

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**PAULA GOMES DIAS**

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DOS EFEITOS DO QTL**  
***ANXRR16* ATRAVÉS DO USO DE RATAS DAS LINHAGENS**  
**CONGÊNICA SLA16 E SHR**

FLORIANÓPOLIS

2015



Paula Gomes Dias

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DOS EFEITOS DO QTL  
*ANXRR16* ATRAVÉS DO USO DE RATAS DAS LINHAGENS  
CONGÊNICA SLA16 E SHR**

Trabalho de conclusão de curso  
submetido como requisito para  
cumprimento da disciplina TCC  
II (BIO 7016) do currículo do  
Curso de Graduação em  
Ciências Biológicas da  
Universidade Federal de Santa  
Catarina.

Orientador: Prof. Dr. Geison de  
Souza Izídio

Florianópolis  
2015



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

Dias, Paula Gomes  
CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DOS EFEITOS DO QTL ANXRR16  
ATRAVÉS DO USO DE RATAS DAS LINHAGENS CONGÊNICA SLA16 E SHR  
/ Paula Gomes Dias ; orientador, Geison de Souza Izídio -  
Florianópolis, SC, 2015.  
70 p.

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

Inclui referências

1. Ciências Biológicas. 2. genética do comportamento. 3.  
farmacogenética. 4. ciclo estral. I. de Souza Izídio,  
Geison. II. Universidade Federal de Santa Catarina.  
Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.



**Paula Gomes Dias**

**Caracterização fenotípica dos efeitos do QTL *Anxrr16*  
através do uso de ratas das linhagens congênica SLA16 e  
SHR**

Este (a) trabalho de conclusão de curso foi julgado(a) adequado(a) para obtenção do Título de “Bacharel em Ciências Biológicas”

Florianópolis, 30 de julho de 2015.

\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup>. Maria Risoleta Freire Marques, Dra.  
Coordenadora do Curso

**Banca Examinadora:**

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr Geison de Souza Izídio.  
Presidente da Banca  
UFSC

\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Dra. Elayne Pereira  
UNISUL

\_\_\_\_\_  
Dra. Eloisa Pavesi  
UFSC

\_\_\_\_\_  
Renata C. N. Marchette, Msc.  
Universidade Federal de Santa  
Catarina





Dedico à minha família, em especial aos meus avós, “Seo Betinho” e “Dona Cide” (*in memoriam*), que me ensinaram o gosto pela natureza.



## AGRADECIMENTOS

Meu agradecimento sincero ao meu querido orientador, Prof. Dr. Geison Izídio de Souza, por ter sido sempre presente e solícito quando precisei. Agradeço por ter deixado fazer parte deste laboratório e por ter me incentivado a ser monitora. Foi uma experiência muito feliz!

Ao Prof. Dr. André de Ávila Ramos, pela oportunidade de trabalhar como monitora, aprofundando meus conhecimentos científicos e tomando gosto pela arte de ensinar.

À Dra. Renata Pértile pelos ensinamentos. Aos mestrandos e colegas de LGC: Fernanda, Fernando, Mayara, Natalli e, em especial, Lucía e Elisa com quem tive o prazer de aprender e trabalhar mais de perto. E aos colegas IC's: Kátia, Thalita e Gui.

Aos meus professores que durante toda a graduação contribuíram para minha formação e serviram de exemplo.

Aos membros da banca, Dra. Elayne Pereira, Dra. Eloisa Pavesi e Renata Marchette por terem aceito o convite de serem banca deste trabalho.

Aos meus pais, Maria Goretti Gomes Dias e Valberto Andrade Dias, por não medirem esforços para me proporcionarem o melhor. Sem o apoio de vocês, jamais teria chegado até aqui!

Bruna Gomes Dias, pela companhia e pelas *playlists* nas noites que passei escrevendo. A vida fica mais leve com pessoas divertidas como você!

Ao meu namorado, Fernando Santos, pelo apoio, incentivo e paciência, por entender minha ausência neste momento e pela sua eficiente assistência técnica. Você é o cara!

À minha querida 'chefa', Alessandra Matos Silva, agradeço pela compreensão que sempre teve quando precisei me ausentar e pelo seu carinho.

Aos meus amigos, pelos momentos de descontração, de estudos e nos difíceis também: Stéfany, Bruno, Camila, Pâmela, Isabela, Ju Burger, Mari e Clisten.

À todos que contribuíram de alguma forma para que este trabalho tenha sido desenvolvido.



“Existem muitas hipóteses em ciência que estão erradas. Isso é perfeitamente aceitável, elas são a abertura para achar as que estão certas”.

(Carl Sagan)



## RESUMO

**INTRODUÇÃO-** A maioria dos estudos biomédicos e pré-clínicos utiliza somente machos como animais de experimentação, ignorando as diferenças fisiológicas entre os sexos. Isso pode levar a medicamentos com menor efeito específico e com maior toxicidade para mulheres. Um ponto que alguns pesquisadores argumentam como causa para negligenciar as fêmeas em pesquisas científicas é que elas apresentam grande variação hormonal no seu ciclo estral. Assim, o número de fêmeas deveria ser 4X maior, pois algumas pesquisas mostram que em cada fase do ciclo estral, elas se comportam de maneira distinta.

**OBJETIVOS-** Neste trabalho buscou-se fazer uma caracterização fenotípica dos efeitos do QTL *Anxrr16* em fêmeas de duas linhagens de ratos. Materiais e métodos-Para isso, foram testadas as ratas das linhagens congênica SLA16 (n=10) e SHR (N=9), por 4 dias seguidos, no teste triplo (TT) levando em conta o ciclo estral (DP=diestro-proestro e EM=estro-metaestro) (experimento 1). Além disso, avaliou-se a resposta das fêmeas destas duas linhagens, SLA16 (n=20), SHR= (n=20), a um antagonista D2 não seletivo, nos testes do campo aberto e labirinto em cruz elevado (experimento 2).

**RESULTADOS-** No experimento 1, no dia1, as fêmeas DP tiveram maior locomoção central que EM. Já no dia, 4 as fêmeas EM tiveram um maior número de entradas no compartimento claro. No experimento 2, foi observado um efeito farmacogenético no LCE, onde as ratas SHR são menos sensíveis aos efeitos do haloperidol, em comparação as ratas SLA16.

**CONCLUSÕES-** Assim sugere-se que o ciclo estral influencia o comportamento das fêmeas destas linhagens no TT e que os efeitos fenotípicos do QTL *Anxrr16* podem ser devidos, ao menos em parte e no LCE, a receptores dopaminérgicos do tipo D2.

**Palavras-chave:** genética do comportamento; farmacogenética; ciclo estral; teste triplo, campo aberto, labirinto em cruz elevado.





## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Representação da flutuação dos hormônios (estrogênio e progesterona) dividida em cada uma das fases do ciclo estral de ratas. Adaptado de Simpson e Kelly (2012). ..... 27
- Figura 2 - Locomoção central (A) e periférica (B) das fêmeas em Diestro-Proestro e Estro-Metaestro das linhagens SLA16 e SHR testadas durante 4 dias repetidos no teste triplo. As barras representam a média  $\pm$  erro padrão. (\*) representa diferença entre linhagens ( $p < 0,05$ ); (#) representa diferença entre Diestro-Proestro e Estro-Metaestro ( $p < 0,05$ ). Os números representados dentro de cada barra correspondem ao número de animais de cada grupo. ANOVA de 2 vias. .... 42
- Figura 3 - Tempo no centro (A) e na periferia (B) das fêmeas em Diestro-Proestro e Estro-Metaestro das linhagens SLA16 e SHR testadas durante 4 dias repetidos no teste triplo. As barras representam a média  $\pm$  erro padrão. (\*) representa diferença entre linhagens ( $p < 0,05$ ); (#) representa diferença entre Diestro-Proestro e Estro-Metaestro ( $p < 0,05$ ). Os números representados dentro de cada barra correspondem ao número de animais de cada grupo. ANOVA de 2 vias. .... 43
- Figura 4 - Número de entradas nos braços abertos (A) e fechados (B) das fêmeas em Diestro-Proestro e Estro-Metaestro das linhagens SLA16 e SHR testadas durante 4 dias repetidos no teste triplo. As barras representam a média  $\pm$  erro padrão. (\*) representa diferença entre linhagens ( $p < 0,05$ ); (#) representa diferença entre Diestro-Proestro e Estro-Metaestro ( $p < 0,05$ ). Os números representados dentro de cada barra correspondem ao número de animais de cada grupo. ANOVA de 2 vias. .... 45
- Figura 5 - Tempo nos braços abertos (A) e fechados (B) das fêmeas em Diestro-Proestro e Estro-Metaestro das linhagens SLA16 e SHR testadas durante 4 dias repetidos no teste triplo. As barras representam a média  $\pm$  erro padrão. (\*) representa diferença entre linhagens ( $p < 0,05$ ); (#) representa diferença entre Diestro-Proestro e Estro-Metaestro ( $p < 0,05$ ). Os números representados dentro de cada barra correspondem ao número de animais de cada grupo. ANOVA de 2 vias. .... 46
- Figura 6 - Número de entradas (A) compartimento claro e (B) compartimento escuro. s fêmeas em Diestro-Proestro e Estro-Metaestro das linhagens SLA16 e SHR testadas durante 4 dias repetidos no teste triplo. As barras representam a média  $\pm$  erro

padrão. (\*) representa diferença entre linhagens ( $p < 0,05$ ); (#) representa diferença entre Diestro-Proestro e Estro-Metaestro ( $p < 0,05$ ). Os números representados dentro de cada barra, correspondem ao número de animais de cada grupo. ANOVA de 2 vias. .... 47

Figura 7 - Tempo (A) no claro e (B) no escuro das fêmeas em Diestro-Proestro e Estro-Metaestro das linhagens SLA16 e SHR testadas durante 4 dias repetidos no teste triplo. As barras representam a média  $\pm$  erro padrão. (\*) representa diferença entre linhagens ( $p < 0,05$ ); (#) representa diferença entre Diestro-Proestro e Estro-Metaestro ( $p < 0,05$ ). Os números representados dentro de cada barra correspondem ao número de animais de cada grupo. ANOVA de 2 vias. .... 48

Figura 8 - A: Locomoção central no campo aberto. A figura mostra a locomoção central das fêmeas, separadas por linhagem (SHR e SLA16) e doses de haloperidol. B: Locomoção periférica no campo aberto, separadas por linhagem (SHR e SLA16) e doses. (\*\*) representa diferenças entre linhagens ( $p < 0,01$ ). ANOVA de 2 vias. .... 50

Figura 9 - Tempo (A) centro e (B) periferia do campo aberto medido em segundos. (\*\*) apresentadas por linhagem (SHR e SLA16) e doses representa diferenças entre linhagens ( $p < 0,01$ ). ANOVA de 2 vias. .... 51

Figura 10 - (A) número de entradas nos braços abertos separados por linhagens. (B) entradas nos braços fechados. (\*\*) representa diferenças entre linhagens ( $p < 0,01$ ); (@) representa interação entre linhagem e tratamento. ANOVA de 2 vias. .... 52

Figura 11- (A) tempo despendido nos braços abertos em segundos. (B) tempo nos braços fechados medido em segundos. ANOVA de 2 vias. .... 53

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Diferenças entre machos e fêmeas em parâmetros avaliados nos testes comportamentais (tabela adaptada de Júnior e Morato (2005)).....28

Tabela 2- Critérios adotados para caracterizar a fase do ciclo estral.....37



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

*Anxrr16*= QTL para resposta relacionada à ansiedade 16  
(*Anxiety Related Response QTL 16*)

ANOVA= Análise de variância

CA= Campo aberto

CBP= Caixa branca/preta

LCE= Labirinto em cruz elevado

LGC= Laboratório de Genética do Comportamento

LEW= Lewis

QTL= Loci para características quantitativas (*Quantitative trait loci*)

RGD= Rat Genome Database

SHR= Rato espontaneamente hipertenso (*spontaneously hypertensive rat*)

SLA16= SHR.LEW-*Anxrr16*

TDAH= Transtorno de déficit de atenção e hiperatividade

TT= Teste triplo



## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>25</b>
1.1 Prevalências das doenças psiquiátricas em mulheres e o uso de fêmeas nas pesquisas biomédicas .....	25
1.2 Ciclo estral das ratas.....	26
1.3 Testes comportamentais.....	29
1.4 Teste triplo.....	30
1.5 O QTL e o desenvolvimento da linhagem congênica SLA16.....	31
1.6 Sistema dopaminérgico e seu envolvimento nos comportamentos.....	33
1.7 Hipóteses.....	34
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>35</b>
2.1 Objetivo Geral: .....	35
2.2 Objetivos Específicos:.....	35
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>37</b>
3.1 Animais.....	37
3.2 Experimento 1- Teste Triplo e ciclo estral.....	37
3.2.1 Avaliação da fase do ciclo estral.....	37
3.2.2. Aparato teste triplo .....	38
3.3 Experimento 2-Haloperidol.....	39
3.3.1. Fármaco .....	39
3.3.2 Testes comportamentais.....	39
3.4 Análises estatísticas.....	40
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>41</b>
4.1 Teste Triplo- experimento 1 .....	41
4.2 Experimento 2- Haloperidol.....	49
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>55</b>
5.1 Experimento 1 - Teste triplo .....	55
5.2 Experimento 2 - Haloperidol.....	57
<b>6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS .....</b>	<b>61</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>63</b>





## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Prevalências das doenças psiquiátricas em mulheres e o uso de fêmeas nas pesquisas biomédicas

Ao longo das duas últimas décadas, as doenças psiquiátricas vêm se mostrando como uma das principais causas pelas quais os indivíduos são afastados temporária ou permanentemente de seus trabalhos e estes índices estão aumentando a cada ano. Por exemplo, em 2013 houve 61.044 casos de afastamentos do trabalho no Brasil por depressão, segundo dados do Instituto Nacional do Seguro Social (INSS) (BRASIL, 2013). Em 1990, a depressão ocupava o quarto lugar no ranking das doenças que mais acometiam a população mundial e a projeção é que chegue a ocupar o segundo lugar em 2020. Isto exemplifica a gravidade deste assunto para a saúde pública e torna imprescindível que os governos encarem essas doenças como uma epidemia a ser combatida (LOPEZ; MURRAY, 1998).

