



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – LICENCIATURA
NOTURNO

Consumo voluntário do etanol nas linhagens isogênicas de ratos SLA16 e SHR

ACADÊMICA: Thalita Mello Alves

ORIENTADOR: Prof. Dr. Geison Souza Izídio

Florianópolis – SC

2018

Resumo

Alguns estudos sugerem uma correlação positiva entre consumo de álcool e ansiedade, em humanos e em modelos animais. Afim de melhor compreender as bases genéticas destes transtornos, foram comparados, em um protocolo de consumo espontâneo de etanol, os ratos da linhagem isogênica SLA16 (*SHR.LEW-Anxrr16*) e SHR (do inglês, ratos espontaneamente hipertensos), que diferem apenas em uma região do cromossomo 4 (*Anxrr16*). Estas duas linhagens apresentam diferenças nos seus níveis basais de ansiedade. No teste de etanol forçado, a ANOVA revelou um efeito do fator sexo ($F=17,2$; $p<0,01$), onde fêmeas consomem mais etanol que machos. No consumo de etanol voluntário, a ANOVA de medidas repetidas revelou uma interação entre os fatores sexo e repetição ($F=5,3$; $p<0,01$). O teste post-hoc de Duncan sugere que fêmeas consomem mais etanol que machos nas concentrações 5%, 10% e 20%. Quando avaliada à preferência ao etanol, a Anova de medidas repetidas revelou uma interação entre os fatores sexo e repetição ($F=3,55$; $p<0,05$). O teste post-hoc de Duncan sugere que fêmeas preferem mais o etanol que machos nas concentrações de 2.5%, 5% e 10%. Não foi demonstrada diferenças entre linhagens, embora haja uma tendência de maior consumo de etanol em fêmeas SHR. Nossos resultados ressaltam a importância de se avaliar fêmeas na pesquisa básica, ou pré-clínica. As diferenças encontradas sugerem que estudos futuros que visem encontrar os genes de *Anxrr16*, que estão relacionados com o consumo de etanol, foquem em fêmeas destas linhagens.

Palavras chaves: ansiedade, neurogenética, ratos isogênicos/congênicos, QTL.

SUMÁRIO

1. Introdução	4
2. Material e Métodos.....	6
2.1. Animais	6
2.2. Definição dos grupos experimentais	6
2.3. Análises estatísticas.....	7
3. Resultados	7
4. Discussão.....	12
5. Conclusão	15
6. Avaliação dos benefícios da IC no aprendizado e formação científica	15
7. Referências Bibliográficas	17

1. Introdução

Alguns estudos sugerem uma correlação positiva entre consumo de álcool e ansiedade, tanto em humanos quanto em modelos animais [COLOMBO et al., 1995]. Considerando os estudos clínicos que demonstram esta correlação, há alguma evidência de que o abuso crônico do álcool precede os transtornos de ansiedade, e não o contrário [DA SILVA et al., 2004]. Além disso, a influência de fatores genéticos sobre estas duas características comportamentais já foi amplamente demonstrada, sendo assim teoricamente possível, através de seleção genética, a produção de ratos com maior/menor preferência ao etanol e/ou nível de ansiedade.

Vários modelos genéticos de ratos são utilizados em estudos envolvendo ansiedade e consumo de etanol [IZÍDIO; RAMOS, 2007]. Dentre as linhagens isogênicas (nas quais todos os indivíduos são geneticamente idênticos) e contrastantes utilizadas no estudo da emocionalidade em roedores, destacam-se as linhagens LEW (Lewis) e SHR (*Spontaneously Hypertensive Rats*, ou ratos espontaneamente hipertensos). Ratos LEW mostram índices mais elevados de comportamentos relacionados à ansiedade quando submetidos a uma variedade de testes comportamentais, em comparação aos SHR, mas sem diferirem em medidas de locomoção total [RAMOS et al., 1997; 1998]. Para investigar as bases moleculares dessas diferenças, um estudo realizou um intercruzamento entre as linhagens LEW e SHR, e a partir disso foi encontrado um QTL no cromossomo 4 influenciando a locomoção central no teste do campo aberto (CA), ao qual se deu o nome de *Anxrr16 (Anxiety related response QTL 16)* [RAMOS et al., 1999; VENDRUSCOLO et al., 2006]. Além disso, um estudo anterior relatou um QTL próximo ao *Anxrr16* que influencia a preferência ao etanol [TERENINA-RIGALDIE et al., 2003]. Ainda em outro estudo, foi relatado que um QTL no cromossomo 4 influencia os níveis de corticosterona, o que tem implicações em vários distúrbios psiquiátricos, tais como

ansiedade, depressão e dependência de drogas [POTENZA et al., 2004]. Dadas as evidências, esta região do cromossomo 4 pode conter genes influenciando não só comportamentos relacionados à ansiedade, como também o consumo de etanol.

