

**LEANDRO FRANCO VENDRUSCOLO**

**UMA ABORDAGEM FARMACOGENÉTICA PARA O ESTUDO DE  
REAÇÕES DE DEFESA E DEPENDÊNCIA DE DROGAS EM RATOS**

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

**Orientador: Prof. Dr. Reinaldo N. Takahashi  
Co-orientadores: Prof. Dr. André Ramos  
Dr. Pierre Mormède**

**FLORIANÓPOLIS-SC  
2006**

VENDRUSCOLO, Leandro Franco, **Uma abordagem farmacogenética para o estudo de reações de defesa e dependência de drogas em ratos**. Florianópolis, 2006, 134p. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Curso de Pós Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Naoto Takahashi

Co-orientadores: Prof. Dr. André Ramos e Dr. Pierre Mormède

Defesa: 31/03/2006

O presente trabalho avaliou a influência genética em respostas relacionadas a comportamentos de defesa e dependência de drogas em ratos. Para esta proposta, duas estratégias foram utilizadas: i) comparação das linhagens isogênicas de ratos Lewis e SHR; ii) avaliação de quatro linhagens recombinantes (derivadas do intercruzamento entre ratos Lewis e SHR), selecionadas geneticamente para possibilitar o estudo dos efeitos específicos de duas regiões genômicas: *Ofil1* e *Ofil2*. Os ratos Lewis de ambos os sexos, em comparação com os ratos SHR, exibiram maiores níveis de comportamentos relacionados à ansiedade em vários modelos comportamentais (campo aberto, labirinto em cruz elevado e sobressalto acústico), maior inibição comportamental (teste de inibição pelo pré-pulso), mas consumiram menos sacarina, quinino e álcool. Estas linhagens, entretanto, não diferiram em relação aos níveis de analgesia e de corticosterona, quando submetidas ao estresse do odor de um predador. Além disso, os ratos Lewis machos exibiram menor sensibilização comportamental e maior liberação de corticosterona induzida por injeções repetidas de cocaína do que os ratos SHR. Em fêmeas, o locus *Ofil1* afetou os níveis de ansiedade e o consumo de álcool enquanto o locus *Ofil2* afetou a inibição comportamental e o efeito hiperlocomotor da cocaína. Em machos, o locus *Ofil1* afetou as respostas comportamentais e neuroendócrinas ao estresse, bem como o desenvolvimento de sensibilização psicomotora induzida pela cocaína. Em conclusão, ratos Lewis e SHR exibem perfis “psiconeuroendócrinos” distintos, sendo, portanto, úteis no estudo genético de várias respostas comportamentais e fisiológicas. As regiões genômicas *Ofil1* e *Ofil2* modularam respostas ligadas à ansiedade, inibição comportamental e dependência de drogas sugerindo a existência, nestas regiões, de genes controlando estes fenótipos.

Palavras-chave: Seleção genética, Linhagens recombinantes, Locus para traços quantitativos (QTL), ansiedade, estresse, alcoolismo, dependência de drogas.

**Este trabalho é dedicado especialmente à minha  
esposa Janaína C. M. Vendruscolo pelo amor,  
amizade e incentivo constante.**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, eu gostaria de expressar meus mais sinceros agradecimentos ao professor Reinaldo N. Takahashi que me orientou durante este doutorado com rigor e paciência. Agradeço por ter confiado em meu trabalho e me incentivado ao longo destes anos. Sua maneira de orientar serviu e sempre servirá como exemplo para minha formação profissional. Não aprendi apenas ciência com o professor Reinaldo, parte do meu crescimento pessoal eu devo a ele.

Agradeço ao professor André Ramos, meu co-orientador, por ter me incluído em sua equipe de trabalho, pela qualidade de sua orientação, disponibilidade, atenção, etc. Sua participação teve papel fundamental na realização do meu estágio de doutorado na França e na realização desta tese. Admiro e reconheço o seu trabalho.

Ao doutor Pierre Mormède, meu agradecimento pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório, onde pude aprender várias técnicas comportamentais, bioquímicas e de biologia molecular, e por ter me dado total liberdade de expressão e autonomia na organização e realização de meus trabalhos. Admiro sua competência científica e sua personalidade.

Aos professores doutores Carlos Alberto Bezerra Tomaz, Roseli Boerngen-Lacerda, Ana Lúcia Brunialti Godard, Gina Struffaldi Morato e Thereza C. Monteiro de Lima Nogueira, eu agradeço por terem gentilmente aceito o convite para participar da banca examinadora, contribuindo para melhorar a qualidade deste trabalho.

Aos colegas/amigos do laboratório de Psicofarmacologia I: Rui, Luciano, Pamplona, Pablo, Meigy, Rafael e Vanessa, e àqueles que finalizaram seus trabalhos neste laboratório, mas participaram da minha jornada: Fabrício e George. Aos colegas do laboratório de Genética do Comportamento, em especial ao Geison, Gustavo, Elayne e Thais. Aos colegas do laboratório Neurogénétique et Stress, especialmente à Claudine Tridon, pelo cuidado com os animais, auxílio nos experimentos e, principalmente, pela sua amizade. O meu muito obrigado a todas estas pessoas pelo convívio harmonioso, pelas discussões científicas e pelos bons momentos compartilhados.

Aos amigos mais antigos, mas de sempre, Carolzinha e Michel, Karina e Alex, Rodrigo Sartório e esposa, Fabrício e Luciano, valeu pela força.

Aos amigos Marie-Pierre e Laurent, assim como seus filhos Tangi, Mael, Marine, Lucille e Luna, o meu muito obrigado pela acolhida, pelos excelentes momentos, pelos bons vinhos com Foie Gras. Espero que a nossa amizade resista ao tempo e aos quilômetros que nos separa.

Agradeço aos professores do Departamento de Farmacologia da UFSC pela dedicação em ensinar, e aos funcionários da Farmaco pelo trabalho competente.

Eu agradeço ao CNPq e a CAPES pelo apoio financeiro no Brasil e no exterior.

Enfim, mas acima de tudo, meus agradecimentos são dedicados a minha família. Aos meus pais Lêdo e Leda, pelo amor e apoio desde sempre; vocês me deram educação e força de vontade para trabalhar em busca de meus objetivos. Meus irmãos, Jú e Cado, e às cunhadas, Cris e Lisa, agradeço pelo carinho e amizade. Agradeço também meus sogros, Darci e Márcia, pelo apoio e incentivo, igualmente ao meu cunhado Alexandre, amigo de tempo, e à sua esposa Paula.

Esta tese é dedicada a você, Janaína. Os êxitos alcançados por mim nos últimos anos são devidos em grande parte a você.

## ÍNDICE

RESUMO	I
ABSTRACT	III
LISTA DE ABREVIACÕES	V
LISTA DE FIGURAS	VI
LISTA DE TABELAS	VIII
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1. Ansiedade como fator de vulnerabilidade à dependência de drogas	2
1.2. Estresse como fator de vulnerabilidade à dependência de drogas	7
1.3. Contribuição genética nas diferenças interindividuais	11
1.4. As linhagens isogênicas de ratos Lewis e SHR como modelo genético para o estudo da ansiedade, estresse e dependência	12
1.5. Regiões cromossômicas modulando comportamentos relacionados à ansiedade em roedores	16
2. JUSTIFICATIVA	19
3. OBJETIVOS	19
3.1. OBJETIVO GERAL	19
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
4. CAPÍTULO 1 - Efeito genético sobre comportamentos relacionados à ansiedade e consumo de álcool	21
4.1. INTRODUÇÃO	21
4.2. MATERIAL E MÉTODOS	23
4.2.1. Produção de quatro linhagens recombinantes através de seleção genética baseada em marcadores	23
4.2.2- Animais	27
4.2.3. Caixa de atividade	27
4.2.4. Campo aberto	28
4.2.5. Labirinto em cruz elevado	29
4.2.6. Testes de consumo	30
4.2.6.1. Livre escolha entre sacarina e água	31
4.2.6.2. Livre escolha entre quinino e água	31
4.2.6.3. Consumo forçado de álcool	31
4.2.6.4. Livre escolha entre álcool e água	32
4.2.6.5. Livre escolha entre água e diferentes concentrações de álcool	32
4.2.7. Pressão arterial	32
4.2.8. Análise estatística	33
5.3. RESULTADOS	34
5.3.1. Caixa de atividade	34
5.3.2. Campo aberto (CA)	34
5.3.3. Labirinto em cruz elevado (LCE)	37
5.3.4. Testes de consumo	39
5.3.4.1. Livre escolha entre água e sacarina	39
5.3.4.2. Livre escolha entre água e quinino	39
5.3.4.3. Álcool forçado (ET 10 %)	41
5.3.4.4. Livre escolha entre água e álcool (ET 10 % vs. água)	41
5.3.4.5. Livre escolha entre água e álcool em diferentes concentrações	42

5.3.5. Pressão arterial	44
5.4. DISCUSSÃO	44
6. CAPÍTULO 2 - Efeito genético na reatividade ao sobressalto acústico e inibição comportamental	50
6.1. INTRODUÇÃO	50
6.2. MATERIAL E MÉTODOS	53
6.2.1. Animais	53
6.2.2. Reflexo de sobressalto acústico	54
6.2.3. Inibição pelo pré-pulso	55
6.2.4. Análise estatística	56
6.3. RESULTADOS	57
6.3.1. Reflexo de sobressalto acústico	57
6.3.2. Inibição pelo pré-pulso	59
6.4. DISCUSSÃO	61
7. CAPÍTULO 3 - Efeito genético na analgesia e liberação de corticosterona induzidas pela exposição de ratos ao odor de um predador	66
7.1. INTRODUÇÃO	66
7.2. MATERIAL E MÉTODOS	68
7.2.1. Animais	68
7.2.2. Medida de corticosterona plasmática	68
7.2.3. Teste de nocicepção	69
7.2.4. Exposição ao odor de raposa (TMT)	69
7.2.5. Análise estatística	70
7.3. RESULTADOS	71
7.3.1. Reatividade nociceptiva basal e após exposição ao TMT	71
7.3.2. Níveis plasmáticos de corticosterona basal e pós-estresse	73
7.4. DISCUSSÃO	75
8. CAPÍTULO 4 - Efeito genético na sensibilização comportamental e neuro-endócrina induzida pela cocaína	81
8.1. INTRODUÇÃO	81
8.2. MATERIAL E MÉTODOS	84
8.2.1. Animais	84
8.2.2. Drogas	84
8.2.3. Sensibilização comportamental induzida pela cocaína	85
8.2.4. Análise estatística	86
8.3. RESULTADOS	87
8.3.1. Desenvolvimento de sensibilização comportamental induzida pela cocaína	87
8.3.3. Desafio com cocaína na locomoção e na liberação de corticosterona	92
8.4. DISCUSSÃO	96
9- DISCUSSÃO GERAL	102
9.1. As linhagens LEW e SHR	103
9.2. Efeito dos <i>loci</i> Ofil1 e Ofil2	108
10- CONCLUSÕES	115
11- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	116
12- ANEXOS	132

## RESUMO

A combinação de fatores ambientais e genéticos determina a vulnerabilidade individual para o desenvolvimento de dependência de drogas. Outros transtornos psiquiátricos como ansiedade, depressão e o transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) são comumente observados em indivíduos dependentes de drogas. Estas altas taxas de comorbidade provavelmente refletem a existência de fatores genéticos comuns, porém muito pouco se sabe sobre as bases moleculares envolvidas nestes processos.

As linhagens isogênicas de ratos Lewis (LEW) e SHR têm sido propostas como modelo genético para o estudo da ansiedade, por exibirem altos e baixos níveis de comportamentos relacionados à ansiedade, respectivamente. Os ratos SHR também são considerados como um modelo animal para o estudo do TDAH. Técnicas de mapeamento de *locus* para traços quantitativos (QTL) permitiram a identificação dos primeiros *loci* (*Ofil1*, no cromossomo 4 e *Ofil2*, no cromossomo 7) para comportamentos relacionados à ansiedade em ratos, através do inter cruzamento das linhagens LEW e SHR.

O objetivo principal do presente estudo foi verificar a influência genética sobre várias respostas relacionadas a comportamentos de defesa e dependência de drogas, buscando estabelecer correlações entre elas. Para esta proposta, duas estratégias foram utilizadas: i) comparação das linhagens isogênicas puras LEW e SHR; ii) avaliação de quatro linhagens recombinantes (derivadas do inter cruzamento entre ratos LEW e SHR), selecionadas geneticamente para possibilitar o estudo dos efeitos específicos dos QTLs *Ofil1* e *Ofil2*, bem como da sua interação.

Os ratos LEW de ambos os sexos exibiram maiores níveis de comportamentos relacionados à ansiedade em vários modelos comportamentais (campo aberto, labirinto em cruz elevado e sobressalto acústico), maior inibição comportamental (menor impulsividade), mas consumiram menos sacarina, quinino e álcool do que os ratos SHR. Estas linhagens, entretanto, não diferiram em relação aos níveis de analgesia e de corticosterona (o mediador primário da resposta hormonal ao estresse), quando submetidas ao odor de um predador. Além disso, os ratos LEW, mas não os SHR, exibiram aumento



dos níveis de corticosterona após injeções repetidas de cocaína. O *locus Ofil1* afetou os níveis de ansiedade e o consumo de álcool em fêmeas. Ainda em fêmeas, o *locus Ofil2* afetou a inibição comportamental e o efeito hiperlocomotor da cocaína. Em machos, o *locus Ofil1* afetou as respostas comportamentais e neuroendócrinas ao estresse e o desenvolvimento de sensibilização psicomotora induzida pela cocaína.

Em conclusão, ratos LEW e SHR exibem perfis “psiconeuroendócrinos” distintos, sendo, portanto, úteis no estudo genético da ansiedade, das respostas relacionadas ao estresse e da dependência de drogas. A utilização destas linhagens também pode favorecer o estudo de algumas relações positivas, como a inibição comportamental e o consumo de álcool, e os níveis de ansiedade e a susceptibilidade aos efeitos da cocaína. As regiões genômicas *Ofil1* e *Ofil2* modularam respostas ligadas à ansiedade, inibição comportamental e dependência de drogas. A dissecação destes *loci* pode ser promissora na identificação de gene(s) e produto(s) gênico(s) influenciando respostas relacionadas aos sistemas de defesa e de dependência de drogas. Estes resultados ressaltam, acima de tudo, a complexidade da influência genética sobre o comportamento, provavelmente, envolvendo interações entre genes, gênero e ambiente.

## ABSTRACT

The combination of genetic and environmental factors determines the individual vulnerability for drug addiction. Other psychiatric disorders such as anxiety, depression and attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD) are frequently observed in drug addicted patients. These high rates of comorbidity probably reflect the existence of common genetic mechanisms. However, the molecular bases underlying these processes remain largely unknown.

The Lewis (LEW) and SHR inbred rat strains have been proposed as a genetic model for the study of anxiety, since they show high and low levels of anxiety-related behaviors, respectively. The SHR strain also constitutes an animal model of ADHD. A genome-wide QTL (quantitative trait *locus*) search using a LEW x SHR intercross led to the discovery of two QTLs named *Ofil1* (on chromosome 4) and *Ofil2* (on chromosome 7) linked to an anxiety-related variable.

The main objective of the present study was to verify the genetic influence on several responses related to defensive behaviors and to drug addiction, searching for correlations among them. For this purpose, two approaches were employed: i) to compare the LEW and SHR strains; ii) to evaluate four recombinant strains (deriving from a LEW x SHR intercross) genetically selected to allow the study of the specific effects of *Ofil1* and *Ofil2*, as well their interaction.

LEW rats of both sexes showed higher levels of anxiety-related behaviors in various behavioral tests (open field, elevated plus maze and startle reflex), higher behavioral inhibition (low impulsivity), but they drank less saccharine, quinine and alcohol than SHR rats. These rat strains, however, did not differ in relation to the levels of analgesia and corticosterone (the primary mediator of hormonal stress response) when exposed to a predator odor. Moreover, LEW rats, but not SHRs, displayed enhancement of corticosterone following repeated injections of cocaine. *Ofil1* affected an anxiety-related behavior and alcohol drinking in females. Also in females, *Ofil2* affected behavioral inhibition and the psychostimulant effect of cocaine. In males, *Ofil1* affected the behavioral

and neuroendocrine responses produced by stress and the development of psychomotor sensitization to cocaine.

In conclusion, LEW and SHR rats show distinct “psychoneuroendocrine” profiles, being therefore useful to the genetic study of anxiety, stress-related responses and drug addiction. The LEW and SHR strains seem to be appropriate for studying the positive relationship between behavioral inhibition and alcohol drinking, and anxiety levels and susceptibility to the effects of cocaine. Moreover, *Ofil1* and *Ofil2* modulate experimental responses linked to anxiety, behavior inhibition and drug addiction. Further dissection of these loci should be promising in the identification of gene(s) and gene(s) product(s) influencing responses related to defensive behaviors and drug addiction. The present results also highlight the complexity of the genetic influences on behavior, probably involving interactions among genes, gender and environment.

## LISTA DE ABREVIações

ACTH – Hormônio adrenocorticotrófico

CA- Campo aberto

CRH – Hormônio liberador de corticotrofina

DA- Dopamina

EPM – Erro-padrão da média

ET- Etanol

FDA- *Food and Drug Administration*

HPA – Hipotálamo-pituitária-adrenal

i.p. – Intraperitoneal

LCE – Labirinto em cruz elevado

LEW – Lewis

PCR- *Polymerase chain reaction*

QTL – *Locus* para traços quantitativos

SHR – *Spontaneously Hypertensive Rats*

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1-** Espiral ansiedade-dependência.

**Figura 2-** O eixo HPA.

**Figura 3-** Neuroadaptação produzida pelo abuso de drogas: relação com o estresse.

**Figura 4-** Esquema da produção das quatro linhagens recombinantes.

**Figura 5-** Caixas de atividade.

**Figura 6-** Teste do campo aberto.

**Figura 7-** Labirinto em cruz elevado.

**Figura 8-** Gaiolas individuais para testes de consumo.

**Figura 9-** Locomoção de ratos na caixa de atividade.

**Figura 10-** Locomoção na área central e periférica no campo aberto.

**Figura 11-** Tempo gasto nos braços abertos e número de entradas nos braços fechados do labirinto em cruz elevado.

**Figura 12-** Consumo de sacarina e quinino em livre escolha com água.

**Figura 13-** Consumo de álcool forçado ou em livre escolha com água.

**Figura 14-** Aparelho de sobressalto acústico e inibição pelo pré-pulso.

**Figura 15-** Aparelho para aferir pressão arterial de ratos.

**Figura 16-** Respostas de sobressalto acústico de ratos.

**Figura 17-** Porcentagem de inibição do sobressalto acústico pelo pré-pulso de ratos.

**Figura 18-** Esquema ilustrando os procedimentos da realização do experimento de estresse pelo odor de um predador.

**Figura 19-** Latência para nocicepção basal e pós-estresse de ratos no teste da placa quente.

**Figura 20-** Níveis basais e pós-estresse de corticosterona plasmática de ratos.

**Figura 21-** Esquema dos procedimentos do teste de sensibilização comportamental induzida pela cocaína.

**Figura 22-** Efeito da injeção repetida de cocaína ou salina na atividade locomotora em ratos LEW e SHR (desenvolvimento de sensibilização).

**Figura 23-** Efeito da injeção repetida de cocaína ou salina na atividade locomotora em ratos F4 (desenvolvimento de sensibilização).

**Figura 24-** Efeito de uma dose desafio de cocaína na atividade locomotora e níveis plasmáticos de corticosterona de ratos LEW e SHR.

**Figura 25-** Efeito de uma dose desafio de cocaína na atividade locomotora e níveis plasmáticos de corticosterona de ratos F4.

**Figura 26-** Diagrama esquemático dos efeitos dos *loci Ofil1* e *Ofil2*.

**Figura 27-** Esquema didático dos possíveis efeitos de genes contidos em *Ofil1* e *Ofil2*.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1-** Resumo das principais respostas fenotípicas observadas em ratos LEW e SHR.

# **1. INTRODUÇÃO GERAL**

Existe uma grande diferença entre indivíduos de uma mesma espécie na predisposição para o consumo de drogas de abuso e na vulnerabilidade ao desenvolvimento de dependência. Fatores como constituição genética, influências ambientais, disponibilidade de droga, sexo, personalidade e história de uso de drogas contribuem para estas diferenças. A dependência do álcool (ou etanol), por exemplo, é um transtorno psiquiátrico etiológica e clinicamente heterogêneo de herdabilidade moderada a alta, e causada pela interação complexa entre genes e ambiente (Busto, 2000; Gianoulakis, 2001). A influência genética sobre o alcoolismo tem sido estimada em torno de 50-60%, tanto em homens como em mulheres (Enoch e Goldman, 2001).

Para a maioria dos dependentes de drogas, incluindo o álcool, o abuso de substâncias não ocorre como um transtorno isolado. Quatro condições psiquiátricas (ansiedade, depressão, personalidade anti-social e transtorno de déficit de atenção e hiperatividade) são comumente presentes e, provavelmente, estão envolvidas na psicopatologia da dependência de drogas (Grant e Harford, 1995; Merikangas et al., 1998; Regier et al., 1990). Estudos clínicos e epidemiológicos apontam que mais da metade dos indivíduos dependentes de droga têm transtornos de ansiedade e/ou depressão. Apesar da ocorrência destas comorbidades ser excepcionalmente alta em dependentes de drogas, estes fatores ainda são bastante negligenciados e, conseqüentemente, o diagnóstico e o tratamento destes indivíduos são particularmente ineficientes. Os estudos clínicos e pré-clínicos e o desenvolvimento de estratégias efetivas para tratar esta população estão apenas em fase inicial. Nesta tese, a ênfase será dada à ansiedade e a algumas características do



transtorno de déficit de atenção e hiperatividade em relação ao consumo e a neuroadaptação produzida por drogas.

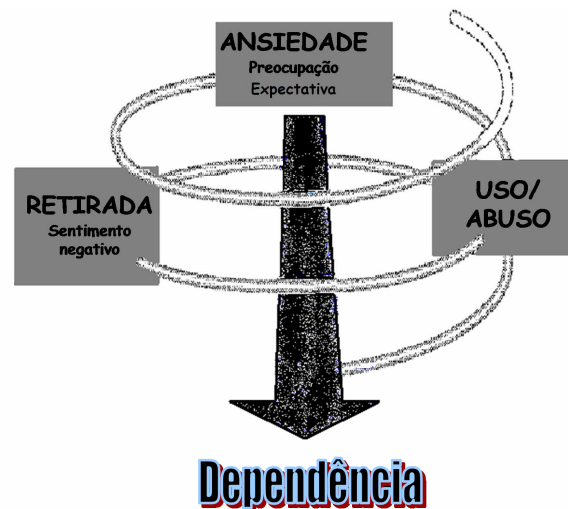
Sabe-se que um grande número de pessoas experimenta drogas com potencial de abuso. Algumas delas passam a consumir drogas ocasionalmente, porém apenas uma parte destes indivíduos adquire dependência (Lende e Smith, 2002; Vanyukov et al., 2003). Na maioria dos países, o consumo de álcool e de outras drogas é comum e o abuso delas é crescente. Atualmente, o grande desafio na pesquisa psiquiátrica consiste na identificação de fatores biológicos e ambientais de risco, ou de proteção, para a vulnerabilidade ao desenvolvimento de dependência. Considerando que a influência de fatores genéticos em psicopatologias é amplamente demonstrada (Lesch, 2001b; Nurnberger et al., 2002), a alta taxa de comorbidade entre transtornos distintos provavelmente reflete a existência de fatores genéticos comuns entre eles, porém muito pouco é sabido sobre as bases moleculares envolvidas nestes processos.

### **1.1. Ansiedade como fator de vulnerabilidade à dependência de drogas**

Estudos epidemiológicos mostram que os transtornos psiquiátricos estão entre as principais causas de incapacidade para o trabalho no mundo (Ezzati et al., 2002) e estima-se que este quadro tende a se agravar nos próximos anos (Lopez e Murray, 1998). Dentre as diversas psicopatologias, os transtornos relacionados à ansiedade são os mais frequentes. Aproximadamente 25% da população sofre, ou irá sofrer, com transtornos de ansiedade, pelo menos em algum momento da vida (Anagnostaras et al., 1999). Estudos clínicos e epidemiológicos documentam uma alta ocorrência de transtornos de ansiedade em pacientes dependentes de drogas (Allan, 1995; Lejoyeux et al., 2000; Merikangas et al.,

1998). Muitos destes pacientes relatam que os problemas com ansiedade precederam o abuso de drogas (Cox et al., 1990). Dados também mostram que os transtornos de ansiedade aparecem tipicamente durante a adolescência, geralmente uma década antes do início dos problemas sérios com álcool ou drogas (Le Fauve et al., 2004). Porém, acredita-se que a ansiedade tenha um papel importante tanto na fase de iniciação, como na manutenção e recaída ao consumo de drogas.

De acordo com a hipótese de redução de tensão formulada inicialmente por Conger (1956), os indivíduos ansiosos ou estressados teriam maior predisposição para consumir álcool com o objetivo de aliviar a tensão (“efeito calmante”). Outra hipótese primária consistente com esta visão geral, algumas vezes chamada de “hipótese da auto-medicação” (Kushner et al., 2001; Quitkin et al., 1972), sugere que os efeitos psicofarmacológicos do álcool e de outras drogas servem para diminuir os sintomas negativos da ansiedade, levando, por meio disso, ao consumo constante e aumento gradativo (“escalada da droga”), via reforço negativo. Koob e Le Moal (1997) sugerem que há uma espiral de ansiedade e dependência. Nesta espiral existem três componentes principais: “Preocupação/Expectativa” (ansiedade) que levaria ao “Uso/Abuso” de uma droga (reforço positivo, alívio da tensão, bem estar, euforia); sendo que na fase subsequente o indivíduo sofreria com a “Sensação Negativa da Abstinência” (ansiedade, mal-estar, angústia, tremores), que é um aspecto motivacional importante para a repetição e manutenção do uso da droga pelo indivíduo. É importante notar que esta espiral aumenta em amplitude com a repetição das experiências, culminando em um estado patológico conhecido como dependência (Koob e Le Moal, 1997) (Figura 1).



**Figura 1-** Espiral ansiedade-dependência. Adaptado de Koob e Le Moal, 1997.

Com base na classificação de tipos de personalidade e consumo de álcool proposta por Cloninger (1987), os indivíduos alcoolistas podem ser divididos em Tipo 1 e Tipo 2. Os alcoolistas do Tipo 1, que geralmente iniciam o consumo “pesado” de álcool em fase mais tardia da vida, apresentam baixo grau de desejo por novidades e maior esquivas ao perigo (“alcoolismo etiologicamente ligado à ansiedade”). Os alcoolistas do Tipo 2, por outro lado, que iniciam o consumo de álcool geralmente na adolescência, exibem alto grau de desejo por novidades e baixa esquivas ao perigo (Cloninger, 1987). Esta classificação talvez possa ser estendida à dependência de outras drogas.

Apesar das taxas excepcionalmente altas de comorbidade entre ansiedade e dependência de drogas, os estudos investigando este tipo de relação estão em fase inicial. Com relação ao álcool, especificamente, existem relatos de que aproximadamente a metade dos alcoolistas tratados em programas de reabilitação permanece abstinente ao álcool por um período de 6 a 12 meses (Bowen et al., 2000; Langenbucher et al., 1997). Entretanto, resultados pouco satisfatórios foram obtidos quando os alcoolistas apresentavam comorbidade com transtornos de ansiedade (Kushner et al., 2000). Os indivíduos alcoolistas

e ansiosos recaem ao consumo de álcool com mais frequência do que aqueles sem esta comorbidade (Driessen et al., 2001). Estas informações conduzem a uma série de questões e desafios em relação à pesquisa não só do alcoolismo, mas também de outros tipos de dependência, por exemplo: i) As medicações aprovadas para tratar transtornos psiquiátricos como ansiedade e depressão são efetivas em pacientes dependentes de drogas? Para obter a aprovação de um medicamento pelo FDA (*Food and Drug Administration*), um órgão americano que regulamenta e aprova a comercialização de medicamentos, as indústrias farmacêuticas geralmente excluem os dependentes de drogas de seus estudos. ii) O tratamento farmacológico e comportamental de dependentes de drogas com comorbidades deve ser diferente do tratamento empregado em pacientes com dependência de drogas sem comorbidades? iii) O tratamento da dependência ou da condição psiquiátrica concomitante melhora os sintomas do outro transtorno?

Os estudos com o objetivo de identificar e avaliar a efetividade de tratamentos em indivíduos dependentes de drogas e que apresentem transtornos de ansiedade são escassos. Um estudo realizado com alcoolistas com transtorno de ansiedade generalizada demonstrou que o ansiolítico buspirona, um agonista parcial do receptor 1A da 5-hidroxitriptamina (5-HT<sub>1A</sub>), foi efetivo em reduzir os sintomas de ansiedade. Além da melhora dos sintomas de ansiedade, os pacientes tratados com buspirona permaneceram mais tempo em tratamento e demoraram mais a retornar ao consumo “pesado” de álcool do que os não tratados (Kranzler et al., 1994). Outros estudos, entretanto, não observaram melhora nos níveis de ansiedade nem redução no consumo de álcool em pacientes tratados com buspirona (Malcolm et al., 1992). Em alcoolistas com transtorno de fobia social, Randal e colaboradores (2001b) encontraram, inesperadamente, que uma terapia cognitivo-comportamental específica para dependência de álcool foi mais efetiva em reduzir o

consumo do que uma terapia planejada para tratar simultaneamente alcoolismo e fobia social (Randall et al., 2001b). Um estudo preliminar com paroxetina, um inibidor seletivo da recaptção de serotonina utilizado no tratamento de fobia social (Stein et al., 1998), demonstrou eficácia e segurança no tratamento de pacientes com ansiedade e dependência de álcool, reduzindo os índices de ansiedade e, mais tardiamente, reduzindo o consumo de álcool pelos indivíduos tratados com paroxetina em comparação ao grupo placebo (Randall et al., 2001a). Dados recentes obtidos em animais de laboratório mostram que o tratamento crônico com fluoxetina e paroxetina (ambas inibidoras da recaptção de serotonina) pode sensibilizar o efeito estimulante e do tipo-ansiolítico produzido pelo álcool (Goeldner et al., 2005), fatores motivacionais supostamente implicados no desenvolvimento do alcoolismo.

Em conjunto, estes dados sugerem que a dependência de drogas e transtornos de ansiedade co-existem com freqüência e que este tipo de comorbidade está associado a piores resultados no tratamento da dependência. Apesar deste conhecimento, esta área de pesquisa (clínica e pré-clínica) está apenas em seu início. Portanto, a investigação de fatores genéticos, farmacológicos e comportamentais pode contribuir com novas estratégias de prevenção e tratamento destes transtornos psiquiátricos. Em relação à dependência de outras drogas de abuso além do álcool, os dados da literatura são ainda mais limitados. Entretanto, alguns estudos demonstram que a iniciação, a manutenção e a recaída ao uso de outras drogas parece ser fortemente influenciados pelos níveis de ansiedade (Merikangas et al., 1998).

## **1.2. Estresse como fator de vulnerabilidade à dependência de drogas**

O conceito de estresse e a sua importância para muitas doenças em humanos foram postulados pelo endocrinologista pioneiro Hans Selye. Este pesquisador descobriu que vários estímulos aversivos causavam o fenômeno então chamado de “síndrome geral de adaptação”, mediada em parte pela pituitária e glândulas adrenais (Selye, 1936). Estresse pode ser definido como um evento ambiental que altera a homeostasia do organismo, evocando uma cascata de respostas fisiológicas, comportamentais e psicológicas que podem ser adaptativas se ocorrerem de maneira moderada e não continuada. No entanto, está bem reconhecido que eventos estressantes, dependendo da intensidade, frequência e de outros fatores, também estão implicados na etiologia e fisiopatologia de uma ampla variedade de doenças psiquiátricas incluindo ansiedade, depressão e abuso de drogas, particularmente em indivíduos vulneráveis (Kandel e Davies, 1982; Nestler et al., 2002). As respostas fisiológicas relacionadas ao estresse incluem a ativação do sistema nervoso central, sistema nervoso autônomo e o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA). Em relação a este último sistema, o estresse aumenta a liberação do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) pelo hipotálamo. A ligação do CRH em seu receptor, na pituitária anterior, aumenta a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). O ACTH via circulação sanguínea, estimula a produção e liberação de glicocorticóides pelo córtex da adrenal que por sua vez produzem seus efeitos fisiológicos (Seong et al., 2002) (Figura 2).

Vários tipos de estresse aumentam a liberação de dopamina (DA) no nucleus accumbens, uma estrutura cerebral chave nos processos motivacionais e de reforço produzido por drogas de abuso, e este efeito pode ser reduzido pelo bloqueio seletivo da liberação de glicocorticóides (Piazza et al., 1996). Tem sido demonstrado também que a

liberação de glicocorticóides pelo estresse e suas ações sobre o sistema dopaminérgico mesolímbico leva a neuroadaptações que conferem aos indivíduos uma maior suscetibilidade aos futuros efeitos de drogas de abuso. Porém, como um estímulo que é geralmente visto como algo aversivo (i.e. estresse) pode aumentar a percepção de reforço associada a uma droga? Além disso, como uma droga de abuso, bem como o estresse, podem ativar o eixo HPA e possuir efeito de reforço positivo? Estas questões intrigantes permanecem como desafio à pesquisa nesta área.

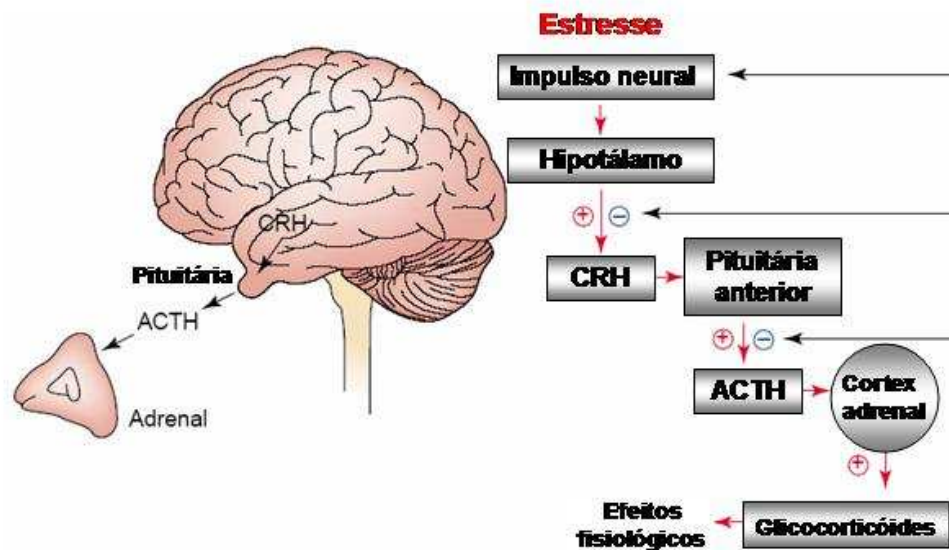


Figura 2- O eixo HPA. Adaptado de Seong et al., 2002.

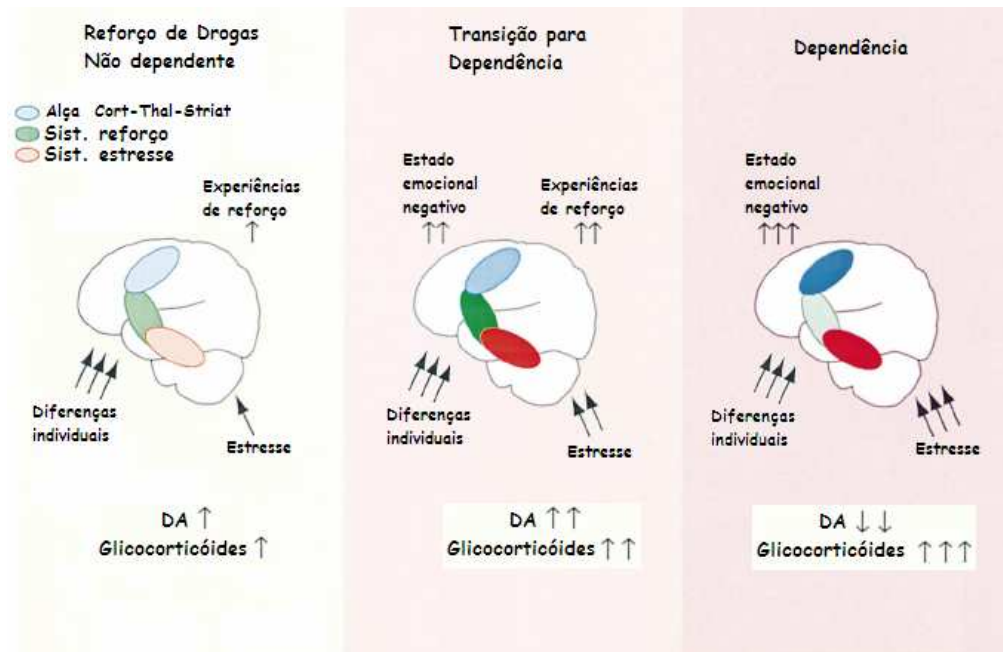
O estresse favorece a auto-administração de drogas em animais e humanos (Goeders, 2002; Kalivas e Stewart, 1991; Piazza e Le Moal, 1998) e a recorrência destes eventos pode promover aumento gradativo e duradouro na liberação de DA em áreas mesocorticolímbicas (sensibilização) (Kalivas e Stewart, 1991). A liberação de DA induzida por drogas também é aumentada em indivíduos estressados (Kalivas e Stewart, 1991) e a administração de cocaína por via intravenosa, intranasal ou fumada, aumenta a

secreção de cortisol em usuários crônicos de cocaína (Mello e Mendelson, 1997). Além disso, os indivíduos dependentes de drogas frequentemente exibem padrões anormais de atividade do eixo HPA. Em ratos, observa-se que a sensibilidade à cocaína pode ser correlacionada positivamente com o aumento de corticosterona plasmática induzido pelo estresse (Goeders, 2002; Goeders e Guerin, 1996). De maneira interessante, os efeitos comportamentais de drogas de abuso são atenuados em ratos adrenalectomizados (Prasad et al., 1998) ou quando a síntese de corticosterona é inibida farmacologicamente (Rouge-Pont et al., 1995). Além disso, o estresse facilita a aquisição do consumo de álcool e pode induzir um aumento na ingestão de álcool durante a manutenção de seu consumo (Pohorecky, 1990), possivelmente via liberação de corticosteróides (Fahlke e Hansen, 1999). Esta correlação entre estresse e dependência parece ocorrer com uma ampla variedade de drogas com potencial de abuso (Piazza e Le Moal, 1998).

