

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**  
**Centro de Ciências Biológicas**  
**Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética**  
**Laboratório de Genética do Comportamento**

**Gabriela Ferreira de Medeiros**

**DESENVOLVIMENTO DE UMA**  
**LINHAGEM CONGÊNICA PARA O *LOCUS Ofil1*, LOCALIZADO NO**  
**CROMOSSOMO 4 DO RATO (*Rattus norvegicus*)**

**Florianópolis,**  
**2009**

**Gabriela Ferreira de Medeiros**

**DESENVOLVIMENTO DE UMA  
LINHAGEM CONGÊNICA PARA O *LOCUS Ofil1*, LOCALIZADO NO  
CROMOSSOMO 4 DO RATO (*Rattus norvegicus*)**

**Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
à Coordenadoria do Curso de Graduação em  
Ciências Biológicas da Universidade Federal  
de Santa Catarina como requisito parcial  
para a conclusão do curso.**

**Orientador: Prof. Dr. André de Avila Ramos  
Co-orientador: Elayne Pereira**

**Florianópolis,  
2009**

## AGRADECIMENTOS

Expresso aqui meus sinceros agradecimentos a todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho. Nestes quase cinco anos de vida acadêmica, foram muitas as pessoas que cruzaram o meu caminho, dentro e fora desta universidade, muitas permanecendo comigo até hoje.

Agradeço primeiramente ao Professor André Ramos, pela disponibilidade em me receber em seu laboratório assim que manifestei interesse, pelos incentivos e inspiração para a permanência no meio científico, e, sobretudo, pela confiança a mim dispensada durante estes quase dois anos no LGC.

À Elayne, que me acompanhou desde meus primeiros passos no LGC, me ensinando, apoiando, aconselhando... Que além de co-orientadora, foi uma grande parceira nas atividades do laboratório e de fora dele, e, acima disso, uma amiga, com quem pude contar sempre que precisei.

À todos os demais colegas do laboratório. À Thaize, com quem tive tantas conversas filosóficas acerca do mundo científico (e, muitas vezes, do não-científico também). Ao John, por ter me ajudado a conhecer melhor ao nosso modelo animal, pelo companheirismo e ajuda durante nossos experimentos, e por cuidar dos nossos biotérios com muito profissionalismo e carinho. Ao Gus, pela disposição em ajudar, obrigada por todos os galhos quebrados. À Letícia por toda a ajuda, principalmente na genotipagem dos animais. Ao Leandro, o mais novo membro do laboratório, ao qual não dediquei o tempo merecido devido à correria da construção deste TCC, mas a quem eu espero ter conseguido mostrar um pouquinho do “maravilhoso mundo da ciência” que eu vejo em nosso laboratório. E ao Geison, um dos ministrantes do curso que me fez conhecer o LGC, e que, mesmo não estando mais no laboratório, permanece nos apoiando quando precisamos.

Às poucas pessoas do curso com quem tive contato mais próximo. À Cris, onde quer que ela esteja, de quem sinto saudades e espero rever logo. À Fernanda, acho que a mais bem sucedida de nós, que continue com todo o sucesso no mundo profissional, e que volte pra Floripa de vez em quando... À Maíra, com quem dividi a maior parte das disciplinas, apesar dos

altos e baixos. Aos demais colegas de curso, apesar do pouco contato, e a todos os professores, que contribuíram para a minha ampla visão sobre o mundo natural, característica dos biólogos.

À toda a minha família, principalmente aos meus pais e ao Ro, pelo carinho e apoio incondicional. Que revisaram, mesmo não sendo da área, vários dos meus trabalhos e projetos (inclusive este). Que aturaram e até participaram das minhas conversas de bióloga. Que se preocuparam, me aconselharam, e, sobretudo, confiaram em mim. Sou eternamente grata a vocês.

E por último, mas nem um pouco menos importante, ao Wi, que deve ter sido quem mais ouviu minhas reclamações e desabaços. Obrigada por ter sido um ótimo ouvinte, por compreender os meus períodos de falta de tempo, pelos conselhos, pelo amor e atenção, além de todas as outras coisas que fazes por mim, mesmo sem saber.

*Não há nada mais excitante que a ciência. Você se diverte muito só ficando sentado, quieto, anotando números, prestando atenção... A ciência tem isso tudo!*

Diretor Seymour Skinner, Os Simpsons

## RESUMO

Os transtornos de ansiedade são altamente prevalentes, estimando-se que mais de 12% da população irá ser afetada por algum transtorno de ansiedade ao longo da vida. Agregações familiares foram documentadas para todos os principais transtornos de ansiedade, sendo os fatores genéticos os principais responsáveis por estas agregações. Um inter cruzamento entre as linhagens isogênicas de ratos Lewis (LEW) e espontaneamente hipertensos (SHR), contrastantes em comportamentos relacionados à emocionalidade, possibilitou a identificação de um QTL (*Quantitative Trait Locus*) no cromossomo 4 chamado *Ofill*, com influência na locomoção central do campo aberto, um índice experimental de ansiedade (Ramos et al, 1999). Desde 2005, a construção de uma linhagem congênica, a partir de uma dinâmica de cruzamentos entre a linhagem LEW (doadora) e SHR (receptora), está sendo realizada para refinar o estudo do *locus Ofill*. O presente trabalho teve como objetivo finalizar a construção de uma linhagem de rato congênica para o *locus Ofill*, a partir da geração N8, com o intuito de confirmar o envolvimento desta região com comportamentos relacionados à ansiedade, utilizando-se os testes comportamentais do campo aberto (CA) e da caixa branca e preta (CBP), e ao mesmo tempo delimitar fisicamente a região analisada, facilitando assim uma futura busca por genes candidatos para este fenótipo. A genotipagem dos animais foi realizada utilizando-se os marcadores moleculares microssatélites D4Mgh6, D4Rat76, D4Mgh11 e D4Rat59 (este último utilizado apenas na geração N10 “homozigota”), localizados na região do *Ofill*. Os animais heterozigotos LEW-SHR e homozigotos SHR-SHR (controles) das gerações N8, N9 e N10 para os três marcadores, bem como os homozigotos da geração N10 “homozigota” para o marcador D4Mgh6 e os controles LEW e SHR puros, foram testados no CA e na CBP, e os resultados analisados utilizando a ANOVA de duas vias (sexo e genótipo). O resultado esperado foi encontrado apenas para o tempo gasto no centro do CA pelos N10 “homozigotos”, para o tempo gasto no compartimento branco da CBP pelos animais da geração N8 e para o número de transições entre os compartimentos da CBP pelas fêmeas da geração N9. A presença de poucos resultados no sentido esperado provavelmente se deve a um efeito aditivo pequeno dos alelos LEW nas gerações heterozigotas e/ou à heterogeneidade dos animais testados na N10 “homozigota” em relação aos demais marcadores. Pode-se ainda considerar uma perda, ao longo da construção

desta linhagem, da região do *Ofill* responsável pelos fenótipos observados por Ramos e colaboradores (1999), apesar da pequena probabilidade deste evento. Em conclusão, os resultados deste trabalho devem apenas servir como uma prévia do perfil comportamental que poderá ser observado ao analisarmos animais homozigotos LEW para toda a região do *Ofill*, sendo o término da construção da linhagem congênica aqui proposta necessário para uma avaliação adequada dos efeitos do *locus Ofill* sobre os comportamentos relacionados à ansiedade em ratos.

**Palavras-chave: Ansiedade, emocionalidade, comportamento, ratos LEW e SHR, linhagens congênicas, cromossomo 4 do rato.**

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>8</b>
	1.1 O Uso do Rato Como Modelo Comportamental	8
	1.2 A Identificação do QTL <i>Ofil1</i>	11
	1.3 Linhagens Congênicas e o Refinamento da Região do <i>Ofil1</i>	12
	1.4 Hipótese	14
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>15</b>
	2.1 Objetivos Gerais	15
	2.2 Objetivos Específicos	15
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>16</b>
	3.1 Animais	16
	3.2 Construção dos Animais Congênicos	16
	3.3 Genotipagem	17
	3.4 Testes Comportamentais	20
	3.4.1 Teste do Campo Aberto	20
	3.4.2 Teste da Caixa Branca e Preta	21
	3.5 Análise Estatística	22
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>24</b>
	4.1 Genotipagem	24
	4.2 Animais Produzidos e Testados	25
	4.2.1 Gerações N8, N9 e N10 no Teste do Campo Aberto	26
	4.2.2 Gerações N8, N9 e N10 no Teste da Caixa Branca e Preta	28
	4.2.3 Geração N10 “Homozigota” no Teste do Campo Aberto	30
	4.2.4 Geração N10 “Homozigota” no Teste da Caixa Branca e Preta	32
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>35</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>40</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>41</b>



## 1. INTRODUÇÃO

A ansiedade é um estado que se desenvolve em antecipação a uma ameaça ou perigo e que ajuda na adaptação do organismo ao seu meio, promovendo a vigília e facilitando comportamentos de fuga, sendo, em sua forma normal, parte das experiências emocionais humanas (GROSS; HEN, 2004). Ao mesmo tempo em que pode ser protetora, a ansiedade excessiva pode ser desabilitante para o indivíduo, ocasionando diversos sintomas físicos e psicológicos (GORDON; HEN, 2004), caracterizando um quadro de ansiedade patológica. Os transtornos de ansiedade são altamente prevalentes, correspondendo a cerca de 25% dos transtornos psiquiátricos diagnosticados (GRIEZ et al., 2001), e se encontram associados a um considerável número de outros quadros (SOMERS et al., 2006), tais como enxaqueca (BASKIN; SMITHERMAN, 2009), doenças auto-imunes da tireóide (CARTA et al., 2004) e, sobretudo, à depressão (MALSEN; OLIVIER; KAS, 2008). Além disso, indivíduos portadores de transtornos de ansiedade tendem a ter uma diminuição da qualidade de vida e uma série de impedimentos funcionais (RAPAPORT et al., 2005). Sabe-se que tanto os traços normais de ansiedade quanto os transtornos de ansiedade são influenciados pela interação complexa entre fatores genéticos e ambientais (LESCH, 2001).

### 1.1 O Uso do Rato Como Modelo Comportamental

O rato de laboratório (*Rattus norvegicus*) foi a primeira espécie de mamífero “domesticada” para o uso na pesquisa, e vem sendo utilizado em estudos científicos há mais de 150 anos, tornando-se o modelo animal mais amplamente estudado na pesquisa biomédica (JACOB, 1999). Devido ao seu tamanho, à fácil manipulação e a outras características referentes à sua criação, tem sido o modelo animal escolhido em diversas áreas da pesquisa, tais como a bioquímica, a neurobiologia, o comportamento, a fisiologia e a farmacologia (AITMAN et al., 2008; JACOB, 1999). Alguns aspectos clínicos envolvidos em uma série de doenças são melhor “mimetizados” pelo rato do que pelo camundongo, particularmente em doenças

neurodegenerativas e transtornos que afetam funções cerebrais complexas, como esquizofrenia, ansiedade, depressão e adição (SMITS; CUPPEN, 2006).

Modelos animais têm sido utilizados como ferramenta de rastreamento na procura de compostos com potencial terapêutico e como simulação na pesquisa sobre os mecanismos envolvidos nos comportamentos emocionais (RODGERS et al., 1997). Os mais diversos fenótipos psiquiátricos tem sido estudados através deste modelo, como o transtorno do déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) (HOWELLS; BINDEWALD; RUSSELL, 2009), a dependência a drogas (FELTENSTEIN; DO; SEE, 2009), a depressão (TIZABI et al., 2009), entre outros. Na ausência de medidas objetivas e diretas da emocionalidade em animais, por se tratar de um conceito que envolve componentes subjetivos, os pesquisadores tendem a inferir o estado emocional do animal a partir de manifestações que possam ser medidas, tais como suas respostas comportamentais e fisiológicas (RAMOS; MORMÈDE, 1998). Algumas destas manifestações apresentadas pelos ratos em diferentes testes comportamentais permitem estabelecer um paralelo, mesmo que limitado, com a ansiedade não patológica em humanos, o que faz deste animal um bom modelo para estudos comportamentais relacionados à ansiedade. Apesar disso, não é possível afirmar que um determinado animal seja ou esteja “ansioso”, uma vez que a ansiedade é uma emoção tipicamente humana. Portanto, neste trabalho, quando nos referirmos a um animal como mais “ansioso” ou menos “ansioso”, estaremos nos referindo à maior ou menor observação, durante os testes comportamentais, de determinados fenótipos que têm sido usados na literatura como índices experimentais de ansiedade (e que possivelmente também possuem funções e mecanismos comuns), e não à emoção humana propriamente dita.