Devido à enorme diferença observada no comportamento emocional entre as linhagens LEW e SHR [CHIAVEGATTO et al., 2008], bem como às descobertas referentes ao *Anxrr16* e à influência deste no comportamento tipo ansioso e no consumo de etanol, estratégias experimentais foram desenvolvidas para identificar suas possíveis origens. Nesse sentido, a fim de melhor caracterizar este QTL, os ratos da linhagem isogênica SLA16 (SHR.LEW-*Anxrr16*) foram selecionados geneticamente a partir de cruzamentos entre as linhagens isogênicas de ratos LEW (doadora de *Anxrr16*) e SHR (receptora) [PEREIRA, 2010; DE MEDEIROS et al., 2013]. Sendo que SLA16 e SHR são geneticamente idênticas, exceto pelo *locus* *Anxrr16* que foi doado pela linhagem LEW, dessa forma qualquer diferença fisiológica ou comportamental entre as duas linhagens pode ser atribuída a este *locus* diferencial quando os fatores ambientais são padronizados.

Tal qual sua contraparte doadora, a linhagem SLA16 difere dos ratos SHR em vários comportamentos relacionados com a ansiedade/emocionalidade. No geral, ratos SLA16 são menos ansiosos que os ratos SHR [DE MEDEIROS et al., 2013; ACUÑA et al., 2015]. Sendo assim, devido à alta prevalência de condições como os transtornos de ansiedade e o alcoolismo em comorbidade, é de grande interesse a utilização das linhagens SLA16 e SHR no estudo das bases comuns entre os comportamentos do tipo ansioso e o consumo de álcool.

Para tal, o presente estudo foi realizado a fim de examinar as possíveis diferenças entre machos e fêmeas das linhagens SHR e SLA16 em um protocolo de consumo de etanol. A comparação do consumo e preferência de etanol voluntário entre estas linhagens em diferentes concentrações poderá nos oferecer respostas sobre a possível participação dos genes da região *Anxrr16* nos comportamentos relacionados ao alcoolismo. Nossa hipótese inicial era que a

linhagem SHR, com comportamento tipo ansioso mais acentuado em comparação a SLA16, consumiria mais etanol que a linhagem SLA16.

2. Material e Métodos

2.1. Animais

Ratos jovens das linhagens isogênicas SHR e SLA16 (n = 10 animais/linhagem/sexo/grupo experimental) usados neste estudo foram mantidos no biotério do laboratório de Genética do Comportamento (LGC). Todos os animais foram mantidos em gaiolas de plástico coletivas (5 ratos/gaiola, forradas com serragem esterilizada, sendo esta trocada a cada dois dias), em condições padronizadas (temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$; ciclo claro/escuro de 12h, luz das 07:00 as 19:00h) com comida e água *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais realizados estão de acordo com as normas previstas pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC).

2.2. Definição dos grupos experimentais

Foram utilizados 40 ratos de ambos os sexos (10/linhagem/sexo, com 10 semanas de idade). Os animais foram submetidos a um período de 2 dias de adaptação ao isolamento, em caixas moradia individuais, onde somente água foi oferecida; 2 dias de etanol forçado (10%); seguido de uma etapa de livre escolha entre água e etanol (2,5%; 5%; 10% e 20%, 2 dias cada concentração). Durante todo o experimento os animais foram alimentados *ad libitum* com ração comercial. O consumo dos líquidos foi medido por pesagem dos bebedouros sendo a quantidade consumida calculada pela diferença entre peso inicial do bebedouro e o peso final. O peso

corporal foi medido no início do experimento e no final do mesmo. As posições das garrafas foram mudadas a cada troca de concentração de etanol para evitar viés de posição. Os dados são apresentados em termos de consumo absoluto (ml) e g de álcool por dia por kg de peso corporal.

2.3. Análises estatísticas

A ANOVA de duas vias ou de duas vias para medidas repetidas foi utilizada para comparar os dados gerados neste experimento. O teste post-hoc de Duncan para comparações de médias foi utilizado para analisar um possível efeito da concentração da solução sempre que um efeito linhagem/consumo, assim como linhagem/preferência, era detectado como significativo pela ANOVA. As diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando $P \leq 0,05$. O software estatístico utilizado para a análise dos resultados foi o Statistica 7 (StatSoft, Tulsa, OK, USA).

3. Resultados

No consumo forçado de etanol a Anova de duas vias revelou um efeito do fator sexo ($F=17,17$; $p<0,01$) mostrando que as fêmeas consumiram significativamente mais etanol que os machos (Figura 1).