De um ponto de vista adaptativo, algumas hipóteses têm sido postuladas no sentido de integrar a participação do estresse na vulnerabilidade à dependência. Como postulado por Koob e Le Moal (2001), em indivíduos em estado “normal” (não dependente) o impacto de estressores seria mínimo (ou adequado à situação), as experiências de reforço também seriam normais e os circuitos cerebrais relacionados aos hormônios do estresse (liberação de cortisol/corticosterona) não estariam ativados. Durante a transição para dependência, tanto o sistema de reforço como o de estresse estariam ativados e o indivíduo começaria a experimentar as sensações emocionais negativas da abstinência da droga. Na dependência, o sistema de reforço estaria em um estado de sub-ativação, enquanto que os sistemas cerebrais do estresse e das respostas emocionais negativas estariam ativados demasiadamente (Koob e Le Moal, 2001).



É importante notar que, além dos fatores ambientais, diferenças genéticas modulam este complexo sistema (Figura 3). Portanto, se certos indivíduos são mais sensíveis ao estresse, então eles podem ser mais propensos ao uso de drogas de abuso. Considerando que os níveis de ansiedade modulam a reatividade ao estresse (Helmstetter, 1993), diferenças nos níveis de ansiedade poderiam influenciar indiretamente este sistema.



**Figura 3-** Neuroadaptação produzida pelo abuso de drogas: relação com o estresse. Três circuitos cerebrais simplificados que contribuem para as alterações no sistema de reforço estão contextualizados: i) sistema de reforço (verde), ii) sistema de estresse (vermelho) e iii) sistema cortico-talamo-estriatal (azul). Adaptado de Koob e Le Moal (2001).

### 1.3. Contribuição genética nas diferenças interindividuais

Está bem reconhecido que fatores genéticos contribuem substancialmente para as diferenças interindividuais nas formas sub-clínicas de ansiedade, nas psicopatologias relacionadas à ansiedade, bem como na vulnerabilidade ao abuso de drogas (Agatsuma e

Hiroi, 2004; Lesch, 2001a; 2001b). No entanto, estes aspectos permanecem pouco compreendidos a nível molecular. Consequentemente, a identificação, localização e caracterização de genes que predisõem indivíduos a manifestarem estas características certamente contribuiriam com novas perspectivas na prevenção, diagnóstico e tratamento da ansiedade, dependência, bem como a da comorbidade destes problemas em humanos.

Estudos de famílias revelam que indivíduos com parentes de primeiro grau com algum transtorno de ansiedade são de 4 a 6 vezes mais suscetíveis a desenvolver tal transtorno do que indivíduos sem este grau de parentesco. A comparação da taxa de concordância em gêmeos dizigóticos e homozigóticos revela que entre 30 e 50% da variabilidade individual no risco de desenvolver algum transtorno de ansiedade deve-se a fatores genéticos (Hettema et al., 2001; Kendler, 2001).

De forma similar, estudos de família e em gêmeos revelam que os genes contribuem para a vulnerabilidade à dependência de drogas, com estimativa de 30 a 60% de herdabilidade. A herdabilidade em dependência foi demonstrada inicialmente no alcoolismo. Estudos em gêmeos evidenciam consistentemente maiores taxas de relação de alcoolismo em gêmeos monozigóticos do que em gêmeos dizigóticos (Hrubec e Omenn, 1981), enquanto que estudos de adoção demonstram maiores índices de alcoolismo em filhos de alcoolistas (criados distantes dos pais biológicos) do que em filhos adotados controle (Goodwin et al., 1973). A predisposição para dependência de drogas, lícitas ou ilícitas, pode ser devida a variações genéticas com efeitos comuns a mais de um tipo de droga, ou pode ser específica para uma droga em particular. Alguns estudos mostram, por exemplo, um componente genético que é compartilhado por múltiplas classes de drogas de abuso (True et al., 1999; Tsuang et al., 1998), enquanto outros estudos demonstram um componente genético específico para uma classe de droga, como é particularmente

observado para a dependência de opióides (Kendler et al., 2003). Existem também diferenças nas influências genéticas vs. ambientais nos efeitos agudos da droga, na transição do uso esporádico para o uso regular, na dependência e na recaída (Tsuang et al., 1999).

Como pode ser notado nos parágrafos precedentes, está bem estabelecido que o risco para o desenvolvimento de transtornos de ansiedade e dependência de drogas é, em parte, transmitido geneticamente. Alguns estudos revelam que membros de famílias de indivíduos com transtornos de ansiedade têm maior propensão para o alcoolismo (Cloninger et al., 1981; Harris et al., 1983) e que membros de famílias de alcoolistas têm risco aumentado para transtornos de ansiedade (Mathew et al., 1993; Reich et al., 1993).

#### **1.4. As linhagens isogênicas de ratos Lewis e SHR como modelo genético para o estudo da ansiedade, estresse e dependência**

As pesquisas utilizando modelos animais têm sido responsáveis por significativos avanços na compreensão de transtornos psiquiátricos. Além da ampliação do conhecimento da biologia humana de maneira geral, os estudos animais têm proporcionado suporte empírico para a importância de fatores genéticos e ambientais no comportamento e desenvolvimento neurobiológico. O desenvolvimento da vasta maioria de agentes psicofarmacológicos utilizados na clínica também depende do uso de modelos animais. No entanto, nenhum modelo animal é perfeito, completo e abrangente o suficiente para “modelar” os mais variados aspectos envolvidos em algum tipo específico de transtorno psiquiátrico, ou qualquer condição médica, e debates contraditórios sobre a validade e utilidade de modelos animais específicos ainda persistem.

Recentemente, Spanagel e colaboradores relataram que camundongos que tinham supressão do gene *Per2*, envolvido na regulação do ritmo circadiano, apresentavam alterações no sistema glutamatérgico e maior consumo de álcool. O tratamento farmacológico com acamprosato, uma droga usada na clínica para prevenir a compulsão (fissura) e a recaída em pacientes alcoolistas, reduziu os níveis de glutamato e normalizou o consumo de álcool nos animais mutantes. Os autores ainda relataram que variações (polimorfismos) do gene *Per2* humano foram associadas com a regulação do consumo de álcool em pacientes dependentes (Spanagel et al., 2005). Este elegante estudo exemplifica de forma clara a importância da utilização de modelos animais na compreensão de psicopatologias em humanos.

O rato de laboratório (*Rattus norvegicus*) foi a primeira espécie de mamífero domesticado para pesquisa científica e os primeiros trabalhos com ratos datam por volta de 1850. O primeiro estudo genético com esta espécie foi realizado entre 1877 e 1885 focalizando no padrão de herança da cor da pelagem. A primeira linhagem isogênica (consangüínea) de ratos foi estabelecida em 1909. As linhagens isogênicas são produzidas através de cruzamentos sucessivos entre irmãos e irmãs ou progenitores e descendentes. Com aproximadamente 20 gerações por endocruzamento, os indivíduos de uma mesma linhagem apresentam mais de 98 % de homozigose, podendo ser considerados isogênicos. A vantagem de utilizar estes animais é que as diferenças fenotípicas encontradas entre indivíduos de uma mesma linhagem podem ser consideradas de origem ambiental. Por outro lado, as diferenças entre populações de linhagens isogênicas diferentes, mantidas sob as mesmas condições ambientais, podem ser consideradas de origem genética. Atualmente, existem mais de 234 linhagens isogênicas de ratos (acessar o *site* “Rat Genome Database”, <http://rgd.mcw.edu>, para mais informações sobre linhagens isogênicas de ratos).

A maior parte dos estudos comportamentais utiliza uma população heterogênea de animais supostamente “normais”, cujas reações comportamentais poderiam ser consideradas, talvez indevidamente, como adequadas do ponto de vista adaptativo (Spooren et al., 2002). No entanto, o estudo de populações extremas (ou claramente contrastantes) em relação a traços de interesse poderia trazer uma maior contribuição à compreensão de processos patológicos observados nas populações humanas. Nesta tese serão utilizados ratos das linhagens isogênicas Lewis (LEW) e espontaneamente hipertensos (SHR), propostos como um modelo genético para o estudo da ansiedade.

Os ratos SHR, quando submetidos a uma variedade de testes comportamentais de ansiedade/emocionalidade, como o labirinto em cruz elevado, campo aberto, caixa claro/escuro e labirinto em T elevado, exibem maior tendência a se aproximar dos ambientes mais aversivos destes testes sendo, portanto considerados como “menos ansiosos” em comparação com os ratos LEW (“mais ansiosos”). Eles não apresentam diferenças, entretanto, nos níveis de locomoção em ambientes menos aversivos, tanto novos como familiares (Ramos et al., 1997; Ramos et al., 2002; Ramos et al., 1998), o que torna este modelo particularmente interessante para o estudo de comportamentos especificamente ligados à emocionalidade. Respostas consistentes nestes testes foram obtidas quando os ratos LEW e SHR foram injetados com drogas ansiolíticas como o diazepam, clordiazepóxido e NKP-608 e com a droga ansiogênica pentilenotetrazol (Ramos et al., 1997; Vendruscolo et al., 2003), sugerindo que as diferenças comportamentais observadas entre estas duas linhagens podem estar associadas aos níveis basais de comportamentos relacionados à ansiedade. Em ambientes sociais, os ratos LEW exibem menor agressividade e maior submissão em comparação aos ratos SHR (Berton et al., 1997) e, quando submetidos a um estresse social por derrotas repetidas (modelo do residente/intruso) ou

estresse da natação forçada, os ratos LEW exibem respostas comportamentais de maior intensidade e/ou duração do que os ratos SHR, incluindo a perda de peso corporal, hipofagia, analgesia e efeitos do tipo ansiogênico (Berton et al., 1998; Vendruscolo et al., 2004). Estes dados sugerem que o impacto de eventos estressantes parece ser mais severo em ratos LEW do que em ratos SHR.

Estas evidências nos encorajaram a comparar diretamente estas linhagens em relação ao consumo de álcool. A relação positiva entre os altos níveis de ansiedade inata e a pré-disposição ao maior consumo de álcool não foi encontrada entre os ratos LEW e SHR. Pelo contrário, os ratos SHR (“menos ansiosos”) beberam mais álcool voluntariamente do que os ratos LEW (Da Silva et al., 2004; Da Silva et al., 2005). Eles também consumiram mais sacarina e quinino (substâncias doces e amargas, respectivamente) do que os ratos LEW, evidenciando uma maior atratividade por novos líquidos exibida pelos ratos SHR (Da Silva et al., 2005). Este resultado foi inesperado pelo fato dos ratos LEW serem considerados como mais suscetíveis ao estresse e ao efeito reforçador de drogas (Kosten e Ambrosio, 2002; Kosten et al., 1994), em comparação a outras linhagens de ratos (e.g. Fischer 344).

Os ratos SHR, além da utilidade para o estudo da ansiedade, são considerados como modelo genético para o estudo do TDAH, por exibirem prejuízo de atenção, hiperatividade em algumas situações, dificuldade em realizar tarefas operantes e serem ávidos por novidades e situações de risco (Sagvolden et al., 2005). Tem sido demonstrado que o TDAH é um fator de risco para a dependência de drogas, incluindo alcoolismo (Biederman et al., 1997; Davids e Gastpar, 2003; Wilens et al., 1997). Portanto, pelo fato dos ratos SHR apresentarem baixo comportamento relacionado à ansiedade (ou menor esquiva do perigo), consumirem grandes quantidades de sacarina e quinino (maior atratividade por novidades),

é possível propor uma hipótese da utilidade desta linhagem como um modelo para o estudo do alcoolismo do Tipo 2 (Da Silva et al., 2005). Obviamente, é preciso ter cautela nestas suposições, pois não se sabe ainda se as demais características comportamentais dos ratos SHR são geneticamente ligadas ao consumo de álcool ou se são apenas relações casuais.

### **1.5. Regiões cromossômicas modulando comportamentos relacionados à ansiedade em roedores**

A utilização de linhagens isogênicas de ratos favorece a investigação das bases moleculares envolvidas em processos fisiopatológicos. Uma abordagem para o estudo molecular de fenótipos complexos (e provavelmente poligênicos), como respostas comportamentais, é a utilização de técnicas de mapeamento de *locus* para traços quantitativos (QTL), no qual o grau de associação entre um *locus* (ou vários *loci*) genético(s) e uma medida quantitativa (e.g., peso corporal, comportamento relacionado à ansiedade) pode ser estimado (Belknap et al., 1997). Um método frequentemente utilizado para a detecção de QTLs consiste na produção de uma população geneticamente segregante (F2, FX ou retro-cruzamento) através do inter cruzamento de duas linhagens isogênicas, particularmente se elas forem contrastantes para um traço de interesse. Uma variedade de QTLs para comportamentos relacionados à ansiedade e consumo de álcool já foram identificados, principalmente em camundongos (mais de 2050 QTLs), mas também em ratos (mais de 700 QTLs) (Flint et al., 2005). As técnicas de QTL também estão sendo aplicadas em humanos.

Embora a dificuldade em identificar genes que controlam fenótipos comportamentais através das análises de QTL seja evidente, este tipo de abordagem tem

contribuído substancialmente com informações sobre a arquitetura genética do comportamento e genes específicos estão começando a ser identificados (Flint, 2003; Korstanje e Paigen, 2002; Liang et al., 2003; Yalcin et al., 2004). Recentemente, partindo de uma análise de QTL, Yalcin e colaboradores (2004) demonstraram que o gene *Rgs2*, que codifica para um regulador de sinalização por proteína G, modula comportamentos relacionados à ansiedade em camundongos. Este estudo pioneiro abre perspectivas na identificação de genes que modulam outros fenótipos complexos (Darvasi, 2005).

Com o objetivo de investigar as bases moleculares das diferenças comportamentais relacionadas à ansiedade entre ratos LEW e SHR, uma busca por QTLs no genoma foi realizada (Ramos et al., 1999). Este estudo revelou uma complexa estrutura genética dos diversos comportamentos. Foram identificados dois QTLs específicos para fêmeas, denominados *Ofil1* e *Ofil2* (localizados nos cromossomos 4 e 7, respectivamente), que afetavam a locomoção na área central e aversiva de um campo aberto (CA), um índice supostamente relacionado à ansiedade. Embora um destes QTLs, como esperado, aumentasse a locomoção central no CA quando os alelos foram herdados da linhagem SHR (*Ofil2* no cromossomo 7), o outro reduzia o traço quando os alelos foram herdados desta linhagem (*Ofil1* no cromossomo 4) (Ramos et al 1999).

Subsequentemente, Mormède e colaboradores (2002) confirmaram o envolvimento destes QTLs em comportamentos relacionados à ansiedade produzindo duas linhagens de ratos com genótipos opostos. Foi encontrado que os ratos da linhagem “High” (alelos LEW em *Ofil1* e alelos SHR em *Ofil2*) exibiam uma menor inibição da locomoção com o aumento da aversividade do ambiente do que os ratos da linhagem “Low” (alelos SHR em *Ofil1* e alelos LEW em *Ofil2*). Curiosamente, estes *loci* não afetaram o tempo de permanência nos braços abertos no teste do labirinto em cruz elevado (Mormede et al.,



2002b; Ramos et al., 1999), uma medida clássica de ansiedade, mas influenciaram processos de inibição comportamental avaliados no teste de inibição do sobressalto acústico pelo pré-pulso. É interessante notar que indivíduos com transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) e esquizofrenia, frequentemente apresentam prejuízos neste teste (Braff et al., 2001; Hawk et al., 2003). Estes dados conduziram Mormède e colaboradores (2002) a concluir que os *loci Ofil1* e *Ofil2* poderiam estar influenciando processos de inibição comportamental (impulsividade), pois a linhagem “High”, que exibia maior locomoção em áreas aversivas, também exibia menor inibição comportamental em comparação à linhagem “Low”. Entretanto, este estudo não permitiu distinguir a influência específica de *Ofil1*, *Ofil2* ou da interação entre eles sobre este comportamento, pois o efeito dos dois *loci* estava combinado em apenas duas linhagens.

Para finalizar, Terenina-Rigaldie e colaboradores (2003a) descreveram um QTL na mesma região do cromossomo 4 (*Ofil1*) influenciando comportamentos relacionados à ansiedade em um inter cruzamento entre ratos Wistar-Kyoto e ratos com alta preferência por álcool (*high ethanol preferring*). Outros QTLs modulando o consumo de soluções de álcool e de sacarina (Carr et al., 1998; Terenina-Rigaldie et al., 2003a; Terenina-Rigaldie et al., 2003b), foram identificados em regiões próximas a *Ofil1*. Ainda na região vizinha a *Ofil1*, um QTL controlando os níveis de corticosterona em ratos foi identificado (Potenza et al., 2004). Estas evidências em conjunto sugerem que esta região genômica pode conter genes relevantes não só para comportamentos relacionados à ansiedade, mas também para consumo de álcool, inibição comportamental e reatividade ao estresse.

## **2. JUSTIFICATIVA**

Considerando a dependência de drogas e suas comorbidades como uma preocupação crescente em termos de saúde pública, a busca de fatores que predisõem indivíduos a desenvolverem estes tipos de transtornos torna-se imperativa. Portanto, o estudo da participação genética em respostas relacionadas à ansiedade, ao estresse e à dependência é de grande importância para a melhor compreensão dos mecanismos biológicos subjacentes a estes processos.

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1. OBJETIVO GERAL**

O objetivo principal do presente estudo foi verificar a participação genética em respostas relacionadas a reações de defesa (ansiedade, estresse e inibição comportamental) e de dependência de drogas e buscar correlações genéticas entre os diversos fenótipos estudados (pleiotropia). Para isto foram utilizados dois modelos genéticos: i) linhagens isogênicas LEW e SHR, e ii) quatro linhagens recombinantes (derivadas do intercruzamento entre ratos LEW e SHR) selecionadas geneticamente para possibilitar o estudo individual das regiões genômicas *Ofil1* e *Ofil2*, bem como a sua interação.

### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Analisar a influência genética nos seguintes fenótipos:

1- Respostas comportamentais de locomoção, ansiedade, consumo de sacarina, quinino e álcool, e pressão arterial (Capítulo 1).

2- Reatividade ao sobressalto acústico, um modelo comportamental de ansiedade, e inibição comportamental avaliada no teste de inibição pelo pré-pulso (Capítulo 2).

3- Reatividade comportamental e neuroendócrina ao estresse produzido pela exposição ao odor de um predador (Capítulo 3).

4- Sensibilização comportamental e ativação do eixo HPA produzidas por injeções repetidas de cocaína (Capítulo 4).

## 4. CAPÍTULO 1

### ***Efeito genético sobre comportamentos relacionados à ansiedade e consumo de álcool.***

#### 4.1. INTRODUÇÃO

Como descrito na introdução geral, dentre as diversas psicopatologias, os transtornos relacionados à ansiedade são os mais frequentes. O abuso de álcool (o termo etanol será utilizado como sinônimo), outro transtorno psiquiátrico frequente, também é considerado como um importante problema de saúde pública (Pearson, 2004). Os indivíduos dependentes de álcool apresentam altos índices de comorbidade com transtornos de ansiedade (Le Fauve et al., 2004). A co-existência destes transtornos provavelmente reflete mecanismos genéticos e ambientais comuns. Entretanto, os mecanismos moleculares envolvidos nestes processos são muito pouco compreendidos, devido, em parte, à falta de modelos animais adequados.

A literatura examinando a relação entre ansiedade e consumo de álcool em modelos animais é bastante controversa. Alguns estudos demonstraram que comportamentos relacionados à ansiedade e consumo de álcool foram positivamente correlacionados (Spanagel et al., 1995; Stewart et al., 1993), enquanto outros estudos não apóiam este tipo de relação (Henniger et al., 2002; Overstreet et al., 1997; Viglinskaya et al., 1995). A

relação positiva entre níveis de ansiedade e consumo de álcool não foi encontrada comparando ratos LEW e SHR (Da Silva et al., 2004; Da Silva et al., 2005). Estas evidências sugerem que este par de linhagens parece não ser um bom modelo para o estudo da relação positiva entre os níveis de ansiedade inata e consumo de álcool. No entanto, Terenina-Rigaldie e colaboradores (2003) relataram um QTL próximo a *Ofil1* influenciando comportamentos relacionados à ansiedade, consumo de sacarina e de álcool em um intercruzamento das linhagens de ratos “high ethanol preferring” e Wistar-Kyoto. Outros QTLs com efeito sobre o consumo de álcool foram encontrados na mesma região em um intercruzamento das linhagens de ratos alcohol-preferring e alcohol-non-preferring (Carr et al., 1998). Estas evidências sugerem que esta região cromossômica, inicialmente identificada a partir de ratos LEW e SHR, pode conter genes controlando comportamentos relacionados à ansiedade e consumo de álcool.

Portanto, nesta primeira etapa do nosso estudo, o objetivo foi caracterizar a contribuição dos *loci Ofil1* e *Ofil2*, bem como sua interação, em uma bateria de testes comportamentais de locomoção, ansiedade, preferência por soluções doces e amargas, e consumo de álcool. A pressão arterial de todos os animais também foi avaliada. As linhagens puras LEW e SHR foram testadas concomitantemente.

## 4.2. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1. Produção de quatro linhagens recombinantes através de seleção genética baseada em marcadores

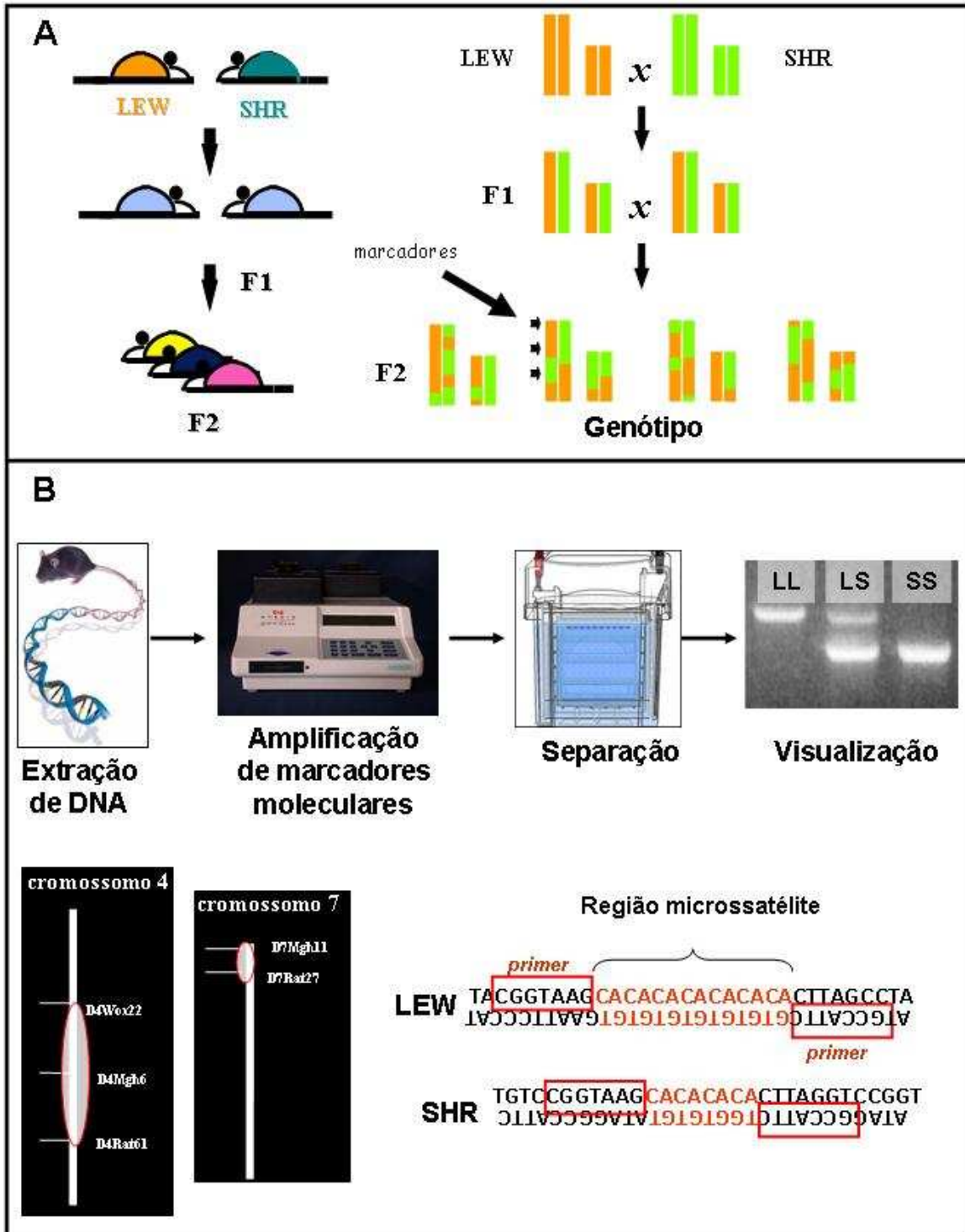
Para possibilitar o alcance dos objetivos desta tese, 4 novas linhagens recombinantes de ratos foram produzidas através de um inter cruzamento entre as linhagens isogênicas de ratos LEW e SHR. Ratos, machos e fêmeas, LEW/CRLIFO e SHR/CRL foram adquiridos de Charles River/IFFA CREDO. Para obter a geração F1, três LEW machos foram cruzados com seis SHR fêmeas e três SHR machos foram cruzados com seis LEW fêmeas. Ratos da geração F1 foram então acasalados entre si para a produção da geração F2. Um total de 453 ratos desta geração (F2) foram genotipados com marcadores moleculares para regiões microsatélites polimórficas escolhidas para flanquear os *loci Ofil1* (D4Wox22, 37,38 cM e D4Mgh6, 58,99 cM) e *Ofil2* (D7Rat35, 6,83 cM e D7Mgh11, 2,3 cM). Os animais que tinham herdado o genótipo homocigoto LEW/LEW (L) ou SHR/SHR (S) para cada um dos dois *loci* (4=*Ofil1* e 7=*Ofil2*) foram utilizados como fundadores das linhagens recombinantes (L4/L7, L4/S7, S4/L7 e S4/S7). Foram utilizados entre 3 e 5 casais de cada linhagem genotípica para a produção dos animais da geração F3 ou F4 testados. As ninhadas foram limitadas a 8 filhotes. Para melhor delinear *Ofil1*, os animais pertencentes à geração F3 foram genotipados com um marcador adicional, D4Rat61 (73,62 cM).

Esta seleção genética possibilitou a produção de 4 linhagens de ratos com o genótipo conhecido somente para as duas regiões genômicas (*Ofil1* no cromossomo 4 e

*Ofil2* no cromossomo 7). O resto do genoma consiste de uma recombinação aleatória de alelos de uma ou de outra linhagem parental (LEW ou SHR) que, teoricamente, não diferem estatisticamente. Portanto, as possíveis diferenças fenotípicas encontradas entre estas linhagens podem ser consideradas resultantes de variações alélicas (polimorfismos) dentro destas regiões cromossômicas especificamente. Abordagens similares a esta já foram empregadas com sucesso previamente (Mormède et al., 2002; Terenina-Rigaldie et al., 2003a).

Os marcadores moleculares para regiões microsátélites foram adquiridos da Eurogentec (Seraing, Bélgica) ou da Research Genetics (Huntsville, Alabama, EUA). O DNA genômico foi extraído, a partir de fragmento tissular da cauda do rato, usando um kit comercial (Promega, Charbonnières, França). As determinações dos genótipos foram realizadas por reações em cadeia da polimerase (PCR). Em uma reação de 20 µl em volume, 50 ng de DNA genômico foi misturado com 5 pmol de cada mix de *primers* e 0,4 U de Taq DNA polimerase (Promega, Charbonnières, França) em tampão Promega tipo A. A amplificação foi feita em micro-placas em um termociclador (Hybaid Limited, Teddington, Reino Unido). As condições da reação de PCR foram as seguintes: desnaturação inicial a 96°C por 5 min, seguido por 35 ciclos de 92°C por 40 s, 55°C por 1 min e 72°C por 30 s, e um ciclo a 72°C por 2 min. Os alelos foram separados em gel de agarose a 3% e visualizados com brometo de etídio sob luz ultra-violeta. A Figura 4 apresenta um esquema da produção das linhagens recombinantes.

Todos os experimentos que compõem esta tese foram realizados de acordo com as normas éticas internacionais para o uso de animais (“Princípios e cuidados com animais de laboratório” da publicação do NIH n° 85-23).





**Figura 4-** Esquema da produção das quatro linhagens recombinantes. (A) Intercruzamento das linhagens LEW e SHR formando a geração híbrida F1. A geração F1 intercruzada dá origem à geração recombinante F2. A parte da direita do desenho ilustra um par de cromossomos (laranja para LEW e verde para SHR). Na geração F1 todos os animais têm 1 cromossomo inteiro de cada linhagem (genótipo: 50 % LEW e 50 % SHR). Na geração F2, as regiões cromossômicas das duas linhagens segregam aleatoriamente, pelo fenômeno de *crossing over*, formando uma geração recombinante. Nestes animais recombinantes, é possível determinar o genótipo em regiões específicas do genoma (e.g. *Ofil1* e *Ofil2*) usando técnicas de biologia molecular. (B) O DNA dos ratos da geração F2 foi extraído a partir de tecido da cauda. O DNA foi então amplificado em reação de PCR para diferentes marcadores moleculares (e.g. D4Wox22), separados em gel de agarose por eletroforese e visualizados com brometo de etídeo sob luz ultra-violeta. Na parte de baixo da figura B, as letras em vermelho correspondem a uma região microssatélite. Regiões microssatélites são pequenas seqüências repetitivas de pares de bases (normalmente dinucleotídeos) presentes ao longo do genoma. Estas regiões, não codificadoras, podem diferir em tamanho em função do número de repetições das seqüências básicas entre os indivíduos (regiões polimórficas). Não se sabe ao certo a origem evolucionária destas regiões nem sua função biológica, entretanto elas servem como marcadores moleculares, uma ferramenta para genotipagem praticamente em todas as espécies, animal ou vegetal. Os *primers* são moléculas complementares que se ligam no DNA flanqueando a região microssatélite (nos sentidos para diante ou reverso) (destacados na figura por um retângulo vermelho). Estes *primers* servem para amplificação da região microssatélite. Com o alelo visualizado sendo LEW ou SHR para um determinado marcador, pode-se considerar que blocos de alelos ligados a estes microssatélites foram herdados da linhagem LEW ou SHR. Portanto, se um animal pertencente à geração F2, F3 ou FX possui o genótipo LEW/LEW ou SHR/SHR nos marcadores que flanqueiam uma região (e.g. para os 3 marcadores para *Ofil1*), pode-se considerar que o animal possui o genótipo da linhagem LEW em todo o *locus* analisado.

#### 4.2.2- Animais

Nesta primeira etapa foram utilizados ratos adultos (8 semanas de idade) das quatro linhagens recombinantes (F3) (n=11 e 14 para a linhagem L4/L7; 5 e 5 para a linhagem L4/S7; 8 e 5 para a linhagem S4/L7; 16 e 12 para a linhagem S4/S7; machos e fêmeas, respectivamente). Grupos adicionais de ratos LEW (10 machos e 10 fêmeas) e SHR (6 machos e 10 fêmeas) com a mesma idade foram testados concomitantemente. Todos os animais foram alojados em caixas coletivas (2-4 ratos/caixa), tendo comida e água disponíveis *ad libitum*, e mantidos sob um sistema claro/escuro de 12 h (início do período claro as 7:00 h) com a temperatura controlada ( $21 \pm 2^\circ\text{C}$ ).

Os testes foram conduzidos entre 8:00 h e 12:30 h. Os animais foram submetidos sucessivamente a uma bateria de testes comportamentais com pelo menos 3 dias de intervalo entre cada teste. A bateria de testes, em ordem de realização, está descrita abaixo:

#### 4.2.3. Caixa de atividade

Os animais foram colocados individualmente, por 60 min, em caixas com chão de grades metálicas e paredes de acrílico transparente (38,5 x 23,5 x 23 cm). As caixas estavam localizadas dentro de uma estante equipada com sensores foto-elétricos (infravermelhos) que estavam conectados a um computador que registrava a locomoção dos animais (idas e vindas) (Imetronic, Pessac, França) (Figura 5). Este teste foi realizado em condições de baixa iluminação ( $< 25$  lux). Neste teste duas variáveis foram analisadas: locomoção durante os primeiros 10 min, representando a reatividade locomotora dos

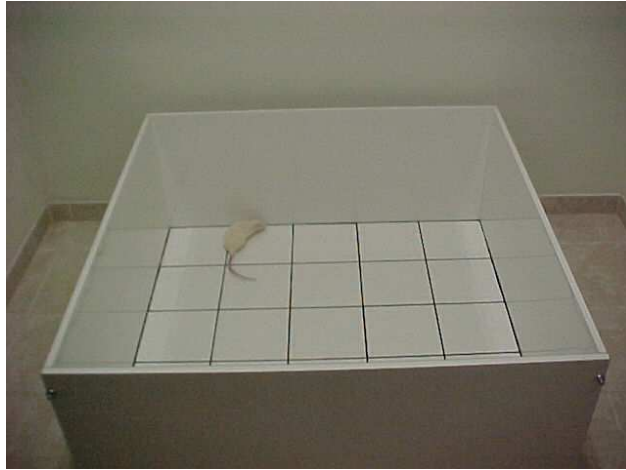
animais em um ambiente novo e a locomoção total (60 min), que representaria a locomoção geral dos animais.



**Figura 5-** Caixas de atividade.

#### **5.2.4. Campo aberto**

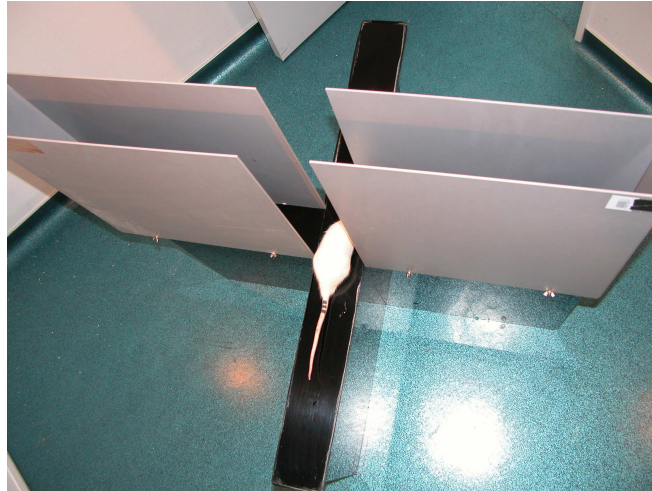
O aparelho é feito de madeira coberta com fórmica impermeável branca com o chão branco de 100 x 100 cm (dividida por linhas pretas em 25 quadrados de 20 x 20 cm) e paredes brancas (40 cm de altura) (Figura 6). A iluminação no centro do campo aberto foi de 530 lux. Cada rato foi colocado no centro do campo aberto e o número de cruzamentos periféricos, adjacentes à parede (locomoção periférica), número de cruzamentos centrais, distantes das paredes (locomoção central) e número total de bolos fecais (defecação) foram registrados por 5 min.



**Figura 6-** Teste do campo aberto.

#### **4.2.5. Labirinto em cruz elevado**

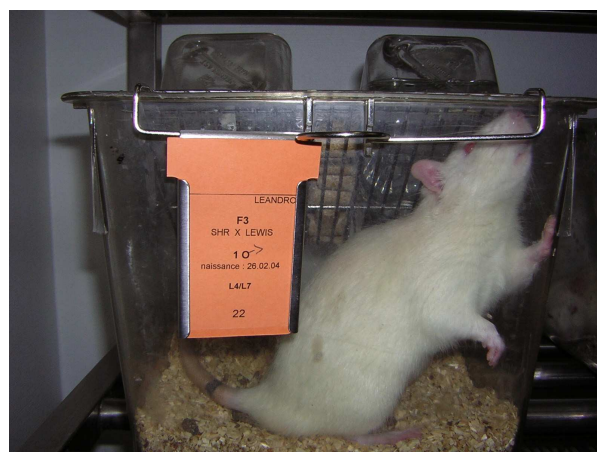
O aparelho feito de acrílico opaco, com chão preto e paredes cinza, possui quatro braços elevados (66 cm de altura) com 45 cm de comprimento e 10 cm de largura (Figura 7). Os braços estão dispostos perpendicularmente, com dois braços opostos fechados por paredes de 50 cm de altura e dois braços abertos (mas com uma borda de 1 cm), tendo em sua intersecção uma plataforma central (10 x 10 cm) que dá acesso a qualquer um dos quatro braços. A plataforma central estava sob iluminação de 530 lux. Cada rato foi colocado na plataforma central com a face voltada para um braço aberto e, em seguida, os seguintes comportamentos foram registrados por 5 min: número de entradas e tempo gasto (com as quatro patas) dentro de cada tipo de braço. O comportamento de cada animal no labirinto, e também no campo aberto, foi gravado por uma câmera de vídeo posicionada acima dos aparelhos e monitorado em outra sala via um circuito fechado de TV-câmera.