Nos últimos anos, o rato, que até então era visto principalmente como um modelo para estudos fisiológicos, vem sendo cada vez mais utilizado como modelo genético. Juntamente com estudos “mecanicistas”, o desenvolvimento de estratégias genéticas que correlacionem os parâmetros biológicos estudados no rato com o seu genoma, recentemente seqüenciado, permitirá melhor traduzir os resultados experimentais obtidos com o rato para o ser humano, através da genômica comparativa, o que deverá acelerar a melhoria dos cuidados de saúde e o avanço das pesquisas biomédicas (LAZAR et al., 2005).

Após o desenvolvimento da primeira linhagem isogênica (composta por indivíduos geneticamente idênticos) de ratos, por King em 1909, mais de quinhentas linhagens isogênicas (ou *inbred*) foram desenvolvidas e estudadas em relação a diversos fenótipos

bioquímicos e fisiológicos, constituindo modelos de diferentes doenças (AITMAN et al., 2008), tais como encefalomielite auto-imune (STEFFERL et al., 1999), diabetes (SHINOHARA et al., 2000), artrite (TRENTHAM; TOWNES; KANG, 1977) e doenças cardiovasculares (KODAVANTI et al., 2000). Ao perceber o potencial do rato como modelo para o entendimento da biologia básica e dos processos de saúde e doença em humanos, os US National Institutes of Health (NIH) lançaram o Projeto Genoma do Rato em 1995, que, em conjunto com projetos lançados posteriormente, produziu uma variedade de recursos genômicos básicos e forneceu poderosas ferramentas que facilitaram o estudo comparativo entre modelos animais e humanos. Em 1999, o US National Heart, Lung and Blood Institute (NHLBI) promoveu um encontro que tinha como temática o uso do rato como modelo animal, no qual se reconheceu a necessidade de fundar uma base de dados que reunisse informações acerca do genoma do rato, posteriormente denominada Rat Genome Database (RGD) (AITMAN et al., 2008). O RGD constitui um importante recurso para os pesquisadores que utilizam o rato como modelo genético, coletando, consolidando e integrando as informações geradas em pesquisas genéticas e genômicas sobre o rato, e as disponibilizando para a comunidade científica. Dentre os diferentes recursos disponíveis nesta base de dados, é possível pesquisar os QTL (*quantitative trait loci*, ou *loci* para características quantitativas) e genes já identificados para os mais diversos fenótipos, além de realizar comparações entre regiões homólogas entre ratos, camundongos e humanos.

Duas linhagens podem diferir ou até mesmo ser contrastantes em relação à expressão de um determinado fenótipo. Quando submetidas às mesmas condições ambientais, pode-se dizer que as diferenças médias encontradas entre estas linhagens são de origem genética. As linhagens Roman High-(RHA) e Low-(RLA) Avoidance, contrastantes em relação ao comportamento de esquiva (BIGNAMI, 1965), e as linhagens Floripa H e L (RAMOS et al., 2003), que diferem em relação à locomoção na área central do teste do campo aberto (CA), são exemplos de linhagens contrastantes em relação a um fenótipo comportamental. Através de uma bateria de testes comportamentais utilizando seis linhagens isogênicas de rato, Ramos e colaboradores (1997) encontraram que as linhagens Lewis (LEW) e Spontaneously Hypertensive Rats (SHR) são contrastantes em relação a diversos comportamentos interpretados como índices experimentais de ansiedade, uma vez que tais comportamentos responderam ao tratamento com drogas ansiolíticas. No trabalho mencionado, os animais da linhagem SHR mostraram maior aproximação aos estímulos aversivos de diversos testes em relação aos da linhagem LEW, que

exibiram um perfil mais “ansioso”. Esse contraste foi posteriormente atribuído a fatores genéticos, através de um estudo feito com o inter cruzamento de animais das duas linhagens, nascidos, criados e testados simultaneamente, sob as mesmas condições ambientais, e sendo demonstrada a ausência de efeitos maternos e das avós nos comportamentos avaliados (RAMOS et al., 1998).

## 1.2 A Identificação do QTL *Ofil1*

Existem evidências bastante convincentes de que a ansiedade e outros transtornos relacionados sejam influenciados por fatores ambientais e genéticos, sendo estes altamente complexos, poligênicos e epistáticos (LESCH, 2001). Agregações familiares foram documentadas para todos os principais transtornos de ansiedade, com estudos comparativos entre gêmeos monozigóticos e dizigóticos apontando os fatores genéticos como os principais responsáveis por estas agregações, acompanhados por uma influência do ambiente compartilhado não tão significativa (HETTEMA; NEALE; KENDLER, 2001).

QTL podem ser definidos como regiões ao longo do genoma contendo genes capazes de influenciar determinadas características quantitativas, que variam de maneira contínua na população, como o peso e a altura, por exemplo. A análise de QTL é frequentemente utilizada na identificação de regiões envolvidas em características comportamentais complexas (LANDER; SCHORK, 1994). QTL foram descritos em ratos para diversos fenótipos, tais como o peso do fígado (SEDA et al., 2005), resistência a tumores mamários (SAMUELSON et al., 2003), níveis de proteína na urina (GARRETT; JOE; YERGA-WOOLWINE, 2006) e pressão arterial sistólica (SHIOZAWA et al., 2000). QTL também já foram descritos em ratos para fenótipos comportamentais, como o consumo de álcool (BICE et al., 1998) e a depressão (SOLBERG et al., 2004), por exemplo.

O primeiro QTL descrito para a emocionalidade em ratos foi mapeado e identificado por Ramos e colaboradores (1999), utilizando uma geração F2 (população segregante) proveniente de um inter cruzamento entre as linhagens isogênicas de ratos LEW e SHR. O QTL em questão está localizado no cromossomo 4 e tem uma forte influência na

locomoção central no teste do CA (um índice experimental de ansiedade), sendo então chamado de *Ofil1* (*open field inner locomotion 1*). O *locus Ofil1* é atualmente denominado pelo *Rat Genome Database* (MEDICAL COLLEGE OF WISCONSIN, 2008) *Anxiety related response QTL 16*, ou *Anxrr16*. A partir de uma busca realizada no RGD em setembro de 2009, foi possível localizar vinte e seis QTL, incluindo o *Anxrr16*, já identificados no genoma do rato para comportamentos relacionados à ansiedade, e que se encontram distribuídos em diferentes cromossomos (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 15, 18 e 19). Dentre os QTL localizados, o *Anxrr16* possui o segundo maior *lod score* (7.22), teste estatístico que permite estimar a ligação entre determinadas características e marcadores moleculares.

### 1.3 Linhagens Congênicas e o Refinamento da Região do *Ofil1*

Em estudos que visam identificar QTL, é comum a utilização de gerações segregantes (F2 ou retrocruzamentos) oriundas de duas linhagens isogênicas contrastantes em relação a algum fenótipo escolhido. Os métodos clássicos para a identificação de QTL, envolvendo fenotipagem e genotipagem de populações segregantes, têm um baixo poder de resolução e acabam por mapear *loci* que correspondem a regiões cromossômicas muito extensas. Logo, após análises iniciais de QTL, são necessárias outras estratégias para se refinar o mapa do *locus* em estudo. A construção de uma linhagem congênica permite, através de retrocruzamentos (cruzamentos realizados entre os descendentes de cada geração com uma das linhagens parentais), que um QTL proveniente de uma das linhagens parentais esteja presente em um genoma quase que inteiramente constituído por material genético da outra linhagem parental.

Diversos estudos têm utilizado linhagens congênicas para analisar a influência de determinado *locus* em um fenótipo de interesse, como, por exemplo, a hipertensão (SAAD et al., 2007), a síndrome cardio-metabólica (WALLIS et al., 2008) e a função renal (GARRETT et al., 2007), e, em relação a fenótipos comportamentais, o consumo de álcool (CARR et al., 2006) e o transtorno do déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) (KAMIMURA et al., 2001). A construção dessas linhagens inicia com o cruzamento entre duas linhagens parentais contrastantes para um dado fenótipo, sendo uma das linhagens a doadora do *locus* de interesse e a outra a

receptora, gerando uma geração F1. Em seguida, realizam-se sucessivos retrocruzamentos destes animais com a linhagem parental receptora, selecionando-se ao longo das gerações animais heterozigotos que possuam a região de interesse (também chamada de *locus* diferencial) da linhagem doadora para serem novamente retrocruzados. Cada geração originada por retrocruzamento em uma linhagem congênica é simbolizada pelo número da geração (em relação às linhagens parentais) precedido da letra N.

Durante a construção de uma linhagem congênica, os retrocruzamentos são repetidos por ao menos dez gerações (ARMSTRONG; VOGEL; HAWKES, 2005) o que leva cerca de três a quatro anos. Após cada retrocruzamento, ocorre a perda de aproximadamente 50% do material genético da linhagem doadora, ficando o genoma da linhagem em desenvolvimento cada vez mais semelhante ao da linhagem receptora, exceto pelo *locus* de interesse, proveniente da linhagem doadora. A porcentagem do genoma proveniente da linhagem receptora ao longo das gerações está ilustrada na Figura 1. Após a décima geração, indivíduos heterozigotos para o *locus* de interesse são intercruzados, sendo cerca de um quarto da prole gerada homozigota para a região de interesse. Estes animais constituirão a linhagem congênica para este *locus*. A partir disso é possível realizar comparações rigorosas entre dois grupos de animais praticamente idênticos genotipicamente, exceto pela região do *locus* diferencial (a linhagem congênica e a linhagem receptora), atribuindo-se a essa região as diferenças fenotípicas encontradas.

GENOMA AO LONGO DOS RETROCRUZAMENTOS	
	Receptor %
P	100
F1	50
N2	75
N3	87,5
N4	93,8
N5	96,9
N6	98,45
N7	99,2
N8	99,6
N9	99,8
N10	99,9

Jackson Laboratory

**Figura 1 - Porcentagem do genoma proveniente da linhagem receptora ao longo do desenvolvimento de uma linhagem congênica (Jackson Laboratory).**

A utilização da linhagem congênica aqui proposta, ainda inédita no estudo da reatividade emocional das linhagens LEW e SHR, permitirá um melhor entendimento dos mecanismos genéticos envolvidos nos comportamentos emocionais relacionados principalmente à ansiedade.

#### **1.4 Hipótese**

Sendo a região do *Ofil1*, no cromossomo 4 do rato, uma das responsáveis pelos comportamentos relacionados à ansiedade, com a presença de alelos LEW nesta região aumentando a locomoção central no teste do CA, espera-se que ao construirmos um animal de *background* genético do tipo SHR, mas com alelos LEW na região do *Ofil1*, esses exibam um comportamento ainda menos “ansioso” do que animais SHR puros. Desta forma, queremos testar as seguintes hipóteses: a) haverá uma manutenção do efeito dos alelos LEW no *locus Ofil1* ao longo das gerações analisadas (N8, N9, N10 e N10 homocigota), tendo os animais congênicos escores mais altos para a medida de locomoção central do CA do que os animais SHR puros; b) por ter efeito sobre comportamentos relacionados à ansiedade, os genes do *locus Ofil1* estariam também atuando em comportamentos exibidos em outro teste comportamental relacionado à ansiedade, a caixa branca e preta (CBP), na qual algumas medidas, assim como a locomoção central no teste do CA, respondem ao tratamento com benzodiazepinas (CRAWLEY, 1981).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivos Gerais

Este estudo teve como objetivo construir uma linhagem de rato congênica para o *locus Ofill*, localizado no cromossomo 4, a partir das linhagens LEW (doadora) e SHR (receptora). O desenvolvimento desta linhagem tem como finalidade a confirmação do envolvimento desta região com comportamentos relacionados à ansiedade, como proposto por Ramos em 1999, e ao mesmo tempo delimitar fisicamente a região analisada, facilitando assim uma futura busca por genes candidatos para este fenótipo.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Continuar o desenvolvimento de uma linhagem congênica para o *locus Ofill*, participando nas etapas relativas às gerações N8, N9, N10 e N10 homocigota;
- Extrair DNA e posteriormente realizar a amplificação da região de interesse através da reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando os marcadores moleculares D4Rat76, D4Mgh6, D4Mgh11 e, no caso da geração N10 homocigota, o D4Rat59;
- Realizar a genotipagem dos produtos de PCR relativos aos animais das gerações N8, N9, N10 e N10 homocigota, selecionando a cada geração os animais com o genótipo de interesse para que sejam avaliados nos testes comportamentais e posteriormente promover novos cruzamentos, originando a geração seguinte;
- Realizar os testes comportamentais do CA e da CBP a fim de verificar o fenótipo exibido pelos animais na presença de alelos LEW na região do *Ofill*, tanto em heterocigose (durante a construção da linhagem congênica) quanto em homocigose (com os animais congênicos propriamente ditos).



