri *et*

al., 2001). Isto sugere que este teste deve conter particularidades que não aparecem nos outros testes avaliados naquele mesmo estudo, podendo ser levantada a hipótese de que a luz, que é muito forte e aversiva neste teste, seja responsável por parte destas diferenças. Por exemplo, Ramos *et al.* (1997), mostraram que ratos Brown Norway exibiram o mais baixo grau de aversão ao compartimento branco da CBP quando comparados com cinco outras linhagens. Curiosamente, estes ratos eram os únicos naquele estudo com olhos, pele e pêlo pigmentados. Entretanto, neste mesmo estudo, Ramos *et al.* (1997) demonstraram que a locomoção no compartimento branco da CBP ficou no mesmo fator de uma análise de componentes principais que medidas de ansiedade de outros testes comportamentais (CA e LCE), sugerindo que o significado desta medida pode compartilhar algum componente psicológico com as medidas relacionadas a ansiedade de outros testes.

Exceto por uma interação entre linhagem e fase circadiana para o número de transições em fêmeas, não ocorreram diferenças entre as fases clara e escura na CBP. Este resultado é surpreendente, se considerarmos, por exemplo, que os níveis extracelulares de serotonina (que é relacionada a comportamentos de ansiedade) e a atividade do eixo HPA (que controla a resposta central ao estresse) mostram ambos uma ritmicidade circadiana (Korte, 2001; Steckler, 2001). Os presentes resultados também não concordam com os de Costall *et al.* (1989), que demonstraram um decréscimo na aversão ao compartimento branco da CBP em camundongos que foram testados durante a fase diurna. Tal inconsistência poderia se dever a diferenças interespecíficas entre ratos e camundongos ou, ainda, ao fato de que nossos experimentos foram realizados

somente em dois diferentes pontos do ciclo circadiano de 24 h (um na fase clara e um na fase escura). Talvez em outros pontos da fase escura, uma diferença em relação à fase clara pudesse ser evidenciada. Então, nós demonstramos que: a) as linhagens continuam apresentando diferenças entre si em um teste dependente da luminosidade, na fase escura do ritmo circadiano de sono/vigília e (b) o perfil comportamental apresentado por ambas as linhagens à noite não difere daquele apresentado durante a fase diurna do ritmo circadiano, o que reforça estas linhagens como um modelo genético robusto para o estudo da ansiedade.

Em um segundo experimento, nós submetemos as linhagens LEW e SHR a duas exposições subseqüentes no LCE, duas condições que se sugere corresponder a estados de “ansiedade generalizada” e de “fobia adquirida”, respectivamente (File e Zangrossi, 1993, Hogg e File, 1994). Dois argumentos principais têm sido usados para sustentar tal hipótese: (a) as benzodiazepinas, que são efetivas em humanos contra a ansiedade generalizada, mas não tanto contra as fobias, apresentam efeitos ansiolíticos na primeira, mas não na segunda exposição ao LCE; e (b) quando a primeira exposição é mais longa do que o usual (10 min ao invés de 5 min), o fenômeno da “tolerância a uma exposição” desaparece, fornecendo assim uma analogia com os “estados fóbicos”, que diminuem de intensidade com a exposição repetida à situação geradora de fobia (File *et al.*, 1993). Outros autores, no entanto, reconhecem que existe uma mudança qualitativa no tipo de emocionalidade avaliada durante a primeira e a segunda exposição ao LCE, mas consideram que o significado psicológico desta mudança permanece incerto (Holmes e Rodgers, 1998). Os nossos resultados reforçam esta interpretação cautelosa, pois a diferença encontrada entre as duas

linhagens também no reteste sugere que a primeira e a segunda exposição neste aparato podem compartilhar componentes psicológicos comuns.

Nas duas exposições sucessivas, diferenças gerais entre as linhagens foram observadas para os dois principais índices de “ansiedade” do LCE, o tempo gasto e a porcentagem de entradas nos braços abertos (Pellow *et al.*, 1985). Enquanto que nas fêmeas ambos estes efeitos foram significativos, nos machos as diferenças de linhagem alcançaram diferença estatística apenas no tempo gasto nos braços abertos. Por outro lado, os animais de ambas as linhagens e sexos mostraram um significativo decréscimo no tempo passado e na porcentagem de entradas nos braços abertos, quando retestados 24 após sua primeira exposição, o que está de acordo com estudos prévios encontrados na literatura (Rodgers *et al.*, 1992; File *et al.*, 1998; Holmes e Rodgers, 1998; File *et al.*, 1999; Bertoglio e Carobrez 2000; 2002c).

Sabe-se que a primeira experiência no LCE apresenta uma forte influência nos padrões comportamentais de exposições subseqüentes (Rodgers *et al.*, 1996). Treit e *col.* (1992), relataram que ratos submetidos a 18 sessões no LCE em 18 dias consecutivos não se habituaram aos braços abertos, continuando a apresentar fuga desta região. Bertoglio e Carobrez (2000) relataram que é necessário que os ratos conheçam tanto os braços abertos como os braços fechados do aparato, para que eles adquiram medo dos braços abertos. Isto sugere que o processo de aprendizado pode estar ligado com a habilidade cognitiva para decidir entre diferentes níveis de situações aversivas.

Não se sabe ao certo qual estímulo específico no primeiro teste é responsável por induzir uma grande esquivas dos braços abertos na segunda

exposição, mas existem evidências experimentais sugerindo que o fato dos braços abertos serem um ambiente aberto e que não permite a tigmotaxia por parte dos animais possa contribuir mais para essa esquia do que propriamente a altura ou a novidade dos braços (Pellow *et al.*, 1985; Treit *et al.*, 1993; Aguilar *et al.*, 2002).

No presente estudo, um aumento significativo nas duas medidas de atividade locomotora do LCE, entradas totais e entradas nos braços fechados, (Ramos e Mormède, 1998), foi detectado nas fêmeas no reteste (com uma diferença não-significativa sendo observada na mesma direção em machos), assim sugerindo que os níveis de locomoção aumentam durante a segunda exposição, possivelmente devido à maior familiaridade com o aparato de teste, como já visto em outros estudos (Osenkopp *et al.*, 1994). Curiosamente, tais mudanças foram acompanhadas por um aparente aumento na ansiedade (menor aproximação aos braços abertos), mostrando assim que uma maior ansiedade/emocionalidade pode não resultar em menor atividade locomotora geral neste teste.

Nenhuma interação entre linhagem e exposição prévia foi observada no tempo passado nos braços abertos e na % de entrada nos braços abertos, indicando que as diferenças emocionais entre os ratos LEW e SHR no LCE persistem após uma primeira exposição ao aparato. As diferenças entre linhagens observadas na primeira exposição do presente estudo estão de acordo com nossos estudos prévios (Ramos *et al.*, 1997, 1998, 2002), que sugerem que os ratos LEW de ambos os sexos são mais “ansiosos” do que os ratos SHR. Contudo, estas duas linhagens nunca tinham sido comparadas em um reteste no LCE. A hipótese de que estas duas linhagens diferem tanto em modelos de

“ansiedade generalizada”, como de “fobia”, o que poderia explicar porquê elas diferem tanto na primeira como na segunda exposição ao LCE, não é apoiada por outros estudos do nosso laboratório, os quais não revelaram diferenças significativas entre os ratos LEW e SHR no teste do odor de gato (dados não publicados), outro modelo sugerido para o estudo de “fobia”.

Estudos farmacológicos prévios indicam que ambas as linhagens LEW e SHR respondem aos efeitos ansiolíticos das benzodiazepinas quando submetidos ao LCE pela primeira vez, mas os ratos LEW parecem requerer maiores doses de diazepam para que o seu perfil ansiogênico seja atenuado (Ramos *et al.*, 1997; Takahashi *et al.*, 2001). Estudos adicionais são necessários para investigar as respostas destas linhagens às benzodiazepinas durante a segunda exposição ao LCE. Entretanto, se as diferenças comportamentais/emocionais entre os ratos LEW e SHR não tratados fossem de natureza semelhante àquelas tipicamente observadas entre roedores controles e roedores tratados com benzodiazepinas, nós poderíamos esperar que as diferenças observadas entre as linhagens na primeira exposição diminuiriam ou desapareceriam no reteste. No entanto, a falta de interação entre linhagem e exposição, observada no presente estudo, não corrobora tal hipótese. Os ratos e camundongos tratados com benzodiazepinas geralmente diferem dos controles na primeira exposição, mas não na segunda, enquanto que as linhagens LEW e SHR mostraram-se diferentes uma da outra em ambas as situações de teste. Portanto, os presentes resultados sugerem que mecanismos que atuam por outras vias que não as do sistema GABA/benzodiazepina devem ser responsáveis, ao menos em parte, pelas diferenças emocionais basais observadas entre as linhagens LEW e SHR. Além

disso, através de uma abordagem genética, estes resultados fornecem uma ligação entre a primeira e a segunda exposição no LCE, sugerindo que as respostas emocionais destas duas condições de teste podem compartilhar componentes psicológicos comuns.

No segundo bloco de experimentos, os presentes resultados mostraram que alguns fatores ambientais comuns que normalmente variam dentro e entre laboratórios, podem alterar não somente os níveis basais dos comportamentos relacionados com a ansiedade, mas também diferenças genótípicas entre linhagens de roedores. A localização das gaiolas dos animais dentro do biotério, desde o desmame até o dia do teste, influenciou o comportamento dos animais no CA independentemente da linhagem ou do sexo. Na CBP, por outro lado, esta mesma variável ambiental interferiu com comportamentos relacionados à ansiedade/medo de uma maneira dependente do genótipo, a tal ponto que algumas diferenças entre linhagens apareceram somente quando os ratos estavam alojados na parte alta das estantes. Além disso, o estado comportamental do animal, observado imediatamente antes do teste, influenciou os resultados do teste do LCE, por exemplo, com diferenças relacionadas à ansiedade aparecendo entre as linhagens somente nos ratos que estavam em vigília antes do teste. A familiaridade dos animais com o experimentador, entretanto, não modificou o comportamento de nenhuma das duas linhagens no teste do CA.

Estudos prévios tinham mostrado que os ratos LEW de ambos os sexos, quando comparados com os ratos SHR, evitam mais os estímulos aversivos de diferentes testes, como a área central do CA, os braços abertos do LCE e o

compartimento branco da CBP (Ramos *et al.*, 1997; Berton *et al.*, 1998; Ramos *et al.*, 1998, 2002). A análise de um intercruzamento entre os ratos LEW e SHR mostrou que alguns dos contrastes comportamentais entre estas linhagens eram bastante herdáveis (> 50%) (Ramos *et al.*, 1998). Além disso, como mostramos anteriormente, as diferenças entre as linhagens resistiram a variações na situação de teste tais como: o horário do teste na CBP e a experiência prévia no LCE. Em um outro estudo, o nível de iluminação no CA também não modificou a diferença entre estas mesmas linhagens (Ramos *et al.*, 2002). Entretanto, apesar da aparente solidez deste modelo genético animal, alguma variabilidade entre diferentes estudos têm sido observada. Por exemplo, diferenças entre as linhagens na % de entradas nos braços abertos, um dos principais índices de ansiedade do LCE, foram algumas vezes, mas não sempre, significativas em machos ou fêmeas, dependendo do estudo (Ramos *et al.*, 1997; 1998; 2002; Vendruscolo *et al.*, 2003). Curiosamente, esta variável específica apresentou uma baixa herdabilidade (10%) em outro estudo com as linhagens LEW e SHR (Ramos *et al.*, 1998). Nós sugerimos, portanto, que alguns fatores ambientais podem não somente alterar os escores basais dos ratos LEW e SHR, mas também interagir com o genótipo, interferindo assim, na replicabilidade das comparações entre estas duas linhagens.

O fato dos animais serem manipulados por um experimentador não familiar antes do teste do CA não foi suficiente para causar mudança no perfil comportamental das duas linhagens, ou pelo menos estas mudanças não foram detectadas imediatamente após o contato do animal com o experimentador. Contrariamente, Crabbe *et al.* (1999) sugeriram que o experimentador foi uma das

causas dos resultados comportamentais idiossincráticos quando três linhagens de camundongos foram simultaneamente comparadas em três diferentes laboratórios. Além disso, Chesler *et al.* (2002) também sugeriram o experimentador como uma importante causa da variabilidade entre diferentes estudos de nocicepção. No presente estudo, diferentemente destes trabalhos prévios, todos os esforços foram feitos para padronizar os procedimentos, movimentos e roupas dos dois experimentadores, já que nosso objetivo foi analisar o efeito da familiaridade animal/experimentador. Talvez, se esta extensa padronização não tivesse sido realizada, o fator experimentador poderia ter apresentado um efeito significativo. A falta de tal efeito no presente estudo sugere que o controle de todos os procedimentos de pré-teste e de algumas características e hábitos do experimentador pode ajudar a minimizar ou mesmo abolir a variabilidade de resultados, quando diferentes experimentadores tiverem que realizar os mesmos testes dentro de um mesmo laboratório.

Sabemos que os roedores tendem a evitar espaços abertos onde eles não podem realizar tigmotaxia e que, portanto, eles concentram sua locomoção nas áreas periféricas. Esta esquiva pode ser revertida através do uso de drogas ansiolíticas (Ramos e Mormède, 1998; Vendruscolo *et al.*, 2003) e, por isso, sugere-se que este comportamento seja relacionado à ansiedade. A locomoção central no CA apresenta alta herdabilidade (Ramos *et al.*, 1998) e é a responsável por dois QTLs nos cromossomos 4 e 7 do rato (Ramos *et al.*, 1999). A posição das gaiolas na estante (alta ou baixa) dentro do biotério influenciou os resultados de dois testes comportamentais, o CA e a CBP. No CA, os ratos alojados na parte alta das estantes, desde o desmame até o dia do teste, apresentaram maior

locomoção central do que aqueles alojados na parte baixa, independentemente das linhagens ou sexos. Isto sugere que os ratos alojados no alto das estantes são menos “ansiosos/medrosos” neste teste em particular, que foi realizado sob iluminação fraca. Na CBP, que tem a alta luminosidade como seu principal componente aversivo, uma influência similar da posição das gaiolas foi observada. Entretanto, este efeito foi linhagem e sexo específico. Interessantemente, as diferenças entre linhagens no tempo gasto no compartimento branco, uma medida altamente contrastante para os ratos alojados no alto das estantes, não foram significativas para os machos alojados nas partes baixas das estantes. Quando a medida locomoção no compartimento branco foi considerada, o efeito também foi linhagem e sexo específico. Então, qualquer estudo que não controle tal variável ambiental e que tenha um viés no alojamento das gaiolas (por exemplo, todos os ratos alojados na parte baixa) poderia mascarar importantes diferenças genotípicas que seriam reveladas se não houvesse a interferência desta variável.