**Figura 7-** Labirinto em cruz elevado.

#### 4.2.6. Testes de consumo

Um procedimento padronizado para o consumo de sacarina, quinino e álcool foi utilizado (Terenina-Rigaldie et al., 2003ab). Para os testes de consumo, os animais foram alojados individualmente em gaiolas de acrílico. Os testes foram iniciados após um período de 5 dias de adaptação dos animais nas gaiolas individuais (Figura 8).



**Figura 8-** Gaiolas individuais para testes de consumo.

#### **4.2.6.1. Livre escolha entre sacarina e água**

Os animais tinham livre escolha entre duas garrafas contendo sacarina (7,5 mM; Sigma, Saint Quentin Fallavier, França) ou água por dois dias consecutivos. As garrafas foram pesadas, preenchidas e a posição alternada diariamente no mesmo intervalo de 2 h. Os dados foram expressos como um índice que mede o aumento na ingestão de líquido quando a solução de sacarina estava disponível aos animais de acordo com a seguinte fórmula: volume de sacarina mais o volume de água consumida no mesmo período de 24 horas dividido pelo volume normal de água consumido em 24 h (medido durante os dois dias precedentes), expresso como porcentagem.

#### **4.2.6.2. Livre escolha entre quinino e água**

O protocolo deste teste foi idêntico ao da sacarina, mas com uma solução de quinino (2  $\mu$ M) sendo utilizada.

#### **4.2.6.3. Consumo forçado de álcool**

Os animais tinham acesso somente a uma solução de álcool (10 %, v/v) (Prolabo, Saint Quentin Fallavier, França) por dois dias consecutivos. O volume consumido foi medido diariamente e a posição da garrafa alternada. Os dados estão expressos como a média do consumo de álcool dos dois dias em grama por quilograma de peso corporal (g/kg/dia). Entre os testes de sacarina, quinino e álcool forçado, os animais tiveram acesso somente à água por dois dias.

#### **4.2.6.4. Livre escolha entre álcool e água**

Imediatamente após a exposição ao consumo forçado de álcool, os animais tiveram livre escolha entre álcool (10 %, v/v) e água. As garrafas foram pesadas a cada dois dias (preenchidas quando necessário) por 7 períodos de 2 dias (i.e. 14 dias). Os dados estão expressos em g/kg/dia.

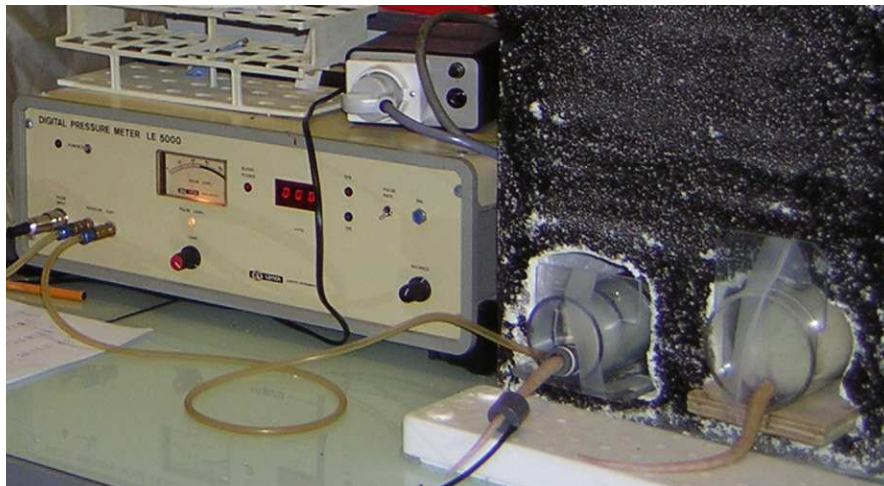
#### **4.2.6.5. Livre escolha entre álcool em diferentes concentrações e água**

Com o objetivo de testar a hipótese de que alguns animais podem ajustar seu consumo de álcool em função da concentração, os animais tiveram livre acesso a água ou a álcool em diferentes concentrações (2,5, 5, 10 e 20 %, v/v), dois dias em cada concentração. Este protocolo iniciou após 4 dias de privação de álcool, sendo que neste período de privação os animais tiveram acesso apenas à água. Os animais foram divididos em 4 grupos, e a ordem de apresentação das diferentes concentrações foi baseada em esquema de quadrado-latino. Os dados estão expressos em g/kg/dia. Durante os testes de consumo, os animais foram pesados pelo menos uma vez por semana.

#### **4.2.7. Pressão arterial**

A pressão arterial sistólica foi aferida pela cauda do rato consciente por um método indireto, não invasivo, usando um sistema de esfigmomanômetro (Letica, Espanha) como descrito previamente (Ramos et al., 1998; Ramos et al., 1999). Os animais foram colocados em um cilindro de acrílico de contenção o qual foi introduzido por uma abertura em uma

caixa aquecida (38°C). A cauda do rato foi deixada para fora da caixa e um transdutor de sinal (conectado a uma unidade digital central, LE 5000) e um *tail cuff* foram colocados na cauda do rato (Figura 15). Os animais foram deixados inalterados por um período mínimo de 30 min. Quando um sinal de pulso constante foi detectado, 5-8 leituras da pressão sanguínea foram obtidas e a média calculada.



**Figura 15-** Aparelho para aferir pressão arterial de ratos acordados.

#### 4.2.8. Análise estatística

Todas as análises foram realizadas separadamente para machos e para fêmeas. Inicialmente, as linhagens LEW e SHR foram comparadas usando-se o teste t de Student. Para o teste de livre escolha entre água e álcool em diferentes concentrações, os dados de LEW e SHR foram comparados utilizando ANOVA de duas vias (linhagem) para medidas repetidas (diferentes concentrações). Para analisar especificamente a influência dos alelos L ou S em cada QTL, bem como sua interação, uma ANOVA de duas vias (fatores *Ofil1* (alelos L ou S) e *Ofil2* (alelos L ou S)) foi realizada exclusivamente com os dados das



quatro linhagens recombinantes. Para os dados do teste de livre escolha entre água e álcool em diferentes concentrações, o fator medida repetida foi incluído na análise (ANOVA de três vias). O teste LSD foi utilizado para as comparações *post-hoc* quando apropriado. O nível de significância aceito em todos os testes foi  $p \leq 0,05$ . Os dados estão expressos nas figuras como média e erro-padrão da média (EPM).

## 5.3. RESULTADOS

### 5.3.1. Caixa de atividade

A Figura 9 ilustra os resultados de atividade locomotora (1 h) de ratos machos (a) e fêmeas (b). Para os machos LEW e SHR, nenhuma diferença estatística foi observada para a locomoção nos primeiros 10 min e para a locomoção total (60 min). Para as fêmeas, o teste t de Student revelou que as fêmeas SHR exibiram maior locomoção nos primeiros 10 min do que as fêmeas LEW ( $t=2,34$ ;  $p<0,04$ ). Elas não diferiram, entretanto, para locomoção total durante 1 h.

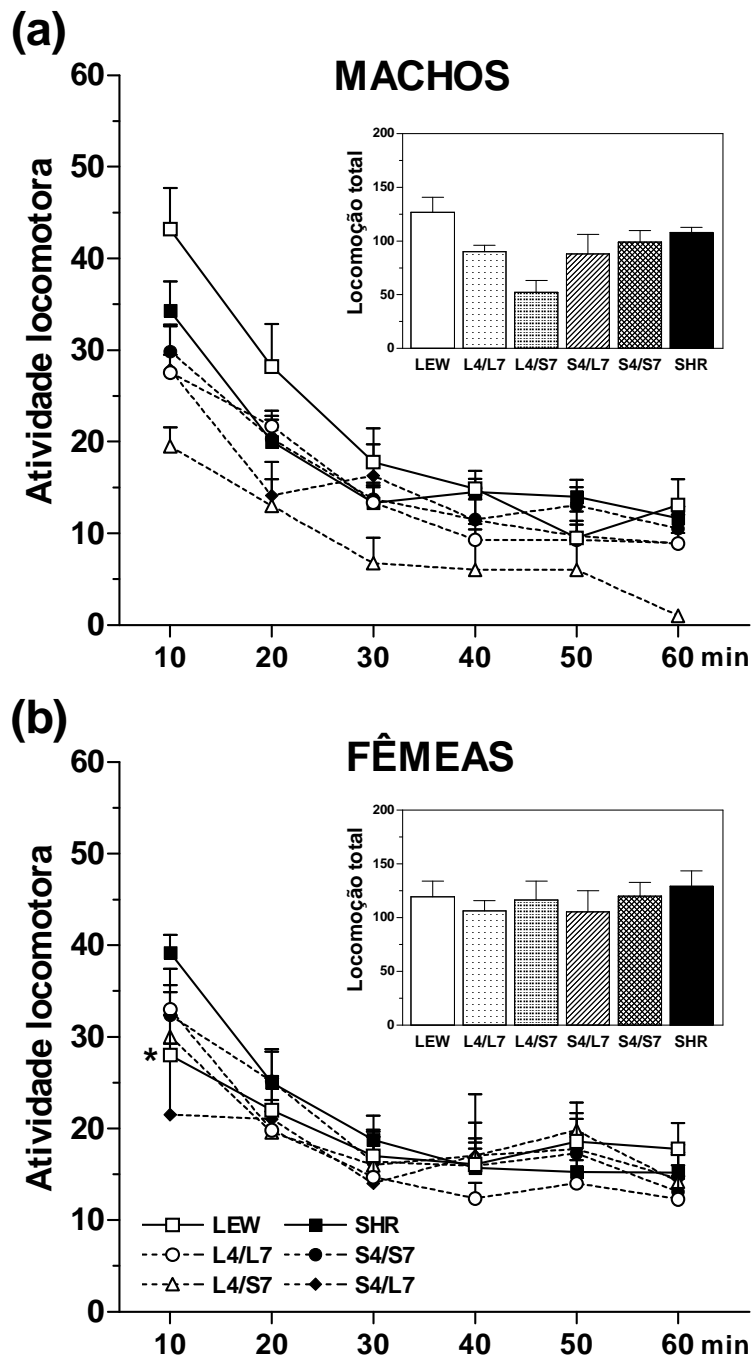
Os *loci Of11* e *Of12* não afetaram a locomoção dos ratos, machos ou fêmeas, na caixa de atividade.

### 5.3.2. Campo aberto (CA)

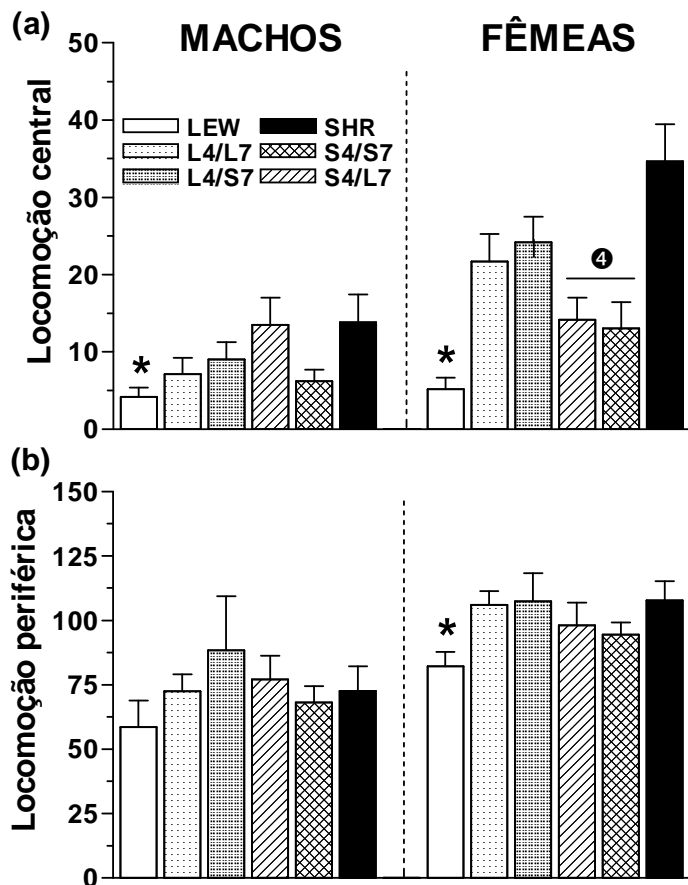
Os resultados da locomoção central (a) e periférica (b) no CA estão ilustrados na Figura 10. Para os machos, o teste t de Student revelou que os ratos SHR fizeram mais cruzamentos na área central, mas não na área periférica, do CA do que os ratos LEW. Para

as fêmeas, foi verificado que as ratas SHR fizeram mais cruzamentos centrais ( $t=5,90$ ;  $p<0,0001$ ) e periféricos ( $t=2,74$ ;  $p<0,02$ ) no CA do que as ratas LEW.

Analisando a influência dos *loci*, a ANOVA de duas vias não revelou efeito significativo para os parâmetros analisados em machos. Para as fêmeas, um efeito geral do *locus Ofil1* ( $F_{(1,32)}=4,81$ ;  $p<0,05$ ) foi observado. As ratas com alelos LEW para este *locus* (i.e., L4) cruzaram mais quadrantes centrais do CA do que as ratas com alelos SHR (i.e. S4). Os *loci Ofil1* e *Ofil2* não influenciaram a locomoção periférica das ratas. A defecação dos animais foi praticamente ausente, assim não foi possível observar efeitos claros para este parâmetro, tanto em machos como em fêmeas.



**Figura 9-** Locomoção de ratos LEW, SHR e F3 (de acordo com a linhagem) machos (a) e fêmeas (b) avaliada na caixa de atividade (atividade horizontal). Os resultados estão apresentados em blocos de 10 min. A atividade total dos ratos durante 1 h está apresentada nas figuras menores. \* Diferença significativa em comparação a ratas SHR (teste t de Student,  $p < 0,05$ ).



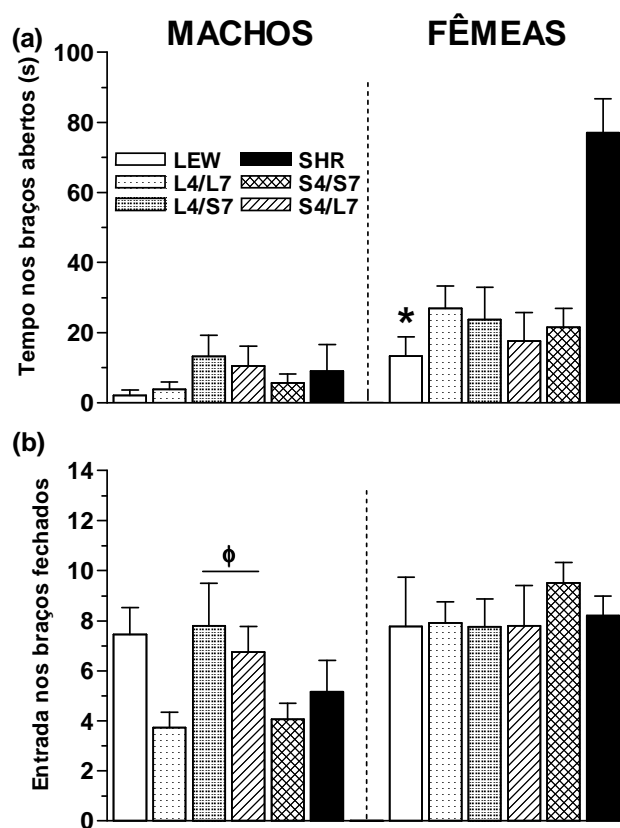
**Figura 10-** Locomoção na área central (a) e periférica (b) no campo aberto (530 lux) durante 5 min exibida por ratos LEW, SHR e F3 (de acordo com a linhagem) de ambos os sexos. \* Diferença significativa em comparação a ratos SHR (teste t de Student,  $p < 0,05$ ). <sup>4</sup> Indica efeito significativo de *Ofil1* (cromossomo 4) (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

### 5.3.3. Labirinto em cruz elevado (LCE)

A Figura 11 mostra os resultados do tempo gasto nos braços abertos (a) e entradas nos braços fechados (b) do LCE. Para os machos, as análises estatísticas não revelaram diferenças significativas entre ratos LEW e SHR tanto para o tempo gasto nos braços abertos como para o número de entradas nos braços fechados do LCE. Para as fêmeas, o teste t de Student revelou que as ratas SHR permaneceram mais tempo que as ratas LEW

nos braços abertos do LCE ( $t=5,51$ ;  $p<0,0001$ ) sem diferir, entretanto, para o número de entradas nos braços fechados.

Para os machos, a ANOVA de duas vias revelou uma interação significativa dos *loci Ofil1* e *Ofil2* ( $F_{(1,35)}=13,83$ ;  $p<0,0008$ ) para o número de entradas nos braços fechados do LCE, sendo que os ratos L4/L7 e S4/S7 exibiram maior frequência de entradas nos braços fechados do LCE do que os ratos L4/S7 e S4/L7 (LSD,  $p<0,04$ ). A análise de duas vias para as fêmeas não revelou efeitos significativos dos *loci Ofil1* e *Ofil2* nos parâmetros do LCE.



**Figura 11-** Tempo gasto nos braços abertos (a) e número de entradas nos braços fechados (b) do LCE (530 lux) durante 5 min por ratos LEW, SHR e F3 (de acordo com a linhagem) de ambos os sexos. \* Diferença significativa em comparação a ratos SHR (teste t de Student,  $p<0,05$ ).  $\phi$  Diferença significativa em relação a ratos L4/L7 e S4/S7 (interação *Ofil1* vs. *Ofil2*, ANOVA seguida do teste LSD,  $p<0,05$ ).

### 5.3.4. Testes de consumo

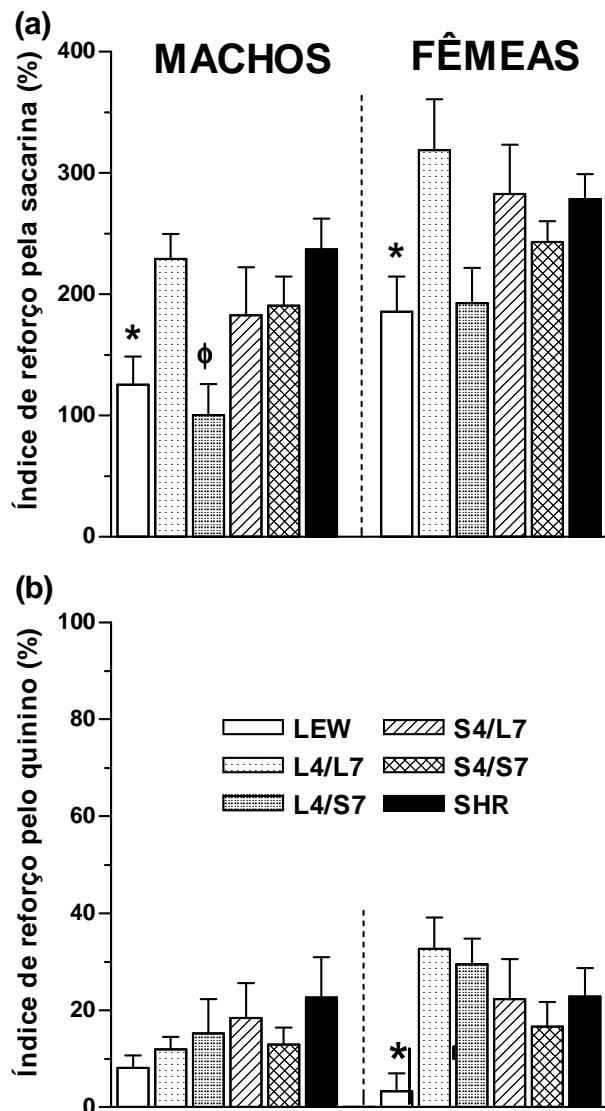
#### 5.3.4.1. Livre escolha entre água e sacarina

A Figura 12 (a) ilustra os resultados do aumento na ingestão de líquido induzido pela disponibilidade de uma solução de sacarina (7,5 mmol) em livre escolha com água por dois dias consecutivos. O teste t de Student revelou que os ratos SHR apresentaram um maior aumento na ingestão de líquido ( $t=3,67$ ;  $p<0,02$ ) do que os ratos LEW. Para as fêmeas, o teste t de Student também revelou que as ratas SHR apresentaram um maior consumo de líquido do que as ratas LEW ( $t=2,60$ ;  $p<0,03$ ).

A ANOVA de duas vias revelou uma interação significativa entre *Ofil1* e *Ofil2* ( $F_{(1,36)}=4,78$ ;  $p<0,05$ ) para os machos. O teste *post-hoc* indicou que os ratos L4/L7 consumiram mais sacarina do que os ratos L4/S7 (LSD,  $p<0,03$ ). A ANOVA não revelou efeito significativo dos *loci Ofil1* e *Ofil2* no consumo de sacarina para as fêmeas.

#### 5.3.4.2. Livre escolha entre água e quinino

A Figura 12 (b) ilustra os resultados do aumento na ingestão de líquido induzido pela disponibilidade de uma solução de quinino (2  $\mu\text{mol}$ ) em livre escolha com água por dois dias consecutivos. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada para os ratos machos em relação ao consumo de quinino. Para as fêmeas, as análises estatísticas revelaram que as ratas SHR apresentaram um maior consumo de líquido ( $t=2,81$ ;  $p<0,02$ ) do que as ratas LEW. Os *loci Ofil1* e *Ofil2* não afetaram o consumo de quinino tanto em machos como em fêmeas.



**Figura 12-** Aumento na ingestão de líquido induzido pela disponibilidade de sacarina (a) ou quinino (b) em livre escolha com água (média de dois dias consecutivos) exibido por ratos LEW, SHR e F3 (de acordo com a linhagem) de ambos os sexos. Os dados estão expressos como um índice que consiste no volume de líquido consumido quando a sacarina (7,5 mmol) ou quinino (2  $\mu$ mol) estão disponíveis aos animais em relação ao consumo de líquido basal quando somente água está disponível. \* Diferença significativa em comparação a ratos LEW (teste t de Student,  $p < 0,05$ ).  $\phi$  Diferença significativa em comparação a ratos L4/L7 (interação *Ofil1* vs. *Ofil2*; ANOVA seguida do teste LSD,  $p < 0,05$ ).

#### 5.3.4.3. Álcool forçado (ET 10 %)

Os resultados do consumo de álcool forçado por dois dias consecutivos estão ilustrados na Figura 13 (a). Para os machos, o teste t de Student indicou que os ratos SHR consumiram mais álcool do que os ratos LEW ( $t=6,29$ ;  $p<0,0001$ ). Para as fêmeas, foi encontrado também que as ratas SHR consumiram mais álcool do que as ratas LEW ( $t=5,15$ ;  $p<0,0001$ ).

A ANOVA de duas vias revelou um efeito significativo do *Ofil2* ( $F_{(1,36)}=7,98$ ;  $p<0,009$ ), sendo que os animais com os alelos SHR (i.e. S7) consumiram mais álcool do que os animais com os alelos LEW (i.e. L7). Para as fêmeas as análises considerando *Ofil1* e *Ofil2* não revelaram diferenças significativas.

#### 5.3.4.4. Livre escolha entre água e álcool (ET 10 % vs. água)

Os resultados do consumo de álcool (10 %) vs. água em livre escolha estão apresentados na Figura 13 (a). Para os machos, a análise revelou que os ratos SHR consumiram mais álcool (média de 7 blocos de dois dias) do que os ratos LEW ( $t=4,27$ ;  $p<0,009$ ). Para as fêmeas, também foi observado que as ratas SHR consumiram mais álcool do que as ratas LEW ( $t=3,39$ ;  $p<0,004$ ).

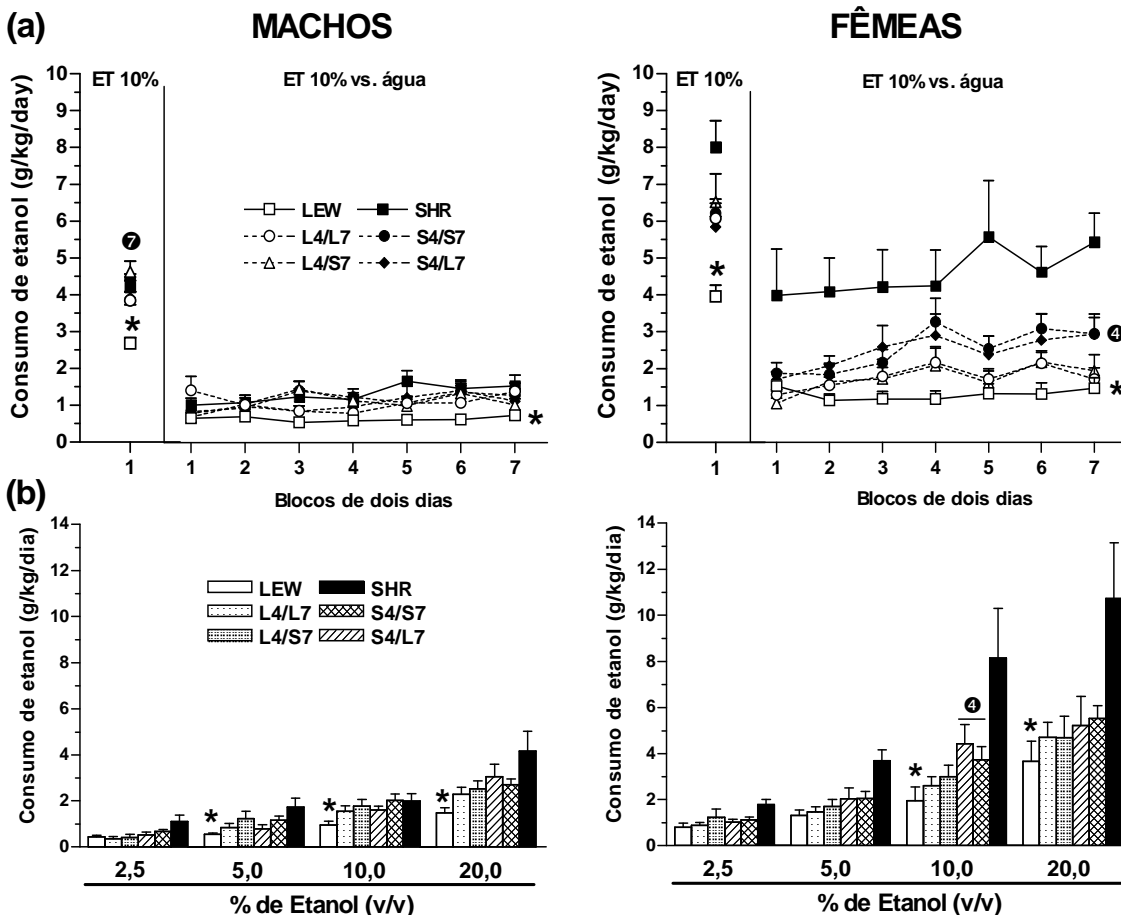
Para os machos as análises considerando *Ofil1* e *Ofil2* não revelaram diferenças significativas. Em relação às fêmeas, a ANOVA de duas vias revelou um efeito geral do locus *Ofil1* ( $F_{(1,32)}=4,51$ ;  $p<0,05$ ), sendo que os animais com alelos SHR (i.e. S4) consumiram mais álcool do que os animais com alelos LEW (i.e. L4).



### 5.3.4.5. Livre escolha entre água e álcool em diferentes concentrações

Os resultados do consumo em livre escolha de água *vs.* álcool em diferentes concentrações (ET 2,5, 5, 10 e 20 %) estão representados na Figura 13 (b). Para os machos, a ANOVA de duas vias para medidas repetidas (concentração de álcool) revelou um efeito significativo da linhagem ( $F_{(1,14)}=21,08$ ;  $p<0,0005$ ), da concentração ( $F_{(3,42)}=23,40$ ;  $p<0,0001$ ) e uma interação linhagem *vs.* concentração ( $F_{(3,42)}=5,75$ ;  $p<0,003$ ). O teste *post-hoc* indicou que ratos SHR beberam mais álcool nas concentrações de 5, 10 e 20 % do que os ratos LEW ( $p<0,003$ ). Para as fêmeas, a ANOVA de duas vias para medidas repetidas revelou um efeito significativo da linhagem ( $F_{(1,18)}=10,95$ ;  $p<0,005$ ), da concentração ( $F_{(3,54)}=14,72$ ;  $p<0,0001$ ) e interação linhagem *vs.* concentração ( $F_{(3,54)}=4,58$ ;  $p<0,006$ ). O teste *post-hoc* indicou que as ratas SHR beberam mais álcool do que ratas LEW nas concentrações de 10 e 20 % ( $p<0,0001$ ).

A ANOVA de três vias (*Ofil1* e *Ofil2*) para medidas repetidas revelou somente que a ingestão de álcool aumentou em função das concentrações ( $F_{(3,108)}=66,49$ ;  $p<0,0001$ ) para os machos. Para as fêmeas, a ANOVA de três vias revelou um efeito da concentração, com a ingestão de álcool aumentando de acordo com as diferentes concentrações ( $F_{(3,96)}=62,42$ ;  $p<0,0001$ ). Apesar desta análise não ter revelado efeitos significativos de *Ofil1* e *Ofil2*, uma ANOVA de duas vias adicional efetuada para cada concentração de álcool revelou um efeito significativo de *Ofil1* para o consumo de álcool na concentração de 10 % ( $F_{(1,32)}=4,28$ ;  $p<0,05$ ). As ratas com alelos SHR (i.e., S4) beberam mais álcool do que as ratas com alelos LEW (i.e., L4). Uma tendência não significativa na mesma direção foi observada nas concentrações de 5 e 20 %.



**Figura 13-** (a) Consumo de álcool forçado (ET 10 %; à esquerda). Os animais tinham acesso somente ao álcool na concentração de 10 % (v/v) por dois dias consecutivos. (a) Livre escolha de álcool 10 % vs. água (ET 10% vs. água; à direita). Os animais tinham livre escolha entre álcool 10 % e água por 14 dias (7 blocos de dois dias). (b) Consumo de água vs. álcool em função da concentração. Os animais tinham livre escolha entre água e álcool nas concentrações de 2,5, 5, 10 e 20 % (v/v) por 8 dias (2 dias em cada concentração). A sequência das concentrações foi baseada em esquema do quadrado-latino. Os dados estão expressos como a quantidade de álcool em gramas por quilograma de peso corporal por dia (g/kg/dia). \* Diferença significativa em comparação a ratos SHR (teste t de Student ou ANOVA,  $p < 0,05$ ). <sup>Ⓢ</sup> Indica efeito significativo do *Ofil1* (ANOVA,  $p < 0,05$ ). <sup>Ⓣ</sup> Indica efeito significativo do *Ofil2* (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

### 5.3.5. Pressão arterial

O teste t de Student revelou que os ratos SHR exibem maior pressão sistólica do que os ratos LEW ( $289,9 \pm 6,9$  vs.  $238,7 \pm 3,1$  mmHg;  $t=7,799$ ;  $p<0,001$ ). O mesmo foi observado para as fêmeas, com ratas SHR hipertensas em relação a ratas LEW ( $289,2 \pm 5,1$  vs.  $236,7 \pm 2,7$  mmHg;  $t=9,097$ ;  $p<0,001$ ).

Os loci *Ofil1* e *Ofil2* não afetaram a pressão sistólica dos animais. Machos: L4/L7 ( $252,2 \pm 3,2$  mmHg), L4/S7 ( $258,4 \pm 3,5$  mmHg), S4/L7 ( $252,9 \pm 4,1$  mmHg) e S4/S7 ( $256,6 \pm 4,6$  mmHg). Fêmeas: L4/L7 ( $260,6 \pm 4,2$  mmHg), L4/S7 ( $265,3 \pm 7,3$  mmHg), S4/L7 ( $251,2 \pm 5,1$  mmHg) e S4/S7 ( $254,8 \pm 3,8$  mmHg).

## 5.4. DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo estão de acordo com estudos prévios demonstrando que ratos LEW exibem maiores níveis de comportamentos relacionados à ansiedade do que ratos SHR. Além disso, ratos SHR consumiram mais sacarina, quinino e álcool do que ratos LEW no teste de auto-administração oral, confirmando estudos prévios do nosso laboratório (Da Silva et al., 2004; Da Silva et al., 2005). O resultado mais importante do presente estudo, entretanto, foi que o locus *Ofil1* (Ramos et al., 1999), no cromossomo 4, afetou significativamente a locomoção na área central e aversiva do campo aberto (uma medida potencialmente ligada à ansiedade), bem como o consumo de álcool em ratas F3 derivadas de um inter cruzamento entre as linhagens LEW e SHR. A locomoção em um ambiente novo, mas menos desafiador, não foi afetada por este locus. Além disso,

confirmando estudos prévios (Ramos et al., 1998; Ramos et al., 1999), os *loci Ofil1* e *Ofil2* não influenciaram a pressão sanguínea dos animais. Em conjunto, estes resultados sugerem que esta região genômica pode conter um ou mais genes com efeitos simultâneos sobre ansiedade e consumo de álcool em fêmeas.

Em relação à influência dos QTLs *Ofil1* e *Ofil2*, Ramos et al. (1999) encontraram que eles foram específicos para fêmeas, um deles sendo altamente significativo (*Ofil1*, LOD score = 7,22) e o outro somente sugestivo (*Ofil2*, LOD score = 3,66) e eles tinham um efeito específico sobre a locomoção central no campo aberto. Ainda naquele estudo prévio, o efeito de *Ofil1* foi invertido em relação às linhagens parentais (i.e. alelos LEW promovendo mais ao invés de menos locomoção central), enquanto que *Ofil2* agiu na direção esperada (i.e. alelos LEW reduzindo o traço). Os resultados do presente estudo confirmam isso, pois mostram claramente que os animais com dois alelos LEW em *Ofil1* exibiram maior locomoção central no campo aberto do que os animais com alelos SHR. Este *locus*, entretanto, não afetou a locomoção periférica no campo aberto nem a locomoção nas caixas de atividade, o que é consistente com seu perfil específico para ansiedade. O efeito foi específico para fêmeas e para o campo aberto, pois o tempo nos braços abertos do labirinto em cruz elevado, considerado como um bom índice de ansiedade (Pellow et al., 1985), não foi afetado.

Um dos aspectos mais intrigantes dos transtornos de ansiedade é a ocorrência de diferenças quantitativas e qualitativas dramáticas entre homens e mulheres. Apesar do fato de que os transtornos de ansiedade são mais prevalentes em mulheres, a grande maioria dos estudos animais envolvendo comportamentos relacionados à ansiedade são conduzidos com animais machos (Blanchard et al., 1995). Numerosas hipóteses têm sido propostas para explicar estas diferenças entre sexos. Sabe-se, por exemplo, que a incidência de transtornos

psiquiátricos é maior durante o período reprodutivo das mulheres (Bebbington et al., 1998). Em roedores, sabe-se também que os hormônios sexuais possuem influência importante em comportamentos relacionados à ansiedade, principalmente em fêmeas (Palanza, 2001). Os mecanismos biológicos subjacentes às influências hormonais sobre o comportamento são complexos e pouco compreendidos. Além disso, mecanismos genéticos, independentes de ação hormonal, podem ativar diferenciação sexual do cérebro e comportamento (Arnold, 1996). Como já mencionado, o resultado saliente deste estudo foi observado entre as fêmeas. Outros estudos são necessários para esclarecer as causas do efeito específico de *Ofil* sobre o comportamento de fêmeas.

Há um número crescente de evidências para o fato de que diferentes testes podem acessar diferentes tipos de medo em roedores (ver para revisão Ramos & Mormède, 1998). Portanto, os efeitos genéticos teste-específicos observados no presente estudo são, provavelmente, relacionados aos diferentes tipos de estresse emocional que o campo aberto e o labirinto em cruz elevado podem evocar nos animais.

O labirinto em cruz elevado é um modelo de ansiedade que é baseado na tendência natural de roedores de se esquivarem de locais altos e abertos (Montgomery, 1955; Pellow et al., 1985). A aproximação dos braços abertos pode ser seletivamente aumentada por ansiolíticos e diminuída por substâncias ansiogênicas, enquanto que compostos que atuam sobre o sistema de serotonina produzem resultados variáveis (Handley e McBlane, 1993; Hogg, 1996; Pellow et al., 1985; Treit et al., 1993).

O teste do campo aberto, por sua vez, foi originalmente desenvolvido como um teste de emocionalidade (Hall, 1934) e é geralmente considerado como um ambiente estressante e causador de medo em roedores. Os animais mais “ansiosos” tendem a manter distância da parte central do campo aberto onde eles não podem sentir as paredes (tigmotaxia). O efeito

de drogas ansiolíticas não tem sido universalmente verificado neste teste (Angrini et al., 1998; Fisher e Hughes, 1996), mas, como sugerido por Prut e Belzung (2003), o campo aberto parece ser um bom modelo para testar benzodiazepínicos clássicos e agonistas 5-HT<sub>1A</sub>, os quais são efetivos no tratamento de transtornos de ansiedade generalizada. Por outro lado, o campo aberto não é sensível a compostos que são efetivos em transtornos de ansiedade (alprazolam e inibidores seletivos da recaptação de serotonina) tais como pânico, transtorno obsessivo-compulsivo, fobias e transtorno de estresse pós-traumático (Prut e Belzung, 2003). Portanto, o teste do campo aberto parece modelar alguns aspectos de transtornos de ansiedade generalizada e ansiedade não patológica.