No consumo de etanol espontâneo (Figura 2), a Anova de medidas repetidas revelou uma interação entre os fatores sexo e repetição ($F=5,3$; $p<0,01$). O teste post-hoc de Duncan sugere que as fêmeas consomem significativamente mais etanol que os machos nas concentrações de 5%, 10% e 20%. Não foi demonstrada diferenças entre linhagens neste

experimento, porém observou-se uma tendência de maior consumo de etanol na linhagem SHR, ao menos em fêmeas, nas concentrações de 10% e 20%.

Na preferência de etanol (Figura 3) a Anova de medidas repetidas revelou uma interação entre os fatores sexo e repetição ($F=3,55$; $p<0,05$). O teste post-hoc de Duncan sugere que fêmeas preferem significativamente mais o etanol que machos nas concentrações de 2.5%, 5% e 10%.

Em relação a massa corpórea (Figura 4), a Anova de medidas repetidas revelou um efeito significativo dos fatores linhagem ($F=16,0$; $p<0,01$; SLA16>SHR); sexo ($F=1027,0$; $p<0,01$; Machos>Fêmeas) e repetição ($F=196,0$; $p<0,01$; Peso final>peso inicial).

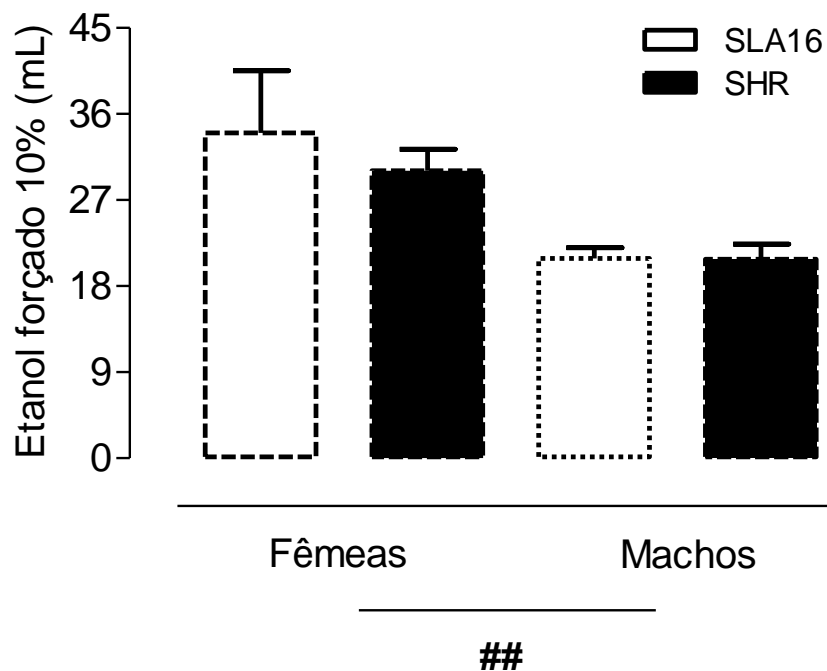


Figura 1. Gráfico referente ao consumo forçado de etanol (10%) em mililitros durante os dois dias desta etapa do experimento. A Anova mostra um efeito do fator sexo, onde fêmeas consumiram mais etanol que machos. ## significam diferenças entre machos e fêmeas $p<0,01$.