No geral, os presentes resultados sugerem que o fato dos animais serem alojados por diversas semanas em gaiolas nas partes altas ou baixas provoca mudanças na reatividade emocional dos animais, o que está de acordo com um estudo prévio sobre as respostas comportamentais à d-anfetamina (Exner e Clark, 1993). O controle deste fator ambiental também foi alvo de debate em um estudo não comportamental sobre a carcinogenicidade (Herzberg e Lagakos, 1992), mas ao nosso conhecimento, o presente estudo é o primeiro a demonstrar que a posição das gaiolas pode interagir e até mesmo mascarar efeitos genéticos nas comparações comportamentais de linhagens. Não é possível determinar qual/quais o/os fator/es responsável/is por tal fenômeno, mas nós podemos

sugerir que a luminosidade tem um papel importante, já que ela variou entre 240 (gaiolas altas) e 12 (gaiolas baixas) lux, enquanto que nenhuma diferença de temperatura pode ser detectada. Entretanto, outros fatores não controlados aqui podem ter variado entre as duas situações de alojamento, como exemplo, o odor, a qualidade do ar e os estímulos visuais (não somente os luminosos).

O LCE, por sua vez, é um modelo de ansiedade que algumas vezes pode produzir resultados não replicáveis (Hogg, 1996). Como mencionamos acima, esta variabilidade tem sido observada mesmo entre estudos usando os ratos isogênicos LEW e SHR (Ramos *et al.*, 1997; 1998; 2002; Vendruscolo *et al.*, 2003). Os presentes resultados sugerem que o estado de vigília do animal anteriormente ao teste do LCE pode contribuir para aumentar a variabilidade entre e dentro de diferentes estudos que utilizam este modelo. Em dois dos mais importantes índices de ansiedade (tempo passado e % de entradas nos braços abertos), os ratos LEW e SHR machos foram significativamente diferentes somente quando testados após estarem em estado de vigília (ao invés de repouso) nas suas gaiolas durante os 5 min prévios ao teste. A principal medida de atividade locomotora deste teste, o número de entradas nos braços fechados, também foi influenciada pela vigília. Nossa observação de que as diferenças genéticas na ansiedade experimental foram somente observadas nos ratos em estado de vigília, é compatível com a proposição de Heller de que a ansiedade humana, diferentemente da depressão, é expressa em uma situação de alta vigília ou ativação (Schmidtke e Heller, 2004). Esta variável torna-se importante nos estudos utilizando o LCE, pois o estado comportamental antes do teste não varia necessariamente de modo aleatório, mas sim em função de alguns fatores que

atuam na sala onde os animais estão alojados previamente ao teste e que dependem, por exemplo, do protocolo de teste (modo de abertura das gaiolas, retirada do animal e o transporte para o teste) e do número de ratos por gaiola. Se o estado de um animal for afetado pela ordem na qual ele é testado dentro da sua gaiola, por exemplo, então nós poderíamos esperar que a ordem de teste do animal influenciaria o seu desempenho. Esta influência não foi observada em estudos de nocicepção (Chesler *et al.*, 2002). Entretanto, no presente estudo (dados não mostrados), ela atuou nas medidas do CA e da CBP. No geral, o primeiro rato a ser testado em uma dada gaiola foi mais “ansioso” e menos ativo do que os ratos testados na sua seqüência. Então, os presentes resultados não são importantes somente na comparação de linhagens, mas também em estudos farmacológicos, já que o LCE é um teste mundialmente utilizado na busca por agentes ansiolíticos (Rodgers e Cole, 1994; Dawson e Tricklebank, 1995) e que este fator de pré-teste normalmente não é controlado.

Na totalidade, os resultados deste segundo bloco experimental sugerem que os fatores ambientais que atuam anteriormente ao teste (no ambiente de laboratório), podem ser de fato mais relevantes para as interações genótipo x ambiente do que as mudanças na situação de teste, no modelo LEW/SHR. A importância destes fatores é evidenciada quando observamos que os ratos SHR, normalmente menos “ansiosos” do que os ratos LEW, não apresentaram diferença em relação a estes, quando alojados em gaiolas baixas ou quando testados logo após um período de repouso.

5.2 A relação entre “ansiedade” e “alcoolismo”

A associação entre preferência por sacarina e consumo de etanol tem sido demonstrada tanto em humanos quanto em animais de laboratório (Kampov-Polevoy *et al.*, 1997) e até mesmo uma ligação genética entre elas já foi sugerida (Terenina-Rigaldie *et al.*, 2003). Podemos observar que ratos ou camundongos selecionados para alta preferência ao álcool tendem a escolher soluções adocicadas concentradas e a beber mais delas, quando comparados com animais selecionados para baixa preferência ao álcool (Belknap *et al.*, 1993; Bachmanov *et al.*, 1996; Grahame *et al.*, 1999). Além disso, vemos que alguns modelos animais selecionados para o consumo de etanol demonstram preferência por soluções de quinino, uma substância amarga, o que poderia ser um indicativo de que o animal não está consumindo etanol apenas pelos seus efeitos farmacológicos, mais sim pelo seu cheiro ou gosto. Por estas razões, em nosso estudo de auto-administração, no terceiro bloco de experimentos, foi empregado um controle de dois dias para cada uma das soluções doce e amarga (sacarina e quinino, respectivamente). Nós observamos que os animais não apresentaram diferença no consumo destas substâncias, o que reforça a hipótese de que as diferenças encontradas no consumo de etanol, sejam realmente devidas aos efeitos farmacológicos desta substância.

Os ratos LEW machos pareceram mais “ansiosos” em todos os testes do presente estudo, corroborando nossos resultados anteriores (Ramos *et al.*, 1997; 1998; 2002), e apresentaram ainda um maior consumo de etanol nas concentrações de 6% e 10% quando comparados aos animais SHR. Já os animais Floripa L, foram considerados de perfil mais “ansioso” em relação aos animais

Floripa H nos três testes comportamentais a que foram submetidos, independentemente do sexo, também corroborando nossos resultados com gerações anteriores (Ramos *et al.*, 2003). Os animais Floripa L apresentaram um maior consumo de etanol nas concentrações de 2 e 10%. A 10%, a diferença foi mais acentuada em fêmeas, pois nesta medida a interação entre sexo e linhagem por pouco não foi significativa ($p=0,054$). Estes resultados, obtidos com dois modelos genéticos diferentes (um *inbred* e outro *outbred*), foram ao encontro da hipótese de uma comorbidade ou correlação positiva entre alta “ansiedade” e alto consumo de etanol (Stewart *et al.*, 1993; Colombo *et al.*, 1995; Spanagel *et al.*, 1995; Möller *et al.*, 1997). Entretanto, este ponto é bastante controverso, pois diversos estudos têm mostrado a falta desta correlação em humanos e roedores (Tuominen *et al.*, 1990; Viglinskaya *et al.*, 1995; Overstreet *et al.*, 1997; Fernández-Teruel *et al.*, 2002; Henniger *et al.*, 2002; Da Silva *et al.*, 2004).

Dentre os estudos citados acima, um merece especial atenção. Da Silva *et al.* (2004) estudaram as linhagens LEW/SHR e Floripa H/L, as mesmas que foram estudadas aqui. Eles encontraram uma correlação negativa entre medidas comportamentais de ansiedade e consumo de etanol no modelo genético LEW/SHR (portanto, o contrário do resultado do presente estudo) e uma falta de relação entre estas duas características no modelo Floripa H/L. Porém, existem diferenças significativas entre os protocolos utilizados nestes dois estudos, como a duração do experimento, as concentrações de etanol utilizadas, a presença de um período de etanol forçado, a utilização de substâncias controles de sabor e o tipo de gaiola utilizada para avaliação do consumo.

Para se saber ao certo qual ponto é de fato o causador destes resultados contraditórios, mais estudos deverão ser realizados, mas nós podemos desde já propor explicações a partir de dados da literatura. Sabe-se, por exemplo, que o estresse da restrição de comida pode estimular o consumo de etanol através de um mecanismo dependente da corticosterona (Garcia-Belenguer *et al.*, 1993; Hansen *et al.*, 1995; Söderpalm e Hansen, 1999). Entretanto, ratos da linhagem LEW apresentam falta, ou um aumento atenuado, dos níveis do hormônio de liberação de corticotrofinas (CRF), de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e de corticosterona em resposta a uma variedade de eventos estressantes, como contenção, exposições a ambientes novos, natação forçada ou éter (Sternberg *et al.*, 1992), quando comparados com outras linhagens de ratos. Então, se considerarmos que as gaiolas metálicas com piso gradeado utilizadas no protocolo de Da Silva *et al.* (2004) podem ser mais estressantes para os animais do que as gaiolas plásticas com piso com maravalha utilizadas em nosso estudo, o consumo de etanol poderia ser diminuído em gaiolas metálicas na linhagem LEW, menos reativa, mas não na linhagem SHR. Esta hipótese é apoiada quando (a) vemos que as duas linhagens respondem de maneira diferente ao estresse crônico, por exemplo, com ratos LEW apresentando maior hipofagia e perda de peso corporal do que ratos SHR (Berton *et al.*, 1997; Berton *et al.*, 1998) e (b) pelo resultado de outro estudo de auto-administração de etanol realizado em nosso laboratório com as linhagens LEW e SHR. Nele, os animais LEW apresentaram uma tendência a consumir mais etanol nas concentrações de 2 e 4% em livre escolha do que os ratos SHR. Porém, após os animais passarem a receber diariamente a aplicação de uma droga via oral (um processo considerado estressante), o consumo dos

animais SHR passou a ser maior (dados não publicados). Então, o tipo de gaiola utilizada nos estudos de alcoolismo com modelos animais pode ser um fator causador de divergências, principalmente entre os resultados obtidos com o modelo genético LEW/SHR. No caso dos resultados divergentes entre o presente estudo e o de Da Silva *et al.* (2004) com as linhagens Floripa H/L, além de todos os fatores comentados anteriormente, ainda podemos citar o fato de que Da Silva *et al.* (2004) utilizaram animais provenientes da quinta geração de seleção, enquanto que nós utilizamos animais da décima geração. Como os animais vêm sendo selecionados com base no seu escore para uma medida relacionada à ansiedade e supondo que o consumo de etanol esteja relacionado geneticamente com ela, os animais podem ter obtido um ganho genético ao longo das últimas gerações, o que poderia ter levado ao surgimento da diferença no consumo de etanol. Então, um futuro estudo medindo o nível de corticosterona também nestas linhagens parece ser uma boa estratégia para avaliar este ponto.

As linhagens Floripa H/L vêm sendo selecionadas bidirecionalmente ao longo de 10 gerações para uma medida comportamental relacionada à ansiedade (locomoção no centro do CA) e que é fortemente influenciada por um QTL no cromossomo 4 do rato (Ramos *et al.*, 1999). Esperamos que ao longo das gerações de seleção, os alelos que estejam dentro desta região e que afetem este comportamento sejam fixados de maneira contrária nas duas linhagens. Como podemos observar no resultado deste estudo, a linhagem Floripa L se aproxima menos dos ambientes aversivos de três diferentes testes comportamentais de “ansiedade” em comparação com a linhagem Floripa H, sugerindo ser uma linhagem com maior “ansiedade” (Ramos *et al.*, 2003; Hinojosa *et al.*, em

preparação). Interessantemente, a linhagem Floripa L foi a que bebeu mais etanol nas concentrações de 2 e 10% (independentemente do sexo) e nas concentrações de 4 e 6% (somente em fêmeas), sugerindo novamente uma correlação positiva entre comportamentos ligados à ansiedade e ao alcoolismo. Este resultado além de validar nosso protocolo de auto-administração, ainda, reforça a hipótese de que a região do cromossomo 4 pode influenciar também a ingestão de etanol. Outro ponto interessante foi o fato de fêmeas terem bebido maiores quantidades de etanol do que machos neste modelo genético, o que confirma dados prévios da literatura (Almeida *et al.*, 1998; Cailhol e Mormède, 2002; Da Silva *et al.*, 2004) e sugere a importância de se estudar fêmeas nos diferentes protocolos de auto-administração de etanol.

5.3 Expressão gênica

Dois genes avaliados nos experimentos de expressão de RNAm (NPY e receptor 5-HT_{1A}), mostraram-se diferencialmente expressos entre as linhagens LEW e SHR no hipocampo, uma das regiões cerebrais analisadas juntamente com o hipotálamo. Estas regiões foram escolhidas, por estarem amplamente envolvidas com comportamentos relacionados à emocionalidade e ao alcoolismo em modelos animais. O hipotálamo faz parte do eixo HPA e é o responsável por mediar respostas de estresse nos animais (Ramos e Mormède, 1998). Além disso, sugere-se que o núcleo anatômico das reações de ansiedade/medo seja representado por um conjunto de estruturas límbicas inter-relacionadas como o sistema septo-hipocampal, algumas áreas do hipotálamo, alguns núcleos do complexo amigdalóide e da substância cinzenta periaquedutal no mesencéfalo

(Chamey *et al.*, 1996). Apesar da importância do hipotálamo, nenhuma diferença de expressão entre linhagens foi observada nesta região para nenhum dos três genes estudados. Porém, no hipocampo, que também está envolvido em diversas características emocionais (Arushanian e Beer, 1999; Barnes e Sharp, 1999; López *et al.*, 1998; Liang *et al.*, 2003), diferenças de expressão gênica entre as duas linhagens foram evidentes.

O gene do NPY está próximo de três QTL's encontrados no cromossomo 4 do rato, que parecem estar ligados ao consumo de etanol e sacarina (Bice *et al.*, 1998; Carr *et al.*, 1998; Terenina-Rigaldie *et al.*, 2003) e a comportamentos relacionados à emocionalidade (Ramos *et al.*, 1999; Mormède *et al.*, 2002). No presente estudo, os ratos LEW apresentaram cerca de 40% menos expressão gênica de NPY no hipocampo em comparação com os ratos SHR. Este resultado vai ao encontro das diferenças comportamentais encontradas nos testes de ansiedade e de consumo espontâneo de etanol realizados no presente trabalho, que mostraram que a linhagem LEW pareceu mais “ansiosa” e consumiu mais etanol do que a linhagem SHR.