Com relação à ação invertida do locus *Ofil1*, Ramos et al (1999) propuseram algumas hipóteses. Resumidamente, é provável que uma linhagem com um determinado fenótipo (e.g. baixos níveis de locomoção central no campo aberto) possa carregar alelos de alguns genes tendendo ao outro extremo (i.e. aumento da locomoção central). Entretanto, é pouco provável que um efeito fenotípico robusto como o produzido por *Ofil1*, observado no estudo de Ramos et al. (1999) e em nossos resultados, seja simplesmente contrabalançado pela ação oposta de vários outros QTLs. Uma hipótese mais provável seria a ocorrência de interações epistáticas com outras regiões genômicas, na qual a presença de alelos SHR em outros *loci* seria necessária para a expressão dos alelos LEW em *Ofil1*. De forma similar, outros QTLs com ação oposta ao esperado têm sido descritos para variáveis fisiológicas e comportamentais (Jiang e Zeng, 1997), inclusive para locomoção central no campo aberto (Terenina-Rigaldie et al., 2003a). A hipótese de interações epistáticas de *Ofil1* com o locus *Ofil2*, em relação à locomoção central no campo aberto, não é confirmada pelos nossos resultados, pois o efeito de *Ofil1* foi independente deste segundo locus. Portanto, pode ser sugerido que outro locus (ou outros *loci*) localizado(s) em alguma outra parte do genoma,

apesar de não ter(em) sido detectado(s) na análise de QTL realizada por Ramos e colaboradores (1999), interaja(m) com *Ofill* e resulte(m) no efeito invertido observado.

O locus *Ofill*, em fêmeas, também influenciou significativamente o consumo de álcool (10 %), em doses farmacologicamente relevantes (Ferraro et al., 1991; Weiss et al., 1993), quando oferecido em livre escolha com água. A possibilidade de que um único gene em tal região afete, através de mecanismos neurobiológicos comuns, comportamentos relacionados à ansiedade e consumo de álcool é interessante e garante estudos adicionais. Porém, o fato de um locus estar influenciando traços distintos não significa necessariamente que estes traços estejam sob o controle do(s) mesmo(s) gene(s), porque genes localizados próximos (ou ligados) podem modular diferentes traços independentemente. É importante enfatizar que as ratas com alelos SHR em *Ofill* foram “mais ansiosas” e consumiram mais álcool do que as ratas com alelos LEW neste locus, estando, portanto, de acordo com a hipótese de redução de tensão (Conger, 1956).

De forma interessante, um QTL ligado ao consumo de álcool (5 %) em livre escolha com água em um inter cruzamento entre as linhagens “high ethanol preferring” vs. Wistar Kyoto (Terenina-Rigaldie et al., 2003ab) e outro influenciando consumo de álcool (10 %) em livre escolha com água (Carr et al., 1998) em um inter cruzamento entre as linhagens de ratos “alcohol-preferring” vs. “alcohol-non-preferring” foram identificados e localizados na mesma região, próximo a *Ofill*, no cromossomo 4. Recentemente, o gene da  $\alpha$ -sinucleína, modulador do sistema dopaminérgico, foi mapeado no cromossomo 4 do rato no pico de um QTL para consumo de álcool (Liang et al 2003; Carr et al., 1998), sendo assim considerado como um gene candidato para a preferência ao álcool (Liang et al., 2003).

Para os machos, nenhum efeito claro de *Ofill* ou *Ofil2* foi encontrado. Entretanto, uma interação significativa entre estes dois *loci* foi encontrada. Este efeito epistático foi

observado para a frequência de entradas nos braços fechados do labirinto em cruz elevado e para o consumo de sacarina. A princípio, este efeito no labirinto em cruz elevado poderia ser atribuído a diferenças relacionadas à ansiedade, desde que as linhagens não diferiram para locomoção em um ambiente menos desafiador na caixa de atividades. Entretanto, a tentativa de distinguir comportamentos relacionados à ansiedade ou a locomoção neste teste para os machos pode ser enganoso e os resultados devem ser interpretados com cautela. Além disso, os ratos L4/L7 e S4/S7 foram um pouco mais sensíveis ao reforço pela sacarina do que as outras duas linhagens recombinantes. Estes dados demonstram a complexidade da influência genética sobre traços comportamentais, envolvendo provavelmente interações gene-gene, gene-gênero e gene-ambiente.

Em conclusão, os resultados do presente estudo demonstram que o locus *Ofil1* influencia um comportamento relacionado à ansiedade específico e consumo de álcool em fêmeas. Estes resultados apontam para duas possibilidades: 1) a presença de dois (ou mais) genes ligados controlando comportamento relacionado à ansiedade e consumo de álcool independentemente, ou 2) um único gene afetando simultaneamente ambos os traços. Uma interação entre *Ofil1* e *Ofil2* também foi observada para alguns traços, mas não para outros, demonstrando a complexidade da influência genética sobre o comportamento e sugerindo que outros *loci*, que permanecem não identificados, interagem com *Ofil1*.



## 6. CAPÍTULO 2

### *Efeito genético na reatividade ao sobressalto acústico e inibição comportamental.*

#### 6.1. INTRODUÇÃO

O transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) é um transtorno neuropsiquiátrico complexo que inclui aspectos comportamentais e cognitivos tais como desatenção e impulsividade/hiperatividade. Impulsividade é um traço de personalidade caracterizado por baixa inibição comportamental, que pode ser definida como: agir repentinamente e sem planejamento para satisfazer um desejo (Kreek et al., 2005). As evidências sugerem a existência de prejuízos nos processos de controle cognitivo (Douglas, 1999) e baixa inibição comportamental em TDAH (Barkley, 1999). Estudos de família, de gêmeos e uma associação de TDAH com o polimorfismo de vários genes demonstram que este transtorno heterogêneo tem um componente genético substancial (Asherson, 2004; Heiser et al., 2004). Apesar do fato de que o TDAH é diagnosticado com mais frequência em meninos do que em meninas, existem evidências demonstrando que mais mulheres sofrem deste transtorno do que homens na vida adulta (Biederman et al., 1994).

Conforme descrito no capítulo anterior, os ratos LEW e SHR constituem uma ferramenta para o estudo da ansiedade por apresentarem comportamentos contrastantes em uma variedade de testes comportamentais de ansiedade. Entretanto, este contraste parece

ser limitado a modelos baseados na tendência de aproximação/esquiva como o campo aberto, o labirinto em cruz elevado e a caixa claro/escuro. Eles não diferem no teste de ansiedade de interação social nem quando expostos ao odor de predadores (Capítulo 3). Neste contexto, é possível que as diferenças comportamentais entre LEW e SHR sejam relacionadas a processos de inibição comportamental. Na pesquisa pré-clínica, além da utilidade no estudo da ansiedade, a linhagem de ratos SHR também é um dos modelos animais de TDAH mais utilizados. Em comparação com seus controles normotensos (Wistar-Kyoto) e com outras linhagens de ratos, os ratos SHR exibem prejuízo em manter a atenção, hiperatividade em algumas situações, dificuldade em realizar tarefas operantes e são ávidos por novidades e por situações de risco, modelando assim vários aspectos encontrados em pacientes com TDAH (Davids et al., 2003; Russell et al., 2005).

Mormède et al. (2002), utilizando uma abordagem de seleção genética baseada em marcadores similar a do presente estudo, produziram duas linhagens de ratos com genótipos opostos com o objetivo de confirmar os QTLs encontrados por Ramos et al. (1999). A linhagem *High* (equivalente a ratos L4/S7 no presente estudo) apresentava o genótipo que teoricamente aumentaria a locomoção central no campo aberto e a linhagem *Low* (equivalente a ratos S4/L7) apresentava o genótipo oposto. Em caixas de atividade, a linhagem *Low* foi mais ativa do que a linhagem *High*. O inverso foi visto no campo aberto, mas a inibição da locomoção da linhagem *Low*, comparada à linhagem *High*, foi relacionada à aversividade do ambiente, maior no centro do que na periferia e maior com forte iluminação do que com baixa iluminação. Esta inibição não foi atribuída ao “fator clássico de ansiedade” no labirinto em cruz elevado, pois a atividade nos braços abertos não foi diferente entre as linhagens (Mormède et al., 2002; Capítulo 1). A linhagem *High*, que apresentou maior locomoção central no campo aberto também apresentou menor inibição

comportamental quando avaliada no teste de inibição pelo pré-pulso (Mormède et al 2002). Portanto, os *loci Ofil1* e *Ofil2*, previamente identificados como QTLs relacionados à ansiedade, também modularam processos de inibição comportamental. Este estudo, entretanto, não permitiu o conhecimento das influências específicas de *Ofil1* e *Ofil2*, bem como da sua interação, pois o efeito destes QTLs estava combinado em apenas duas linhagens.

O campo aberto foi desenvolvido originalmente como um teste de emocionalidade (Hall, 1934) e é considerado como um ambiente estressante e que gera medo nos animais. Os animais mais “ansiosos” tendem a andar menos e ficar mais distantes da parte central da arena onde eles não podem fazer tigmotaxia. Além disso, tem sido sugerido que a atividade locomotora em tal arena inescapável reflete um componente reforçador da novidade (Bardo et al., 1996). O teste de inibição pelo pré-pulso, no qual uma resposta de sobressalto acústico é reduzida por um estímulo acústico prévio (pré-pulso), é considerado como uma medida operacional da transmissão sensorio-motora (Koch, 1999), ou de inibição comportamental. Alguns transtornos de comportamento descontrolado, como TDAH e esquizofrenia, são associados a prejuízos em respostas de inibição pelo pré-pulso (Castellanos et al., 1996; Hawk et al., 2003; Swerdlow et al., 1994). A inibição pelo pré-pulso também é reduzida com a administração de agonistas dopaminérgicos e normalizada com drogas antipsicóticas (Swerdlow et al., 1994). Estes efeitos têm sido interpretados como resultado da modulação sensorio-motora (i.e. redução da inibição comportamental) em condições de comportamento exploratório aumentado. Estudos de neuroanatomia indicam que as estruturas que contribuem nas respostas de inibição pelo pré-pulso incluem o *nucleus accumbens*, hipocampo, amígdala e córtex medial pré-frontal (Swerdlow et al., 2001), as quais também são sabidamente implicadas no controle de estados emocionais e

motivacionais. Portanto, pode-se supor que os genes que influenciam o comportamento de ratos no teste do campo aberto e as respostas de inibição pelo pré-pulso sejam, ao menos em parte, sobrepostos.

O objetivo deste experimento foi comparar, pela primeira vez, os ratos LEW e SHR de ambos os sexos no teste de sobressalto acústico, um teste usado para o estudo da ansiedade (Davis, 1998), no qual a atividade locomotora não constitui um fator de confusão e no teste de inibição pelo pré-pulso. O reflexo de sobressalto pode ser avaliado através do reflexo do piscar de olhos em humanos e da contratura muscular em animais de laboratório. Manipulações que induzem ansiedade aumentam a magnitude de sobressalto e este efeito pode ser bloqueado com o uso de drogas ansiolíticas (Davis, 1998). Adicionalmente, nós objetivamos nesta etapa dissociar as respectivas influências de *Ofil1*, *Ofil2* e sua interação nas respostas de sobressalto acústico e inibição pelo pré-pulso.

## 6.2. MATERIAL E MÉTODOS

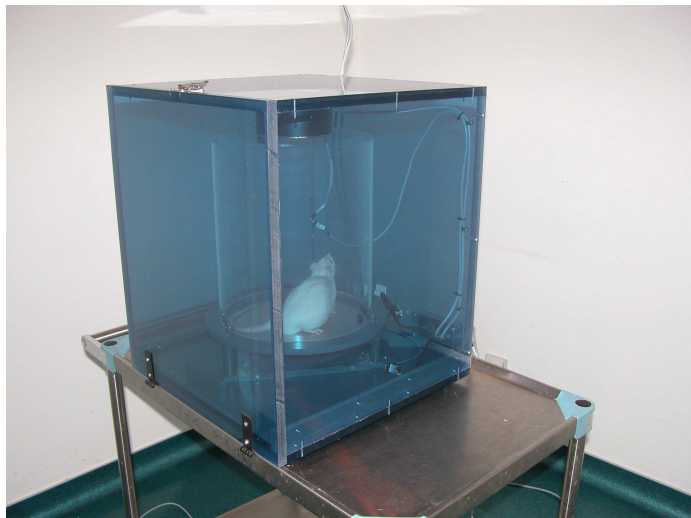
### 6.2.1. Animais

Nesta segunda etapa foram utilizados ratos adultos (10 semanas de idade) das quatro linhagens recombinantes (F3) (n=11 e 14 para a linhagem L4/L7; 5 e 5 para a linhagem L4/S7; 8 e 5 para a linhagem S4/L7; 16 e 12 para a linhagem S4/S7; machos e fêmeas, respectivamente). Grupos adicionais de ratos LEW (10 machos e 10 fêmeas) e SHR (6 machos e 10 fêmeas) com a mesma idade foram testados concomitantemente. Todos os

animais foram alojados em caixas coletivas com água e comida *ad libitum* e mantidos em condições padronizadas como descrito no Capítulo 1.

### **6.2.2. Reflexo de sobressalto acústico**

O aparelho de sobressalto acústico (Imetronic, Pessac, France) consiste em um cilindro de acrílico transparente (24 cm de diâmetro) localizado em cima de uma placa acoplada a um sensor (Figura 14). Este sensor fica ligado a um computador que registra a força produzida pelo animal localizado em cima da placa. Todos os estímulos acústicos foram apresentados por um alto-falante localizado a 31 cm acima da placa. Este aparelho de sobressalto estava dentro de um compartimento de isolamento sonoro. Os animais foram colocados dentro do aparelho sob baixa iluminação (40 lux) e sob um ruído de fundo contínuo de 70 dB. Após 5 min de ambientação do animal, 50 estímulos acústicos (105 dB; 5 KHz; 40 ms) foram apresentados. Os intervalos entre os estímulos acústicos foram fixados aleatoriamente entre 20 e 40 s. A amplitude de sobressalto foi medida durante 300 ms após o início do estímulo acústico. Para cada rato, a média de amplitude de sobressalto de 10 estímulos acústicos foi calculada para os 5 blocos (i.e. 50 estímulos acústicos no total) e os resultados estão expressos como média e EPM.



**Figura 14-** Aparelho para avaliar sobressalto acústico e inibição pelo pré-pulso.

### 6.2.3. Inibição pelo pré-pulso

Este teste foi conduzido uma semana após o teste de sobressalto acústico no mesmo aparelho, sob baixa iluminação (40 lux) e sob um ruído de fundo contínuo (70 dB). Após um período de ambientação (5 min), os animais foram expostos a 10 estímulos acústicos (105 dB; 5 KHz; 40 ms) com o objetivo de habituar os animais. Estes dados não foram explorados. Logo após, um esquema de 4 condições foi realizado: sem pré-pulso (10 estímulos de 105 dB), pré-pulso de 94 dB (10 estímulos), 98 dB (10 estímulos) ou 102 dB (20 estímulos). A duração do pré-pulso foi de 40 ms (frequência de 2 KHz). Estas condições foram apresentadas pseudo-aleatoriamente a cada 20 s. O intervalo de tempo entre o fim do pré-pulso e o início do pulso foi de 100 ms. As análises foram realizadas sobre a porcentagem de inibição em cada pré-pulso calculado pela seguinte fórmula: % de inibição pelo pré-pulso =  $[100 - (100 \text{ vezes a amplitude de sobressalto com o pré-pulso}) /$

(sobressalto acústico pelo pulso somente)]. Os parâmetros deste teste foram escolhidos com base em experimentos preliminares.

#### 6.2.4. Análise estatística

Todas as análises foram realizadas separadamente para machos e para fêmeas. Para comparar as linhagens puras LEW e SHR, os dados da amplitude de sobressalto acústico e inibição pelo pré-pulso foram analisados por ANCOVA de duas vias (linhagem) para medidas repetidas (5 blocos de 10 estímulos acústicos no teste de sobressalto ou intensidade de pré-pulso no teste de inibição pelo pré-pulso). Para analisar especificamente a influência dos genótipos L ou S em cada QTL, bem como sua interação, uma ANCOVA de três vias (fatores *Ofil1* e *Ofil2*) para medidas repetidas foi realizada exclusivamente com os dados das 4 linhagens recombinantes. O peso corporal dos animais foi incluído como co-variável em todas as análises, com o objetivo de eliminar a influência do peso nos resultados comportamentais. O teste LSD foi utilizado para as comparações *post-hoc*, quando apropriado. O nível de significância aceita em todos os testes foi  $p \leq 0,05$ . Os dados estão expressos nas figuras como média e EPM.

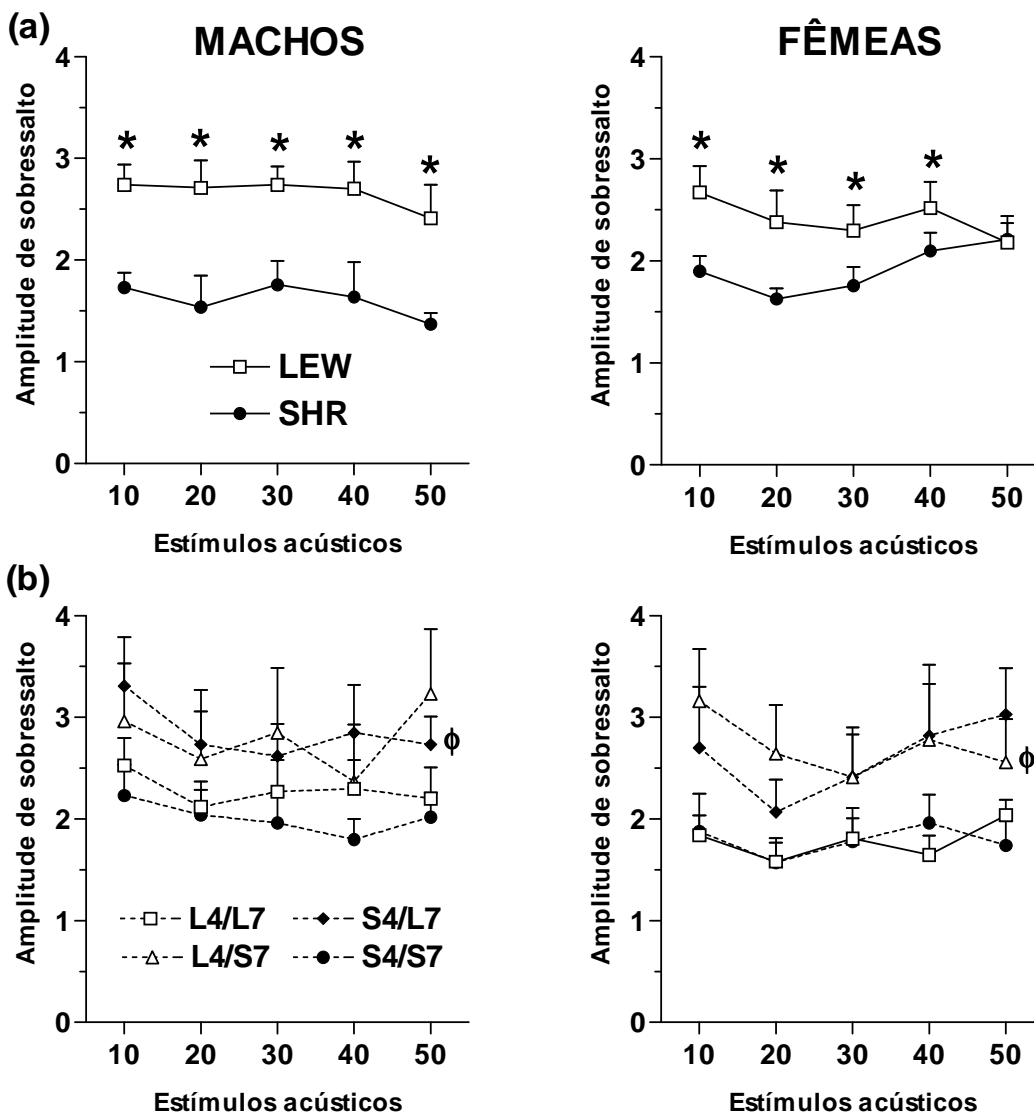
## 6.3. RESULTADOS

### 6.3.1. Reflexo de sobressalto acústico

A Figura 16 (a) representa a amplitude de sobressalto acústico. Para os machos, a ANCOVA de duas vias para medidas repetidas (5 blocos de 10 estímulos acústicos) revelou um efeito geral da linhagem sobre o reflexo de sobressalto ( $F_{(1,13)}=4,68$ ;  $p<0,05$ ). Ratos LEW exibiram maior amplitude de sobressalto do que os ratos SHR. Para as fêmeas, a ANCOVA revelou uma interação linhagem vs. medida repetida ( $F_{(4,72)}=3,41$ ;  $p<0,02$ ) sobre o reflexo de sobressalto. As análises subsequentes indicaram que as ratas LEW exibiram maior reflexo de sobressalto do que as ratas SHR nos 40 estímulos acústicos iniciais ( $p<0,02$ ), porém nos últimos 10 estímulos acústicos não houve diferença entre as linhagens.

A ANCOVA de três vias revelou uma interação significativa entre os *loci* *Ofil1* e *Ofil2* ( $F_{(1,35)}=5,72$ ;  $p<0,03$ ) sobre a magnitude de sobressalto acústico. As análises *post-hoc* indicaram que ratos S4/L7 exibiram maiores níveis de sobressalto acústico do que os ratos S4/S7 ( $p<0,05$ ). Para as fêmeas, a ANCOVA de três vias revelou um efeito significativo da medida repetida ( $F_{(4,128)}=4,51$ ;  $p<0,003$ ) e uma interação significativa *Ofil1* vs. *Ofil2* ( $F_{(1,31)}=10,18$ ;  $p<0,004$ ), sendo que os ratos L4/S7 exibiram maiores níveis de sobressalto acústico do que os ratos L4/L7 ( $p<0,05$ ).



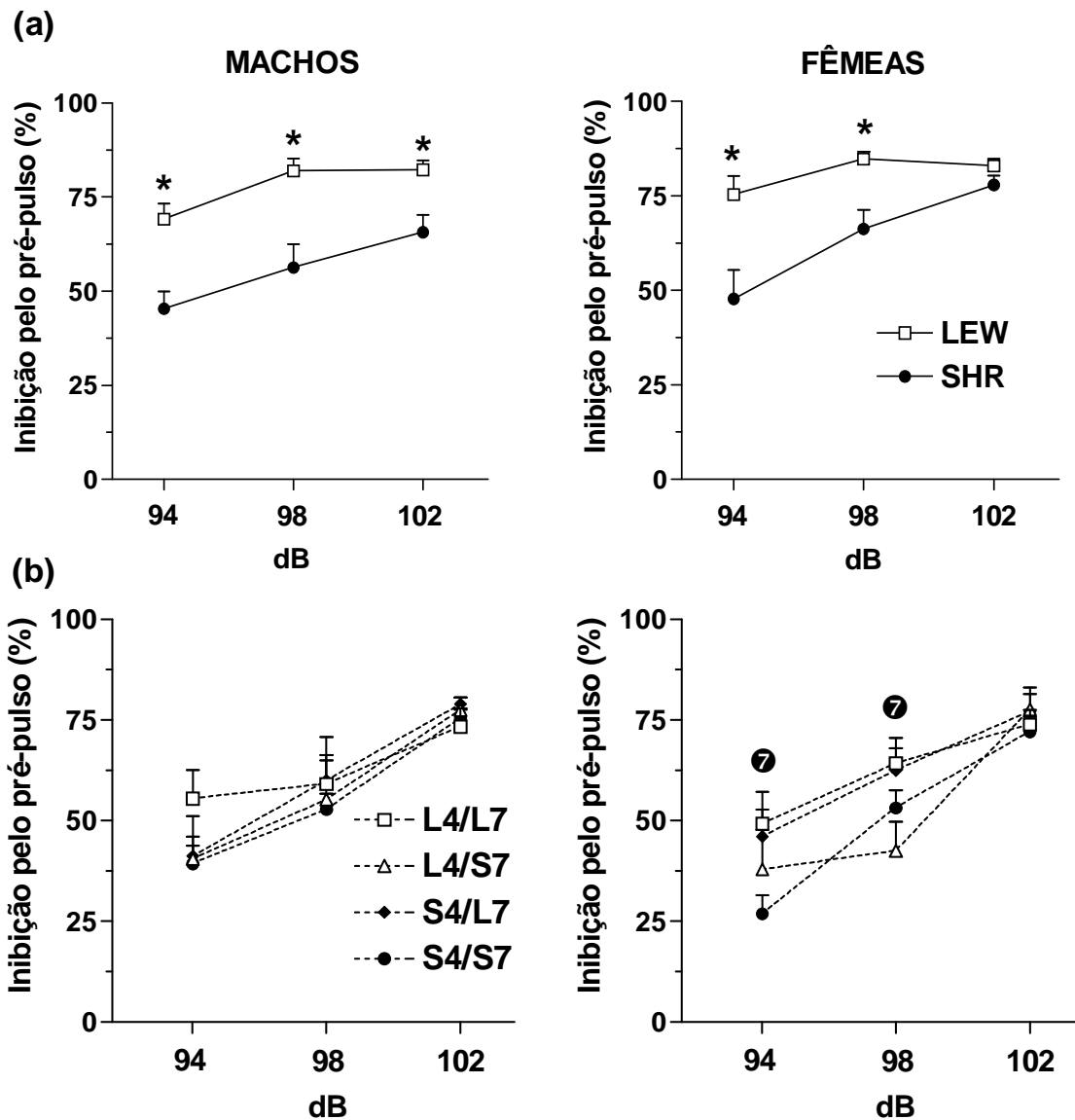


**Figura 16-** Amplitude de sobressalto acústico de ratos LEW e SHR (a), e F3 (b; de acordo com a linhagem) de ambos os sexos. \* Diferença significativa em relação a ratos SHR (ANCOVA,  $p < 0,05$ ).  $\Phi$  Diferença significativa em relação a ratos S4/S7 ou diferença significativa em relação a ratos L4/L7 (Interação *Ofil1* vs. *Ofil2*; ANCOVA seguida do teste LSD,  $p < 0,05$ ).

### 6.3.2. Inibição pelo pré-pulso

Os resultados de inibição pelo pré-pulso estão apresentados na Figura 17. Para os machos, a ANCOVA de duas vias para medidas repetidas (intensidade do pré-pulso) revelou um efeito geral da linhagem ( $F_{(1,13)}=15,27$ ;  $p<0,002$ ) e da intensidade de pré-pulso ( $F_{(2,28)}=18,90$ ;  $p<0,0001$ ). Os ratos LEW exibiram maiores níveis de inibição pelo pré-pulso do que os ratos SHR. Para as fêmeas, uma interação linhagem vs. intensidade de pré-pulso ( $F_{(2,36)}=4,76$ ;  $p<0,02$ ) foi observada. As análises *post-hoc* indicaram que as ratas LEW exibiram maiores níveis de inibição pelo pré-pulso do que as ratas SHR nas duas menores intensidades de pré-pulso (94 e 98 dB; LSD,  $p<0,001$ ).

Com relação ao efeito dos *loci Ofil1* e *Ofil2* em machos, a ANCOVA de três vias para medidas repetidas revelou somente um efeito significativo da intensidade de pré-pulso ( $F_{(2,72)}=47,28$ ;  $p<0,0001$ ), com os níveis de inibição aumentando em função da intensidade de pré-pulso. Para as fêmeas, a ANCOVA de três vias para medidas repetidas revelou uma interação significativa *Ofil2* vs. intensidade de pré-pulso ( $F_{(2,64)}=6,02$ ;  $p<0,004$ ). Uma ANCOVA de duas vias adicional realizada separadamente para cada intensidade de pré-pulso revelou um efeito geral de *Ofil2* nas intensidades de pré-pulso de 94 dB ( $F_{(1,31)}=4,16$ ;  $p<0,05$ ) e 98 dB ( $F_{(1,31)}=7,51$ ;  $p<0,02$ ). Os animais com alelos SHR (i.e. S7) exibiram menores níveis de inibição pelo pré-pulso em relação aos animais com alelos LEW (i.e. L7).



**Figura 17** - Porcentagem de inibição pelo pré-pulso de ratos LEW e SHR (a), e F3 (b; de acordo com a linhagem) de ambos os sexos. As análises foram feitas sobre a porcentagem de inibição pelo pré-pulso, calculado pela seguinte fórmula: Porcentagem de inibição pelo pré-pulso =  $[100 - (100 \text{ vezes a amplitude do sobressalto ao estímulo com pré-pulso}) / (\text{amplitude do sobressalto ao estímulo acústico, i.e. pulso})]$ . \* Diferença significativa em comparação a ratos SHR (ANCOVA,  $p < 0,05$ ). 7 Efeito significativo de *Ofil2* (ANCOVA,  $p < 0,05$ ).

## 6.4. DISCUSSÃO

Os presentes resultados do reflexo de sobressalto acústico estão de acordo com os estudos prévios utilizando outros testes de ansiedade (ver Capítulo 1), indicando que ratos SHR exibem menor reatividade emocional do que os ratos LEW. Além disso, os ratos SHR exibiram menor inibição comportamental do que ratos LEW quando testados no teste de inibição pelo pré-pulso. O locus *Ofil2* no cromossomo 7 afetou significativamente os níveis de inibição pelo pré-pulso em fêmeas F3, sem afetar os níveis de sobressalto acústico.

O reflexo de sobressalto, que é uma rápida contratura da musculatura corporal induzida por um estímulo acústico intenso e inesperado, é frequentemente utilizado para o estudo da neurobiologia da ansiedade (Davis et al., 1998; Koch, 1998). A resposta de sobressalto acústico é mediada por um circuito neuronal relativamente simples localizado no tronco cerebral. No entanto, esta via primária recebe projeções de estruturas cerebrais superiores sabidamente implicadas no controle de comportamentos defensivos (Davis et al., 1998; Koch, 1998). De acordo com estas observações, no presente estudo, os ratos LEW (considerados mais “ansiosos”) exibiram maior amplitude de sobressalto acústico em comparação aos ratos SHR (menos “ansiosos”). Outros estudos também relataram uma menor reatividade ao sobressalto acústico em ratos SHR em comparação a outras linhagens de ratos (Hard et al., 1985; van den Buuse, 2004). É interessante notar que enquanto as ratas LEW demonstraram habituação para as respostas de sobressalto ao longo da sessão de 50 estímulos acústicos, as ratas SHR não se habituaram. A habituação de curto prazo também é prejudicada em alguns transtornos psiquiátricos. Por exemplo, tem sido demonstrado que pacientes esquizofrênicos apresentam prejuízos tanto em respostas de

inibição pelo pré-pulso, quanto em habituação do reflexo de sobressalto (Braff et al., 1992). Além disso, foi observado que a magnitude de sobressalto acústico foi mais elevada em crianças com história parental de transtorno de ansiedade, enquanto que a habituação do sobressalto e inibição pelo pré-pulso estava prejudicada em crianças com história parental de alcoolismo (Grillon et al., 1997). Curiosamente, ratos SHR exibem menores níveis de comportamentos relacionados à ansiedade e maior consumo de álcool do que ratos LEW (Capítulo 1).

No teste de inibição pelo pré-pulso, a magnitude de sobressalto é reduzida quando um estímulo acústico é precedido por um pré-pulso e, por isso, é considerado como uma medida operacional de transmissão sensório-motora (Koch, 1999). É importante ressaltar que prejuízos em respostas de inibição pelo pré-pulso são frequentemente associados como esquizofrenia e TDAH (Castellanos et al., 1996; Hawk et al., 2003; Swerdlow et al., 1994). No presente estudo, foi encontrado que os ratos SHR, um modelo animal de TDAH, exibiram menores níveis de inibição pelo pré-pulso do que os ratos LEW, demonstrando assim que os processos de inibição comportamental são menos eficientes em ratos SHR. No entanto, outros estudos relataram que os ratos SHR, comparados a ratos Wistar-Kyoto ou Sprague-Dawley, não exibiram prejuízos em respostas de inibição pelo pré-pulso. Estes achados, associados aos presentes resultados, sugerem que os ratos LEW podem exibir níveis elevados de inibição comportamental em comparação, não só com SHRs, mas também com outras linhagens. De qualquer forma, o contraste comportamental para este traço entre ratos LEW e SHR constitui ferramenta útil para o estudo dos mecanismos genéticos subjacentes à transmissão sensório-motora. Nenhuma comparação direta entre estas linhagens foi realizada previamente.

É preciso enfatizar que, em estudos publicados na literatura, os ratos SHR exibiram níveis similares de sobressalto acústico e de inibição pelo pré-pulso em resposta tanto a estímulos acústicos como táteis (jato de ar sob pressão) (Palmer et al., 2000). Isto sugere que as diferenças comportamentais entre LEW e SHR observadas no presente estudo são mais provavelmente decorrentes de diferenças nos níveis de sobressalto acústico e inibição pelo pré-pulso do que de diferenças de acuidade auditiva. Além disso, é geralmente aceito que sobressalto acústico e inibição pelo pré-pulso são variáveis independentes e que estão sob controle genético distinto (Crawley et al., 1997; Koch, 1999).

Em relação à influência dos *loci Ofil1* e *Ofil2*, Mormède e colaboradores (2002) confirmaram o envolvimento destes *loci* sobre respostas comportamentais produzindo duas linhagens de ratos com o genótipo oposto para *Ofil1* e *Ofil2*. Foi encontrado que a linhagem *Low* (correspondendo a ratos S4/L7 no presente estudo) foi menos ativa do que a linhagem *High* (correspondendo a ratos L4/S7) no centro do campo aberto. A linhagem *High* também apresentou prejuízo nas respostas de inibição pelo pré-pulso, sugerindo que *Ofil1* e *Ofil2*, previamente descritos como sendo relacionados à ansiedade, foram adicionalmente envolvidos em um traço de inibição comportamental. Aquele estudo, entretanto, não permitiu dissociar os efeitos respectivos destes dois *loci* sobre respostas relacionadas à ansiedade e inibição comportamental porque os efeitos de *Ofil1* e *Ofil2* estavam combinados em apenas duas linhagens.

Conforme descrito no capítulo 1, foi encontrado que *Ofil1*, mas não *Ofil2*, afetou a locomoção central de fêmeas no campo aberto. Nesta segunda etapa, ficou evidenciado que *Ofil2* modula inibição comportamental em fêmeas. As ratas com alelos LEW neste locus exibiram maior inibição pelo pré-pulso do que as ratas com alelos SHR. Portanto, pode-se concluir agora que os efeitos observados por Mormède e colaboradores (2002) sobre

respostas de inibição comportamental havia sido produzido por *Ofil2* e não *Ofil1*. Estes resultados sugerem ainda que a locomoção central no teste do campo aberto e respostas de inibição do sobressalto acústico pelo pré-pulso são traços geneticamente dissociados, pelo menos neste modelo genético. É importante enfatizar que as respostas de sobressalto acústico não foram afetadas por *Ofil2*. Além disso, os efeitos genéticos nas respostas de inibição pelo pré-pulso observadas, foram consistentes com o perfil das linhagens parentais, i.e. alelos SHR reduzindo o traço e alelos LEW aumentando o traço.

Até o presente momento, somente um estudo identificou QTLs para inibição pelo pré-pulso em ratos. Um QTL significativo no cromossomo 2 e outro sugestivo no cromossomo 18 foram encontrados para respostas de inibição pelo pré-pulso em ratos (Palmer et al., 2003). O presente estudo contribui com informação adicional relatando um QTL específico para fêmeas no cromossomo 7 do rato. Em camundongos, vários QTLs específicos para respostas de inibição pelo pré-pulso foram identificados nos cromossomos 3, 5, 7 e 16 (Joober et al., no prelo). Mais recentemente, (Petryshen et al., 2005) relataram dois QTLs no cromossomo 16 do camundongo afetando inibição pelo pré-pulso. Finalmente, uma interação entre *Ofil1* e *Ofil2* (i.e. efeito epistático) foi encontrada para respostas de sobressalto acústico. Os ratos L4/S7 e S4/L7 exibiram maior sobressalto acústico do que os ratos L4/L7 e S4/S7.

Em conclusão, nesta etapa do presente estudo, a importância de fatores genéticos e sexuais sobre respostas comportamentais foi confirmada. As linhagens de ratos LEW e SHR, além da utilidade para o estudo de comportamentos relacionados à ansiedade, também parecem apropriados para estudar mecanismos de inibição comportamental. Além disso, foi identificado um QTL específico para fêmeas no cromossomo 7 que modula

inibição pelo pré-pulso, um traço neuro-comportamental encontrado em pacientes com TDAH (e outros transtornos psiquiátricos).