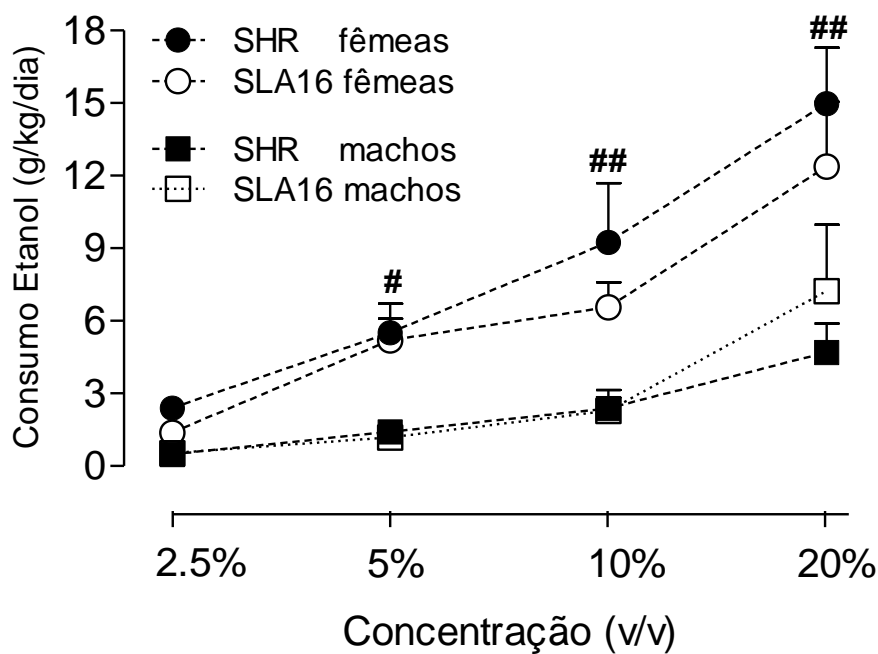


Figura 2. Gráfico referente ao consumo espontâneo de etanol, onde a Anova de medidas repetidas mostrou uma interação entre os fatores sexo e repetição. O teste post-hoc de Duncan sugere que as fêmeas consomem mais etanol que os machos nas concentrações de 5%, 10% e 20%, mas não há diferença significativa entre as fêmeas e os machos na concentração 2,5%. Não foi encontrada diferenças entre linhagens. # ou ## significam diferenças entre machos e fêmeas; $p < 0,05$, $p < 0,01$, respectivamente.

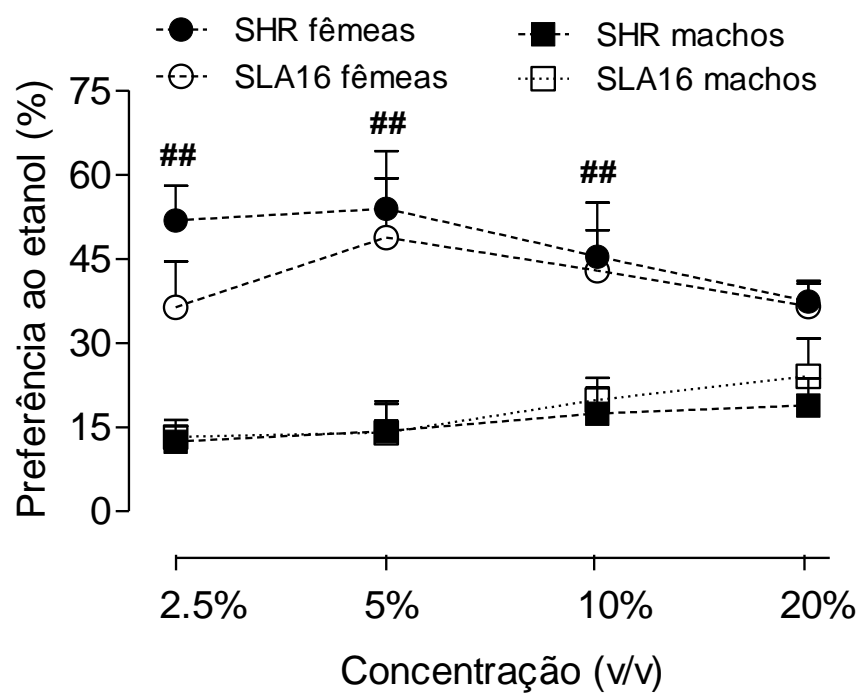


Figura 3. Gráfico de preferência de etanol. A Anova de medidas repetidas mostrou uma interação entre os fatores sexo e repetição. O teste post-hoc de Duncan sugere que as fêmeas preferem mais etanol que os machos nas concentrações de 2,5%, 5% e 10%, mas não há diferença significativa entre as fêmeas e os machos na concentração 20%. Não foi encontrada diferenças entre linhagens. ## significam diferenças entre machos e fêmeas $p < 0,01$.