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

Para produzir esta linhagem congênica foram utilizados animais das linhagens LEW e SHR, provenientes de colônias isogênicas mantidas há mais de vinte gerações, através de acasalamentos consangüíneos (irmão/irmã), no Laboratório de Genética do Comportamento, pertencente ao Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética da Universidade Federal de Santa Catarina. Para a fundação destas colônias, animais da linhagem SHR foram obtidos a partir da Universidade Federal do Espírito Santo, que por sua vez os obteve da Universidade Estadual Paulista, na cidade de Botucatu/SP, sendo esta linhagem originária da Universidade de Harvard (Boston, MA). Já a linhagem LEW é originária da Harlan Spreague Dowley Inc. (Indianápolis, IN) e foi obtida a partir da Universidade Estadual de Campinas/SP. Todos os animais nascidos ao longo do desenvolvimento da linhagem congênica aqui descrita foram desmamados e separados das mães com 28 dias de idade, sendo mantidos em gaiolas de polipropileno contendo um total de cinco indivíduos, com água e comida disponíveis *ad libitum*, em um biotério com ciclo claro/escuro de 12:12h (luzes acesas às 07:00h) e temperatura mantida a  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Os animais foram utilizados de acordo com as orientações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e do *General Guidelines for the Use of Animals in Scientific Research - National Institutes of Health (NIH/USA)*. Além disso, o projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/UFSC, de número 109/07 – CEUA PRPe.

#### 3.2 Construção dos Animais Congênicos

A construção dos animais congênicos começou em 2005, antes do início do estágio de iniciação científica que originou este trabalho de conclusão de curso, sendo parte do projeto da doutoranda Elayne Pereira, do programa de pós-graduação em Farmacologia desta

mesma universidade. Mesmo tendo sido concluídas antes do início deste estágio, as etapas envolvidas no início da construção destes animais estão aqui descritas para possibilitar um melhor entendimento do processo. Este trabalho de conclusão de curso abrangeu as quatro últimas gerações desenvolvidas: N8, N9, N10 e N10 homocigota.

A primeira etapa da produção foi o cruzamento de fêmeas provenientes da linhagem LEW (doadora) com machos da linhagem SHR (receptora), gerando uma F1 híbrida que foi então retrocruzada com a linhagem receptora SHR, dando origem à geração N2. A partir da N2, foram retrocruzados com a linhagem receptora SHR somente os animais heterocigotos para a região de interesse (*Ofil1*), o que foi verificado através da genotipagem para os marcadores moleculares D4Rat76, D4Mgh6 e D4Mgh11, localizados ao longo deste QTL. Como já mencionado, os sucessivos retrocruzamentos entre a linhagem receptora e os animais selecionados resultam na crescente eliminação do genoma da linhagem doadora (LEW), exceto pela região do *locus* diferencial (*Ofil1*). Na geração N10, os animais heterocigotos para o *locus Ofil1* foram então cruzados entre si, a fim de se obter a geração N10 homocigota: animais com o *background* genético da linhagem receptora (SHR) e que possuíssem apenas a região de *Ofil1* em homocigose, proveniente da linhagem doadora (LEW). Os animais da geração N10 homocigota foram também genotipados, utilizando-se os marcadores D4Rat76, D4Mgh6 e D4Rat59 (em substituição ao D4Mgh11 por questões metodológicas), a fim de se selecionar os indivíduos homocigotos LEW na região do *Ofil1*. A Figura 2 ilustra os sucessivos cruzamentos realizados entre as linhagens utilizadas para a produção da linhagem congênica desenvolvida.

### 3.3 Genotipagem

Todos os animais das gerações N8, N9, N10 e N10 homocigota foram genotipados. O DNA utilizado foi extraído das células de um pequeno fragmento da porção distal da cauda (com cerca de 5 mm de comprimento), seccionado por volta de quatro semanas de vida. Para a extração deste DNA foi utilizado o kit comercial *DirectPCR Lysis Reagent (tail)* (Viagem Biotech Inc.), conforme especificações do fabricante. O DNA extraído foi submetido à reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando-se *primers* para cada um dos três marcadores moleculares

polimórficos: D4Rat76, D4Mgh6 e D4Mgh11 (Invitrogen do Brasil, São Paulo), e no caso da N10 homozigota, o marcador D4Mgh11 foi substituído pelo marcador D4Rat59, todos já utilizados na identificação do *Ofil1* por Ramos et al. (1999). Os marcadores D4Mgh11 e D4Rat76 flanqueiam a região do *locus Ofil1*, enquanto D4Mgh6 se localiza no pico deste QTL, conforme ilustrado na Figura 3, e o marcador D4Rat59 situa-se entre os marcadores D4Mgh6 e D4Mgh11. As seqüências dos *primers* para os marcadores utilizados estão ilustrados na Tabela 1.

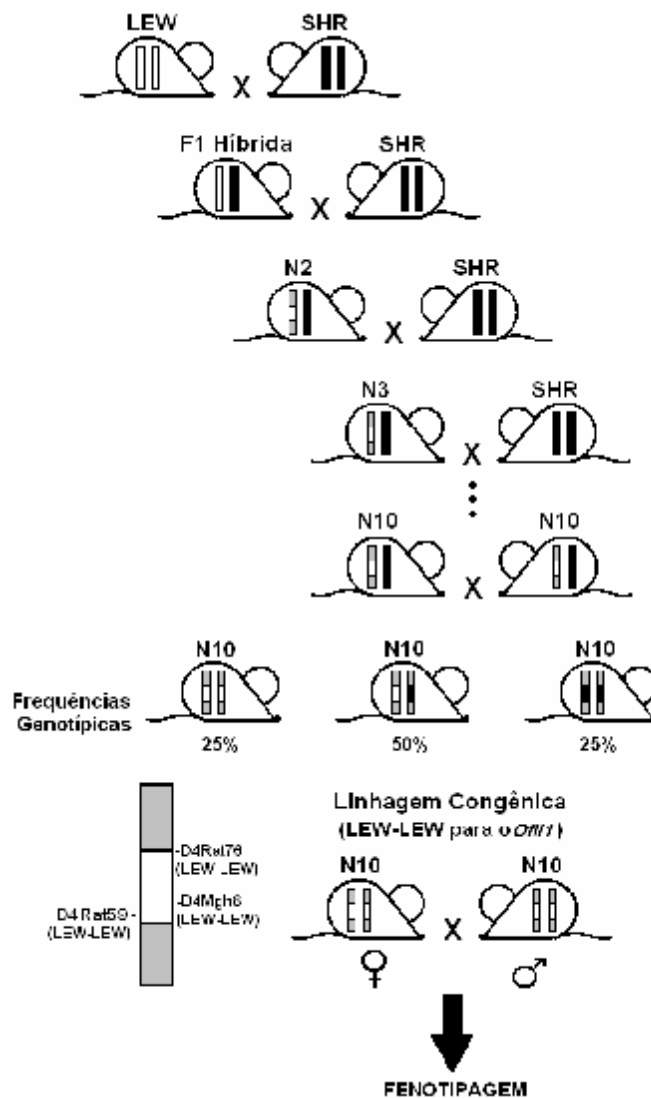


Figura 2 – Desenho esquemático da dinâmica dos cruzamentos realizados durante a construção da linhagem congênica. As regiões cromossômicas representadas em cinza se referem a regiões do cromossomo 4 nas quais não houve um controle genotípico e que podem ainda possuir alguns alelos LEW devido a possíveis recombinações.

Tabela 1 – Sequências *forward* e *reverse* dos *primers* para os marcadores moleculares utilizados.

Marcador	Forward	Reverse
D4Rat76	GTAAAGGAACCATGGGCTGA	GTATGTTTCCTTCCTGCCCC
D4Mgh6	GGGTCTTGTAGCATTTTTTAAAGC	AGAACCAACTCCTAAACTCCTGC
D4Rat59	GCGGAATGATAGTTACTACGGC	GCAGTGTGTTTGGGGTAGCT
D4Mgh11	CTCAACGAACAGGTTTCATTATG	AGAAGGGATGACAATTGGTACG

A solução submetida à PCR continha 0,4 µl de DNA genômico, 4,6 µl de água deionizada, 5 µl (66 µM) de cada mix de *primers* e 0,076 µl (0,038 unidades) de Taq polimerase (Promega, Charbonnière, França), em 10 µl de tampão *Promega Green Gotac*, totalizando 20 µl. A amplificação foi realizada utilizando micro-placas, no termociclador *Px2 Thermo Cycler* (Hybaid – EUA), com a seguinte programação: (i) um ciclo a 96 °C por 5'; (ii) trinta e cinco ciclos de 92 °C por 30'', 58 °C por 1' e 72 °C por 31''; e (iii) um ciclo à 72 °C por 2'.

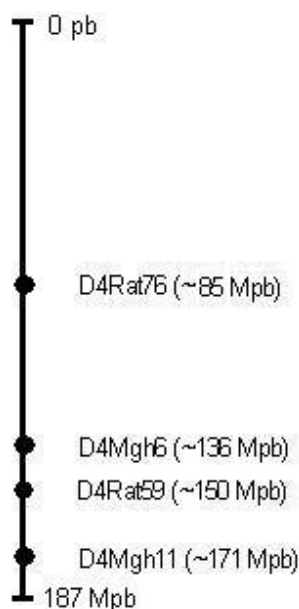


Figura 3 – Representação do cromossomo 4 do rato, com a localização aproximada dos quatro marcadores moleculares utilizados.

Por fim, os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 3 % contendo brometo de etídio. As bandas resultantes, formadas pelos alelos de tamanhos já conhecidos para os quatro marcadores, foram visualizadas com o auxílio do transluminador (luz ultravioleta) e as amostras foram genotipadas, sendo algumas também fotodocumentadas. Considerando o polimorfismo dos marcadores moleculares utilizados entre as linhagens LEW e SHR, a identificação dos fragmentos gerados pela PCR foi feita analisando-se a disposição das bandas resultantes da eletroforese no gel de agarose. Por exemplo, o marcador D4Rat76 possui em torno de 176 pb na linhagem LEW, enquanto na linhagem SHR possui aproximadamente 200 pb (tamanho aproximado dos fragmentos em cada uma das linhagens disponível no *Rat Genome Database*), sendo então possível identificar animais homocigotos SHR (apenas uma banda “alta”) e heterocigotos LEW-SHR (duas bandas).

### **3.4 Testes Comportamentais**

Após a genotipagem de cada geração, com entre 10 e 12 semanas de vida, os animais das gerações N8, N9 e N10 de genótipos homocigoto (SHR/SHR) e heterocigoto (SHR/LEW) para os três marcadores moleculares analisados foram submetidos a dois testes comportamentais que fornecem medidas relacionadas à ansiedade, o CA e a CBP, de modo a verificar diferenças comportamentais entre os dois genótipos, observando-se assim a influência do *Ofil* sobre a emocionalidade em ratos. Na geração N10 homocigota, os animais homocigotos LEW apenas para o marcador D4Mgh6, juntamente com controles SHR puros e LEW puros, foram submetidos aos mesmos testes.

#### **3.4.1 Teste do Campo Aberto**

O teste do CA, desenvolvido em 1934 por Calvin Hall (WEISS; GREENBERG, 1998), é considerado um teste clássico para medidas de emocionalidade em roedores. O aparato,

ilustrado na Figura 4, consiste em uma arena de paredes e fundo brancos, medindo 1,0 x 1,0 m e com 40 cm de altura. O fundo do aparato é dividido em vinte e cinco quadrados de 20 x 20 cm delimitados por linhas pretas, sendo os quadrados adjacentes às paredes considerados a região periférica do aparato, e os demais pertencentes à região central. No teste, o animal é posicionado no centro do aparato e sua locomoção (número de quadrados cruzados por ele), defecação e tempo gasto na região central são quantificados durante cinco minutos. A iluminação da sala de testes era de 10 lux. Considera-se mais “ansioso” o animal que permanece a maior parte do tempo na região periférica, apresentando uma baixa exploração da região central.