Os sistemas centrais de NPY são conhecidos por estarem envolvidos nos transtornos de ansiedade e alcoolismo (Carr *et al.*, 1998; Badia-Elder *et al.*, 2001; Badia-Elder *et al.*, 2003), por exemplo, através da alteração da expressão e da secreção de outros neurotransmissores como a serotonina (Shimizu e Bray, 1989). Pandey (2003) sugeriu que o fator de transcrição gênico CREB, que regula a expressão do NPY, pode estar envolvido na regulação da ansiedade e da ingestão de etanol através de uma diminuição dos níveis de NPY no SNC. Além disso, alguns estudos têm sugerido uma correlação negativa entre os níveis de NPY e a

ansiedade (Heilig *et al.*, 1989; Stewart *et al.*, 1993; Ehlers *et al.* 1998) e entre os níveis de NPY e o alcoolismo (Badia-Elder *et al.*, 2001; Badia-Elder *et al.*, 2003). Estudos com animais knockout NPY^{-/-} sugerem que a falta de NPY está envolvida com ambas as características, ansiedade e consumo de etanol (Thiele *et al.*, 1998). A administração intracerebroventricular (ICV) de NPY reduz o consumo de etanol nos ratos P (*alcohol-preferring*), mas não nos ratos NP (*non-preferring*, menos “ansiosos”) (Badia-Elder *et al.*, 2001) e nas ratas HAD (*high alcohol drinking*), mas não nas ratas LAD (*low alcohol drinking*, menos “ansiosas”) (Badia-Elder *et al.*, 2003). Portanto, os presentes resultados reforçam dados prévios da literatura que sugerem uma correlação negativa dos níveis de NPY com os comportamentos relacionados à “ansiedade” e ao alcoolismo.

O NPY também parece participar na patofisiologia de certos transtornos de humor, incluindo a depressão (Stogner e Holmes, 2000; Redrobe *et al.*, 2002a; Redrobe *et al.*, 2002b), correlacionando-se também negativamente a ela. Alguns estudos demonstram que a depressão pode se apresentar em comorbidade com outras alterações emocionais como, por exemplo, a ansiedade, pois mais de 85% dos indivíduos depressivos experimentam sintomas significativos de ansiedade (Rihmer *et al.*, 2001; Yerevanian *et al.*, 2001). Quando foram realizados estudos que compararam as linhagens LEW/SHR no teste do nado forçado (TNF), que é considerado um modelo de depressão humana, os resultados mostraram que a linhagem LEW apresenta um maior tempo de imobilidade, podendo ser considerada a mais “depressiva” neste teste (Armário *et al.*, 1995; Lahmame e Armário, 1996; Berton *et al.*, 1998). Ou seja, a linhagem LEW considerada a mais

“ansiosa” neste modelo genético é também a considerada a mais “depressiva”, o que também é consistente com os dados de expressão gênica de NPY.

Alguns autores sugerem que as respostas comportamentais e fisiológicas associadas aos transtornos de ansiedade sejam reguladas no SNC através de um balanço entre os sistemas GABA-érgico (inibitório) e Glutamatérgico (excitatório) (Sajdyk e Shekhar, 1997). Diversos trabalhos sugerem a participação do glutamato nos comportamentos relacionados à ansiedade em animais experimentais (Kim e McGaugh, 1992; Bertoglio e Carobrez, 2003; Bergink *et al.*, 2004), ocorrendo um aumento nos níveis extracelulares de glutamato após estresse ou estímulo aversivo (Timmerman *et al.*, 1999). A ação do glutamato é realizada através da ligação a diferentes tipos de receptores ionotrópicos e metabotrópicos deste transmissor e também de diferentes combinações de suas subunidades (Bergink *et al.*, 2004). Alguns experimentos sugerem que a administração de antagonistas do receptor NMDA, como o AP7, diminuem a “ansiedade” experimental em roedores (Plaznik *et al.*, 1994; Wiley *et al.*, 1995; Jessa *et al.*, 1996). Estes receptores NMDA são formados a partir de dois tipos de subunidades, NR1 e NR2, podendo, cada uma delas, existir em diferentes isoformas (Kutsuwada *et al.*, 1992; Barnard *et al.*, 1997). Sabe-se, que populações hipocâmpais da subunidade NR2b estão implicadas no comportamento ansioso que acompanha a retirada da administração crônica de etanol (Stork *et al.*, 2002). A região do cromossomo 4 do rato que contém o QTL que afeta a locomoção central no CA, também abriga o gene da subunidade NR2b dos receptores NMDA, chamado de *Grin2b*, que é amplamente distribuída no cérebro (Milan *et al.*, 2002). Por esta razão, nós comparamos as linhagens LEW/SHR em relação à expressão

gênica da subunidade NR2b do receptor NMDA e vimos que não ocorreram diferenças entre as linhagens nas duas áreas analisadas, o que sugere que a expressão de uma das subunidades do receptor NMDA não é diferente entre elas. Entretanto, isto não significa que os outros subtipos das subunidades NR2 ou NR1 não sejam diferencialmente expressos entre estas duas linhagens.

A princípio, este resultado sugere que *Grin2b* não é um bom gene candidato para o QTL do cromossomo 4 do rato. Porém, neste estudo foram analisadas apenas duas áreas cerebrais e sabe-se que os receptores NMDA, além de serem amplamente expressos no cérebro, podem estar regulando os comportamentos relacionados à ansiedade em outras áreas (Bergink *et al.*, 2004). Além disso, a quantificação da expressão gênica empregada neste estudo (Bustin, 2000; 2002) não nos permite dizer nada sobre a afinidade (capacidade de uma molécula de ligar-se a um receptor) e a eficácia (capacidade de, uma vez ligada, provocar alterações que produzam efeitos) dos receptores NMDA como um todo das duas linhagens. Experimentos futuros avaliando a sensibilidade das nossas linhagens a compostos que atuam neste receptor ajudarão a entender melhor este ponto.

O terceiro gene analisado foi o do receptor 5-HT_{1A}, que não está localizado próximo ao QTL do cromossomo 4 do rato, mas que tem se mostrado um candidato potencial para o desenvolvimento de drogas efetivas no tratamento dos transtornos de ansiedade (De Vry, 1995; Barnes e Sharp, 1999). A ativação dos receptores 5-HT_{1A} pós-sinápticos resulta na inibição dos neurônios de vários sistemas de neurotransmissores, como os interneurônios GABA-érgicos (Barnes e Sharp, 1999). Entretanto, existem também receptores 5-HT_{1A} pré-sinápticos, que

funcionam como inibidores da síntese e da liberação da 5-HT nas áreas de projeção (Boess e Martin, 1994) num mecanismo auto-regulatório. Diversos estudos têm demonstrado que baixos níveis do receptor 5-HT_{1A} no hipocampo de animais experimentais estão associados com comportamentos ligados à ansiedade (Watanabe *et al.*, 1993; Flugge, 1995; McKittrick *et al.*, 1995; Fernandes *et al.*, 1997; López *et al.*, 1998; Wissink *et al.*, 2000) e que a administração de seus agonistas parciais (buspirona, gepirona) e totais 8-hidroxi-2-(di-n-propilamino) tetralina (8-OH-DPAT) em ratos resultam em um efeito ansiolítico (Lucky *et al.*, 1994; De Vry, 1995). Além disso, agonistas dos receptores 5-HT_{1A} diminuem o consumo de etanol em uma maneira dose-dependente (Schreiber *et al.*, 1993). Sabe-se, que a diminuição nos níveis de serotonina na fenda sináptica está associada com a depressão em humanos e em modelos animais, com as drogas antidepressivas atuando no sentido de inibir a recaptação deste e de outros neurotransmissores (Cryan *et al.*, 2002).

O gene que codifica o receptor 5-HT_{1A} não se apresentou diferencialmente expresso entre as duas linhagens no hipotálamo. Estudos futuros avaliando a expressão e a sensibilidade do receptor 5-HT_{1A} e não somente o seu RNAm nesta área cerebral, deverão ser realizados para investigar melhor este ponto. Entretanto, no hipocampo, a outra área analisada neste estudo e que também contem receptores 5-HT_{1A} pós-sinápticos, a diferença entre as linhagens foi evidente. A linhagem LEW apresentou uma expressão gênica 57% maior do receptor 5-HT_{1A} quando comparada à linhagem SHR.

Camundongos *knockout* 5-HT_{1A}^{-/-}, deficientes para este receptor, apresentam um perfil considerado ansioso (Heisler *et al.*, 1998; Parks *et al.*, 1998;

Ramboz *et al.*, 1998). Entretanto, no nosso estudo os ratos LEW, considerados os mais ansiosos, apresentaram maior expressão gênica do receptor 5-HT_{1A}, contrariando nossa expectativa inicial. Alguns pontos podem ser discutidos com o intuito de tentar explicar este resultado aparentemente contraditório.

Os ratos LEW, quando testados em nosso laboratório, apresentaram um maior tempo de imobilidade no teste do nado forçado quando comparados aos ratos SHR, ou seja, um perfil considerado “depressivo” (dados não publicados). Isto poderia sugerir que os níveis de serotonina na fenda sináptica no hipocampo dos animais LEW são mais baixos do que aqueles dos animais SHR causando, assim, uma *upregulation* dos receptores 5-HT_{1A} nos animais LEW numa tentativa de amplificar a resposta (Rang *et al.*, 2001). No entanto, estudos de *binding* no hipocampo com o receptor 5-HT_{1A} e o 5-HTT têm mostrado que linhagens LEW e SHR francesas não apresentam diferenças, sugerindo que os níveis de serotonina extracelular nelas sejam iguais (Kulikov *et al.*, 1997) e, portanto não apoiando a hipótese acima mencionada. Porém, como estas populações podem diferir das populações LEW/SHR brasileiras utilizadas aqui nos estudos de expressão gênica, nós deveremos realizar futuramente outros experimentos como, por exemplo, estudos de *binding* com o receptor 5-HT_{1A} e HPLC com a serotonina, no hipocampo, para melhor esclarecer esta questão.

Em segundo lugar, diferenças interespecíficas devem ser consideradas. Vemos que a diferença entre espécies (ratos/camundongos) parece ser marcante em estudos relacionados ao receptor 5-HT_{1A}. Como foi comentado anteriormente, em ratos, agonistas deste receptor produzem um perfil ansiolítico, enquanto que em camundongos o bloqueio seletivo destes receptores apresenta uma ação

ansiolítica comparada àquela das benzodiazepinas (Griebel *et al.*, 1999; 2000). Além desta, existem outras evidências que sugerem que a farmacologia molecular deste receptor é diferente entre estas duas espécies. Por exemplo, em camundongos, a hipotermia induzida pelo agonista total 8-OH-DPAT é devida a receptores 5-HT_{1A} pré-sinápticos, ou aqueles que inibem a liberação de serotonina nas áreas de projeção, enquanto que no rato este efeito pode ser mediado por receptores 5-HT_{1A} pós-sinápticos, aqueles responsáveis pelo mecanismo de transdução de sinal (Bill *et al.*, 1991). Portanto, comparações entre o presente estudo e estudos genéticos envolvendo camundongos *knockout* devem ser interpretadas com cautela.

Um terceiro ponto que pode ser levantado para explicar os resultados aparentemente contraditórios, é o fato de que pode ter-se originado um mecanismo compensatório de outro sistema ao longo do desenvolvimento dos camundongos *knockout* 5-HT_{1A}^{-/-}, para contrabalançar a falta dos receptores 5-HT_{1A}. Sabe-se que é grande a relação do sistema serotoninérgico com outros sistemas neuroquímicos, como por exemplo, o sistema NPY-érgico. Por exemplo, os camundongos *knockout* para o receptor Y1 apresentam redução na “agressividade” de uma maneira dose-dependente quando injetados com 8-OH-DPAT, um agonista do receptor 5-HT_{1A}. Estes camundongos Y1^{-/-} também apresentam elevado consumo de etanol (Thiele *et al.*, 1998), sugerindo que uma eventual participação dos receptores 5-HT_{1A} na auto-administração de etanol possa ser modulada pelo sistema NPY-érgico. Parece que a serotonina pode regular a liberação de NPY no hipotálamo (Sawchenko *et al.*, 1983; Williams *et al.*, 2001) e na amígdala (Smialowska *et al.*, 2001) e terminais nervosos contendo 5-

HT atuam sobre as células sintetizadoras de NPY (Guy *et al.*, 1988). Além disso, a administração de fluoxetina e fenfluramina reduz os níveis de NPY no NPV e em outras áreas do hipotálamo (Rodgers *et al.*, 1991; Dube *et al.*, 1992; Dryden *et al.*, 1994a) enquanto que o agonista do receptor 5-HT_{1A} (flesinoxan) aumenta os níveis de NPY no PVN e no NAR quando injetado agudamente (Dryden *et al.*, 1994b). No presente estudo, a linhagem LEW apresentou uma expressão gênica do receptor 5-HT_{1A} maior do que a linhagem SHR, sendo que a linhagem LEW consumiu significativamente maiores quantidades de etanol do que a linhagem SHR. Para melhor esclarecer estes pontos, estudos avaliando a sensibilidade do receptor 5-HT_{1A} a drogas agonistas e antagonistas nas linhagens LEW e SHR brasileiras e a relação deste sistema com outros, como o NPY-érgico, serão futuramente realizados.

Finalmente, é essencial reconhecermos que o papel da 5-HT na modulação da ansiedade e da depressão é extremamente complexo, o que faz com que estudos experimentais em modelos animais produzam resultados muitas vezes contraditórios ou de difícil interpretação. Por exemplo, quando drogas que atuam no receptor 5-HT_{1A} são utilizadas em testes comportamentais de “ansiedade”, os resultados apresentam uma grande variação, com os mesmos compostos algumas vezes exibindo efeito ansiolítico, outras falta de efeito, ou até mesmo efeito ansiogênico (De Vry, 1994; Griebel *et al.*, 2000).