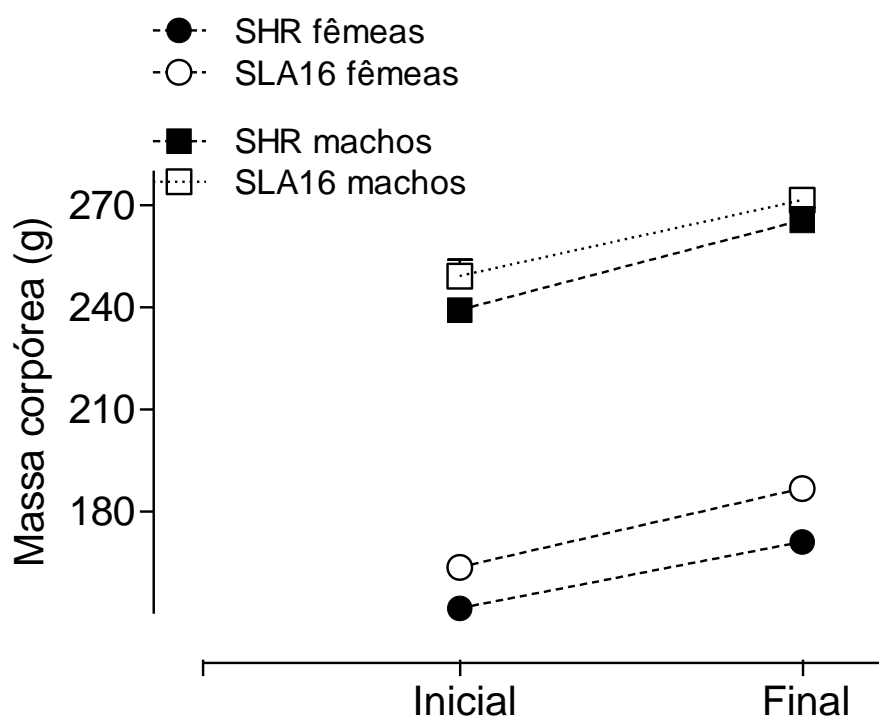


Figura 4.

Figura 4. Gráfico de massa corpórea no início e fim (após doze dias) do protocolo experimental, onde a Anova de medidas repetidas mostrou um efeito significativo dos fatores linhagem, sexo e repetição.

4. Discussão

No presente experimento, nós objetivamos avaliar pela primeira vez machos e fêmeas de duas linhagens isogênicas de ratos, SHR e SLA16, que apresentam um perfil diferencial em medidas de ansiedade/emocionalidade. Nossos resultados mostraram, basicamente, diferenças entre os sexos, em que o consumo e preferência de etanol em fêmeas, das duas linhagens, foi maior do que o consumo dos machos. Não foram encontradas diferenças significativas entre as linhagens SHR e SLA16, exceto nas medidas de massa corporal.

A literatura demonstra que ratos SLA16 possuem menor comportamento tipo ansioso que ratos SHR [DE MEDEIROS et al., 2013; ACUÑA et al., 2015] e sugere que exista uma correlação positiva entre consumo de álcool e ansiedade, tanto em humanos quanto em modelos animais [COLOMBO et al., 1995]. Desta maneira, nós propusemos a hipótese inicial que a linhagem SHR apresentaria níveis maiores de consumo de etanol do que a linhagem SLA16.

Como podemos observar no conjunto atual de experimentos, a nossa hipótese foi negada, pois nenhuma diferença estatística significativa foi encontrada entre as linhagens no consumo, ou preferência de etanol. Apenas uma tendência de maior consumo foi observada na linhagem SHR, nas concentrações de 10 e 20%, bem como uma tendência de maior preferência pelo etanol na concentração de 2,5%, em fêmeas. Experimentos futuros, focados somente em fêmeas avaliando outras concentrações de etanol, outros períodos de tempo, ou protocolos experimentais, poderão adequadamente responder se, de fato, os genes localizados na região *Anxxr16* não são importantes para o consumo de etanol.

Recentemente, alguns pesquisadores têm atentado para a importância do uso de fêmeas em baterias de testes comportamentais [VOIKAR et al. 2001], mas, mesmo assim, esta é ainda uma prática rara. Um número grande de transtornos neuropsiquiátricos apresentam diferenças intersexuais. Por exemplo, certos tipos de ansiedade ou depressão, têm sido observados mais

frequentemente em mulheres do que em homens [SANDFORD et al. 2000]. Além de diferirem em certos tipos de transtornos psiquiátricos, fêmeas também diferem de machos nos padrões de uso de drogas e apresentam maior vulnerabilidade aos efeitos do etanol [SIMPSON; KELLY, 2012], apresentando diferenças tanto na farmacocinética como na farmacodinâmica do etanol [GRAZIANI; NENCINI; NISTICÒ, 2014]. Mulheres apresentam uma menor porcentagem de água corporal o que resulta em maiores concentrações de etanol no sangue [NIH, 2014], apresentam alta incidência no consumo excessivo de etanol, assim como são mais sensíveis aos efeitos negativos do abuso de etanol quando comparadas aos homens [WILHEIM et al., 2015], apresentando maior suscetibilidade para manutenção de consumo [KENNEDY et al., 2013] e recaída [KIPPIN et al., 2005]. A partir da compreensão destas particularidades do comportamento de ingestão de álcool entre machos e fêmeas é possível traçar novas estratégias para a prevenção de problemas ocasionados pelo consumo de etanol.

Uma das principais razões da exclusão das fêmeas dos testes comportamentais como animais experimentais é a flutuação hormonal que ocorre durante o seu ciclo estral. Basicamente, os ratos pertencem a um grupo de animais com ciclo estral curto (4-5 dias), com 4 fases. Estas fases são nomeadas proestro, estro, metaestro e diestro [HEBEL e STROMBERG, 1986].