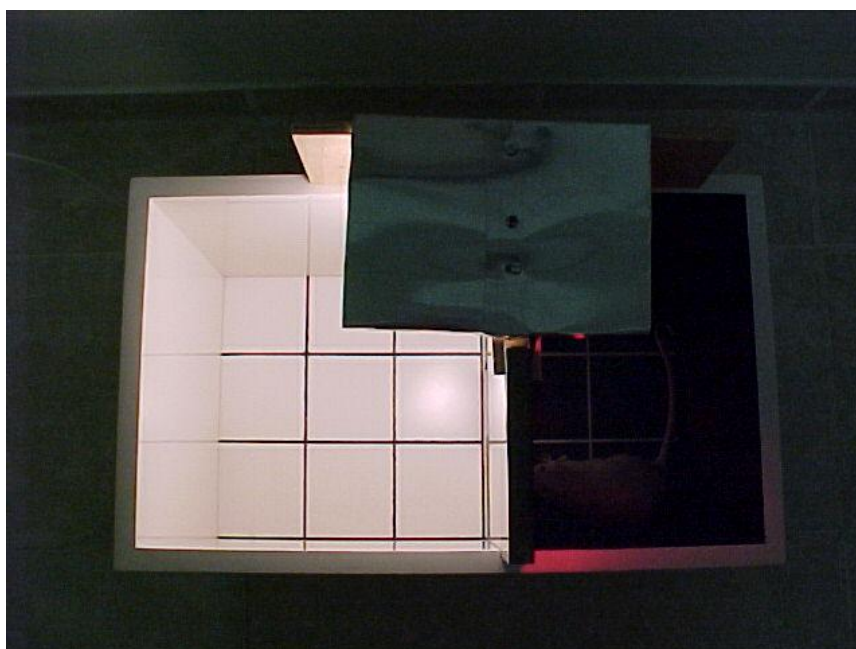


**Figura 4 – Teste do campo aberto.**

### **3.4.2 Teste da Caixa Branca e Preta**

No teste da CBP utiliza-se um aparato composto por dois compartimentos separados por uma parede, um branco fortemente iluminado, medindo 27 x 27 cm, cujo chão é dividido em 9 quadrados (9 x 9 cm), e outro preto com iluminação por lâmpada vermelha, medindo 27 x 18 cm, cujo chão é dividido em 6 quadrados (9 x 9 cm), ambos cercados por

paredes de 27 cm de altura, conforme ilustrado na Figura 5. A parede que divide os dois compartimentos possui uma pequena abertura de 7 x 7 cm no centro. Neste teste, cada rato é inicialmente posicionado no compartimento branco e monitorado por cinco minutos, observando-se os seguintes comportamentos: latência inicial de saída do compartimento branco, locomoção no compartimento branco e no preto, tempo no compartimento branco e no preto, defecação no compartimento branco e no preto, e transições do compartimento branco para o preto. Um baixo nível de exploração do compartimento branco, assim como um pequeno número de transições entre os compartimentos, revelam um alto nível de “ansiedade” do animal (CRAWLEY, 1981).



**Figura 5 – Teste da caixa branca e preta.**

### **3.5 Análise Estatística**

Como o principal objetivo deste estudo foi avaliar diferenças entre os animais que apresentam o genótipo LEW-SHR ou SHR-SHR para o *locus Ofil1* durante as gerações N8, N9 e N10, e na N10 homocigota entre os genótipos dos animais congênicos propriamente ditos

(*background* SHR com LEW-LEW no *locus Ofil1*) e as linhagens parentais LEW e SHR puras, os resultados foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) de duas vias para os fatores genótipo e sexo, separadamente para cada geração. No caso de interações entre estes fatores, o teste de comparação de médias (*post hoc*) Newman-Keuls foi aplicado. Valores de  $p$  menores ou iguais a 0,05 foram considerados significativos. Todas as análises foram realizadas com o software *Statistica* 6.0 (Statsoft, França, 2006).



## 4 RESULTADOS

### 4.1 Genotipagem

Os animais das gerações N8, N9 e N10 foram genotipados para os marcadores D4Rat76, D4Mgh6 e D4Mgh11, conforme já descrito anteriormente. Entretanto, durante a genotipagem dos animais N10 homozigotos, dificuldades metodológicas envolvendo o marcador D4Mgh11 surgiram, impossibilitando a sua utilização na genotipagem destes animais. Ao visualizar, em gel de agarose, os fragmentos resultantes da amplificação da região deste marcador, era possível identificar as bandas dos homozigotos SHR, mas a diferenciação entre as bandas dos homozigotos LEW e dos heterozigotos não era clara. Por este motivo não houve problemas durante a genotipagem dos animais N8, N9 e N10 com este marcador, uma vez que nestas gerações os animais só poderiam ser homozigotos SHR ou heterozigotos (devido à metodologia dos retrocruzamentos com a linhagem SHR, só existiram animais homozigotos LEW a partir da geração N10, provenientes dos cruzamentos entre os heterozigotos desta geração para se obter a geração N10 homozigota). Diante desta dificuldade, tentou-se genotipar as amostras dos animais N10 homozigotos para o marcador D4Mgh11 em gel de poliacrilamida, que, por ser uma técnica com maior sensibilidade, poderia ser capaz de separar melhor as bandas destes fragmentos e possibilitar a diferenciação entre estes dois genótipos. Mesmo após inúmeras tentativas, manipulando-se diversas variáveis que poderiam estar influenciando na qualidade da banda formada pela amostra, não obtivemos sucesso. Por este motivo, o marcador D4Rat59, sendo o único marcador polimórfico, de fácil visualização em gel de agarose, próximo ao D4Mgh11 e disponível em nosso laboratório, foi utilizado na genotipagem dos animais N10 homozigotos.

## 4.2 Animais Produzidos e Testados

O número de animais submetidos aos testes comportamentais variou de acordo com as gerações, devido ao número de filhotes obtidos por ninhada e conforme o sexo e o genótipo destes animais. O número de animais totais obtidos a cada cruzamento, desconsiderando-se o genótipo, está ilustrado na Tabela 2. O número de animais testados nas gerações N8, N9 e N10, divididos por sexo e genótipo, está ilustrado na Tabela 3.

Dentre os oitenta animais da geração N10 homocigota, somente um macho e duas fêmeas foram homocigotos LEW para os três marcadores analisados: D4Mgh6, D4Rat76 e D4Rat59. Pela inviabilidade de se utilizar um número amostral tão pequeno em testes comportamentais, optou-se por testar todos os animais homocigotos LEW para o marcador D4Mgh6, que representa o pico do QTL *Ofil1*, independentemente do genótipo apresentado para os demais marcadores, totalizando quinze animais (oito machos e sete fêmeas), e sendo estes aqui referidos como N10 “homocigotos”. Os animais SHR puros e LEW puros utilizados neste experimento foram produzidos simultaneamente aos animais homocigotos N10.

**Tabela 2 - Número de casais e de animais nascidos a partir do cruzamento de cada geração.**

Geração	Cruzamentos	Nº de Casais	Total de Filhotes	Machos	Fêmeas
N7	LS x SS	20	117 (N8)	64	53
N8	LS x SS	23	101 (N9)	48	53
N9	LS x SS	20	160 (N10)	85	75
N10	LS x LS	10	80	35	45

**Tabela 3 –Número de animais das gerações N8, N9 e N10 testados no CA e na CBP, separados por sexo e genótipo.**

Geração	Fêmeas LS	Fêmeas SS	Machos LS	Machos SS
N8	10	11	12	16
N9	8	9	18	10
N10	16	6	21	14

#### 4.2.1 Gerações N8, N9 e N10 no Teste do Campo Aberto

Os resultados do teste do CA para as gerações N8, N9 e N10 estão sumarizados nas Figuras 6 e 7. Em relação a locomoção central (Figura 6), a ANOVA demonstrou um efeito geral significativo para o fator sexo nas gerações N8 [ $F(1,45)=28,93$ ,  $p=0,000$ ], N9 [ $F(1, 41)=14,84$ ,  $p=0,000$ ] e N10 [ $F(1, 53)=5,31$ ,  $p=0,025$ ], com os machos apresentando escores menores do que as fêmeas em todas as gerações analisadas. Para medida de locomoção periférica (Figura 6), ocorreu novamente um efeito geral do sexo significativo nas gerações N8 [ $F(1, 45)=17,02$ ,  $p=0,000$ ], N9 [ $F(1, 41)=17,95$ ,  $p=0,000$ ] e N10 [ $F(1, 53)=12,80$ ,  $p=0,001$ ], com os machos apresentando escores menores do que as fêmeas. Quanto ao tempo gasto no centro do aparato (Figura 7), a ANOVA revelou um efeito geral do sexo somente na geração N10 [ $F(1, 53)=4,28$ ,  $p=0,044$ ], com os machos permanecendo mais tempo no centro do aparato do que as fêmeas. Nenhum efeito significativo para o fator genótipo foi detectado nestas variáveis comportamentais.

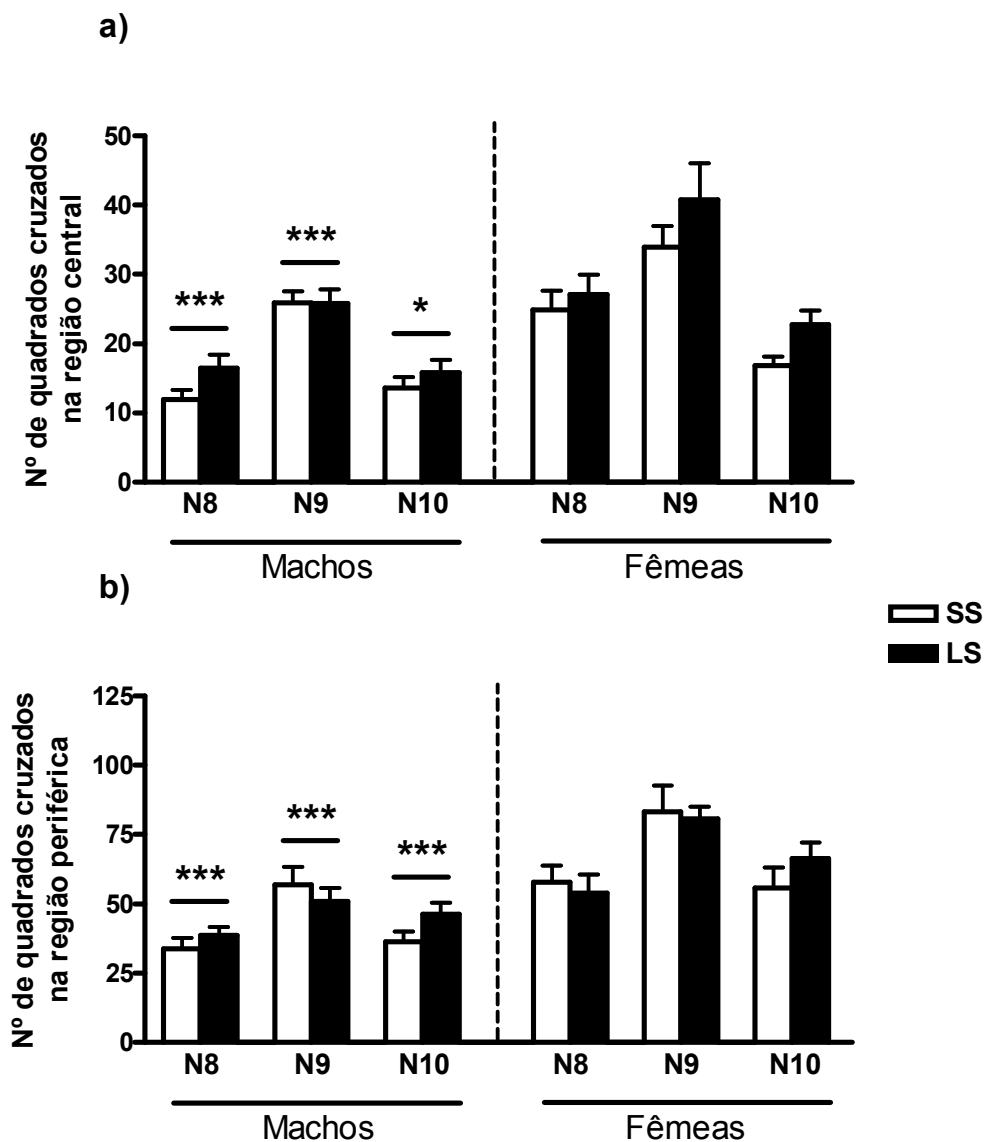


Figura 6 – Número de quadrados cruzados nas regiões central (a) e periférica (b) pelos machos e fêmeas das gerações N8, N9 e N10 no teste do campo aberto. Barras e linhas verticais representam os valores da média e erro padrão da média. (\*) e (\*\*\*), ilustrados apenas nos machos, representam diferenças significativas gerais para o fator sexo (ANOVA de duas vias para cada geração separadamente,  $p < 0,05$  e  $p < 0,001$ , respectivamente).