6-CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo mostraram que as linhagens LEW e SHR, que compõem um dos modelos genéticos aqui utilizados, continuaram apresentando diferenças relacionadas à ansiedade no teste da CBP na fase escura do ciclo circadiano e no reteste do LCE. Isto sugere que as diferenças entre estas linhagens são robustas e não fase-dependente e que o teste e o reteste no LCE devem apresentar componentes emocionais e psicológicos comuns.

Nós também mostramos dois fatores ambientais de laboratório que tem influência nos resultados dos testes comportamentais, com algumas destas influências sendo genótipo-dependente. Ao nosso conhecimento, este foi o primeiro estudo que relatou a influência da posição das gaiolas e do estado comportamental anterior ao teste nas comparações comportamentais entre linhagens de roedores. Estes achados são importantes para estudos que almejam comparar animais com diferentes genótipos, mas também tem um impacto potencial em outros tipos de experimentos neurobiológicos. Estudos adicionais deveriam tentar identificar as causas destes efeitos ambientais, para investigar o seu impacto na expressão de genes e para propor mudanças nos procedimentos anteriores ao teste, que poderiam minimizar ou até mesmo abolir os efeitos destas variáveis ambientais. Enquanto isso, um esforço no sentido de equilibrar estes efeitos entre diferentes grupos ou tratamentos seria aconselhável. Estes resultados mostraram ainda que, apesar da robustez do modelo LEW/SHR, diferenças genéticas de emocionalidade podem depender de alguns detalhes do

ambiente de laboratório. Por exemplo, ratos SHR, normalmente menos “ansiosos” do que ratos LEW se igualam a estes quando alojados em gaiolas baixas ou quando testados logo após um período de repouso.

No terceiro bloco experimental, nós demonstramos que as linhagens consideradas as mais “ansiosas” nos nossos modelos genéticos foram as que consumiram maiores quantidades de etanol quando este foi oferecido em livre escolha. Isto sugere uma correlação positiva entre índices experimentais de “ansiedade” e “alcoolismo”, porém, estudos futuros com populações segregantes destas quatro linhagens deverão avaliar melhor este ponto. Como este resultado foi contrário ao encontrado em estudos prévios, nós sugerimos que a importância do protocolo empregado, principalmente da gaiola onde são realizados os testes, é um fator ambiental a ser considerado em estudos futuros de auto-administração. Finalmente, no quarto bloco experimental, nossos resultados reforçam uma correlação entre menores níveis de expressão gênica de NPY no hipocampo, maior ansiedade/emocionalidade e maior consumo de etanol no nosso modelo genético. Nossos resultados também sugerem a serotonina, como possível participante dos comportamentos relacionados à ansiedade e ao consumo de etanol, talvez através de uma interação com o NPY. Porém, estudos adicionais para se investigar os níveis de proteína do receptor 5-HT_{1A} e a sua funcionalidade nas duas linhagens serão necessários.

7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS

- ADAMEC, R. E.; BLUNDELL, J.; COLLINS, A. (2001) **Neural plasticity and stress induced changes in defense in the rat.** *Neurosci Biobehav Rev* 25:721-744.
- AGUILAR, R.; GIL, L.; FLINT, J.; GRAY, J. A.; DAWSON, G. R.; DRISCOLL, P.; GIMÉNEZ-LLORT, L.; ESCORIHUELA, R. M.; FERNÁNDEZ-TERUEL, A.; TOBEÑA, A. (2002) **Learned fear, emotional reactivity and fear of heights: a factor analytic map from a large F2 intercross of Roman rat strains.** *Brain Res Bull* 57:17-26.
- ALLAN, C. A. (1995) **Alcohol problems and anxiety disorders – a critical review.** *Alcohol Alcohol* 30:145-151.
- ALMEIDA, O. F. X.; SHOAB, M.; DEIKE, J.; FISCHER, D.; DARWISH, M. H.; PATCHEV, V. K. (1998) **Gender differences in ethanol preference and ingestion in rats.** *The J Clin Invest* 101:2677-2685.
- ANDREATINI, R.; BACELLAR, L. F. S. (2000) **Animal models: Trait or state measure? The test-retest reliability of the Elevated Plus Maze and Behavioral Despair.** *Prog NeuroPsychopharmacol Biol Psychiatry* 24:549-560.
- ANGRINI, M.; LESLIE, J. C.; SHEPHARD, R. A. (1998) **Effects of propranolol, buspirone, pCPA, reserpine, and chlordiazepoxide on open-field behavior.** *Pharmacol Biochem Behav* 59: 387-397.
- ARCHER, J. (1973) **Tests for emotionality in rats and mice: a review.** *Anim Behav* 21:205-235.
- ARMARIO, A.; GAVALDÀ, A.; MARTI, J. (1995) **Comparison of the behavioural and endocrine response to forced swimming stress in five inbred strains of rats.** *Psychoneuroendocrinology* 20: 879-890.
- ARUSHANIAN, E. B.; BEER, E. V. (1999) **The contrary effect of destruction of the dorsal hippocampus and of the suprachiasmatic nucleus of the hypothalamus on the rhythmic organization of behavior and on anxiety in rats.** *Zhurnal Vysshei Nervnoi Deiatelnosti Imeni P Pavlova* 49: pp. 264-270.
- BACHMANOV, A. A.; TORDOFF, M. G.; BEAUCHAMP, G. K. (1996) **Ethanol consumption and taste preferences in C57BL/6ByJ and 129/J mice.** *Alcohol Clin Exp Res* 20:201-206.
- BADIA-ELDER, N. E.; STEWART, R. B.; POWROZEK, T. A.; ROY, K. F.; MURPHY, J. M.; LI, T. K. (2001) **Effect of neuropeptide Y (NPY) on oral**

- ethanol intake in Wistar, alcohol-preferring (P), and –nonpreferring (NP) rats.** *Alcohol Clin Exp Res* 25:386-390.
- BADIA-ELDER, N. E.; STEWART, R. B.; POWROZEK, T. A.; MURPHY, J. M.; LI, T.-K. (2003) **Effects of neuropeptide Y (NPY) on sucrose and ethanol intake and on anxiety-like behavior in high alcohol drinking (HAD) and low alcohol drinking (LAD) rats.** *Alcohol Clin Exp Res* 27:894-899.
- BARNARD, E. A. (1997) **Ionotropic glutamate receptors: new types and new concepts.** *Trends Pharmacol Sci* 18:141-148.
- BARNES, N. M.; SHARP, T. (1999) **A review of central 5-HT receptors and their function.** *Neuropharmacology* 38:1083-1152.
- BELKNAP, J. K.; CRABBE, J. C.; YOUNG, E. R. (1993) **Voluntary consumption of ethanol in 15 inbred mouse strains.** *Psychopharmacologia* 112:503-510.
- BELZUNG, C.; LÊ PAPE, G. (1994) **Comparison of different behavioral test situations used in psychopharmacology for measurement of anxiety.** *Physiol Behav* 56:623-628.
- BELZUNG, C.; PINEAU, N.; BEUZEN, A.; MISLIN, R. (1994) **PD135158: a CCK-B antagonist, reduces “state”, but not “trait” anxiety in mice.** *Pharmacol Biochem Behav* 49:433-436.
- BELZUNG, C. e GRIEBEL, G. (2001) **Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: A review.** *Behav Brain Res* 125:141-149.
- BERGINK, V.; VAN MEGEN, H. J. G. M.; WESTENBERG, H. G. M. (2004) **Glutamate and anxiety.** *Eur Neuropsychopharmacol* 14:175-183.
- BERTOGLIO, L. J. e CAROBREZ, A. P. (2000) **Previous maze experience required to increase open arms avoidance in rats submitted to the elevated plus-maze model of anxiety.** *Behav Brain Res* 108, 197-203.
- BERTOGLIO, L. J. e CAROBREZ, A. P. (2002a) **Prior maze experience required to alter midazolam effects in rats submitted to the elevated plus maze.** *Pharmacol Biochem Behav* 72:449-455.
- BERTOGLIO, L. J. e CAROBREZ, A. P. (2002b) **Anxiolytic effects of ethanol and phenobarbital are abolished in test-experienced rats submitted to the elevated plus maze.** *Pharmacol Biochem Behav* 73:963-969.
- BERTOGLIO, L. J. e CAROBREZ, A. P. (2003) **Anxiolytic effects of NMDA/glycine-B receptor ligands are abolished during the elevated plus-maze Trial 2 in rats.** *Psychopharmacology (Berl)* 170: 335-342.

- BERTON, O.; RAMOS, A.; CHAOULOFF, .F; MORMÈDE, P. (1997) **Behavioral reactivity to social and nonsocial stimulations: a multivariate analysis of six inbred rat strains.** *Behav Genet* 27:155-166.
- BERTON, O.; AGUERRE, S.; SARRIEAU, A.; MORMEDE, P.; CHAOULOFF, F. (1998) **Differential effects of social stress on central serotonergic activity and emotional reactivity in Lewis and spontaneously hypertensive rats.** *Neuroscience* 82:147-159.
- BICE, P.; FOROUD, T.; BO, R.; CASTELLUCCIO, P.; LUMENG, L.; LI, T. K.; CARR, L. G. (1998) **Genomic screen for QTLs underlying alcohol consumption in the P and NP rat lines.** *Mamm Genome* 9:949-955.
- BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C.; WEISS, S. M.; MEYER, S. (1990) **The effects of ethanol and diazepam on reactions to predatory odors.** *Pharmacol Biochem Behav* 35:775-780.
- BLANCHARD, D. C.; GRIEBEL, G.; BLANCHARD, R. J. (2001a) **Mouse defensive behaviors: Pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic.** *Neurosci Biobehav Rev* 25:205-218.
- BLANCHARD, R. J.; MCKITTRICK, C. R.; BLANCHARD, D. C. (2001b) **Animal models of social stress: Effects on behavior and brain neurochemical systems.** *Physiol Behav* 73:261-271.
- BLISS, T. P. V. e COLLINGRIDGE, L. G. (1993) **A synaptic model for memory: long-term for potentiation in the hippocampus.** *Nature* 361:31-39.
- BLOMQVIST, A. G. e HERZOG, H. (1997) **Y-receptor subtypes--how many more?** *Trends Neurosci* 20: 294-298.
- BOESS, F. G. E MARTIN, I. L. (1994) **Molecular biology of 5-HT receptors.** *Neuropharmacol* 33:275-317.
- BORSINI, F. e MELI, A. (1988) **Is the forced swimming test a suitable model for revealing Antidepressant activity?** *Psychopharmacologia* 94: 147-160.
- BRADY, K. T. e SONNE, S. C. (1999) **The role of stress in alcohol use, alcoholism treatment, and relapse.** *Alcohol Res. Health* 23:263-271.
- BROADHURST, P. L. (1975) **The Maudsley Reactive and Nonreactive strains of rats, a survey.** *Behav Genet* 5:299-319.
- BRODKIN, E. S. e NESTLER, E. J. (1998) **Quantitative Trait Locus Analysis: A New Tool for Psychiatric Genetics.** *Neuroscience Update* 4:317-323.

- BRUSH, F. R., GENDRON, C. M.; ISAACSON, M. D. (1999) **A selective genetic analysis of the Syracuse high- and low-avoidance (SHA/Bru and SLA/Bru) strains of rats (*Rattus norvegicus*).** *Behav Brain Res* 106:1-11.
- BUSTIN, S. A. (2000) **Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays.** *J Mol Endocrinol* 25:169-193.
- BUSTIN, S. A. (2002) Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol* 29:23-39.
- CAILHOL, S. e MORMÈDE, P. (2002) **Conditioned taste aversion and alcohol drinking: strain and gender differences.** *J Stud Alcohol Suppl* 63:91-99.
- CALOGERO, A. E.; STERNBERG, E. M.; BAGDY, G.; SMITH, C.; BERNARDI, R.; AKSENTIJEVICH, S.; WILDER, R. L.; GOLD, P. W.; CHROUSOS, G. P. (1992) **Neurotransmitter-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis responsiveness is defective in inflammatory disease-susceptible Lewis rats, in vivo and invitro studies suggesting globally defective hypothalamic secretion of Corticotropin-Releasing Hormone.** *Neuroendocrinol* 55:600-608.
- CARR, L. G.; FOROUD, T.; BICE, P.; GOBBETT, T.; IVASHINA, J.; EDENBERG, H.; LUMENG, L.; LI, T.-K. (1998) **A quantitative trait locus for alcohol consumption in selectively bred rat lines.** *Alcohol Clin Exp Res* 22: 884-887.
- CARDENAS, F.; LAMPREA, M. R.; MORATO, S. (2001) **Vibrissal sense is not the main sensory modality in rat exploratory behavior in the elevated plus-maze.** *Behav Brain Res* 122:169-174.
- CASPI, A.; SUGDEN, K.; MOFFITT, T. E.; TAYLOR, A.; CRAIG, I. W.; HARRINGTON, H.; MCCLAY, J.; MILL, J.; MARTIN, J. (2003) **Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene.** *Science* 301:386-389.
- CASTANON, N. e MORMÈDE, P. (1994) **Psychobiogenetics, adapted tools for the study of the coupling between behavioral and neuroendocrine traits of emotional reactivity.** *Psychoneuroendocrinol* 19:257- 282.
- CHARNEY, D. S., NAGY, L. M., BRENNER, D. (1996). **Neurobiological mechanisms of human anxiety.** In: Fogel, B.S., Schiffer, R.B. and Rao, S.M., Editors. *Neuropsychiatry*, Williams and Wilkins, Baltimore, MD.
- CHAOULOFF, F.; DURAND, M.; MORMÈDE, P. (1997) **Anxiety-and activity-related effects of diazepam and chlordiazepoxide in the rat light/dark and dark/light tests.** *Behav Brain Res* 85:27-35.