Tendo em vista os nossos resultados, ondeem que as fêmeas mostraram maior consumo de etanol comparado aos machos tanto na etapa de etanol forçado, como nas concentrações de 5%, 10% e 20%, ou ainda maior preferência por etanol, é possível considerar que esta variação pode ter sido ocasionada pela participação de hormônios sexuais, por exemplo, o estradiol [SANDBERG et al., 1982; MARINELI et al., 2003]. Além disso, é possível que o maior consumo em fêmeas esteja também relacionado à progesterona decorrente do ciclo estral. Usualmente a menor quantidade deste hormônio pode acarretar reações como ansiedade, o que por sua vez é fortemente relacionado ao alto consumo e preferência de etanol [GOUVEIA et

al., 2004]. Esta questão pode justificar o motivo de fêmeas consumirem mais etanol do que machos.

É de conhecimento geral que a linhagem isogênica SHR foi selecionada para apresentar hipertensão inata. Um estudo recente [DOS ANJOS, 2017], realizado em nosso laboratório, revela uma diferença na pressão arterial entre SHR e SLA16, onde SHR apresenta maior Pressão Arterial que SLA16, além de demonstrar a relação positiva entre a hipertensão da linhagem SHR e o elevado consumo de etanol desta linhagem. Neste estudo realizado em fêmeas, ao ser administrado um anti-hipertensivo, o consumo de etanol espontâneo e a pressão arterial da linhagem SHR foram diminuídas. Esta correlação positiva também poderia justificar a maior tendência ao consumo e preferência de etanol por fêmeas SHR, no nosso estudo.

É importante considerar que alguns QTL relacionados ao consumo de etanol foram encontrados no cromossomo 4 próximo ao QTL *Anxrr16* [CARR et al., 1998], o que veio a ser corroborado mais tarde por Bice et al. (1998). Todavia, em estudo utilizando fêmeas F3 derivadas de um inter cruzamento entre SHR e LEW, Vendruscolo et al. (2006) descreveram que o QTL localizado no cromossomo 4 afeta o consumo de etanol. Mais tarde Izídio et al. (2011) demonstraram um novo QTL no cromossomo 4 que afeta o consumo forçado de etanol na concentração de 10%. Com este arcabouço bibliográfico podemos dizer que nesta região genômica diferencial pode haver diferentes genes envolvidos na regulação do consumo de etanol.

Embora os machos pesem mais que as fêmeas, não houve consumo maior em machos que possa ser justificado pela busca de calorias no etanol para manutenção de peso por seus indivíduos. Essa falta de correlação de massa corpórea com a ingestão de etanol é interessante, pois ajuda a dissociar os efeitos farmacológicos do etanol nos animais. Da mesma maneira, animais da linhagem SLA16 apresentaram uma maior massa corporal do que animais SHR. Isso pode estar também relacionado ao *locus* *Anxrr16*, onde de acordo com o site Rat Genome

Database, próximo à região, há a presença de dois QTL codificantes para ganho de massa corporal (*Bw52* e *Bw53*).

5. Conclusões

O estudo demonstra que não há diferença entre o fator linhagem no consumo ou preferência de etanol, embora haja diferença significativa no fator sexo. As diferenças de sexo encontradas podem sugerir a participação dos hormônios sexuais e suas flutuações, bem como a hipertensão inata de SHR, na regulação do consumo de etanol em fêmeas. Embora haja uma maior tendência ao consumo e preferência nas fêmeas da linhagem SHR, não houve diferenças significativas entre fêmeas de ambas linhagens. Sendo assim, experimentos futuros, focados somente em fêmeas poderão adequadamente responder se, de fato, os genes localizados na região *Anxxr16* não são importantes para o consumo de etanol.

6. Avaliação dos benefícios da IC no aprendizado e formação científica

A possibilidade da iniciação científica (IC) me proporcionou uma boa experiência no que eu imaginava ser o ramo da pesquisa acadêmica, tanto no seu âmbito científico (realização de projetos, trabalhos experimentais, entre outros) quanto em seu âmbito burocrático (conserto de materiais necessários às práticas do laboratório, compra de materiais, realização de orçamentos). Todas as experiências vividas no laboratório já me auxiliaram como ainda irão me auxiliar em minha formação, onde dada esta vivência, posso saber o que irei encontrar na prática de pesquisa acadêmica depois da minha formação, o que irá me auxiliar muito caso escolha este ramo para meu futuro profissional.

Além disso, a realização de leituras de artigos e seminários sobre a linha de pesquisa realizada no laboratório (entre outras atividades) foram um ganho em minha vida acadêmica, em que discussões sobre novos projetos e seus entraves, assim como discussões críticas sobre artigos lidos e seus possíveis problemas metodológicos me ajudaram a desenvolver o senso crítico, não só nos estudos relacionados à linha de pesquisa do laboratório, como também nas aulas da graduação.