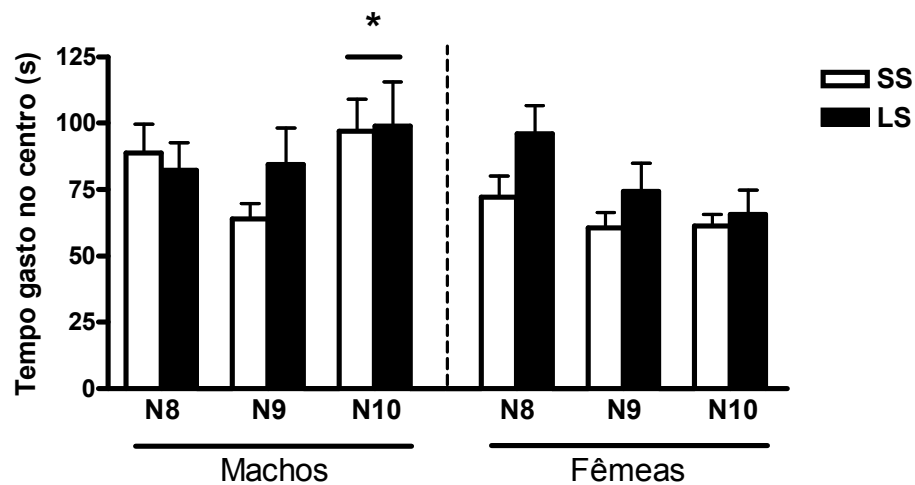


Figura 7 - Tempo pelo qual os machos e fêmeas das gerações N8, N9 e N10 permaneceram no centro do campo aberto. Barras e linhas verticais representam os valores da média e erro padrão da média. (\*), ilustrado apenas nos machos, representa diferença significativa geral para o fator sexo (ANOVA de duas vias para cada geração separadamente,  $p < 0,05$ ).

#### 4.2.2 Gerações N8, N9 e N10 no Teste da Caixa Branca e Preta

Os resultados dos testes da CBP estão ilustrados nas Figuras 8 e 9. Para a variável tempo no compartimento branco (Figura 8), a ANOVA revelou um efeito geral para o fator genótipo na geração N8 [ $F(1, 45)=5,52, p=0,023$ ], com os animais heterozigotos para o *locus Ofill* permanecendo mais tempo no compartimento branco do que os animais homozigotos SHR para este mesmo *locus*. Também foi observado um efeito significativo do sexo na geração N9 [ $F(1, 41)=6,34, p=0,016$ ], com os machos permanecendo mais tempo no compartimento branco do que as fêmeas. Em relação ao tempo no compartimento preto da CBP (Figura 8), as análises de variância revelaram apenas um efeito significativo do sexo na geração N9 [ $F(1, 41)=4,85, p=0,033$ ], com as fêmeas permanecendo mais tempo neste compartimento do que os machos. Quanto ao número de transições (Figura 9), foi observado um efeito geral do sexo nas gerações N8 [ $F(1, 45)=8,93, p=0,005$ ] e N10 [ $F(1, 53)=17,27, p=0,000$ ]. As análises de variância também revelaram uma interação entre o sexo e o genótipo na geração N9 [ $F(1, 41)=6,44, p=0,015$ ], com as fêmeas heterozigotas para o *locus Ofill* apresentando um número maior de

transições do que as fêmeas homocigotas SHR [ $p=0,012$ ] e do que os machos heterocigotos [ $p=0,017$ ].

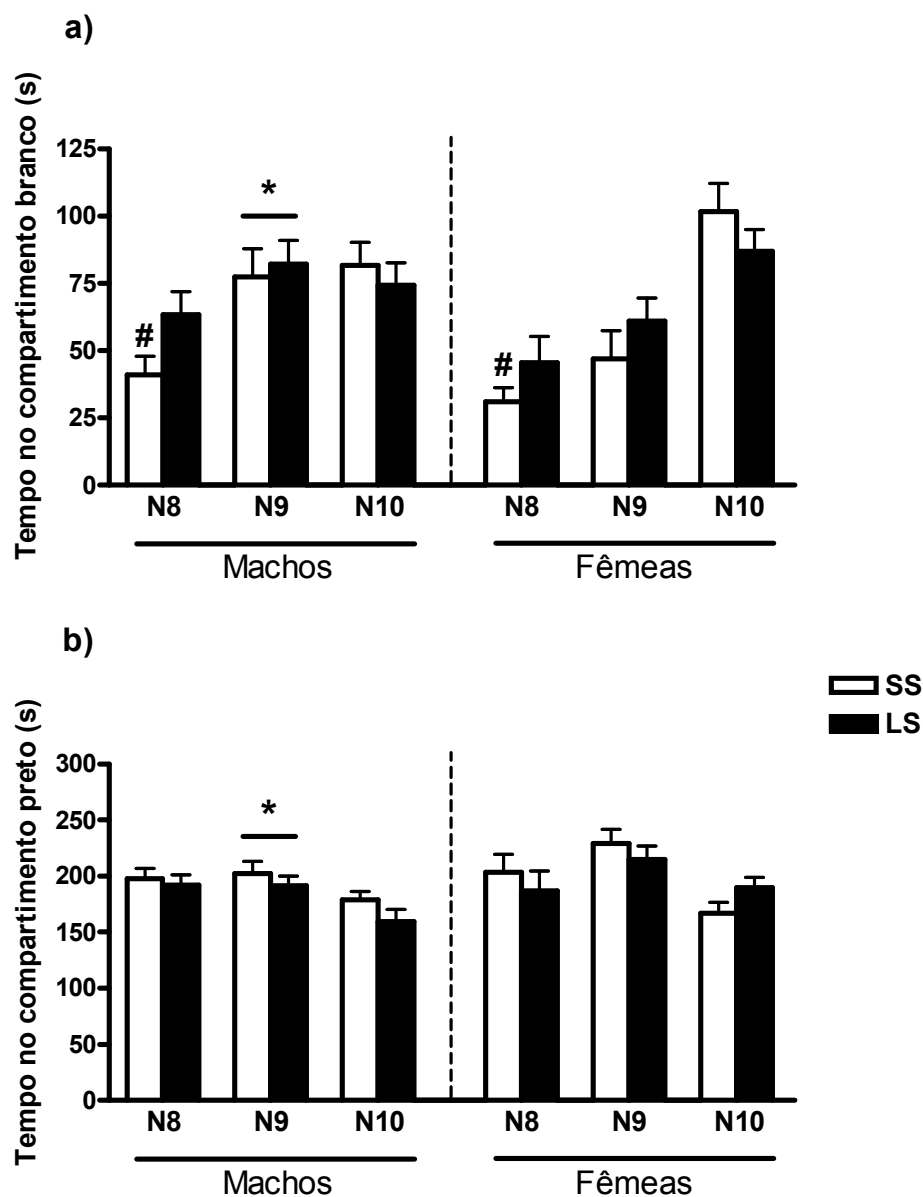


Figura 8 – Tempo pelo qual os machos e fêmeas das gerações N8, N9 e N10 permaneceram no compartimento branco (a) e no compartimento preto (b) da caixa branca e preta. Barras e linhas verticais representam os valores da média e erro padrão da média. (#), ilustrado apenas na linhagem de menor média, representa diferença significativa geral para o fator genótipo. (\*), ilustrado apenas no gráfico dos machos, representa diferença significativa geral para o fator sexo (ANOVA de duas vias para cada geração separadamente,  $p<0,05$ ).

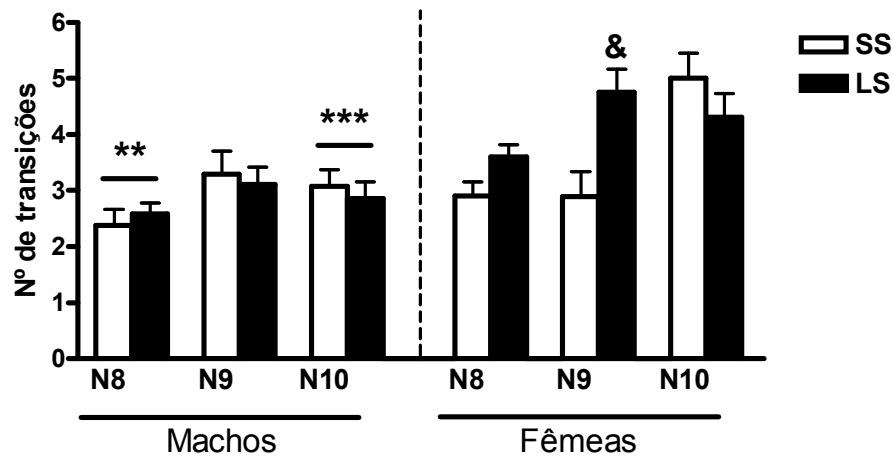


Figura 9 - Número de transições entre compartimentos da caixa branca e preta, realizadas pelos machos e fêmeas das gerações N8, N9 e N10. (\*\*) e (\*\*\*), ilustrados apenas nos machos, representam diferenças significativas gerais para o fator sexo (ANOVA de duas vias,  $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ , respectivamente). (&) representa diferença significativa entre os subgrupos fêmeas LS e fêmeas SS e entre fêmeas LS e machos LS (ANOVA de duas vias para cada geração separadamente,  $p < 0,05$ , seguida pelo teste post-hoc Newman Keuls).

#### 4.2.3 Geração N10 “Homozigota” no Teste do Campo Aberto

Os resultados do teste do CA para a geração N10 “homozigota” estão sumarizados nas Figuras 10, 11 e 12. A ANOVA demonstrou um efeito geral significativo para o fator sexo na locomoção central (Figura 10) [ $F(1, 35)=9,90$ ,  $p=0,003$ ], com os machos apresentando escores menores do que as fêmeas. Apenas nesta geração foi observado um efeito geral significativo para o fator genótipo, sendo os escores dos animais LEW menores do que os dos N10 “homozigotos” [ $p=0,003$ ] e do que os SHR [ $p=0,001$ ]. Para a medida de locomoção periférica (Figura 11), foi observado apenas um efeito geral significativo para o fator genótipo, sendo os escores dos animais LEW puros maiores do que os dos N10 “homozigotos” [ $p=0,000$ ] e do que os SHR puros [ $p=0,000$ ]. Quanto ao tempo gasto no centro do CA (Figura 12), encontrou-se um efeito geral do genótipo, com os animais N10 “homozigotos” permanecendo mais tempo no centro do aparato do que os animais LEW [ $p=0,000$ ] e do que os SHR [ $p=0,043$ ], e com os SHR permanecendo mais tempo do que os LEW [ $p=0,002$ ].

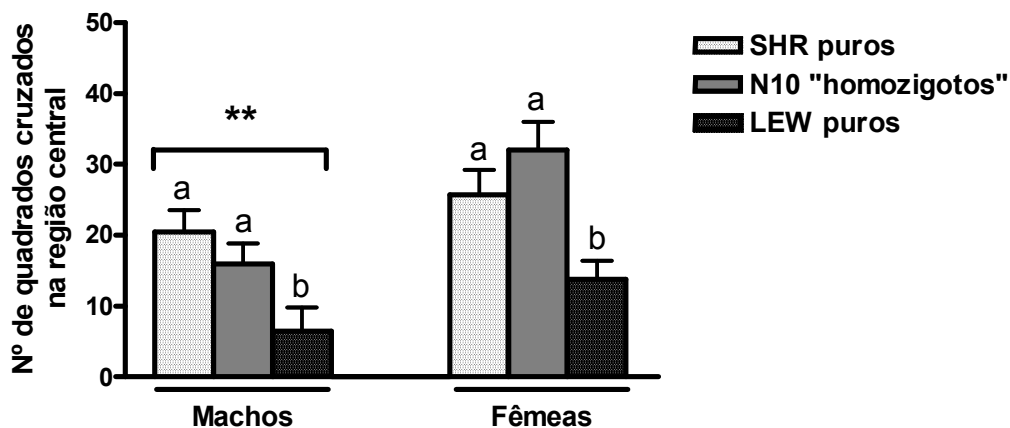


Figura 10 - Número de quadrados cruzados na região central pelos machos e fêmeas da geração N10 "homozigota" no teste do campo aberto. Genótipos identificados por letras distintas apresentaram diferenças significativas entre si (ANOVA de duas vias,  $p < 0,01$ , seguida pelo teste post-hoc Newman Keuls para o fator genótipo). (\*\*) representa diferença significativa geral para o fator sexo (ANOVA de duas vias,  $p < 0,01$ )

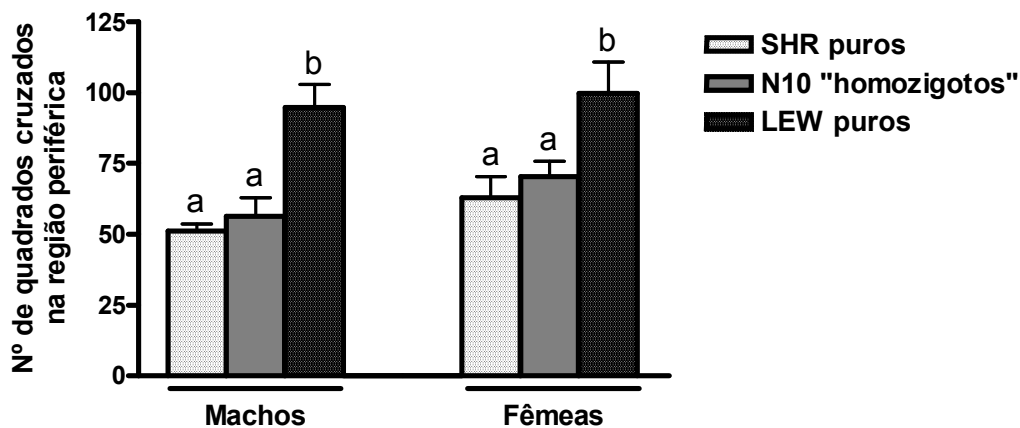


Figura 11 - Número de quadrados cruzados na região periférica pelos machos e fêmeas da geração N10 "homozigota" no teste do campo aberto. Genótipos identificados por letras distintas apresentaram diferenças significativas entre si (ANOVA de duas vias,  $p < 0,001$ , seguida pelo teste post-hoc Newman Keuls para o fator genótipo).