## 7. CAPÍTULO 3

***Efeito genético na analgesia e liberação de corticosterona induzidas pela exposição de ratos ao odor de um predador.***

### 7.1. INTRODUÇÃO

A exposição de animais, incluindo humanos, a eventos estressantes pode induzir uma ampla variedade de respostas fisiológicas e comportamentais. Por exemplo, o estresse pode ativar sistemas analgésicos endógenos (Lewis et al., 1980), produzindo um fenômeno chamado de “analgesia induzida pelo estresse”. Tem sido sugerido que este fenômeno é parte do sistema defensivo dos animais e que pode ser modulado pelo medo e ansiedade (Harris, 1996). Um grande número de evidências aponta para o fato de que fatores genéticos têm um envolvimento substancial sobre a analgesia induzida pelo estresse (Mogil, 1999) e sobre a função do eixo HPA (Mormede et al., 2002a), o mediador primário das respostas neuroendócrinas induzidas pelo estresse (Selye, 1936). Entretanto, os genes envolvidos permanecem desconhecidos.

As linhagens de ratos LEW e SHR exibem altos e baixos níveis de ansiedade experimental, respectivamente (Capítulos 1). Além disso, ratos LEW, quando submetidos a estresse social repetido, exibem respostas comportamentais mais severas e de maior duração, tais como perda de peso corporal, hipofagia e efeito do tipo ansiogênico, do que ratos SHR (Berton et al 1998). Nós relatamos recentemente que 3 min de estresse da natação induzem analgesia em ratos machos LEW e Wistar, mas não em ratos SHR. O

mesmo estresse, entretanto, induziu analgesia em fêmeas das três linhagens de ratos (Vendruscolo et al., 2004), sugerindo a existência de diferenças sexuais e genéticas sobre a reatividade ao estresse. Por outro lado, existem evidências mostrando que ratos LEW tendem a exibir menor liberação de corticosterona (i.e. hipoatividade do eixo HPA) (Duclos et al., 2001; Gomez et al., 1998) do que outras linhagens de ratos. Além disso, ratos LEW e SHR não diferem no teste de interação social (Ramos et al., 1997). Estas evidências sugerem que este par de linhagens exibe respostas distintas em relação à reatividade ao estresse. Não se sabe, entretanto, se ratos LEW e SHR diferem em relação a outros tipos de estímulos emocionais, tais como a presença de odor de predadores.

Recentemente, um QTL no cromossomo 4, próximo a *Ofil1*, controlando níveis de corticosterona em ratos, foi identificado (Potenza et al., 2004). Estas evidências sugerem que esta região genômica pode conter genes controlando, não somente comportamentos relacionados à ansiedade e consumo de álcool, mas também reatividade fisiológica ao estresse.

Portanto, considerando que os níveis de ansiedade podem modular o impacto do estresse sobre indivíduos (Hard et al., 1985), o objetivo deste capítulo foi comparar ratos LEW e SHR de ambos os sexos em relação a analgesia e liberação de corticosterona induzidas pelo estresse do odor de um predador. Além disso, a possível influência dos *loci Ofil1* e *Ofil2* sobre estas respostas foi verificada. Para esta proposta, a sensibilidade nociceptiva e os níveis de corticosterona antes e depois da exposição a 2,4,5-trimetiltiazolína (TMT), um componente das fezes de raposa, foi avaliada. Um teste com odor de predador foi escolhido nesta etapa, pois se sabe que a exposição ao odor de um predador, ou mesmo ao predador, induz uma variedade de reações de defesa em roedores, mesmo que ele nunca tenha tido contato com o odor (i.e. reações inatas).

## 7.2. MATERIAL E MÉTODOS

### 7.2.1. Animais

Nesta terceira etapa foram utilizados ratos adultos (10 semanas de idade) das quatro linhagens recombinantes (F3) (n=7 e 10 para a linhagem L4/L7; 5 e 4 para a linhagem L4/S7; 9 e 10 para a linhagem S4/L7; 9 e 9 para a linhagem S4/S7; machos e fêmeas, respectivamente). Grupos adicionais de ratos LEW (10 machos e 9 fêmeas) e SHR (10 machos e 8 fêmeas) com a mesma idade foram testados concomitantemente. Todos os animais foram alojados em caixas coletivas com água e comida *ad libitum* e mantidos em condições padronizadas como descrito no Capítulo 1.

### 7.2.2. Medida de corticosterona plasmática

As amostras de sangue (150 µl) foram coletadas através de uma rápida incisão nos vasos da ponta da cauda dos ratos dentro de 30 s. As amostras foram coletadas no período da manhã (entre 8:00 h e 9:00 h) e no fim de tarde (entre 17:00 h e 18:00 h) para estimar os níveis de corticosterona basal. O sangue foi coletado em tubos plásticos, resfriados e revestidos com uma solução de EDTA a 10 %. Após centrifugação (4500 g, 15 min, 4°C), o plasma foi então armazenado a -80°C para posterior análise de corticosterona. Como previamente descrito (Dias Soares et al., 2003), as concentrações de corticosterona plasmática foram determinadas por ensaio competitivo de união específica (*binding*) após extração com álcool absoluto. Corticosterona triciada ( $[^3\text{H}]$ -corticosterona; 76,5 Ci/mmol;

NEN Life Science, Paris, França) foi utilizada como radio-ligante e a proteína transcortina (CBG), proveniente de plasma de macaco *rhesus*, foi utilizada como sítio de ligação.

### 7.2.3. Teste de nocicepção

O teste da placa quente foi utilizado de acordo com os métodos descritos previamente (Vendruscolo et al., 2004). A placa quente (Ugo Basile, model-DS37) foi mantida a  $52,2 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ . Os animais foram colocados sobre a placa quente, circundada por um cilindro de acrílico (24 cm de diâmetro) e o tempo gasto pelo animal para lamber ou agitar vigorosamente a pata traseira, ou pular (o que ocorresse primeiro) foi registrado e utilizado como índice de nocicepção. Um tempo de corte (*cut-off*) de 45 s foi imposto para que os animais que não exibissem um dos parâmetros de nocicepção fossem retirados da placa para prevenir queimaduras.

### 7.2.4. Exposição ao odor de raposa (TMT)

Este procedimento foi iniciado uma semana após a coleta de sangue para determinação de corticosterona basal, com os mesmos animais. Após avaliação do comportamento nociceptivo basal na placa quente, os animais foram colocados individualmente em caixas plásticas transparentes (sem serragem) contendo uma pequena peça de papel filtro (dentro de uma tampa plástica) embebida com 25  $\mu\text{l}$  de 2,5-dihidro-2,4,5-trimetiltiazolina (TMT, Phero Tech Inc., Vancouver, BC, Canadá) localizada em um dos cantos da caixa plástica. A quantidade de TMT e condições de exposição foram baseadas em estudos prévios (Dias Soares et al., 2003). A sala de exposição ao odor era

ventilada sob pressão negativa em relação ao corredor para evitar a disseminação do odor para outras áreas. Após 10 min de exposição ao TMT, os animais foram removidos da sala e testados novamente na placa quente em uma sala adjacente. Os ratos machos e fêmeas foram testados em dias alternados entre 8:00 h e 12:00 h. Medidas adequadas foram tomadas para evitar dor e desconforto aos animais. Vinte minutos após o fim da exposição ao TMT, amostras de sangue foram coletadas para estimativa dos níveis de corticosterona plasmática pós-estresse (Figura 18).



**Figura 18-** Esquema ilustrando os procedimentos da realização do experimento.

### 7.2.5. Análise estatística

As análises foram realizadas separadamente para machos e fêmeas. Para comparar as linhagens LEW e SHR, os dados do teste com o odor do TMT foram analisados por ANOVA de duas vias (linhagem) para medidas repetidas (nocicepção basal e pós-estresse; ou níveis basais e pós-estresse de corticosterona). Para analisar especificamente a influência dos genótipos L ou S em cada QTL, bem como sua interação, uma ANOVA de três vias (fatores *Ofil1* e *Ofil2*) para medidas repetidas foi realizada exclusivamente com os dados das 4 linhagens recombinantes. Nestes animais, a ocorrência de analgesia foi determinada pelo teste t de Student comparando a latência para nocicepção basal e pós-estresse para

cada linhagem. O teste LSD foi utilizado para as comparações *post-hoc*, quando apropriado. O nível de significância aceita em todos os testes foi  $p \leq 0,05$ . Os dados estão expressos nas figuras como média e EPM.

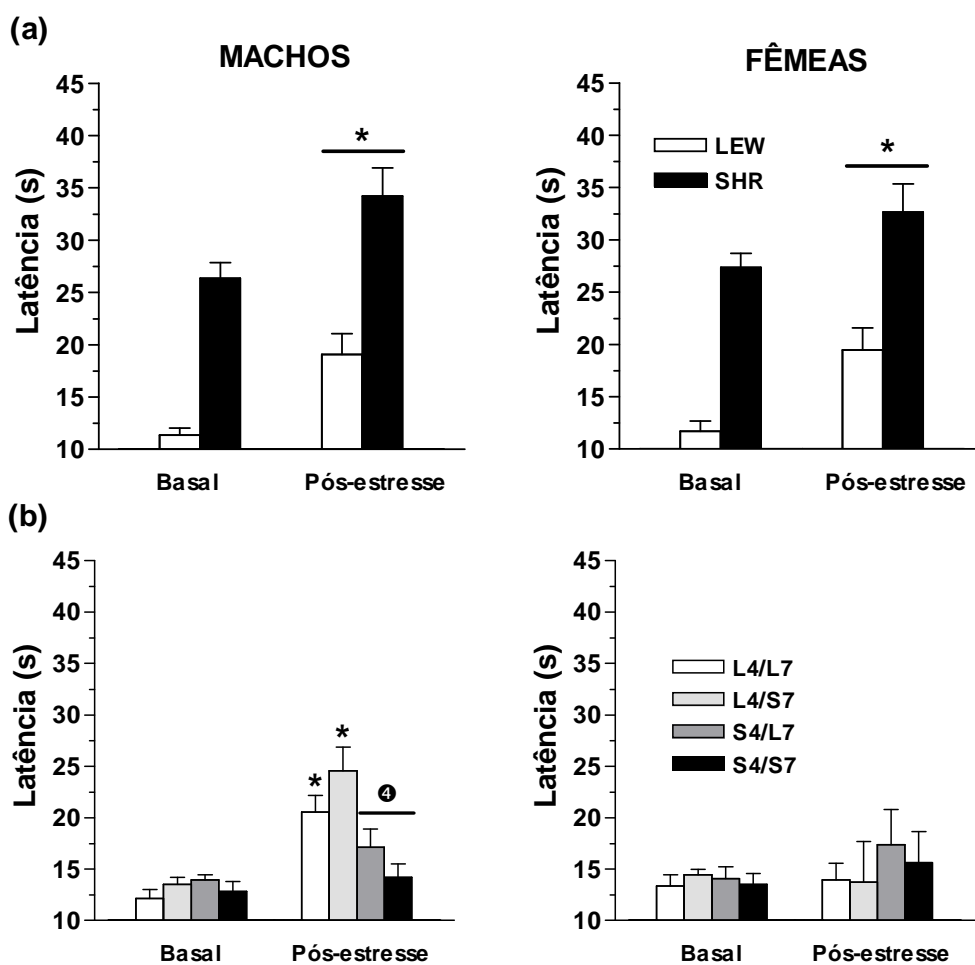
## 7.3. RESULTADOS

### 7.3.1. Reatividade nociceptiva basal e após exposição ao TMT

A Figura 19 ilustra os resultados da latência nociceptiva basal e pós-estresse obtidos em ratos LEW e SHR (a), e F3 (b; de acordo com a linhagem) de ambos os sexos. Para os machos, a ANOVA de duas vias para medidas repetidas (basal e pós-estresse) revelou um efeito geral da linhagem ( $F_{(1,18)}=46,17$ ;  $p < 0,0001$ ) e da medida repetida ( $F_{(1,18)}=29,84$ ;  $p < 0,0001$ ). Como esperado, os ratos SHR exibiram maior latência nociceptiva basal em relação aos ratos LEW. A exposição dos ratos ao odor do TMT induziu analgesia (i.e. aumento da latência nociceptiva comparado aos níveis basais) para ambas as linhagens. Para as fêmeas, a ANOVA também revelou um efeito geral da linhagem ( $F_{(1,15)}=45,93$ ;  $p < 0,0001$ ) e da medida repetida ( $F_{(1,15)}=20,68$ ;  $p < 0,0004$ ), sendo que as ratas SHR exibiram maior latência nociceptiva basal em relação às ratas LEW e o TMT induziu analgesia significativa nas duas linhagens.

A ANOVA de três vias para medidas repetidas revelou uma interação significativa *Ofil1* vs. medida repetida ( $F_{(1,26)}=21,60$ ;  $p < 0,0001$ ) para os machos. Uma ANOVA de duas vias adicional realizada separadamente para cada medida (basal e pós-estresse) revelou que os ratos com alelos LEW em *Ofil1* exibiram maior analgesia induzida pelo TMT do que os

ratos com alelos SHR ( $F_{(1,26)}=15,00$ ;  $p<0,0008$ ). A latência nociceptiva basal, entretanto, não foi afetada por *Ofil1* ou *Ofil2*. Mais especificamente, a exposição ao TMT induziu analgesia em ratos L4/L7 ( $t=-7,79$ ;  $p<0,0003$ ) e L4/S7 ( $t=-5,4$ ;  $p<0,006$ ), mas não em ratos S4/L7 e S4/S7 em comparação com suas respectivas latências nociceptivas basais. Em relação às fêmeas, os *loci Ofil1* e *Ofil2* não influenciaram nenhum dos parâmetros analisados.



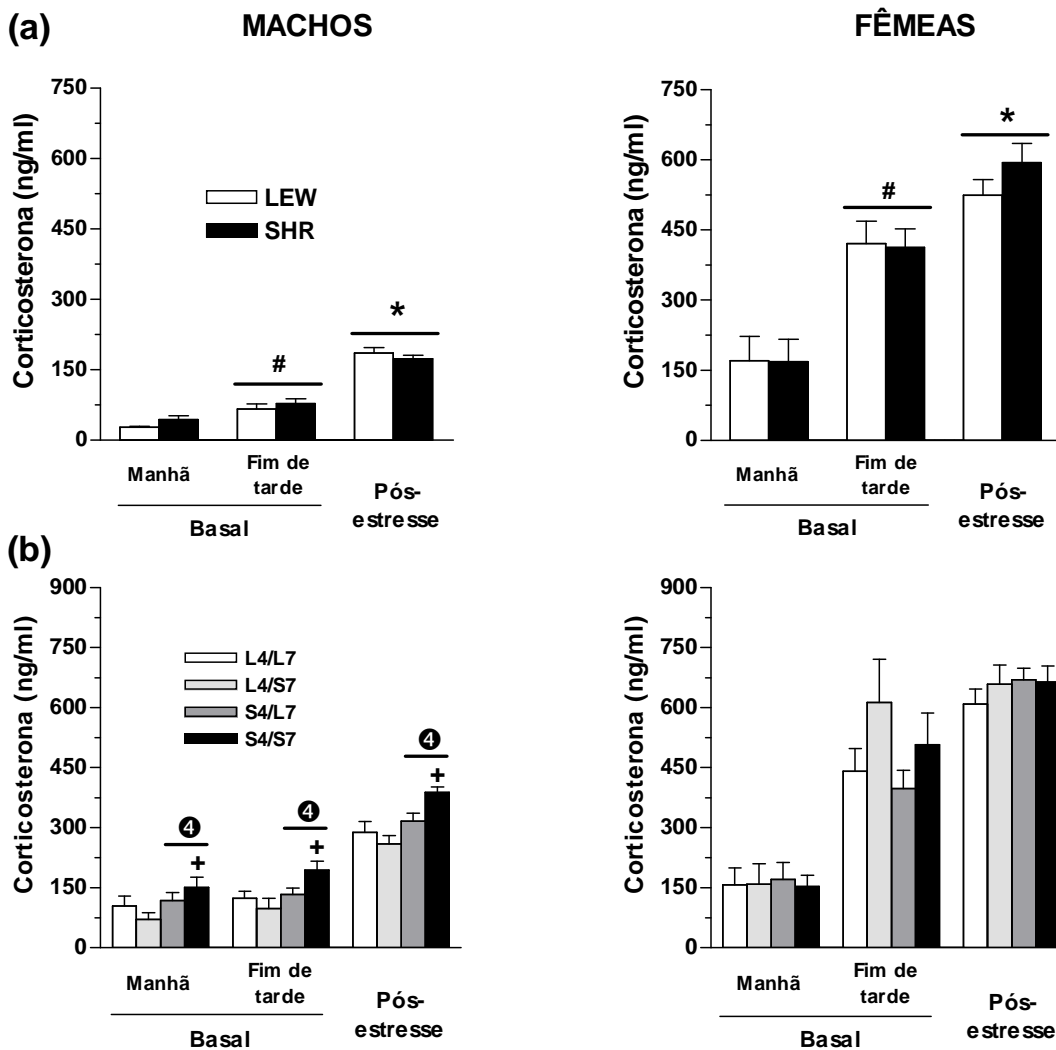
**Figura 19-** Latência (s) para nocicepção basal e pós-estresse de ratos LEW e SHR (a), e F3 (b; de acordo com a linhagem) de ambos os sexos. Os ratos foram testados na placa quente ( $52,2 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ) imediatamente antes (Basal) e após (Pós-estresse) exposição de 10 min ao odor de raposa, TMT. \* Diferença significativa em comparação à latência nociceptiva basal (ANOVA,  $p<0,05$ ). <sup>4</sup> Efeito significativo de *Ofil1* (ANOVA,  $p<0,05$ ).

### 7.3.2. Níveis plasmáticos de corticosterona basal e pós-estresse

Os resultados dos níveis plasmáticos de corticosterona basal (pela manhã e fim de tarde) e pós-estresse de ratos LEW e SHR (a), e F3 (b) estão ilustrados na Figura 20. A ANOVA de duas vias revelou somente um efeito significativo da medida repetida ( $F_{(2,36)}=134,36$ ;  $p<0,0001$ ). As comparações *post-hoc* indicaram a seguinte ordem para os níveis de corticosterona: manhã<fim de tarde<pós-estresse (pelo menos  $p<0,0004$  para cada comparação). O mesmo perfil de resposta foi observado para as fêmeas: efeito significativo do fator repetição ( $F_{(2,30)}=37,00$ ;  $p<0,0001$ ; manhã<fim de tarde<pós-estresse; pelo menos  $p<0,0004$ ).

A ANOVA de três vias revelou um efeito geral de *Ofil1* ( $F_{(1,26)}=5,38$ ;  $p<0,04$ ) para os machos. Os animais com alelos LEW em *Ofil1* exibiram menores níveis de corticosterona do que os animais com alelos SHR neste locus. Uma interação entre *Ofil1* e *Ofil2* também foi observada ( $F_{(1,26)}=5,38$ ;  $p<0,03$ ). As análises *post-hoc* indicaram que os ratos S4/S7 exibiram maiores níveis de corticosterona do que as outras três linhagens ( $p<0,05$ ). Além disso, a ANOVA revelou um efeito da medida repetida ( $F_{(2,52)}=188,86$ ;  $p<0,0001$ ; manhã<fim de tarde<pós-estresse;  $p<0,03$ ). Nenhum efeito significativo foi detectado para *Ofil1* e *Ofil2* em fêmeas. Somente um efeito da medida repetida foi observado ( $F_{(2,58)}=108,26$ ;  $p<0,0001$ ; manhã<fim de tarde<pós-estresse;  $p<0,0001$ ).





**Figura 20-** Níveis plasmáticos de corticosterona basal (manhã, 8:00-9:00 h; fim de tarde, 17:00-18:00 h) e pós-estresse (20 min após 10 min de exposição ao TMT) de ratos LEW e SHR (a), e F3 (b; de acordo com a linhagem). \* Diferença significativa em relação aos níveis basais (ANOVA,  $p < 0,05$ ). # Diferença significativa em relação aos níveis basais de corticosterona avaliados no período da manhã (ANOVA seguida do teste LSD,  $p < 0,05$ ). + Diferença significativa em relação às outras três linhagens (ANOVA seguida do teste LSD,  $p < 0,05$ ). 4 Efeito geral de *Ofil1* (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

## 7.4. DISCUSSÃO

Considerando-se que a ansiedade é um traço multidimensional, estudos aplicando testes comportamentais múltiplos em grupos de animais com genótipos bem definidos podem ser úteis para investigar se diferentes modelos experimentais (ou diferentes condições de teste) acessam ou não o mesmo fenômeno psicológico (ver para revisão Ramos e Mormède, 1998). No presente estudo, os ratos LEW e SHR, contrastantes em uma variedade de testes comportamentais de ansiedade (Capítulo 1), foram submetidos a um teste com odor de raposa, o qual tem sido sugerido como modelo de fobia inata. Os ratos LEW e SHR de ambos os sexos exibiram níveis similares de analgesia e de corticosterona induzidos pela exposição ao odor de raposa. Além disso, os *loci Ofil1* e *Ofil2*, que modulam comportamentos relacionados à ansiedade em fêmeas (Capítulo 1), não afetaram a analgesia nem os níveis de corticosterona induzidos pelo TMT em fêmeas. Em machos, entretanto, o locus *Ofil1* afetou significativamente a analgesia induzida pelo estresse e os níveis de corticosterona. Estes dados representam a primeira identificação de um QTL afetando respostas comportamentais e neuroendócrinas induzidas por odor de predador em ratos.

Um número crescente de evidências sugere que a exposição ao TMT induz uma variedade de alterações fisiológicas e comportamentais em ratos (Fendt et al., 2005), que têm sido interpretadas como indicativas de aversão, medo e/ou ansiedade. Por exemplo, a exposição ao TMT induz postura de congelamento (Wallace e Rosen, 2000), comportamento de esquiva (McGregor et al., 2002), aversão condicionada de sabor (Myers e Rinaman, 2005), potencialização de respostas de sobressalto acústico, inibição de

comportamento apetitivo (Endres et al., 2005), analgesia (King et al., 2005; Walf e Frye, 2003) e liberação de corticosterona em ratos (Wallace e Rosen, 2000). Tem sido relatado também que a exposição ao TMT aumenta a expressão de c-Fos em várias regiões cerebrais sabidamente implicadas no controle de comportamentos defensivos, bem como na atividade do eixo HPA (Day et al., 2004; Myers e Rinaman, 2005; Endres et al., 2005). As evidências em conjunto sugerem que a exposição ao TMT induz respostas relacionadas ao estresse, particularmente quando apresentadas em um espaço confinado (como as condições utilizadas neste experimento), onde seu efeito nocivo não pode ser esquivado. Desde que processos motivacionais, como a ansiedade, têm papel importante na reatividade ao estresse (Harris, 1996), poderia se esperar que linhagens de ratos contrastantes para comportamentos relacionados à ansiedade responderiam de forma diferenciada quando submetidas ao odor de predadores.

Os ratos LEW e SHR, que exibem altos e baixos níveis de comportamentos relacionados à ansiedade (Capítulo 1), respectivamente, demonstraram aumento da latência para nocicepção na placa quente (i.e. analgesia induzida pelo estresse) e dos níveis de corticosterona plasmática após exposição ao TMT (ativação do eixo HPA). Estes dados corroboram a hipótese de que o TMT causa aversão robusta e inata em ratos. Entretanto, nenhuma diferença entre as linhagens foi observada para as medidas avaliadas, além do bem conhecido fenótipo hipoalгésico dos ratos SHR na placa quente (Vendruscolo et al., 2004). Estes achados sugerem que as diferenças relacionadas à ansiedade, observadas entre os ratos LEW e SHR, não modulam as respostas comportamentais e fisiológicas ao estresse do odor de um predador.

Foi observado que os níveis basais de corticosterona foram maiores no fim de tarde do que no período da manhã (independente dos fatores linhagem e sexo), confirmando a

influência do ritmo circadiano normal sobre a atividade do eixo HPA nestes ratos. De acordo com estudos prévios (Duclos et al., 2001), os níveis de corticosterona no início da fase clara (pela manhã) não foram diferentes entre as linhagens LEW e SHR. Porém, um resultado inesperado encontrado no presente estudo foi que os ratos LEW e SHR também não diferiram em relação aos níveis de corticosterona medidos no fim de tarde e após a exposição ao estresse do TMT. Alguns estudos sugerem que os ratos LEW exibem variação circadiana mínima nos níveis de corticosterona (Oitzl et al., 1995) e que eles têm o eixo HPA hiporesponsivo em algumas situações (Gomez et al., 1998; Duclos et al., 2001) em comparação aos ratos SHR. Além disso, muitos estudos mostram esta hiporesponsividade do eixo HPA em ratos LEW em comparação a ratos Fisher 344 (Kosten e Ambrosio, 2002). Por outro lado, outros estudos relataram que os ratos LEW e SHR não diferiram entre si em algumas condições de estresse (Gomez et al., 1995; Berton et al., 1998; Duclos et al., 2001). A discordância entre resultados pode ser decorrente de diferenças no contexto experimental empregado nos diferentes estudos. Pelo nosso conhecimento, nenhuma comparação direta entre ratos LEW e SHR com relação aos níveis de corticosterona medidos no fim de tarde e após exposição ao estresse do TMT havia sido realizada previamente.

Embora um grande número de estudos sugira que o TMT induz comportamentos defensivos em roedores, alguns outros estudos mostram resultados contraditórios (Blanchard et al., 2003; McGregor et al., 2002). McGregor e colaboradores (2002) relataram que ratos exibiram esquiva tanto do odor de gato como do TMT, mas somente o odor de gato induziu um aumento no comportamento de fuga e um aumento na ansiedade avaliada no labirinto em cruz elevado. O tratamento farmacológico com midazolam, uma droga ansiolítica, reduziu a esquiva em relação ao odor de gato, mas aumentou a esquiva

em relação ao TMT (McGregor et al., 2002). Estes dados sugerem que o TMT pode induzir um conjunto mais restrito de alterações comportamentais do que o odor de gato. No entanto, um estudo realizado no laboratório de genética do comportamento da UFSC, utilizando um teste clássico de odor de gato (McGregor et al., 2002) e outras subpopulações de ratos LEW e SHR, também não revelou diferenças significativas entre as respostas comportamentais destas linhagens (dados não publicados). Em conjunto, estes resultados, apesar de não evidenciarem diferenças entre as linhagens testadas, sugerem que o teste com TMT e odor de gato são modelos interessantes para o estudo da ansiedade, mas uma ampla avaliação será necessária para esclarecer o significado biológico destes modelos nestas duas linhagens de ratos.

Os presentes resultados ainda sugerem que estes dois testes (TMT e odor de gato) não avaliam o mesmo tipo de “ansiedade” que outros testes nos quais estas linhagens foram caracterizadas previamente, uma hipótese que está de acordo com outros estudos (Dielenberg e McGregor, 2001). Estudos farmacológicos demonstraram que drogas ansiolíticas (e.g. benzodiazepínicos), que são efetivas em modelos clássicos de ansiedade generalizada (e.g. labirinto em cruz elevado), não atenuam as respostas de defesa produzidas pelo TMT (McGregor et al., 2002; Blanchard et al., 2003), sugerindo que os testes com odor de predador podem modelar alguns aspectos de ansiedade fóbica. Até agora, nenhum estudo abrangente investigando o efeito de drogas ansiolíticas sobre as respostas comportamentais de medo induzido por TMT foi conduzido.

O locus *Ofil1* afetou significativamente as respostas comportamentais e endócrinas induzidas pelo odor do TMT. A exposição ao TMT induziu um aumento significativo nos níveis de corticosterona, mas não induziu analgesia em fêmeas F3. As evidências sugerem que a analgesia induzida pelo estresse é menos pronunciada em fêmeas do que em machos

(Romero et al., 1988). Estes resultados corroboram a hipótese de que as respostas comportamentais e neuroendócrinas induzidas pelo odor de predadores podem ser dissociadas (File et al., 1993a). Pode ser sugerido que as fêmeas das linhagens recombinantes sejam menos sensíveis à analgesia induzida pelo TMT do que as fêmeas das linhagens puras. O fato de *Ofil1* não modular os efeitos do TMT em fêmeas proporciona evidência adicional de que o campo aberto e os testes com odor de predador provavelmente refletem diferentes aspectos “psicológicos”.

Em machos, *Ofil1* afetou significativamente a analgesia induzida pelo TMT e os níveis de corticosterona (no fim de tarde e após o estresse do TMT). Estes achados representam a primeira evidência de um QTL modulando respostas comportamentais e neuroendócrinas induzidas pelo estresse do odor de predador em roedores. Os animais com alelos LEW em *Ofil1* mostraram maiores níveis de analgesia induzida pelo TMT, sem afetar os níveis basais de nocicepção, em comparação aos animais com alelos SHR. Em contrapartida, *Ofil1* afetou os níveis de corticosterona no período do fim de tarde e após exposição ao TMT, mas com os animais com alelos SHR em *Ofil1* aumentando os níveis de corticosterona. De forma interessante, um estudo recente relatou um QTL controlando os níveis de corticosterona no fim de tarde (Potenza et al., 2004) localizado aproximadamente na mesma região que *Ofil1*, no cromossomo 4, em um inter cruzamento entre ratos LEW e Fischer 344. Portanto, esta região genômica pode conter genes controlando respostas comportamentais e endócrinas potencialmente ligadas ao estresse.

Em conclusão, as diferenças comportamentais e neuroendócrinas esperadas entre as linhagens LEW e SHR, que diferem em modelos clássicos de ansiedade generalizada, não foram encontradas nos testes com odor de predador. Além disso, a ausência de efeito dos *loci Ofil1* e *Ofil2* em fêmeas reforça a idéia de que o comportamento avaliado no teste do

campo aberto é geneticamente dissociado da reatividade comportamental e neuroendócrina induzida pela exposição ao odor de um predador. Por outro lado, o efeito do locus *Ofil1* nas respostas ligadas ao estresse em machos mostra que a mesma região genômica que modula um determinado fenótipo em fêmeas pode influenciar outros fenótipos em machos.

## 8. CAPÍTULO 4

### ***Efeito genético na sensibilização comportamental e neuroendócrina induzida pela cocaína.***

#### 8.1. INTRODUÇÃO

O fato dos ratos SHR beberem mais álcool do que os ratos LEW foi um tanto inesperado, pois os ratos LEW são considerados mais “ansiosos” (Capítulo 1), mais reativos ao estresse em diversas situações em comparação aos ratos SHR (Berton et al., 1998; Vendruscolo et al., 2004) e mais sensíveis ao efeito reforçador de drogas em comparação a ratos Fischer 344 (Kosten et al., 1994; Suzuki et al., 1988). Todas estas características são consideradas como fatores de vulnerabilidade ao abuso de drogas. Em contrapartida, os ratos SHR apresentam características de impulsividade e desatenção (Capítulo 2), fatores estes também associados ao desenvolvimento de dependência de drogas. Em relação às regiões genômicas de interesse, no Capítulo 1 foi observado que *Ofil1* afetou concomitantemente comportamentos relacionados à ansiedade e consumo de álcool em fêmeas. Entretanto, não sabemos se esta relação positiva é exclusiva para o álcool ou pode ser estendida a outros tipos de drogas. Em machos, por outro lado, *Ofil1* afetou respostas comportamentais e neuroendócrinas ao estresse (Capítulo 3). Estas informações nos motivaram a realizar um outro teste considerado relevante para o estudo da dependência, utilizando outra droga com potencial de abuso, a cocaína, no modelo de sensibilização induzida por esta droga.



A sensibilização comportamental tem sido proposta como modelo animal de neuroplasticidade associada à administração repetida de psicoestimulantes e tem sido implicada no desenvolvimento de dependência de drogas (Robinson e Berridge, 1993). O fenômeno de sensibilização comportamental induzida por cocaína é conhecido há muitos anos (Downs e Eddy, 1932; Tatum e Seevers, 1929) e co-existe com várias alterações neuroquímicas nas vias cerebrais de reforço. As alterações nas áreas de projeções mesocorticolímbicas dopaminérgicas ou na área tegmentar ventral (rica em neurônios dopaminérgicos) promovidas pela administração repetida de cocaína incluem: aumento no metabolismo da glicose (Thomas et al., 1996), alteração dos níveis extracelulares e liberação de monoaminas, bem como de seus receptores e transportadores (Kalivas e Duffy, 1990; Koff et al., 1994; Muller et al., 2004; Parsons et al., 1993), mudanças no sistema de AMPc e proteínas G (Miserendino e Nestler, 1995; Striplin e Kalivas, 1993), alterações na expressão gênica (McClung e Nestler, 2003), aumento na transmissão por aminoácidos excitatórios (Pierce et al., 1996) e mudanças na atividade da fosfolipase A2 (Reid et al., 1996). Estas alterações sugerem que o estudo da sensibilização induzida por cocaína pode ser informativo na busca de fatores que levam ao abuso de drogas. No entanto, as regiões cromossômicas e os genes que determinam a sensibilidade às alterações produzidas pela administração repetida de cocaína e os processos de sensibilização comportamental são pouco conhecidos.

Além destas alterações, sabe-se que o eixo HPA é atípico em pessoas dependentes ao álcool, nicotina ou drogas ilícitas como a cocaína. Koob e Le Moal (1997) propõem que a dependência de droga, por sua natureza, é um desarranjo do comportamento adaptativo. Usando as palavras de Koob e Le Moal (1997), “*o aparelho emocional e motivacional do cérebro é seqüestrado em pessoas que se tornaram dependentes*”. O eixo HPA tem um

envolvimento essencial nos processos fisiológicos normais e na adaptação ao estresse (Selye, 1936). Um grande número de evidências sugere a existência de um importante conjunto de interações entre a função alterada do eixo HPA e consumo de drogas, dependência e reatividade ao estresse (Goeders e Guerin, 1996; Prasad et al., 1998). Por estes motivos, as alterações na função do eixo HPA em dependentes de droga constituem a “porta de entrada” ao desarranjo dos sistemas motivacionais e emocionais no cérebro.

Em animais de laboratório, a injeção de cocaína aumenta os níveis plasmáticos de corticosterona. Ratos adrenalectomizados não desenvolvem sensibilização comportamental nem auto-administração de cocaína, processos que podem ser re-estabelecidos com a suplementação de corticosterona (Marinelli et al., 1994; Rouge-Pont et al., 1995). Além disso, a exposição de roedores a uma variedade de eventos estressantes pode sensibilizar o sistema de reforço e favorecer a auto-administração de drogas (Piazza e Le Moal, 1998), com participação crítica dos glicocorticóides nestes efeitos. Um aspecto comum da sensibilização comportamental e dependência é a marcada variação interindividual na suscetibilidade ao desenvolvimento destes processos (Robinson e Berridge, 2001). Esta variabilidade individual é provavelmente determinada pela interação de fatores ambientais e genéticos. Com base nas evidências apresentadas, poder-se-ia esperar uma sensibilidade diferenciada aos efeitos da cocaína sobre o comportamento e sistema endócrino em populações de animais com diferenças genéticas na reatividade ao estresse e na atividade do eixo HPA.

O objetivo deste experimento foi avaliar o efeito genético nas respostas comportamentais e na ativação do eixo HPA induzidas pelo tratamento repetido com cocaína.

## 8.2. MATERIAL E MÉTODOS

### 8.2.1. Animais

Nesta última etapa foram utilizados ratos adultos (10 semanas de idade) das quatro linhagens recombinantes (F3): Salina (n=7 e 6 para a linhagem L4/L7; 5 e 5 para a linhagem L4/S7; 8 e 8 para a linhagem S4/L7; 6 e 6 para a linhagem S4/S7; machos e fêmeas, respectivamente); Cocaína (n=8 e 6 para a linhagem L4/L7; 5 e 7 para a linhagem L4/S7; 8 e 8 para a linhagem S4/L7; 5 e 8 para a linhagem S4/S7; machos e fêmeas, respectivamente). Grupos adicionais de ratos LEW e SHR (7-8) com a mesma idade foram testados concomitantemente. Todos os animais foram alojados em caixas coletivas com água e comida *ad libitum* e mantidos em condições padronizadas como descrito no Capítulo 1.

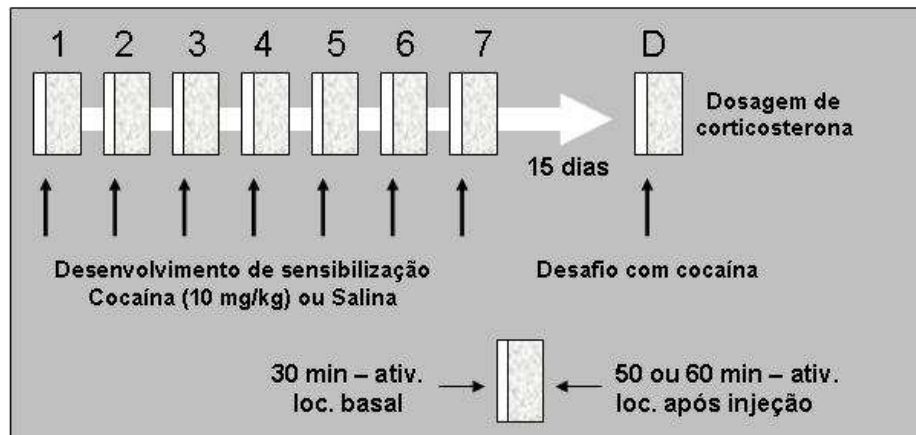
Neste experimento especificamente foram utilizados ratos LEW, SHR e F4 (L4/L7, L4/S7, S4/L7 e S4/S7) de ambos os sexos. No início dos testes os animais tinham entre 9 e 11 semanas de idade. Todos os animais foram alojados em caixas coletivas com água e comida *ad libitum* e mantidos em condições padronizadas, como descrito no Capítulo 1.

### 8.2.2. Drogas

A cocaína foi obtida da Coopérative Pharmaceutique Française (Bordeaux, França). Salina estéril (NaCl 0,9 %) foi utilizada como solvente e como solução controle.