- CHAOULOFF, F.; BERTON, O.; MORMÈDE, P. (1999) **Serotonin and Stress.** *Neuropsychopharmacology* 21:28S-32S.
- CHESLER, E. J.; WILSON, S. G.; LARIVIERE, W. R.; RODRIGUEZ-ZAS, S. L.; MOGIL, J. S. (2002) **Identification and ranking of genetic and laboratory environment factors influencing a behavioral trait, thermal nociception, via computational analysis of a large data archive.** *Neurosci Biobehav Rev* 26:907-923.
- CIPOLLA-NETO, J.; MARQUES, N.; MENNA-BARRETO, L. S. (1988) **Introdução ao estudo da Cronobiologia.** *Editora Ícone*, São Paulo.
- CLÉMENT, Y.; CALATAYUD, F.; BELZUNG, C. (2002) **Genetic Basis of Anxiety-like Behaviour: A Critical Review.** *Brain Res Bull* 57:57-71.
- CLONINGER, C. R. (1987) **Neurogenetic adaptative mechanisms in alcoholism.** *Science* 236:410-416.
- COLOMBO, G.; AGABIO, R.; LOBINA, C.; REALI, L.; ZOCCHI, A.; FADDA, F.; GESSA, G. L. (1995) **Sardinian alcohol-preferring rats: a genetic animal model of anxiety.** *Physiol Behav* 57:1181-1185.
- CORNELIUS, J. R.; BUKSTEIN, O.; SALLOUM, I.; CLARK, D. (2003) **Alcohol and psychiatric comorbidity.** *Recent Dev Alcohol* 16:361-374.
- COSTALL, B.; JONES, B. J.; KELLY, M. E.; NAYLOR, R. J.; TOMKINS, D. M. (1989) **Exploration of Mice in a Black and White Test Box: Validation as a Model of Anxiety.** *Pharmacol Biochem Behav* 32:777--785.
- COTMAN, C. W.; KAHLE, J. S.; MILLER, S. E.; ULAS, J.; BRIDGES, R. J. (1995) **Excitatory amino acid transmission. Em: Bloom, F. E.; Kupfer, D. J. (eds) Psychopharmacology: a fourth generation of progress.** *Raven Press, Nova lork* 75-85.
- CRABBE, J. C.; WAHLSTEN, D.; DUDEK, B. C. (1999) **Genetics of mouse behavior: interactions with laboratory environment.** *Science* 284:1670--1672.
- CRAWLEY, J. N. (1981) **Neuropharmacologic Specificity of a Simple Animal Model for the Behavioral Actions of Benzodiazepines.** *Pharmacol Biochem Behav* 15:695-699.
- CRAWLEY, J. N. e DAVIS, L. G. (1982) **Baseline exploratory activity predicts anxiolytic responsiveness to diazepam in five mouse strains.** *Brain Res Bull* 8: 609-612.

- CRYAN, J. F.; MARKOU, A.; LUCKI, I. (2002) **Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs.** *Trends Pharmacol Sci* 23:238-245.
- DA SILVA, G. E.; RAMOS, A.; TAKAHASHI, R. N. (2004) **Comparison of voluntary ethanol intake by two pairs of rat lines used as genetic models of anxiety.** *Braz J Biol* 37:1511-1517.
- DAVIDSON, J. R.; DUPONT, R. L.; HEDGES, D.; HASKINS, J. T. (1999) **Efficacy, safety, and tolerability of venlafaxine extended release and bupirone in outpatients with generalized anxiety disorder.** *J Clin Psychiatry* 60:528-535.
- DAWSON, G. R. e TRICKLEBANK, M. D. (1995) **Use of the elevated plus maze in the search for novel anxiolytic agents.** *Current techniques* 16:33-36.
- DE VRY, J. (1995) **5-HT_{1A} receptor agonists: recent developments and controversial issues.** *Psychopharmacology (Berl.)* 121:1-26.
- Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders** 4th edn (American Psychiatric Association Washington DC. 1994).
- DIELENBERG, R. A. e MCGREGOR, I. S. (2001) **Defensive behavior in rats towards predatory odors: A review.** *Neurosci Biobehav Rev* 25:597-609.
- DRISCOLL, P.; ESCORIHUELA, R. M.; FERNÁNDEZ-TERUEL, A.; GIORGI, O.; SCHWEGLER, H.; STEIMER, T.; WIERSMA, A.; CORDA, M. G.; FLINT, J.; KOOLHAAS, J. M.; LANGHANS, W.; SCHULZ, P. E.; SIEGEL, J.; TOBEÑA A. (1998) **Genetic selection and differential stress responses: the Roman lines/strains of rats.** *Ann. N.Y. Acad. Sci* 851:501-510.
- DRYDEN, S.; FRANKISH, H.M.; KILPATRICK, A.; WILLIAMS, G. (1994a) **Effect of acute administration of the serotonergic 5-HT_{1A} agonist flesinoxan on feeding in the rat: could the hyperphagia be mediated by neuropeptide Y?** *Clin. Sci.* 87:22P.
- DRYDEN, S.; FRANKISH, H.M.; WANG, Q.; WILLIAMS, G. (1994b) **Altered neuropeptide Y levels in specific hypothalamic regions of obese (fa/fa) and lean (Fa/?) Zucker rats after chronic fluoxetine treatment.** *J Endocrinol* 140:P196 Suppl.
- DRYDEN, S.; WANG, Q.; FRANKISH, H. M.; PICKAVANCE, L.; WILLIAMS, G. (1995) **The serotonin (5-HT) antagonist methysergide increases neuropeptide (NPY) synthesis and secretion in the hypothalamus of the rat.** *Brain Res* 699:12-18.

- DUBE, M.G.; SAHU, A.; PHELPS, C.P.; KALRA, P.S.; KALRA, S.P. (1992) **Effect of d-fenfluramine on neuropeptide Y concentration and release in the paraventricular nucleus of food-deprived rats.** *Brain Res Bull* 29:865–869.
- DUMONT-DAMIEN, E.; DUYME, M. (1993) **Pleiotropic effect of a locus on chromosome 4 influencing alcohol drinking and emotional reactivity in rats.** *Genes Brain Behav* 2:125-131.
- EHLERS, C.; LI, T.-K.; LUMENG, L.; SOMES, C.; JIMINEZ, P. (1998) **Neuropeptide Y (NPY) levels in ethanol-naïve alcohol preferring and non-preferring rats and in Wistars following ethanol exposure.** *Alcohol Clin Exp Res* (in press).
- EHLERT, U.; GAAB, J.; HEINRICHS, M. (2001) **Psychoneuroendocrinological contributions to the etiology of depression, posttraumatic stress disorder, and stress-related bodily disorders: the role of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis.** *Biol Psychol* 57: 141-152.
- EKBLAD, E.; EDVINSSON, L.; WAHLESTEDT, G.; UDDMAN, R.; HAKANSON, R.; SUNDLER, F. (1984) **Neuropeptide-Y Co-Exists And Co-Operates With Noradrenaline In Perivascular Nerve-Fibers.** *Regul Pept* 8:225-235.
- ESEL, E. (2003) *Turk Psikiyatri Derg* 14:60-71 in: HADAD, J. J. (2004) **Alcoholism and neuro-immune-endocrine interactions: physiochemical aspects.** *Biochem biophys res* 323:361-371.
- EXNER, M. e CLARK, D. (1993) **Subtle variations in living conditions influence behavioural response to d-amphetamine.** *Neuroreport* 4:1059-1062.
- FERNANDES, C. e FILE, S. E. (1996) **The influence of open arm ledges and maze experience in the elevated plus-maze.** *Pharmacol Biochem Behav* 49:21–30.
- FERNANDES, C.; MCKITTRICK, C. R.; FILE, S. E.; MC EWEN, B. S. (1997) **Decreased 5-HT_{1A} and increased 5-HT_{2A} receptor binding after chronic corticosterone associated with behavioural indication of depression but not anxiety.** *Psychoneuroendocrinology* 22:477-491.
- FERNÁNDEZ-TERUEL, A.; DRISCOLL, P.; GIL, L.; AGUILAR, R.; TOBEÑA, A.; ESCORIHUELA, R. M. (2002) **Enduring effects of environmental enrichment on novelty seeking, saccharin and ethanol intake in two rat lines (RHA/Verh and RLA/Verh) differing in incentive-seeking behavior.** *Pharmacol Biochem Behav* 73:225-231.
- FILE, S. E. e HYDE, J. R. G. (1978) **Can social interaction be used to measure anxiety?** *Br J Pharmacol* 62:19-24.

- FILE, S. E. (1980) **The use of social interaction as a method for detecting anxiolytic activity of chlordiazepoxide-like drugs.** *J Neurosci Meth* 2:219-238.
- FILE, S. E. (1987) **The contribution of behavioural studies to the neuropharmacology of anxiety.** *Neuropharmacology* 26:877-886.
- FILE, S. E. (1990) **One-trial tolerance to the anxiolytic effects of chlordiazepoxide in the plus-maze.** *Psychopharmacology (Berl)* 100:281--282.
- FILE, S. E.; ANDREWS, N.; WU, P. Y.; ZHARKOVSKY, A.; ZANGROSSI JR., H. (1992) **Modification of chlordiazepoxide's behavioural and neurochemical effects by handling and plus-maze experience.** *Eur J Pharmacol* 218:9-14.
- FILE, S. E. e ZANGROSSI, H. (1993) **"One-trial tolerance" to the anxiolytic actions of benzodiazepines in the elevated plus-maze, or the development of a phobic state?** *Psychopharmacology (Berl)* 110:240-244.
- FILE, S. E.; ZANGROSSI, H. JR.; ANDREWS, N. (1993) **Social interaction and elevated plus-maze tests: Changes in release and uptake of 5-HT and GABA.** *Neuropharmacology* 32:217-221.
- FILE, S. E. (1995) **Animal models of different anxiety states.** In **Neurobiology to treatment** editado por Biggio, G.; Sanna, E.; Costa, E. *Raven Press. Nova York.*
- FILE, S. E.; GONZALEZ, L. E.; GALLANT, R. (1998) **Role of the basolateral nucleus of the amygdala in the formation of a phobia.** *Neuropsychopharmacology* 19:397-405.
- FILE, S. E.; GONZALEZ, L. E.; GALLANT, R. (1999) **Role of the dorsomedial hypothalamus in mediating the response to benzodiazepines on trial 2 in the elevated plus-maze test of anxiety.** *Neuropsychopharmacology* 21:312-320.
- FILE, S. E. (2001) **Factors controlling measures of anxiety and responses to novelty in the mouse.** *Behav Brain Res* 125:151-157.
- FLINT, J.; CORLEY, R.; DE FRIES, J. C.; FULKER, D. W.; GRAY, J. A.; MILLER, S.; COLLINS, A. C. (1995) **A simple basis for a complex psychological trait in laboratory mice.** *Science* 269:1432-1435.
- FLUGGE, G. (1995) **Dynamics of central nervous 5-HT_{1A}-receptors under psychosocial stress.** *J Neurosci* 15:7132-7140.

- FOROUD, T.; LI, T.-K. (1999) **Genetics of alcoholism: a review of recent studies in human and animal models.** *Am J Addict* 8:261-278.
- FUJITA, O.; ANNEN, Y.; KITAOKA, A. (1994) **Tsukuba high- and low-emotional strains of rats (*Rattus norvegicus*): an overview.** *Behav Genet* 24:389-415.
- GARCIA-BELENQUER, S.; OLIVER, C.; MORMÈDE, P. (1993) **Facilitation and feedback in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis during food restriction in rats.** *J Neuroendocrinol* 5:663-668.
- GEHLERT, D. R. (1999) **Role of hypothalamic neuropeptide Y in feeding and obesity.** *Neuropeptides* 33: 329-338.
- GENTSCH, C., LICHTSTEINER, M., DRISCOLL, P.; FEER, H. (1982) **Differential hormonal and physiological responses to stress in Roman High- and Low-Avoidance rats.** *Physiol Behav* 28:259-263.
- GENTSCH, C.; LICHTSTEINER, M.; FEER, H. (1987) **Open field and elevated plus-maze, a behavioural comparison between spontaneously hypertensive (SHR) and Wistar-Kyoto (WKY) rats and the effects of chlordiazepoxide.** *Behav Brain Res* 25: 101-107.
- GLOWA, J. R. e HANSEN, C. T. (1994) **Differences in response to an acoustic startle stimulus among forty-six rat strains.** *Behav Genet* 24:79-84.
- GORKA, Z.; MORYL, E.; PAPP, M. (1996) **Effect of chronic mild stress on circadian rhythms in the locomotor activity in rats.** *Pharmacol Biochem Behav* 54:29-234.
- GRAHAME, N. J.; LI, T.-K.; LUMENG, L. (1999) **Selective breeding for high and low alcohol preference in mice.** *Behav Genet* 29:47-57.
- GRAY, J. A. (1979) **Emotionality in male and female rodents, a reply to Archer.** *Br J Psychol* 70:42-440.
- GREENAMYRE, J. T. e PORTER, R. H. (1994) **Anatomy and physiology of glutamate in the CNS.** *Neurology* 44:7-13.
- GREENBERG, P. E.; SISITSKY, T.; KESSLER, R. C.; FINKELSTEIN, S. N.; BERNDT, E. R.; DAVIDSON, J. R. T.; BALLENGER, J. C.; FYER, A. J. (1999) **The economic burden of anxiety disorders in the 1990s.** *J Clin Psychiatric* 60:427-435.
- GREGORY, S. G.; SEKHON, M.; SCHELN, J.; ZHAO, S.; OSOEGAWA, K.; SCOTT, C. E.; EVANS, R. S.; BURRLDGE, P. W.; COX, T. V.; FOX, C. A.; HUTTON, R. D.; MULLENGER, I. R.; PHILLIPS, K. J.; SMITH, J.; STALKER,

- J.; THREADGOLD, G. J.; BARNEY, E.; WYLLE, K.; CNIWALLA, A.; WALLS, J.; et al. (2002) **A physical map of the mouse genome.** *Nature* 418:743-750.
- GRIEBEL, G.; RODGERS, R. J.; PERRAULT, G.; SANGER, D. J. (1999) **Behavioural profiles in the mouse defense test battery suggest anxiolytic potential of 5-HT_{1A} receptor antagonists.** *Psychopharmacology (Berl.)* 144:121-130.
- GRIEBEL, G.; RODGERS, R. J.; PERRAULT, G.; SANGER, D. J. (2000) **The effects of compounds varying in selectivity as 5-HT_{1A} receptor antagonists in three rat models of anxiety.** *Neuropharmacol* 39:1848-1857.
- GROENINK, L.; PATTIJ, T.; DE JONGH, R.; VAN DER GUGTEN, J.; OOSTING, R. S.; DIRKS, A.; OLIVIER, B. (2003) **5-HT_{1A} receptor knockout mice and mice overexpressing corticotropin-releasing hormone in models of anxiety.** *Eur J Pharmacol* 463:185-197.
- GROSS, C. e HEN, R. (2004) **The developmental origins of anxiety.** *Nature Rev* 5: 545-551.
- GUILLOT, P.-V. e CHAPOUTIER, G. (1996) **Intermale aggression and dark/light preference in ten inbred mouse strains.** *Behav Brain Res* 77:211-213.
- GUY, J.; PELLETIER, G.; BOSLER, O. (1988) **Serotonin innervation of neuropeptide Y-containing neurons in the rat arcuate nucleus.** *Neuroscience Lett* 85:9-13.
- HALL, C. S. (1934) **Emotional behavior in the rat. L., Defecation and urination as measures of individual differences in the emotionality.** *J Comp Psychol* 18:385-403.
- HANDLEY, S. L. e MCBLANE, J. W. (1993) **An assessment of the elevated X-maze for studying anxiety and anxiety-modulating drugs.** *J Pharmacol Toxicol Meth* 29: 129-138.
- HANSEN, S.; FAHLKE, C.; SÖDERPALM, A. H. V.; HARD, E. (1995) **Significance of adrenal corticosteroid secretion for the food restriction-induced enhancement of ethanol drinking in the rat.** *Psychopharmacology (Berl.)* 121:213-221.
- HARFORD, T. C.; PARKER, D. A.; GRANT, B. F.; DAWSON, D. A. (1992) **Alcohol use and dependence among employed men and women in the United States in 1998.** *Alcohol Clin Exper Res* 16:146-148.