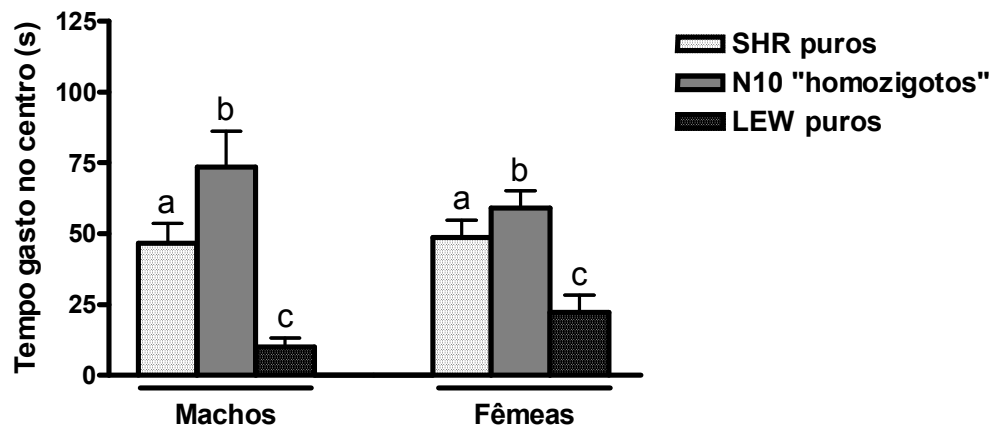


Figura 12 – Tempo pelo qual os machos e fêmeas da geração N10 “homozigota” permaneceram no centro do campo aberto. Genótipos identificados por letras distintas apresentaram diferenças significativas entre si, com  $p < 0,05$  entre a e b,  $p < 0,01$  entre a e c e  $p < 0,001$  entre b e c (ANOVA de duas vias, seguida pelo teste post-hoc Newman Keuls para o fator genótipo).

#### 4.2.4 Geração N10 “Homozigota” no Teste da Caixa Branca e Preta

Para o teste da CBP da geração N10 “homozigota”, cujos resultados estão ilustrados nas Figuras 13, 14 e 15, a ANOVA revelou efeitos gerais tanto do sexo [ $F(1, 35)=12,43$ ,  $p=0,001$ ] quanto do genótipo para o tempo gasto no compartimento branco (Figura 13), com os animais LEW permanecendo menos tempo nesse compartimento do que os N10 “homozigotos” [ $p=0,000$ ] e do que os SHR [ $p=0,001$ ]. Apenas na geração N10 “homozigota” observou-se um efeito geral do genótipo para o tempo gasto no compartimento preto (Figura 14), com os animais LEW permanecendo ali por mais tempo do que os SHR [ $p=0,000$ ] e do que os N10 “homozigotos” [ $p=0,000$ ]. Já em relação ao número de transições (Figura 15), um efeito geral do genótipo foi encontrado, com os animais SHR apresentando um número maior de transições do que os N10 “homozigotos” [ $p=0,012$ ] e do que os LEW [ $p=0,000$ ]. Os escores dos N10 “homozigotos” também foram significativamente maiores do que os dos LEW [ $p=0,003$ ].

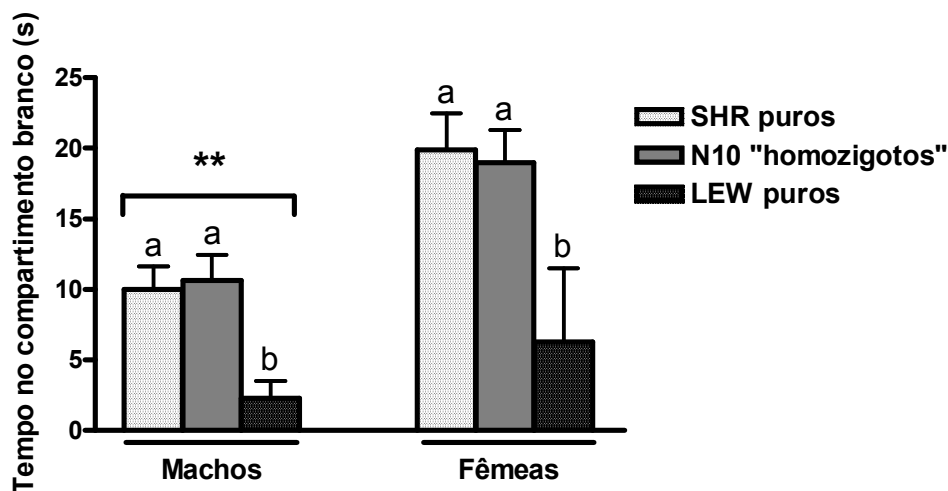


Figura 13 – Tempo gasto no compartimento branco pelos machos e fêmeas da geração N10 “homozigota” no teste da caixa branca e preta. Genótipos identificados por letras distintas apresentaram diferenças significativas entre si (ANOVA de duas vias,  $p < 0,001$ , seguida pelo teste post-hoc Newman Keuls para o fator genótipo). (\*\*) representa diferença significativa geral para o fator sexo (ANOVA de duas vias,  $p < 0,01$ )

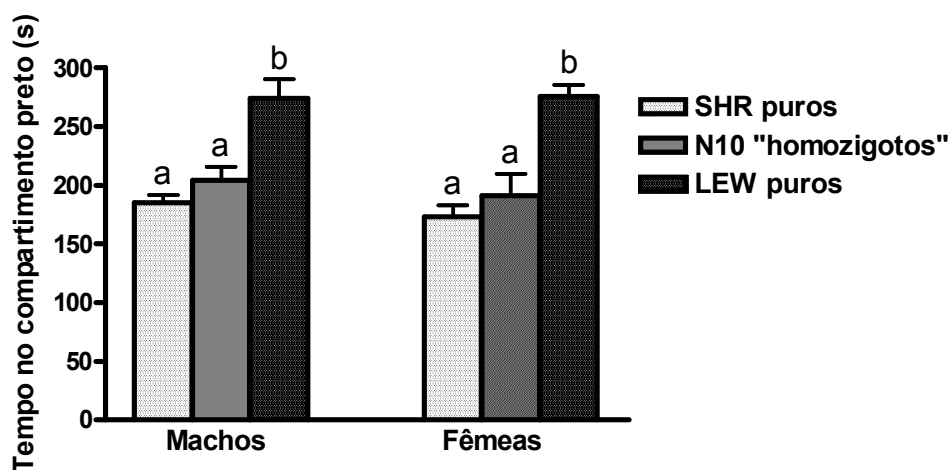


Figura 14 - Tempo gasto no compartimento preto pelos machos e fêmeas da geração N10 “homozigota” no teste da caixa branca e preta. Genótipos identificados por letras distintas apresentaram diferenças significativas entre si (ANOVA de duas vias,  $p < 0,001$ , seguida pelo teste post-hoc Newman Keuls para o fator genótipo).

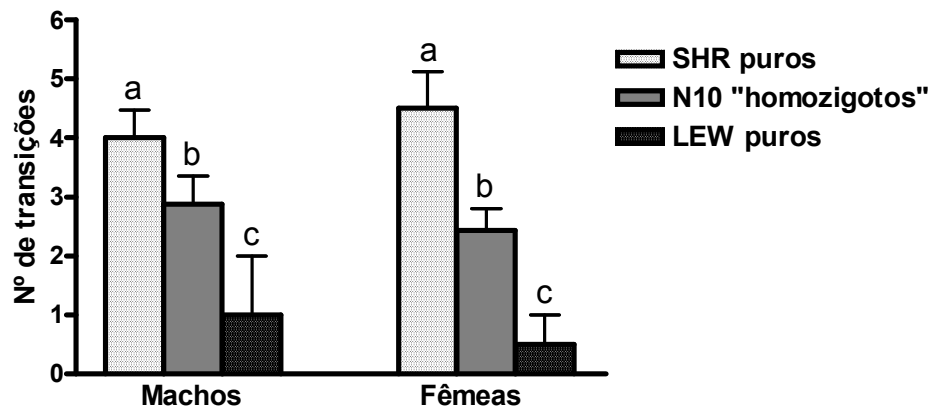


Figura 15 – Número de transições realizadas pelos machos e fêmeas da geração N10 “homozigota” no teste da caixa branca e preta. Genótipos identificados por letras distintas apresentaram diferenças significativas entre si, com  $p < 0,05$  entre a e b,  $p < 0,01$  entre b e c e  $p < 0,001$  entre a e c (ANOVA de duas vias, seguida pelo teste post-hoc Newman Keuls para o fator genótipo).

## 5 DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como principal objetivo construir uma linhagem de ratos congênica para o *locus Ofill*, a fim de confirmar o envolvimento desta região com comportamentos relacionados à ansiedade. É importante ressaltar que nas gerações N8, N9 e N10, por serem testados apenas animais homozigotos SHR-SHR e heterozigotos SHR-LEW, mas não homozigotos LEW-LEW, para os marcadores moleculares utilizados, foi somente possível observar os efeitos dos alelos LEW em heterozigoze na região do *Ofill*. Portanto, os resultados dos testes comportamentais nestas gerações apenas sugerem os efeitos que poderiam ser encontrados nos animais congênicos completos, com alelos LEW em homozigoze nesse *locus*. Caso o alelo LEW fosse recessivo em relação ao alelo SHR, nenhum efeito seria observado nas gerações N8, N9 e N10 heterozigotas, apenas na geração N10 homozigota.

Durante este trabalho ainda não foi possível observar o fenótipo comportamental exibido pela linhagem congênica (homozigota LEW para toda a região do *Ofill*), pois dentre os animais nascidos do intercruzamento entre os N10 heterozigotos, apenas um macho e duas fêmeas possuíam os três marcadores moleculares analisados (D4Rat76, D4Mgh6 e D4Rat59) em homozigoze para alelos LEW, constituindo um número amostral insuficiente. Diante disso, e da impossibilidade de realizar novos cruzamentos entre esses animais (para se obter um número maior de animais homozigotos LEW) devido ao prazo para a conclusão deste trabalho, optou-se por realizar os testes comportamentais com todos os animais homozigotos LEW para o marcador D4Mgh6, uma vez que este se localiza no pico do QTL em questão. Portanto, os resultados descritos para os animais N8, N9 e N10 referem-se a animais heterozigotos para os três marcadores moleculares utilizados na genotipagem destas gerações, enquanto os resultados dos N10 “homozigotos” referem-se a animais com alelos LEW em homozigoze apenas para o marcador molecular D4Mgh6 (e com genótipos variados em relação aos outros dois marcadores analisados), e não a um animal congênico para toda a região de interesse.

A escolha dos dois testes comportamentais utilizados no presente trabalho aconteceu no início do desenvolvimento desta linhagem, sendo os mesmos testes utilizados desde a avaliação comportamental das primeiras gerações, basicamente por se tratarem de dois testes

bastante utilizados no estudo dos comportamentos relacionados à ansiedade, ambos baseados no conflito natural entre o impulso de explorar um ambiente novo e a tendência de evitar uma área potencialmente perigosa (RAMOS, 2008). O CA foi o aparato cuja medida de locomoção na área central e aversiva levou a identificação do QTL *Ofill*, por Ramos e colaboradores (1999), motivo pelo qual não poderia deixar de ser utilizado na confirmação do envolvimento deste QTL nos comportamentos relacionados à ansiedade. Já a escolha da CBP foi baseada na ampla utilização deste teste no estudo da ansiedade, e no fato dele não ter sido avaliado no trabalho que identificou o *Ofill*, sendo, portanto, importante a avaliação da influência do *Ofill* nos fenótipos exibidos neste teste. Além disso, sugere-se que as variáveis analisadas em diferentes testes de ansiedade possam refletir diferentes dimensões comportamentais, uma vez que estas medidas nem sempre estão correlacionadas (RAMOS, 2008). Considerando-se o *Ofill* não teve influência nos comportamentos exibidos no labirinto em cruz elevado, outro teste comportamental amplamente utilizado e que também foi avaliado no trabalho que descreveu este QTL, seria interessante verificar se este *locus* influenciaria apenas comportamentos relacionados à ansiedade restritos ao teste do CA, ou se este fenótipo se estenderia a outros testes comportamentais.