Sabe-se que os transtornos mentais acometem de maneira diferente homens e mulheres tanto em proporções quanto em sintomas específicos. Alguns são mais comuns no sexo masculino, como a esquizofrenia que é 1,4 vezes mais comum neles, diferentemente da depressão, estresse pós-traumático e transtornos de ansiedade, sendo este último duas vezes mais comum em mulheres (BEERY; ZUCKER, 2011; HORST et al., 2011).

Contraopondo-se a esta realidade, em termos de ensaios clínicos de estágio avançado, quando se testam os fármacos em humanos, a maioria dos voluntários é homem, o que dificulta conhecer o total efeito da droga, visto que não é possível analisar os seus possíveis efeitos ao longo do ciclo de flutuação hormonal das mulheres (HORST et al., 2011). A fim de reduzir este contraste, desde 1993 o Instituto Nacional da Saúde dos Estados Unidos obriga que experimentos clínicos sejam realizados tanto homens quanto mulheres. Porém, até hoje pouca atenção tem sido dada a este ponto na pesquisa pré-clínica.

Grande parte das pesquisas biomédicas pré-clínicas usam somente machos em seus experimentos. As poucas que incluem as fêmeas, o fazem numa proporção bem menor (SIMPSON; KELLY, 2012). Por exemplo, nas Neurociências, os

trabalhos publicados no ano de 2009 utilizaram mais machos que fêmeas numa proporção de 5,5 para uma, enquanto na farmacologia este índice foi de 5 para uma (BEERY; ZUCKER, 2011).

Especula-se que a principal razão para que ocorra essa baixa utilização de fêmeas nestas pesquisas, seja a íntima relação com as questões hormonais, visto que os animais são altamente influenciados pela oscilação hormonal, que podem alterar o comportamento (BEERY; ZUCKER, 2011; SIMPSON; KELLY, 2012).

## **1.2 Ciclo estral das ratas**

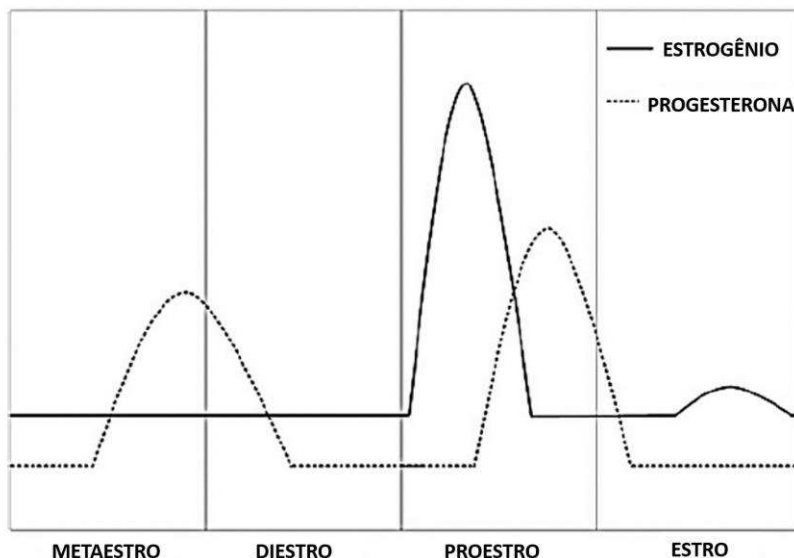
O ciclo estral das ratas é relativamente curto, dura em torno de 4-5 dias e neste pequeno intervalo ocorrem mudanças fisiológicas no ovário, no útero e na vagina dependentes de cada uma das 4 fases (FITZGERALD, 1987). As fases são nomeadas de proestro, estro, metaestro e diestro sendo que cada uma apresenta características e duração específicas (HEBEL; STROMBERG, 1986; FITZGERALD, 1987).

O diestro tem a predominância de leucócitos, acompanhado de células epiteliais nucleadas e podendo conter células corneificadas; o proestro tem predominância de células nucleadas, podendo aparecer células corneificadas; o estro contém exclusivamente células corneificadas; e o metaestro contém uma grande quantidade de leucócitos em blocos ou dispersos, em menor quantidade do que no diestro, acompanhado de células corneificadas e nucleadas (MARCONDES; BIANCHI; TANNO, 2002)

O metaestro consiste no período pós-ovulatório e apresenta aumento nos níveis de progesterona. Num segundo momento, ainda nesta fase, a progesterona cai abruptamente. O proestro é marcado por um aumento de estrogênio, seguido do aumento de secreção de progesterona, que precede o período da ovulação. Este fenômeno caracteriza a fase estro, fase em que os hormônios voltam aos seus níveis basais e as fêmeas se mostram mais receptivas aos machos (SIMPSON; KELLY, 2012).

Em geral, o proestro e estro duram cerca de 12 horas, o metaestro 21 horas e o diestro 57 horas (LONG; EVANS, 1922; HEBEL; STROMBERG, 1986). Entretanto, estes números variam

de acordo com os autores. Por exemplo, Andersen *et al* (2004) sugerem que o estro possui 25 horas, enquanto o metaestro tem apenas 8 horas de duração. A sequência proestro, estro, metaestro e diestro caracteriza o ciclo estral de fêmeas que estão ciclando regularmente (Figura 1).



**Figura 1- Representação da flutuação dos hormônios (estrogênio e progesterona) dividida em cada uma das fases do ciclo estral de ratas. Adaptado de Simpson e Kelly (2012).**

O baixo uso de fêmeas nos testes comportamentais se deve principalmente a esta flutuação hormonal que ocorre durante o seu ciclo estral, assim como ocorre nas mulheres no ciclo menstrual. Visto que o número amostral necessário para a comparação correta de todas as fases do ciclo estral aumentaria muito e, por esta razão, os estudos que usam fêmeas em sua maioria ainda focam em fases pré-selecionadas do ciclo ao invés da avaliação de todas as fases. Ou seja, significa dizer que para um experimento completo em que são necessários oito machos, nós necessitaríamos oito fêmeas, que tenham um ciclo regular, para cada fase do ciclo, e que possam ter a fase corretamente

identificada no momento do experimento. Isso elevaria o número total de fêmeas utilizadas para, no mínimo, 32 ratas.

Sabe-se que fêmeas se comportam diferentemente de machos nos mais variados aparatos comportamentais. Por exemplo, já foi visto que elas diferem dos machos na exploração do LCE (labirinto em cruz elevado), com as fêmeas entrando mais e permanecendo mais tempo nos braços abertos e aversivos (STEENBERGEN et al., 1990; JOHNSTON; FILE, 1991) (Tabela 1). Além disso, a flutuação hormonal causada pelo ciclo estral gera alterações no comportamento das fêmeas. Por exemplo, a exploração do LCE e do CA (campo aberto) é distinta entre as fases do ciclo em roedores (MORA; DUSSAUBAT; DÍAZ-VÉLIZ, 1996; MEZIANE et al., 2007). Além de aspectos comportamentais, muitas funções neurais são influenciadas por mudanças hormonais em ratas. Por exemplo, alguns estudos demonstraram que a progesterona tem efeito ansiogênico, interferindo na formação da memória, mas que pode ser revertido na presença do estradiol (DÍAZ-VÉLIZ, 1997).

**Tabela 1- Diferenças entre machos e fêmeas em parâmetros avaliados nos testes comportamentais ( adaptada de Júnior e Morato (2005) )**

<i>Teste Comportamental</i>	<i>Parâmetro</i>	<i>Macho</i>	<i>Fêmea</i>	<i>Referências</i>
LCE	Nº de Entradas braços abertos		↑	Johnston e File, 1991; Steenberg et al., 1990
CA	Deslocamento		↑	Curzon, Haaren e Kennett, 1990; Kennett, Chauloff, Marcou e Curzon, 1986
CA	Defecação	↑		Alonso, Castellano, Afonso e Rodriguez, 1991; Curzon et al., 1990; Kennett et al., 1986

### 1.3 Testes comportamentais

A emocionalidade é um termo muito utilizado atualmente a fim de evitar outros mais antropomórficos, como comportamento tipo ansioso ou depressivo. Esta palavra designa uma experiência psicológica subjetiva que normalmente está associada a alterações comportamentais e/ou fisiológicas (ARCHER, 1973). A emocionalidade depende de fatores genéticos, epigenéticos, ambientais, destacando-se o estresse nesta última classe, além dos fisiológicos, como os hormônios (RAMOS; MORMEDE, 1997).

Sabe-se também que ao longo da evolução das espécies muitos mecanismos de defesa foram conservados, dentre os quais o rato faz parte. Isso dá subsídios para que este animal seja um modelo para investigação das bases neurobiológicas de problemas relacionados com emocionalidade em humanos, ainda que estes animais não apresentem uma patologia.

Os testes do CA, LCE e CBP (caixa branca/preta) são alguns dos mais utilizados para se obter medidas de emocionalidade em estudos que envolvem a avaliação da alteração comportamental provocada por fármacos ansiogênicos e ansiolíticos. (GRIEBEL; HOLMES, 2013)

Estes três testes comportamentais se baseiam no conflito entre a aproximação/esquiva de áreas aversivas (centro do CA, braços abertos do LCE e área iluminada da CBP) (OHL, 2005). Entretanto, estes testes permitem uma única avaliação com cada animal, pois o significado psicológico dos testes é alterado após o conhecimento prévio do aparato (RAMOS, 2008).

É notável a importância destes aparatos para a triagem e desenvolvimento de fármacos eficazes para algumas doenças psiquiátricas (DAWSON; TRICKLEBANK, 1995). Entretanto, por vezes torna-se necessário usar mais de um teste, pois cada teste tem suas peculiaridades e esta pré-exposição modifica a forma de lidar com o aparato subsequente (RAMOS et al., 2008).

Além disso, as medidas comportamentais obtidas nos 3 testes, e que deveriam apontar e corroborar no mesmo sentido, raramente possuem uma correlação estatística alta (RAMOS, 2008). Como exemplo, o centro do CA e os braços abertos do LCE, que são as partes aversivas destes testes. Quanto menor o tempo, menos ansioso o animal está naquele momento. Então, aquele animal que passa mais tempo explorando o centro do CA

deveria se comportar da mesma forma no LCE (explorando mais as partes aversivas dos 2 testes). Entretanto, nem sempre isso é observado. Então, pode-se pensar que: a) estas medidas não são as mais adequadas para tais características emocionais, ou então b) que diferentes testes não avaliam exatamente o mesmo fenômeno biológico (RAMOS; MORMEDE, 1997; RAMOS, 2008).

No LCE, a resposta às drogas ansiolíticas e ansiogênicas diminui ou mesmo desaparece quando os animais são previamente expostos ao mesmo aparato de teste, um fenômeno conhecido como tolerância à primeira exposição (*one-trial tolerance*) (FILE, 1990).

#### 1.4 Teste triplo

Proposto por Ramos et al. (2008), o teste triplo (TT) foi criado com a intenção de reduzir as interferências de um teste em relação ao outro. Para isso os pesquisadores integraram três dos mais tradicionais testes comportamentais de ansiedade: CA, LCE e CBP. Os autores demonstraram que as medidas de ansiedade e locomoção no TT foram similares usando cada aparato de forma combinada ou separada, mas em ambas as condições cada teste produziu seu próprio fator de ansiedade relativo. Quando duas drogas benzodiazepínicas, clordiazepóxido (CDZ) e diazepam, foram administradas houve aumento na entrada nos braços abertos do LCE. Ao utilizar o pentilenotetrazol (PTZ), um fármaco ansiogênico, houve redução da exploração nas áreas aversivas: os braços abertos do LCE, centro do CA e compartimento claro da CBP.

Além disso, Wehrmeister et al. (2010) verificaram que o efeito ansiolítico do CDZ poderia persistir após vários dias de teste sugerindo assim que o efeito da tolerância à primeira exposição pode ser evitado no TT, o que é uma vantagem em relação ao uso isolado de cada aparato.