Acrescentado ao desenvolvimento do senso crítico, também há o desenvolvimento da criatividade. Antes da IC sempre imaginei ciência como algo rígido, onde se devia sempre seguir determinado protocolo para que o experimento ocorra corretamente, o que realmente ocorre, porém não é a realidade completa. Por exemplo, para algum aprofundamento relacionado à pesquisa, faz-se necessário a criação de um novo protocolo (caso não haja algum já existente) e é nesse ponto que entra a criatividade. Obviamente há outros pontos onde a solução criativa é necessário.

Outros pontos a serem colocados são a utilização de materiais laboratoriais, antes só utilizados em escassas aulas práticas no decorrer da graduação, agora utilizadas com frequência no laboratório. Isto confere um reforço do que foi aprendido nas aulas práticas anteriores, como também uma boa experiência para aulas práticas futuras.

Em suma, a iniciação científica me ajudou por demais, desde a vivência na realidade do ramo de pesquisa acadêmico do país, como também nas aulas da graduação, seja pelo senso crítico desenvolvido na IC, seja pela leitura de artigos e discussões realizados no laboratório, além das práticas realizadas no mesmo.

7. Referências Bibliográficas

COLOMBO, G., AGABIO, R., LOBINA, C., REALI, R., ZOCCHI, A., FADDA, F., GESSA, G. L.. Sardinian Alcohol-Preferring Rats: A Genetic Animal Model of Anxiety. **Physiology & Behavior**, Vol. 57, No. 6, pp. 1181-1185, 1995.

DA SILVA, G.E., RAMOS, A., TAKAHASHI, R.N.. Comparison of voluntary ethanol intake by two pairs of rat lines used as genetic models of anxiety. **Braz J Med Biol Res** 37(10) 2004.

IZÍDIO, G. S., Ramos, A.. Positive association between ethanol consumption and anxiety-related behaviors in two selected rat lines. **Alcohol** 41 (2007) 517-524.

RAMOS, A., BERTON, O., MORMÈDE, P. and CHAOULOFF, F.. A multiple-test study of anxiety-related behaviours in six inbred rat strains. **Behav. Brain Res.** (1997) 85: 57-69.

RAMOS, A., MOISAN, M-P., WALENTINSSON, A., SJOLING, A., KLINGA-LEVAN, K., Atkinson, O.S., Jacob, H.J., Thomas, M., Grob, U. and Knoblauch, M.. Discrepancies in chromosomal assignment of commercially available rat microsatellite markers. **Rat Genome** (1998) 4: 103-110.

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

VENDRUSCOLO, L. F., TERENINA-RIGALDIE, E., 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** (2006) 5: 441–450.

TERENINA-RIGALDIE, E., JONES, B. C., MORMÈDE, P., Pleiotropic effect of a locus on chromosome 4 influencing alcohol drinking and emotional reactivity in rats. **Genes, Brain and Behavior** (2003) 2: 125–131.

POTENZA, M.N., BRODKIN, E.S., JOE, B., LUO, X., REMMERS, E.F., WILDER, R.L., NESTLER, E.J., GELERNTER, J.. Genomic regions controlling corticosterone levels in rats. **Biol Psychiatry** (2004) Mar 15;55(6):634-41.

ACUNÃ, L. R., Investigaço do fenomeno de tolerncia  primeira exposio (one-trial tolerance) utilizando uma linhagem congnica de ratos (SLA16) e seu controle isognico SHR. Dissertao submetida ao Programa de Ps-Graduao em Farmacologia de Universidade Federal de Santa Catarina para obteno do Grau de Mestre em Farmacologia (2015)

DE MEDEIROS, G.F., PEREIRA, E., GRANZOTTO, N., RAMOS, A.. Low-Anxiety Rat Phenotypes Can Be Further Reduced through Genetic Intervention. **PLoS ONE** (2013) 8(12): e83666. doi:10.1371/journal.pone.0083666

PEREIRA, E.. Desenvolvimento de uma linhagem congnica para um locus no cromossomo 4 do rato com efeito sobre a emocionalidade. Tese apresentada ao Curso de Ps-graduao

em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Farmacologia (2010).

CHIAVEGATTO, S., IZÍDIO, G.S., MENDES-LANA, A., ANEAS, I., FREITAS, T.A., TORRÃO, A.S., CONCEIÇÃO, I.M., BRITTO, L.R.G., RAMOS, A.. Expression of a-synuclein is increased in the hippocampus of rats with high levels of innate anxiety. **Molecular Psychiatry** (2008) 1–12.