No teste do CA, a locomoção central das gerações heterozigotas (N8, N9 e N10) diferiu significativamente somente em relação ao sexo, mas não em relação ao genótipo ou apresentou interações entre sexo e genótipo. O mesmo padrão também foi encontrado em relação aos seus escores de locomoção periférica e ao tempo gasto na região central, sendo que para esta última variável o efeito do sexo foi verificado apenas na geração N10. Estas diferenças entre os sexos, sobretudo as de ordem locomotora, já foram anteriormente observadas nas linhagens parentais LEW e SHR, também com as fêmeas apresentando escores mais altos do que os machos (HINOJOSA et al., 2006; RAMOS et al., 1997, 1998, 2002).

Já na CBP, foi observado um efeito significativo do genótipo no tempo gasto no compartimento branco pela geração N8, com os animais homozigotos SS permanecendo menos tempo nesse compartimento do que os heterozigotos, conforme o esperado, se considerarmos que o compartimento branco é uma área aversiva e que alelos LEW estariam promovendo uma diminuição dos comportamentos “ansiosos”. A ANOVA também revelou um efeito significativo do sexo sobre o tempo gasto em ambos os compartimentos apenas na geração N9, o com os machos permanecendo mais tempo no compartimento branco e as fêmeas no compartimento preto. Uma interação entre sexo e genótipo foi observada nas transições dos animais da geração

N9, com as fêmeas heterozigotas apresentando um número maior de transições do que as fêmeas homozigotas SHR e do que os machos heterozigotos. Essa diferença entre os escores de transição dos machos e fêmeas heterozigotos provavelmente ilustra apenas uma tendência das fêmeas em apresentar escores maiores para esse comportamento, conforme também observado na forma de um efeito geral do sexo nas gerações N8 e N10. Já a diferença entre as fêmeas dos dois genótipos acontece no sentido esperado, com as fêmeas heterozigotas apresentando um comportamento menos “ansioso”, uma vez que o número de transições foi apontado por Crawley, em 1981, como um bom índice de ansiedade, respondendo a drogas ansiolíticas. A ausência de efeito significativo do genótipo no *locus Ofill* em algumas das variáveis analisadas em ambos os testes poderia ter relação com o fato destes animais ainda serem heterozigotos para este *locus* e, portanto, possuírem os alelos LEW em apenas uma das duas cópias do cromossomo 4, o que poderia estar mascarando o efeito destes alelos caso eles fossem recessivos. Esta recessividade, porém, é descartada com base nos resultados de gerações heterozigotas anteriores a este trabalho, dentre as quais já foi observado um efeito geral do genótipo (PEREIRA et al., 2009, dados não publicados). Pode-se ainda considerar que exista um efeito aditivo dos alelos LEW, que em heterozigose permitiria apenas a visualização de um efeito mais sutil, o que explicaria, nas gerações heterozigotas, o pequeno número de variáveis que apresentaram diferenças significativas entre os genótipos.

As linhagens parentais LEW e SHR, utilizadas como controle nos testes da geração N10 “homozigota”, apresentaram diferenças significativas para as variáveis analisadas tanto no teste do CA quanto na CBP, com os animais LEW exibindo um perfil mais “ansioso”. Estes resultados vão de acordo ao esperado, sobretudo a partir dos resultados de Ramos e colaboradores (2002).

Em relação à geração N10 “homozigota” no teste do CA, a diferença entre os sexos foi significativa somente para a locomoção central, não sendo observada para as outras duas variáveis avaliadas neste teste. Foi também encontrado um efeito significativo do genótipo, com a geração N10 “homozigota” diferindo dos controles LEW nas três variáveis. A diferença observada entre os animais N10 “homozigotos” e os controles LEW, apesar destes animais serem idênticos entre si para a região do pico do *Ofill*, deve-se provavelmente ao fato de existirem outros sítios no genoma também influenciando estes comportamentos, uma vez que se acredita que a ansiedade tenha componentes genéticos poligênicos e epistáticos (LESCH, 2001). Entre os

N10 “homozigotos” e os controles SHR também foi observada uma diferença significativa, porém apenas em relação ao tempo gasto no centro do CA, com os animais N10 “homozigotos” passando mais tempo no centro do aparato do que os SHR puros, sendo esta menos significativa do que as diferenças encontradas entre os N10 “homozigotos” e os controles LEW, e entre os dois controles. Esta diferença foi no sentido esperado, uma vez que estudos anteriores já demonstraram que, em gerações F2, alelos LEW na região do *locus Ofll* aumentam a locomoção central, apesar de animais LEW puros apresentarem escores mais baixos para esta medida do que SHR puros (VENDRUSCOLO et al., 2006; RAMOS et al., 1999).

Quanto aos parâmetros avaliados no teste da CBP, tanto no tempo gasto no compartimento branco quanto no compartimento preto, os animais N10 “homozigotos” também diferiram significativamente dos controles LEW, mas não dos SHR. Para o número de transições, foram encontradas diferenças significativas entre todos os grupos analisados, mas ainda não no sentido esperado, pois, uma vez que alelos LEW aumentam o número de transições, os animais N10 “homozigotos” que possuem estes alelos inseridos em um *background* SHR deveriam apresentar escores ainda maiores do que os SHR puros.

Seria esperado, entretanto, que as diferenças entre os N10 “homozigotos” e os controles SHR, observadas apenas em relação ao tempo no centro do CA e ao número de transições entre os compartimentos da CBP, também fossem observadas nas demais variáveis analisadas. O fato desta diferença não ter sido verificada em algumas variáveis poderia refletir uma possível perda, em alguns dos animais avaliados, dos alelos LEW da região do *Ofll* responsáveis por estes fenótipos, uma vez que os animais foram selecionados somente em relação ao marcador D4Mgh6. Mesmo este marcador estando no pico deste QTL, não houve um controle genotípico das regiões próximas a ele, que poderiam estar sofrendo recombinação, e como um ou mais genes responsáveis pelos fenótipos em questão estariam provavelmente nessas regiões, poderia estar-se trabalhando com animais que possuem diferentes variantes para estes genes. Além disso, considerando o restante do genoma, tanto os alelos LEW perdidos quanto os alelos SHR adquiridos a cada retrocruzamento poderiam estar influenciando estes fenótipos, uma vez que outras regiões críticas também estão sendo modificadas, e interações epistáticas poderiam estar surgindo ou deixando de acontecer. Linhagens congênicas de rato para dois *loci* diferenciais (chamadas *double congenic*) já foram desenvolvidas, demonstrando interações entre genes de

diferentes *loci* em fenótipos como a hipertensão arterial (RAPP; GARRET; DENG, 1998) e desenvolvimento de tumores mamários (PIESSEVAUX et al., 2008).

Com relação à heterogeneidade dos efeitos observados em diferentes índices de ansiedade, pode ser sugerido que, conforme já proposto por Ramos e colaboradores (1998), diferentes medidas tidas como indicativas de ansiedade podem representar diferentes dimensões deste comportamento, o que explicaria, por exemplo, a ausência (ou a presença em apenas uma geração) do efeito sexo em algumas variáveis analisadas na CBP, efeito este encontrado com alta significância em algumas medidas do CA. Além disso, a diferença esperada entre as linhagens N10 “homozigota” e os controles SHR, observada somente em uma variável do teste do CA, poderia ser uma consequência das diferentes dimensões da emocionalidade acessadas por estes testes, o que é corroborado por Ramos (2008), que sugere que a correlação entre as variáveis relacionadas à ansiedade nos dois testes seja de apenas 5,3%.

Uma hipótese que não pode deixar de ser considerada é a perda, ao longo dos retrocruzamentos, dos alelos LEW na porção do *Ofil1* responsável pelo aumento da locomoção central, índice este que associou a região com comportamentos relacionados à ansiedade. Nos animais heterozigotos, apesar do controle com marcadores moleculares em três regiões estratégicas deste QTL, recombinações ainda podem ter acontecido nos intervalos entre eles, substituindo assim os alelos LEW por alelos SHR. Esta hipótese, contudo, é pouco provável, pois além dos intervalos em questão serem curtos (e, portanto, pouco sujeitos a eventos de recombinação), na geração N10 “homozigota” foi encontrado um efeito do genótipo no sentido esperado para o tempo no centro do CA, variável não analisada por Ramos e colaboradores (1999) e que, assim como a locomoção central, estaria avaliando a relação do animal com a região aversiva do aparato.

A presença de fatores ambientais que não puderam ser controlados, como as diferentes estações do ano ou a fase do ciclo estral no qual a maioria das fêmeas se encontrava no período dos testes de cada geração, por exemplo, poderia também estar atuando nessas diferenças comportamentais observadas entre as gerações, sendo estas influências difíceis de serem quantificadas.



## 6 CONCLUSÕES

No presente trabalho, não foi possível confirmar o perfil menos “ansioso” dos animais congênicos em relação à linhagem parental SHR, uma vez que o desenvolvimento da linhagem congênica idealizada não foi concluído no prazo desta monografia. Entretanto, durante este período, foi possível analisar o efeito dos alelos LEW no *locus Ofil1* ao longo das gerações N8, N9, N10 e N10 “homozigota”, com o resultado esperado sendo encontrado apenas para o tempo gasto no centro do CA pelos N10 “homozigotos”, o tempo gasto no compartimento branco da CBP pelos animais da geração N8 e o número de transições entre os compartimentos da CBP pelas fêmeas da geração N9. A presença de poucos resultados no sentido esperado provavelmente se deve a um efeito aditivo pequeno dos alelos LEW nas gerações heterozigotas e/ou à heterogeneidade dos animais testados na N10 “homozigota”, devido à falta de um número amostral suficiente de animais congênicos completos (homozigotos para todos os marcadores de interesse).

Devido às questões já discutidas anteriormente, os resultados deste trabalho devem apenas servir como uma prévia do perfil comportamental que poderá ser observado ao analisarmos animais homozigotos LEW para toda a região do *Ofil1*, já que a maioria dos efeitos observados foi pouco significativa e algumas vezes até contrários ao esperado. O término da construção da linhagem congênica aqui proposta faz-se necessário para uma avaliação adequada dos efeitos do *locus Ofil1* sobre os comportamentos relacionados à ansiedade em ratos, e abre perspectivas para se avaliar o efeito deste *locus* sobre outros fenótipos comportamentais como a depressão, consumo de álcool, hipertensão, síndrome metabólica, entre outros. Após a avaliação dos efeitos de alelos LEW no *locus Ofil1* utilizando-se e linhagem congênica completa, estudos futuros poderiam reduzir ainda mais a região analisada, através da construção de linhagens subcongênicas, facilitando assim a busca e a investigação de genes candidatos.

## REFERÊNCIAS

- AITMAN, T. J.; CRITSER, J.K.; CUPPEN, E.; DOMINICZAK, A.; FERNANDEZ-SUAREZ, X.M.; FLINT, J.; GAUGUIER, D.; GEURTS, A.M.; GOULD, M.; HARRIS, P.C.; HOLMDAHL, R.; HUBNER, N.; IZSVÁK, Z.; JACOB, H.J; KURAMOTO, T.; KWITEK, A.E.; MARRONE, A.; MASHIMO, T.; MORENO, C.; MULLINS, J.; MULLINS, L.; OLSSON, T.; PRAVENEC, M.; RILEY, L.; SAAR, K.; SERIKAWA, T.; SHULL, J.D.; SZPIRER, C.; TWIGGER, S.N.; VOIGT, B.; WORLEY, K. Progress and prospects in rat genetics: a community view. **Nature Genetics**, v. 40, n. 5, p. 516-522, 2008.
  
- ARMSTRONG, C. L.; VOGEL, M. W.; HAWKES, R. Development of Hsp25 expression compartments is not constrained by purkinje cell defects in the lurcher mouse mutant. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 491, p. 69–78. 2005.
  
- BASKIN, S. M.; SMITHERMAN, T. A. Migraine and psychiatric disorders: comorbidities, mechanisms, and clinical applications. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 30 (Supl. 1). P. S61–S65. 2009.
  
- BICE, P.; FOROUD, T.; BO, R.; CASTELLUCCIO, P.; LUMENG,L.; LI, T. K.;CARR, L. G. Genomic screen for QTLs underlying alcohol consumption in the P and NP rat lines. **Mammalian Genome**, v. 9, n. 12, p. 949-55. 1998.
  
- BIGNAMI, G. Selection for high rates and low rates of avoidance conditioning in the rat. **Animal Behavior**, v. 13, n. 2, p. 221-7. 1965.
  
- CARR, L. G.; GABEGGER, K.; SPENCE, J. P.; LIU, L.; LUMENG,L.; FOROUD, T. Development of Congenic Rat Strains for Alcohol Consumption Derived from the Alcohol-Preferring and Nonpreferring Rats. **Behavior Genetics**, v. 36, n. 2, p. 285-290. 2006.
  
- CARTA, M. G.; LOVISELLI, A.; HARDOY, M. C.; MASSA, S.; CADEDDU, M.; SARDU, C.; CARPINIELLO, B.; DELL’OSSO, L.; MARIOTTI, S. The link between thyroid autoimmunity (antithyroid peroxidase autoantibodies) with anxiety and mood disorders in the community: a field of interest for public health in the future. **BMC Psychiatry**, v. 4, n. 25. 2004.

- CRAWLEY, J. N. Neuropharmacologic specificity of a simple animal model for the behavioral actions of benzodiazepines. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 15, n. 5, p. 695-699. 1981.
- FELTENSTEIN, M. W.; DO, P. H.; SEE, R. E. Repeated aripiprazole administration attenuates cocaine seeking in a rat model of relapse. **Psychopharmacology**, v. 207, n. 3, p. 401-411. 2009.
- GARRETT, M.R.; JOE, B.; YERGA-WOOLWINE, S. Genetic linkage of urinary albumin excretion in Dahl salt-sensitive rats: influence of dietary salt and confirmation using congenic strains. **Physiological Genomics**, v. 25, n.1, p. 39-49. 2006.
- GARRETT, M. R.; GUNNING, W. T.; RADECKI, T.; RICHARD, A. Dissection of a genetic locus influencing renal function in the rat and its concordance with kidney disease loci on human chromosome 1q21. **Physiological Genomics**, v. 30, p. 322-334. 2007.
- GORDON, J. A.; HEN, R. Genetic approaches to the study of anxiety. **Annual Review of Neuroscience**, v. 27, p. 193–222. 2004.
- GRIEZ, E. J. L.; FARAVELLI, C.; NUTT, D.; ZOHAR, D. (Ed). **Anxiety Disorders**. West Sussex, UK: John Wiley & Sons Ltd. 2001. 380 p.
- GROSS, C.; HEN, R. Genetic and environmental factors interact to influence anxiety. **Neurotoxicity Research**, v. 6, n. 6, p. 493-501. 2004.
- HOWELLS, F. M.; BINDEWALD, L.; RUSSELL, V. A. Cross-fostering does not alter the neurochemistry or behavior of spontaneously hypertensive rats. **Behavioral and Brain Functions**, v. 5, n. 24. 2009.
- JACOB, H. J. Functional genomics and rat models. **Genome Research**, v. 9, p. 1013-1016. 1999.
- HETTEMA, J. M.; NEALE, M. C.; KENDLER, K. S. A Review and Meta-Analysis of the Genetic Epidemiology of Anxiety Disorders. **American Journal of Psychiatry**, v. 158, n. 10, p. 1568–1578, 2001.

- HINOJOSA, F. R.; SPRICIGO, J. L.; IZÍDIO, G. S.; BRÜSKE, G. R.; LOPES, D. M.; RAMOS, A. Evaluation of two genetic animal models in behavioral tests of anxiety and depression. **Behavioural Brain Research**, v. 168, p. 127-136. 2006.
- KAMIMURA, E.; UENO, Y.; TANAKA, S.; SAWA, H.; YOSHIOKA, M.; UENO, K. I.; INOUE, T.; LI, X.; KOYAMA, T.; ISHIKAWA, R.; NAGASHIMA, K. New rat model for attention deficit hyperactive disorder (ADHD). **Comparative Medicine**, v. 51, n. 3, p. 245-251. 2001.
- KODAVANTI, U. P.; SCHLADWEILER, M. C.; LEDBETTER, A. D.; WATKINSON, W. P.; CAMPN, M. J.; WINSETT, D. W.; RICHARDS, J. R.; CRISSMAN, K. M.; HATCH, G. E.; COSTA, D. L. The Spontaneously Hypertensive Rat as a Model of Human Cardiovascular Disease: Evidence of Exacerbated Cardiopulmonary Injury and Oxidative Stress from Inhaled Emission Particulate Matter. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 164, n. 3, p. 250-263. 2000.
- LANDER, E.S.; SCHORK, N.J. Genetic dissection of complex traits. **Science**, v. 265, n. 5181, p. 2037–2048, 1994.
- LAZAR, J.; MORENO, C.; JACOB, H.J.; KWITEK, A.E. Impact of genomics on research in the rat. **Genome Research**, v. 15, p. 1717-1728. 2005.
- LESCH, K. P. Molecular foundation of anxiety disorders. **Journal of Neural Transmission**, v. 108, p. 717–746. 2001.
- MALSEN, J. G. A. M.; OLIVIER, B.; KAS, M. J. H. Behavioural genetics in mood and anxiety: A next step in finding novel pharmacological targets. **European Journal of Pharmacology**, v. 585, p. 436-440. 2008.
- MEDICAL COLLEGE OF WISCONSIN. **Rat Genome Database** . Disponível em: <<http://rgd.mcw.edu/>>. Acesso em: 29 out. 2009.
- PIESSEVAUX, G.; LELLA, V.; RIVIERE, M.; STIEBER, D.; DREZE, P.; SZPIRER, C. Contrasting epistatic interactions between rat quantitative trait loci controlling mammary cancer development. **Mammalian Genome**, v. 20, n. 1, p. 43-52. 2008.

- RAMOS, A.; BERTON, O.; MORMÈDE, P.; CHAOULOFF, F. A multiple-test study of anxiety-related behaviours in six inbred rat strains. **Behavioural Brain Research**, v. 85, p. 57-69. 1997.
- RAMOS, A.; MELLERIN, Y.; MORMÈDE, P.; CHAOULOFF, F. A genetic and multifactorial analysis of anxiety-related behaviours in Lewis and SHR intercrosses. **Behavioural Brain Research**, v. 96, p. 195-205. 1998.
- RAMOS, A.; MORMÈDE, P. Stress and emotionality: a multidimensional and genetic approach. **Neuroscience and Biobehavioural Reviews**, v. 22, p. 33-57. 1998.
- RAMOS, A.; MOISAN, M-P.; CHAOULOFF, F.; MORMÈDE, C.; MORMÈDE, P. Identification of female-specific QTLs affecting an emotionality-related behavior in rats. **Molecular Psychiatry**, v. 4, p. 453-462. 1999.
- RAMOS, A.; KANGERSKI, A. L.; BASSO, P. F.; SANTOS, J. E. S.; ASSREUY, J.; VENDRUSCOLO, L. F.; TAKAHASHI, R. N.. Evaluation of Lewis and SHR rat strains as a genetic model for the study of anxiety and pain. **Behavioural Brain Research**, v. 129, p. 113-123. 2002.
- RAMOS, A.; CORREIA, E. C.; IZÍDIOS, G. S.; BRÜSKE, G. R. Genetic selection of two new rat lines displaying different levels of anxiety-related behaviors. **Behavior Genet**, v. 33, n. 6, p. 657-668. 2003.
- RAMOS, A. Animal models of anxiety: do I need multiple tests. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 29, p. 493-498. 2008.
- RAPAPORT, M. H.; CLARY, C.; FAYYAD, R.; ENDICOTT, J. Quality-of-Life Impairment in depressive and anxiety disorders. **American Journal of Psychiatry**, v. 162, n. 6, p. 1171-1178. 2005.
- RAPP, J. P.; GARRET, M. R.; DENG, A. Y. Construction of a double congenic strain to prove an epistatic interaction on blood pressure between rat chromosomes 2 and 10. **Journal of Clinical Investigation**, v. 101, n. 8, p. 1591-1595. 1998.
- RODGERS, R. J.; CAO, B. J.; DALVI, A.; HOLMES, A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, n. 3, p. 289-304. 1997.

- SAAD, Y.; YERGA-WOOLWINE, S.; SAIKUMAR, J.; FARMS, P.; MANICKAVASAGAM, E.; TOLAND, E. J.; JOE, B. Congenic Interval Mapping of RNO10 Reveals a Complex Cluster of Closely-Linked Genetic Determinants of Blood Pressure. **Hypertension**, v. 50, p. 891-898. 2007.
  
- SAMUELSON D.J.; HAAG, J. D.; LAN, H.; MONSON, D. M.; SHULTZ, M. A.; KOLMAN, B. D.; GOULD, M. N. Physical evidence of Mcs5, a QTL controlling mammary carcinoma susceptibility, in congenic rats. **Carcinogenesis**, v. 24, n. 9, p. 1455-60. 2003.
  
- SEDA O.; LISKA, F.; KRENOVA, D.; KAZDOVA, L.; SEDOVA, L.; ZIMA, T.; PENG, J.; PELINKOVA, K.; TREMBLAY, J.; HAMET, P.; KREN, V. Dynamic genetic architecture of metabolic syndrome attributes in the rat. **Physiological Genomics**, v. 21, n. 2, p. 243-52. 2005.
  
- SHINOHARA, M.; MAUYAMA, T.; SHODA, T.; TAKAHASHI, T.; KATSUDA, Y.; KOMEDA, K.; KUROKI, M.; KAKEHASHI, A.; KANAZAW, Y. A new spontaneously diabetic non-obese Torii rat strain with severe ocular complications. **International Journal of Experimental Diabetes Research**, v.1, n. 2, p. 89-100. 2000.
  
- SHIOZAWA M.; PROVOOST, A. P.; VAN DOKKUM, R. P. E.; MAJEWSKI, R. R.; JACOB, H. J. Evidence of gene-gene interactions in the genetic susceptibility to renal impairment after unilateral nephrectomy. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 11, n. 11, p. 2068-78. 2000.
  
- SMITS, B. M. G.; CUPPEN, E. Rat genetics: the next episode. **Trends in Genetics**, v. 22, n. 4, p. 232-240. 2006.
  
- SOLBERG, L. C.; BAUM, A. E.; AHMADIYEH, N.; SHIMOMURA, K.; LI, R.; TUREK, F. W.; CHURCHIL, G. A.; TAKAHASHI, J. S.; REDEI, E. E. Sex- and lineage-specific inheritance of depression-like behavior in the rat. **Mammalian Genome**, v. 15, p. 648-662. 2004.
  
- SOMERS, J. M.; GOLDNER, E. M.; WARAICH, P.; HSU, L. Prevalence and incidence studies of anxiety disorders: a systematic review of the literature. **Canadian Journal of Psychiatry**, v. 51, n. 2, p. 100-113. 2006.

- STEFFERL, A.; BREHM, U.; STORCH, M.; LAMBRACHT-WASHINGTON, D.; BOURQUIN, C.; WONIGEIT, K.; LASSMANN, H.; LININGTON, C. Myelin oligodendrocyte glycoprotein induces experimental autoimmune encephalomyelitis in the “resistant” Brown Norway rat: disease susceptibility is determined by MHC and MHC-linked effects on the B cell response. **The Journal of Immunology**, v. 163, p. 40-49. 1999.
- TIZABI, Y.; HAUSER, S. R.; TYLER, K. Y.; GETACHEW, B.; MADANI, R.; SHARMA, Y.; MANAYE, K. F. Effects of nicotine on depressive-like behavior and hippocampal volume of female WKY rats. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**. 2009.
- TRENTHAM, D. E.; TOWNES, A. S.; KANG, A. H. Autoimmunity to type II collagen: an experimental model of arthritis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 146, p. 857-868. 1977.
- VENDRUSCOLO, L. F.; RIGALDIE, E. T.; RABA, F.; RAMOS, A.; TAKAHASHI, R. N.; MORMÈDE, P. Evidence for a female-specific effect of a chromosome 4 locus on anxiety-related behaviors and ethanol drinking in rats. **Genes, Brain and Behavior**, v. 5, p. 441-450. 2006.
- WALLIS, R. H.; COLLINS, S. C.; KAISAKI, P. J.; ARGOUD, K.; WILDEN, S. P.; WALLACE, K. J.; RIA, M.; KTORZA, A.; RORSMAN, P.; BIHOREAU, M. T.; GAUGUIER, D. Pathophysiological, genetic and gene expression features of a novel rodent model of the cardio-metabolic syndrome. **PLoS One**, v. 3, n. 8. 2008.
- WEISS, E.; GREENBERG, G. Open Field Procedures. In: GREENBERG, G.; HARAWAY, M. M. **Comparative Psychology: A Handbook**, Taylor & Francis, 1998. p. 257- 263.