- HEILIG, M.; SODERPALM, B.; ENGEL, J. A.; WIDERLOV, E. (1989) **Centrally administered neuropeptide Y (NPY) produces anxiolytic-like effects in animal anxiety models.** *Psychopharmacology (Berl)* 98:524-529.
- HENDERSON, N. D. (1970) **Genetic influences on the behavior of mice can be obscured by laboratory rearing.** *J Comp Physiol Psychol* 72:505-511.
- HENDLEY, E. D.; OHLSSON, W. G. (1991) **Two new inbred rat strains derived from SHR, WKHA, hyperactive, and WKHT, hypertensive, rats.** *Am J Physiol* 261 (Heart Circ. Physiol 30), H583- H589.
- HENNINGER, M. S. H.; OHL, F.; HÖLTER, S. M.; WEINßENBACHER, P.; TOSCHI, N.; LÖRSCHER, P.; WIGGER, A.; SPANAGEL, R.; LANDGRAF, R. (2000) **Unconditioned Anxiety and Social Behaviour in two Rat Lines Selectively Bred for High and Low Anxiety-related Behaviour.** *Behav Brain Res* 111:153-163.
- HENNIGER, M. S. H.; SPANAGEL, R.; WIGGER, A.; LANDGRAF, R.; HÖLTER, S. M. (2002) **Alcohol self-administration in two rat lines selectively bred for extremes in anxiety-related behavior.** *Neuropsychopharmacology* 26:729–736.
- HERZBERG, A. M. e LAGAKOS, S. W. (1992) **Cage allocation designs for rodent carcinogenicity experiments (reprinted from environmental-health perspectives, vol 96, pg 199-202, 1991) Herzberg A. M., Lagakos S. W.** *Environ Health Perspect* 97, 277-280.
- HOGG, S. e FILE, S. E. (1994) **Responders and nonresponders to cat odor do not differ in other tests of anxiety.** *Pharmacol Biochem Behav* 49:219- 222.
- HOGG, S. (1996) **A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety.** *Pharmacol Biochem Behav* 54:21-30.
- HÖKFELT, T.; BROBERGER, C.; ZHANG, X.; DIEZ, M.; KOPP, J.; XU, Z.; LANDRY, M.; BAO, L.; SCHALLING, M.; KOISTINAHO, J.; DE ARMOND, S. J.; PRUSINER, S.; GONG, J.; WALSH, J. H. (1998) **Neuropeptide Y: some viewpoints on a multifaceted peptide in the normal and diseased nervous system.** *Brain Res Brain Res Rev* 26:154-166.
- HOLMES A. e RODGERS R. J. (1998) **Responses of Swiss–Webster mice to repeated plus-maze experience: further evidence for qualitative shift in emotional state?** *Pharmacol. Biochem. Behav* 60:473-488.
- HOYER, D.; CLARKE, D. E.; FOZARD, J. R.; HARTIG, P. R.; MARTIN, G. R.; MYLECHARANE, E. J.; SAXENA, P. R.; HUMPHREY, P. P. (1994)

International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol Rev* 46:157-203.

ICHIMIYA, T.; SUHARA, T.; SUDO, Y.; OKUBO, Y.; NAKAYAMA, K.; NANKAI, M.; INOUE, M.; YASUNO, F.; TAKANO, A.; MAEDA, J.; SHIBUYA, H. (2002) **Serotonin transporter binding in patients with mood disorders: a PET study with [11C](+)McN5652.** *Biol Psychiatry* 51:715-722.

ILAR News (1992) **Definition, nomenclature, and conservation of rat strains.** 34 (4), http://dels.nas.edu/ilar/jour_online/34_4/definitionandnomenrat.asp.

IMHOF, J. T.; COELHO, Z. M. I.; SCHMITT, M. L.; MORATO, G. S.; CAROBREZ, A. P. (1993) **Influence of gender and age on performance of rats in the elevates plus maze apparatus.** *Behav Brain Res* 56:177-180.

JESSA, M.; NAZAR M, BIDZINSKI A, PLAZNIK A. (1996) **The effect of repeated administration of diazepam, MK-801 and CGP 37849 on rat behavior in two models of anxiety.** *Eur Neuropsychopharmacol* 6:55-61.

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

KALRA, S. P.; DUBE, M. G.; PU, S. Y.; XU, B.; HORVATH, T. L.; KALRA, P.S. (1999) **Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight.** *Endoq Rev* 20:68-100.

KAMPOV-POLEVOY, A. B.; GARBUT, J. C.; JANOWSKY, D. (1997) **Evidence of preference for a higher concentration sucrose solution in alcoholic men.** *Am J Psychiatric* 154:269-270.

KARL, T.; LIN, S.; SCHWARZER, C.; SAINSBURY, A.; COUZENS, M.; WITTMANN, W.; BOEY, D.; VON HÖRSTEN, S.; HERZOG, H. (2004) **Y1 receptors regulate aggressive behavior by modulating serotonin pathways.** *PNAS* 101:12742-12747.

KASK, A.; HARRO, J. VON HORSTEN, S.; REDROBE, J. P.; DUMONT, Y.; QUIRION, R. (2002) **The neurocircuitry and receptor subtypes mediating anxiolytic-like affects of neuropeptide Y.** *Neurosci Biobehav Rev* 26:259-283.

KHANNA, J. M.; KALANT, H.; CHAU, A. K.; SHARMA, H. (1990) **Initial sensitivity, acute tolerance and alcohol consumption in four inbred strains of rats.** *Psychopharmacology (Berl.)* 101:390-395.

- KIM M. e MCGAUGH J. L. (1992) **Effects of intraamygdala injections of nmda receptor antagonists on acquisition and retention of inhibitory avoidance.** *Brain Res* 585:35-48.
- KIRBY, R. F.; CALLAHAN, M. F.; MCCARTY, R.; JOHNSON, A. K. **Cardiovascular and symphatetic nervous system responses to an acute stressor in Borderline Hypertensive Rats (BHR)** *Physiol Behav* 46:309-313.
- KORTE, S. M. (2001) **Corticosteroids in relation to fear, anxiety and psychopathology.** *Neurosci Biobehav Rev* 25:117–142.
- KOSTEN, T. A.; MISERENDINO, M. J. D.; CHI, S.; NESTLER, E. J. (1994) **Fischer and Lewis rat strain show differential cocaine effects in conditioned place preference and behavioral sensitization but not in locomotor activity or conditioned taste aversion.** *J Pharmacol Exp Ther* 269:137-144.
- KULIKOV, A.; AGUERRE, S.; BERTON, O.; RAMOS, A. MORMÈDE, P.; CHAOULOFF, F. (1997) **Central serotonergic systems in the spontaneously hypertensive and lewis rat strains that differ in the elevated plus-maze test of anxiety.** *J Pharmacol Exp Ther* 281:775-784.
- KUTSUWADA, T.; KASHIWABUCHI, N.; MORI, H.; SAKIMURA, K.; KUSHIYA, E.; ARAKI, K.; MEGURO, H.; MASAKI, H.; KUMANISHI, T.; et al. (1992) **Molecular diversity of the NMDA receptor channel.** *Nature* 358:36-41.
- LAHMAME, A. e ARMARIO, A. (1996) **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 (Berl.)* 123:191-198.
- LANDER, E. e KRUGLYAK, L. (1995) **Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results.** *Nature Genet.* 11: 241-247.
- LANDGRAF, R. e WIGGER, A. **Born to be anxious: neuroendocrine and genetic correlates of trait anxiety in HAB rats.** *Stress* 6: 111-119.
- LANG, P. J.; DAVIS, M.; OHMAN, A. (2000) **Fear and anxiety: Animal models and human cognitive psychophysiology.** *J Affect Disord* 61:137-159.
- LEE, C. e RODGERS, R. J. (1990) **Antinoceptive effects of elevated plus-maze exposure: influence of opiate receptor manipulations.** *Psychopharmacology (Berl.)* 102:507-513.

- LI, T.-K.; HEWITT, B. G.; GRANT, B. F. (2004) **Alcohol use disorders and mood disorders: A national institute on alcohol abuse and alcoholism perspective.** *Biol Psychiatry* 56: 718-720.
- LIANG, T.; SPENCE, J.; LIU, L.; STROTHER, W. N.; CHANG, H. W.; ELLISON, J. A.; LUMENG, L.; LI, T.-K.; FOROUD, T.; CARR, L. G. (2003) **α -Synuclein maps to a quantitative trait locus for alcohol preference and is differentially expressed in alcohol-preferring and-nonpreferring rats.** *PNAS* 100:4690-4695.
- LIEBSCH, G., MONTKOWSKI, A., HOLSBOER, F., AND LANDGRAF, R. (1998). **Behavioural profiles of two Wistar rat lines selectively bred for high and low anxiety-related behaviour.** *Behav Brain Res* 94:301-310.
- LISTER, R. G. (1990) **Ethologically-based animal models of anxiety disorders.** *Pharmacol Ther* 46:321-340.
- LÓPEZ, J. F.; CHALMERS, D. T.; LITTLE, K. Y.; WATSON, S. J. (1998) **Regulation of serotonin_{1A}, glucocorticoid, and mineralocorticoid receptor in rat and human hippocampus: implications for the neurobiology of depression.** *Biol Psychiatry* 43: 547-573.
- LUCKY, I.; SINGH, A.; KREISS, D. S. (1994) **Antidepressant-like behavioral effects of serotonin receptor agonists.** *Neurosci Biobehav Rev* 18:85-95.
- MADSEN, O.; SCALLY, M.; DOUADY, C. J.; KAO, D. J.; DEBRY, R. W.; ADKINS, R.; AMRINE, H. M.; STANHOPE, M. J.; DE LONG, W. W.; SPRINGER, M. S. (2001) **Parallel adaptative radiations in two major clades of placental mammals.** *Nature* 409:610-614.
- MAISONNETTE, S.; MORATO, S.; BRANDAO, M. L. (1993) **Role of resocialization and of 5-HT_{1A} receptor activation on the anxiogenic effects induced by isolation in the elevated plus-maze test.** *Physiol Behav* 54:753-758.
- MANDICH, P.; SCHITO, A. M.; BELLONE, E.; ANTONACCI, R.; FINELLI, P.; ROCCHI, M.; AJMAR, F. (1994) **Mapping of the human nmdar2b receptor subunit gene (grin2b) to chromosome 12p12 .** *Genomics* 22:216-218.
- MARINELLI, P. W.; QUIRION, R.; GIANOULAKIS, C. (2003) **Estradiol valerate and alcohol intake: a comparison between Wistar and Lewis rats and the putative role of endorphins.** *Behav Brain Res* 139:59-67.
- MARON, E.; KUIKKA, J.T.; SHLIK, J.; VASAR, V.; VANNINE, E.; TIIHONEN, J. (2004) **Reduced brain serotonin transporter binding in patients with panic disorder.** *Psychiatric Res: Neuroimaging* 132:173-181.

- MATHIS, C.; PAUL, S. M.; CRAWLEY, J. N. (1994) **Characterization of benzodiazepine-sensitive behaviors in the A/J and C57BL/6J inbred strains of mice.** *Behav Genet* 24:171-180.
- MCKITTRICK, C. R.; BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J.; MCEWEN, B. S.; SAKAI, R. R. (1995) **Serotonin receptor binding in a colony model of chronic social stress.** *Biol Psychiatry* 37:383-393.
- MELTZER, C. C.; PRICE, J. C.; MATHIS, C. A.; BUTTERS, M. A.; ZIOLKO, S. K.; MOSES-KOLKO, E.; MAZUMDAR, S.; MULSANT, B. H.; HOUCK, P. R.; LOPRESTI, B. J.; WEISSFELD, L. A.; REYNOLDS, C. F. (2004) **Serotonin 1A Receptor Binding and Treatment Response in Late-Life Depression.** *Neuropsychopharmacology* 29:2258-2265.
- Merali, Z.; Levac, C.; Anisman, H. (2003) **Validation of a simple, Ethologically relevant paradigm for assessing anxiety in mice.** *Biol Psychiatry* 54:552-565.
- MILLAN, M. J.; MAIOFISS, L.; CUSSAC, D.; AUDINOT, V.; BOUTIN, J.-A.; NEWMAN-TANCREDI, A. (2002) **Differential actions of antiparkinson agents at multiple classes of monoaminergic receptor I. A multivariate analysis of the binding profiles of 14 drugs at 21 native and cloned human receptor subtypes.** *J Pharmacol Exp Ther* 303: 791-804.
- MÖLLER, C.; WIKLUND, L.; SOMMER, W.; THORSELL, A.; HEILIG, M. (1997) **Decreased experimental anxiety and voluntary ethanol consumption in rats following central but not basolateral amygdala lesions.** *Brain Research* 760:94-101.
- MONTGOMERY, K. C. (1955) **The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior.** *J Comp Physiol Psychol* 48:254-260.
- MONYER, H.; SPRENGEL, R.; SCHOEPFER, R.; HERB, A.; HIGUCHI, M.; LOMELI, H.; BURNASHEV, N.; SAKMANN, B.; SEEBURG, P. H. (1992) **Heteromeric NMDA receptors: Molecular and functional distinction of subtypes.** *Science* 256:1217-1221.
- MORATO, S. e CASTRECHINI, P. (1989) **Effects of floor surface and environmental illumination on exploratory activity in the elevated plus-maze.** *Braz J Med Biol Res* 22:707-710.
- MORATO, S. e BRANDÃO, M. L. (1997) **Paradoxical increase of exploratory behavior in the elevated plus-maze by rats exposed to two kinds of aversive stimuli.** *Braz J Med Biol Res* 30:1113-1120.
- MORIN, L. P. (1999) **Serotonin and regulation of mammalian circadian**

rhythmicity. *Ann Med* 31:12-33.