### 8.2.3. Sensibilização comportamental induzida pela cocaína

A atividade locomotora dos animais foi avaliada em caixas de atividade (ver descrição e Figura 5 no Capítulo 1). A atividade horizontal e a frequência do comportamento de levantar (*rearing*) foram avaliadas por 90 min. As sessões de teste foram realizadas a cada dois dias (uma vez por dia), por 7 sessões consecutivas (i.e. 14 dias). A atividade locomotora basal foi avaliada nos primeiros 30 min de cada sessão (habituação). Imediatamente após este período, os animais foram retirados, rapidamente injetados com salina (1 ml/kg) ou cloridrato de cocaína (10 mg/kg; i.p.) em sala adjacente, e expostos novamente ao aparelho por mais 60 min (avaliação da locomoção pós-injeção). Finalizada a última sessão (7<sup>a</sup>) de desenvolvimento de sensibilização pela cocaína, os animais foram mantidos em suas caixas coletivas por um período de 15 dias sem tratamento farmacológico e então submetidos a um desafio com cocaína onde todos os animais (previamente expostos à cocaína ou à salina) foram injetados com cocaína (10 mg/kg; i.p.). Esta sessão especificamente consistiu em 30 min de locomoção basal e 50 min de locomoção pós-injeção. O esquema de teste de sensibilização comportamental está ilustrado na Figura 21. Terminado o teste comportamental, os animais foram decapitados e o sangue armazenado para subsequente análise de corticosterona, como descrito no Capítulo 3.



**Figura 21-** Esquema dos procedimentos do teste de sensibilização comportamental induzida pela cocaína. Os números de 1 a 7 correspondem às sessões de desenvolvimento de sensibilização e a letra D corresponde à sessão desafio com cocaína.

#### 8.2.4. Análise estatística

As análises foram realizadas separadamente para machos e fêmeas. Para comparar as linhagens LEW e SHR, os dados do desenvolvimento de sensibilização foram analisados por ANOVA de três vias (linhagem e tratamento) para medidas repetidas (sessões). Os dados da sessão desafio foram analisados por ANOVA de duas vias (linhagem e tratamento). Para analisar especificamente a influência dos genótipos L ou S em cada QTL, bem como sua interação sobre o desenvolvimento de sensibilização, uma ANOVA de quatro vias (fatores tratamento, *Ofil1* e *Ofil2*) para medidas repetidas foi realizada exclusivamente com os dados das 4 linhagens recombinantes. Para a sessão desafio as análises foram realizadas por ANOVA de três vias (tratamento, *Ofil1* e *Ofil2*). O teste LSD foi utilizado para as comparações *post-hoc*, quando apropriado. O nível de significância aceita foi  $p \leq 0,05$ . Os dados estão expressos nas figuras como média e EPM.

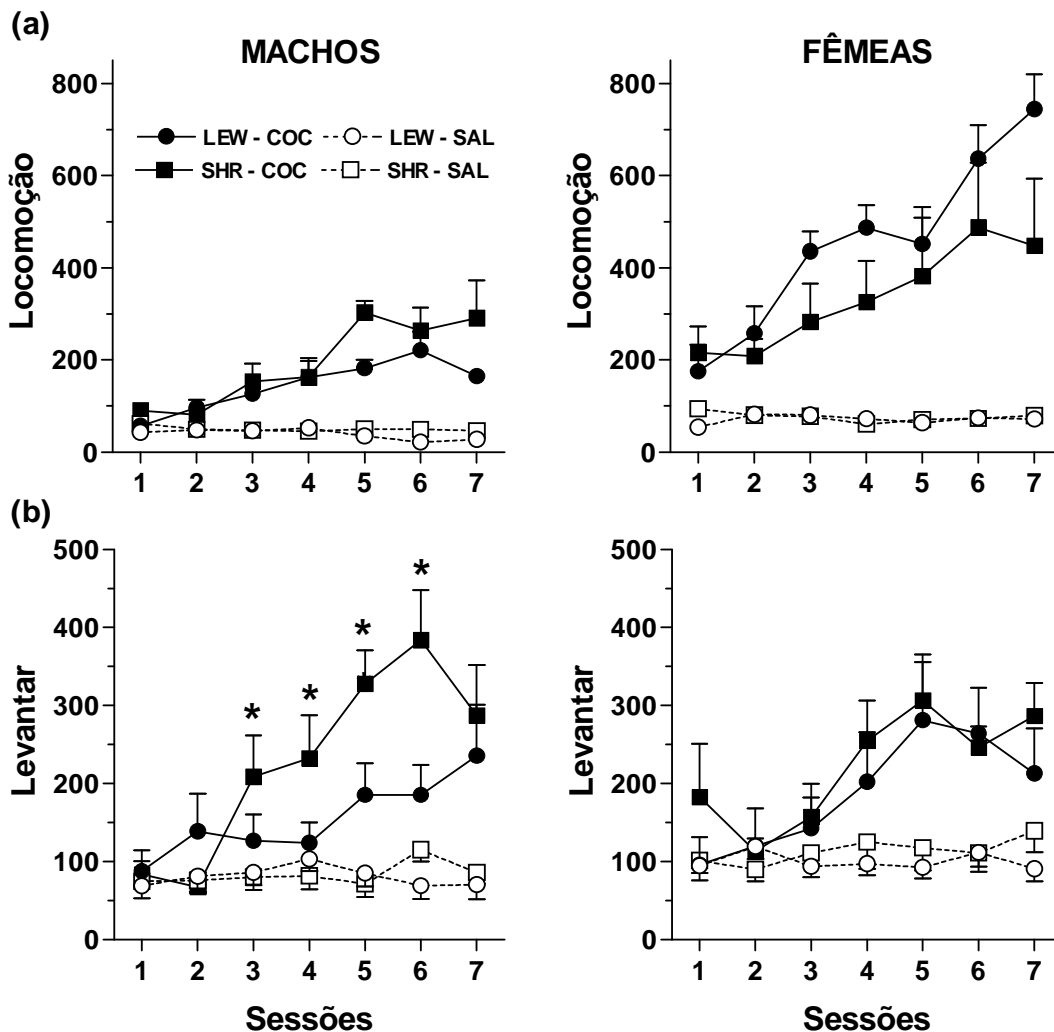
## 8.3. RESULTADOS

### 8.3.1. Desenvolvimento de sensibilização comportamental induzida pela cocaína

A Figura 22 ilustra os resultados da sensibilização psicomotora (locomoção horizontal e comportamento de levantar) dos ratos LEW e SHR de ambos os sexos tratados (a cada dois dias) com salina ou cocaína (10 mg/kg). Para os machos LEW e SHR, um efeito geral do tratamento ( $F_{(1,26)}=42,43$ ;  $p<0,0001$ ) e uma interação tratamento *vs.* sessões ( $F_{(6,156)}=13,22$ ;  $p<0,0001$ ) indicam que a cocaína induziu um aumento geral da locomoção horizontal dos animais e que este efeito foi crescente ao longo das sete sessões (i.e. desenvolvimento de sensibilização ao efeito estimulante da droga). Entretanto, não houve diferença de sensibilidade aos efeitos da cocaína entre as linhagens, como indicado pela ausência de interação significativa entre os fatores linhagem e tratamento. Para a frequência de levantar, a ANOVA de duas vias para medidas repetidas revelou efeito significativo do tratamento ( $F_{(1,26)}=20,37$ ;  $p<0,0001$ ), e interações do tratamento *vs.* sessões ( $F_{(6,156)}=6,82$ ;  $p<0,0001$ ) e do tratamento *vs.* linhagem *vs.* sessões ( $F_{(6,156)}=2,18$ ;  $p<0,05$ ). As análises *post-hoc* indicaram que os ratos SHR tratados com cocaína exibiram maior frequência de levantar do que os ratos LEW tratados com cocaína nas sessões três, quatro, cinco e seis ( $p<0,05$ ). O efeito hiperlocomotor agudo da cocaína (i.e. sessão 1) não foi detectado para os machos.

Para as fêmeas, a ANOVA de três vias para medidas repetidas revelou efeito significativo do tratamento ( $F_{(1,28)}=50,56$ ;  $p<0,0001$ ) e interação entre tratamento e sessões

( $F_{(6,168)}=10,46$ ;  $p<0,0001$ ), indicando que a cocaína promoveu um aumento geral da locomoção horizontal e causou sensibilização em magnitude similar nas fêmeas LEW e SHR. O mesmo perfil de resposta foi encontrado para a frequência de levantar: efeito do tratamento ( $F_{(1,28)}=12,70$ ;  $p<0,002$ ) e interação entre tratamento e sessões ( $F_{(6,168)}=4,51$ ;  $p<0,0003$ ). O efeito hiperlocomotor agudo da cocaína (i.e. sessão 1) foi evidenciado para locomoção horizontal em fêmeas ( $F_{(1,28)}=8,67$ ;  $p<0,006$ ).



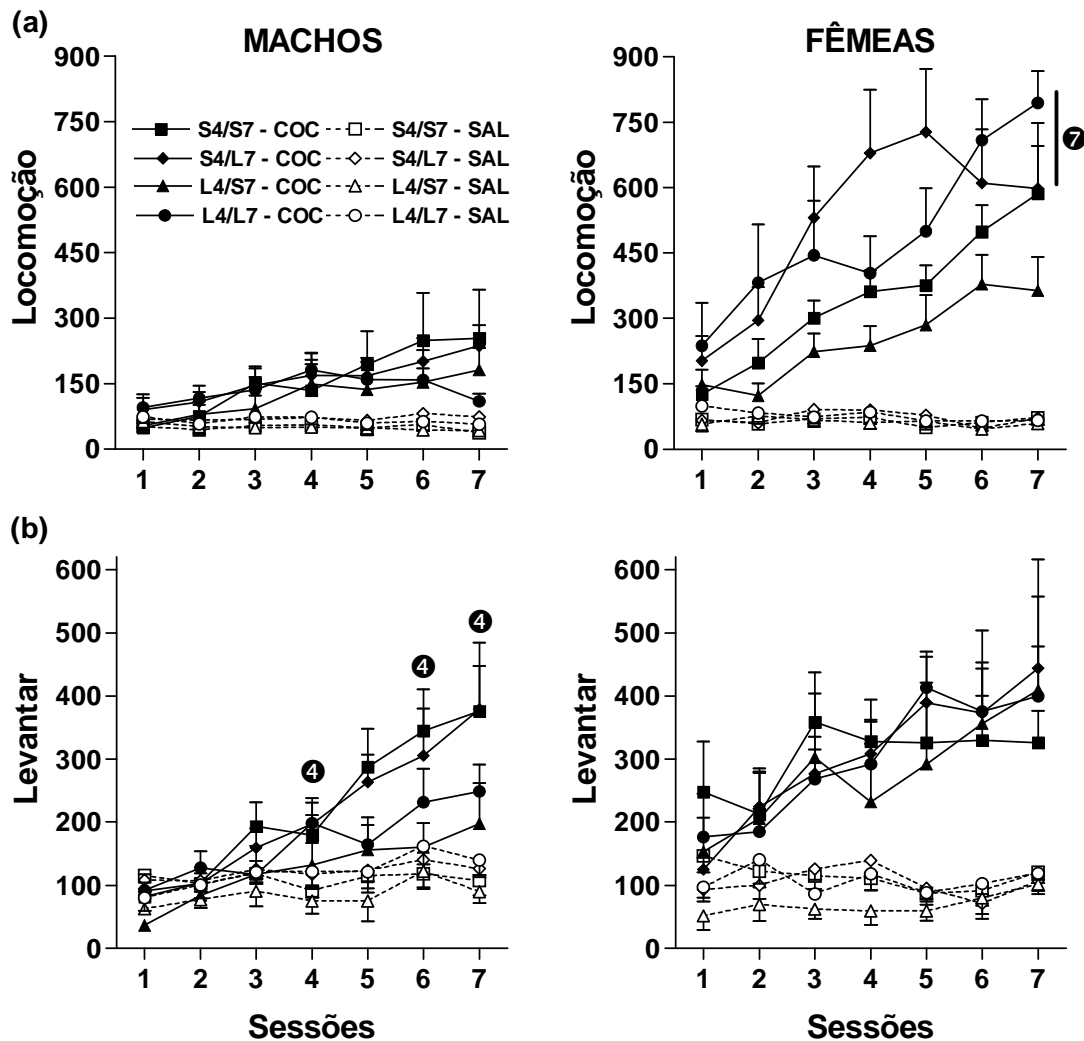
**Figura 22-** Efeito de injeções repetidas de cocaína ou salina (a cada dois dias) na locomoção horizontal (a) e freqüência de levantar (b) de ratos LEW e SHR de ambos os sexos. Em cada sessão, após 30 min de habituação os animais eram retirados da caixa de atividade, injetados com cocaína (10 mg/kg) ou salina (1 ml/kg), e a atividade psicomotora avaliada durante 60 min. \* Indica diferença significativa em relação a ratos LEW tratados com cocaína (ANOVA seguida do teste LSD,  $p < 0,05$ ).

A Figura 23 ilustra os resultados da sensibilização psicomotora (locomoção horizontal e comportamento de levantar) de ratos F4 (de acordo com a linhagem) de ambos os sexos tratados (a cada dois dias) com salina ou cocaína (10 mg/kg). A ANOVA de



quatro vias para medidas repetidas revelou um efeito geral do tratamento ( $F_{(1,44)}=19,11$ ;  $p<0,0001$ ) e uma interação do tratamento *vs.* sessões ( $F_{(6,264)}=10,28$ ;  $p<0,0001$ ) para a locomoção horizontal dos machos, indicando que a cocaína induziu aumento geral da locomoção e sensibilização nesta população de ratos. Em relação à frequência de levantar, a ANOVA revelou uma interação significativa do tratamento *vs.* *Ofil1* ( $F_{(1,44)}=4,08$ ;  $p<0,05$ ) e do tratamento *vs.* *Ofil1 vs.* sessões ( $F_{(6,264)}=3,47$ ;  $p<0,003$ ). As análises *post-hoc* indicaram que os animais com alelos SHR em *Ofil1* tratados com cocaína exibiram com mais frequência o comportamento de levantar ( $p<0,002$ ) do que os animais com alelos LEW. Além disso, os animais com alelos SHR em *Ofil1* tratados com cocaína exibiram maior sensibilização do comportamento de levantar ao longo das sessões do que os animais com alelos LEW como evidenciado por diferenças significantes de *Ofil1* nas sessões três, seis e sete ( $p<0,008$ ). O efeito hiperlocomotor agudo da cocaína (i.e. sessão 1) não foi detectado para os machos.

Para as fêmeas, a ANOVA de quatro vias para medidas repetidas revelou efeito significativo do tratamento ( $F_{(1,46)}=77,80$ ;  $p<0,0001$ ) e uma interação entre tratamento *vs.* sessões ( $F_{(6,276)}=18,15$ ;  $p<0,0001$ ). Além disso, foi verificado uma interação significativa entre tratamento e *Ofil2* ( $F_{(1,46)}=6,65$ ;  $p<0,02$ ). As análises subseqüentes indicaram que as fêmeas com alelos LEW em *Ofil2* tratadas com cocaína apresentaram maior locomoção horizontal do que as fêmeas com alelos SHR tratadas com cocaína ( $p<0,0002$ ). Com relação à frequência de levantar, a ANOVA revelou somente um efeito significativo do tratamento ( $F_{(1,46)}=25,63$ ;  $p<0,0001$ ) e uma interação do tratamento *vs.* sessões ( $F_{(6,276)}=5,52$ ;  $p<0,0001$ ). O efeito hiperlocomotor agudo da cocaína (i.e. sessão 1) foi evidenciado para locomoção horizontal ( $F_{(1,46)}=11,53$ ;  $p<0,001$ ) e frequência de levantar ( $F_{(1,46)}=5,01$ ;  $p<0,03$ ) em fêmeas.



**Figura 23-** Efeito da injeção de cocaína ou salina (a cada dois dias) na locomoção horizontal (a) e freqüência de levantar (b) de ratos F4 (de acordo com a linhagem) de ambos os sexos. Em cada sessão, após 30 min de habituação os animais eram retirados da caixa de atividade, injetados com cocaína (10 mg/kg) ou salina (1 ml/kg) e a atividade psicomotora avaliada durante 60 min. <sup>•</sup> Efeito significativo de *Ofil1* (ANOVA seguida do teste LSD,  $p < 0,05$ ). <sup>•</sup> Efeito geral de *Ofil2* (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

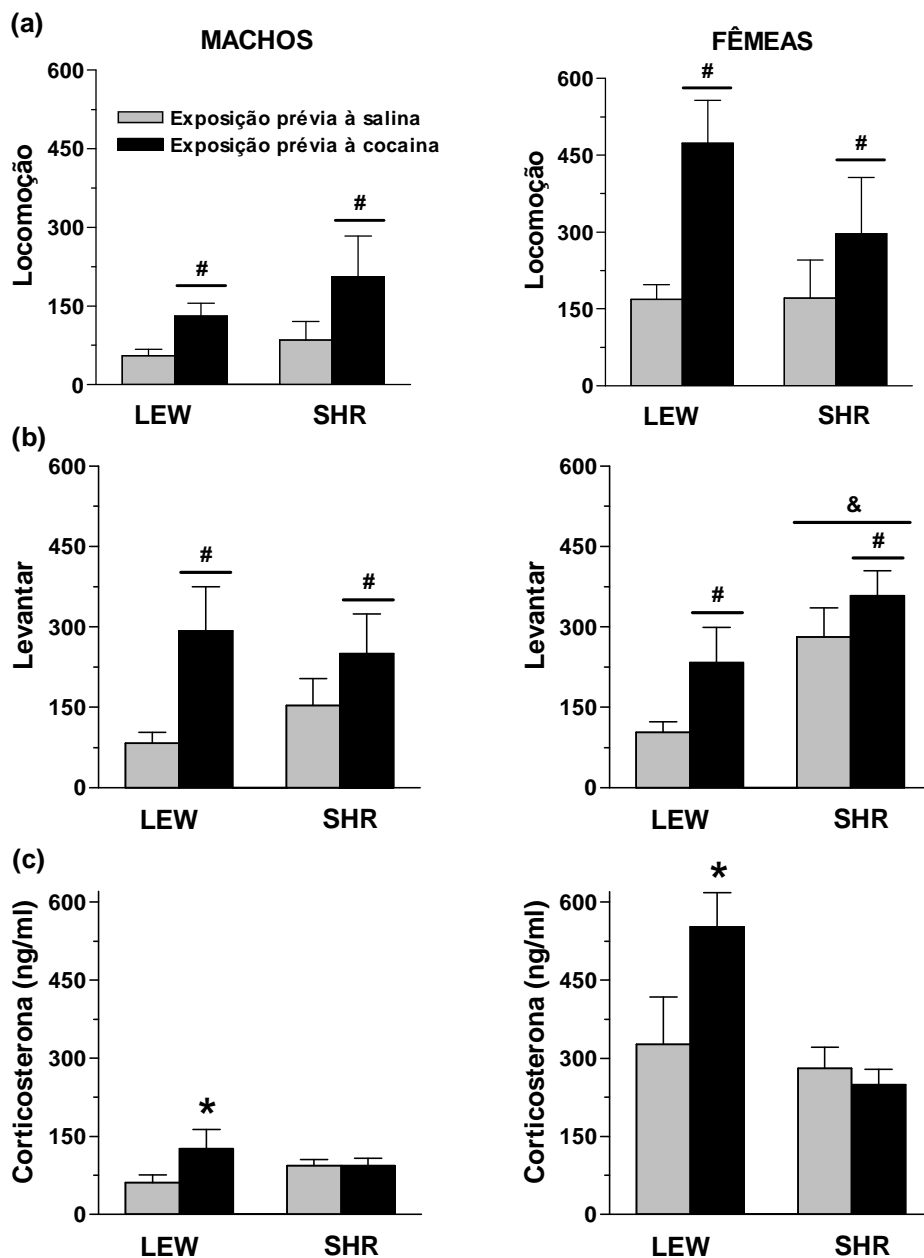
### 8.3.3. Desafio com cocaína na locomoção e na liberação de corticosterona

A Figura 24 ilustra os resultados da atividade locomotora (locomoção horizontal e frequência de levantar) e dos níveis plasmáticos de corticosterona de ratos LEW e SHR de ambos os sexos (previamente expostos à salina ou cocaína) tratados com uma dose desafio de cocaína (10 mg/kg). Para os machos, a ANOVA de duas vias revelou um efeito geral do tratamento para a locomoção horizontal ( $F_{(1,26)}=4,28$ ;  $p<0,05$ ) e frequência de levantar ( $F_{(1,26)}=5,58$ ;  $p<0,03$ ), indicando que os ratos previamente expostos à cocaína exibiram maior estimulação psicomotora (sensibilização persistente) do que os ratos previamente expostos à salina. A ANOVA também revelou uma interação significativa linhagem vs. tratamento ( $F_{(1,26)}=4,27$ ;  $p<0,05$ ) para os níveis de corticosterona. As análises *post-hoc* indicaram que os ratos LEW, mas não os SHR, exibiram sensibilização do eixo HPA induzida por injeções repetidas de cocaína (i.e. maior aumento dos níveis plasmáticos de corticosterona nos animais previamente expostos à cocaína do que nos animais previamente expostos à salina;  $p<0,009$ ).

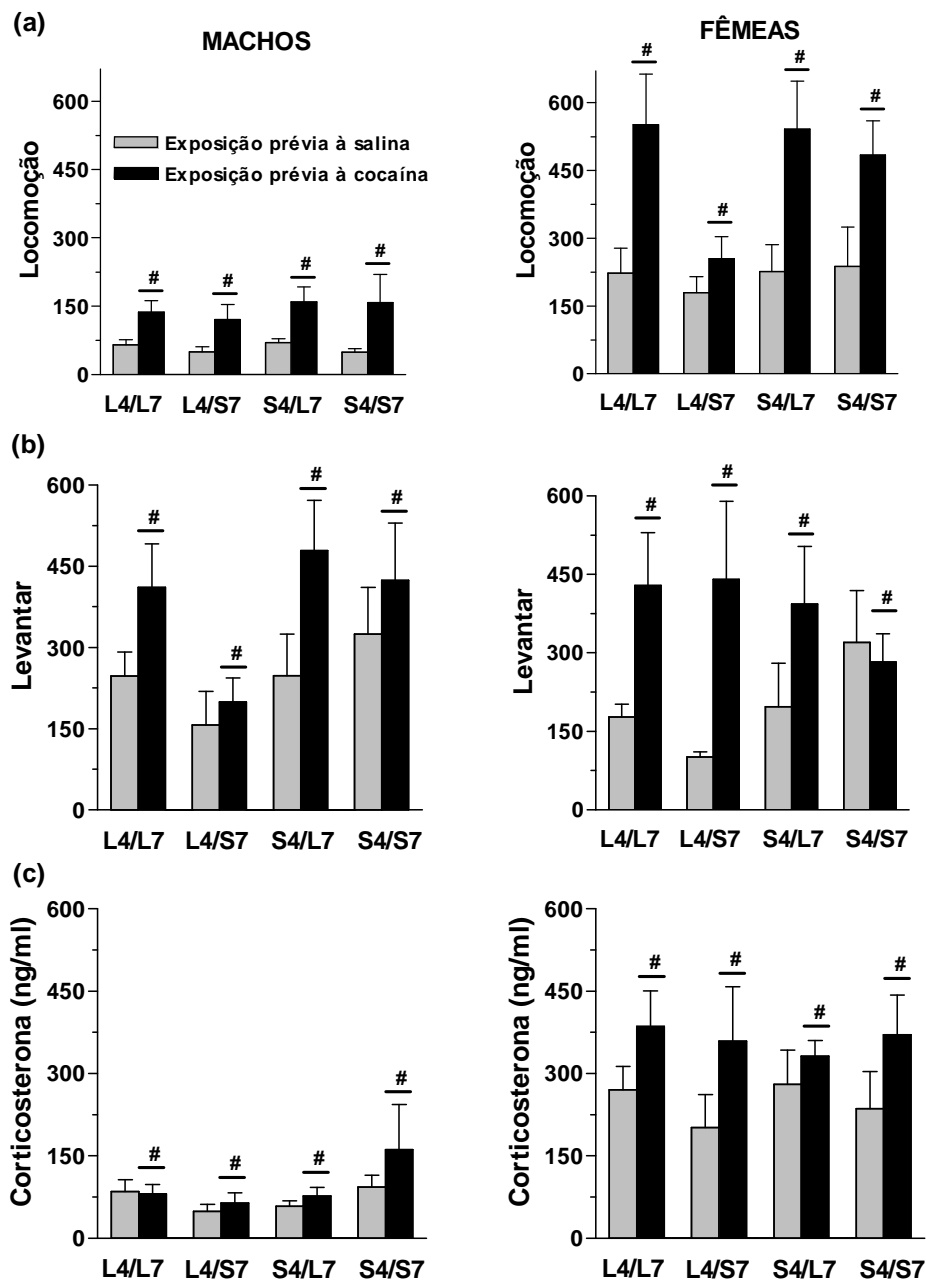
Para as fêmeas, a ANOVA de duas vias revelou efeito geral do tratamento sobre a locomoção horizontal ( $F_{(1,28)}=7,27$ ;  $p<0,01$ ) e frequência de levantar ( $F_{(1,28)}=9,32$ ;  $p<0,005$ ), indicando maior ativação psicomotora da cocaína em animais previamente expostos a esta droga do que em animais previamente expostos à salina. Além disso, foi observado um efeito geral da linhagem sobre a frequência de levantar ( $F_{(1,28)}=4,38$ ;  $p<0,05$ ), sendo que as ratas SHR fizeram este comportamento com mais frequência do que as LEW. A ANOVA de duas vias revelou uma interação significativa entre linhagem e tratamento ( $F_{(1,28)}=4,37$ ;  $p<0,05$ ) para os níveis de corticosterona. As comparações subsequentes indicaram que as

ratas LEW, mas não SHR, previamente expostas à cocaína exibiram maiores níveis de corticosterona do que as ratas LEW previamente expostas à salina ( $p < 0,01$ ).

A Figura 25 ilustra os resultados da atividade locomotora (locomoção horizontal e frequência de levantar) e dos níveis plasmáticos de corticosterona de ratos F4 (de acordo com a linhagem) de ambos os sexos (previamente expostos à salina ou cocaína) tratados com uma dose (10 mg/kg) desafio de cocaína. Para os machos, a ANOVA de três vias revelou efeito significativo do tratamento para a locomoção horizontal ( $F_{(1,44)}=12,18$ ;  $p < 0,001$ ), frequência de levantar ( $F_{(1,44)}=5,42$ ;  $p < 0,02$ ) e níveis de corticosterona ( $F_{(1,44)}=4,75$ ;  $p < 0,03$ ), sendo que nestes três parâmetros os animais previamente expostos à cocaína exibiram maiores índices dos que os animais previamente expostos à salina. Para as fêmeas, o mesmo perfil de respostas foi observado: efeito do tratamento para locomoção horizontal ( $F_{(1,46)}=18,10$ ;  $p < 0,0001$ ), frequência de levantar ( $F_{(1,46)}=7,02$ ;  $p < 0,01$ ) e níveis de corticosterona ( $F_{(1,46)}=5,40$ ;  $p < 0,02$ ).



**Figura 24-** Efeito de uma dose desafio de cocaína na locomoção horizontal (a), freqüência de levantar (b) e níveis plasmáticos de corticosterona (c) de ratos LEW e SHR de ambos os sexos previamente expostos à cocaína ou à salina. Nesta sessão, após 30 min de habituação, os animais foram retirados da caixa de atividade, injetados com cocaína (10 mg/kg) e a atividade psicomotora avaliada durante 50 min. <sup>#</sup> Indica efeito geral do tratamento (ANOVA,  $p < 0,05$ ). <sup>&</sup> Indica efeito geral da linhagem (ANOVA,  $p < 0,05$ ). <sup>\*</sup> Indica diferença significativa em relação ao respectivo grupo controle (ANOVA seguida do teste LSD,  $p < 0,05$ ).



**Figura 25-** Efeito de uma dose desafio de cocaína na locomoção horizontal (a), frequência de levantar (b) e níveis plasmáticos de corticosterona (c) de ratos F4 (de acordo com a linhagem) de ambos os sexos previamente expostos à cocaína ou à salina. Nesta sessão, após 30 min de habituação, os animais foram retirados da caixa de atividade, injetados com cocaína (10 mg/kg) e a atividade psicomotora avaliada durante 50 min. # Indica efeito geral do tratamento (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

## 8.4. DISCUSSÃO

Os resultados deste experimento confirmam que a exposição repetida à cocaína causa um aumento progressivo nas respostas comportamentais (i.e. desenvolvimento de sensibilização psicomotora) em ratos LEW e SHR de ambos os sexos. Este efeito foi persistente, considerando que os animais previamente expostos à cocaína exibiram maior aumento da locomoção após uma dose desafio da droga em relação aos animais previamente expostos à salina. Entretanto, o principal achado deste experimento foi a observação de que o tratamento repetido com cocaína induziu sensibilização do eixo HPA na linhagem LEW, mas não na linhagem SHR, verificado pelos níveis de corticosterona plasmática. Isto mostra que a sensibilização deste sistema está sob influência genética. Além disso, foi observado que as regiões genômicas *Ofil1* e *Ofil2* modulam significativamente o desenvolvimento de sensibilização psicomotora em machos e o efeito hiperlocomotor da cocaína em fêmeas, respectivamente.

A ocorrência de sensibilização comportamental é marcadamente influenciada pelas características do esquema de tratamento. Neste sentido, o tratamento intermitente com doses baixas ou moderadas de psicoestimulantes é mais efetivo em induzir sensibilização comportamental do que a exposição crônica a altas doses de droga (Post, 1980; Vanderschuren et al., 1997). Com base nestas informações, no presente estudo foi utilizado um esquema de tratamento intermitente com cocaína (10 mg/kg, i.p., a cada dois dias, durante 14 dias) que tem demonstrado induzir sensibilização comportamental em outras linhagens de ratos (Cailhol e Mormede, 1999; , 2000). Muitos pesquisadores nesta área distinguem duas fases no desenvolvimento e manutenção do processo de sensibilização: a

fase inicial de indução, na qual os animais são expostos repetidamente à droga e a fase subsequente de expressão, que ocorre após longos períodos de retirada da droga (Pierce e Kalivas, 1997; Vanderschuren e Kalivas, 2000).

No presente experimento, o tratamento agudo (sessão 1) com cocaína causou um pequeno aumento na locomoção horizontal, mas não na frequência de levantar, das fêmeas. O mesmo tratamento não afetou os parâmetros comportamentais para os machos. Isto mostra que a dose de cocaína utilizada pode ser considerada baixa. Entretanto, o tratamento repetido com cocaína induziu sensibilização comportamental em todos os grupos, como pode ser visto pelo aumento gradativo da locomoção horizontal e frequência de levantar dos animais tratados com cocaína. Este processo de sensibilização foi de igual magnitude no parâmetro de locomoção horizontal para os machos e nos dois parâmetros de atividade psicomotora para as fêmeas. Porém, foi observado que os ratos SHR exibiram maior frequência de levantar do que os ratos LEW. Estes resultados sugerem que os ratos SHR machos podem ser mais sensíveis às propriedades de sensibilização psicomotora da cocaína. Como pode ser visto, a maioria dos efeitos comportamentais da cocaína foram verificados no parâmetro de frequência de levantar em machos e locomoção horizontal em fêmeas. Existem evidências mostrando que a frequência de levantar é um parâmetro comportamental mais sensível a drogas psicoestimulantes do que a locomoção horizontal (Wultz et al., 1990), sugerindo que as fêmeas, em nosso estudo, foram mais sensíveis à cocaína do que os machos. Nenhuma diferença foi observada na locomoção dos animais tratados com salina, confirmando os resultados prévios obtidos na caixa de atividade (Capítulo 1).

Existem evidências mostrando que ratos LEW exibem maior sensibilização psicomotora do que ratos Fischer 344 (Kosten et al., 1994). Na verdade, os ratos Fischer



344 apresentam pouca sensibilidade a injeções repetidas de cocaína sobre os parâmetros de locomoção (Kosten et al., 1994; Ortiz et al., 1995). Foi observado também que os ratos SHR não diferem em relação à sensibilização comportamental induzida pela cocaína em comparação a ratos Wistar-Kyoto e Wistar-Kyoto hiperativo (Cailhol e Mormède, 2000). O presente estudo é o primeiro que compara as linhagens LEW e SHR diretamente em relação aos efeitos de hiperlocomoção da cocaína.

Quatorze dias após a última sessão de sensibilização (período sem droga), todos os animais, previamente expostos à cocaína ou salina, receberam uma dose desafio de cocaína e foram avaliados novamente quanto à sua locomoção e aos níveis de corticosterona plasmática. Como esperado, os animais que haviam sido previamente expostos à cocaína exibiram maior locomoção horizontal e frequência de levantar (i.e. expressão de sensibilização) do que os animais previamente expostos à salina. No entanto, apesar de haver uma tendência dos ratos LEW em exibir maior sensibilização comportamental do que os ratos SHR, nenhuma diferença entre as linhagens foi observada.

O resultado mais expressivo deste estudo foi o fato dos ratos LEW de ambos os sexos (“mais ansiosos” e mais reativos ao estresse em algumas situações (ver Capítulos 1 e 3), previamente expostos à cocaína, exibirem sensibilização da atividade do eixo HPA, evidenciado pelo aumento nos níveis de corticosterona destes animais em comparação aos ratos LEW que foram previamente expostos à salina e tratados com cocaína. O mesmo perfil de resultado, entretanto, não foi observado em ratos da linhagem SHR. Outros estudos evidenciaram sensibilização do eixo HPA através de injeções repetida de outras drogas com potencial de abuso (Cruz et al., 2005). Estes achados são bastante interessantes, pois apesar do claro envolvimento dos glicocorticóides em processos de dependência (Goeders e Guerin, 1996), estudos da contribuição genética sobre estes aspectos são

praticamente inexistentes.

Sabendo-se que os hormônios glicocorticóides parecem ser cruciais no desenvolvimento de outras psicopatologias como ansiedade e depressão (Parker et al., 2003), a seguinte hipótese pode ser formulada: a sensibilização do eixo HPA induzida por drogas em indivíduos predispostos poderia contribuir para desenvolvimento de comorbidades psiquiátricas frequentemente observadas em pacientes dependentes de droga. Estudos clínicos e epidemiológicos mostram que a ansiedade, por exemplo, pode levar à dependência, mas também a abstinência aguda ou tardia pode gerar ansiedade (Merikangas et al., 1997). Estudos visando a compreensão desta instigante relação de psicopatologias como causa ou efeito da dependência de drogas são claramente necessários. Um estudo está sendo realizado atualmente em nosso laboratório com a finalidade de verificar o efeito da administração crônica de corticosterona em parâmetros experimentais de ansiedade e depressão, assim como alguns parâmetros bioquímicos e moleculares potencialmente implicados nestas respostas.

Com relação ao envolvimento dos *loci Ofil1* e *Ofil2* nas respostas induzidas pela cocaína, foi observado que o locus *Ofil1* afetou o desenvolvimento de sensibilização comportamental induzida pela droga, verificado pela frequência de levantar em machos. Além disso, o locus *Ofil2* afetou a atividade psicomotora horizontal induzida pela cocaína em fêmeas.

Os ratos com alelos SHR em *Ofil1* exibiram um maior aumento na frequência de levantar do que os ratos com alelos LEW. Este efeito foi evidente a partir da quarta sessão de tratamento com cocaína. As respostas de sensibilização foram coerentes com as respostas observadas com as linhagens puras, i.e. alelos SHR neste locus aumentando e os alelos LEW reduzindo o traço. Quanto às fêmeas, as ratas com alelos LEW em *Ofil2*

exibiram maior locomoção horizontal induzida pela cocaína (verificada desde a primeira sessão) do que as ratas com alelos SHR, porém este locus não afetou o desenvolvimento de sensibilização nas fêmeas (ausência de interação *Ofil2* vs. tratamento vs. sessões). Em relação à dose desafio de cocaína, quatorze dias após a última injeção da droga, as regiões genômicas em questão não afetaram a expressão de sensibilização comportamental e neuroendócrina tanto em machos como em fêmeas.

Um elegante estudo realizado por (Phillips et al., 1998) descreve vários QTLs para atividade locomotora induzida por uma dose aguda de cocaína e para sensibilização em 25 linhagens de camundongos recombinantes. Eles observaram que os QTLs variavam conforme o esquema de tratamento (agudo vs. repetido) e também conforme a dose de cocaína. Alguns QTLs afetavam ambas as medidas, enquanto outros modulavam uma ou a outra medida, sugerindo que os substratos genéticos que controlam a atividade locomotora produzida por dose aguda de cocaína e a sensibilização são apenas parcialmente sobrepostos. Aquele estudo identificou um grande número de QTLs, refletindo a natureza poligênica destes fenótipos. Além disso, um grande número de genes candidatos foi identificado. O presente estudo é o primeiro a identificar QTLs afetando a atividade locomotora induzida por dose aguda de cocaína e sensibilização em ratos.

Em conclusão, os presentes resultados fornecem evidências da influência genética sobre a sensibilidade aos efeitos agudos de hiperlocomoção da cocaína e sobre a sensibilização comportamental e neuroendócrina produzida por injeções repetidas da droga. Mais especificamente, a linhagem de ratos LEW exibiu sensibilização comportamental e do eixo HPA, enquanto os ratos SHR exibiram apenas alterações comportamentais, sugerindo que este par de linhagens é particularmente útil para a investigação genética de alguns aspectos relacionados à dependência de drogas. Além disso, um ou mais genes que

modulam a sensibilização comportamental e o efeito hiperlocomotor agudo da cocaína (e possivelmente dependência de cocaína) residem nas regiões cromossômicas *Ofil1* e *Ofil2*, respectivamente.