IZÍDIO, G.S., OLIVEIRA, L.C., OLIVEIRA, L.F.G., PEREIRA, E., WEHRMEISTER, T.D., RAMOS, A.. The influence of sex and estrous cycle on QTL for emotionality and ethanol consumption. **Mammalian Genome** (2011) 22:329–340.

DA SILVA, G.E., VENDRUSCOLO, L. F., TAKAHASHI, R. N.. Effects of ethanol on locomotor and anxiety-like behaviors and the acquisition of ethanol intake in Lewis and spontaneously hypertensive rats. **Life Sciences** 77 (2005) 693–706.

ALMEIDA, O. F. X.; SHOAI, M.; DEIKE, J.; FISCHER, D.; DARWISH, M. H.; PATCHEV, V. K.. Gender differences in ethanol preference and ingestion in rats. **Journal of Clinical Investigation** (1998) v. 101, p. 2677-2685.

CAILHOL, S.; MORMÈDE, P.. Conditioned taste aversion and alcohol drinking: strain and gender differences. **Journal of Studies on Alcohol** (2002) v. 63, p. 91-99.

MARINELLI, P. W.; QUIRION, R.; GIANOULAKIS, C.. Estradiol valerate and alcohol intake: a comparison between Wistar and Lewis rats and the putative role of endorphins. **Behavioural Brain Research** (2003) v. 139, p. 59-67.

SANDBERG, D.; DAVID, S.; STEWART, J.. Effects of estradiol benzoate on the pattern of eating and ethanol consumption. **Physiol Behav** (1982) v. 29, p. 61-65.

DE OLIVEIRA, L. F. G.. Fatores genéticos e ambientais envolvidos com o consumo de etanol e seus possíveis correlatos comportamentais nas linhagens de ratos Lewis e SHR. 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 (2008).

MONTGOMERY, K.C., MONKMAN, J.A.. The relation between fear and exploratory behavior. **Journal of Comparative Physiological Psychology** (1955) 48, 132–136.

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

GOUVEIA, A. Jr., DOS SANTOS U. D., FELISBINO, F. E., DE AFONSECA, T. L., ANTUNES, G., MORATO, S. Influence of the estrous cycle on the behavior of rats in the elevated T maze. **Behav Processes** (2004) v.67, n.2, p.167-71.

TAKAHASHI, R.N., BERTON, O., MORMÈDE, P., CHAOULOFF, F.. 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. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** (2001) 34, 675–682.

VENDRUSCOLO, L.F., TAKAHASHI, R.N., Bruske, G.R., Ramos, A.. Evaluation of the anxiolytic-like effect of NKP608, a NK1-receptor antagonist, in two rat strains that differ in anxiety-related behaviors. **Psychopharmacology** (2003) 170, 287–293.

DOS ANJOS, P. A R.. Fêmeas das linhagens SHR e SLA16: um modelo genético para o estudo dos efeitos do etanol. Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Farmacologia (2017).

VOIKAR, V.; KOKS, S.; VASAR, E.; RAUVALA, H. Strain and gender differences in the behavior of mouse lines commonly used in transgenic studies. **Physiol Behav**, v. 72, p. 271–81, 2001.

SANDFORD, J. J.; ARGYROPOULOS, S.V.; NUTT, D. J. The psycho biology of anxiolytic drugs. Part 1: **Basic neurobiology. Pharmacol Ther**, v. 88, p. 197–212, 2000.

HEBEL, R.; STROMBERG, M. W. Anatomy and embryology of the laboratory rat. Wörthsee: **BioMed Verlag**, 1986.

SIMPSON, J.; KELLY, J. P. An investigation of whether there are sex differences in certain behavioural and neurochemical parameters in the rat. **Behavioural Brain Research**, v. 229, n. 1, p. 289–300, 2012.

GRAZIANI, M.; NENCINI, P.; NISTICÒ, R. Genders and the concurrent use of cocaine and alcohol: **Pharmacological aspects. Pharmacological Research**, v. 87, p. 60–70, 2014.

NIH. Consideration of Sex as a Biological Variable, 2014. Disponível em: <<https://grants.nih.gov/grants/guide/notice-files/NOT-OD-15-102.html>>. Acessado em: 14/11/2016.

WILHELM, C. J. et al. Females uniquely vulnerable to alcohol-induced neurotoxicity show altered glucocorticoid signaling. **Brain Research**, v. 1601, p. 102–116, 2015.

CARR, L. G. et al. A quantitative trait locus for alcohol consumption in selectively bred rat lines. **Alcoholism, clinical and experimental research**, v. 22, n. 4, p. 884–7, 1998.

BICE, P. et al. Genomic screen for QTLs underlying alcohol consumption in the P and NP rat lines. **Mammalian Genome**, v. 9, n. 12, p. 949–955, 1998.