MORMÈDE, P.; MONEVA, E.; BRUNEVAL, C.; CHAOULOFF, F.; MOISAN, M. P. (2002) **Marker-assisted selection of a neuro-behavioural trait related to behavioural inhibition in the SHR strain, an animal model of ADHD.** *Genes Brain Behav* 1:111-116.

MURPHY, W. J.; EIZIRIK, E.; JOHNSON, W. E.; ZHANG, Y. P.; RYDER, O. A.; O'BRIEN, S. J. (2001) **Molecular phylogenetics and the origins of placental mammals.** *Nature* 409:614-618.

NAZAR, M.; JESSA, M.; PLAZNIK, A. (1997) **Benzodiazepine-GABA_A receptor complex ligands in two models of anxiety.** *J Neural Transm* 104:733-746.

OKAMOTO, K. e AOKI, K. (1963) **Development of a strain of Spontaneously Hypertensive Rats.** *Jpn Circ J* 27:282-293.

OLSSON, I. A. S.; NEVISON, C. M.; PATTERSON-KANE, E. G.; SHERWIN, C. M.; VAN DE WEERD, H. A.; WÜRBEL, H. (2003) **Understanding behaviour: the relevance of ethological approaches in laboratory animal science.** *Appl Anim Behav Sci* 81:245-264.

OSSENKOPP, K. P.; SORENSON, L.; MAZMANIAN, D. S. (1994) **Factor analysis of open-field behavior in the rat (*Rattus norvegicus*): application of the three-way PARAFAC model to a longitudinal data set.** *Behav Proc* 31:129-144.

OVERSTREET, D. H.; HALIKAS, J. A.; SEREDENIN, S. B.; KAMPOV-POLEVOY, A. B.; VINGLISKAYA, I. V.; KASHEVSKAYA, O.; BATISHTOV, B. A.; KNAPP, D. J.; MORMÈDE, P.; KIIANMAA, K.; LI, T. K.; REZVANI, A. H. (1997) **Behavioral similarities and differences among alcohol-preferring and – nonpreferring rats: confirmation by factor analysis and extension to additional groups.** *Alcohol Clin Exp Res* 21:840-848.

PANDEY, S. C. (2003) **Anxiety and alcohol abuse disorders: a common role for CREB and its target, the neuropeptide Y gene.** *Trends Pharmacol Sci* 24:456-460.

PARÉ, W. P. (1989) **Stress ulcersusceptibility and depression in Wistar Kyoto (WKY) rats.** *Physiol Behav* 46:993-998.

PARKER, R. M. e HERZOG, H. (1999) **Regional distribution of Y-receptor subtype mRNAs in rat brain.** *Eur J Neurosci* 11:1431-1448.

- PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M. (1985) **Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat.** *J Neurosci Meth* 14:149--167.
- PLAZNIK, A.; PALEJKO W.; NAZAR M.; JESSA M. (1994) **Effects of antagonists at the NMDA receptor complex in two models of anxiety.** *Eur Neuropsychopharmacol* 4:503-512.
- PLOMIN, R.; DEFRIES, J. C.; MCCLEARN, G. E. (1990) **Behavioral genetics a primer**, 2nd edn. New York: W. H. Freeman and Company.
- PINEYRO, G. e BLIER, P. (1999) **Autoregulation of serotonin neurons: role in antidepressant drug action.** *Pharmacol Rev* 51:533-591.
- RAMOS, A.; BERTON, O.; MORMÈDE, P.; CHAOULOFF, F. (1997) **A Multiple Test Study of Anxiety-related Behaviours in Sin Inbred Rat Strains.** *Behav Brain Res* 85:57-69.
- Ramos, A. e MORMÈDE, P. (1998) **Stress and Emotionality: a Multidimensional and Genetic Approach.** *Neurosci Biobehav Rev* 22:33-57.
- RAMOS, A.; MELLERIN, Y.; MORMÈDE, P.; CHAOULOFF, F. (1998) **A Genetic and Multifactorial Analysis of Anxiety-Related Behaviours in Lewis and SHR Intercrosses.** *Behav Brain Res* 96:195-205.
- RAMOS, A; MOISAN, M. P.; CHAOULOFF, F.; MORMÈDE, C.; MORMÈDE, F. (1999) **Identification of Female-Specific QTLs Affecting An Emotionality-Related Behavior in Rats.** *Mol Psychiatry* 4:453-462.
- RAMOS, A.; KANGERSKI, A. L.; BASSO, P. F.; DA SILVA SANTOS, J. E.; ASSREUY, J.; VENDRUSCOLO, L. F.; TAKAHASHI, R. N. (2002) **Evaluation of Lewis and SHR Rat Strains as a Genetic Model for the Study of Anxiety and Pain.** *Behav Brain Res* 129:113-123.
- RAMOS, A.; CORREIA, E. C.; IZIDIO, G. S.; BRUSKE, G. R. (2003) **Genetic selection of two new rat lines displaying different levels of anxiety-related behaviors.** *Behav Genet* 33:657-668.
- RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. (2001) **Farmacologia.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- REDROBE, J. P.; DUMONT, Y.; FOURNIER, A.; QUIRION, R. (2002a) **The neuropeptide y (npy) y1 receptor subtype mediates npy-induced antidepressant-like activity in the mouse forced swimming test.** *Neuropsychopharmacology* 26:615-624.

- REDROBE, J. P.; DUMONT, Y.; QUIRION, R. (2002a) **Neuropeptide Y (NPY) and depression: from animal studies to the human condition.** *Life Sciences* 71:2921-2937.
- Redrobe, J. P.; Dumont, Y.; Herzog, H.; Quirion, R. (2003) **Neuropeptide Y (NPY) Y2 receptors mediate behaviour in two animal models of anxiety: evidence from Y2 receptor knockout mice.** *Behav Brain Res* 141:251-255.
- REGIER, D. A. et al. (1990) **Comorbidity of mental disorders with alcohol and other drug abuse: results from the epidemiologic catchment area (ECA) study.** *J Am Med Assoc* 264:2511-2518.
- REW, D. A. (2004) **The sequencing of the rat genome.** *Eur J Surg Oncol* 30: 905-906.
- REX, A.; SONDERN, U.; VOIGT, J. P.; FRANCK, S.; FINK, H. (1996) **Strain differences in fear-motivated behavior of rats.** *Pharmacol Biochem Behav* 54:107-111.
- RIHMER, Z.; SZADOCZKY, E.; FÜREDI, J.; KISS, K.; PAPP, Z. (2001) **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.
- RODGERS, P. MCKIBBIN, P.E.; WILLIAMS, G. (1991) **Acute fenfluramine administration reduces neuropeptide Y concentrations in specific hypothalamic regions of the rat: possible implications for the anorectic effect of fenfluramine.** *Peptides* 12:251–255.
- RODGERS, R. J.; COLE, J. C.; COBAIN, M. R.; DALY, P.; DORAN, P. J.; EELLS, J. R.; WALLIS, P. (1992) **Anxiogenic-like effects of fluprazine and eltoprazine in the mouse elevated plus-maze: profile comparisons with 8-OH-DPAT, CGS 12066B, TFMP and mCPP.** *Behav Pharmacol* 3:621-634.
- RODGERS, R. J. e COLE, J. C. (1994) **The elevated plus-maze: pharmacology, methodology and ethology.** *Ethology and Psychopharmacology* editado por Cooper, S. J. e Hendrie, C. A. John Wiley & Sons Ltd. 9-43.
- RODGERS, R. J. e COLE, J. C. (1995) **The effects of scopolamine and its quaternary analogue in the murine elevated plus-maze test of anxiety.** *Behav Pharmacol* 6:283-289.
- RODGERS, R. J.; JOHNSON, N. J. T.; CARR, J.; HODGSON, T. P. (1996) **Resistance of experimentally-induced changes in murine plus-maze behaviour to altered retest conditions.** *Behav Brain Res* 86:71-77.

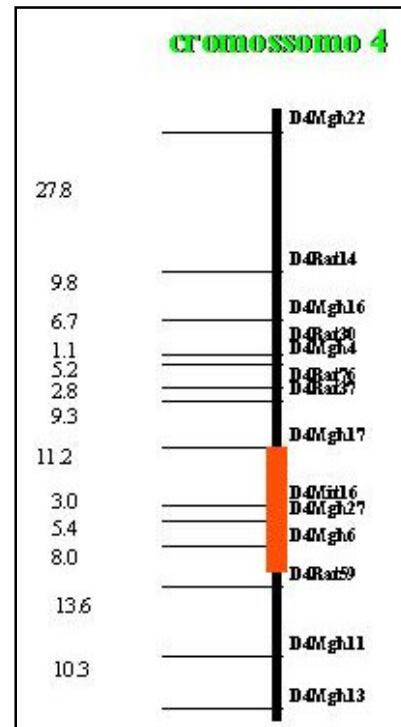
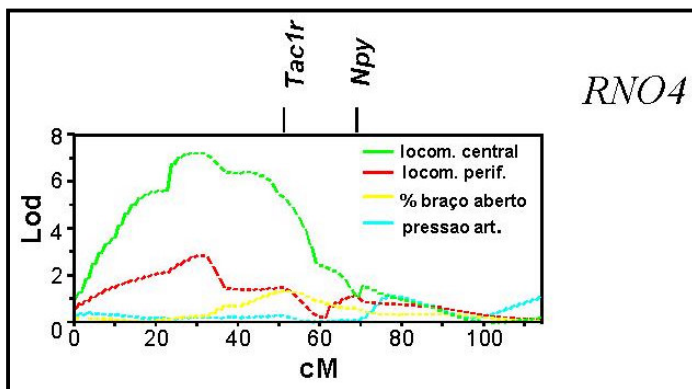
- RODGERS, R. J. e DALVI, A. (1997) **Anxiety, defence and the elevated plus-maze.** *Neurosci Biobehav Rev* 21:801-810.
- RODGERS, R. J.; CAO, B.-J.; DALVI, A.; HOLMES, A. (1997) **Animal models of anxiety: an ethological perspective.** *Braz J Med Biol Res* 30:289-304.
- SAJDYK, T. J. e SHEKHAR, A. (1997) **Excitatory amino acid receptor antagonists block the cardiovascular and anxiety responses elicited by gamma-aminobutyric acidA receptor blockade in the basolateral amygdala of rats.** *J Pharmacol Exp Ther* 283:969-977.
- SAKIMURA, K.; KITSUWADA, T.; ITO, I.; MANABE, T.; TAKAYAMA, C.; KUSHIYA, E.; YAGI, T.; AIZAWA, S.; INOUE, Y.; SUGIYAMA, H.; MISHINA, M. (1995) **Reduced hippocampal LTP and spatial learning in mice lacking NMDA receptor epsilon1 subunit.** *Nature* 373:151-155.
- SANDBERG, D.; DAVID, S.; STEWART, J. (1982) **Effects of estradiol benzoate on the pattern of eating and ethanol consumption.** *Physiol Behav* 29:61-65.
- SAWCHENKO, P. E.; SWANSON, L. W.; STEINBUSCH, H. W.; VERHOFSTAD, A. A. (1983) **The distribution and cells of origin of serotonergic inputs to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat.** *Brain Res* 277:355-360.
- SCHEUER, K.; MARAS, A.; GATTAZ, W. F.; CAIMS, N.; FORSTL, H.; MULLER, W. D. (1996) **Cortical NMDA receptor properties and membrane fluidity altered in Alzheimer's disease.** *Dementia* 7: 210-214.
- SCHMIDTKE, J. I. e HELLER, W. (2004) **Personality, affect and EEG: predicting patterns of regional brain activity related to extraversion and neuroticism.** *Personality and Individual Differences* 36:717-732.
- SCHUCKIT, M. A. (1994) **Low level of response to alcohol as a predictor of future alcoholism.** *Am J Psychiatry* 151:184-189.
- SCHUCKIT, M. A. e HESSELBROCK, V. (1994) **Alcohol dependence and anxiety disorders: what is the relationship?** *Am J Psychiatry* 151:1723-1734.
- SHADER, R. I. e GREENBLATT, D. J. (1993) **Use of benzodiazepines in anxiety disorders.** *New Engl J Med* 328:1398-1405.
- SHIMIZU, H. e BRAY, G. A. (1989) **Effects of neuropeptide Y on norepinephrine and serotonin metabolism in rat hypothalamus in vivo.** *Brain Res Bull* 22:945-950.

- SIMON, P.; DUPUIS, R.; COSTENTIN, J. (1994) **Thigmotaxis as an index of anxiety in mice. Influence of dopaminergic transmissions.** *Behav Brain Res* 61:59-64.
- SMIALOWSKA, M.; BAJKOWSKA, M.; HEILIG, M.; OBUCHOWICZ, E.; TURCHAN, J.; MAJ, M.; PRZEWLOCKI, R. (2001) **Pharmacological studies on the monoaminergic influence on the synthesis and expression of neuropeptide Y and corticotropin releasing factor in rat brain amygdala.** *Neuropeptides* 35:82-91.
- SMYTHE, J. W.; MURPHY, D.; BHATNAGAR, S.; TIMOTHY, C.; COSTALL, B. (1996) **Muscarinic antagonists are anxiogenic in rats tested in the black-white box.** *Pharmacol Biochem Behav* 54:57-63.
- SÖDERPALM, A. H. V. e HANSEN, S. (1999) **Alcohol Alliesthesia: Food Restriction Increases the Palatability of Alcohol Through a Corticosterone-Dependent Mechanism.** *Physiol Behav* 67:409-415.
- SPANAGEL, R.; MONTKOWSKI, A.; ALLINGHAM, K.; STÖHR, T.; SHOAB, M.; HOLSBOER, F.; LANDGRAF, R. (1995) **Anxiety: a potential predictor of vulnerability to the initiation of ethanol self-administration in rats.** *Psychopharmacology (Berl.)* 122:369-373.
- STECKLER, T. (2001) **The molecular neurobiology of stress--evidence from genetic and epigenetic models.** *Behav Pharmacol* 12:381-427.
- STERNBERG, E. M.; GLOWA, J. R.; SMITH, M. A.; CALOGERO, A. E.; LISTWAK, S. J.; AKSENTIJEVICH, S.; CHROUSOS, G. P.; WILDER, R. L. E GOLD, P. W. (1992) **Corticotropin Releasing Hormone related behavioural and neuroendocrine responses to stress in Lewis and Fischer rats.** *Brain Res* 570:54-60.
- STEWART, R. B.; GATTO, G. J.; LUMENG, L.; LI, T. K.; MURPHY, J. M. (1993) **Comparison of alcohol-preferring (P) and nonpreferring (NP) rats on tests of anxiety and for the anxiolytic effects of ethanol.** *Alcohol* 10:1-10.
- STOGNER, K. A. e HOLMES, P. V. (2000) **Neuropeptide-Y exerts antidepressant-like effects in the forced swim test in rats.** *Eur J Pharmacol* 387:R9-R10.
- STÖHR, T.; SZURAN, T.; PLISKA, V.; FELDON, J. (1999) **Behavioural and hormonal differences between two Lewis rat lines.** *Behav Brain Res* 101:163-172.

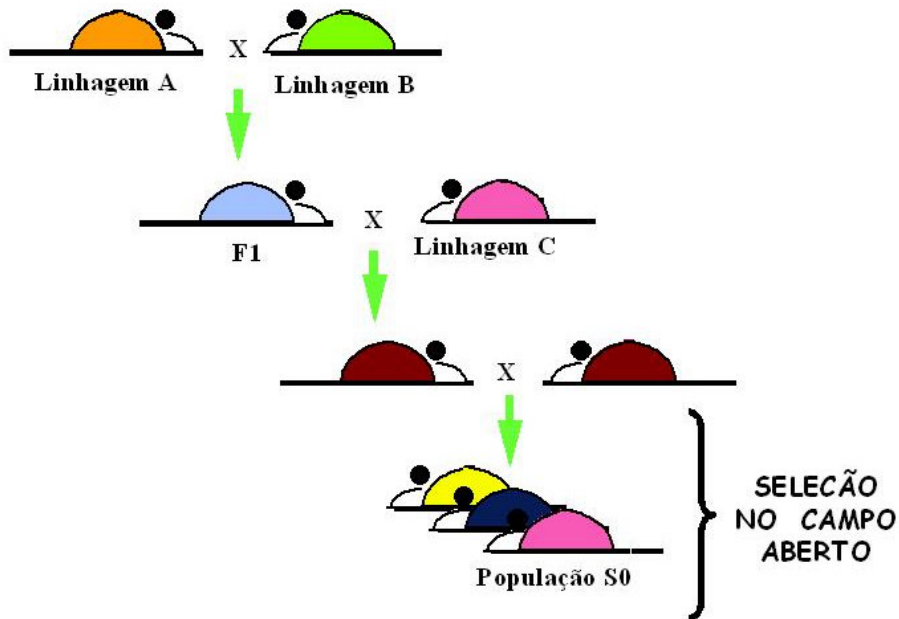
- STORK, O.; KOJIMA, N.; STORK, S.; KUME, N.; OBATA, K. (2002) **Resistance to alcohol withdrawal-induced behaviour in fyn transgenic mice and its reversal by ifenprodil.** *Mol Brain Res* 105: 126-135.
- SUZUKI, T.; OTANI, K.; KOIKE, Y.; MISAWA, M. (1988a) **Genetic differences in preferences for morphine and codeine in Lewis and Fischer 344 inbred rat strains.** *Japn J Pharmacol* 47:425-31.
- SUZUKI, T.; GEORGE, F. R.; MEISCH, R. A. (1988b) **Differential establishment and maintenance of oral ethanol reinforced behavior in Lewis and Fischer 344 inbred rat strains.** *J Pharmacol Exp Ther* 245:164-170.
- TAKAHASHI, R. N.; BERTON, O.; MORMÈDE, P.; CHAOULOFF, F. (2001) **Strain-dependent effects of diazepam and the 5-HT_{2B/2C} receptor antagonist SB 206553 in spontaneously hypertensive and Lewis rats tested in the elevated plus-maze.** *Braz J Med Biol Res* 34:675-682.
- TECOTT, L. H. (2003) **The Genes and Brains of Mice and Men.** *Am J Psychiatry* 160:646-656.
- TERENINA-RIGLADIE, E.; JONES, B. C.; MORMÈDE, P. (2003a) **Pleiotropic effect of a locus on chromosome 4 influencing alcohol drinking and emotional reactivity in rats.** *Genes Brain Behav* 2:125-131.
- TERENINA-RIGLADIE, E.; MOISAN, M.-P.; COLAS, A.; BEAUGÉ, F.; SHAH, K. V.; JONES, B. C.; MORMÈDE, P. (2003b) **Genetics of behaviour: phenotypic and molecular study of rats derived from high- and low-alcohol consuming lines.** *Pharmacogenetics* 13:543-554.
- The International Human Genome Mapping Consortium (2001) **A physical map of the human genome.** *Nature* 409:934–941.
- THIELE, T. E., MARSH, D. J.; MARIE, L. S.; BERNSTEIN, I. L.; PALMITER, R. D. (1998) **Ethanol consumption and resistance are inversely related to neuropeptide Y levels.** *Nature* 396:366–369.
- TIMMERMAN, W.; CISCI, G.; NAP, A.; DE VRIES, J. B.; WESTERNINK, B. H. C. (1999) **Effects of handling on extracellular levels of glutamate and other amino acids in various areas of the brain measured by microdialysis.** *Brain Res* 833: 150-160.
- TOYE, A. A. e COX, R. (2001) **Behavioral Genetics: Anxiety Under Interrogation.** *Curr Biol* 11:473-476.
- TOTH, M. (2003) **5-HT_{1A} receptor knockout mouse as a genetic model of anxiety.** *Eur J Pharmacol* 463:177-184.

- TREIT, D. (1985) **Animal models for the study of anti-anxiety agents, a review.** *Neurosci Biobehav Rev* 9:203-222.
- TREIT, D. e FUNDYTUS, M. (1989) **Thigmotaxis as a test for anxiolytic activity in rats.** *Pharmacol Biochem Behav* 31:59-962.
- TREIT, D.; MENARD, J.; ROYAN, C. (1993) **Anxiogenic Stimuli in the Elevated Plus-Maze.** *Pharmacol Biochem Behav* 44:463-469.
- TRULLAS, R. e SKOLNICK, P. (1993) **Differences in fear motivated behaviors among inbred mouse strains.** *Psychopharmacology (Berl.)* 44:463-469.
- TUOMINEN, K.; HILAKIVI, L. A.; PAIVARINTA, P.; KORPI, E. R. (1990) **Behavior of alcohol-preferring AA and alcohol-avoiding ANA rat lines in tests of anxiety and aggression.** *Alcohol* 7:349-353.
- TURRI, M. G.; DATTA, S. R.; DEFRIES, J.; HENDERSON, N. D.; FLINT, J. (2001) **QTL analysis identifies multiple behavioral dimensions in ethological tests of anxiety in laboratory mice.** *Curr Biol* 11:725-734.
- VAN DER STAAY, F. J. e STECKLER, T. (2002) **The fallacy of behavioral phenotyping without standardisation.** *Genes Brain Behav.* 1, 9-13.
- VAN ZUTPHEN, L. F. M.; BAUMANS, V.; BEYNEN, A. C. (2001) **Principles of Laboratory Animal Science. A contribution to the Humane Use and Care of Animals and to the Quality of Results.** *Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.*
- VENDRUSCOLO; L. F.; TAKAHASHI, R. N.; BRUSKE, G. R.; RAMOS, A. (2003) **Evaluation of the anxiolytic-like effect of NKP608, a NK1-receptor antagonist, in two rat strains that differ in anxiety-related behaviors.** *Psychopharmacology (Berl.)* 170:287-293.
- VENTER, J. C.; ADAMS, M. D.; MYERS, E. W.; LI, P. W.; MURAL, R. J.; SUTTON, G. G.; SMITH, H. O.; YANDELL, M.; EVANS, C. A.; HOLT, R. A.; GOCAYNE, J. D.; AMANATIDES, P.; BALLEW, R. M.; HUSON, D. H.; WORTMAN, J. R.; ZHANG, Q.; KODIRA, C. D.; ZHENG, X. H.; CHEN, L.; SKUPSKI, M. (2001) **The Sequence of the Human Genome.** *Science* 291:1304-1351.
- VIGLINSKAYA, I. V.; OVERSTREET, D. H.; KASHEVSKAYA, O. P.; BADISHTOV, B. A.; KAMPOV-POLEVOY, A. B.; SEREDENIN, S. B.; HALIKAS, J. A. (1995) **To drink or not to drink: tests of anxiety and immobility in alcohol-preferring and alcohol-nonpreferring rat strains.** *Physiol Behav* 57:937-941.

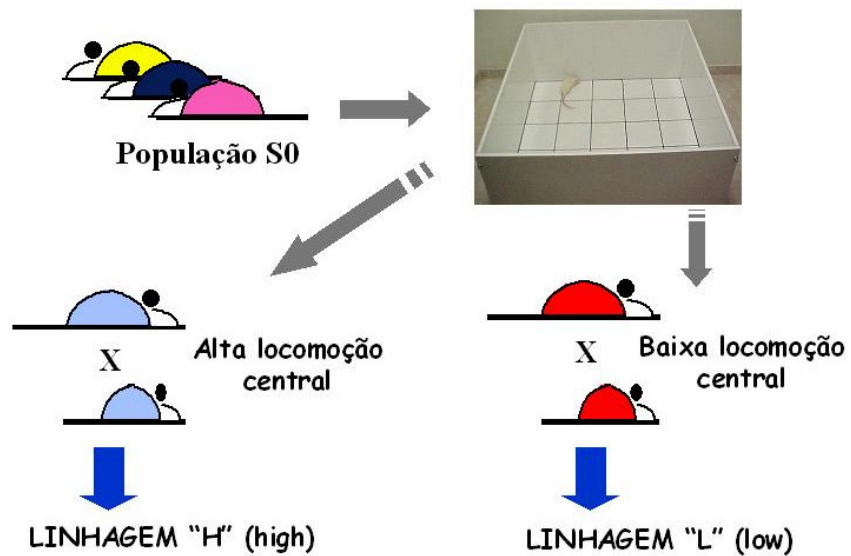
- WAHLSTEN, D.; METTEN, P.; PHILIPS, T. J.; BOEHM II, S. L.; BURKHART-KASCH, S.; DOROW, J.; DOERKSEN, S.; DOWNING, C.; FOGARTY, J.; RODD-HENRICKS, K.; HEN, R.; MCKINNON, C. S.; MERRILL, C. M.; NOLTE, C.; SCHALOMON, M.; SCHLUMBOHM, J. P.; SIBERT, J. R.; WENGER, C. D.; DUDEK, B. C.; CRABBE, J. C. (2003) **Different Data from Different Labs: Lessons from Studies of Gene-Environment Interaction.** *J Neurobiol* 54:283-311.
- WALDBILLIG, R. J.; BARTNESS, T. J.; STANLEY, B. G. (1981) **Increased food intake, body weight, and adiposity in rats after regional neurochemical depletion of serotonin.** *J Comp Physiol Psychol* 95:391-405.
- WALSH, R. N. e CUMMINS, R. A. (1976) **The open field test: a critical review.** *Psychol Bull* 83:482-504.
- WANG, Y. H.; BOSY, T. Z.; YASUDA, R. P.; GRAYSON, D. R.; VICINI, S.; PIZZORUSSO, T.; WOLFE, B. B. (1995) **Characterization of NMDA receptor subunit-specific antibodies: distribution of NR2A and NR2B receptor subunits in rat brain and ontogenic profile in the cerebellum.** *J Neurochem* 65:176-183.
- WATANABE, Y.; SAKAI, R. R.; MCEWEN, B. S.; MENDELSON, S. (1993) **Stress and antidepressant effects on hippocampal and cortical 5-HT_{1A} and 5-HT₂ receptors and transport sites for serotonin.** *Brain Res* 615:87-94.
- WILEY, J. L.; CRISTELLO, A. F.; BALSTER, R. L. (1995) **Effects of site selective NMDA receptor antagonists in an EPM model of anxiety in mice.** *Eur J Pharmacol* 294: 101-107.
- WILLIAMS, G.; BING, C.; CAI, X. J.; HARROLD, J. A.; KING, P. J.; LIU, X. H. (2001) **The hypothalamus and the control of energy homeostasis Different circuits, different purposes.** *Physiol Behav* 74:683-701.
- WISSINK, S.; MEIJER, O.; PEARCE, D. VAN DER BURG, B.; VAN DER SAAG, P. T. (2000) **Regulation of the rat serotonin-1A receptor gene by corticosteroids.** *J Biol Chem* 275:1321-1326.
- WOOD, S. e TOOTH, M. (2001) **Molecular pathways of anxiety revealed by knockout mice.** *Mol Neurobiol* 23:101-119.
- WURBEL, H. (2002) **Behavioral phenotyping enhanced-beyond (environmental) standardisation.** *Genes Brain Behav* 1:3-8.
- YEREVANIAN, B.; KOEK, R. J.; RAMDEV, S. (2001) **Anxiety disorders comorbidity in mood disorder subgroups:data from a mood disorders clinic.** *Journal of Affective Disorders* 67:167-173.



Anexo 1- QTL identificado por Ramos *et al.* (1999) para locomoção central no campo aberto (à esquerda). Região genômica correspondente a este QTL no cromossomo 4 do rato (à direita) que serviu de base para a escolha de dois genes candidatos avaliados neste estudo (NPY e Grin2b).



Anexo 2- Processo de origem das linhagens Floripa H e L. Linhagem A= Wistar, linhagem B= Hooded, linhagem C= Lewis.



Anexo 3- Processo de seleção das linhagens Floripa H e L. Cinco casais são selecionados a cada geração.