## **9- DISCUSSÃO GERAL**

O objetivo principal do presente trabalho foi estudar a contribuição genética em uma variedade de respostas comportamentais, farmacológicas e hormonais relacionadas a reações de defesa e de dependência de drogas usando modelos animais. Para isto, foram utilizadas duas abordagens: a primeira consistiu na comparação direta de duas linhagens isogênicas de ratos, LEW e SHR, de ambos os sexos. Os indivíduos pertencentes a cada linhagem podem ser considerados geneticamente idênticos. Desta forma, se as duas linhagens forem criadas em um mesmo ambiente, as diferenças fenotípicas entre elas podem ser consideradas de origem genética. A segunda estratégia consistiu no estudo da influência de duas regiões genômicas, *Ofil1* (no cromossomo 4) e *Ofil2* (no cromossomo 7), através de uma seleção genética baseada em marcadores moleculares que flanqueavam estes dois QTLs. Esta técnica permitiu a produção de 4 novas linhagens de ratos (derivadas de um inter cruzamento entre ratos LEW e SHR) com o genótipo conhecido e contrastante somente para as duas regiões genômicas em questão. O resto do genoma consiste em uma recombinação aleatória de alelos de uma ou de outra linhagem parental (LEW ou SHR) que, teoricamente, não diferem estatisticamente. Portanto, as possíveis diferenças fenotípicas encontradas entre estas linhagens podem ser consideradas resultantes de variações alélicas (polimorfismos) dentro das duas regiões cromossômicas especificamente.

### 9.1. As linhagens LEW e SHR

Uma grande variedade de diferenças comportamentais e hormonais foi observada entre as linhagens isogênicas LEW e SHR. A Tabela 1 resume os principais resultados obtidos com estas linhagens.

**Tabela 1-** Resumo das principais respostas fenotípicas observadas em ratos LEW e SHR (independente do sexo).

	<i>LEWIS</i>	<i>SHR</i>
<b>Locomoção geral</b>		
<b>Comportamentos relacionados à ansiedade (CA, LCE, reflexo de sobressalto)</b>		>
<b>Consumo de sacarina, quinino e álcool</b>		<
<b>Inibição comportamental</b>		>
<b>Pressão arterial</b>		<
<b>Reatividade comportamental (analgesia) e do eixo HPA ao estresse (odor de um predador)</b>		
<b>Sensibilização psicomotora induzida por cocaína</b>		
<b>Sensibilização do eixo HPA induzida por cocaína</b>		>

CA: Campo aberto; LCE: Labirinto em cruz elevado.

Nossos resultados estão coerentes com estudos prévios (Ramos et al., 1997; 1998; 2002), demonstrando que ratos LEW de ambos os sexos exibem maiores níveis de comportamentos relacionados à ansiedade nos testes do campo aberto e labirinto em cruz elevado do que ratos SHR (Capítulo 1). Os resultados obtidos no teste de sobressalto acústico corroboram estes dados, demonstrando, pela primeira vez, que os ratos LEW são mais reativos ao reflexo de sobressalto induzido por um estímulo acústico do que os ratos

SHR (Capítulo 2). Embora os ratos LEW sejam considerados mais “ansiosos” e, segundo a literatura, predispostos ao consumo de drogas de abuso (Kosten et al., 1994), eles bebem pouco álcool. O presente estudo confirma e estende resultados prévios do nosso laboratório (Da Silva et al., 2004; 2005) demonstrando que os ratos LEW bebem menos álcool (forçado ou voluntariamente) do que os ratos SHR (Capítulo 1). Isto sugere que as linhagens LEW e SHR puras não constituem um bom modelo para o estudo da relação positiva entre os níveis de ansiedade e o consumo de álcool.

Algumas possibilidades têm sido propostas na tentativa de explicar este tipo de resultado. Em estudo recente do nosso laboratório, foi observado que os ratos SHR foram mais sensíveis aos efeitos desinibitórios (ansiolítico/estimulante) do álcool (Da Silva et al., 2005). Além disso, ratos SHR consomem maior quantidade de sacarina e quinino do que os ratos LEW, sugerindo que os ratos SHR podem ter maior atração por novos líquidos (propriedades de sabor e/ou de reforço pela novidade) (Da Silva et al., 2005). Como se pode observar na Figura 12 do Capítulo 1, os ratos SHR consumiram entre 200 e 300 % a mais de líquido em relação a sua ingestão de líquido normal quando a sacarina estava presente. Esta tendência de consumo de sacarina além dos limites do consumo normal de líquido é proposta como um modelo de características clínicas de perda de controle ou desejo por novidades (Kampov-Polevoy e Rezvani, 1997).

A linhagem SHR também é considerada como modelo genético de TDAH (Sagvolden et al., 2005), uma condição caracterizada por desatenção, impulsividade e hiperatividade. Estas características são consideradas como fatores de risco para o início prematuro do uso de drogas, incluindo álcool (Wilens et al., 1997). De forma interessante, foi observado no presente estudo que os ratos SHR apresentaram prejuízo nas respostas de inibição pelo pré-pulso (Capítulo 2). Isto sugere que os processos de inibição

comportamental são menos eficientes em ratos SHR do que em ratos LEW. Em humanos, o prejuízo nas respostas de inibição pelo pré-pulso é frequentemente observado em pacientes com transtornos de comportamento descontrolado como esquizofrenia e TDAH, provavelmente refletindo aspectos de impulsividade/desatenção. Ainda, a reduzida inibição comportamental (impulsividade) dos ratos SHR pode contribuir para o comportamento de risco destes animais em diversos testes comportamentais de ansiedade (e.g. maior aproximação/menor esquiva das áreas aversivas dos testes de ansiedade) (Capítulo 1). Entretanto, os resultados do Capítulo 2 sugerem que os ratos SHR combinam características de menor ansiedade (observado no teste do sobressalto acústico, no qual a atividade locomotora e a busca por novidade não representam um fator de confusão) e maior impulsividade (baixa inibição comportamental), em comparação com os ratos LEW.

Portanto, é possível sugerir que a combinação de fatores como a maior sensibilidade aos efeitos desinibitórios do álcool (ansiolítico/estimulante), a atração por novidades (alto consumo de novos líquidos) e a baixa inibição comportamental (impulsividade/desatenção) exibidos por ratos SHR podem constituir fatores genéticos preditivos e correlacionados ao maior consumo de álcool destes animais. Estes resultados corroboram a sugestão de que os ratos SHR poderiam constituir um modelo animal para o estudo do alcoolismo do Tipo 2 (Da Silva et al., 2005). De acordo com Cloninger (1987), os alcoolistas do Tipo 1 seriam aqueles indivíduos com baixo grau de desejo por novidades, alto grau de esquiva de ambientes novos e aversivos. Os alcoolistas do Tipo 2 apresentariam alto desejo por novidades e comportamento de risco. Obviamente, é preciso ter cautela nestas suposições, pois não se sabe ainda se as características dos ratos SHR acima descritas são geneticamente ligadas ao consumo de álcool, ou se são apenas relações casuais. Estudos adicionais são necessários para consolidar esta hipótese.



Um resultado um pouco inesperado no presente estudo foi a falta de diferenças comportamentais e neuroendócrinas entre ratos LEW e SHR quando expostos ao estresse do odor de um predador. Este tipo de estresse foi escolhido com base no fato de que a exposição ao TMT, além dos efeitos já mencionados no Capítulo 3, também produz ativação e liberação de dopamina em estruturas mesocorticolímbicas e interação cruzada com cocaína (Morrow et al., 2000; Wu et al., 2003), podendo, portanto, fornecer pistas sobre a sensibilidade a drogas dos animais. A exposição ao TMT, um componente químico volátil das fezes de raposa, induziu analgesia e aumento nas concentrações plasmáticas de corticosterona em nível similar nas duas linhagens. Considerando que a ansiedade pode modular a reatividade ao estresse (Harris, 1996), poder-se-ia esperar que as linhagens LEW e SHR exibissem respostas diferenciadas quando expostas ao estresse de um odor de predador. No entanto, estes resultados estão de acordo com a idéia multidimensional da emocionalidade (Ramos e Mormède, 1998), que prediz que diferentes situações de estresse podem produzir “fenômenos psicológicos” distintos. Tem sido proposto que o odor de predadores induz medo inato em roedores. O tratamento farmacológico com ansiolíticos clássicos (e.g. benzodiazepínicos), que possuem efeito em modelos de ansiedade generalizada (e.g. campo aberto ou labirinto em cruz elevado), não é efetivo em reduzir comportamentos defensivos produzidos pelo TMT (Blanchard et al., 2003).

O objetivo da última etapa do nosso estudo foi verificar se os ratos LEW e SHR seriam igualmente sensíveis ao teste de sensibilização induzida pela cocaína (Capítulo 4). Robinson e Berridge (1993) propõem que este fenômeno está ligado ao desenvolvimento de dependência, pois a sensibilização induzida pela exposição repetida a drogas está associada a neuroadaptações em estruturas mesocorticolímbicas.

Ratos LEW e SHR exibiram magnitude similar de sensibilização pela cocaína durante o período de desenvolvimento deste processo. Entretanto, após um período de 14 dias de abstinência de cocaína, a re-exposição dos animais à droga induziu a expressão de sensibilização comportamental, evidenciando o caráter persistente deste fenômeno. O resultado mais importante foi a observação de que os ratos LEW exibiram sensibilização do eixo HPA, mas não os ratos SHR. Isto demonstra que a sensibilização do eixo HPA pela cocaína está sob controle genético. Como sugerido por um grande número de pesquisas e descrito na introdução, os hormônios glicocorticóides estão envolvidos na determinação da propensão de um indivíduo em desenvolver dependência (Piazza e Le Moal, 1997; Goeders e Guerin, 1996). Uma hiperatividade funcional de glicocorticóides também é frequentemente encontrada em indivíduos com alta vulnerabilidade a drogas (Piazza e Le Moal, 1997) ou expostos cronicamente ao estresse. Além disso, sabe-se que na fase de abstinência de droga em indivíduos dependentes os níveis de ansiedade são cruciais na recaída ao consumo da droga. A liberação de glicocorticóides promovida por pistas visuais associadas à droga parece constituir um sinal para gerar ansiedade e fissura.

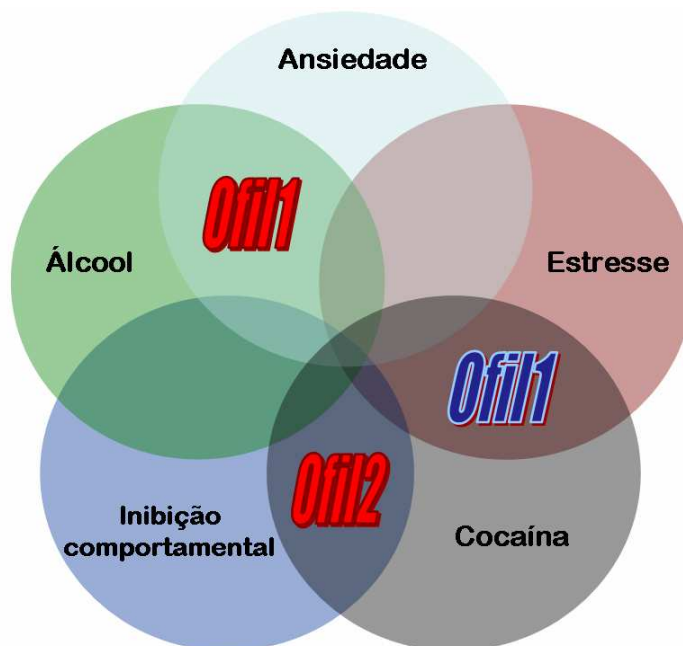
Os hormônios glicocorticóides também estão implicados no desenvolvimento de transtornos psiquiátricos como ansiedade e depressão. Portanto, na relação da ansiedade como causa/efeito em processos de dependência, pode-se sugerir que a sensibilização do eixo HPA seria importante no desenvolvimento da ansiedade em indivíduos que fizeram ou fazem uso repetido de drogas. Neste contexto, os ratos LEW seriam interessantes para a investigação do componente genético envolvido nestas relações. Um experimento com tratamento crônico com corticosterona está sendo realizado em nosso laboratório com o objetivo de verificar se este tratamento farmacológico é capaz de produzir comportamentos do tipo-ansio gênico e/ou do tipo-depressivo nestes animais.

Como sugerido por (Wilson et al., 1997), o controle genético do efeito de drogas de abuso pode depender do teste comportamental utilizado. Por exemplo, foi demonstrado que o consumo operante de álcool, no qual o animal precisa pressionar uma barra para receber o reforço, é alto em ratos LEW (Suzuki et al., 1988), mas no teste de consumo voluntário com duas garrafas estes animais bebem pouco álcool (Capítulo 1). O consumo voluntário de álcool é uma resposta ativa que poderia modular o “gostar” (Berridge, 2004), em que o animal beberia álcool para experimentar seu valor hedônico (prazer). Por outro lado, tem sido sugerido que os processos de sensibilização comportamental podem envolver sensibilização do “querer” (Robinson e Berridge, 1993). Este assunto ainda é tema de debates (Ahmed e Cador, 2006), de qualquer forma pode-se propor que o consumo voluntário de álcool e a sensibilização produzida pela cocaína estão sob controles genéticos distintos. Portanto, o fato dos ratos LEW beberem pouco álcool, mas serem mais sensíveis aos efeitos da cocaína sobre o eixo HPA em comparação aos ratos SHR não é surpreendente e sugere que este par de linhagens pode ser utilizado no estudo de diferentes aspectos relacionados à dependência de drogas.

## **9.2. Efeito dos loci *Ofil1* e *Ofil2***

O estudo da influência das regiões genômicas, *Ofil1* (no cromossomo 4) e *Ofil2* (no cromossomo 7) (Ramos et al., 1999), em respostas relacionadas a reações de defesa e de dependência de drogas constituía outro objetivo do presente estudo. O locus *Ofil1* afetou simultaneamente a locomoção central no teste do campo aberto e consumo de álcool em ratas. Ainda em fêmeas, o locus *Ofil2* afetou a inibição comportamental e a sensibilidade ao efeito hiperlocomotor da cocaína. Em machos, foi verificado que *Ofil1* afetou

concomitantemente os parâmetros comportamentais e neuroendócrinos avaliados após o estresse de um predador e o desenvolvimento de sensibilização psicomotora induzida pela cocaína. O resumo da influência dos *loci Ofil1* e *Ofil2* sobre repostas comportamentais e neuroendócrinas estão ilustradas na Figura 26.



**Figura 26-** Diagrama esquemático dos efeitos dos *loci Ofil1* e *Ofil2*. Ansiedade: comportamentos relacionados à ansiedade no teste do campo aberto; Álcool: consumo voluntário de álcool; Inibição comportamental: níveis de inibição pelo pré-pulso; Cocaína: efeito hiperlocomotor ou de sensibilização; Estresse: analgesia ou aumento de corticosterona plasmática induzida pelo TMT. *Ofil1* em azul corresponde a efeitos observados em machos. *Ofil1* e *Ofil2* em vermelho correspondem a efeitos observados em fêmeas. Como pode ser observado, *Ofil1* e *Ofil2* estão localizados na intersecção do diagrama, mostrando que os respectivos QTLs exerceram influência em mais de um fenótipo.

O efeito de *Ofil1* sobre a locomoção central no campo aberto e o consumo de álcool sugere uma relação positiva entre comportamentos relacionados à ansiedade e consumo de álcool em fêmeas (Capítulo 1). Confirmando estudos prévios (Ramos et al., 1999), os

resultados do presente estudo demonstraram claramente que os animais cujos alelos eram LEW em *Ofill* exibiram maior locomoção central no campo aberto do que os animais com alelos SHR. Este locus, no entanto, não afetou a locomoção periférica no campo aberto nem a locomoção em um ambiente menos desafiador (locomoção em caixas de atividade), o que estaria coerente com o seu perfil específico relacionado à “ansiedade”. De maneira interessante, *Ofill* também afetou o consumo de álcool em fêmeas. Neste sentido, é importante destacar que os animais com alelos LEW para este locus (menores níveis de comportamentos relacionados à ansiedade) também consumiram menos álcool do que os animais com os alelos SHR em *Ofill*. Ao contrário do que foi observado nas linhagens parentais, em que ratos SHR (considerados menos “ansiosos”) consomem mais álcool do que ratos LEW, a utilização desta estratégia de seleção genética favorece o estudo da relação positiva ansiedade vs. consumo de álcool. A identificação de outros QTLs na mesma região do cromossomo 4 afetando o consumo de álcool em outros pares de linhagens de ratos (Carr et al., 1998; Terenina-Rigaldie et al., 2003ab) torna esta região particularmente promissora para a identificação de genes com efeito sobre o consumo de álcool e sua relação com os níveis de ansiedade (efeito pleiotrópico).

De acordo com a hipótese de redução de tensão (Conger, 1956), os indivíduos com altos níveis de ansiedade seriam mais vulneráveis à iniciação e à manutenção do consumo de álcool pela busca do efeito ansiolítico desta substância. Na clínica, as taxas de comorbidade entre transtornos de ansiedade e alcoolismo são excepcionalmente altas (extrapolando a probabilidade de ocorrência ao acaso). Esta relação provavelmente reflete a sobreposição de fatores biológicos, porém estes aspectos são frequentemente negligenciados na clínica, o que torna o diagnóstico e tratamento dos “alcoolistas ansiosos”

particularmente ineficientes. As bases moleculares envolvidas nestes processos são muito pouco compreendidas devido, em parte, à falta de modelos animais adequados.

O locus *Ofil2* não exibiu o efeito esperado sobre a locomoção central no campo aberto, mas modulou a inibição comportamental de fêmeas avaliadas no teste de inibição do sobressalto acústico pelo pré-pulso (Capítulo 2). Todavia, este locus não afetou os níveis basais de sobressalto acústico. Mormède e colaboradores (2002) relataram que ratos “High-line” (que correspondem a ratos L4/S7 no presente estudo), que fizeram mais cruzamentos no centro do campo aberto (“menos ansiosos”) do que os ratos da linhagem “Low-line” (correspondendo a ratos S4/L7), também exibiram menores níveis de inibição comportamental. Estes resultados conduziram os autores a sugerirem que as diferenças destas linhagens em relação à locomoção em ambientes aversivos poderia estar relacionada com diferenças em processos de inibição comportamental (impulsividade). Os resultados do presente estudo permitiram dissociar as respectivas influências de *Ofil1* e *Ofil2*, revelando que as ratas com alelos SHR em *Ofil2* exibiram menores níveis de inibição pelo pré-pulso do que as ratas com alelos LEW. Desta forma é possível concluir que as diferenças de impulsividade observadas por Mormède e colaboradores (2002) foram produzidas por *Ofil2* e não por *Ofil1*. Estes dados ainda reforçam a especificidade de *Ofil1* sobre comportamentos relacionados à ansiedade.

Até o presente momento somente um estudo identificou QTLs modulando inibição do sobressalto acústico pelo pré-pulso em ratos. Palmer e colaboradores (2003) encontraram um QTL significante no cromossomo 2 e outro sugestivo no cromossomo 18. Portanto, o presente estudo adiciona informação relatando um QTL no cromossomo 7 afetando a inibição pelo pré-pulso em fêmeas. *Ofil2* modulou ainda a sensibilidade ao efeito

hiperlocomotor da cocaína em fêmeas. As ratas com o genótipo LEW neste locus exibiram maior sensibilidade ao efeito da cocaína.

As duas regiões genômicas, foco do presente estudo, não afetaram o comportamento dos ratos machos no teste do campo aberto, labirinto em cruz elevado, consumo de álcool, reflexo do sobressalto e inibição pelo pré-pulso. No entanto, foi verificado que *Ofil1* afetou significativamente a reatividade comportamental e neuroendócrina induzida pela exposição dos ratos ao odor de um predador (Capítulo 3). Foi observado que os ratos com alelos LEW em *Ofil1* exibiram maior analgesia induzida pelo TMT, mas, em contraposição, menores níveis de corticosterona do que os animais com alelos SHR. Este é o primeiro estudo a revelar um QTL para analgesia induzida pelo estresse em ratos. Nossos dados ainda reforçam os resultados publicados recentemente por Potenza e colaboradores (2004) onde foi identificado um QTL na mesma região de *Ofil1* afetando os níveis de corticosterona (avaliados no fim de tarde) de ratos machos em um cruzamento entre as linhagens LEW vs. Fischer 344. Apesar destas duas variáveis refletirem aspectos relacionados à reatividade ao estresse (Mogil, 1999; Mormede et al., 2002a), vários estudos mostram que as respostas comportamentais e neuroendócrinas podem ser dissociadas e moduladas por diferentes substratos biológicos (File et al., 1993b). Levando em consideração o fato de que praticamente todas as drogas com potencial de abuso possuem efeitos analgésicos, o que sugere a sobreposição de mecanismos neurobiológicos (Franklin, 1998), e da estreita relação do eixo HPA vs. drogas de abuso (particularmente para psicoestimulantes), nossa hipótese é que estas regiões genômicas poderiam potencialmente modular respostas induzidas pela cocaína.

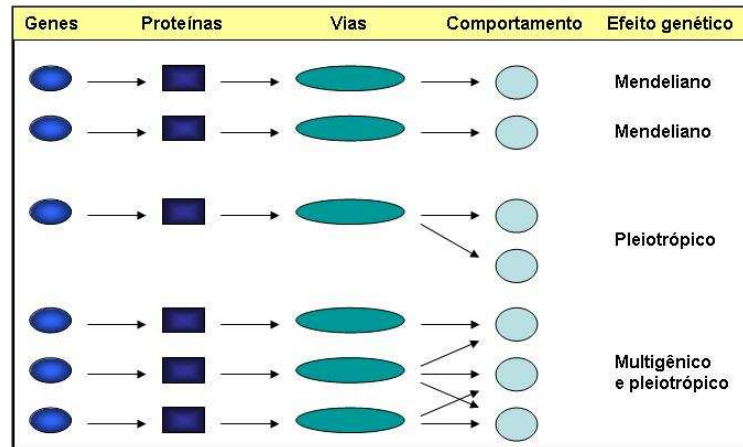
Confirmando nossas expectativas, *Ofil1* afetou o desenvolvimento de sensibilização psicomotora pela cocaína (Capítulo 4). De forma coerente, os animais que exibiram

maiores níveis de corticosterona no fim de tarde e pós-estresse (ratos com alelos SHR em *Ofil1*) também exibiram comportamento de levantar com mais frequência durante o processo de desenvolvimento da sensibilização à cocaína.

Os QTLs estudados no presente trabalho são regiões relativamente grandes e com um grande número de genes potencialmente capazes de influenciar os fenótipos analisados. A maior parte dos efeitos comportamentais observados no presente estudo foi decorrente de *Ofil1*. Os genes que codificam para o neuropeptídeo Y, para  $\alpha$ -sinucleína (modulador do sistema de dopamina), para os receptores NK1 da substância P e para a subunidade 2B do receptor NMDA do glutamato já foram mapeados e situam-se na vizinhança ou dentro de *Ofil1* (detalhes das posições de mapa podem ser encontrados no sítio Rat genome database da internet, <http://rgd.mcw.edu/>). Sendo assim, devido à sua localização no genoma e às suas funções comportamentais (Liang et al., 2003; Pandey et al., 2005; Spanagel et al., 2005; Vendruscolo et al., 2003), estes genes podem ser considerados candidatos potenciais para a predisposição genética de ratos a exibirem maior ou menor nível de ansiedade, consumo de álcool, níveis de corticosterona e sensibilidade à cocaína. Alguns estudos recentes mostram que os ratos LEW têm menores níveis de expressão do gene do neuropeptídeo Y no hipocampo em relação aos ratos SHR. A expressão do gene *Grin2b* (codifica para a subunidade 2B do receptor NMDA) no hipocampo ou hipotálamo não foi diferente entre as linhagens (Izídio, 2005). A investigação aprofundada da expressão de genes, como estes acima descritos ou outros, em regiões do cérebro de ratos LEW e SHR, constituiria uma abordagem importante para o entendimento das bases genéticas da relação entre ansiedade e alcoolismo, níveis de corticosterona e sensibilidade aos efeitos da cocaína, etc.



É preciso enfatizar que o fato de um mesmo locus estar influenciando diferentes traços não significa necessariamente que eles estejam sob o controle do(s) mesmo(s) gene(s), pois genes vizinhos podem modular independentemente diferentes traços. A Figura 27 mostra as possibilidades de ação das regiões *Ofil1* e *Ofil2* em mais de um fenótipo.



**Figura 27-** Esquema didático dos possíveis efeitos de genes contidos em *Ofil1* e *Ofil2*. Os genes através de suas expressões levam à síntese de proteínas específicas. Estas proteínas participam de numerosos eventos celulares e em vias cerebrais que acabam modulando o comportamento (ansiedade, reatividade ao estresse e drogas). A figura apresenta três tipos de ação genética: i) genes afetando essencialmente um único fenótipo (ou comportamento) (herança mendeliana); ii) um único gene afetando, por mecanismos biológicos comuns, mais de um fenótipo (efeito pleiotrópico); iii) mais de um gene afetando o mesmo fenótipo, e também um único gene afetando mais de um fenótipo (multigênico e pleiotrópico). Adaptado de (Lovinger e Crabbe, 2005).

Para finalizar, a estratégia de seleção baseada em marcadores constitui uma ferramenta única para a confirmação de QTLs e permite o estudo amplo das regiões de interesse em qualquer fenótipo desejado. Confirmar, estender e compreender melhor o efeito de QTLs é uma etapa importante e necessária na busca de genes que controlam fenótipos complexos.

## 10- CONCLUSÕES

Em conjunto, os resultados do presente estudo levam a duas conclusões principais:

- 1) A ampla caracterização fenotípica das linhagens isogênicas de ratos LEW e SHR sugere que este par de linhagens exhibe perfis “psiconeuroendócrinos” distintos sendo, portanto, úteis no estudo genético de uma variedade de respostas comportamentais e fisiológicas relacionadas às reações de defesa e de dependência de drogas. Estas linhagens também podem favorecer o estudo de algumas com possíveis relações genéticas: i) Ratos SHR: níveis de inibição comportamental, consumo de álcool e sensibilidade aos efeitos de hiperlocomoção da cocaína; ii) Ratos LEW: níveis de ansiedade e efeitos da cocaína sobre o eixo HPA.
  
- 2) A dissecação das regiões *Ofil1* e *Ofil2* pode ser promissora na identificação de gene(s) e produto(s) gênico(s) influenciando respostas relacionadas às reações de defesa e de dependência de drogas. Os resultados do presente estudo ainda corroboram a hipótese de que diferentes fenótipos podem estar sob a influência de mecanismos genéticos comuns. Além disso, a ação de uma região genômica sobre um determinado fenótipo é dependente do sexo. Estes resultados ressaltam, acima de tudo, a complexidade da influência genética sobre o comportamento, provavelmente envolvendo interações entre genes, gênero e ambiente.

## 11- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agatsuma S, Hiroi N (2004) [Genetic basis of drug dependence and comorbid behavioral traits]. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi* 24: 137-45.
- Ahmed SH, Cador M (2006) Dissociation of psychomotor sensitization from compulsive cocaine consumption. *Neuropsychopharmacology* 31: 563-71.
- Allan CA (1995) Alcohol problems and anxiety disorders--a critical review. *Alcohol Alcohol* 30: 145-51.
- Anagnostaras SG, Craske MG, Fanselow MS (1999) Anxiety: at the intersection of genes and experience. *Nat Neurosci* 2: 780-2.
- Angrini M, Leslie JC, Shephard RA (1998) Effects of propranolol, buspirone, pCPA, reserpine, and chlordiazepoxide on open-field behavior. *Pharmacol Biochem Behav* 59: 387-97.
- Arnold AP (1996) Genetically triggered sexual differentiation of brain and behavior. *Horm Behav* 30: 495-505.
- Asherson P (2004) Attention-Deficit Hyperactivity Disorder in the post-genomic era. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 13 Suppl 1: I50-70.
- Bardo MT, Donohew RL, Harrington NG (1996) Psychobiology of novelty seeking and drug seeking behavior. *Behav Brain Res* 77: 23-43.
- Barkley RA (1999) Theories of attention-deficit/hyperactivity disorder. Kluwer Academic/Plenum, Kluwer Academic/Plenum.
- Bebbington PE, Dunn G, Jenkins R, Lewis G, Brugha T, Farrell M, Meltzer H (1998) The influence of age and sex on the prevalence of depressive conditions: report from the National Survey of Psychiatric Morbidity. *Psychol Med* 28: 9-19.
- Belknap JK, Richards SP, O'Toole LA, Helms ML, Phillips TJ (1997) Short-term selective breeding as a tool for QTL mapping: ethanol preference drinking in mice. *Behav Genet* 27: 55-66.
- Berridge KC (2004) Motivation concepts in behavioral neuroscience. *Physiol Behav* 81: 179-209.
- Berton O, Aguerre S, Sarrieau A, Mormede P, Chaouloff F (1998) Differential effects of social stress on central serotonergic activity and emotional reactivity in Lewis and spontaneously hypertensive rats. *Neuroscience* 82: 147-59.

- Berton O, Ramos A, Chaouloff F, Mormde P (1997) Behavioral reactivity to social and nonsocial stimulations: a multivariate analysis of six inbred rat strains. *Behav Genet* 27: 155-66.
- Biederman J, Faraone SV, Spencer T, Wilens T, Mick E, Lapey KA (1994) Gender differences in a sample of adults with attention deficit hyperactivity disorder. *Psychiatry Res* 53: 13-29.
- Biederman J, Wilens T, Mick E, Faraone SV, Weber W, Curtis S, Thornell A, Pfister K, Jetton JG, Soriano J (1997) Is ADHD a risk factor for psychoactive substance use disorders? Findings from a four-year prospective follow-up study. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 36: 21-9.
- Blanchard D, Griebel G, Blanchard R (1995) Gender bias in the preclinical psychopharmacology of anxiety: male models for (predominantly) female disorders. *J Psychopharmacol* 9: 79-82.
- Blanchard DC, Griebel G, Blanchard RJ (2003) Conditioning and residual emotionality effects of predator stimuli: some reflections on stress and emotion. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 27: 1177-85.
- Bowen RC, D'Arcy C, Keegan D, Senthilselvan A (2000) A controlled trial of cognitive behavioral treatment of panic in alcoholic inpatients with comorbid panic disorder. *Addict Behav* 25: 593-7.
- Braff DL, Geyer MA, Light GA, Sprock J, Perry W, Cadenhead KS, Swerdlow NR (2001) Impact of prepulse characteristics on the detection of sensorimotor gating deficits in schizophrenia. *Schizophr Res* 49: 171-8.
- Braff DL, Grillon C, Geyer MA (1992) Gating and habituation of the startle reflex in schizophrenic patients. *Arch Gen Psychiatry* 49: 206-15.
- Busto UE (2000) Pharmacogenetics of alcohol: treatment implications. *Alcohol Clin Exp Res* 24: 1323-6.
- Cailhol S, Mormede P (1999) Strain and sex differences in the locomotor response and behavioral sensitization to cocaine in hyperactive rats. *Brain Res* 842: 200-5.
- Cailhol S, Mormede P (2000) Effects of cocaine-induced sensitization on ethanol drinking: sex and strain differences. *Behav Pharmacol* 11: 387-94.
- Carr LG, Foroud T, Bice P, Gobbett T, Ivashina J, Edenberg H, Lumeng L, Li TK (1998) A quantitative trait locus for alcohol consumption in selectively bred rat lines. *Alcohol Clin Exp Res* 22: 884-7.

- Castellanos FX, Fine EJ, Kaysen D, Marsh WL, Rapoport JL, Hallett M (1996) Sensorimotor gating in boys with Tourette's syndrome and ADHD: preliminary results. *Biol Psychiatry* 39: 33-41.
- Cloninger CR (1987) Neurogenetic adaptive mechanisms in alcoholism. *Science* 236: 410-6.
- Cloninger CR, Bohman M, Sigvardsson S (1981) Inheritance of alcohol abuse. Cross-fostering analysis of adopted men. *Arch Gen Psychiatry* 38: 861-8.
- Conger JJ (1956) Alcoholism: theory, problem and challenge. II. Reinforcement theory and the dynamics of alcoholism. *Q J Stud Alcohol* 17: 296-305.
- Cox BJ, Norton GR, Swinson RP, Endler NS (1990) Substance abuse and panic-related anxiety: a critical review. *Behav Res Ther* 28: 385-93.
- Crawley JN, Belknap JK, Collins A, Crabbe JC, Frankel W, Henderson N, Hitzemann RJ, Maxson SC, Miner LL, Silva AJ, Wehner JM, Wynshaw-Boris A, Paylor R (1997) Behavioral phenotypes of inbred mouse strains: implications and recommendations for molecular studies. *Psychopharmacology (Berl)* 132: 107-24.
- Cruz FC, Delucia R, Planeta CS (2005) Differential behavioral and neuroendocrine effects of repeated nicotine in adolescent and adult rats. *Pharmacol Biochem Behav* 80: 411-7.
- Da Silva GE, Ramos A, Takahashi RN (2004) Comparison of voluntary ethanol intake by two pairs of rat lines used as genetic models of anxiety. *Braz J Med Biol Res* 37: 1511-7.
- Da Silva GE, Vendruscolo LF, Takahashi RN (2005) Effects of ethanol on locomotor and anxiety-like behaviors and the acquisition of ethanol intake in Lewis and spontaneously hypertensive rats. *Life Sci* 77: 693-706.
- Darvasi A (2005) Dissecting complex traits: the geneticists' "Around the world in 80 days". *Trends Genet* 21: 373-6.
- Dauids E, Gastpar M (2003) [Attention-deficit/hyperactivity disorder and substance abuse]. *Psychiatr Prax* 30: 182-6.
- Dauids E, Zhang K, Tarazi FI, Baldessarini RJ (2003) Animal models of attention-deficit hyperactivity disorder. *Brain Res Brain Res Rev* 42: 1-21.
- Davis M (1998) Are different parts of the extended amygdala involved in fear versus anxiety? *Biol Psychiatry* 44: 1239-47.

- Dias Soares D, Fernandez F, Aguerre S, Foury A, Mormede P, Chaouloff F (2003) Fox odour affects corticosterone release but not hippocampal serotonin reuptake and open field behaviour in rats. *Brain Res* 961: 166-70.
- Dielenberg RA, McGregor IS (2001) Defensive behavior in rats towards predatory odors: a review. *Neurosci Biobehav Rev* 25: 597-609.
- Douglas VI (1999) control processes in attention-deficit/hyperactivity disorder. . Kluwer Academic/Plenum, Kluwer Academic/Plenum.
- Downs AW, Eddy NB (1932) The effect of repeated doses of cocaine on the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 46: 199-200.
- Driessen M, Meier S, Hill A, Wetterling T, Lange W, Junghanns K (2001) The course of anxiety, depression and drinking behaviours after completed detoxification in alcoholics with and without comorbid anxiety and depressive disorders. *Alcohol Alcohol* 36: 249-55.
- Duclos M, Martin C, Malgat M, Mazat JP, Chaouloff F, Mormede P, Letellier T (2001) Relationships between muscle mitochondrial metabolism and stress-induced corticosterone variations in rats. *Pflugers Arch* 443: 218-26.
- Endres T, Apfelbach R, Fendt M (2005) Behavioral changes induced in rats by exposure to trimethylthiazoline, a component of fox odor. *Behav Neurosci* 119: 1004-10.
- Enoch MA, Goldman D (2001) The genetics of alcoholism and alcohol abuse. *Curr Psychiatry Rep* 3: 144-51.
- Ezzati M, Lopez AD, Rodgers A, Vander Hoorn S, Murray CJ (2002) Selected major risk factors and global and regional burden of disease. *Lancet* 360: 1347-60.
- Fahlke C, Hansen S (1999) Effect of local intracerebral corticosterone implants on alcohol intake in the rat. *Alcohol Alcohol* 34: 851-61.
- Fendt M, Endres T, Lowry CA, Apfelbach R, McGregor IS (2005) TMT-induced autonomic and behavioral changes and the neural basis of its processing. *Neurosci Biobehav Rev* 29: 1145-56.
- Ferraro TN, Carrozza DP, Vogel WH (1991) In vivo microdialysis study of brain ethanol concentrations in rats following oral self-administration. *Alcohol Clin Exp Res* 15: 504-7.
- File SE, Zangrossi H, Jr., Andrews N (1993a) Novel environment and cat odor change GABA and 5-HT release and uptake in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 45: 931-4.