Assim, o TT mostra grande potencial para o estudo de ansiedade, por ser um método rápido, compreensível para identificação de comportamentos relacionados à ansiedade/emocionalidade e seus componentes subjacentes, medindo simultaneamente e excluindo o efeito da reexposição que poderia criar uma possível memória aversiva.

## 1.5 O QTL e o desenvolvimento da linhagem congênica SLA16

Em 1999, Ramos et al. propuseram um modelo genético com duas linhagens isogênicas de ratos. Ele era constituído pelas linhagens LEWIS (LEW) e SHR (sigla do inglês para “ratos espontaneamente hipertensos”). Este modelo genético tinha como base a diferença significativa de aproximação e esquiva de áreas aversivas, como, por exemplo, o centro do CA ou os braços abertos do LCE. Observou-se que o SHR tem a tendência natural de ir ao centro, enquanto o LEW a evita, mas não há diferenças locomotoras entre as linhagens. Ou seja, ambas exploram igualmente o aparato, diferindo unicamente em relação às áreas exploradas. Essas duas linhagens foram testadas em diferentes aparatos, protocolos e até em diferentes laboratórios do mundo, confirmando as suas diferenças e a validade deste modelo genético.

Quando há uma diferença comportamental bem nítida e que é reproduzível em diferentes locais, pode-se inferir que esta diferença deve ter bases genéticas fortes e assim investigá-las. Para estudar estas bases do comportamento de esquiva e aproximação das áreas aversivas destas linhagens foi utilizado um método de mapeamento genético. Descobriu-se, então, que no cromossomo 4 dos ratos há uma região de aproximadamente 80 milhões de pares de base que contem genes que influenciam a aproximação ao centro do CA. Esta região é chamada pelo RGD na atualidade de QTL (do inglês *loci* para características quantitativas) *Anxrr16* (LAULEDERKIND et al., 2013).

O QTL é expresso como uma curva de probabilidade, quanto mais alta o pico desta curva, maior a chance de encontrar naquela região cromossômica um gene que afeta o comportamento em questão. Ao longo dos anos com outras pesquisas, esta região se mostrou não específica, o que é muito comum. Por exemplo, os ratos P e NP, que são selecionados para consumir ou não álcool, respectivamente, diferem em seus níveis de emocionalidade. Quando eles foram estudados foi descoberto um QTL na região próxima ao *Anxrr16* que afetava consumo de álcool. Esta é apenas uma ilustração de quando se começou a se estudar esta região do cromossomo 4 e considerá-la importante para características emocionais independentes da linhagem ou situação submetida.

Após correlacionar a região genômica com determinados comportamentos, com a finalidade de saber quais são os genes e seus papéis específicos, foi empregada a técnica de construção de uma linhagem congênica. Desta maneira a região genômica de *Anxrr16* foi isolada em uma nova linhagem de ratos (PEREIRA, 2010). A estratégia de construção de linhagem congênica basicamente é feita a partir da transferência de uma região genômica de uma linhagem doadora (área onde se tem os QTL de interesse) para uma linhagem receptora, detentora do restante do genoma que a linhagem congênica herdará. Neste caso, foi utilizada a linhagem LEW, que doou a região onde os QTLs estão contidos, enquanto a SHR (receptora) proveu o restante do genoma. No fim do processo, após seguidos ciclos de retrocruzamento e seleção por marcadores moleculares, obteve-se uma linhagem congênica (SLA 16), sendo ela geneticamente idêntica à linhagem receptora (SHR), excetuando a parte do QTL transferido (MEDEIROS et al., 2014).

Quando se constrói uma linhagem é comum que se perca a característica, pois apesar de selecionar uma região, se perdem outras regiões importantes e, assim acaba-se perdendo as características iniciais de interesse, pois são diversas regiões que contribuem para estas características. O primeiro passo após criar a linhagem, foi validá-la no teste do CA, sendo a linhagem SHR seu controle pelo fato de praticamente todo genoma da linhagem congênica ser igual ao dela. Assim, todas as diferenças comportamentais apresentadas neste teste entre a linhagem SLA16 e SHR são atribuídas àquela região do QTL. Os efeitos do QTL *Anxrr16* foram confirmados tanto em machos quanto em fêmeas, ou seja, os animais congênicos se aproximam ainda mais do centro do CA que os SHR. Além disso, foram encontradas algumas outras diferenças comportamentais que não eram inicialmente esperadas e provavelmente sejam devidas aos genes que vieram juntos no processo de produção da linhagem congênica.

Deste modo, uma nova linhagem congênica, denominada SHR.LEW-*Anxrr16* (SLA16) foi construída no Laboratório de Genética do Comportamento – UFSC, com o intuito de melhor compreender os efeitos do QTL *Anxrr16* sobre comportamentos relacionados à ansiedade (PEREIRA, 2010; MEDEIROS, 2012). Atualmente, a linhagem congênica SLA16 está estabelecida e encontra-se na nona geração de endocruzamento



proporcionando assim um modelo único para estudar os genes contidos neste *locus*, que estão relacionados à ansiedade humana.

Izídio et al. (2011), sugeriram que a variação natural nos níveis hormonais presente ao longo do ciclo estral das fêmeas podem influenciar os efeitos deste *locus* sobre o comportamento ao demonstrar que fêmeas em diestro-proestro (DP) apresentam o QTL na mesma região genômica que os machos, enquanto que fêmeas em estro-metaestro (EM), não possuem. Este resultado recente sugere que os genes contidos na região de *Anxrr16* podem estar sobre a influência de fatores ligados ao ciclo estral das fêmeas.

## **1.6 Sistema dopaminérgico e seu envolvimento nos comportamentos**

A dopamina (DA) é um neurotransmissor da família das catecolaminas e tem como molécula precursora a L-tirosina, esta sofre uma reação de hidroxilação pela tirosina hidroxilase e assim é convertida em L-DOPA, que por ação da DOPA-descarboxilase é convertida em DA. Recém-formada, a DA é armazenada em vesículas sinápticas e só é liberada via processo de exocitose quando estimulada por impulso nervoso (RANG et al., 2012).

Seus receptores são metabotrópicos acoplados a proteína G podendo ser pré ou pós-sinápticos. Pré-sinápticamente, ela pode atuar nos neurônios inibitórios do tipo D2 presentes nos corpos celulares e nos terminais enquanto que na região pós-sináptica pode agir nos neurônios do tipo D1 e D2 (MISSALE et al., 1998; GRAEFF; GUIMARÃES, 2013). Eles estão presentes no córtex com função de alerta e humor; no sistema límbico influenciando as emoções e o comportamento; no estriado; e nas partes ventral do hipocampo e anterior da hipófise regulando a secreção de prolactina (BJÖRKLUND; DUNNETT, 2007). Existem 5 receptores dopaminérgicos sendo eles divididos em duas classes: os da família D1 (D1 e D5) e da família D2, mais importantes do ponto de vista farmacológico, que são subdivididos em D2, D3 e D4. Os da família D2, acoplados à proteína G inibitória, atuam diminuindo a ação da adenilato ciclase (AC), que reduz a síntese do monofosfato cíclico de adenosina (AMPC). Enquanto os da família D1 ativam a enzima

AC que por sua vez influencia de forma a aumentar a síntese do AMPc (MISSALE et al., 1998; RANG et al., 2012).

Muitas alterações das vias dopaminérgicas vem sendo relacionadas com consumo de álcool e abuso de drogas, a ansiedade, transtorno de déficit de atenção e hiperatividade, esquizofrenia e a doença de Parkinson (GRAEFF; GUIMARÃES, 2013; ADAMCZYK; SOLECKA; STROSZNAJDER, 2005).

A alfa-sinucleína é uma proteína que é expressada ao longo de todo o sistema nervoso central e é mais abundante nos terminais pré-sinápticos do hipocampo. Uma função desta proteína é inibir a atividade da tirosina-hidroxilase diminuindo a síntese das catecolaminas, inclusive da dopamina (ADAMCZYK; SOLECKA; STROSZNAJDER, 2005).

O haloperidol é um antagonista do receptor D2 da dopamina e causa inibição das funções psicomotoras. Esta droga é utilizada na clínica como tratamento para a esquizofrenia, quando administrada em ratos mostram uma diminuição na locomoção. Seu mecanismo de ação é o bloqueio seletivo dos receptores do tipo D2 (BJÖRKLUND; DUNNETT, 2007; RANG et al., 2012).

## **1.7 Hipóteses**

Por fim, as hipóteses deste trabalho são: (1) há influência hormonal, decorrentes das fases do ciclo estral, no comportamento das ratas SLA16 e SHR submetidas ao teste triplo e que (2) haja diferença na responsividade entre as ratas das linhagens SLA16 e SHR, bem como entre os diferentes tratamentos.

## 2. OBJETIVOS

Assim, devido a todos os fatos apresentados anteriormente na introdução, o presente estudo teve o objetivo de:

### 2.1 Objetivo Geral:

Caracterizar fenotipicamente os efeitos do QTL *Anxrr16* pelo uso de ratas SLA 16 e SHR.

### 2.2 Objetivos Específicos:

No experimento 1, sobre o teste triplo:

- a) Testar as fêmeas em idade reprodutiva da linhagem congênica SLA16 e isogênica SHR no TT em todas as fases do ciclo estral;
- b) Retestar as fêmeas da linhagem congênica SLA16 e SHR no TT em todas as fases do ciclo estral, durante 4 dias consecutivos.

No experimento 2, sobre a influência do haloperidol

- a) Avaliar o efeito do bloqueio dos receptores D2 sobre o comportamento das fêmeas da linhagem congênica SLA16 e isogênica SHR submetidas ao teste do campo aberto.
- b) Avaliar o efeito do bloqueio dos receptores D2 sobre o comportamento das fêmeas da linhagem congênica SLA16 e isogênica SHR submetidas ao teste do labirinto em cruz elevado.



### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

As linhagens de ratos, SLA16 e SHR, utilizadas no presente estudo foram mantidas através do acasalamento entre irmãos como o padrão para colônias consanguíneas do Laboratório de Genética do Comportamento. Quatro semanas após o nascimento, os animais foram desmamados e separados por sexo. Foram colocados em gaiolas de plástico padrão com 5 indivíduos cada com água e ração disponíveis *ad libitum*. Eles ficaram num biotério sob um ciclo claro/escuro de 12/12h (luzes acessas às 07h00min) com a temperatura sempre mantida a  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ .

Para este experimento utilizou-se fêmeas em idade reprodutiva, com três meses de vida, totalizando 66 fêmeas. Todos os procedimentos realizados foram aprovados pelo do Comitê de Ética do Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina e estão no protocolo nº: PP00903.

#### 3.2 Experimento 1- Teste Triplo e ciclo estral

##### 3.2.1 Avaliação da fase do ciclo estral

A fim de avaliar o período do ciclo estral em que as ratas se encontravam, foram realizadas coletas de secreção vaginal com uma pipeta Pasteur e água destilada. Com este material eram feitas lâminas a fresco com corante azul de metileno e observava-se em microscópio óptico no aumento de 40x. A determinação da fase na qual a fêmea se encontrava foi realizada a partir da análise dos tipos e das quantidades celulares (tabela de critérios- tabela 2).

**Tabela 2- Critérios adotados para caracterizar a fase do ciclo estral.**

Fases do ciclo estral:	Diestro	Proestro	Estro	Metaestro
TIPOS CELULARES	Predomínio de leucócitos	Predomínio de células epiteliais	Predomínio de células corneificadas	Distribuição regular de todos os tipos celulares

As ratas foram analisadas por quatro dias seguidos antes do início dos testes comportamentais com a finalidade de verificar se ciclo estral estava ocorrendo de maneira adequada. Esta verificação era sempre feita no período vespertino, entre às 14 e 15 horas. Do quinto dia ao oitavo, as fêmeas, que ciclaram corretamente nos 4 primeiros dias, passavam primeiro pelo aparato e após retirava-se o ciclo, a fim de reduzir qualquer interferência que esta manipulação pudesse causar no experimento comportamental. Os experimentos ocorreram sempre no período vespertino, entre as 13:00 e 18:00. Os animais mudaram de grupo a cada dia, de acordo com a fase do ciclo as fêmeas estavam.

### **3.2.2. Aparato teste triplo**

Para este teste seguiu-se o protocolo descrito a seguir. O TT consiste na junção dos aparatos CA, LCE e CBP. O LCE encontra-se no centro do TT e serve como ligação entre o CA e a CBP. Assim, no teste triplo tem-se o CA, o qual tem uma de suas quatro paredes conectada à um dos braços fechados do LCE por uma abertura central (10 cm de largura por 40 cm de altura) que permite livre acesso a todo o labirinto e, conseqüentemente, à CBP. Na extremidade do outro braço fechado do LCE há uma abertura (10 x 7 cm) conectando-o a CBP. Essa abertura encontra-se no centro de uma das paredes do compartimento preto da caixa, e, oposta a essa, existe outra pequena abertura (7x7 cm) ligando os dois compartimentos da CBP. O TT foi disposto a 52 cm do chão para que as características aversivas dos braços abertos do LCE fossem mantidas. Os experimentos foram realizados em ambiente com baixa luminosidade, com o CA apresentando 10 lux, o LCE 15 lux e a CBP 20 lux no compartimento preto e 750 lux no compartimento branco sendo que cada rata foi colocada no centro do CA e pode explorar livremente os aparatos. Foram filmadas por uma câmera posicionada acima do aparato e gravados por um sistema de monitoramento de segurança por 15 minutos para posterior avaliação.

Neste teste foram avaliadas as seguintes medidas comportamentais: locomoção periférica e central, tempo na periferia e no centro do campo aberto; entradas nos braços abertos, centro e fechados, tempo nos braços abertos e fechado

no LCE; número de entradas no compartimento branco e no compartimento preto, tempo em ambos os compartimentos da caixa branca e preta. Após cada animal ser testado, o aparato foi limpo com álcool 10% e seco com papel toalha.

### **3.3 Experimento 2-Haloperidol**

#### **3.3.1. Fármaco**

Utilizou-se o haloperidol a fim de avaliar as mudanças comportamentais ocorridas pela administração de um antagonista dos receptores dopaminérgicos D2. Os grupos de animais receberam uma única dose de 0,25 mg/kg (n=7), 0,5 mg/kg (n=7) ou salina (NaCl 0,9%) (n=6) pela via intraperitoneal e 30 minutos após, foram expostos primeiramente no CA e imediatamente após ao LCE. As doses foram escolhidas de acordo com um dos poucos estudos que envolviam haloperidol injetado via intraperitoneal em SHR.

#### **3.3.2 Testes comportamentais**

##### **3.3.2.1 Campo aberto (CA):**

Este teste foi feito em um aparato quadrado, medindo 100 x 100 cm. Sua base composta de 25 quadrados de (20x20 cm) sendo 9 centrais e considerados a parte aversiva do aparato e outros 16 próximos às paredes (medem 40 cm de altura) e portanto menos aversivos. A luminosidade no centro do aparato mede 7 lux. Os animais foram sempre inseridos no centro do CA e as variáveis a serem avaliadas foram filmadas por uma câmera posicionada acima do aparato e gravados por um sistema de monitoramento de segurança por 5 minutos: locomoção na periferia (quadrados adjacentes às paredes), locomoção central e tempo no centro.

##### **3.3.2.2 Labirinto em cruz elevado (LCE)**

Este aparato apresenta 4 braços (2 abertos e 2 fechados) em forma de cruz, cada um deles medindo 45x10 cm de largura, sendo os braços opostos fechados com paredes medindo 50 cm de altura e os outros dois são abertos. Há uma plataforma central medindo 10 x 10 cm que dá acesso a qualquer um dos 4 braços.

O labirinto fica a 66 cm do chão e iluminação no centro do aparato foi mantida em 12 lux. Cada rato era colocado nesta parte central e assim como no CA teve seu comportamento gravado por 5 minutos com uma câmera posicionada acima do labirinto. As variáveis analisadas foram: tempo nos braços fechados, tempo nos braços abertos, número de entradas nos braços abertos e número de entradas nos braços fechados. Estas medidas só foram consideradas quando a rata passava com as 4 patas da plataforma central para cada braço.

### 3.4 Análises estatísticas

Todos os dados estão representados como a média  $\pm$  erro padrão. Todas as análises estatísticas foram realizadas no *software Statistica 7.0* (Statsoft, Tulsa, OK, EUA). No experimento 1, no TT, foram realizadas ANOVA (Análise de variância) de duas vias (fatores ciclo e linhagem), separadas por dia (1 à 4). No experimento 2, o efeito comportamental do haloperidol sobre a SLA16 e seu controle isogênico também foi avaliado por meio de ANOVA de duas vias, mas neste caso os fatores principais foram linhagem e tratamento. Em ambos os experimentos os dados foram considerados significativos quando o valor de p foi menor que 0,05 ( $p < 0,05$ ). Quando necessário foi utilizado o teste post-hoc de Duncan. Todos os gráficos foram produzidos através do *software Graph Pad 5.0* (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).



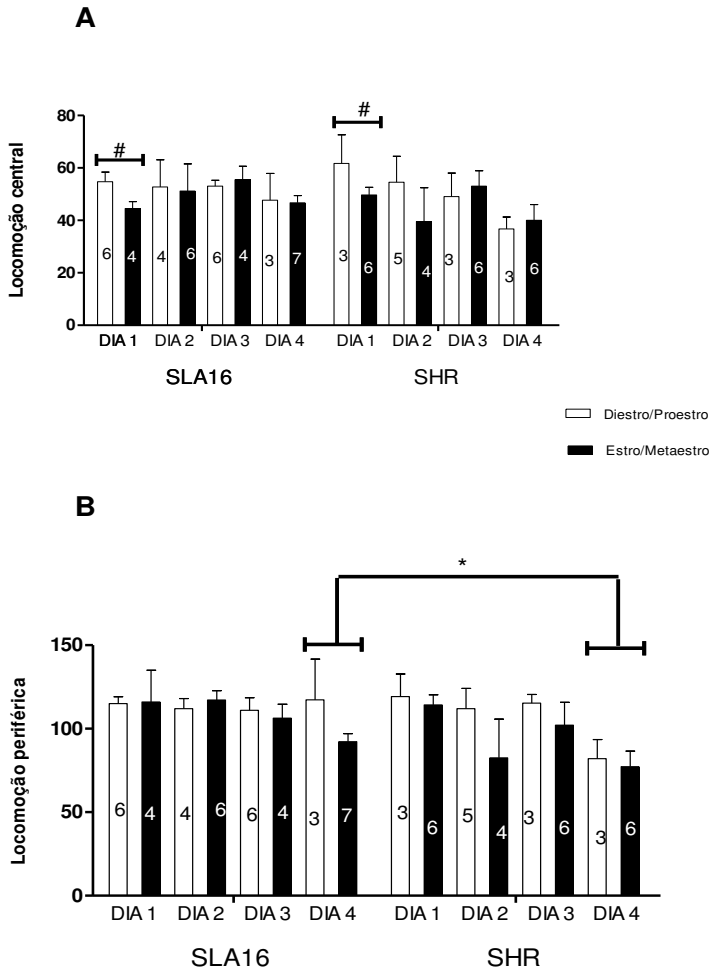
## 4. RESULTADOS

### 4.1 Teste Triplo- experimento 1

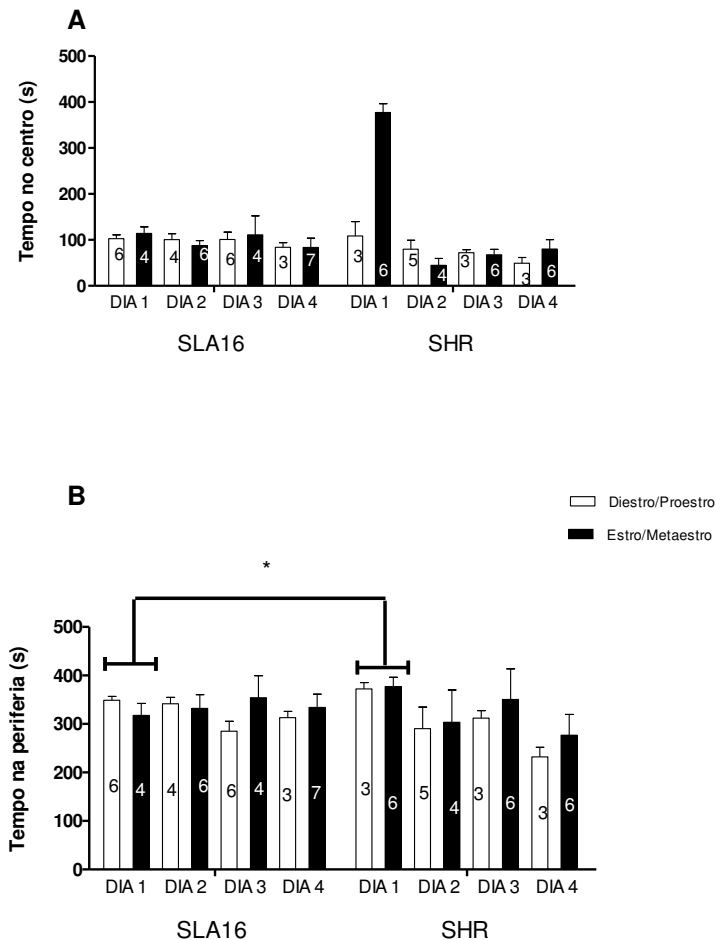
Os resultados do TT estão representados nas Figuras 2 a 7. Para diminuir a quantidade de gráficos, optou-se por colocar os resultados experimentais de todos os dias de teste nos mesmos gráficos. Entretanto, a ANOVA de 2 vias é específica para cada dia.

Na medida de locomoção central (Figura 2A), no dia 1, as fêmeas de ambas as linhagens em DP se locomoveram mais no centro ( $F=1,15$ ;  $p<0.05$ ), do que as fêmeas em EM. Na medida locomoção periférica (Figura 2B), ocorreu uma diferença no dia 4 entre as linhagens, onde a linhagem SLA16 explorou mais esta área que a SHR ( $F= 1, 15$ ;  $p<0,05$ ).

Na medida tempo no centro (Figura 3A), nenhuma diferença foi encontrada, já no tempo na periferia (Figura 3B) no dia 1 há uma diferença significativa entre as linhagens, com a linhagem SLA16 explorando menos a periferia que a SHR ( $F=1,15$ ;  $p<0,05$ ).



**Figura 2 - Locomoção central (A) e periférica (B) das fêmeas em Diestro-Proestro e Estro-Metaestro das linhagens SLA16 e SHR testadas durante 4 dias repetidos no teste triplo. As barras representam a média  $\pm$  erro padrão. (\*) representa diferença entre linhagens ( $p < 0,05$ ); (#) representa diferença entre Diestro-Proestro e Estro-Metaestro ( $p < 0,05$ ). Os números representados dentro de cada barra correspondem ao número de animais de cada grupo. ANOVA de 2 vias.**



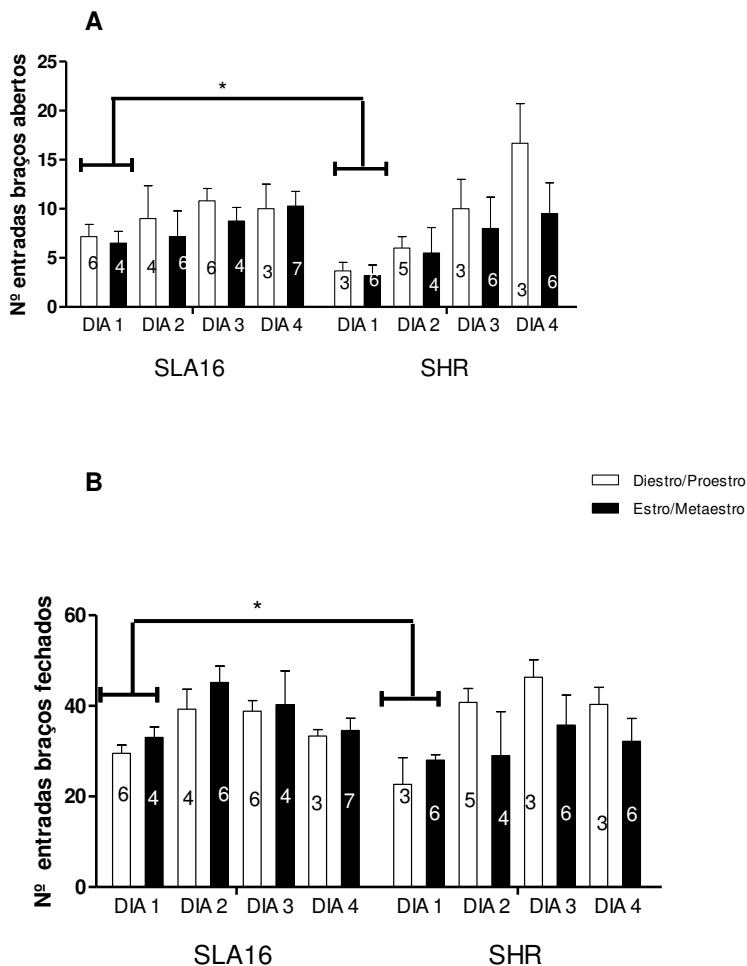
**Figura 3 - Tempo no centro (A) e na periferia (B) das fêmeas em Diestro-Proestro e Estro-Metaestro das linhagens SLA16 e SHR testadas durante 4 dias repetidos no teste triplo. As barras representam a média  $\pm$  erro padrão. (\*) representa diferença entre linhagens ( $p < 0,05$ ); (#) representa diferença entre Diestro-Proestro e Estro-Metaestro ( $p < 0,05$ ). Os números representados dentro de cada barra correspondem ao número de animais de cada grupo. ANOVA de 2 vias.**

Na medida número de entradas nos braços abertos, a linhagem SLA16 tem um número de entradas maior que a SHR no dia 1 ( $F=1,15$ ;  $p<0,05$ ) (Figura 4A). Da mesma maneira, a linhagem SLA16 tem um número de entradas nos braços fechados maior que a SHR no dia 1 (Figura 4B) ( $F=1,15$ ;  $p<0,05$ ).

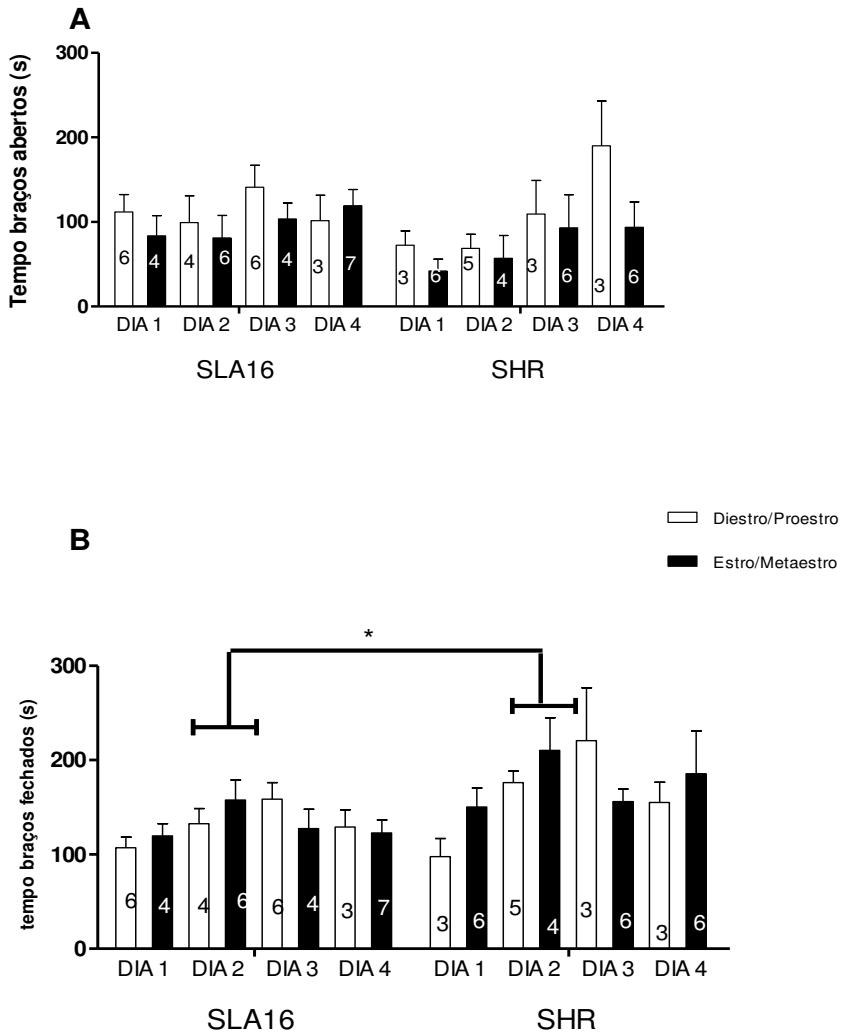
Na medida tempo nos braços abertos (Figura 5A) não foi encontrada nenhuma diferença significativa. Quanto ao tempo gasto nos braços fechados (Figura 5B), a linhagem SLA16 tem um índice menor comparado a SHR no dia 2 ( $F=1,15$ ;  $p<0,05$ ).

Na medida de entradas no compartimento claro as fêmeas que estavam em DP apresentaram mais entradas do que as fêmeas em EM no dia 4 ( $F=1,15$ ;  $p<0,05$ ) (Figura 6A). Já a medida de entradas no compartimento escuro (Figura 6B) não mostrou nenhuma diferença significativa.

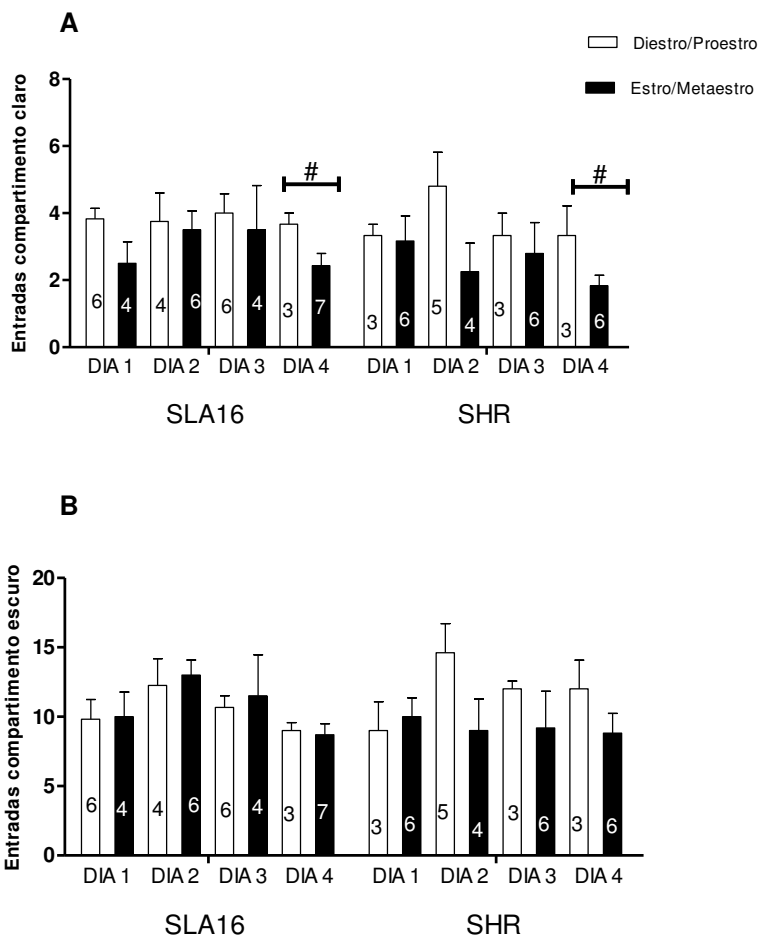
As medidas de tempo gasto no compartimento claro (Figura 7A) e escuro (Figura 7B) não mostraram nenhuma diferença significativa.



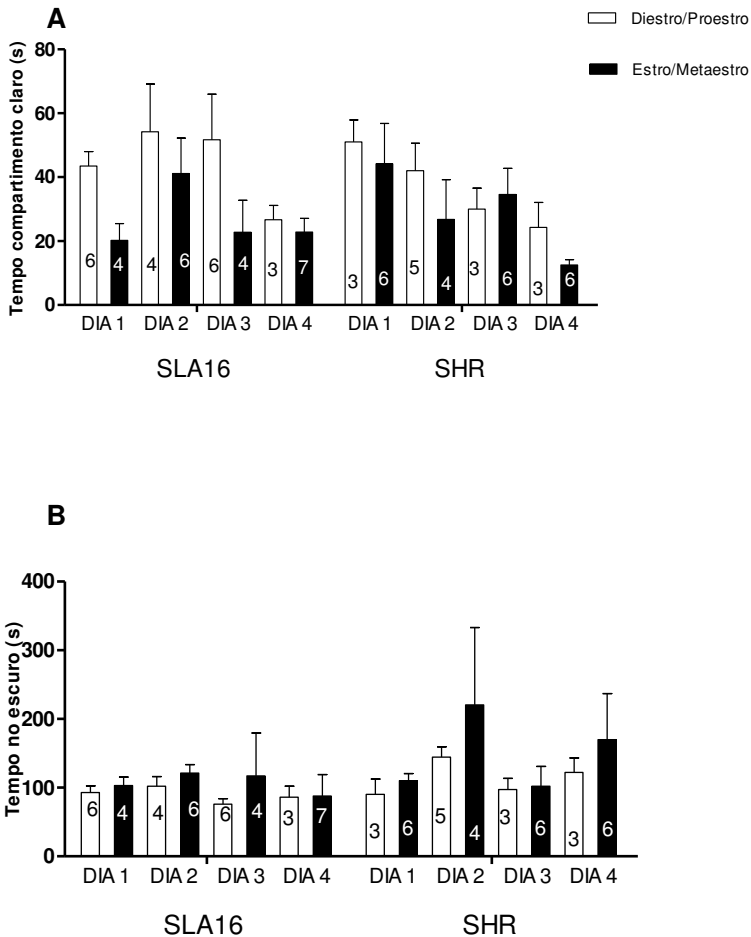
**Figura 4 - Número de entradas nos braços abertos (A) e fechados (B) das fêmeas em Diestro-Proestro e Estro-Metaestro das linhagens SLA16 e SHR testadas durante 4 dias repetidos no teste triplo. As barras representam a média  $\pm$  erro padrão. (\*) representa diferença entre linhagens ( $p < 0,05$ ); (#) representa diferença entre Diestro-Proestro e Estro-Metaestro ( $p < 0,05$ ). Os números representados dentro de cada barra correspondem ao número de animais de cada grupo. ANOVA de 2 vias.**



**Figura 5 - Tempo nos braços abertos (A) e fechados (B) das fêmeas em Diestro-Proestro e Estro-Metaestro das linhagens SLA16 e SHR testadas durante 4 dias repetidos no teste triplo. As barras representam a média  $\pm$  erro padrão. (\*) representa diferença entre linhagens ( $p < 0,05$ ); (#) representa diferença entre Diestro-Proestro e Estro-Metaestro ( $p < 0,05$ ). Os números representados dentro de cada barra correspondem ao número de animais de cada grupo. ANOVA de 2 vias.**



**Figura 6 - Número de entradas (A) compartimento claro e (B: compartimento escuro) s fêmeas em Diestro-Proestro e Estro-Metaestro das linhagens SLA16 e SHR testadas durante 4 dias repetidos no teste triplo. As barras representam a média ± erro padrão. (\*) representa diferença entre linhagens ( $p < 0,05$ ); (#) representa diferença entre Diestro-Proestro e Estro-Metaestro ( $p < 0,05$ ). Os números representados dentro de cada barra, correspondem ao número de animais de cada grupo. ANOVA de 2 vias.**



**Figura 7 - Tempo (A) no claro e (B) no escuro das fêmeas em Diestro-Proestro e Estro-Metaestro das linhagens SLA16 e SHR testadas durante 4 dias repetidos no teste triplo. As barras representam a média  $\pm$  erro padrão. (\*) representa diferença entre linhagens ( $p < 0,05$ ); (#) representa diferença entre Diestro-Proestro e Estro-Metaestro ( $p < 0,05$ ). Os números representados dentro de cada barra correspondem ao número de animais de cada grupo. ANOVA de 2 vias.**

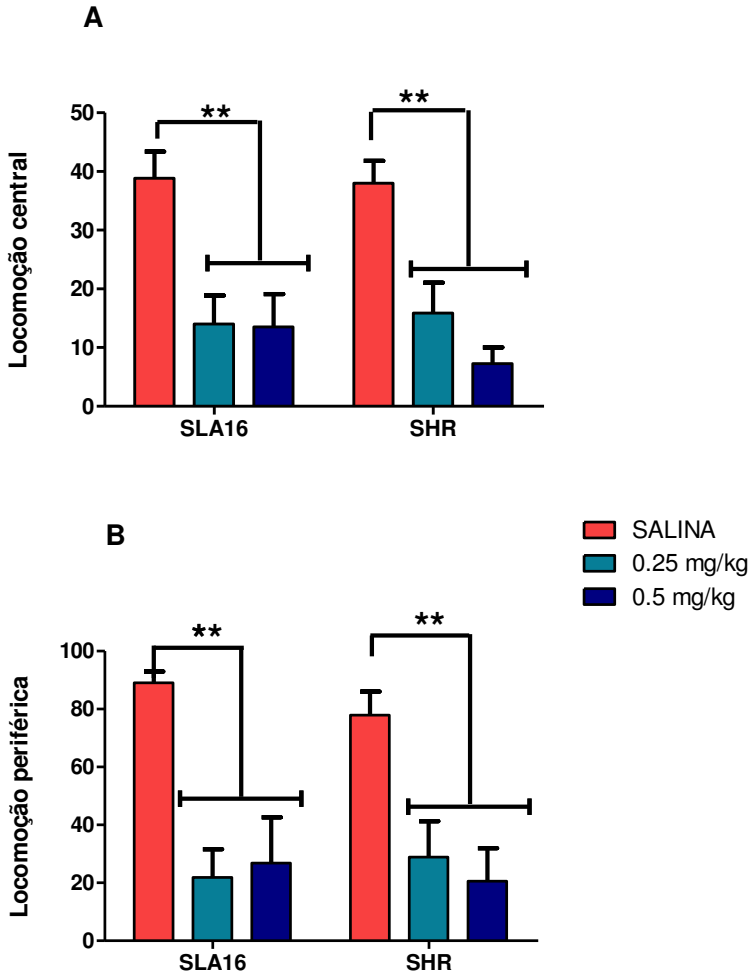


## 4.2 Experimento 2- Haloperidol

Os resultados encontrados no CA e LCE do experimento do Haloperidol estão apresentados nas Figuras 8 a 11. Com relação ao CA, verificou-se quem em ambas as doses, independentemente da linhagem, houve diminuição tanto na locomoção central e periférica ( $F=2,39$ ;  $p<0.01$ ) (Figura 8A e B).

As fêmeas que receberam a dose de 0,5 mg/kg de haloperidol permaneceram mais tempo no centro, a parte aversiva do aparato, enquanto os grupos salina e 0,25mg/kg permaneceram a maior parte do tempo na periferia ( $F=2,39$ ;  $p<0,01$ ) (Figura 9A e B).

No LCE, as fêmeas que receberam salina entraram mais nos braços fechados em relação as que receberam as doses de 0,25 e 0,5 mg/kg de haloperidol ( $F=2,39$ ;  $p<0,01$ ). Observa-se também uma interação linhagem e tratamento ( $p<0,05$ ) nas entradas nos braços abertos, onde o post-hoc de Duncan diz que a linhagem SLA16 é mais sensível aos efeitos do haloperidol (Figura 10). Já os tempos nos braços abertos e fechados não foram significativamente diferentes (Figura 11).



**Figura 8 - A: Locomoção central no campo aberto. A figura mostra a locomoção central das fêmeas, separadas por linhagem (SHR e SLA16) e doses de haloperidol. B: Locomoção periférica no campo aberto, separadas por linhagem (SHR e SLA16) e doses. (\*\*) representa diferenças entre linhagens ( $p < 0.01$ ). ANOVA de 2 vias.**

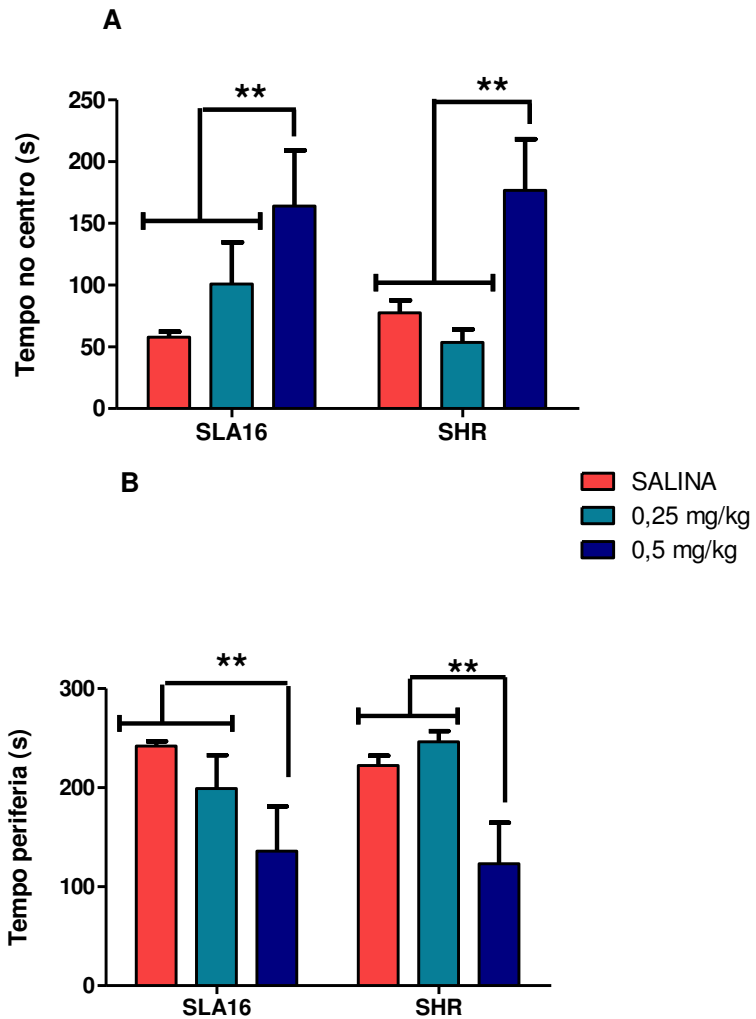
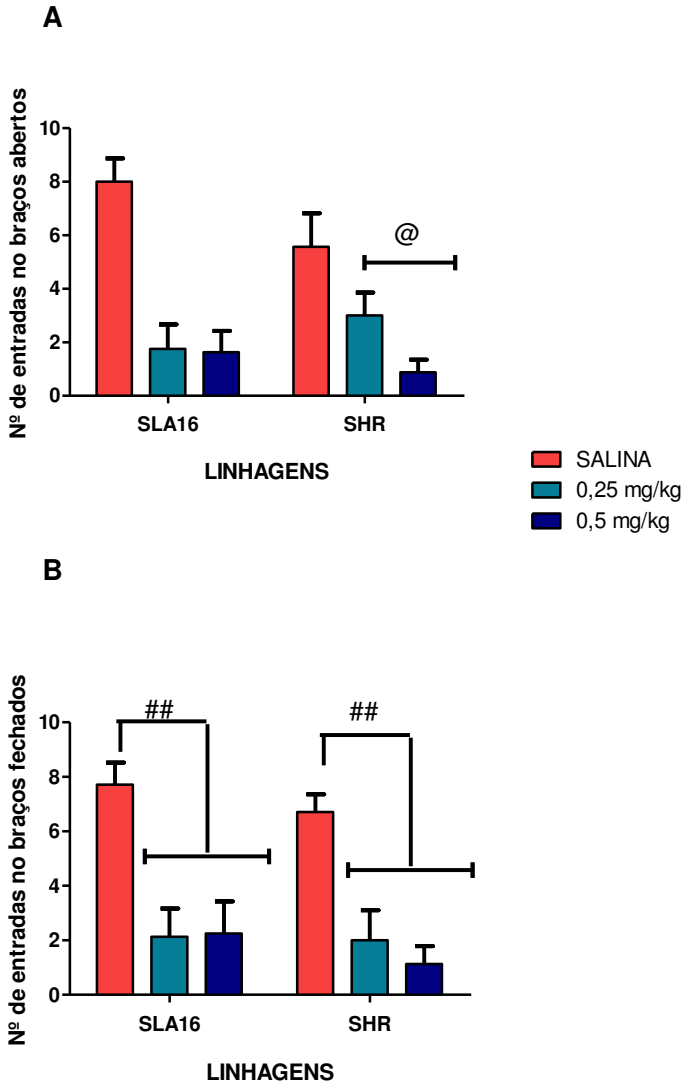


Figura 9 - Tempo (A) centro e (B) periferia do campo aberto medido em segundos. (\*\*) apresentadas por linhagem (SHR e SLA16) e doses representa diferenças entre linhagens ( $p < 0.01$ ). ANOVA de 2 vias.



**Figura 10 - (A) número de entradas nos braços abertos separados por linhagens. (B) entradas nos braços fechados. (\*\*) representa diferenças entre linhagens ( $p < 0.01$ ); (@) representa interação entre linhagem e tratamento. ANOVA de 2 vias.**

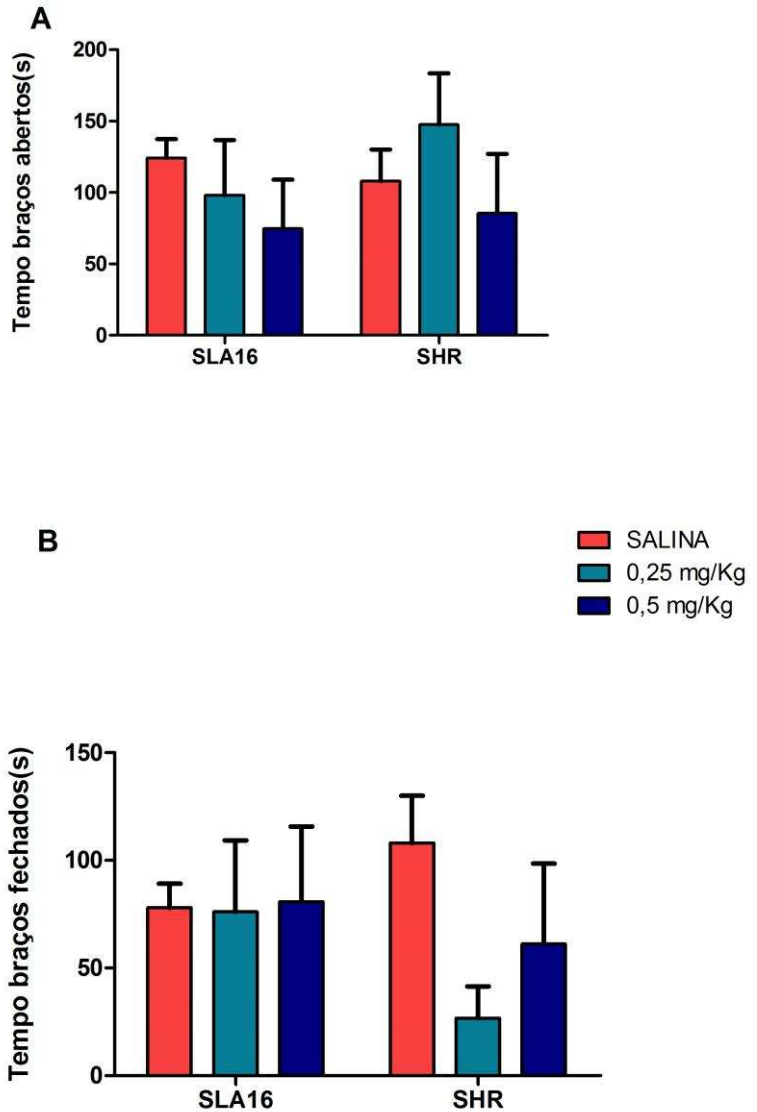


Figura 11- (A) tempo despendido nos braços abertos em segundos. (B) tempo nos braços fechados medido em segundos. ANOVA de 2 vias.



## 5. DISCUSSÃO

Os resultados apresentados no presente estudo, sugerem que existem algumas diferenças específicas entre as diferentes fases do ciclo estral, e também entre as linhagens, no experimento 1. Além destes, uma diferença de sensibilidade entre as linhagens em relação aos efeitos do haloperidol, ao menos no LCE, foi encontrada.

### 5.1 Experimento 1 - Teste triplo

A primeira hipótese experimental de que há diferenças comportamentais em decorrência das fases do ciclo estral no TT é verdadeira. Pois, a locomoção central no CA no dia 1 e no dia 4 para o número de entradas no compartimento claro da CBP apresentaram diferenças significativas ( $DP > EM$ ) entre as fases do ciclo estral. Porém, não foram encontradas diferenças significativas entre as fases na parte do LCE, dentro do TT.

No dia 1, há um efeito da locomoção central do CA entre as fases, com DP se locomovendo mais na área mais aversiva do aparato que EM, independentemente da linhagem. Tal evento pode ter ocorrido apenas no primeiro dia por uma questão de habituação das ratas ao aparato, que pode ser diferente em decorrência da fase do ciclo em que se encontra. Dados de Izídio (2009), apontam o mesmo resultado, com as fêmeas em DP apresentando menor emocionalidade que as EM, no CA, e, conseqüentemente, se aproximando mais da área aversiva (centro do CA).

Ainda sobre as diferenças entre fases do ciclo, no dia 4 houve maior número de entradas no compartimento branco da CBP, a área mais aversiva da caixa, pelas ratas em DP que as na fase EM, mostrando novamente um menor grau de ansiedade pelas fêmeas em DP. Um ponto a ser considerado é que não se sabe o que de fato este aparato integrado significa psicologicamente para os animais. O fato de a locomoção central aparecer alta já no primeiro dia enquanto as entradas no claro aumentam somente no quarto dia, pode indicar que os níveis de ansiedade provocados por cada aparato são distintos. Por exemplo, pode-se imaginar que no primeiro dia o CA seja o estímulo desafiador, talvez pelo fato dos animais começarem ali o teste. Enquanto que com as repetições ao aparato, e a

habituação a ele, outros estímulos, como a CBP, podem assumir este papel de ambiente mais aversivo.

A literatura nos mostra que os animais considerados menos ansiosos se aproximam do centro no CA (PRUT; BELZUNG, 2003), na CBP, a aproximação do compartimento branco também é tida como um índice de baixa ansiedade/emocionalidade (CRAWLEY, 1981; COSTALL et al., 1989). Apesar de os dois testes comportamentais se fundamentarem na esquia de áreas aversivas, pode se pensar que eles devem medir, ao menos em parte, uma mesma dimensão emocional. De fato, muitos dados comportamentais (COSTALL et al., 1989; IZIDIO et al., 2005), farmacológicos (PRUT; BELZUNG, 2003) e genéticos (RAMOS et al., 2003) sugerem que o CA e a CBP podem medir a dimensão emocional. Adicionalmente, as drogas ansiogênicas aumentam a esquia das áreas aversivas de ambos os testes, em contrapartida, fármacos ansiolíticos não apresentam efeito semelhante em ambos os testes (RAMOS et al., 2008).

Ramos (2008) sugere que a estimativa da variabilidade total compartilhada entre o CA e a CBP seja de apenas 5.3%, contra 14.4% ente CBP e LCE e apenas 1,7% entre CA e LCE. Ou seja, mesmo dois testes que supostamente deveriam medir comportamentos ligados à emocionalidade/ansiedade, existem algumas evidências que indicam que estes testes podem muitas vezes mensurar uma dimensão emocional bem diferente (ARCHER, 1973; RAMOS; MORMÈDE, 1997).

Com relação às diferenças entre linhagens encontradas aqui, elas parecem ser mais importantes na primeira exposição ao aparato (dia 1). Por exemplo, no CA na medida de tempo na periferia, (SHR>SLA16); e no LCE, na medida de entradas nos braços abertos (SLA16>SHR). Estes dados corroboram com os resultados dos trabalhos anteriores do nosso laboratório, que sugerem que a linhagem SHR tem maior ansiedade/emocionalidade quando comparado à linhagem congênica SLA16. Adicionalmente, a linhagem SLA16 também apresentou, no dia 1, maior locomoção nos braços fechados do LCE, em comparação à linhagem SHR. Este resultado sugere que esta linhagem apresenta uma maior locomoção geral do que a SHR. Este resultado também encontra apoio na literatura prévia (MEDEIROS et al., 2014) e o nosso laboratório vem investigando a utilização da linhagem SLA16 com um modelo de



hiperatividade associada ao TDAH (transtorno de déficit de atenção e hiperatividade).

Como a estatística utilizada foi a ANOVA de 2 vias para cada medida por dia, não há como comparar ou relacionar o comportamento de cada animal ao decorrer do experimento e confirmar estes achados estatisticamente. Entretanto, pode-se inferir para ser levado em consideração de pesquisas futuras que as fêmeas em DP não apresentam *one-trial tolerance* e que as ratas SLA16 parecem manter, enquanto as SHR parecem aumentar a média de idas aos braços abertos com o passar dos dias.

Assim, neste primeiro experimento sugerimos um perfil de menor ansiedade/emocionalidade das gêmeas DP no TT e em uma situação de repetição de testes. Nossa intenção inicial, no presente trabalho, era analisar separadamente as 4 fases do ciclo estral, mas devido à falta de animais no período em que os experimentos foram realizados, se optou pelo agrupamento em duas fases, como em outro trabalho que era referência para este estudo (IZÍDIO, 2009). Desta maneira, estudos futuros com estas linhagens e aparato, poderão nos dizer se diestro e proestro tem realmente o mesmo efeito de diminuição da ansiedade/emocionalidade, ou se existe um perfil diferencial entre estas duas fases, que foram aqui agrupadas.

## **5.2 Experimento 2 - Haloperidol**

A nossa segunda hipótese experimental era de encontrar diferenças de sensibilidade entre as linhagens testadas nos dois aparatos comportamentais nas doses utilizadas de haloperidol.

No teste do CA, na locomoção central e periférica observou-se um efeito geral da droga. Os dados mostram que os animais reduzem em mais de 50% sua exploração no aparato, o que foi observado também em outros estudos que mostram uma inibição das funções psicomotoras tanto em ratos (CALZAVARA et al., 2008) quanto em humanos (DOSSENBACH et al., 2004). Esta sensibilidade pode ser influenciada por fatores relacionados às questões hormonais, como mostrado em outros trabalhos com pacientes diagnosticados com esquizofrenia (KULKARNI et al., 2011) que apresentam uma maior resposta ao antipsicótico ao fazerem um tratamento combinado com estrogênio. Em ratos, a interação haloperidol e estrogênio parece alterar o volume de

áreas cerebrais como CA1 e CA3 do hipocampo e algumas áreas do sistema mesocortical (MADULARU et al., 2015). Estes fatos ajudam a explicar o porquê das ratas parecerem apresentar uma maior sensibilidade e, talvez, precisarem de uma menor dose em relação aos machos.

Ainda no CA, quando comparamos as diferentes doses, as fêmeas responderam de forma igual ao fármaco, não ocorrendo, assim, distinção no comportamento observado. Os dados sugerem características de sedação clássica, o chamado efeito piso, já na dose mais baixa empregada neste estudo. No LCE, o padrão de comportamento é muito semelhante ao do CA, a exploração diminui bruscamente já na menor dose, exceto nos braços abertos. Este ponto será posteriormente avaliado no nosso laboratório, pois talvez doses menores poderão revelar perfis farmacogenéticos distintos entre as duas linhagens.

Fato este que já foi observado na medida de entrada nos braços abertos do LCE. Nesta medida, observa-se um efeito farmacogenético claro, mostrado pela interação entre linhagem e tratamento, visto que a linhagem SLA responde da mesma maneira em ambas as doses, enquanto a linhagem SHR apresenta uma menor sensibilidade ao fármaco. Denomina-se efeito farmacogenético, o fenômeno de influência de um ou mais polimorfismos genéticos sobre um fármaco (HIRATA; TAVARES; HIRATA, 2006). Desta forma, a diferença de sensibilidade e respostas entre linhagens pode ser explicada pela variação de algum receptor, transportador ou enzima envolvida no sistema dopaminérgico.

Talvez esta interação só tenha sido observada no LCE devido ao fato que as fêmeas passaram previamente no CA. Este ponto será investigado futuramente em nosso laboratório. Ou talvez seja a uma dificuldade inerente do nosso estudo, ou seja, a falta de estudos da literatura com haloperidol intraperitoneal em fêmeas. Como a maioria dos estudos prévios foi realizado em machos, a dose escolhida para as fêmeas, no nosso estudo, parece ter sido muito alta. Sendo assim serão necessárias mais pesquisas futuras inserindo uma dose menor com a metade da menor dose (0,125mg/Kg) para as fêmeas. Outro resultado interessante que deve ser investigado é o fato de que os animais do grupo salina não apresentaram diferenças na medida da locomoção central, uma diferença entre linhagens que

é classicamente observado nos experimentos prévios. Este acontecimento, já visto em trabalhos anteriores deste laboratório, parece ocorrer sempre que a injeção de salina é dada poucos minutos antes dos testes e também será experimentalmente investigado no futuro.

Porém, efeitos farmacogenéticos clássicos têm sido constantemente encontrados pelo nosso grupo de pesquisa, com diferentes drogas, no LCE e no CA (Vendruscolo et al. 2003). Além disso, um experimento em andamento no nosso laboratório, com esta mesma droga utilizada aqui, parece confirmar que machos das linhagens SLA16 e SHR apresentam diferentes sensibilidades aos efeitos agudos do haloperidol (Dados não publicados). Estas diferenças farmacogenéticas entre as linhagens provavelmente tem origem nos genes localizados na região de *Anxrr16* que tem relação, direta ou indireta, com o sistema dopaminérgico.

Um dos principais candidatos a este papel é o gene da alfa-sinucleína. Acredita-se que ela tenha o papel de diminuir a atividade do transportador de dopamina (Wersinger e Sidhu, 2005), levando a uma diminuição de receptação da mesma. Desta maneira, Chiavegatto et al. (2008) investigaram o papel da alfa-sinucleína nas linhagens LEW e SHR e mostraram que os animais da linhagem LEW (os mais ansiosos) tiveram maiores níveis de expressão do gene (*Snca*) e da proteína alfa-sinucleína, quando comparados aos animais SHR. Também, os pesquisadores encontraram um SNP (do inglês, polimorfismo de nucleotídeo único) entre as linhagens Lewis e SHR no gene *Snca* da alfa-sinucleína. Para verificar se este polimorfismo poderia estar influenciando o comportamento *in vivo*, Chiavegatto et al. (2008) testaram uma população de ratos segregantes F2 LEW/SHR no teste do CA e genotiparam os animais em relação a este SNP. Os resultados mostraram que os ratos que continham duas cópias do alelo com o nucleotídeo C apresentaram menores níveis de ansiedade do que os ratos com duas cópias do alelo T. Estes resultados, *in vivo*, reforçaram a hipótese de que o polimorfismo no gene *Snca* poderia participar nas diferenças comportamentais observadas entre animais LEW e SHR. Como explicado no item 1.5 da introdução do presente documento, os animais SLA16 aqui utilizados são idênticos aos SHR, exceto na região do QTL *Anxrr16*, que provem dos animais LEW. Assim, as diferenças farmacogenéticas encontradas, no

presente estudo, que estão provavelmente relacionadas à ansiedade, podem ter origem em genes relacionados ao sistema dopaminérgico, como por exemplo, a alfa-sinucleína.

Outro fato interessante que deve ser investigado é o fato de que os animais do grupo salina não apresentaram diferenças na medida da locomoção central, uma diferença entre linhagens que é classicamente observado nos experimentos prévios. Este fato, já ocorrido anteriormente, parece ocorrer sempre que a injeção de salina é dada poucos minutos antes dos testes e também será experimentalmente investigado no futuro, em nosso laboratório.

## 6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

De forma resumida, este estudo da caracterização fenotípica dos efeitos do QTL *Anxrr16* através do uso de ratas das linhagens congênica SLA16 e SHR identificou que os animais submetidos ao TT apresentam (1) diferenças específicas de ciclo estral na locomoção central do CA no dia 1 e (2) diferenças específicas no compartimento branco da CBP no dia 4 e que (3) no LCE não há influência da fase do ciclo em que a fêmea se encontra.

A respeito do haloperidol foi encontrado um efeito farmacogenético que faz com que SLA16 seja mais sensível ao haloperidol que SHR e, dessa forma, apresente comportamento diferenciado nas duas doses do fármaco na medida de número de entradas nos braços abertos.

Trabalhos com machos com o mesmo protocolo do haloperidol estão sendo feitos para elucidar as diferenças entre as linhagens e para futuras comparações entre sexos. Além disso, está se desenvolvendo um trabalho para investigar o efeito do sistema dopaminérgico nestas linhagens. Outros pontos a serem investigados futuramente são o efeito farmacogenético dos braços abertos do LCE, bem como a interferência da injeção influenciar as diferenças clássicas entre as linhagens no comportamento de locomoção central destes animais.



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMCZYK, A.; SOLECKA, J.; STROSZNAJDER, JB., EXPRESSION OF  $\alpha$ -SYNUCLEIN IN DIFFERENT BRAIN PARTS OF ADULT AND AGED RATS. **Journal Of Physiology And Pharmacology**, [s. l.], v. 56, n. 1, p.29-37, 2005.

ARCHER, John. Tests for emotionality in rats and mice: A review. **Animal Behaviour**, [s.l.], v. 21, n. 2, p.205-235, maio 1973. Elsevier BV. DOI: 10.1016/s0003-3472(73)80065-x. Disponível em:

<<http://api.elsevier.com/content/article/PII:S000334727380065X?httpAccept=text/xml>>. Acesso em: 15 jul. 2015.

BEERY, Annaliese K.; ZUCKER, Irving. Sex bias in neuroscience and biomedical research. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, [s.l.], v. 35, n. 3, p.565-572, jan. 2011. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2010.07.002. Disponível em: <<http://api.elsevier.com/content/article/PII:S0149763410001156?httpAccept=text/xml>>. Acesso em: 01 maio 2015.

BJÖRKLUND, Anders; DUNNETT, Stephen B.. Dopamine neuron systems in the brain: an update. **Trends In Neurosciences**, [s.l.], v. 30, n. 5, p.194-202, maio 2007. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.tins.2007.03.006. Disponível em: <<http://api.elsevier.com/content/article/PII:S0166223607000677?httpAccept=text/xml>>. Acesso em: 15 jul. 2015.

CALZAVARA, Mariana Bendlin et al. Neuroleptic Drugs Revert the Contextual Fear Conditioning Deficit Presented by Spontaneously Hypertensive Rats: A Potential Animal Model of Emotional Context Processing in Schizophrenia?. **Schizophrenia Bulletin**, [s.l.], v. 35, n. 4, p.748-759, 16 fev. 2008. Oxford University Press (OUP). DOI: 10.1093/schbul/sbn006.

CHIAVEGATTO, S et al. Expression of  $\alpha$ -synuclein is increased in the hippocampus of rats with high levels of innate anxiety. **Molecular Psychiatry**, [s.l.], v. 14, n. 9, p.894-905, 22 abr. 2008. Nature Publishing Group. DOI: 10.1038/mp.2008.43.

COSTALL, B. et al. Exploration of mice in a black and white test box: Validation as a model of anxiety. **Pharmacology Biochemistry And Behavior**, [s.l.], v. 32, n. 3, p.777-785, mar. 1989. Elsevier BV. DOI: 10.1016/0091-3057(89)90033-6. Disponível em: <<http://api.elsevier.com/content/article/PII:0091305789900336?httpAccept=text/xml>>. Acesso em: 15 jul. 2015.

CRAWLEY, J. Neuropharmacologic specificity of a simple animal model for the behavioral actions of benzodiazepines. **Pharmacology Biochemistry And Behavior**, [s.l.], v. 15, n. 5, p.695-699, nov. 1981. Elsevier BV. DOI: 10.1016/0091-3057(81)90007-1. Disponível em: <<http://api.elsevier.com/content/article/PII:0091305781900071?httpAccept=text/xml>>. Acesso em: 15 jul. 2015.

DAWSON, Gerard R.; TRICKLEBANK, Mark D.. Use of the elevated plus maze in the search for novel anxiolytic agents. **Trends In Pharmacological Sciences**, [s.l.], v. 16, n. 2, p.33-36, fev. 1995. Elsevier BV. DOI: 10.1016/s0165-6147(00)88973-7. Disponível em: <<http://api.elsevier.com/content/article/PII:S0165614700889737?httpAccept=text/xml>>. Acesso em: 14 jul. 2015.

DÍAZ-VÉLIZ, G. Ketanserin and Anxiety Levels: Influence of Gender, Estrous Cycle, Ovariectomy and Ovarian Hormones in Female Rats. **Pharmacology Biochemistry And Behavior**, [s.l.], v. 58, n. 3, p.637-642, nov. 1997. Elsevier BV. DOI: 10.1016/s0091-3057(97)90004-6. Disponível em: <[http://api.elsevier.com/content/article/PII:S0091-3057\(97\)90004-6?httpAccept=text/xml](http://api.elsevier.com/content/article/PII:S0091-3057(97)90004-6?httpAccept=text/xml)>. Acesso em: 14 jul. 2015.

DOSENBACH, M., et al. *Effectiveness of antipsychotic treatments for schizophrenia: interim 6-month analysis from a prospective observational study (IC-SOHO) comparing olanzapine, quetiapine, risperidone, and haloperidol*. J Clin Psychiatry, 2004. **65**, 312-21.

FILE, Sandra E. One-trial tolerance to the anxiolytic effects of chlordiazepoxide in the plus-maze. **Psychopharmacology**, [s.l.],



v. 100, n. 2, p.281-282, fev. 1990. Springer Science + Business Media. DOI: 10.1007/bf02244419.

FITZGERALD, Maria. Anatomy and embryology of the laboratory rat. **Pain**, [s.l.], v. 33, n. 3, p.390-392, 1988. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). DOI: 10.1016/0304-3959(88)90304-1.

GOUVEIA JÚNIOR, Amauri; MORATO, Silvio. Influências do ciclo estral sobre o desempenho de ratos no labirinto em cruz elevado. **Inter. Psicol.**, [s.l.], v. 6, n. 2, p.141-148, 9 dez. 2005. Universidade Federal do Parana. DOI: 10.5380/psi.v6i2.3301.

GRAEFF, Frederico Guilherme; GUIMARÃES, Francisco Silveira. **Fundamentos da Psicofarmacologia**. São Paulo: Atheneu, 2013. 238 p.

GRIEBEL, Guy; HOLMES, Andrew. 50 years of hurdles and hope in anxiolytic drug discovery. **Nat Rev Drug Discov**, [s.l.], v. 12, n. 9, p.667-687, 30 ago. 2013. Nature Publishing Group. DOI: 10.1038/nrd4075.

HIRATA, Mario Hiroyuki; TAVARES, Vladimir; HIRATA, Rosario Dominguez Crespo. DA BIOLOGIA MOLECULAR À MEDICINA: MÉTODOS COMUMENTE UTILIZADOS EM FARMACOGENÉTICA. **Medicina (ribeirao Preto. Online)**, [s.l.], v. 39, n. 4, p.522-534, 30 dez. 2006. Universidade de Sao Paulo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBiUSP. DOI: 10.11606/issn.2176-7262.v39i4p522-534.

HORST, J. P. Ter et al. Relevance of Stress and Female Sex Hormones for Emotion and Cognition. **Cell Mol Neurobiol**, [s.l.], v. 32, n. 5, p.725-735, 24 nov. 2011. Springer Science + Business Media. DOI: 10.1007/s10571-011-9774-2.

IZIDIO, G. S. et al. Common variations in the pretest environment influence genotypic comparisons in models of anxiety. **Genes Brain Behav**, [s.l.], v. 4, n. 7, p.412-419, out. 2005. Wiley-Blackwell. DOI: 10.1111/j.1601-183x.2005.00121.x.

IZÍDIO, Geison de Souza. **Análise de QTL com estudo de genes candidatos para comportamentos relacionados à emocionalidade e ao consumo de etanol usando um modelo genético composto pelas linhagens de ratos Lewis e SHR.** 2009. 213 f. Tese (Doutorado) - Curso de Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

IZÍDIO, Geison de S. et al. The influence of sex and estrous cycle on QTL for emotionality and ethanol consumption. **Mammalian Genome**, [s.l.], v. 22, n. 5-6, p.329-340, 24 abr. 2011. Springer Science + Business Media. DOI: 10.1007/s00335-011-9327-5.

JOHNSTON, Amanda L.; FILE, Sandra E.. Sex differences in animal tests of anxiety. **Physiology & Behavior**, [s.l.], v. 49, n. 2, p.245-250, fev. 1991. Elsevier BV. DOI: 10.1016/0031-9384(91)90039-q. Disponível em: <<http://api.elsevier.com/content/article/PII:003193849190039Q?httpAccept=text/xml>>. Acesso em: 14 jul. 2015.

KULKARNI, Jayashri et al. Estrogens and men with schizophrenia: Is there a case for adjunctive therapy?. **Schizophrenia Research**, [s.l.], v. 125, n. 2-3, p.278-283, fev. 2011. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.schres.2010.10.009. Disponível em: <<http://api.elsevier.com/content/article/PII:S0920996410015847?httpAccept=text/xml>>. Acesso em: 15 jul. 2015.

LAULEDERKIND, Stanley Joseph Federspiel et al. **The Rat Genome Database 2013: data, tools and users..** 2013. Disponível em: <<http://rgd.mcw.edu/>>. Acesso em: 11 jun. 2015.

LONG, Joseph A.; EVANS, Herbert Maclean. **The Oestrous Cycle in the Rat and It's Associated Phenomena.** California: University Of California Press, 1922. 113 p.

LOPEZ, Alan D.; MURRAY, Christopher C.j.l.. The global burden of disease, 1990–2020. **Nat Med**, [s.l.], v. 4, n. 11, p.1241-1243, nov. 1998. Nature Publishing Group. DOI: 10.1038/3218.

MADULARU, Dan et al. Changes in brain volume in response to estradiol levels, amphetamine sensitization and haloperidol treatment in awake female rats. **Brain Research**, [s.l.], v. 1618, n. 8, p.100-110, ago. 2015. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.brainres.2015.05.025. Disponível em: <<http://api.elsevier.com/content/article/PII:S0006899315004278?httpAccept=text/xml>>. Acesso em: 16 jul. 2015.

MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P.. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Braz. J. Biol.**, [s.l.], v. 62, n. 4, p.609-614, 2002. FapUNIFESP (SciELO). DOI: 10.1590/s1519-69842002000400008.

MEDEIROS, Gabriela Ferreira de et al. The Long Way from Complex Phenotypes to Genes: The Story of Rat Chromosome 4 and Its Behavioral Effects. **Wjns**, [s.l.], v. 04, n. 03, p.203-215, 2014. Scientific Research Publishing, Inc,. DOI: 10.4236/wjns.2014.43024.

MEDEIROS, Gabriela Ferreira de. **Caracterização fenotípica e molecular da linhagem congênica de ratos SHR. LEW-Anxrr16 como um novo modelo genético para o estudo da ansiedade**. 2012. 130 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

MEZIANE, H. et al. Estrous cycle effects on behavior of C57BL/6J and BALB/cByJ female mice: implications for phenotyping strategies. **Genes, Brain And Behavior**, [s.l.], v. 6, n. 2, p.192-200, mar. 2007. Wiley-Blackwell. DOI: 10.1111/j.1601-183x.2006.00249.x.

MISSALE, Cristina et al. Dopamine receptors:: from structure to function.. **Physiological Reviews**, Durham, v. 78, n. 1, p.189-225, jan. 1998.

MORA, Sergio; DUSSAUBAT, Nelson; DÍAZ-VÉLIZ, Gabriela. Effects of the estrous cycle and ovarian hormones on behavioral indices of anxiety in female rats. **Psychoneuroendocrinology**, [s.l.], v. 21, n. 7, p.609-620, out. 1996. Elsevier BV. DOI: 10.1016/s0306-4530(96)00015-7. Disponível em: <<http://api.elsevier.com/content/article/PII:S0306453096000157?httpAccept=text/xml>>. Acesso em: 14 jul. 2015.

OHL, F. Animal Models of Anxiety. **Anxiety And Anxiolytic Drugs**, [s.l.], p.35-69, 2005. Springer Science + Business Media. DOI: 10.1007/3-540-28082-0\_2.

PEREIRA, Elayne. **Desenvolvimento de uma linhagem congênica para um locus no cromossomo 4 do rato com efeito sobre a emocionalidade**. 2010. 145 f. Tese (Doutorado) - Curso de Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

PRUT, Laetitia; BELZUNG, Catherine. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European Journal Of Pharmacology**, [s.l.], v. 463, n. 1-3, p.3-33, fev. 2003. Elsevier BV. DOI: 10.1016/s0014-2999(03)01272-x. Disponível em: <<http://api.elsevier.com/content/article/PII:S001429990301272X?httpAccept=text/xml>>. Acesso em: 15 jul. 2015.

RAMOS, André et al. Identification of female-specific QTLs affecting an emotionality-related behavior in rats. **Molecular Psychiatry**, [s.l.], v. 4, n. 5, p.453-462, 8 out. 1999. Nature Publishing Group. DOI: 10.1038/sj.mp.4000546.

RAMOS, André et al. A multiple-test study of anxiety-related behaviours in six inbred rat strains. **Behavioural Brain Research**, [s.l.], v. 85, n. 1, p.57-69, abr. 1997. Elsevier BV. DOI: 10.1016/s0166-4328(96)00164-7. Disponível em: <<http://api.elsevier.com/content/article/PII:S0166432896001647?httpAccept=text/xml>>. Acesso em: 14 jul. 2015.

RAMOS, André et al. Genetic selection of two new rat lines displaying different levels of anxiety-related behaviors. **Behavior Genetics**, [s.l.], v. 33, n. 6, p.657-668, 2003. Springer Science + Business Media. DOI: 10.1023/a:10261311130686.

RAMOS, André et al. Integrating the open field, elevated plus maze and light/dark box to assess different types of emotional behaviors in one single trial. **Behavioural Brain Research**, [s.l.], v. 193, n. 2, p.277-288, nov. 2008. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.bbr.2008.06.007. Disponível em: <<http://api.elsevier.com/content/article/PII:S0166432808003094?httpAccept=text/xml>>. Acesso em: 14 jul. 2015.

RAMOS, André; MORMÈDE, Pierre. Stress and emotionality: a multidimensional and genetic approach. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, [s.l.], v. 22, n. 1, p.33-57, dez. 1997. Elsevier BV. DOI: 10.1016/s0149-7634(97)00001-8. Disponível em: <<http://api.elsevier.com/content/article/PII:S0149763497000018?httpAccept=text/xml>>. Acesso em: 14 jul. 2015.

RAMOS, André. Animal models of anxiety: do I need multiple tests?. **Trends In Pharmacological Sciences**, [s.l.], v. 29, n. 10, p.493-498, out. 2008. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.tips.2008.07.005. Disponível em: <<http://api.elsevier.com/content/article/PII:S016561470800165X?httpAccept=text/xml>>. Acesso em: 14 jul. 2015.

RANG, P. Humphrey. et al **Rang and Dale Farmacologia**. 7. ed. Churchill Livingstone: Elsevier, 2012.

**Referência:** HEBEL, Rudolf; STROMBERG, Melvin W.. **Anatomy and embryology of the laboratory rat**. Worthsee: Biomed Verlag, 1986. 271 p.

SIMPSON, Joy; KELLY, John P. An investigation of whether there are sex differences in certain behavioural and neurochemical parameters in the rat. **Behavioural Brain Research**, [s.l.], v. 229, n. 1, p.289-300, abr. 2012. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.bbr.2011.12.036.

STEENBERGEN, Hans L. et al. Sex-dependent effects of inescapable shock administration on shuttlebox-escape performance and elevated plus-maze behavior. **Physiology & Behavior**, Amsterdam, p.571-576, 1990.

VENDRUSCOLO, Leandro F. et al. Evaluation of the anxiolytic-like effect of NKP608, a NK1-receptor antagonist, in two rat strains that differ in anxiety-related behaviors. **Psychopharmacology**, [s.l.], v. 170, n. 3, p.287-293, 1 nov. 2003. Springer Science + Business Media. DOI: 10.1007/s00213-003-1545-4.

WEHRMEISTER, Thaize D. et al. Absence of repeated-trial tolerance to the anxiolytic-like effects of chlordiazepoxide in the rat triple test. **Pharmacology Biochemistry And Behavior**, [s.l.], v. 97, n. 2, p.301-309, dez. 2010. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.pbb.2010.08.014. Disponível em: <<http://api.elsevier.com/content/article/PII:S0091305710002595?>