- File SE, Zangrossi H, Jr., Sanders FL, Mabbutt PS (1993b) Dissociation between behavioral and corticosterone responses on repeated exposures to cat odor. *Physiol Behav* 54: 1109-11.
- Fisher CE, Hughes RN (1996) Effects of diazepam and cyclohexyladenosine on open-field behavior in rats perinatally exposed to caffeine. *Life Sci* 58: 701-9.
- Flint J (2003) Analysis of quantitative trait loci that influence animal behavior. *J Neurobiol* 54: 46-77.
- Flint J, Valdar W, Shifman S, Mott R (2005) Strategies for mapping and cloning quantitative trait genes in rodents. *Nat Rev Genet* 6: 271-86.
- Franklin KB (1998) Analgesia and abuse potential: an accidental association or a common substrate? *Pharmacol Biochem Behav* 59: 993-1002.
- Gianoulakis C (2001) Influence of the endogenous opioid system on high alcohol consumption and genetic predisposition to alcoholism. *J Psychiatry Neurosci* 26: 304-18.
- Goeders NE (2002) Stress and cocaine addiction. *J Pharmacol Exp Ther* 301: 785-9.
- Goeders NE, Guerin GF (1996) Role of corticosterone in intravenous cocaine self-administration in rats. *Neuroendocrinology* 64: 337-48.
- Goeldner FO, Pigatto G, Ribeiro AF, Machado HB, Boerngen-Lacerda R (2005) Influence of fluoxetine and paroxetine in behavioral sensitization induced by ethanol in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 82: 388-96.
- Gomez F, De Kloet ER, Armario A (1998) Glucocorticoid negative feedback on the HPA axis in five inbred rat strains. *Am J Physiol* 274: R420-7.
- Goodwin DW, Schulsinger F, Hermansen L, Guze SB, Winokur G (1973) Alcohol problems in adoptees raised apart from alcoholic biological parents. *Arch Gen Psychiatry* 28: 238-43.
- Grant BF, Harford TC (1995) Comorbidity between DSM-IV alcohol use disorders and major depression: results of a national survey. *Drug Alcohol Depend* 39: 197-206.
- Grillon C, Dierker L, Merikangas KR (1997) Startle modulation in children at risk for anxiety disorders and/or alcoholism. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 36: 925-32.
- Hall CS (1934) Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *J Comp Psychol* 18: 385-403.

- Handley SL, McBlane JW (1993) An assessment of the elevated X-maze for studying anxiety and anxiety-modulating drugs. *J Pharmacol Toxicol Methods* 29: 129-38.
- Hard E, Carlsson SG, Jern S, Larsson K, Lindh AS, Svensson L (1985) Behavioral reactivity in spontaneously hypertensive rats. *Physiol Behav* 35: 487-92.
- Harris EL, Noyes R, Jr., Crowe RR, Chaudhry DR (1983) Family study of agoraphobia. Report of a pilot study. *Arch Gen Psychiatry* 40: 1061-4.
- Harris JA (1996) Descending antinociceptive mechanisms in the brainstem: their role in the animal's defensive system. *J Physiol Paris* 90: 15-25.
- Hawk LW, Jr., Yartz AR, Pelham WE, Jr., Lock TM (2003) The effects of methylphenidate on prepulse inhibition during attended and ignored prestimuli among boys with attention-deficit hyperactivity disorder. *Psychopharmacology (Berl)* 165: 118-27.
- Heiser P, Friedel S, Dempfle A, Konrad K, Smidt J, Grabarkiewicz J, Herpertz-Dahlmann B, Remschmidt H, Hebebrand J (2004) Molecular genetic aspects of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Neurosci Biobehav Rev* 28: 625-41.
- Helmstetter FJ (1993) Stress-induced hypoalgesia and defensive freezing are attenuated by application of diazepam to the amygdala. *Pharmacol Biochem Behav* 44: 433-8.
- Henniger MS, Spanagel R, Wigger A, Landgraf R, Holter SM (2002) Alcohol self-administration in two rat lines selectively bred for extremes in anxiety-related behavior. *Neuropsychopharmacology* 26: 729-36.
- Hettema JM, Neale MC, Kendler KS (2001) A review and meta-analysis of the genetic epidemiology of anxiety disorders. *Am J Psychiatry* 158: 1568-78.
- Hogg S (1996) A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 54: 21-30.
- Hrubec Z, Omenn GS (1981) Evidence of genetic predisposition to alcoholic cirrhosis and psychosis: twin concordances for alcoholism and its biological end points by zygosity among male veterans. *Alcohol Clin Exp Res* 5: 207-15.
- Izídio GS (2005) A influência de fatores genéticos e ambientais em modelos animais de ansiedade e sua relação com um modelo de alcoolismo. Dissertação de mestrado em Farmacologia. Programa de pós-graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina. Orientador: Prof. A. Ramos
- Jiang C, Zeng ZB (1997) Mapping quantitative trait loci with dominant and missing markers in various crosses from two inbred lines. *Genetica* 101: 47-58.



- Joober R, Zarate J-M, Rouleau G-A, Skamene E, Boksa P (no prelo) Provisional mapping of quantitative trait loci modulating the acoustic startle response and prepulse inhibition of acoustic startle. *Neuropsychopharmacology*.
- Kalivas PW, Duffy P (1990) Effect of acute and daily cocaine treatment on extracellular dopamine in the nucleus accumbens. *Synapse* 5: 48-58.
- Kalivas PW, Stewart J (1991) Dopamine transmission in the initiation and expression of drug- and stress-induced sensitization of motor activity. *Brain Res Brain Res Rev* 16: 223-44.
- Kampov-Polevoy AB, Rezvani AH (1997) Fluoxetine reduces saccharin-induced elevation of fluid intake in alcohol-preferring Fawn-Hooded rats. *Pharmacol Biochem Behav* 58: 51-4.
- Kandel DB, Davies M (1982) Epidemiology of depressive mood in adolescents: an empirical study. *Arch Gen Psychiatry* 39: 1205-12.
- Kendler KS (2001) Twin studies of psychiatric illness: an update. *Arch Gen Psychiatry* 58: 1005-14.
- Kendler KS, Jacobson KC, Prescott CA, Neale MC (2003) Specificity of genetic and environmental risk factors for use and abuse/dependence of cannabis, cocaine, hallucinogens, sedatives, stimulants, and opiates in male twins. *Am J Psychiatry* 160: 687-95.
- King JA, De Oliveira WL, Patel N (2005) Deficits in testosterone facilitate enhanced fear response. *Psychoneuroendocrinology* 30: 333-40.
- Koch M (1999) The neurobiology of startle. *Prog Neurobiol* 59: 107-28.
- Koff JM, Shuster L, Miller LG (1994) Chronic cocaine administration is associated with behavioral sensitization and time-dependent changes in striatal dopamine transporter binding. *J Pharmacol Exp Ther* 268: 277-82.
- Koob GF, Le Moal M (1997) Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. *Science* 278: 52-8.
- Koob GF, Le Moal M (2001) Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. *Neuropsychopharmacology* 24: 97-129.
- Korstanje R, Paigen B (2002) From QTL to gene: the harvest begins. *Nat Genet* 31: 235-6.
- Kosten TA, Ambrosio E (2002) HPA axis function and drug addictive behaviors: insights from studies with Lewis and Fischer 344 inbred rats. *Psychoneuroendocrinology* 27: 35-69.

- Kosten TA, Miserendino MJ, Chi S, Nestler EJ (1994) Fischer and Lewis rat strains show differential cocaine effects in conditioned place preference and behavioral sensitization but not in locomotor activity or conditioned taste aversion. *J Pharmacol Exp Ther* 269: 137-44.
- Kranzler HR, Burleson JA, Del Boca FK, Babor TF, Korner P, Brown J, Bohn MJ (1994) Buspirone treatment of anxious alcoholics. A placebo-controlled trial. *Arch Gen Psychiatry* 51: 720-31.
- Kreek MJ, Nielsen DA, Butelman ER, LaForge KS (2005) Genetic influences on impulsivity, risk taking, stress responsivity and vulnerability to drug abuse and addiction. *Nat Neurosci* 8: 1450-7.
- Kushner MG, Abrams K, Borchardt C (2000) The relationship between anxiety disorders and alcohol use disorders: a review of major perspectives and findings. *Clin Psychol Rev* 20: 149-71.
- Kushner MG, Thuras P, Abrams K, Brekke M, Stritar L (2001) Anxiety mediates the association between anxiety sensitivity and coping-related drinking motives in alcoholism treatment patients. *Addict Behav* 26: 869-85.
- Langenbucher J, Chung T, Morgenstern J, Labouvie E, Nathan PE, Bavly L (1997) Physiological alcohol dependence as a "specifier" of risk for medical problems and relapse liability in DSM-IV. *J Stud Alcohol* 58: 341-50.
- Le Fauve CE, Litten RZ, Randall CL, Moak DH, Salloum IM, Green AI (2004) Pharmacological treatment of alcohol abuse/dependence with psychiatric comorbidity. *Alcohol Clin Exp Res* 28: 302-12.
- Lejoyeux M, Mourad I, Ades J (2000) [Psychiatric disorders induced by drug dependence other than alcohol]. *Encephale* 26: 21-7.
- Lende DH, Smith EO (2002) Evolution meets biopsychosociality: an analysis of addictive behavior. *Addiction* 97: 447-58.
- Lesch KP (2001a) Molecular foundation of anxiety disorders. *J Neural Transm* 108: 717-46.
- Lesch KP (2001b) Variation of serotonergic gene expression: neurodevelopment and the complexity of response to psychopharmacologic drugs. *Eur Neuropsychopharmacol* 11: 457-74.
- Lewis JW, Cannon JT, Liebeskind JC (1980) Opioid and nonopioid mechanisms of stress analgesia. *Science* 208: 623-5.
- Liang T, Spence J, Liu L, Strother WN, Chang HW, Ellison JA, Lumeng L, Li TK, Foroud T, Carr LG (2003) alpha-Synuclein maps to a quantitative trait locus for alcohol

- preference and is differentially expressed in alcohol-preferring and -nonpreferring rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 4690-5.
- Lopez AD, Murray CC (1998) The global burden of disease, 1990-2020. *Nat Med* 4: 1241-3.
- Lovinger DM, Crabbe JC (2005) Laboratory models of alcoholism: treatment target identification and insight into mechanisms. *Nat Neurosci* 8: 1471-80.
- Malcolm R, Anton RF, Randall CL, Johnston A, Brady K, Thevos A (1992) A placebo-controlled trial of buspirone in anxious inpatient alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res* 16: 1007-13.
- Marinelli M, Piazza PV, Deroche V, Maccari S, Le Moal M, Simon H (1994) Corticosterone circadian secretion differentially facilitates dopamine-mediated psychomotor effect of cocaine and morphine. *J Neurosci* 14: 2724-31.
- Mathew RJ, Wilson WH, Blazer DG, George LK (1993) Psychiatric disorders in adult children of alcoholics: data from the Epidemiologic Catchment Area project. *Am J Psychiatry* 150: 793-800.
- McClung CA, Nestler EJ (2003) Regulation of gene expression and cocaine reward by CREB and DeltaFosB. *Nat Neurosci* 6: 1208-15.
- McGregor IS, Schrama L, Ambermoon P, Dielenberg RA (2002) Not all 'predator odours' are equal: cat odour but not 2,4,5 trimethylthiazoline (TMT; fox odour) elicits specific defensive behaviours in rats. *Behav Brain Res* 129: 1-16.
- Mello NK, Mendelson JH (1997) Cocaine's effects on neuroendocrine systems: clinical and preclinical studies. *Pharmacol Biochem Behav* 57: 571-99.
- Merikangas KR, Mehta RL, Molnar BE, Walters EE, Swendsen JD, Aguilar-Gaziola S, Bijl R, Borges G, Caraveo-Anduaga JJ, DeWit DJ, Kolody B, Vega WA, Wittchen HU, Kessler RC (1998) Comorbidity of substance use disorders with mood and anxiety disorders: results of the International Consortium in Psychiatric Epidemiology. *Addict Behav* 23: 893-907.
- Miserendino MJ, Nestler EJ (1995) Behavioral sensitization to cocaine: modulation by the cyclic AMP system in the nucleus accumbens. *Brain Res* 674: 299-306.
- Mogil JS (1999) The genetic mediation of individual differences in sensitivity to pain and its inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 7744-51.
- Montgomery KC (1955) The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. *J Comp Physiol Psychol Med* 48: 254-260.

- Mormede P, Courvoisier H, Ramos A, Marissal-Arvy N, Ousova O, Desautes C, Duclos M, Chaouloff F, Moisan MP (2002a) Molecular genetic approaches to investigate individual variations in behavioral and neuroendocrine stress responses. *Psychoneuroendocrinology* 27: 563-83.
- Mormede P, Moneva E, Bruneval C, Chaouloff F, Moisan MP (2002b) Marker-assisted selection of a neuro-behavioural trait related to behavioural inhibition in the SHR strain, an animal model of ADHD. *Genes Brain Behav* 1: 111-6.
- Morrow BA, Roth RH, Elsworth JD (2000) TMT, a predator odor, elevates mesoprefrontal dopamine metabolic activity and disrupts short-term working memory in the rat. *Brain Res Bull* 52: 519-23.
- Muller CP, Thonnessen H, Barros M, Tomaz C, Carey RJ, Huston JP (2004) Hippocampus 5-HT(1A)-receptors attenuate cocaine-induced hyperlocomotion and the increase in hippocampal but not nucleus accumbens 5-HT. *Hippocampus* 14: 710-21.
- Myers EA, Rinaman L (2005) Trimethylthiazoline supports conditioned flavor avoidance and activates viscerosensory, hypothalamic, and limbic circuits in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288: R1716-26.
- Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM (2002) Neurobiology of depression. *Neuron* 34: 13-25.
- Nurnberger JI, Jr., Foroud T, Flury L, Meyer ET, Wiegand R (2002) Is there a genetic relationship between alcoholism and depression? *Alcohol Res Health* 26: 233-40.
- Oitzl MS, van Haarst AD, Sutanto W, de Kloet ER (1995) Corticosterone, brain mineralocorticoid receptors (MRs) and the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis: the Lewis rat as an example of increased central MR capacity and a hyporesponsive HPA axis. *Psychoneuroendocrinology* 20: 655-75.
- Ortiz J, DeCaprio JL, Kosten TA, Nestler EJ (1995) Strain-selective effects of corticosterone on locomotor sensitization to cocaine and on levels of tyrosine hydroxylase and glucocorticoid receptor in the ventral tegmental area. *Neuroscience* 67: 383-97.
- Overstreet DH, Halikas JA, Seredenin SB, Kampov-Polevoy AB, Viglinskaya IV, Kashevskaya O, Badishtov BA, Knapp DJ, Mormede P, Kiiianmaa K, Li TK, Rezvani AH (1997) Behavioral similarities and differences among alcohol-preferring and -nonpreferring rats: confirmation by factor analysis and extension to additional groups. *Alcohol Clin Exp Res* 21: 840-8.
- Palanza P (2001) Animal models of anxiety and depression: how are females different? *Neurosci Biobehav Rev* 25: 219-33.

- Palmer AA, Breen LL, Flodman P, Conti LH, Spence MA, Printz MP (2003) Identification of quantitative trait loci for prepulse inhibition in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 165: 270-9.
- Palmer AA, Dulawa SC, Mottiwala AA, Conti LH, Geyer MA, Printz MP (2000) Prepulse startle deficit in the Brown Norway rat: a potential genetic model. *Behav Neurosci* 114: 374-88.
- Pandey SC, Zhang H, Roy A, Xu T (2005) Deficits in amygdaloid cAMP-responsive element-binding protein signaling play a role in genetic predisposition to anxiety and alcoholism. *J Clin Invest* 115: 2762-73.
- Parker KJ, Schatzberg AF, Lyons DM (2003) Neuroendocrine aspects of hypercortisolism in major depression. *Horm Behav* 43: 60-6.
- Parsons LH, Schad CA, Justice JB, Jr. (1993) Co-administration of the D2 antagonist pimozide inhibits up-regulation of dopamine release and uptake induced by repeated cocaine. *J Neurochem* 60: 376-9.
- Pearson H (2004) Public health: the demon drink. *Nature* 428: 598-600.
- Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M (1985) Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods* 14: 149-67.
- Petryshen TL, Kirby A, Hammer RP, Jr., Purcell S, O'Leary SB, Singer JB, Hill AE, Nadeau JH, Daly MJ, Sklar P (2005) Two quantitative trait loci for prepulse inhibition of startle identified on mouse chromosome 16 using chromosome substitution strains. *Genetics* 171: 1895-904.
- Phillips TJ, Huson MG, McKinnon CS (1998) Localization of genes mediating acute and sensitized locomotor responses to cocaine in BXD/Ty recombinant inbred mice. *J Neurosci* 18: 3023-34.
- Piazza PV, Barrot M, Rouge-Pont F, Marinelli M, Maccari S, Abrous DN, Simon H, Le Moal M (1996) Suppression of glucocorticoid secretion and antipsychotic drugs have similar effects on the mesolimbic dopaminergic transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 15445-50.
- Piazza PV, Le Moal M (1998) The role of stress in drug self-administration. *Trends Pharmacol Sci* 19: 67-74.
- Pierce RC, Bell K, Duffy P, Kalivas PW (1996) Repeated cocaine augments excitatory amino acid transmission in the nucleus accumbens only in rats having developed behavioral sensitization. *J Neurosci* 16: 1550-60.

- Pierce RC, Kalivas PW (1997) A circuitry model of the expression of behavioral sensitization to amphetamine-like psychostimulants. *Brain Res Brain Res Rev* 25: 192-216.
- Pohorecky LA (1990) Interaction of ethanol and stress: research with experimental animals--an update. *Alcohol Alcohol* 25: 263-76.
- Post RM (1980) Intermittent versus continuous stimulation: effect of time interval on the development of sensitization or tolerance. *Life Sci* 26: 1275-82.
- Potenza MN, Brodtkin ES, Joe B, Luo X, Remmers EF, Wilder RL, Nestler EJ, Gelernter J (2004) Genomic regions controlling corticosterone levels in rats. *Biol Psychiatry* 55: 634-41.
- Prasad BM, Ulibarri C, Sorg BA (1998) Stress-induced cross-sensitization to cocaine: effect of adrenalectomy and corticosterone after short- and long-term withdrawal. *Psychopharmacology (Berl)* 136: 24-33.
- Prut L, Belzung C (2003) The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol* 463: 3-33.
- Quitkin FM, Rifkin A, Kaplan J, Klein DF (1972) Phobic anxiety syndrome complicated by drug dependence and addiction. A treatable form of drug abuse. *Arch Gen Psychiatry* 27: 159-62.
- Ramos A, Berton O, Mormede P, Chaouloff F (1997) A multiple-test study of anxiety-related behaviours in six inbred rat strains. *Behav Brain Res* 85: 57-69.
- Ramos A, Kangerki AL, Basso PF, Da Silva Santos JE, Assreuy J, Vendruscolo LF, Takahashi RN (2002) Evaluation of Lewis and SHR rat strains as a genetic model for the study of anxiety and pain. *Behav Brain Res* 129: 113-23.
- Ramos A, Mellerin Y, Mormede P, Chaouloff F (1998) A genetic and multifactorial analysis of anxiety-related behaviours in Lewis and SHR intercrosses. *Behav Brain Res* 96: 195-205.
- Ramos A, Moisan MP, Chaouloff F, Mormede C, Mormede P (1999) Identification of female-specific QTLs affecting an emotionality-related behavior in rats. *Mol Psychiatry* 4: 453-62.
- Randall CL, Johnson MR, Thevos AK, Sonne SC, Thomas SE, Willard SL, Brady KT, Davidson JR (2001a) Paroxetine for social anxiety and alcohol use in dual-diagnosed patients. *Depress Anxiety* 14: 255-62.
- Randall CL, Thomas S, Thevos AK (2001b) Concurrent alcoholism and social anxiety disorder: a first step toward developing effective treatments. *Alcohol Clin Exp Res* 25: 210-20.

- Regier DA, Farmer ME, Rae DS, Locke BZ, Keith SJ, Judd LL, Goodwin FK (1990) Comorbidity of mental disorders with alcohol and other drug abuse. Results from the Epidemiologic Catchment Area (ECA) Study. *Jama* 264: 2511-8.
- Reich W, Earls F, Frankel O, Shayka JJ (1993) Psychopathology in children of alcoholics. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 32: 995-1002.
- Reid MS, Hsu K, Tolliver BK, Crawford CA, Berger SP (1996) Evidence for the involvement of phospholipase A2 mechanisms in the development of stimulant sensitization. *J Pharmacol Exp Ther* 276: 1244-56.
- Robinson TE, Berridge KC (1993) The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res Brain Res Rev* 18: 247-91.
- Robinson TE, Berridge KC (2001) Incentive-sensitization and addiction. *Addiction* 96: 103-14.
- Romero MT, Kepler KL, Bodnar RJ (1988) Gender determinants of opioid mediation of swim analgesia in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 29: 705-708.
- Rouge-Pont F, Marinelli M, Le Moal M, Simon H, Piazza PV (1995) Stress-induced sensitization and glucocorticoids. II. Sensitization of the increase in extracellular dopamine induced by cocaine depends on stress-induced corticosterone secretion. *J Neurosci* 15: 7189-95.
- Russell VA, Sagvolden T, Johansen EB (2005) Animal models of attention-deficit hyperactivity disorder. *Behav Brain Funct* 1: 9.
- Sagvolden T, Russell VA, Aase H, Johansen EB, Farshbaf M (2005) Rodent models of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry* 57: 1239-47.
- Selye H (1936) A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature* 138: 32-33.
- Seong E, Seasholtz AF, Burmeister M (2002) Mouse models for psychiatric disorders. *Trends Genet* 18: 643-50.
- Spanagel R, Montkowski A, Allingham K, Stohr T, Shoaib M, Holsboer F, Landgraf R (1995) Anxiety: a potential predictor of vulnerability to the initiation of ethanol self-administration in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 122: 369-73.
- Spanagel R, Pendyala G, Abarca C, Zghoul T, Sanchis-Segura C, Magnone MC, Lascorz J, Depner M, Holzberg D, Soyka M, Schreiber S, Matsuda F, Lathrop M, Schumann G, Albrecht U (2005) The clock gene *Per2* influences the glutamatergic system and modulates alcohol consumption. *Nat Med* 11: 35-42.

- Spooren WP, Schoeffter P, Gasparini F, Kuhn R, Gentsch C (2002) Pharmacological and endocrinological characterisation of stress-induced hyperthermia in singly housed mice using classical and candidate anxiolytics (LY314582, MPEP and NKP608). *Eur J Pharmacol* 435: 161-70.
- Stein MB, Liebowitz MR, Lydiard RB, Pitts CD, Bushnell W, Gergel I (1998) Paroxetine treatment of generalized social phobia (social anxiety disorder): a randomized controlled trial. *Jama* 280: 708-13.
- Stewart RB, Gatto GJ, Lumeng L, Li TK, Murphy JM (1993) Comparison of alcohol-preferring (P) and nonpreferring (NP) rats on tests of anxiety and for the anxiolytic effects of ethanol. *Alcohol* 10: 1-10.
- Striplin CD, Kalivas PW (1993) Robustness of G protein changes in cocaine sensitization shown with immunoblotting. *Synapse* 14: 10-5.
- Suzuki T, George FR, Meisch RA (1988) Differential establishment and maintenance of oral ethanol reinforced behavior in Lewis and Fischer 344 inbred rat strains. *J Pharmacol Exp Ther* 245: 164-70.
- Swerdlow NR, Braff DL, Taaid N, Geyer MA (1994) Assessing the validity of an animal model of deficient sensorimotor gating in schizophrenic patients. *Arch Gen Psychiatry* 51: 139-54.
- Swerdlow NR, Geyer MA, Braff DL (2001) Neural circuit regulation of prepulse inhibition of startle in the rat: current knowledge and future challenges. *Psychopharmacology (Berl)* 156: 194-215.
- Tatum AL, Seevers MH (1929) Experimental cocaine addiction. *J Pharmacol Exp Ther* 36: 401-410.
- Terenina-Rigaldie E, Jones BC, Mormede P (2003a) Pleiotropic effect of a locus on chromosome 4 influencing alcohol drinking and emotional reactivity in rats. *Genes Brain Behav* 2: 125-31.
- Terenina-Rigaldie E, Moisan MP, Colas A, Beauge F, Shah KV, Jones BC, Mormede P (2003b) Genetics of behaviour: phenotypic and molecular study of rats derived from high- and low-alcohol consuming lines. *Pharmacogenetics* 13: 543-54.
- Thomas WL, Jr., Cooke ES, Hammer RP, Jr. (1996) Cocaine-induced sensitization of metabolic activity in extrapyramidal circuits involves prior dopamine D1-like receptor stimulation. *J Pharmacol Exp Ther* 278: 347-53.
- Treit D, Menard J, Royan C (1993) Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav* 44: 463-9.



- True WR, Xian H, Scherrer JF, Madden PA, Bucholz KK, Heath AC, Eisen SA, Lyons MJ, Goldberg J, Tsuang M (1999) Common genetic vulnerability for nicotine and alcohol dependence in men. *Arch Gen Psychiatry* 56: 655-61.
- Tsuang MT, Lyons MJ, Harley RM, Xian H, Eisen S, Goldberg J, True WR, Faraone SV (1999) Genetic and environmental influences on transitions in drug use. *Behav Genet* 29: 473-9.
- Tsuang MT, Lyons MJ, Meyer JM, Doyle T, Eisen SA, Goldberg J, True W, Lin N, Toomey R, Eaves L (1998) Co-occurrence of abuse of different drugs in men: the role of drug-specific and shared vulnerabilities. *Arch Gen Psychiatry* 55: 967-72.
- van den Buuse M (2004) Prepulse inhibition of acoustic startle in spontaneously hypertensive rats. *Behav Brain Res* 154: 331-7.
- Vanderschuren LJ, Kalivas PW (2000) Alterations in dopaminergic and glutamatergic transmission in the induction and expression of behavioral sensitization: a critical review of preclinical studies. *Psychopharmacology (Berl)* 151: 99-120.
- Vanderschuren LJ, Tjon GH, Nestby P, Mulder AH, Schoffelmeer AN, De Vries TJ (1997) Morphine-induced long-term sensitization to the locomotor effects of morphine and amphetamine depends on the temporal pattern of the pretreatment regimen. *Psychopharmacology (Berl)* 131: 115-22.
- Vanyukov MM, Tarter RE, Kirisci L, Kirillova GP, Maher BS, Clark DB (2003) Liability to substance use disorders: 1. Common mechanisms and manifestations. *Neurosci Biobehav Rev* 27: 507-15.
- Vendruscolo LF, Pamplona FA, Takahashi RN (2004) Strain and sex differences in the expression of nociceptive behavior and stress-induced analgesia in rats. *Brain Res* 1030: 277-83.
- Vendruscolo LF, Takahashi RN, Bruske GR, Ramos A (2003) Evaluation of the anxiolytic-like effect of NKP608, a NK1-receptor antagonist, in two rat strains that differ in anxiety-related behaviors. *Psychopharmacology (Berl)* 170: 287-93.
- Viglinskaya IV, Overstreet DH, Kashevskaya OP, Badishtov BA, Kampov-Polevoy AB, Seredenin SB, Halikas JA (1995) To drink or not to drink: tests of anxiety and immobility in alcohol-preferring and alcohol-nonpreferring rat strains. *Physiol Behav* 57: 937-41.
- Walf AA, Frye CA (2003) Anti-nociception following exposure to trimethylthiazoline, peripheral or intra-amygdala estrogen and/or progesterone. *Behav Brain Res* 144: 77-85.
- Wallace KJ, Rosen JB (2000) Predator odor as an unconditioned fear stimulus in rats: elicitation of freezing by trimethylthiazoline, a component of fox feces. *Behav Neurosci* 114: 912-22.

- Weiss F, Lorang MT, Bloom FE, Koob GF (1993) Oral alcohol self-administration stimulates dopamine release in the rat nucleus accumbens: genetic and motivational determinants. *J Pharmacol Exp Ther* 267: 250-8.
- Wilens TE, Biederman J, Mick E, Faraone SV, Spencer T (1997) Attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) is associated with early onset substance use disorders. *J Nerv Ment Dis* 185: 475-82.
- Wilson AW, Neill JC, Costall B (1997) Strain differences in ethanol preference and reinforced behaviour: a comparison of two-bottle choice and operant self-administration paradigms. *Behav Pharmacol* 8: 37-46.
- Wu WR, Li N, Sorg BA (2003) Prolonged effects of repeated cocaine on medial prefrontal cortex dopamine response to cocaine and a stressful predatory odor challenge in rats. *Brain Res* 991: 232-9.
- Wultz B, Sagvolden T, Moser EI, Moser MB (1990) The spontaneously hypertensive rat as an animal model of attention-deficit hyperactivity disorder: effects of methylphenidate on exploratory behavior. *Behav Neural Biol* 53: 88-102.
- Yalcin B, Willis-Owen SA, Fullerton J, Meesaq A, Deacon RM, Rawlins JN, Copley RR, Morris AP, Flint J, Mott R (2004) Genetic dissection of a behavioral quantitative trait locus shows that *Rgs2* modulates anxiety in mice. *Nat Genet* 36: 1197-202.

## 12- ANEXOS

Parte dos resultados que compõem esta Tese foram publicados, ou submetidos, em revistas internacionais especializadas. Outros artigos em fase de preparação.

*Genes, Brain and Behavior* (2005)

Copyright © Blackwell Munksgaard 2005

### Evidence for a female-specific effect of a chromosome 4 locus on anxiety-related behaviors and ethanol drinking in rats

L. F. Vendruscolo<sup>†,‡</sup>, E. Terenina-Rigaldie<sup>†</sup>,  
F. Raba<sup>†</sup>, A. Ramos<sup>§</sup>, R. N. Takahashi<sup>‡</sup> and  
P. Mormède<sup>\*†</sup>

<sup>†</sup>Laboratoire de Neurogénétique et Stress, INRA – Université Victor Segalen, Institut François Magendie, Bordeaux, France, <sup>‡</sup>Departamento de Farmacologia, and <sup>§</sup>Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

\*Corresponding author: Dr P. Mormède, Laboratoire de Neurogénétique et Stress, Institut François Magendie, 146 rue Léo-Saignat, 33077 Bordeaux cedex, France. E-mail: mormede@bordeaux.inserm.fr

Previous studies using the inbred rat strains Lewis (LEW) and spontaneously hypertensive rats (SHR) led to the mapping of two quantitative trait loci, named *Ofil1* (on chromosome 4 of the rat) and *Ofil2* (on chromosome 7), for open-field inner locomotion, a behavioral index of anxiety. Studies using other strains showed that the region next to *Ofil1* influences measures of not only anxiety but also ethanol consumption. In view of the high prevalence of psychiatric disorders such as anxiety and alcoholism, as well as the comorbidity between them, the present study was designed to better characterize the contribution of these two loci to complex emotional and consummatory responses. Rats deriving from an F2 intercross between the LEW and the SHR strains were selected according to their genotype at markers flanking the loci *Ofil1* and *Ofil2* and bred to obtain lines of rats homozygous LEW/LEW or SHR/SHR for each of the two loci, thus generating four genotypic combinations. These selected animals as well as purebred LEW and SHR rats of both sexes were submitted to a battery of tests including measures of locomotor activity, anxiety, sweet and bitter taste reinforcement and ethanol intake. Lewis rats displayed more anxiety-like behavior and less ethanol intake than SHR rats. *Ofil1* (on chromosome 4) affected both the activity in the center of the open field and ethanol drinking in females only. These results suggest that *Ofil1* contains either linked genes with independent influences on anxiety-related responses and ethanol drinking or a pleiotropic gene with simultaneous effects on both traits.

Keywords: Alcoholism, anxiety disorder, behavior genetics, elevated plus maze, marker-assisted selection, open field, oral self-administration paradigm, quantitative trait locus

Received 27 May 2005, revised 30 August 2005, accepted for publication 31 August 2005

Anxiety disorders are the most frequent psychopathologies, with approximately 25% of the population being affected sometime in their lives (Anagnostaras *et al.* 1999) and with a clear preponderance of women being found among anxious patients (Blanchard *et al.* 1995). Alcohol (ethanol) abuse, another frequent psychiatric disorder, is also considered as a major problem of public health (Pearson 2004). Besides the fact that it increases the risk of several life-threatening diseases, such as cancer and liver cirrhosis, ethanol-dependent individuals have high rates of co-occurring psychiatric conditions such as anxiety, depression and schizophrenia (Le Fauve *et al.* 2004). The influence of genetic factors on such psychopathologies has been widely demonstrated (Cloninger 1987; van de Wetering *et al.* 1999), but this effect is still poorly understood at the molecular level. Therefore, the identification and characterization of predisposing genes would certainly be a major advance for preventing and treating psychological disorders such as alcoholism and anxiety.

Quantitative trait locus (QTL) analysis has been employed to study the underlying molecular bases of complex (and probably polygenic) phenotypes. Several anxiety- and ethanol-related QTLs have already been identified, mostly in mice but also in rats (Flint 2003). Although it has been proven difficult to identify genes controlling behavioral phenotypes through QTL analysis, this approach has provided abundant information on the genetic architecture of behaviors, and specific genes are beginning to be identified (Flint 2003; Korstanje & Paigen 2002; Liang *et al.* 2003; Yalcin *et al.* 2004).

One frequently used method for QTL detection consists in the production of a segregating population (F2, Fx or backcross) by crossing two inbred strains that are contrasting for a trait of interest. The inbred rat strains Lewis (LEW) and spontaneously hypertensive rats (SHR) provide a useful genetic model for the study of anxiety. Lewis rats show higher indices of anxiety-related behaviors when submitted to a variety of behavioral tests such as the elevated plus maze, open field, black/white box and elevated T maze compared with SHR rats, without differing in relation to several measures of general locomotion in either novel or familiar

Artigo submetido para a revista Behavior and Brain Functions:

## **A QTL on rat chromosome 7 modulates prepulse inhibition, a neuro-behavioral trait of ADHD, in a Lewis x SHR intercross**

Leandro Franco Vendruscolo<sup>1,3</sup>, Elena Terenina-Rigaldie<sup>1</sup>, Frantz Raba<sup>1</sup>, André Ramos<sup>2</sup>,  
Reinaldo Naoto Takahashi<sup>3</sup> and Pierre Mormède<sup>1</sup> ✉

<sup>1</sup> Laboratoire de Neurogénétique et Stress, UMR 1243 INRA – Université Victor Segalen, Bordeaux 2, Institut François Magendie, Bordeaux, France. <sup>2</sup> Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil. <sup>3</sup> Departamento de Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil.

### **Abstract**

**Background:** Attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) is a complex neuropsychiatric disorder with a substantial genetic component. The Spontaneously Hypertensive Rats (SHR), considered as a good animal model of ADHD, also show less anxiety-like behaviors than Lewis (LEW) rats. The use of these inbred rat strains led us to the mapping of two quantitative trait loci (QTL), named *Ofil1* (on chromosome 4) and *Ofil2* (on chromosome 7), related to locomotion in the central and aversive area of an open field. Herein, we examined whether LEW and SHR rats differ in the acoustic startle reflex, a test used to study the neurobiology of anxiety, and in the prepulse inhibition of the startle response, which is known to be impaired in ADHD patients. The effect of the two aforementioned loci on these behavioral responses was also studied. **Methods:** For this latter purpose, rats deriving from an F2 intercross between the LEW and SHR strains were selected according to their genotype at markers flanking the QTLs and bred to obtain lines of rats homozygous LEW/LEW or SHR/SHR for each of the two loci, thus generating 4 genotypic combinations. **Results:** The SHR rats displayed decreased startle and prepulse inhibition levels when compared to LEW rats. *Ofil2* affected prepulse inhibition in female rats only. **Conclusions:** The results suggest that the LEW and SHR strains are appropriate for studying mechanisms of sensorimotor gating and indicate that the locus *Ofil2* on rat chromosome 7 contain genes controlling prepulse inhibition, a neuro-behavioral trait of ADHD.

*Key words:* Quantitative trait locus (QTL); behavior genetics; anxiety; acoustic startle reflex; prepulse inhibition; marker-assisted selection; rats, inbred SHR; rats, inbred Lewis.

Artigo submetido para a revista Neuroscience Letters:

## **Genetic influences on behavioral and neuroendocrine responses to predator odor in rats**

Leandro F. Vendruscolo<sup>ac</sup>, Janaína C.M. Vendruscolo<sup>a</sup>, Elena Terenina-Rigaldie<sup>a</sup>, Frantz Raba<sup>a</sup>, Gustavo R. Brüske<sup>b</sup>, André Ramos<sup>b</sup>, Reinaldo N. Takahashi<sup>c</sup> and Pierre Mormède<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire de Neurogénétique et Stress, UMR 1243 INRA – Université Victor Segalen, Bordeaux 2, Institut François Magendie, Bordeaux, France, <sup>b</sup> Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil, <sup>c</sup> Departamento de Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil.

### **Abstract**

The exposure of animals to a variety of stressful events can induce behavioral and physiological responses, which can be modulated by anxiety levels. It is well recognized that genetic factors play a substantial role in both anxiety and stress reactivity. The present study examined the effect of 2,4,5-trimethylthiazoline (TMT), a component of fox feces, on nociception and corticosterone levels in Lewis (LEW) and SHR inbred rat strains (which display genetic differences in anxiety models such as the elevated plus-maze and open-field). The influence of two quantitative trait loci (QTL), named *Ofil1* and *Ofil2*, which are known to affect emotionality in LEW vs. SHR intercrosses on the responses to TMT was also investigated. LEW and SHR rats of both sexes displayed similar levels of behavioral and neuroendocrine responses after TMT exposure. As expected, TMT odor stress produced analgesia and enhanced corticosterone levels. *Ofil1* on chromosome 4 affected both analgesia and corticosterone release induced by TMT, in males only. *Ofil2* on chromosome 7 had no effect. The results suggest that behaviors measured in classical models of generalized anxiety and reactivity to stress produced by predator odors can be genetically dissociated. Finding a locus with an effect on the behavioral and neuroendocrine responses to stress represents the starting point in the search for genes responsible for stress-related traits.

*Key words:* Defensive system; Behavior genetics; Quantitative trait locus (QTL); Genomic regions; Marker-assisted selection; Hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis.