Fernanda Junkes Corrêa

O CROMOSSOMO 4 INFLUENCIA COMPORTAMENTOS RELACIONADOS À MEMÓRIA EM UM MODELO GENÉTICO DE RATOS

Florianópolis

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, EMBRIOLOGIA E GENÉTICA

LABORATÓRIO DE GENÉTICA DO COMPORTAMENTO

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

Fernanda Junkes Corrêa

O CROMOSSOMO 4 INFLUENCIA COMPORTAMENTOS RELACIONADOS À MEMÓRIA EM UM MODELO GENÉTICO DE RATOS

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Geison de Souza Izídio

Florianópolis

2015

AGRADECIMENTOS

Primeiramente eu gostaria de agradecer ao meu orientador, Prof. Dr. Geison de Souza Izídio, por quem tenho grande admiração. Agradeço por ter me acolhido no Laboratório de Genética do Comportamento no decorrer desses dois anos de Mestrado e por ter acreditado e confiado no trabalho que eu poderia desenvolver. Agradeço ainda pelos ensinamentos além dos muros da Universidade, e não somente por ter me ensinado, mas por ter me feito aprender. Por fim, obrigada por ser mais que um orientador, ser um grande amigo!

Ao Prof. Dr. André de Ávila Ramos, pela apresentação do mundo científico e por ter acreditado em mim durante a Iniciação Científica. Essa confiança foi o que me fez continuar a seguir na pesquisa científica!

À Mayara Anselmi e à Natalli Granzotto, minhas amigas de laboratório desde os tempos de iniciação científica. Não tenho palavras para agradecer toda parceria dentro e fora do laboratório! Com certeza levarei a amizade de vocês para toda vida!

Aos "hermanos", Fernando Mazur, Lucía Acuña e Maria Elisa Corvino! Obrigada por serem mais que apenas colegas de laboratório, serem meus amigos! Não poderia deixar de agradecer pela apresentação do mate (o argentino é mesmo melhor) e das empanadas! *Gracias*!

Aos alunos atuais e antigos de iniciação científica: Carine, Gui, Ingrid, Kátia, Luís, Paula, Tamiris e Thalita. Em especial à Kátia, que participou da maior parte das atividades deste trabalho, tornando-se também uma amiga!

A todos os demais alunos que fazem ou que já fizeram parte do Laboratório de Genética do Comportamento, em especial à Dra. Renata Pértile. Obrigada pela amizade e por todo seu ensinamento nas tarefas de laboratório e gastronômicas! Sem ela eu jamais saberia o que é um "*chutney*"! Obrigada também às novas integrantes, Rê Marchette, Eloísa Pavesi e Pamela!

Aos amigos que a pós-graduação me deu, Cris e Tiago! Obrigada por poder compartilhar tudo com vocês! Cris, obrigada por parecer minha irmã e por me deixar tão à vontade na tua presença! Sei que posso contar com você e você comigo!! Tiii, sem palavras para agradecer tudo

o que você fez por mim dentro e fora da UFSC! Obrigada pela criação das figuras do artigo e da dissertação! Obrigada pelas horas de mate, bate-papo e idas ao RU!

Ao Laboratório de Farmacologia Cardiovascular, em especial à Prof. Dra. Elizabeth Linder e às mestrandas Giovana e Kiuanne! Obrigada por serem tão solicitas e prestativas durante os experimentos de medida da pressão arterial.

A todos os colegas e professores do Departamento de Farmacologia e do Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética.

Aos Profs. Drs. Ana Lucia Brunialti Godard, Antônio de Pádua Carobrez, Elayne Pereira e Leandro José Bertóglio por terem aceitado o convite para participar da avaliação deste trabalho.

Aos meus pais, João de Souza Corrêa e Graziela Junkes Corrêa, por todo incentivo recebido durante toda a vida! O apoio de vocês foi fundamental para que eu pudesse chegar até aqui! Não tenho palavras para expressar todo meu agradecimento e amor por vocês!

Ao meu noivo e melhor amigo, Lucas Borghezan Gonçalves, por todo incentivo, apoio, ajuda e carinho. Obrigada pela a ajuda durante a redação deste trabalho e obrigada por entender mais uma vez a distância para que eu pudesse realizar o Mestrado!

Ao CNPq pelo suporte financeiro, sem o qual este trabalho não teria sido completado.

A todos que não estão aqui explicitados, mas que colaboraram de alguma forma para execução deste trabalho.

RESUMO

Os ratos das linhagens Lewis (LEW) e *Spontaneously hypertensive rats* (SHR) diferem em uma série de aspectos comportamentais incluindo, também, os relacionados à emocionalidade. Apesar da caracterização comportamental e farmacológica que realizamos ao longo dos últimos anos, ainda existem dúvidas sobre o significado psicológico real das diferenças comportamentais entre essas duas linhagens. Algumas diferenças comportamentais encontradas entre elas podem ser atribuídas tanto a diferenças nos níveis de ansiedade/emocionalidade desses animais, como também a diferenças de aprendizado/memória. Em um estudo prévio, utilizando animais F2 provenientes dessas duas linhagens foi identificado um QTL (*locus* para característica quantitativa) no cromossomo 4 do rato que influenciava a locomoção central no Campo Aberto (CA), um índice experimental de ansiedade/emocionalidade. No presente estudo, com o intuito de buscar as bases genéticas dos comportamentos relacionados ao aprendizado/memória e ansiedade/emocionalidade, nós realizamos: a) uma análise do grau de correlação entre as medidas comportamentais de diferentes testes que envolvem aprendizado/memória e ansiedade/emocionalidade e b) uma análise de QTL, no cromossomo 4 do rato, envolvendo essas mesmas medidas comportamentais. Além disso, c) utilizamos uma linhagem congênica, chamada de SHR.LEW.*Anxrr*16 (SLA16), para estudar os efeitos dos diferentes QTL encontrados. Os resultados revelaram uma correlação entre comportamentos relacionados à emocionalidade e à memória. Além disso, foram encontrados dois QTL significativos influenciando comportamentos relacionados à memória aversiva, no teste do Medo Condicionado (MC), e à atividade locomotora em um ambiente novo no Labirinto em Cruz Elevado Modificado (LCEM). Também foram encontrados 6 QTL sugestivos relacionados à memória aversiva e emocionalidade no LCEM e à emocionalidade no CA. Em relação ao estudo do *locus* diferencial, a linhagem SLA16 exibiu menores índices de ansiedade/emocionalidade, menor duração de congelamento em um teste clássico de memória emocional e não diferiu em tarefas de aprendizado e memória que não

envolvia emocionalidade, em relação à linhagem SHR. Assim, conclui-se que o *locus* diferencial afeta fenótipos associados à emocionalidade em ratos, bem como comportamentos relacionados à memória aversiva. Portanto, a linhagem congênica SLA16 representa uma ferramenta na busca de genes candidatos envolvidos na regulação desses comportamentos. Assim, o presente estudo encontrou dois QTL inéditos e confirmou seus efeitos em uma linhagem congênica de ratos. Desse modo, sugerimos a linhagem congênica SLA16 como um potencial modelo genético para o estudo de alguns aspectos do Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade, uma vez que ela apresenta maior atividade locomotora, que a linhagem SHR, e é uma linhagem normotensa.

Palavras-chave: Ansiedade. QTL. TDAH. Ratos SHR. Linhagem congênica. Medo condicionado.

ABSTRACT

The inbred rat srains Lewis (LEW) and *Spontaneously hypertensive rats* (SHR) are known to differ for several behavior traits including those related to emotionality. Despite the behavioral and pharmacological characterization that we have performed over the last few years, there are still doubts about the real psychological meaning of these behavioral differences. Behavioral divergences between LEW and SHR can be attributed to both differences in anxiety/emotionality or learning/memory levels. In a previous study, an intercross between LEW and SHR led to the identification of a quantitative trait *locus* (QTL), on chromosome 4, influencing central locomotion in the open field (OF) test, an experimental index of anxiety. Thus, in the present study, we aimed to search the genetic basis of anxiety/emotionality and learning/memory behaviors. To this purpose, we: a) analyzed the correlation between anxiety/emotionality and learning/memory behaviors and b) performed a QTL analysis on chromosome 4 of rats involving these same behavioral measures. Moreover, c) we used a congenic strain, named SHR.LEW.Anxrr16 (SLA16), to confirm the QTL effects. The results revealed a correlation between behaviors related to emotionality and memory. Besides that, the QTL analysis revealed two significant *loci* influencing behaviors related to aversive memory in the Fear Conditioning test and locomotor activity related to novelty in a Plus-Maze discriminative avoidance task. In addition, the QTL analysis revealed 6 suggestive QTL related to aversive memory and emotionality. Regarding the differential *locus*, the congenic strain SLA16 displayed lower levels of anxiety/emotionality, lower freezing duration in a classical emotional memory task and did not differ in learning/memory tasks that did not involve emotionality, in relation to SHR strain. Based on these results, it is concluded that the differential *locus* affects phenotypes associated to emotionality and behaviors related to aversive memory. Therefore the congenic strain SLA16 represents a valuable tool in the search for candidate genes involved in the regulation of these behaviors. In conclusion, the present study found two novels QTL and confirmed their effects in a congenic strain of rats. Thus, we propose the congenic strain SLA16 as a valuable genetic

model for studying some aspects of the Attention Deficit Hyperactivity Disorder since SLA16 presents higher locomotor activity, than SHR strain, besides being a normotensive strain.

Keywords: Anxiety. QTL. ADHD. SHR rats. Congenic strain. Fear Conditioning.

LISTA DE ABREVIAÇÕES

AE= Alternação espontânea

Anxrr16 = anxiety related response QTL 16 (QTL para resposta relacionada à ansiedade 16)

CA = Campo Aberto

CBP = Caixa Branca e Preta

ENU = etil-nitroso-uréia

FSL = *Flinders sensitive line*

HPA = hipotálamo-pituitária-adrenal

LCE = Labirinto em Cruz Elevado

LCEM= Labirinto em Cruz Elevado Modificado

LEW = Lewis

LOD = Logaritmo de odds

MC= Medo Condicionado Contextual

NP = *alcohol-nonprefering rat*

Ofil1 = open field inner locomotion 1 (locomoção central no campo aberto 1)

P = *alcohol-preferring rat*

PAS = Pressão Arterial Sistólica

PCR = *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)

QTL = *quantitative trait locus* (*locus* para característica quantitativa)

RGD = *Rat genome database* (banco de dados do genoma do rato)

RO= Reconhecimento de Objetos

SHR = *Spontaneously Hypertensive Rat* (rato espontaneamente hipertenso)

SLA16 = SHR.LEW.*Anxrr*16

SNP = *single nucleotide polymorphism* (polimorfismo de nucleotídeo único)

TDAH = Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade

TEPT = Transtorno de Estresse Pós-Traumático

WKY = Wistar-Kyoto

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Série de cruzamentos envolvidos na construção da linhagem congênica SLA16.....36

Figura 2 - Aparato utilizado no teste do LCEM.....46

Figura 3 - Aparato utilizado no teste do CA.....47

Figura 4 – Esquema utilizado no teste do Reconhecimento de Objetos.....48

Figura 5 – Esquema utilizado no teste de Alternação Espontânea.....49

Figura 6 – Aparato utilizado no teste do Medo Condicionado. 50

Figura 7 – Aparato utilizado no teste do Campo Aberto.....57

Figura 8 – Aparato utilizado no teste de Alternação espontânea. 58

Figura 9 – Médias dos comportamentos dos 96 animais F2 LEW/SHR.....61

Figura 10 - Mapa genético originado a partir dos dados genotípicos obtidos com os 10 marcadores moleculares utilizados em todos os animais da população F2 desse estudo.....63

Figura 11 - QTL significativo encontrado para a medida “tentativa de escape” no teste do Medo Condicionado na análise de ligação realizada com 96 machos F2 LEW/SHR.....64

Figura 12 - QTL sugestivos encontrados na análise de ligação com os 96 machos F2 LEW/SHR para porcentagem de tempo gasto nos braços abertos do LCEM e locomoção central no CA.....65

Figura 13 - QTL significativo encontrado para a medida “distância percorrida” na sessão de treino do teste do Labirinto em Cruz Elevado Modificado (LCEM) na análise de ligação com 96 machos F2 LEW/SHR.....66

Figura 14 – QTL sugestivos encontrados na análise de ligação com os 96 machos F2 LEW/SHR para porcentagem de tempo gasto nos braços aversivos do LCEM; número de entradas no braço aversivo do LCEM; tempo nos braços abertos do LCEM e locomoção periférica no CA.....67

Figura 15 – Genótipos dos animais segundo o marcador D4Wox22 para o fenótipo “tentativo de escape” no teste do Medo Condicionado e genótipo dos animais segundo o marcador D4Mgh27 para o fenótipo “distância percorrida” no LCEM.....69

Figura 16 - Percentual de tempo gasto nos braços aversivos na sessão de treino e teste do LCEM.....71

Figura 17 - Percentual de tempo gasto nos braços abertos na sessão de treino e teste do LCEM.....72

Figura 18 - Número de entradas totais na sessão de treino e teste do LCEM e número entradas nos braços aversivos durante a sessão de treino do LCEM.....73

Figura 19 - Número de quadrados cruzados na região central e periférica do CA.....74

Figura 20 - Índice de discriminação de objetos e tempo de exploração dos objetos.....75

Figura 21 - Porcentagem de alternação espontânea e total de entradas nos braços do teste de AE.....75

Figura 22 – Duração do comportamento de congelamento e número de tentativas de escape durante as fases de pré-condicionamento e condicionamento durante a sessão de treino e após o condicionamento do medo contextual na sessão de teste.....76

Figura 23 – Pressão arterial sistólica.....77

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Informações sobre os marcadores moleculares do tipo microssatélite utilizados na genotipagem dos animais F2.....53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Análise de fator de traços fenotípicos quantificados em ratos machos da geração F2 LEW/SHR.....62

Tabela 2 - QTL significativos e sugestivos identificados nos 96 machos F2 LEW/SHR a partir da análise de ligação.....68

ARTIGOS E RESUMOS ORIGINADOS POR ESTE TRABALHO:

Artigos científicos:

DE MEDEIROS, G. F.; **CORREA, F. J.**; CORVINO, M. E.; IZÍDIO, G. S.; RAMOS, A. The Long Way from Complex Phenotypes to Genes: The Story of Rat Chromosome 4 and Its Behavioral Effects. World Journal of Neuroscience, v. 04, p. 203-215, 2014.

CORREA, F. J.; SANTOS, J. R.; SILVA, A. F.; ANSELMI, M.; CUNHA, J. A. S.; CAMPELO, C. L. C.; LEÃO, A. H. F. F.; RIBEIRO, A. M.; RAMOS, A; SILVA, R. H.; IZÍDIO, G. S. Memory/learning behaviors are influenced by a QTL on rat chromosome 4. Em preparação.

Resumos em congressos:

CORREA, F. J.; ANSELMI, M.; BOLIS, K.; SANTOS, J. R.; SILVA, A. F.; CUNHA, J. A.; RIBEIRO, A. M.; SILVA, R. H.; IZIDIO, G. S. A genomic region on rat chromosome 4 influencing emotional and learning/memory behaviors. XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento, Búzios – RJ, 2014.

PERTILE, R.; PAVESI, E.; **CORREA, F. J** ; ALVES, T. M.; OLIVEIRA, P. A.; MACK, J. M.; PREDIGER, R.; CAROBREZ, A. P.; IZÍDIO, G.S.; RAMOS, A. The evaluation of the dopaminergic antagonist SCH23390 injected in the ventral hippocampus of SLA16 and SHR rats. XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento, Búzios – RJ, 2014.

CORVINO, M. E.; **CORREA, F. J.**; PERTILE, R. A. N.; RAMOS, A; IZÍDIO, G. S. SLA16 and SHR rat strains showed differential responses in pharmacological studies using dopamine D2 receptor antagonist. XXXVIII Reunião Anual da Scociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento, 2014, Búzios.

CORREA, F. J. ; SCHNEIDER, S. S. ; ACUNA, L. R. ; BOLIS, K. ; RAMOS, A. ; IZIDIO, G. S. A congenic rat strain with a low-anxiety phenotype do not exhibit differences in learning/memory behaviors. XXXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento, Belo Horizonte – MG, 2013.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 25

1.1 MODELOS GENÉTICOS 25

1.1.1 As linhagens Lewis e SHR como Modelo Genético 27

1.2 ANÁLISE DE *LOCUS* PARA CARACTERÍSTICAs QUANTITATIVAS 30

1.3 O cromossomo 4 do rato e sua influência em características neurobiológicas 32

1.4 REFINAMENTO GENOTÍPICO E A LINHAGEM CONGÊNICA SLA16 35

2 HIPÓTESES 39

3 OBJETIVOS 41

3.1.1 Objetivos Gerais 41

3.1.2 Objetivos Específicos 41

4 MATERIAIS E MÉTODOS 43

4.1 ANIMAIS 43

4.2 PRODUÇÃO DOS ANIMAIS F2 44

4.3 FENOTIPAGEM 44

4.3.1 Labirinto em Cruz Elevado Modificado 44

4.3.2 Campo Aberto 46

4.3.3 Reconhecimento de Objetos 47

4.3.4 Alternação Espontânea 49

4.3.5 Medo Condicionado 50

4.4 ANÁLISE DE FATOR 51

4.5 GENOTIPAGEM 51

4.5.1 Gel de agarose 53

4.6 ANÁLISE DE QTL 54

4.7 ANIMAIS 55

4.8 ANÁLISE COMPORTAMENTAL 56

4.8.1 Labirinto em Cruz Elevado Modificado 56

4.8.2 Campo Aberto 56

4.8.3 Reconhecimento de Objetos.....57
4.8.4 Alternação Espontânea.....57
4.8.5 Medo Condicionado.....58
4.8.6 Medida não invasiva da pressão arterial.....58
4.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....59
5 RESULTADOS.....61
6 DISCUSSÃO.....79
6.1 PRIMEIRA ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL.....80
6.2 SEGUNDA ESTRATÉGIA COMPORTAMENTAL.....87
7 CONCLUSÕES.....97
REFERÊNCIAS.....99

1 INTRODUÇÃO

1.1 MODELOS GENÉTICOS

Ratos e camundongos são normalmente usados como modelos animais na pesquisa biomédica em razão da sua similaridade fisiológica e anatômica com humanos (BRYDA, 2013; HUANG et al., 2011; JACOB, 1999). Eles são animais relativamente pequenos, que requerem pouco espaço e recursos para serem mantidos; possuem uma gestação curta, gerando um número expressivo de filhotes; apresentam um desenvolvimento rápido para a vida adulta e um tempo de vida curto (AITMAN et al., 2008). Assim, sob uma perspectiva da genética, a utilização desses animais se justifica pelo fato de os efeitos ambientais e/ou genéticos poderem ser padronizados e controlados no ambiente de laboratório (MASHIMO; SERIKAWA, 2009).

Os camundongos (Mus musculus) são frequentemente a espécie de primeira escolha dos geneticistas em razão de algumas características, como, por exemplo, o menor tamanho do que os ratos, simplificando as exigências de moradia. Além disso, a disponibilidade de ferramentas para a manipulação genética do seu genoma está presente desde os anos 1980, explicando, também, a maior ocorrência do seu uso nessa área (NADEAU, 2001; PETERS et al., 2007; SOKOLOWSKA; HOVATTA, 2013).

Ratos, camundongos e humanos possuem em torno de 30.000 genes, dos quais aproximadamente 95% são compartilhados pelas três espécies (BRYDA, 2013). Além disso, as três espécies já possuem o genoma completamente sequenciado. O genoma humano foi sequenciado em 2001 (LANDER et al., 2001; VENTER et al., 2001), sendo o do camundongo e do rato sequenciado em 2002 e 2004, respectivamente (GIBBS et al., 2004; WATERSTON et al., 2002). A disponibilidade das sequências completas de nucleotídeos das três espécies permitiu comparações genômicas importantes, que foram cruciais para a identificação e caracterização de diversos genes (BRYDA, 2013).

O rato de laboratório, *Rattus norvegicus*, foi a primeira espécie de mamífero domesticado para pesquisas científicas e é atualmente o principal animal usado em testes pré-clínicos de drogas. Seu uso é clássico nas áreas de farmacologia e toxicologia, uma vez que seu perfil farmacocinético já é bem definido (JACOB, 1999; LAZAR et al., 2005; SMITS; CUPPEN, 2006). Ainda, a maioria dos estudos comportamentais foi realizada em ratos já que, quando comparados a camundongos, seu comportamento é considerado mais social, complexo e habilidoso (KEPECS et al., 2008). Cientistas conseguiram ensinar tarefas e paradigmas comportamentais complexos aos ratos e, como resultado, eles estão agora também sendo utilizados no campo da neurociência cognitiva, no qual os primatas ainda são predominantes (JACOB, 1999; KEPECS et al., 2008). Entretanto, existem controvérsias há respeito do melhor desempenho de ratos sobre camundongos e já há estudos que mostram que camundongos também são capazes de atingir alto nível de desempenho em tarefas cognitivas complexas (JARAMILLO; ZADOR, 2014).

Após a publicação da sequência genômica do rato, esse animal foi elevado a outro patamar nas pesquisas genéticas. Combinadas com o acervo de dados já estudado extensivamente sobre a fisiologia, farmacologia e comportamento do rato, as sequências genômicas estão facilitando a descoberta de genes que são a base de processos fisiológicos e/ou patológicos envolvidos em doenças humanas. O avanço em tecnologias de engenharia genética para o uso no rato - mutagênese utilizando o agente mutagênico ENU (etil-nitroso-uréia), silenciamento de genes e a tecnologia knockout - está proporcionando milhares de modelos genéticos de ratos úteis para o estudo da genômica funcional e de doenças humanas (MASHIMO; SERIKAWA, 2009; SMITS; CUPPEN, 2006). Devido a todos esses avanços na última década, os ratos de laboratório vêm sendo amplamente usados como modelos genéticos, resultando em uma grande quantidade de dados genotípicos e fenotípicos a partir de uma ampla variedade de estudos. O crescimento de informações criou a necessidade da existência de um banco de dados no qual as informações fenotípicas e genotípicas das mais diversas linhagens

estivessem disponíveis mundialmente. Atualmente, existem diversos bancos de dados que reúnem tais conhecimentos, dos quais podemos destacar o RGD (Rat Genome Database) que constitui uma plataforma que permite associar variações de dados genotípicos a fenotípicos, sendo uma ferramenta imprescindível para avanços nessa área em razão do grande volume de informações produzidas (NIGAM et al., 2013).

Diversos estudos utilizam um tipo de linhagem chamada de isogênica ou pura, nas quais todos os indivíduos pertencentes são geneticamente idênticos uns aos outros. Essas linhagens provêm de cruzamentos consanguíneos entre irmãos, que são realizados por ao menos 20 gerações. Ou seja, quando diferentes linhagens isogênicas são criadas em um mesmo ambiente, pode-se dizer que as diferenças comportamentais encontradas entre elas são de origem genética. Já as diferenças dentro de uma mesma linhagem isogênica podem ser atribuídas a influências ambientais (PLOMIN et al., 1997). Muitos estudos utilizam linhagens isogênicas contrastantes para uma determinada característica (fisiológica, neuroquímica, comportamental, etc) com a finalidade de encontrar genes que estejam contribuindo para a expressão destas diferenças (BIGNAMI, 1965; BROADHURST, 1975; RAMOS et al., 2003).

1.1.1 As linhagens Lewis e SHR como Modelo Genético

Desde o desenvolvimento da primeira linhagem isogênica de rato por King em 1909, mais de 1000 linhagens de ratos isogênicas foram criadas para o estudo de diversos aspectos fisiológicos e bioquímicos, constituindo modelos genéticos de estudo de diferentes doenças, como autoimunes, cardiovasculares, neurológicas, dentre outras inúmeras doenças (AITMAN et al., 2008; DATABASE, 2014).

Em um estudo envolvendo seis linhagens isogênicas de ratos, Ramos et al. (1997) propuseram as linhagens Lewis (LEW) e *Spontaneously Hypertensive Rat* (SHR) como um modelo genético para o estudo da emocionalidade em ratos. Quando expostas a diversos testes de

emocionalidade, ambas as linhagens apresentaram respostas comportamentais contrastantes em relação à aproximação/esquiva das áreas aversivas desses testes. Por exemplo, no teste do Campo Aberto (CA) essas duas linhagens mostraram diferenças significativas na locomoção central, um índice experimental de ansiedade em ratos de laboratório (PRUT; BELZUNG, 2003), com os ratos SHR explorando mais esta área aversiva do que os LEW. Além disso, as linhagens exibem diferenças no número de entradas e no tempo gasto no compartimento branco da Caixa Branca e Preta (CBP) e no tempo gasto e na porcentagem de entradas dos braços abertos do Labirinto em Cruz Elevado (LCE). Em todos os casos descritos, a linhagem SHR exibiu maior aproximação das áreas aversivas quando comparado com a linhagem LEW (RAMOS et al., 1998; RAMOS; MORMEDE, 1998).

Estes resultados poderiam simplesmente sugerir que os ratos SHR são mais ativos que os LEW, entretanto, as linhagens não diferiram em seus índices de locomoção geral nos diversos testes comportamentais utilizados. Desse modo, pode-se dizer que a linhagem SHR realmente exibiu menores índices de emocionalidade em relação à LEW (RAMOS et al., 1997).

Essas duas linhagens possuem algumas características que fazem delas ferramentas interessantes para o estudo de comportamentos relacionados à ansiedade e ao aprendizado e memória. Por exemplo, a linhagem SHR vem sendo sugerida como modelo de estudo de comportamentos relacionados ao Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH), uma vez que apresenta um desempenho reduzido em diferentes paradigmas utilizados para investigar processos de memória e aprendizado, bem como um comportamento hiperativo (MENESES et al., 2011). Entretanto, o comportamento hiperativo do SHR tem sido questionado, uma vez que a linhagem Wistar-Kyoto (WKY), normalmente usada como seu controle, é considerada hipoativa, colocando em dúvida a validade da comparação entre tais linhagens (ROBERTSON et al., 2008). O SHR também apresenta alterações nas funções de alguns neurotransmissores como o glutamato, dopamina e norepinefrina, que fazem parte de circuitos necessários para formação de memória associativa guiada por recompensa (HEAL et al., 2008;

WELLS et al., 2010), sendo que e a memória associativa envolvendo recompensa é a base da maioria dos testes comportamentais para o estudo do TDAH em modelos animais. Ainda, os ratos SHR desenvolvem hipertensão de modo espontâneo após certa idade (OKAMOTO; AOKI, 1963) e o seu prejuízo de memória tem sido relacionado com a hipertensão, uma vez que o déficit cognitivo é revertido por bloqueadores de canais de cálcio, como o anti-hipertensivo nimodipina (MENESES et al., 1997). Contudo, há estudos que mostram que embora a linhagem SHR seja um modelo genético com transtornos neuronais nesse sentido, tais disfunções não são necessariamente ou exclusivamente relacionados à hipertensão por si só (PREDIGER et al., 2005).

A linhagem de ratos LEW também apresenta algumas características interessantes que justificam seu uso na pesquisa referente à ansiedade/emocionalidade e ao aprendizado/memória. Os ratos LEW apresentam uma hiporresponsividade do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) à maioria dos estímulos, sendo mais sensível a doenças autoimunes induzidas experimentalmente (SPINEDI et al., 1994). Por esta razão, esta linhagem é muito utilizada em pesquisas relacionadas às doenças desse gênero. Além disso, os ratos LEW são frequentemente utilizados no estudo do abuso de diferentes drogas, como heroína (PICETTI et al., 2012), cocaína (PICETTI et al., 2010) e metanfetamina (KITAMURA et al., 2006), em razão de apresentarem uma característica em comum com seres humanos que é a autoadministração dessas substâncias. Acredita-se que essa característica possa estar relacionada com a baixa capacidade de resposta ao estresse que ocorre nessa linhagem, que consequentemente ingere maior quantidade de droga para aliviar os sintomas negativos do estresse (KOSTEN; AMBROSIO, 2002). A linhagem LEW também tem sido sugerida como modelo para o estudo de transtornos de estresse pós-traumático (TEPT), por sua similaridade com sintomas da doença em humanos, como déficit na extinção de memórias traumáticas e manifestações comportamentais extremas e de longa duração de ansiedade após exposição a uma ameaça predatória (GOSWAMI et al., 2012).

As linhagens LEW e SHR também foram avaliadas comparativamente no teste do Labirinto em T, que envolve vários ensaios consecutivos, permitindo, assim, que o animal adquira esquiva inibitória dos braços abertos (RAMOS et al., 2002). Os resultados revelaram diferenças significativas entre as linhagens, com a linhagem SHR necessitando de mais ensaios para adquirir a esquiva inibitória que a linhagem LEW. Ademais, uma vez adquirida a esquiva inibitória, 100% dos animais LEW evitaram o estímulo aversivo, enquanto que mais de 50% dos SHR continuaram a entrar nos braços abertos durante o teste após terem adquirido a esquiva no treino. Este resultado contrastante pode ser atribuído a diferenças nos níveis de aprendizado/memória como também a diferenças de ansiedade/emocionalidade desses animais. Diante do exposto, fica claro que estudos complementares são necessários para verificar como essas linhagens respondem em outros modelos ou situações de aprendizado e memória que envolvam ou não componentes fortes de emocionalidade.

1.2 ANÁLISE DE *LOCUS* PARA CARACTERÍSTICAS QUANTITATIVAS

As respostas comportamentais (o que inclui atenção, aprendizado, memória e ansiedade) são fenótipos complexos, possuem uma variação contínua ao longo da população e, portanto, são dependentes do efeito de múltiplos genes em interação com fatores ambientais. Tais fenótipos são frequentemente chamados de "características quantitativas" e a região genômica que contribui para suas variações é conhecida como *locus* para características quantitativas ou QTL (do inglês *Quantitative Trait Locus*) (PLOMIN et al., 1994). O mapeamento dessas regiões genômicas (ou mapeamento de QTL) tem sido realizado na tentativa de identificar genes, produtos gênicos e mecanismos subjacentes ao fenótipo de interesse (FLINT et al., 2005). Para se iniciar um mapeamento de QTL, linhagens parentais (comumente isogênicas) que diferem geneticamente para a característica de interesse são necessárias (MAURICIO, 2001). As formas mais simples de se realizar esses mapeamentos são a partir de gerações F2 (derivadas de híbridos

F1), ou gerações provenientes de retrocruzamentos (derivadas de um cruzamento entre a F1 e uma das linhagens parentais), embora experimentos com a geração F2 sejam mais comumente usados (MOORE; NAGLE, 2000). Posteriormente, o fenótipo e o genótipo de todos os indivíduos da geração selecionada (por exemplo, F2) são analisados com o intuito de se encontrar correlações entre a localização de marcadores moleculares polimórficos e o fenótipo da característica em estudo. Em resumo, essa metodologia identifica regiões cromossômicas que estão mais provavelmente associadas com o fenótipo de interesse em uma dada população (FLINT et al., 2005).

Como já mencionado anteriormente, LEW e SHR são linhagens isogênicas contrastantes para uma série de comportamentos relacionados à ansiedade, sendo que a linhagem LEW apresenta um perfil mais "ansioso" que o SHR. Com o objetivo de se investigar a base genética dessas diferenças comportamentais, Ramos et al. (1999) realizaram uma análise de QTL utilizando essas duas linhagens e identificaram o primeiro QTL relacionado à ansiedade em ratos, que afetava a locomoção central no CA, em uma região genômica localizada no cromossomo 4 do rato. Este QTL apresenta o segundo maior LOD escore (logaritmo de *odds*) já relatado para ansiedade em ratos (LOD escore máximo de 7.22) (LAULEDERKIND et al., 2013; RAMOS et al., 1999). Ele foi primeiramente nomeado como *Ofil1* (*open field inner locomotion 1*) e é atualmente conhecido como *Anxrr16* (*Anxiety related response QTL 16*), pelo RGD. Originalmente, esse *locus* afetava apenas as fêmeas e de uma maneira contraintuitiva, ou seja, alelos LEW conferiam a animais da população F2 uma maior, em vez de uma menor, locomoção no centro do CA (RAMOS et al., 1999). Tal fenômeno contraditório não é raro em estudos de QTL, já que a população F2 é uma "mistura" genética das duas linhagens parentais, que pode revelar novas combinações genéticas (CALDARONE et al., 1997; LLAMAS et al., 2005; SILVA et al., 2007).

1.3 O CROMOSSOMO 4 DO RATO E SUA INFLUÊNCIA EM CARACTERÍSTICAS NEUROBIOLÓGICAS

Os estudos de mapeamento de QTL possuem algumas limitações assim como diversas outras metodologias. Como exemplo, pode-se citar a necessidade de muitos animais e a dificuldade de se chegar ao gene candidato, uma vez que a região mapeada normalmente é grande e pode possuir múltiplos genes contribuindo para o fenótipo de interesse (ABIOLA et al., 2003; FLINT, 2002; FLINT et al., 2005). Porém, apesar da complexidade e limitações dessa técnica, a importância do *locus Anxrr16* fez com que os estudos dessa região genômica e dos fenótipos relacionados prosseguissem com o intuito de melhorar o entendimento em termos de padrão de herança genética, significado etológico e replicabilidade desse QTL.

O trabalho realizado por Mormède et al. (2002) confirmou o papel de *Anxrr16* em comportamentos relacionados à ansiedade, sendo o primeiro trabalho a confirmar os efeitos desse *locus* no CA, corroborando a existência desse QTL no cromossomo 4. Nessa pesquisa, usaram-se animais das gerações F4 e F5 de um intercruzamento entre LEW e SHR, na qual foram selecionadas dois tipos de linhagens, gerando uma linhagem chamada de "*high*" (homozigotos LEW em *Anxrr16*, que aumentavam a locomoção no centro do CA) e outra de "*low*" (homozigotos SHR em *Anxrr16*, que diminuíam a locomoção no centro do CA). Os dados do CA mostraram que a inibição da atividade locomotora na linhagem "*low*" (quando comparada à "*high*") era relacionada à aversividade da situação (maior no centro do que na periferia do CA; e maior sob luz intensa do que luz fraca). Nesse trabalho também foi revelado um efeito potencial de *Anxrr16* em machos, o qual não foi originalmente observado por Ramos et al. (1999) (MORMEDE et al., 2002).

Usando uma abordagem semelhante, Vendruscolo et al. (2006) confirmaram o efeito desse QTL na locomoção central do CA em ratos provenientes de um intercruzamento de F2 derivados de LEW e SHR. Nesse estudo, *Anxrr16* afetou significativamente a locomoção central

no CA bem como o consumo de etanol. Ambos os resultados foram observados apenas em fêmeas, de forma idêntica à Ramos et al. (1999). Esse trabalho demonstrou que esse *locus* influenciava um comportamento relacionado à ansiedade e modulava também o consumo de álcool em fêmeas, o qual pode ser atribuído a duas situações: um único gene afetando simultaneamente ambos os comportamentos ou a presença de dois ou mais genes ligados controlando de modo independente respostas de ansiedade e consumo de etanol (VENDRUSCOLO et al., 2006).

Um estudo subsequente, realizado por Hameister et al. (2008), teve como objetivo verificar se o QTL *Anxrr16* contribuía para a variabilidade comportamental relacionada à emocionalidade em outra população de ratos, representada pelos ratos Floripa *High* (H) e *Low* (L). Essas linhagens foram selecionadas, respectivamente, para alta e baixa locomoção no centro do CA. A seleção desses fenótipos agiu na frequência genotípica dos marcadores que flanqueavam o *Anxrr16*, sendo que a variação de apenas um dos marcadores moleculares (D4Rat59) foi significativamente correlacionada com a variação do fenótipo selecionado (HAMEISTER et al., 2008).

Também, Izídio et al. (2011) realizaram novas análises de QTL, levando em conta apenas o cromossomo 4 do rato em animais F2 proveniente das parentais LEW e SHR. Essa análise revelou quatro QTL ligados a comportamentos emocionais e de consumo de etanol em ratos machos, além de confirmar o efeito de *Anxrr16* nesse sexo. Uma segunda análise de QTL levando em conta fatores relacionados ao ciclo estral revelou três *loci* significativos em fêmeas que influenciavam comportamentos no CA e CBP.

Após a análise de QTL, uma das estratégias para se encontrar os genes (ou o gene) envolvidos na variação da característica em estudo é a avaliação de genes candidatos. De modo interessante, um estudo feito por Chiavegatto et al. (2009) encontrou um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP, do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*) entre as linhagens LEW e SHR em uma região 3’ não traduzida do gene da alfa-sinucleína (localizado na região do

Anxrr16), associado com a locomoção central no CA, sugerindo que esse gene pode ser um bom candidato para explicar os efeitos comportamentais de *Anxrr16* (CHIAVEGATTO et al., 2009).

Diversos estudos realizados por pesquisadores independentes permitiram a identificação de regiões genômicas no cromossomo 4 do rato que influenciavam características neurobiológicas, das quais pode-se citar o consumo de etanol (BICE et al., 1998; TERENINA-RIGALDIE et al., 2003), respostas ao estresse (POTENZA et al., 2004) e comportamentos relacionados à ansiedade (RAMOS et al., 1999). Em um desses estudos, utilizando duas linhagens de ratos que diferiam para preferência por álcool, chamadas de "*alcohol-preferring*" (P) e "alcohol-*nonpreferring*" (NP), Carr et al. (1998) relataram um QTL perto do *Anxrr16* influenciando o consumo de álcool, o qual foi posteriormente confirmado em um estudo realizado por Bice et al. (1998). De maneira interessante, essas duas linhagens também diferiram na exploração dos braços abertos do LCE (PANDEY et al., 2005), outra medida relacionada à ansiedade. Além disso, Terenina-Rigaldie et al. (2003) encontraram um QTL no cromossomo 4 do rato influenciando comportamentos relacionados à ansiedade em um estudo que utilizou animais provenientes de um intercruzamento entre WKY e uma linhagem com alta preferência por etanol (HEP, do inglês *high-ethanol-preferring*). Um estudo subsequente mostrou que esse QTL tinha um efeito pleiotrópico, influenciando não só comportamentos emocionais como também o de consumo de etanol (TERENINA-RIGALDIE; JONES et al., 2003). Ainda, Potenza et al. (2004) descreveram um QTL, também no cromossomo 4, que afetava o controle dos níveis de corticosterona nas linhagens isogênicas LEW e Fischer 344. Esses resultados sugerem que o cromossomo 4 constitui um alvo interessante para o estudo das bases moleculares da ansiedade e outros fenótipos relacionados à reatividade emocional e consumo de etanol (MEDEIROS et al., 2014)

.

1.4 REFINAMENTO GENOTÍPICO E A LINHAGEM CONGÊNICA SLA16

Nos últimos 15 anos, mais de 2.000 QTL foram identificados em cruzamentos entre linhagens isogênicas de ratos e camundongos, porém menos de 1% deles chegaram aos genes responsáveis (FLINT et al., 2005). Além disso, no campo dos transtornos neurobiológicos, mapear comportamentos provenientes de testes relacionados à emocionalidade de maneira isolada pode ser extremamente complexo, uma vez que transtornos envolvendo emocionalidade são multifatoriais e resultam da combinação de fatores genéticos e ambientais (HOVATTA; BARLOW, 2008). Com o intuito de se localizar os genes responsáveis pela variação da característica em estudo, um passo importante é reduzir o tamanho em pares de bases do QTL (MOORE; NAGLE, 2000). Uma das abordagens classicamente utilizadas para isso é a construção de linhagens congênicas intervalo específica (CARR et al., 2006; MOORE; NAGLE, 2000). Essas linhagens são produzidas por uma estratégia de cruzamentos que delineia uma região genômica contendo o *locus* objetivo do estudo, chamado de *locus* diferencial.

Em nosso laboratório, foi desenvolvida uma linhagem congênica por De Medeiros et al. (2013) com o objetivo de refinar a localização e isolar os efeitos de *Anxrr16*, bem como dissecar os efeitos dessa região cromossômica inteira e todos seus possíveis QTL. Nessa linhagem, chamada de SHR.LEW-Anxrr16 (abreviada como SLA16), um pedaço do cromossomo 4 contendo a região que abriga *Anxrr16* foi transferida da linhagem LEW (doadora) para o genoma do SHR (receptora), por meio de uma série de retrocruzamentos. Aqueles animais que estivessem carregando o QTL de interesse da linhagem doadora eram selecionados para o próximo retrocruzamento, novamente com a linhagem receptora, e assim sucessivamente, até que o genoma da linhagem congênica fosse igual ao da linhagem receptora (SHR), com exceção do *locus* diferencial (**Figura 1**). Após cinco anos de reprodução seletiva, a linhagem congênica SLA16 permitiu confirmar a localização de *Anxrr16* dentro de uma região de 86.3 Mpb.

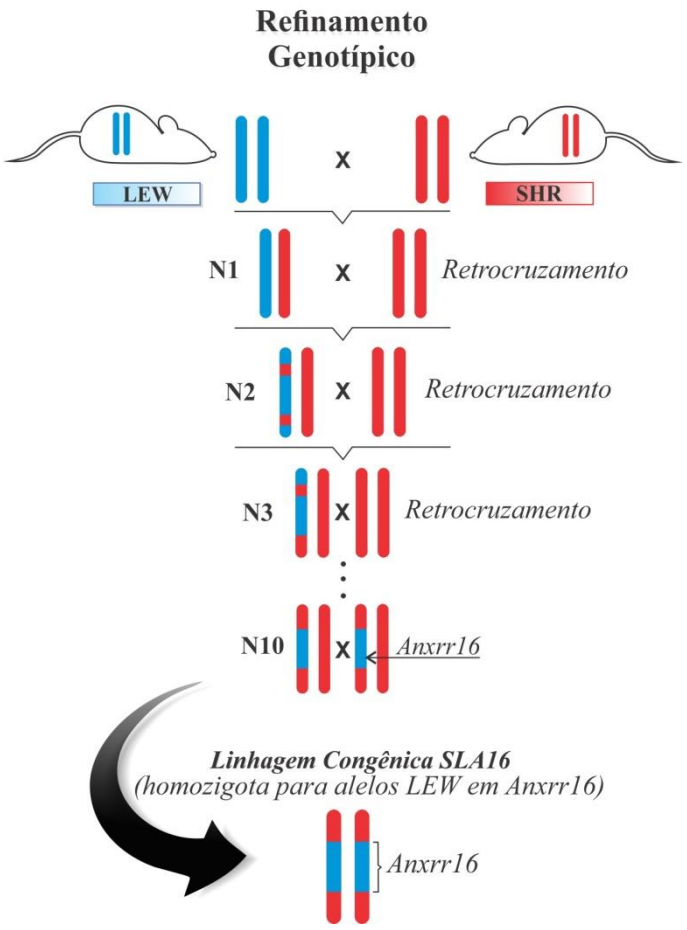

Figura 1 – Série de cruzamentos envolvidos na construção da linhagem congênica SLA16. Após a obtenção da N1, os animais gerados foram continuamente retrocruzados com a linhagem parental SHR (e genotipados para três marcadores na região do *locus* diferencial) por dez gerações, após as quais os animais heterozigotos no locus Anxrr16 foram intercruzados. A linhagem congênica é homozigota para alelos LEW no locus Anxrr16, e possui mais de 99.9% de alelos do tipo SHR no restante do seu genoma.

A linhagem SLA16 mostrou maiores índices de locomoção central no CA quando comparado com seu controle SHR, sendo essa característica observada em ambos os sexos. Os efeitos "ansiolíticos" dos alelos LEW em *Anxrr16* foram confirmados em outros testes de ansiedade, dos quais se podem citar a CBP, o teste do labirinto em T e o teste triplo. Como os animais SLA16 apresentaram maior locomoção geral que os SHR, foi levantada a possibilidade de esse *locus* afetar outras características além das emocionais, como, por exemplo, a atividade motora. Entretanto, após 22,5 h de habituação na caixa de atividade, bem como em suas caixas moradias, nenhuma diferença na atividade locomotora entre as linhagens foi observada, sugerindo que *Anxrr16* parece modular a reatividade emocional a ambientes novos mais que a atividade locomotora espontânea (DE MEDEIROS et al., 2013; MEDEIROS et al., 2014).

Diferente de abordagens envolvendo animais *knockouts* e transgênicos, a presente estratégia experimental é baseada na variação natural dos genes e produtos gênicos que modulam a característica de interesse de uma maneira que facilita a translação de modelos animais para condições clínicas humanas.

2 HIPÓTESES

Conforme mencionado anteriormente, os ratos das linhagens isogênicas LEW e SHR diferem para uma série de aspectos comportamentais, incluindo aqueles relacionados à ansiedade/emocionalidade. Apesar da caracterização comportamental e farmacológica que realizamos ao longo dos últimos anos, ainda existem dúvidas sobre o significado psicológico real das diferenças comportamentais entre essas duas linhagens.

Algumas diferenças comportamentais encontradas entre elas podem ser atribuídas tanto a diferenças nos níveis de emocionalidade/ansiedade desses animais como também a diferenças de aprendizado/memória. Ou ainda, as diferenças de ansiedade/emocionalidade, entre essas duas linhagens, poderiam ocasionar diferenças na formação de memórias, principalmente àquelas com componentes emocionais envolvidos, uma vez que se sabe que há uma relação do estado emocional do animal com a formação de memórias (RIBEIRO et al., 2010). Ademais, muitos dos estudos supracitados relatam que os ratos SHR apresentam um desempenho reduzido em diferentes paradigmas utilizados para investigar processos de aprendizado e memória (MATHEWS, 1990; RIBEIRO et al., 2010). Assim, considerando os fatores acima expostos, as seguintes hipóteses foram formuladas:

1. Existe um significado psicológico em comum entre variáveis de diferentes testes de ansiedade/emocionalidade e aprendizado/memória;

2. O cromossomo 4, que influencia comportamentos relacionados à ansiedade/emocionalidade, nesse modelo genético animal, também influencia comportamentos relacionados à aprendizado/memória;

3. As linhagens SLA16 e SHR exibem comportamentos contrastantes nos testes que avaliam memória/aprendizado e ansiedade/emocionalidade.

3 OBJETIVOS

3.1.1 Objetivos Gerais

Buscar as bases genéticas dos comportamentos relacionados à memória e aprendizado no cromossomo 4 do rato, com o intuito de futuramente descobrir genes que podem ser alvos para tratamentos farmacológicos de transtornos neuropsiquiátricos. Para tais fins o presente trabalho foi dividido em duas estratégias experimentais que serão delineadas nos Materiais e Métodos.

3.1.2 Objetivos Específicos

- Avaliar comportamentalmente ratos F2 machos provenientes de um intercruzamento entre as linhagens LEW e SHR;
- Avaliar o grau de correlação entre as medidas comportamentais de diferentes testes que envolvam aprendizado, memória e emocionalidade;
- Realizar um mapeamento de QTL no cromossomo 4 para comportamentos que envolvam aprendizado, memória e emocionalidade;
- Analisar os efeitos do *locus Anxrr16* sobre o perfil comportamental das linhagens SLA16 e SHR em testes que envolvam aprendizado, memória e emocionalidade;
- Verificar se as linhagens SLA16 e SHR apresentam diferenças na pressão arterial sistólica.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Primeira estratégia experimental

4.1 ANIMAIS

A linhagem LEW/HsdUnibAnra utilizada neste estudo foi obtida da Harlan Sprague Dowley Inc. (Indianápolis, IN) e adquirida pelo Laboratório Genética do Comportamento (LGC)-UFSC a partir da UNICAMP (Campinas, SP, Brasil). Já a linhagem SHR/NCrlAnra, originária da Universidade de Harvard (Boston, MA), foi obtida a partir da UNESP (Botucatu, SP, Brasil).

Desde suas aquisições pelo LGC-UFSC, as colônias de ratos LEW e SHR foram mantidas sob um sistema de acasalamento consanguíneo (irmão/irmã), com o intuito de manter a consanguinidade das linhagens. Os animais foram desmamados e separados por sexo com quatro semanas de idade e, após isso, foram mantidos em gaiolas de plástico coletivas (cinco ratos/gaiola). Comida e água estavam disponíveis *ad libitum*, sob um ciclo claro/escuro de 12/12h (luzes acessas às 07:00 h) com a temperatura sempre mantida à 21 ± 2 °C. Essas duas linhagens foram utilizadas para geração da população F2, necessária para os estudos de análise de QTL.

Os experimentos realizados estavam de acordo com as normas locais do Comitê de Ética no Uso de Animais em pesquisa da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC) e do Rio Grande do Norte (CEUA/UFRN) e foram aprovados sob os Protocolos PP00903 e 040/2011, respectivamente.

4.2 PRODUÇÃO DOS ANIMAIS F2

Devido a questões de logística, os animais utilizados nas análises de QTL realizadas neste trabalho foram produzidos em dois momentos diferentes, denominados de primeiro e segundo grupo. Para a produção do **primeiro grupo**, cinco ratos SHR machos e cinco LEW fêmeas foram cruzados, gerando uma população híbrida F1. Os animais F1 foram intercruzados (15 machos x 15 fêmeas), produzindo 59 machos F2 (primeiro grupo), no Laboratório de Estudos da Memória em Roedores (LEME-UFRN). Os ratos F2 do primeiro grupo foram submetidos a uma bateria de 5 testes comportamentais (descritos a seguir), a partir de 8 semanas de idade.

Posteriormente, 15 machos e 15 fêmeas F1 foram novamente intercruzados, produzindo mais 40 machos F2 (**segundo grupo**). O segundo grupo também foi submetido à mesma bateria de testes comportamentais que os animais do primeiro grupo.

Após os testes comportamentais (**fenotipagem**), todos os animais foram sacrificados e amostras de tecidos foram retiradas de cada animal para extração e análise de DNA (**genotipagem**).

Neste trabalho foram utilizados 96 ratos machos da geração F2 para as análises fenotípicas e genotípicas, sendo que os testes comportamentais envolvendo a geração F2 foram realizados no LEME-UFRN.

4.3 FENOTIPAGEM

4.3.1 Labirinto em Cruz Elevado Modificado

O labirinto em Cruz Elevado Modificado (LCEM), inicialmente proposto por Silva e Frussa-Filho (2000), é um modelo animal de aprendizado e memória que fornece simultaneamente informações sobre o estado emocional do animal (SILVA; FRUSSA-FILHO, 2000). Para realização desse teste foi utilizado um aparato constituído por quatro braços de

madeira, dispostos em formato de cruz. Dois dos braços eram abertos (comprimento= 50 x largura= 15 cm) opostos a dois braços fechados de mesmo comprimento e largura e 40 cm de altura, elevados cerca de 50 cm do chão (**Figura 2**). Um dos braços fechados (braço aversivo) possuía uma lâmpada de 100W e uma fonte sonora acopladas na extremidade final superior que, quando acionadas, tornavam esse braço aversivo para o animal. A lâmpada acionada gerava uma iluminação de aproximadamente: 1200 lux no início do braço aversivo; 2000 na metade (embaixo da lâmpada) e 1500 no final. Já a fonte sonora emitia um ruído de 80 dB quando ativada. Os braços abertos possuíam uma pequena borda com o intuito de prevenir uma possível queda do animal.

Este protocolo consistiu em uma sessão de treino e uma de teste. Na sessão de treino, cada animal foi colocado no aparato experimental e pôde explorá-lo livremente por 10 minutos. Cada vez que o animal entrava com as quatro patas no braço considerado aversivo, o experimentador acionava os estímulos aversivos (ruído de 80 dB emitido pela caixa de som e luminosidade emitida pela lâmpada) por meio do filtro de linha, interrompendo-os assim que o animal deixava esse braço com as quatro patas. No outro braço fechado (braço não-aversivo), ou nos braços abertos, nenhum estimulo era acionado.

Na sessão de teste, 24h após a sessão de treino, os animais foram reexpostos ao mesmo aparato, por 10 minutos, sem que nenhum estímulo fosse aplicado. Entretanto, a caixa de som e a lâmpada permaneceram sobre o braço aversivo (desligadas) como pistas ambientais para o animal. Durante ambas as sessões, o tempo de permanência nos braços abertos e em cada braço fechado (aversivo e não-aversivo) foi registrado a cada minuto. O tempo de exploração dos braços aversivos foi aferido minuto a minuto, com o intuito de avaliar a retenção e extinção da tarefa (minutos finais). A retenção da tarefa (aprendizado) foi avaliada pela porcentagem de tempo de exploração do braço aversivo (tempo gasto no braço aversivo/tempo gasto em ambos os braços fechados – aversivo e não-aversivo) na sessão de teste. Ao mesmo tempo, a porcentagem de tempo de exploração dos braços abertos (tempo gasto nos braços abertos/tempo

gasto em todos os braços), aos quais roedores exibem uma esquiva inata, foi utilizada para avaliação da emocionalidade. Além disso, a distância percorrida no labirinto também foi registrada e utilizada para avaliação da atividade motora. As sessões foram gravadas por uma câmera digital posicionada acima do aparato e o registro dos parâmetros comportamentais supracitados foi realizado pelo software Anymaze® (Stoelting, USA).

Figura 2 - Aparato utilizado no teste do LCEM.

4.3.2 Campo Aberto

O Campo Aberto (CA), originalmente desenvolvido por Calvin Hall (1934) para medir a emocionalidade em ratos, é um dos modelos animais de ansiedade mais amplamente utilizados (HALL, 1934). Roedores, em geral, possuem aversão natural a ambientes novos, abertos e iluminados, sendo que a exposição a essas situações pode desencadear comportamentos referentes à ansiedade. Atualmente, foram desenvolvidas variações nesse teste, de acordo com o interesse da pesquisa. São encontradas variações no tamanho e forma da arena (EILAM, 2003), bem como na intensidade da iluminação (WALKER; DAVIS, 1997). Para realização desse teste, utilizou-se uma arena preta circular (diâmetro de 84 cm), cercada por paredes de 32 cm de altura (**Figura 3**), com o chão do aparato dividido por linhas, sendo que a região adjacente à parede

constituía a região periférica, enquanto a região central era localizada na região interna do aparato. Cada animal foi posicionado no centro do aparato e o número de quadrados cruzados na região periférica e central foi registrado ao longo de cinco minutos. Além disso, quantificou-se também o tempo gasto na região central no aparato. Considera-se que a locomoção na área central do aparato está mais relacionada com a emocionalidade do animal, enquanto a locomoção periférica envolveria predominantemente o componente motor (RAMOS, 2008). Pistas externas (figuras geométricas) foram colocadas nas paredes para facilitar a localização espacial dos animais nesse teste.

Figura 3 - Aparato utilizado no teste do CA.

4.3.3 Reconhecimento de Objetos

O teste de Reconhecimento de Objetos (RO) (**Figura 4**) avalia memórias declarativas episódicas e se baseia principalmente no comportamento exploratório inato dos roedores. Esse teste possui algumas vantagens frente a outros da mesma natureza, uma vez que não requer motivação externa, recompensa ou punição. Essencialmente, a exploração natural de objetos novos em um ambiente familiar é avaliada pelos animais (ANTUNES; BIALA, 2012). Os estudos mostram que os ratos normalmente gastam mais tempo explorando o objeto novo do que o já apresentado (DODART et al., 1997; OBINU et al., 2002). Dois objetos diferentes foram

usados aleatoriamente entre os experimentos (taças ou xícaras). Os objetos diferiam em altura e largura, foram feitos de plástico e preenchidos com cimento para garantir que os animais não os deslocariam durante o experimento.

O protocolo consistiu em uma sessão de treino e uma de teste. Vinte e quatro horas após a habituação no teste do CA (item 2.3.2), cada animal foi situado no centro do aparato com duas cópias idênticas de um dos objetos (sessão de treino), em uma configuração espacial específica. Uma hora após, cada animal foi reexposto ao aparato com uma cópia do objeto familiar (objeto idêntico ao treino) e uma cópia do objeto novo (consistindo na sessão de teste). O mesmo procedimento (teste) foi realizado 24h após a sessão de treino. O tempo de exploração do objeto novo (Tn) e do objeto familiar (Tf) foi contabilizado na sessão de teste. Com o tempo gasto em cada objeto calculou-se o índice de discriminação (DI) – DI= (Tn-Tf)/(Tn+Tf). Esse resultado pode variar de +1 a -1, no qual o resultado positivo indica mais tempo gasto com o objeto novo, o resultado negativo indica mais tempo gasto com o objeto familiar e o resultado zero, nenhuma preferência (AGGLETON et al., 2010; BURKE et al., 2010). Considera-se que o animal aprendeu a tarefa quando ele explora mais tempo o objeto novo em detrimento do familiar.

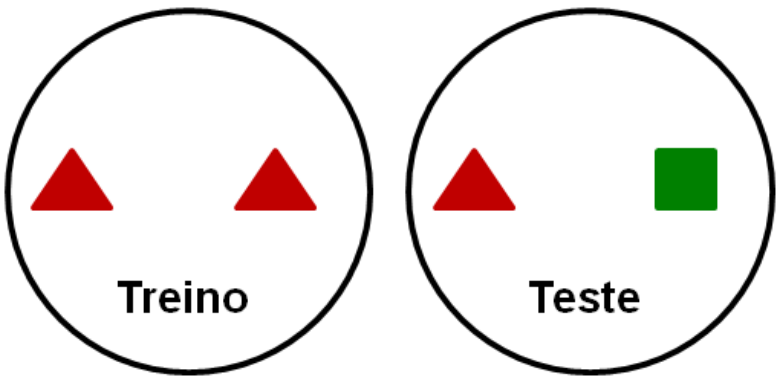

Figura 4 – Esquema utilizado no teste do Reconhecimento de Objetos. Os círculos representam o CA. As figuras geométricas representam os objetos idênticos na sessão de treino. Na sessão de teste está representado o objeto familiar e o novo.

4.3.4 Alternação Espontânea

Para avaliar diferenças de desempenho em tarefas de memória espacial, na ausência de estímulos aversivos, foi realizado o teste de Alternação Espontânea (AE) (RIBEIRO et al., 2010). Nesse experimento, cada animal foi submetido a uma sessão de 10 minutos em um labirinto em cruz elevado (**Figura 5**) feito de madeira, com quatro braços fechados idênticos (50 x 15 x 40 cm de altura) identificados como braços A, B, C e D. Pistas externas foram colocadas nas paredes para que o animal pudesse se localizar espacialmente. Quando deixados para explorar livremente, ratos alternam espontaneamente entre os braços do labirinto, utilizando a memória espacial de trabalho para reter as informações dos braços previamente visitados. A sequência de entradas nos braços foi registrada e a porcentagem de alternação espontânea foi utilizada para análise do comportamento. Uma alternação é definida como a entrada em todos os quatro braços consecutivamente, sem repetições, e o percentual de alternações será calculado como o total de alternações/máximo de alternações possíveis.

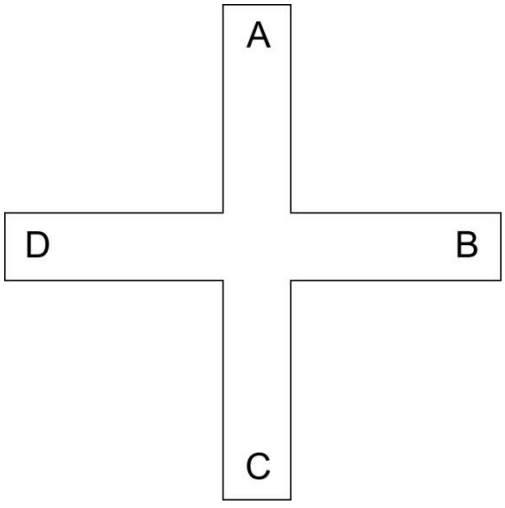

Figura 5 – Esquema utilizado no teste de Alternação Espontânea.

4.3.5 Medo Condicionado

Com o intuito de se investigar o desempenho dos animais em tarefas de memória emocional clássica, foi realizado o teste do Medo Condicionado Contextual (MC) (**Figura 6**) idêntico ao descrito por Ribeiro et al. (2010). Nesse tipo de condicionamento, também conhecido como condicionamento Pavloviano, um estímulo inicialmente neutro (nesse caso o contexto em que o animal se encontra) é pareado com um estímulo incondicionado aversivo (choque nas patas), transformando o estímulo neutro em condicionado aversivo, sendo capaz de desencadear posteriormente e somente com sua apresentação, respostas de medo condicionadas, como o congelamento contextual (FENDT; FANSELOW, 1999). Nesse protocolo os animais foram submetidos a duas sessões de 5 minutos (sessão de treino e teste), em uma caixa com chão de grade de compartimento único. Na primeira sessão (treino), cada animal foi colocado no aparato e após 150 s, seis choques de 0.4 mA foram administrados por 2s a cada 30s. Nessa sessão de treino duas fases foram consideradas: antes (pré-condicionamento) e durante (condicionamento) a administração dos choques. Após o último choque, os ratos retornaram para suas casas moradias. Na sessão de teste (após 24 h) não foram aplicados choques e foi quantificada a duração do comportamento de congelamento (*freezing*) em decorrência da exposição ao contexto previamente pareado com choque e a tentativa de escape (*jumping* e *rearing*).

Figura 6 – Aparato utilizado no teste do Medo Condicionado.

4.4 ANÁLISE DE FATOR

Os resultados comportamentais dos animais F2 foram submetidos à análise de fator, com *eigenvalue* mínimo igual a 1. O desenvolvimento inicial da análise de fator foi devido a Charles Spearman, que estudou a correlação entre os resultados de testes de diversos tipos e observou que muitas correlações observadas poderiam ser explicadas por um modelo simples de resultados (SPEARMAN, 1904). Tais análises fatoriais ou multivariadas já mostraram que vários fatores independentes foram necessários para explicar toda a gama de variabilidade observada em respostas comportamentais a situações estressantes. Dessa forma, esse tipo de análise tem sido empregada para distinguir entre diversas dimensões da reatividade emocional em modelos experimentais (MORMEDE et al., 2002). A ideia inicial dessa análise consiste em agregar uma série de variáveis reais em um número menor de variáveis virtuais correlacionadas, chamadas de fatores. Diz-se que dois resultados são altamente correlacionados se eles possuírem cargas elevadas nos mesmos fatores. Quando as cargas são iguais, em um mesmo fator, significa que os resultados são correlacionados positivamente. Do mesmo modo, cargas opostas expressam uma correlação negativa. Todos os procedimentos da análise estatística foram realizados com o uso do programa *Statistica* 10.

4.5 GENOTIPAGEM

Foram testados 44 marcadores moleculares do tipo microssatélite localizados no cromossomo 4 do rato, sendo que somente 24 foram polimórficos entre as linhagens parentais. Destes todos, 10 foram escolhidos por se distribuírem ao longo de todo o cromossomo e se localizarem nas regiões onde tinham sido encontrados QTL prévios relacionados a características neurobiológicas (BICE et al., 1998; CARR et al., 1998; POTENZA et al., 2004; RAMOS et al., 1999; TERENINA-RIGALDIE et al., 2003). Após a análise comportamental (fenotipagem), cada

um dos animais foi então genotipado para estes 10 marcadores do tipo microssatélite (Quadro 1). As amostras de ácido desoxirribonucleico (DNA) foram extraídas de pequenos fragmentos tissulares do fígado (de aproximadamente 1 cm) dos animais F2. Para extração do DNA, utilizou-se o kit comercial DNAzol (GibcoBRL), permanecendo estocado em freezer -20C até o momento do uso. Após a extração, 5 uL das amostras de DNA (concentração de 10 ng/uL) foram submetidas à reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* – PCR), com 5 uL de mix de cada par de *primers* (1 pmol/mL de cada), 0,4 u de GoTaq® DNA Polymerase, 10 uL de tampão 2x (Promega), em um volume total de 20 uL. A amplificação foi realizada em um termociclador Px2 Thermo Cycler (Hybaid, EUA) com a seguinte programação: (a) um ciclo a 96 °C por 5 minutos; (b) trinta e cinco ciclos a 92 °C por 30 segundos, 51-59 °C (dependendo do microssatélite utilizado) por 1 minuto e 72 °C por 31 segundos; e (c) um ciclo a 72 °C por 2 minutos. Em seguida ao processo de amplificação, o produto de PCR dos animais F2 foi misturado com corante não mutagênico Kasvi® e aplicado – juntamente com amostras controle de animais LEW, SHR e F1 – em géis de agarose a 3%. A genotipagem para cada marcador microssatélite foi analisada comparando-se a posição das bandas de cada amostra com as dos respectivos controles.

Quadro 1- Marcadores moleculares do tipo microssatélite utilizados na genotipagem dos animais F2. Na primeira coluna está o nome de cada marcador. Na segunda coluna encontram-se a posição do marcador em pares de base no cromossomo 4 (de acordo com o mapa *RGSC Genome Assembly v3.4*). Na terceira, as sequências dos seus primers *forward* (F) e *reverse* (R) e na quarta coluna, os tamanhos esperados para os alelos nas linhagens LEW e SHR (com base em dados das sub-linhagens LEW/Pit e SHR/OlaHSd, respectivamente). Todas as informações foram obtidas por meio do *Rat Genome Database Website* (2014a).

Marcador	**Posição (pb)**	**Sequências dos *Primers Forward* (F) e *Reverse* (R)**	**Tamanhos esperados (pb)**	
			LEW	**SHR**
D4MGH22	4.410.369	F: CCTGTCATGTTATTGATGATGATG R: GGTCACATGAAATTTGACCTCA	92	114
D4RAT151	29.413.686	F: TCAAAGGGTAGATGATGGAGTTT R: GGTGCAAATTCAGAGGCATT	238	224
D4WOX22	78.042.681	F: TCAGAAAAATTTAAATTGTATCTGTG R: CCATATGCAAGTGTGGGTATC	Não disponível (aprox. 162 pb)	
D4RAT76	84.886.545	F: GTTAAGGAACCATGGGCTGA R: GTTAAGGAACCATGGGCTGA	176	200
D4RAT49	119.279.962	F: CAGGGAGCTACTGCACACCT R: TCCATCCCTTCACAGACTTTG	151	157
D4MGH27	129.308.765	F: TCCTTCACATACATGTGCATACC R: TGAGAAGGGCTGTCAGTGG	258	252
D4MGH6	135.636.930	F: GGGTCTTGTAGCATTTTTTAAAGC R: AGAACCAACTCCTAAACTCCTGC	154	142
D4RAT59	150.047.799	F: GCGGAATGATAGTTACTACGGC R: GCAGTGTGTTTGGGGTAGCT	168	174
D4MGH11	171.204.377	F: CTCAACGAACAGGTTTCATTATG R: AGAAGGGATGACAATTGGTACG	150	158
D4RAT206	Não disponível	F: GCAGGAAACAGTTTACTTCATGC R: AAGTAGTTGGCATGCGTGTG	160	170

4.5.1 Gel de agarose

Para a genotipagem dos animais foi utilizado gel de agarose 3% (7g de agarose dissolvidas em 250 mL de tampão TBE 0,5X (Tris, Boro e EDTA). A mistura foi levada ao forno micro-ondas e aquecida até a total dissolução do pó. O gel foi então depositado no recipiente apropriado por aproximadamente 20 minutos para ocorrer a solidificação do gel. Em

seguida, o gel sólido foi colocado em uma cuba de eletroforese e coberto com cerca de 700 mL de tampão TBE 0,5X. Depositou-se 7µL do produto de PCR e 1,5 uL do corante Kasvi® (Alaranjado G, Azul de Bromofenol e Xileno Cianol) em cada poço (no máximo 42 amostras por gel) que foram submetidos a uma corrente elétrica variante e tensão fixa de 300V durante 40-70 minutos, variando de acordo com o marcador molecular utilizado.

4.6 ANÁLISE DE QTL

Para proceder à análise de QTL, os dados genotípicos e fenotípicos dos 96 ratos machos da geração F2 foram adicionados ao software estatístico R e analisados por meio do pacote R/QTL, sendo que os gráficos provenientes das análises foram gerados pelo J/QTL, que é uma interface gráfica de análise de dados. Antes de proceder à análise de QTL, faz-se necessário a construção de um mapa de ligação que fornece a localização e a distância em frequência de recombinação ou centimorgans (cM) entre todos os 10 marcadores moleculares do tipo microssatélite utilizados. Essa distância é calculada a partir da taxa de recombinação que ocorre entre esses marcadores e foi realizada por meio do programa GQMOL.

Após a geração do mapa de ligação, os dados fenotípicos foram adicionados ao programa R/QTL para então ser realizado o mapeamento do QTL. A análise de QTL utilizou os dados fenotípicos e genotípicos com o objetivo de revelar as regiões do genoma fortemente associadas às características fenotípicas de interesse. A análise de ligação procurou por um QTL ao longo de todo cromossomo a cada 1 cM, gerando um LOD score (logaritmo de *odds*) como medida de significância do QTL. A pontuação de LOD score compara a probabilidade de existir um QTL, em um determinado intervalo, com a probabilidade de não existir nenhum QTL em qualquer lugar em todo cromossomo, sendo que quanto maior o valor do LOD, maior a probabilidade de que a região genômica em questão afete o fenótipo de interesse.

No presente estudo, os limiares (*threshold*) de significância ($p < 0,05$) e sugestividade

(p<0,10 altamente sugestivo e p< 0,63 sugestivo) foram estimados por meio do teste de permutação para cada fenótipo, com a análise de 1000 permutações a cada 1 cM. Esses limiares de significância foram escolhidos porque são os pontos de corte (*cutoff*) amplamente aceitos (LANDER; KRUGLYAK, 1995) e foram calculados utilizando 1000 permutações (CHURCHILL; DOERGE, 1994). O teste de permutação é uma abordagem mais geral para obter valores limiares de significância que são ajustados a cada caso. Foi utilizado o mapeamento por intervalo composto, que consiste no método mais utilizado para análise de QTL, o qual leva em conta dados genotípicos faltantes em um QTL putativo. O mapeamento por intervalo composto permite testar se há evidência da presença de QTL em todas as posições do genoma. Além disso, o efeito do QTL também foi estimado considerando o grupo (**primeiro** e **segundo grupo** da população F2, ver item 4.2) como uma covariável interativa, já que a época do nascimento (variável ambiental) pode afetar de modo diferente o comportamento dos animais. A principal vantagem de se incluir covariáveis na análise de QTL é reduzir a variação dos resíduos matemáticos, no caso de a covariável ter um forte efeito sobre o fenótipo, o que possibilita melhorar a capacidade de detecção do QTL.

Segunda estratégia experimental

4.7 ANIMAIS

Nessa segunda parte do trabalho, foram utilizadas a linhagem SHR e uma linhagem de ratos congênicos denominada SLA16. Esta linhagem foi desenvolvida integralmente no LGC-UFSC entre os anos de 2005 e 2009. Como já mencionado, nessas linhagens, uma região de interesse (*locus* diferencial) foi transferida do genoma de uma das linhagens parentais (doadora) para a outra linhagem (receptora), através de sucessivos retrocruzamentos (**Figura 1**). A partir desse ponto, é possível estudar as diferenças comportamentais encontradas entre a linhagem congênica e a linhagem parental receptora, uma vez que ambas as linhagens possuem o mesmo

genoma, exceto pela região do *locus* diferencial, ao qual são atribuídas as diferenças fenotípicas existentes entre as linhagens (PEREIRA, 2010). Nessa fase do trabalho, foram utilizados machos das linhagens SLA16 e SHR controle, sendo todos os experimentos realizados no LGC-UFSC (CEUA/UFSC Protocolo PP00903).

4.8 ANÁLISE COMPORTAMENTAL

4.8.1 Labirinto em Cruz Elevado Modificado

Para realização desse teste, os mesmos parâmetros comportamentais descritos no item 4.3.1 foram avaliados. Todavia, o comportamento foi analisado por meio de câmera de vídeo situada acima do aparato, onde os registros foram captados na sala adjacente à sala de teste comportamental e analisados por um experimentador.

4.8.2 Campo Aberto

O teste do CA foi realizado em uma arena branca (**Figura 7**) quadrada (100 x 100 cm), cercada por paredes de 40 cm de altura, com o chão dividido por linhas pretas em 25 quadrados (20 x 20 cm). Os 16 quadrados adjacentes às paredes formavam a região periférica do aparato, enquanto os outros nove estabeleciam a parte central. A iluminação do teste foi feita através da lâmpada da sala de testes, controlada por um *dimmer*, sendo fixada em 10 lux. Cada animal foi posicionado no centro do aparato e os mesmos parâmetros comportamentais descritos no item 2.3.2 foram registrados (locomoção central, locomoção periférica e tempo gasto no centro do aparato).

Figura 7 – Aparato utilizado no teste do Campo Aberto.

4.8.3 Reconhecimento de Objetos

Para realização desse teste comportamental, o protocolo foi exatamente o mesmo descrito no item 4.3.3, diferindo apenas na estrutura do CA, que foi circular no experimento com os animais F2 e quadrado nesse caso, conforme descrito no tópico 4.3.2. Além disso, a sessão de teste foi realizada apenas 24 h após a sessão de treino.

4.8.4 Alternação Espontânea

Nesse experimento, foi utilizado um aparato branco de madeira (**Figura** 8) formado por quatro braços (60 x 10 x 20 cm de altura), sendo que um dos braços foi fechado. Os braços foram identificados como braço A, B, C e elevados a 70 cm do chão. A sequência de entradas nos braços foi registrada e a porcentagem de alternação espontânea foi utilizada para análise do comportamento. Uma alternação é definida como a entrada em todos os três braços consecutivamente, sem repetições, e o percentual de alternações será calculado como o total de alternações/máximo de alternações possíveis.

Figura 8 – Aparato utilizado no teste de Alternação Espontânea.

4.8.5 Medo Condicionado

A realização desse teste seguiu exatamente o mesmo protocolo descrito anteriormente (item 4.3.5). As medidas comportamentais aferidas foram o tempo de congelamento e tentativa de escape do animal nas sessões de treino e teste, consideradas como medidas de retenção da tarefa, como já anteriormente detalhada.

4.8.6 Medida não invasiva da pressão arterial

O método utilizado para obter a média da Pressão Arterial Sistólica (PAS) foi medida por pletismografia de cauda. A temperatura da sala onde foram realizadas as medidas foi mantida a 30°C (modo aquecido) e os animais foram levemente aquecidos por uma manta térmica a fim de promover a dilatação da artéria caudal e possibilitar a detecção do pulso por sensor. Os ratos foram acondicionados individualmente em um contensor de acrílico, para limitar seus movimentos. Após um período de adaptação ao contensor e estabilização (5 a 10 minutos) foi conectado à cauda dos animais um manguito (*tail-cuff*) acoplado a uma bomba insufladora de ar (Eletro-Esfigmomanômetro, ADInstruments) para promover o enchimento do manguito e

consequente oclusão do fluxo sanguíneo, além de um sensor piesoelétrico para detecção do pulso. Tanto o manguito quanto o sensor foram acoplados a um sistema de aquisição de dados (Programa LabChart, versão 7.0) para registro do pulso correspondente ao fluxo sanguíneo, bem como da pressão necessária (em mmHg) para se ocluir a artéria caudal. Depois de estabilizado o fluxo sanguíneo e a frequência cardíaca do animal, a bomba insufladora foi acionada (pressão máxima de 200 mmHg) para que o manguito inflasse e ocorresse a oclusão do fluxo sanguíneo que foi observada pela ausência de fluxo detectada pelo sensor, posterior a isso o manguito foi desinflado, havendo retorno do fluxo sanguíneo. O primeiro sinal de pulso detectado pelo sistema de aquisição de dados representou o momento em que a pressão do sistema tornou-se menor do que a pressão sanguínea do rato. Este valor de pressão de oclusão do manguito permitiu o aparecimento do primeiro sinal de pulso considerado equivalente à PAS. Todos os grupos de animais estudados foram submetidos a três medidas de pressão arterial, sendo que os valores obtidos de PAS utilizadas nas análises estatísticas correspondem à média dessas três medidas.

4.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todas as análises estatísticas foram feitas utilizando o software *Statistica 10* (Statsoft, Tulsa, OK, EUA). Experimentos envolvendo a linhagem como único fator foram analisados pelo teste t de Student. No experimento de RO e MC foi utilizado o teste t pareado para verificar diferenças entre as sessões dentro de um mesmo teste. Na análise dos genótipos dos marcadores moleculares relacionados aos QTL significativos foi utilizado a ANOVA de uma via para o fator "genótipo", sendo que sempre que necessário o teste de comparação de médias (*post-hoc*) *Newman-Keuls* foi aplicado. Valores de "p" menores ou iguais a 0,05 foram considerados como resultados significativos.

5 RESULTADOS

Resultados da primeira estratégia comportamental

Os resultados de algumas variáveis dos testes comportamentais relacionados à emocionalidade e ao aprendizado/memória realizados com os animais F2 localizam-se na **Figura 9**.

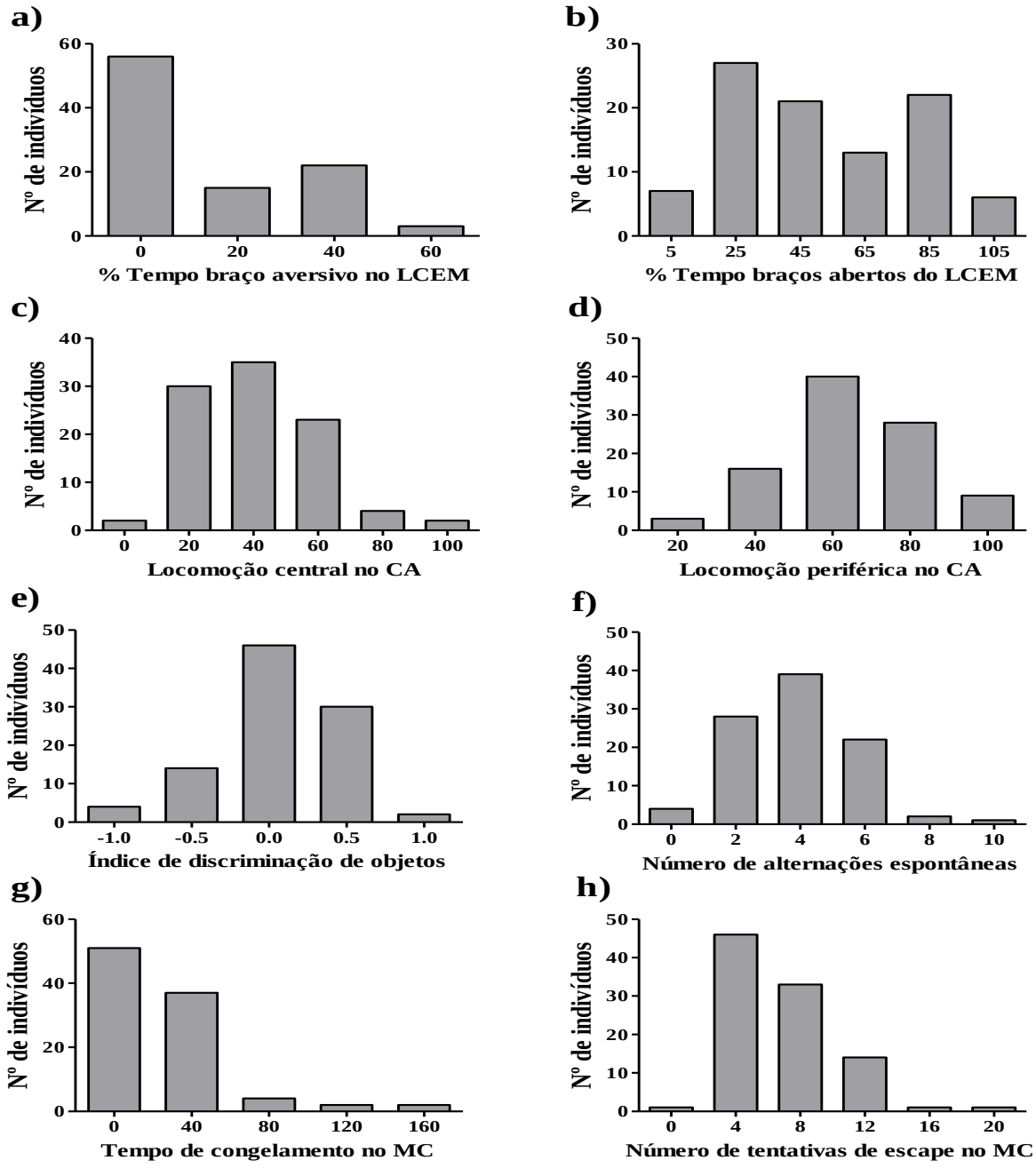

Figura 9 – Médias dos comportamentos dos 96 animais F2 LEW/SHR nos testes: a) percentual de tempo nos braços aversivos do LCEM; b) percentual de tempo nos braços abertos do LCEM; c) locomoção central no CA; d) locomoção periférica no CA; e) índice de discriminação de objetos no RO; f) número de alternações espontâneas no teste de AE; g) tempo de congelamento no MC e h) número de tentativas de escape no MC. LCEM= Labirinto em Cruz Elevado Modificado, CA= Campo Aberto e MC= Medo Condicionado.

O resultado da análise de fator para oito medidas comportamentais, selecionadas dos cinco testes comportamentais realizados com os animais F2, encontra-se exibido na **Tabela 1**.

Essa análise revelou três fatores principais com *eigenvalues* maior do que 1, correspondendo em conjunto a 57% da variância total dos dados. O primeiro fator, que correspondeu a 25% da variância total, correlacionou as medidas de locomoção central e periférica no CA com a alternação espontânea no teste de AE e tentativa de escape no MC e todas essas se correlacionaram negativamente com a medida do tempo de congelamento no MC. O segundo fator, correlacionou positivamente medidas do teste do LCEM (porcentagem de tempo nos braços abertos e nos braços aversivos) com a locomoção central no CA, indicando que os animais que se locomovem mais no centro do CA, também gastam mais tempo nos braços abertos e aversivos do LCEM. Por fim, o terceiro fator correlacionou o índice de discriminação de objetos no teste de RO com tempo de congelamento no MC.

Tabela 1 - Análise de fator de traços fenotípicos quantificados em ratos machos da geração F2 LEW/SHR.

Medidas Comportamentais	Fator 1	Fator 2	Fator 3
% tempo braços abertos (LCEM)		0,77	
% tempo braço aversivo (LCEM)		0,81	
Índice de discriminação (RO)			-0,85
Alternação espontânea (AE)	-0,75		
Tempo de congelamento (s) (MC)	0,46		-0,42
Tentativa de escape (MC)	-0,44		
Locomoção central (CA)	-0,61	0,42	
Locomoção periférica (CA)	-0,74		
Variância total (%)	25	19	13

Quantificação de oito traços fenotípicos em 96 ratos machos (F2 LEW/SHR). Escores maiores que 0,4 são mostrados para cada fator. LCEM = labirinto em cruz elevado modificado, RO = reconhecimento de objetos, AE= alternação espontânea, MC = medo condicionado e CA = campo aberto**.**

O mapa genético produzido a partir da análise de ligação envolvendo todos os 96 animais F2 produzidos e os 10 marcadores moleculares utilizados encontra-se exibido na **Figura 9**. Os marcadores utilizados originaram um mapa de ligação de 129,8 cM. O marcador D4Rat49 não se

alinhou ao mapa de ligação, como resultado ele não fez parte desse mapa.

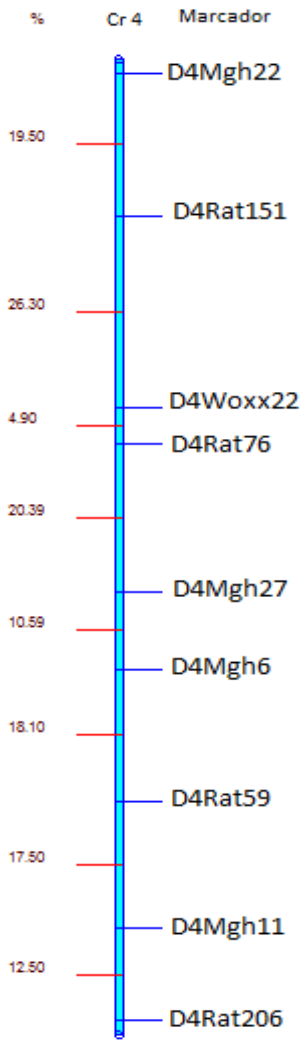

Figura 10 - Mapa genético originado a partir dos dados genotípicos obtidos com os 10 marcadores moleculares utilizados em todos os animais da população F2 desse estudo. A linha vertical representa o cromossomo 4 onde estão demonstradas as posições de cada marcador. As distâncias entre eles estão representadas em cM do lado esquerdo da figura, enquanto que os nomes dos marcadores estão do lado direito da mesma. O marcador D4Rat49 não foi alinhado ao mapa. Cr= cromossomo.

Primeira análise de QTL - considerando o "grupo" como covariável interativa

A primeira análise de QTL do cromossomo 4, na qual o grupo (**ver seção 4.6**) foi adicionado como uma covariável interativa, revelou um QTL significativo (**Figura 11**) e dois sugestivos (**Tabela 2**). O QTL significativo ($p<0,01$) influenciou uma medida relacionada à memória aversiva (tentativa de escape no teste do MC). Esse QTL foi encontrado próximo ao marcador D4Wox22 e alcançou um LOD escore de 4,45 **(Figura 11).**

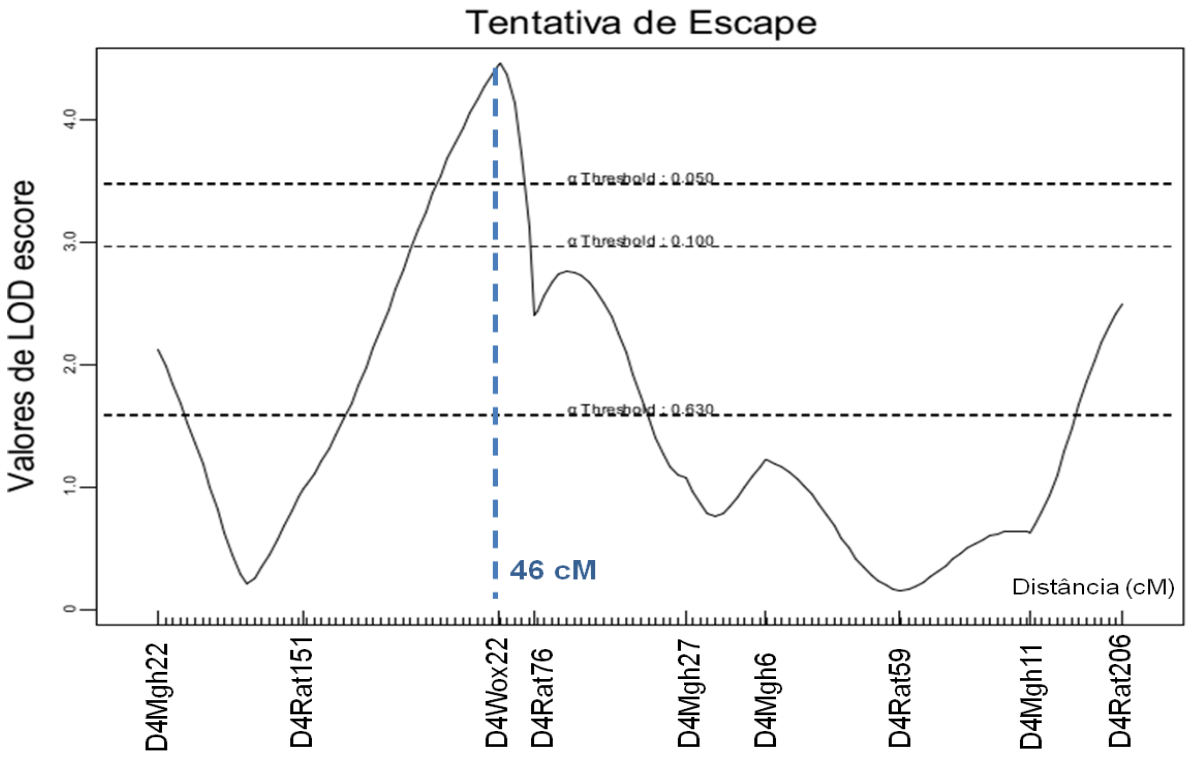

Figura 11 - QTL significativo encontrado para a medida "tentativa de escape" no teste do Medo Condicionado na análise de ligação realizada com 96 machos F2 LEW/SHR. No eixo do X encontram-se os 10 marcadores moleculares utilizados na análise e a distância em centimorgans (cM). No eixo Y os valores de máxima probabilidade deste QTL em LOD escore. Os limiares (*threshold*) de significância ($p < 0,05$) e sugestividade ($p<0,10$) e ($p < 0,63$) estão representados pelas linhas hachuradas.

Ainda considerando o "grupo" como uma covariável interativa, os dois QTL sugestivos encontrados afetaram o percentual de tempo gastos no LCEM e a locomoção central no CA (**Figura 12**).

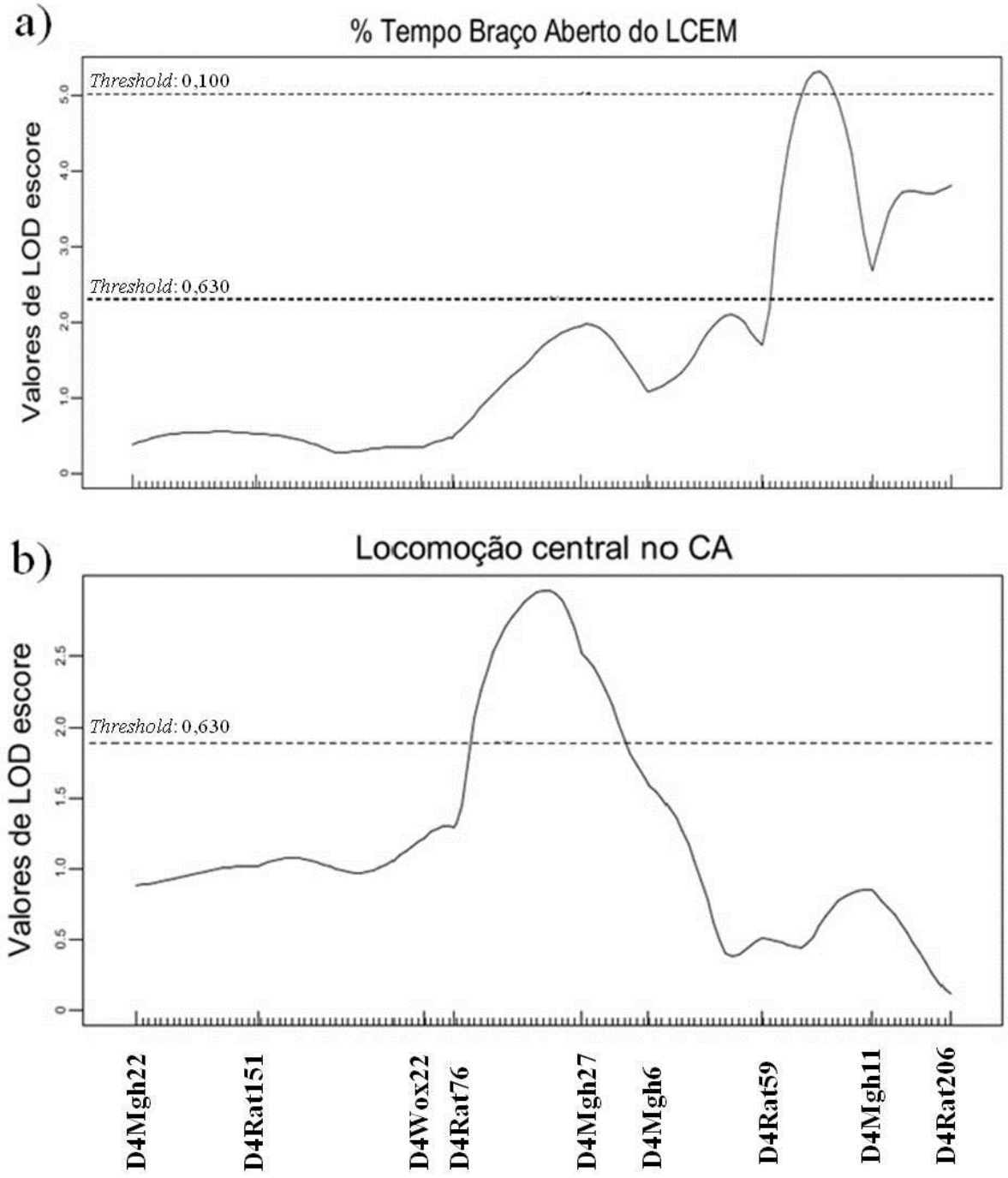

Figura 12 - QTL sugestivos encontrados na análise de ligação com os 96 machos F2 LEW/SHR para: a) porcentagem de tempo gasto nos braços abertos do LCEM e b) locomoção central no CA. No eixo do X encontram-se os 10 marcadores moleculares utilizados na análise e a distância em centimorgans (cM). No eixo Y os valores de máxima probabilidade deste QTL em LOD escore. Os limiares (*threshold*) de sugestividade ($p<0,10$) e ($p< 0,63$) estão representados pelas linhas hachuradas. LCEM= Labirinto em Cruz Elevado Modificado, CA= Campo Aberto.

Segunda análise de QTL – modelo sem covariáveis

Na segunda análise, foi encontrado um QTL significativo (**Figura 13**) e quatro sugestivos (**Tabela 2**). O QTL significativo foi para a medida da distância percorrida durante a sessão de treino do LCEM (**Figura 13**). Ele foi encontrado próximo do marcador D4Mgh27 e apresentou um valor de LOD escore de 2,54 (p<0,05). Os valores de LOD escore, nível de significância e localização em cM dos QTL significativos e sugestivos encontram-se na **Tabela 2**.

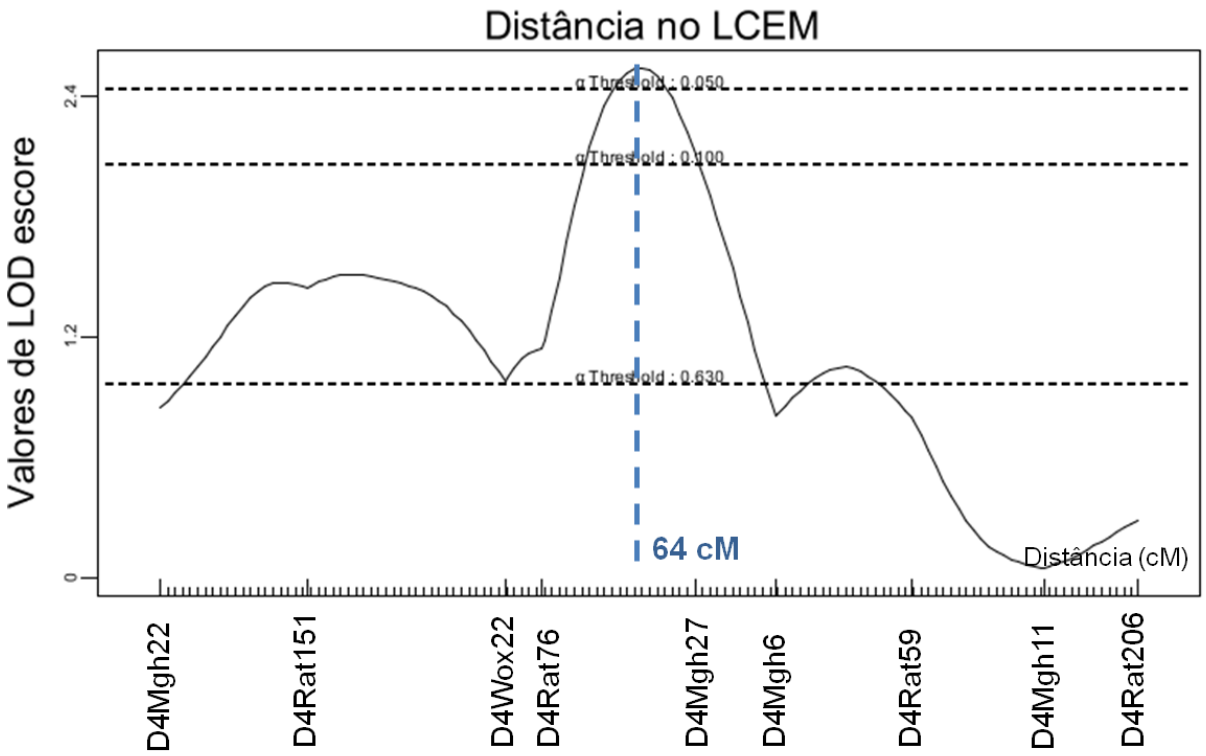

Figura 13 - QTL significativo encontrado para a medida "distância percorrida" na sessão de treino do teste do Labirinto em Cruz Elevado Modificado (LCEM) na análise de ligação com 96 machos F2 LEW/SHR. No eixo do X encontram-se os 10 marcadores moleculares utilizados na análise e a distância em centimorgans (cM). No eixo Y os valores de máxima probabilidade deste QTL em LOD escore. Os limiares (*threshold*) de significância (p< 0,05) e sugestividade (p<0,10) e (p< 0,63) estão representados pelas linhas hachuradas.

Em relação aos QTL sugestivos, três deles influenciaram comportamentos relacionados ao teste do LCEM e o outro uma medida relacionada ao teste do CA (**Figura 14**).

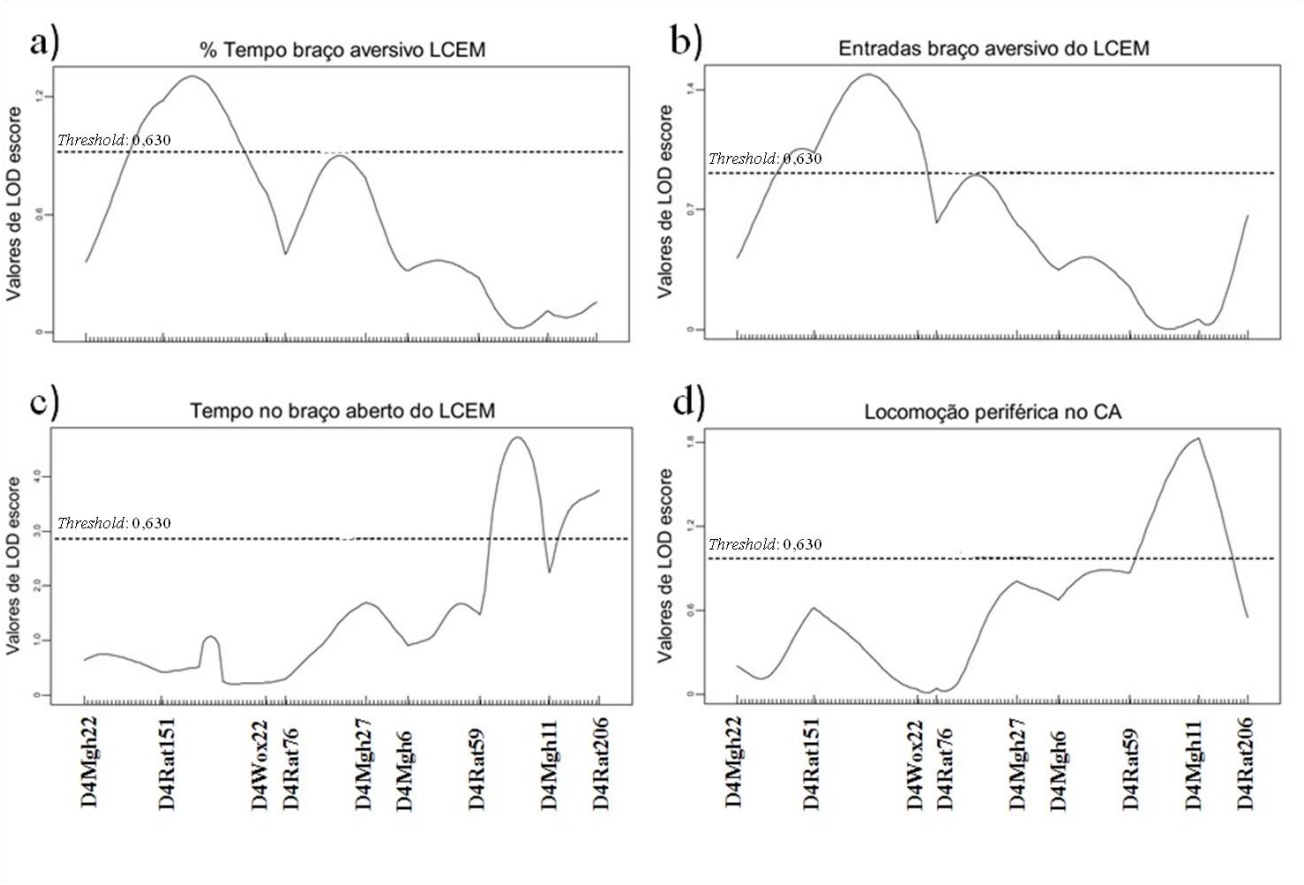

Figura 14 – QTL sugestivos encontrados na análise de ligação com os 96 machos F2 LEW/SHR para: a) porcentagem de tempo gasto nos braços aversivos do LCEM; b) número de entradas no braço aversivo do LCEM; c) tempo nos braços abertos do LCEM; d) locomoção periférica no CA. No eixo do X encontram-se os 10 marcadores moleculares utilizados na análise e a distância em centimorgans (cM). No eixo Y os valores de máxima probabilidade deste QTL em LOD escore. Os limiares (*threshold*) de sugestividade (p< 0,630) estão representados pelas linhas hachuradas. LCEM= Labirinto em Cruz Elevado Modificado, CA= Campo Aberto.

Tabela 2 - QTL significativos e sugestivos identificados nos 96 machos F2 LEW/SHR a partir da análise de ligação.

Medidas Comportamentais	Localização (cM)	LOD score máximo	p	Significância	Covariável
Tentativa de escape	46	4,45	0,006	Significativo	Sim
Distância	64	2,54	0,040	Significativo	Não
% Tempo braços aversivos	27	1,31	0,356	Sugestivo	Não
% Tempo braços abertos	109	5,31	0,084	Sugestivo	Sim
Entradas braço aversivo	33	1,49	0,241	Sugestivo	Não
Tempo braços abertos	109	4,72	0,206	Sugestivo	Não
Locomoção central (CA)	66	2,97	0,176	Sugestivo	Sim
Locomoção periférica (CA)	117	1,83	0,146	Sugestivo	Não

Levando em conta os dois QTL significativos aqui apresentados, a Figura 15 mostra os respectivos fenótipos e os genótipos dos animais segundo o marcador molecular mais próximo ao pico do QTL do fenótipo referente. Os resultados das tentativas de escape para os três possíveis genótipos no marcador D4Wox22 foram: 7,31 $\pm$ 0,85 LEW/LEW (n= 19); 5,00 $\pm$ 0,35 LEW/SHR (n= 50); 7,51 $\pm$ 0,76 SHR/SHR (n= 27). A ANOVA revelou um efeito significativo dos genótipos ($F_{(2,93)}$= 6,88; P<0,01), sendo que o *post hoc* de *Newman-Keuls* mostrou que os animais que carregam o genótipo LEW/SHR fazem menor número de tentativas de escape em comparação com os outros genótipos (**Figura 15a)**.

Os resultados das distâncias percorridas no teste do LCEM para os três possíveis genótipos no marcador D4Mgh27 foram: 20,12 $\pm$ 2,18 LEW/LEW (n= 20); 16,40 $\pm$ 1,01 LEW/SHR (n= 53); 15,33 $\pm$ 1,48 SHR/SHR (n= 23). A ANOVA revelou um efeito significativo do genótipo ($F_{(2,93)=}$ 4,97; p<0,01), sendo que o *post hoc* de *Newman-Keuls* mostrou que os animais contendo duas cópias do alelo LEW (p<0,01) percorreram uma distância maior quando comparados aos animais com os outros dois genótipos (**Figura 15b**).

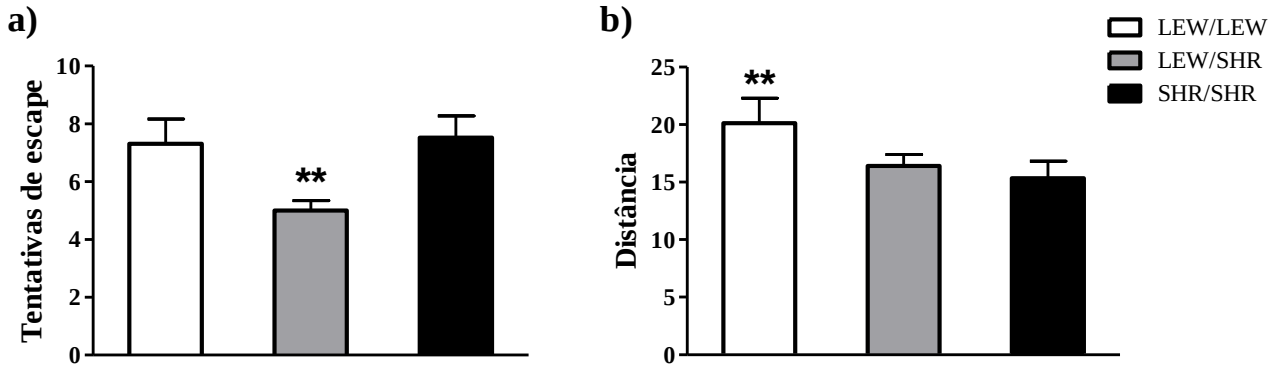

Figura 15 – Genótipos dos animais segundo o marcador D4Wox22 para o fenótipo "tentativo de escape" no teste do Medo Condicionado (n= 19 L/L, 50 L/S e 27 S/S) (a) genótipo dos animais segundo o marcador D4Mgh27 para o fenótipo "distância percorrida" no LCEM (n= 20 L/L, 53 L/S e 23 S/S) (b). (**) p<0,01. ANOVA de uma via seguido pelo *post hoc* de *Newman-Keuls*.

Resultados da segunda estratégia experimental

ANÁLISE COMPORTAMENTAL

A análise comportamental das linhagens SLA16 e SHR foi realizada seguindo os protocolos anteriormente detalhados. Os números amostrais utilizados em cada teste podem ser encontrados nas legendas das figuras.

Labirinto em cruz elevado modificado

Na sessão de treino do LCEM, o teste t de Student revelou que a linhagem SLA16 apresentou maior percentual de tempo gasto nos braços aversivos quando comparada à SHR ($p<0,01$; **Figura 16a**). Com o intuito de se observar o aprendizado ao longo da sessão de treino, dividiu-se a análise em dois blocos de cinco minutos. Nos primeiros cinco minutos, o teste t de Student mostrou que a linhagem SLA16 teve um maior percentual de tempo nos braços aversivos ($p<0,01$; **Figura 16b**) em relação à linhagem SHR, sendo que essa diferença não permaneceu nos minutos finais dessa sessão. Na sessão de teste não foram encontradas diferenças significativas entre as linhagens para a porcentagem de tempo gasto nos braços aversivos do LCEM.

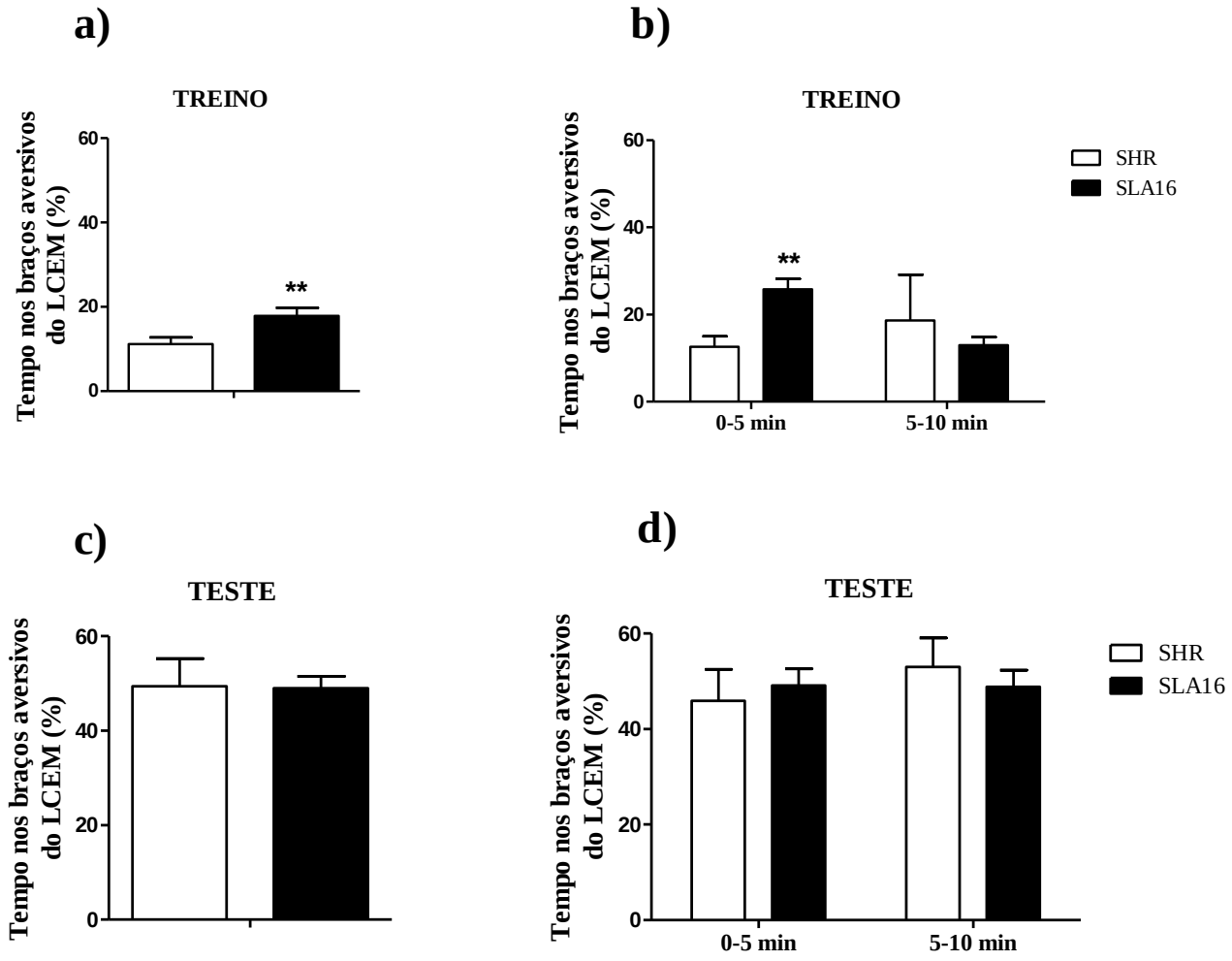

Figura 16 - Percentual de tempo gasto nos braços aversivos considerando toda a sessão (a) e em blocos de cinco minutos (b) durante o treino no LCEM. Percentual de tempo gasto nos braços aversivos considerando toda a sessão (c) e em blocos de cinco minutos (d) durante o teste no LCEM pelas linhagens SLA16 e SHR (n=10-12/linhagem). Barras e linhas verticais representam os valores da média e erro padrão da média. (**) $p<0,01$. Teste t de Student.

Considerando a medida de porcentagem de tempo gastos nos braços abertos desse mesmo aparato, na sessão de treino o test t de Student mostrou que a linhagem SLA16 apresentou maior percentual de tempo gasto nos braços abertos quando comparada à SHR ($p<0,05$; **Figura 17a**). Ainda, com o objetivo de investigar diferenças de estratégia comportamental durante a sessão de treino, dividiu-se a sessão em dois blocos de cinco minutos. Nos primeiros cinco minutos, o teste t de Student revelou que a linhagem SLA16 teve um maior percentual de tempo gasto nos braços abertos ($p<0,01$; **Figura 17b**) quando comparada a linhagem SHR, sendo que essa diferença não permaneceu nos minutos finais.

Já na sessão de teste, foi detectada uma tendência significativa (p=0,07) para a porcentagem de tempo gasto nos braços abertos, com a linhagem SLA16 explorando mais esse braço quando comparada à SHR (**Figura 17c**). Quando a sessão de testes foi analisada em dois blocos de cinco minutos, observou-se uma tendência de resultado significativo para o percentual de tempo gastos nos braços abertos nos minutos iniciais da sessão (p=0,056), sugerindo que a linhagem SLA16 gaste mais tempo nos braços abertos durante os minutos iniciais da sessão de teste quando comparada à SHR (**Figura 17d**).

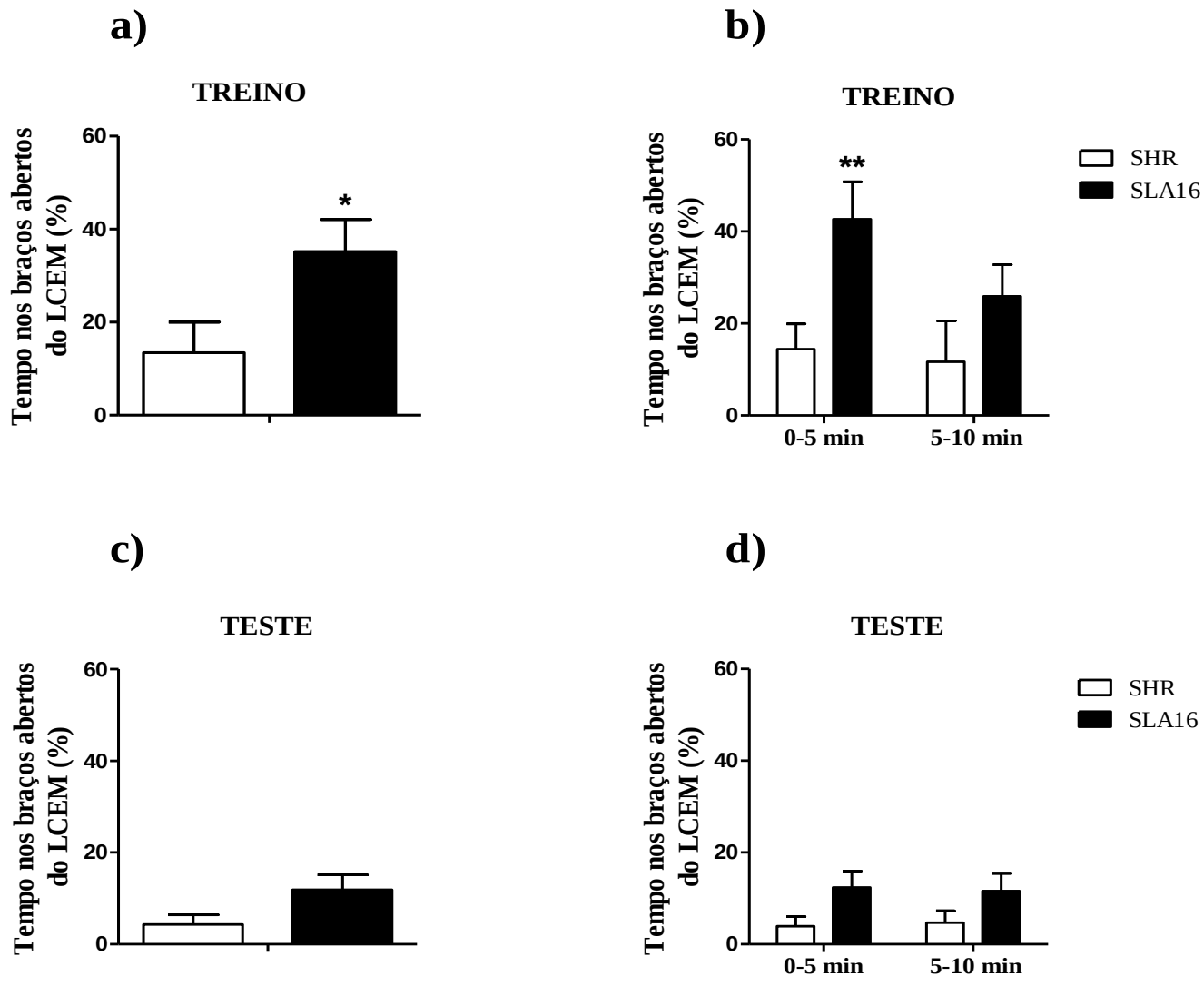

Figura 17 - Percentual de tempo gasto nos braços abertos considerando toda a sessão (a) e em blocos de cinco minutos (b) durante o treino no LCEM. Percentual de tempo gasto nos braços abertos considerando toda a sessão (c) e em blocos de cinco minutos (d) durante o teste no LCEM pelas linhagens SLA16 e SHR (n=10-12/linhagem). Barras e linhas verticais representam os valores da média e erro padrão da média. (*) e (**) efeitos significativos do fator linhagem (p<0,05 e p<0,01), teste t de Student.

Na tentativa de se obter uma medida de atividade locomotora, o número de entradas em todos os braços do LCEM (entradas totais) foi contabilizado. Nas sessões de treino (**Figura 18a**) e teste (**Figura 18c**) do LCEM, o teste t Student mostrou que a linhagem SLA16 apresentou maior número de entradas ($p<0,01$) do que a linhagem SHR em todos os braços do LCEM. Além disso, considerando apenas as entradas nos braços aversivos, foi detectada uma tendência de resultado significativo ($p=0,07$), sugerindo que a linhagem SLA16 tenha um maior número de entradas nos braços aversivos que a linhagem SHR na sessão de treino do LCEM (**Figura 18b**).

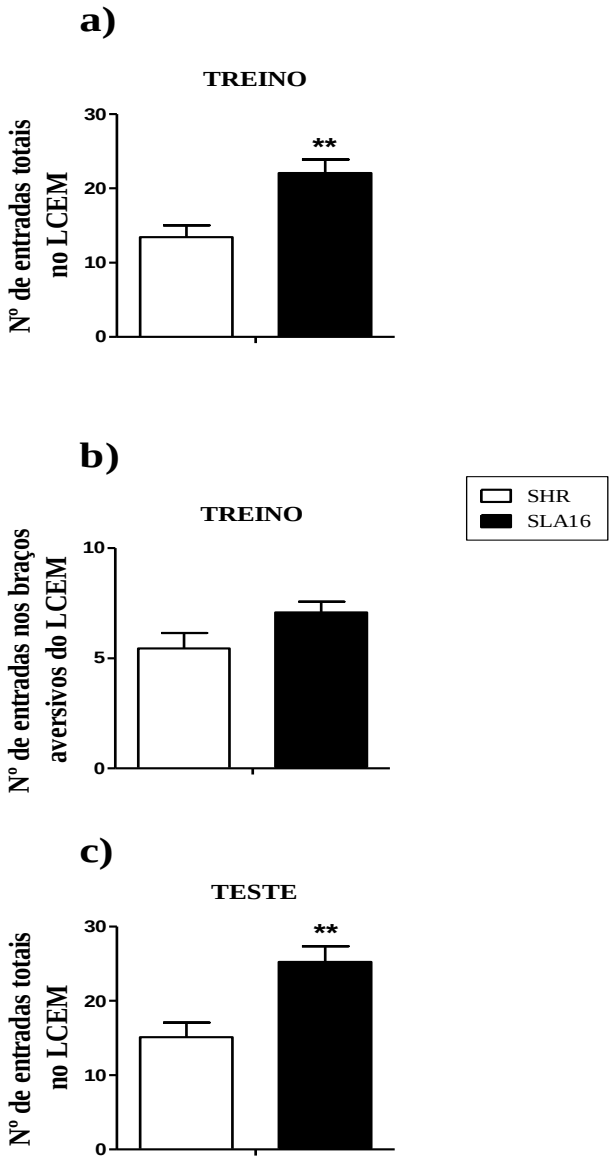

Figura 18 - Número de entradas totais na sessão de treino (a) e teste (c) do LCEM e número entradas nos braços aversivos durante a sessão de treino do LCEM (b) pelas linhagens SLA16 e SHR (n=10-12/linhagem). Barras e linhas verticais representam os valores da média e erro padrão da média. (**) $p<0,01$. Teste t de Student.

Campo Aberto

O teste t de Student mostrou que ratos SLA16 apresentaram escores mais altos de locomoção central (p<0,05) (**Figura 19a**) e periférica (p<0,01) (**Figura 19b**) no CA quando comparados aos SHR. Não houve diferença significativa no tempo gasto no centro do aparato entre as linhagens.

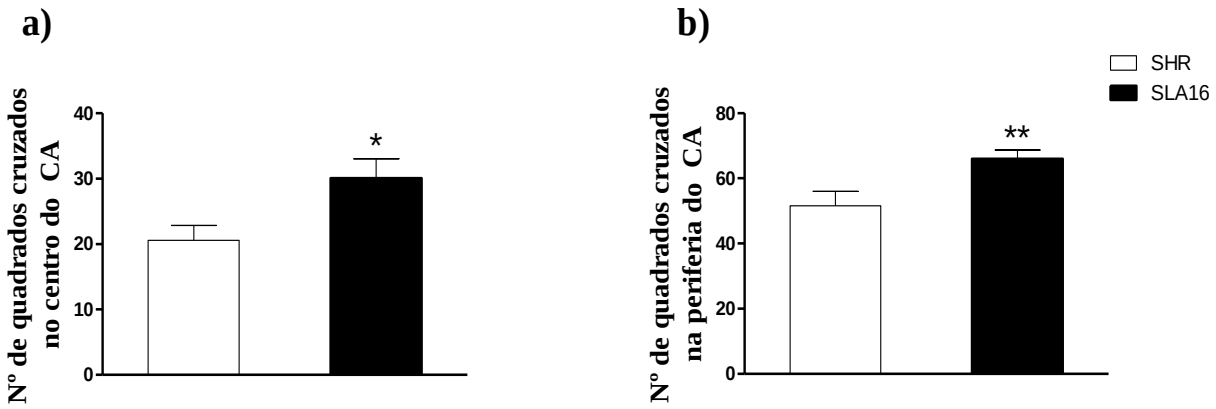

Figura 19 - Número de quadrados cruzados na região central (a) e periférica (b) do CA por ratos das linhagens SLA16 e SHR (n=12/linhagem). Barras e linhas verticais representam os valores da média e erro padrão da média. (*) p<0,05 e (**) p<0,01. Teste t de Student.

Reconhecimento de objetos

Não foram encontradas diferenças significativas para o índice de discriminação de objetos entre ambas as linhagens (p>0,05) (**Figura 20a**). Porém, destaca-se que ambas as linhagens exploraram mais o objeto novo em detrimento do familiar, conforme ilustrado pela **Figura 20b**.

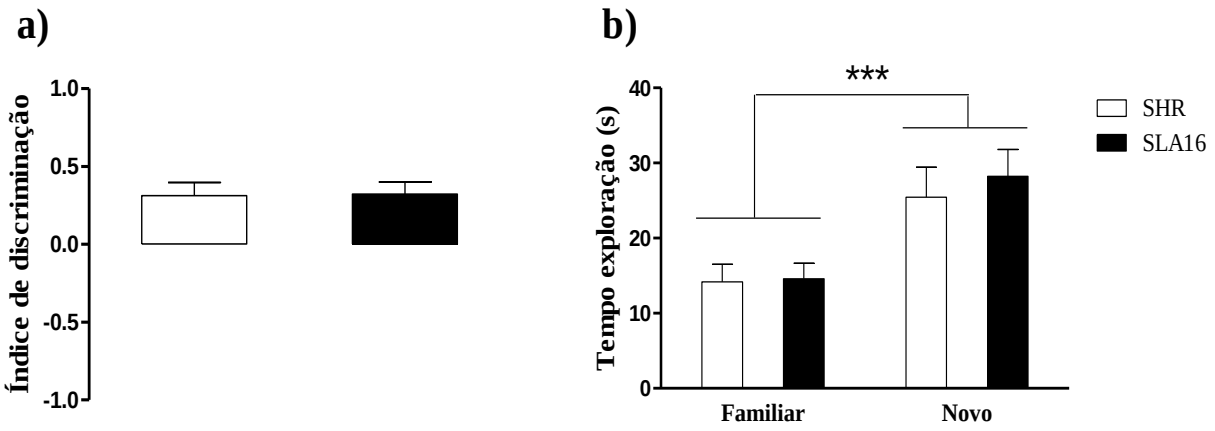

Figura 20 - Índice de discriminação de objetos (a) e tempo de exploração dos objetos (familiar e novo) (b) no teste de RO por ratos das linhagens SLA16 e SHR (n=12/linhagem). (***) p<0,001. Teste t pareado

Alternação espontânea

Não foram encontradas diferenças significativas para a porcentagem de alternação espontânea (**Figura 21a**) e para o número total de entradas em todos os braços (**Figura 21b**) do teste de AE.

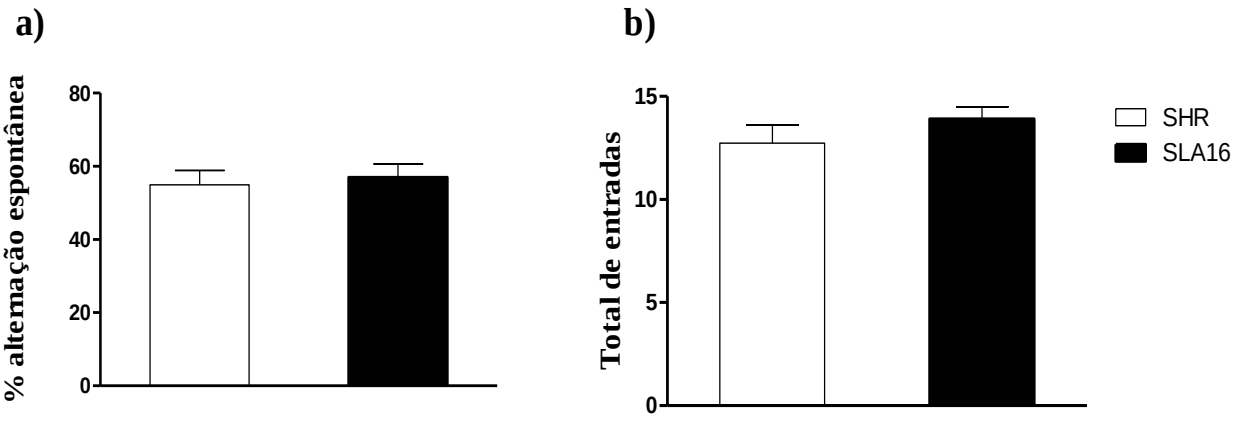

Figura 21 - Porcentagem de alternação espontânea (a) e total de entradas nos três braços (Fig. Xb) do teste de AE por ratos das linhagens SLA16 e SHR (n=12/linhagem). Teste t de Student.

Medo condicionado

Durante a sessão de treino, os dados foram analisados separadamente durante as fases de pré-condicionamento e condicionamento. A duração do comportamento de congelamento não diferiu entre as linhagens durante a fase de pré-condicionamento, porém na fase de condicionamento a linhagem SHR mostrou uma maior duração do comportamento de congelamento ($p<0,01$; **Figura 22a**) em relação à SLA16. Na sessão de teste nenhuma diferença significativa foi encontrada entre as linhagens.

O número de tentativa de escape foi maior na linhagem SLA16 ($p<0,01$; **Figura 22b**) comparada à SHR durante a fase de pré-condicionamento, e nenhuma diferença entre as linhagens foi encontrada para esse parâmetro na fase de condicionamento durante a sessão de treino. Entretanto, observou-se uma diferença ($p= 0,05$) no número de tentativas de escape durante a sessão de teste, sugerindo que a linhagem SLA16 apresenta maior número de tentativas de escape do que à SHR (**Figura 22b**).

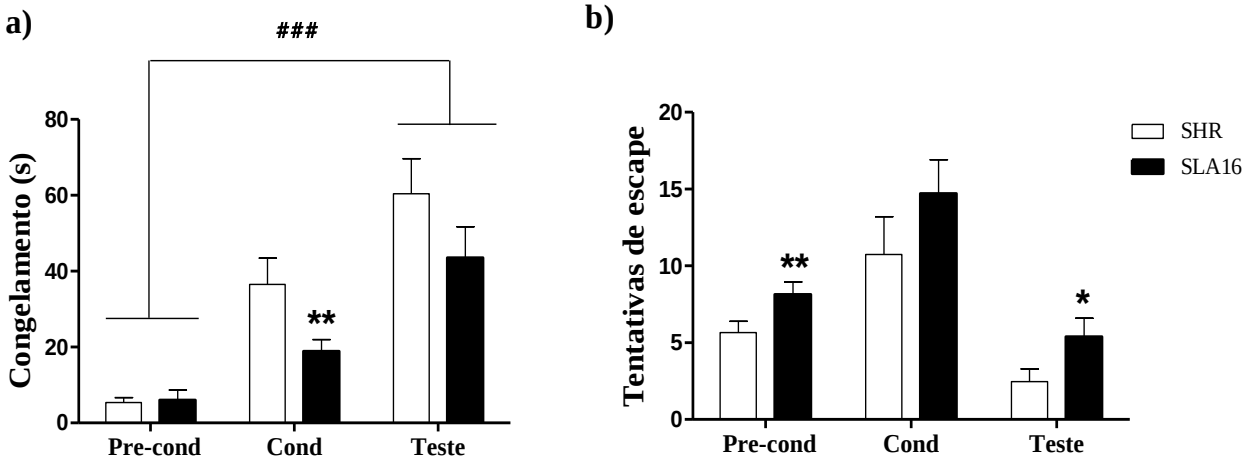

Figura 22 – Duração do comportamento de congelamento medido em segundos (a) e número de tentativas de escape de ratos das linhagens SLA16 e SHR (n=15-14/linhagem), durante as fases de pré-condicionamento (Pre-cond) e condicionamento (Cond) durante a sessão de treino e após o condicionamento do medo contextual na sessão de teste (Teste). Barras e linhas verticais representam os valores da média e erro padrão da média. (*) $p<0,05$ e (**) $p<0,01$ representam diferenças entre as linhagens. Teste t de Student. (###) $p<0,001$ representa diferenças entre as sessões. Teste t pareado.

Pressão arterial

O teste t de Student mostrou que os animais da linhagem SHR apresentam pressão arterial mais elevada quando comparados aos da linhagem SLA16 (p<0,001) (**Figura 23**).

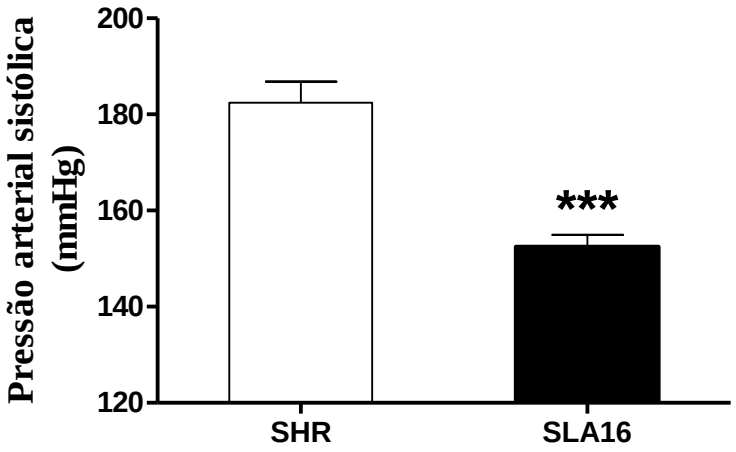

Figura 23 – Pressão arterial sistólica de ratos das linhagens SLA16 e SHR (n=8/linhagem) Barras e linhas verticais representam os valores da média e erro padrão da média. (***) p<0,001. Teste t de Student.

6 DISCUSSÃO

Os ratos das linhagens isogênicas LEW e SHR diferem quanto ao nível de ansiedade em diversos testes comportamentais validados para este fim, sendo que a linhagem SHR exibe um perfil de menor "ansiedade" em relação à linhagem LEW (RAMOS et al., 1997; RAMOS et al., 1998; RAMOS; MORMEDE, 1998). Porém, os resultados de alguns testes comportamentais (RAMOS et al., 2002) possibilitaram questionar se essas diferenças seriam meramente relacionadas à emocionalidade desses animais ou poderiam ser atribuídas também a diferenças de aprendizado e memória. Ou ainda, se as diferenças de emocionalidade entre essas duas linhagens poderiam ocasionar diferenças no aprendizado/memória.

Sabe-se que diferenças nos graus de ansiedade, tanto em humanos como em modelos animais não humanos, podem afetar o desempenho cognitivo (EYSENCK et al., 2007). Sabe-se, ainda, que processos cognitivos desempenham um papel fundamental em transtornos relacionados com a ansiedade (KALUEFF; MURPHY, 2007). Nesse aspecto, parece existir uma forte relação entre memória e ansiedade. Entre as estruturas cerebrais envolvidas, foi demonstrado que a amígdala participa no armazenamento de informações aversivas (DAVIS, 1992). A amígdala também tem função importante na ansiedade e infusão local de benzodiazepínicos nessa estrutura cerebral induz efeitos ansiolíticos em diversos testes comportamentais (DAVIS et al., 1994). O hipocampo também é conhecido por desempenhar um papel fundamental na formação da memória (IZQUIERDO; MEDINA, 1997), possuindo, ainda, evidencias da sua relação com a ansiedade (MCNAUGHTON, 1997). Ao mesmo tempo, alguns estudos propõem que a ansiedade e a memória não são apenas relacionadas, mas que a ansiedade seria uma etapa necessária para formação da memória (MATHEWS, 1990).

Por esses motivos, as linhagens LEW e SHR foram utilizadas nesse estudo, que é composto basicamente de duas etapas. Na primeira etapa desse trabalho, técnicas genéticas e comportamentais foram empregadas no intuito de descobrir regiões genômicas associadas a

comportamentos de emocionalidade e aprendizado/memória. Além disso, avaliou-se a correlação entre as medidas comportamentais de diferentes testes que medem emocionalidade e aprendizado/memória. Ambas as estratégias tiveram o intuito de investigar se esses comportamentos teriam um substrato neurobiológico em comum. Na segunda etapa, utilizou-se uma linhagem congênica na intenção de estudar os efeitos do *locus* diferencial nos comportamentos citados. Com o intuito de facilitar a interpretação dos dados, a discussão estará dividida entre essas duas estratégias experimentais.

6.1 PRIMEIRA ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

A primeira hipótese desse trabalho sugeria que a correlação entre os comportamentos referentes à emocionalidade e à memória seria significativa. Com o intuito de responder essa questão, nós utilizamos uma análise multivariada chamada de análise de fator. Para isso, os 96 animais da geração F2 foram todos submetidos a cinco testes comportamentais (LCEM, CA, RO, AE e MC). Após a finalização dessa bateria de testes, algumas medidas comportamentais (uma a duas de cada teste) foram utilizadas para produção dos fatores.

Os resultados da análise de fator revelaram algumas correlações intra e inter-testes significativas. Como já explicado, diz-se que dois resultados são altamente correlacionados se eles possuírem cargas elevadas nos mesmos fatores. Quando as cargas são iguais, em um mesmo fator, significa que os resultados são correlacionados positivamente. De modo contrário, cargas opostas expressam uma correlação negativa. Três fatores foram revelados no presente estudo (**Tabela 1**).

O fator 1, que representa a maior fatia da variabilidade total (25%), correlacionou o tempo de congelamento e tentativa de escape no MC, com a locomoção central e periférica no CA e número de alternações espontâneas no teste de AE. Neste fator, a correlação do tempo de congelamento se deu de forma negativa com todas as outras medidas. Ou seja, o animal que

possui um tempo maior de congelamento no MC (considerado como medida de memória aversiva), demonstra menor tentativa de escape nesse teste, menor locomoção central e periférica no CA e menor número de alternações espontâneas. Esse resultado nos leva a duas possíveis interpretações: este fator pode representar uma dimensão psicológica relacionada com desempenho cognitivo dependente do nível de ansiedade ou representar uma dimensão relacionada à atividade locomotora em ambientes novos.

Levando a primeira interpretação em consideração, o animal que se locomove menos no CA (central e perifericamente) seria considerado mais "ansioso" e teria um tempo maior de congelamento (maior retenção da memória aversiva). Realmente, há estudos que mostram essa correlação negativa, na qual animais que exploram menos as áreas aversivas de diferentes testes (mais "ansiosos") demonstram maior tempo de congelamento (LOPEZ-AUMATELL et al., 2011). Também já se sabe que o nível de ansiedade é acompanhado de um aumento da liberação de diversos neurotransmissores, como de noradrenalina e adrenalina e de alguns hormônios como de glicocorticoides e vasopressina. O efeito de todas essas substâncias na consolidação da memória é aumentar a ansiedade até certo nível e, a partir deste, quando a ansiedade é intensa, é o de diminuir a consolidação (MCGAUGH, 2004). Como já mencionado anteriormente, há diversos estudos que mostram que diferenças nos graus de ansiedade podem afetar o desempenho cognitivo (DAVIS et al., 1994; EYSENCK et al., 2007; IZQUIERDO; MEDINA, 1997), sendo que o fator 1 pode estar representando uma dimensão relacionada com a modulação das memórias pela ansiedade.

Ponderando a segunda interpretação, é importante discutir o fato de a locomoção central ter se correlacionado positivamente com a periférica no CA, pois estas medidas deveriam avaliar componentes emocionais diferentes (FERNANDEZ-TERUEL et al., 2002; RAMOS et al., 1998). Contudo, resultados da literatura e do nosso laboratório sugerem que essas duas medidas podem compartilhar um significado psicológico comum, pois ambas envolvem locomoção em um ambiente novo, que pode desencadear reações emocionais no animal (DE MEDEIROS et al.,

2013; HAMEISTER et al., 2008; RAMOS et al., 2003). Além disso, originalmente o teste do CA mensurava apenas a locomoção total dos animais, sendo que os animais que se locomovessem menos e defecassem mais eram considerados mais “ansiosos” (HALL, 1934). Não é possível descartar a hipótese de que o fator 1 possa representar uma dimensão de atividade locomotora geral, entretanto nossos dados reforçam que, ao menos em parte e ao menos nestas populações, estas locomoções têm um componente biológico em comum.

O fator 2 relacionou positivamente o percentual de tempo gasto nos braços abertos (sessão de treino) e nos braços aversivos (sessão de teste) do LCEM com a locomoção central no CA. Essa correlação já é um pouco mais fácil de ser explicada, uma vez que essas medidas levam em conta a esquiva de áreas que são consideradas aversivas para o animal. Porém, cabe ressaltar que a esquiva dos braços abertos do LCEM e a locomoção central do CA são medidas clássicas de medo inato (RAMOS; MORMEDE, 1998; RIBEIRO et al., 2011), enquanto a esquiva dos braços aversivos no LCEM leva em conta o aprendizado do animal (RIBEIRO et al., 2010). Assim, este segundo fator sugere que, ao menos em parte, essas três medidas compartilham uma mesma dimensão emocional. Tal informação é corroborada por diversos estudos, os quais demonstram que existem áreas cerebrais em comum envolvidas na modulação do medo inato e aprendido (LEDOUX, 2012; LIKHTIK et al., 2014; MARTINEZ et al., 2013; SHUMYATSKY et al., 2005). Além disso, é ampla a literatura que discorre sobre as áreas e estruturas encefálicas ativadas quando um animal entra em contato com um estímulo aversivo e, como resultado, exibe comportamentos defensivos (GRAEFF, 1981; 1994; GRAY; MCNAUGHTON, 2000).

Por fim, o fator 3 representa medidas relacionadas com aprendizado e memória, correlacionando o índice de discriminação de objetos no RO com tempo de congelamento no MC. No teste de RO, a memória declarativa é o principal componente estudado. A memória declarativa (ou explícita) é aquela que registra fatos ou eventos e pode ser dividida em episódica (referente a eventos que participamos ou assistimos) e semântica (de conhecimentos gerais)

(IZQUIERDO, 2011). Os experimentos com animais de laboratório abrangem em geral quase que exclusivamente memórias episódicas (reconhecer um evento em determinado contexto, reconhecer objetos, etc.) (WINTERS et al., 2008). Esse tipo de memória também é necessária no teste do MC, uma vez que o animal precisa recordar-se de uma experiência prévia (BARBOSA et al., 2013; RUDY et al., 2004). As principais regiões moduladoras da formação da memória declarativas são a amígdala basolateral e as regiões reguladoras dos estados de alerta e ansiedade, como a substância negra, o *locus ceruleus* e os núcleos da rafe (IZQUIERDO, 2011). Ou seja, em ambos os testes o nível de ansiedade do animal pode interferir no desempenho cognitivo.

Diante do exposto, nossa hipótese, de que a existisse um significado psicológico em comum entre variáveis de diferentes testes de ansiedade/emocionalidade e aprendizado e memória, pode ser confirmada, uma vez que todos os fatores envolveram medidas de emocionalidade e aprendizado e memória.

Nossa segunda hipótese experimental sugeria que o cromossomo 4, que influencia comportamentos de ansiedade/emocionalidade (IZIDIO et al., 2011; RAMOS et al., 1999), também influenciaria comportamentos relacionados ao aprendizado/memória. As análises de QTL realizadas nesse estudo revelaram duas regiões genômicas significativamente associadas com comportamentos alusivos à memória aversiva e atividade locomotora em um ambiente novo. Essas regiões afetaram a tentativa de escape no MC e distância percorrida na sessão de treino do LCEM, respectivamente.

O primeiro QTL (**Figura 11**), afetando a tentativa de escape no MC, está situado na posição de 46 cM, muito próximo ao marcador D4Wox22. Embora a avaliação de tentativa de escape não seja um parâmetro muito usual em tarefas de condicionamento de medo, ela foi usada no teste com o intuito de medir uma estratégia comportamental diferente, uma vez que alguns animais adotam uma resposta ativa nesse experimento, opondo-se ao comportamento clássico de congelamento (considerada uma resposta passiva). Animais humanos e não humanos devem

adotar respostas de medo apropriadas quando expostos a uma situação ameaçadora. Nesse sentido, estudos envolvendo modelos animais e humanos revelaram diferenças individuais na forma de enfrentar os desafios ambientais eminentes. Em roedores, os comportamentos defensivos foram agrupados em enfrentamento passivo (ou reativo) ou enfrentamento ativo (ou pró-ativo) (METNA-LAURENT et al., 2012; RIBEIRO et al., 2010). Além disso, alguns pesquisadores usando uma estratégia farmacogenética em camundongos transgênicos descobriram que atividades neuronais em um subgrupo de neurônios da amígdala são necessárias para o comportamento de congelamento em resposta ao estímulo aversivo no MC (TSETSENIS et al., 2007). De maneira interessante, esse mesmo grupo mostrou que a inibição desses neurônios alterou a resposta comportamental ao estímulo aversivo de passiva para uma resposta ativa, ou seja, o animal que inicialmente congelava frente ao estímulo aversivo alterou sua estratégia comportamental para fuga (GOZZI et al., 2010).

Outro ponto importante a ser discutido é o fato de esse QTL ter aparecido apenas quando o "grupo" foi adicionado como uma covariável interativa. Como já foi mencionada, a principal vantagem de se incluir covariáveis nas análises de QTL é reduzir as variações residuais no caso de a covariável ter um efeito forte sobre o fenótipo, o que aumentará a possibilidade de detectar novos QTL. Quando uma covariável interage com o QTL, significa que os efeitos do QTL variam de acordo com a covariável (BROMAN, 2009). Como os "grupos" de animais F2 nasceram em momentos diferentes, pensou-se que a época do nascimento pudesse fazer com que os animais se comportassem de forma diferente, tendo em vista que alguns estudos já encontraram fatores ambientais importantes que podem modificar ou anular a diferença comportamental entre as linhagens LEW e SHR (IZIDIO et al., 2005). Esse resultado sugere que o ambiente, assim como os genes, apresenta um papel importante no comportamento de tentativa de escape no teste do MC.

Segundo o RGD (http://rgd.mcw.edu/), existem um total de 19 QTL mapeados no genoma do rato e 21 no genoma do camundongo para comportamentos relacionados à

memória/aprendizado. Desses, o QTL para tentativa de escape aqui relatado é o quarto com maior LOD escore (4,45) e o único que está mapeado no cromossomo 4 do rato. Todos esses QTL registrados no RGD foram mapeados para comportamentos exibidos no labirinto de Morris e no teste de reconhecimento social (HERRERA et al., 2013; RUIZ-OPAZO; TONKISS, 2004). É importante ressaltar que esse é o primeiro estudo que encontrou um QTL em um teste que avalia memória emocional. Ainda, segundo o RGD, nenhum dos comportamentos relacionados à memória/aprendizado encontra-se mapeado no cromossomo 6 do camundongo (o cromossomo que corresponde a grande parte do cromossomo 4 do rato). Contudo, um estudo utilizando um painel de linhagens com substituições cromossômicas (derivadas das linhagens A/J e C57BL/J6) no teste do MC sugeriu que o cromossomo 6 influenciava no percentual de congelamento ao contexto (PONDER et al., 2007).

Outro ponto importante é que muito próximo a essa região, em um estudo prévio realizado por Izídio et al. (2011), foram encontrados QTL para locomoção central e periférica e defecação no CA e consumo de etanol utilizando as mesmas linhagens (LEW e SHR). Nessa mesma região, Potenza et al. (2004) relataram um QTL que afetava o controle dos níveis de corticosterona nas linhagens isogênicas LEW e Fischer 344.

O segundo QTL significativo (**Figura 13**) apresentou um efeito sobre a distância percorrida na sessão de treino do LCEM e encontra-se entre os marcadores D4Rat76 e D4Mgh27 na posição de 64 cM. Nesse, os alelos LEW aumentaram a distância percorrida nos animais F2 (**Figura 15b**). Segundo o RGD, há 20 QTL relacionados com nível de atividade descritos em ratos, entretanto, nenhum desses situam-se no cromossomo 4. Já em camundongos, o RGD apresenta registro de 72 QTL relacionados à atividade locomotora até agora. De todos, dois situam-se no cromossomo 6 do camundongo (correspondente ao cromossomo 4 em ratos), sendo esses relacionados com atividade locomotora de acordo com o ciclo circadiano (HOFSTETTER et al., 2003) e induzida por etanol (DOWNING et al., 2003). O presente QTL pode não ser totalmente relacionado com a atividade locomotora e sim com a locomoção devido à novidade,

uma vez que ele influenciou essa medida na sessão de treino e não foram encontrados QTL ligados à locomoção na sessão de teste do LCEM. Além disso, no estudo realizado por Izídio et al. (2011), QTL referentes à locomoção central e periférica e defecação no CA foram descritos nessa mesma região. Essas medidas tem relação com o estado emocional do animal, apesar de a locomoção periférica poder ser utilizada como medida de atividade locomotora (RAMOS; MORMEDE, 1998). Entretanto é importante ressaltar que tanto no presente trabalho (**Tabela 1**) como em estudos independentes a locomoção periférica é muitas vezes correlacionada com medidas clássicas de ansiedade/emocionalidade (RAMOS et al., 1998).

Além dos QTL significativos, alguns outros QTL sugestivos foram encontrados (**Tabela2**). Como já mencionado, as características quantitativas são influenciadas por múltiplos genes e cada gene contribui com um pequeno efeito. De acordo com Flint et al. (2005), são necessárias centenas de animais para que seja possível detectar QTL fracos, ou seja, que contribuam com 5% ou menos da variação total do fenótipo. Em nosso estudo foram utilizados 96 animais F2 e, desse modo, regiões genômicas contendo genes com menor efeito podem não ser detectadas ou não atingirem o limiar de significância. Ainda assim, essas regiões são igualmente importantes. De modo interessante, quatro QTL exibiram resultados acima dos limiares de sugestividade no teste do LCEM. Dois desses QTL influenciaram medidas no braço aversivo desse teste e os outros dois nos braços abertos. Os QTL que influenciaram medidas no braço aversivo situam-se próximo do marcador D4Rat151, já o dos braços abertos encontra-se entre os marcadores D4Rat59 e D4Mgh11. Embora ambos os comportamentos sejam correlacionados, de acordo com a **Tabela 1**, eles não parecem ser influenciados pelos mesmos genes. Na região entre os marcadores D4Rat59 e D4Mgh11, já foram descritos outros dois QTL no estudo realizado por Izídio et al. (2011), um influenciando o tempo no compartimento preto da CBP e outro a locomoção no compartimento branco desse mesmo teste, sendo ambas as medidas relacionadas com ansiedade/emocionalidade em ratos.

Outros dois QTL sugestivos foram detectados no teste do CA. Um deles afetou a locomoção periférica e está posicionado perto do marcador D4Mgh11. O outro QTL foi encontrado para locomoção central, localizado entre os marcadores D4Rat76 e D4Mgh6, sendo essa região a mesma do *Anxrr16*. Conforme já descrito na introdução desse trabalho, vários estudos replicaram os efeitos do *Anxrr16* no CA, corroborando a existência desse QTL no cromossomo 4 (IZIDIO et al., 2011; MORMEDE et al., 2002; VENDRUSCOLO et al., 2006). De modo interessante, mesmo quando utilizadas outras populações de ratos, foi possível detectar a influência desse *locus* na locomoção central do CA (HAMEISTER et al., 2008). É curioso observar que embora ambos os comportamentos pareçam estar correlacionados (**Tabela 1**), aparentemente eles não são influenciados pelos mesmos genes. Entretanto, no estudo realizado por Izídio et al. (2011) os *loci* que influenciaram a locomoção central e periférica encontravam-se praticamente na mesma região genômica. Porém, Izídio et al. (2011) utilizaram o CA de formato quadrado, enquanto que no presente trabalho utilizamos o CA circular. Esses dados sugerem que as interpretações psicológicas, por parte dos animais, e talvez os genes envolvidos, são diferentes conforme o formato de CA que os animais são submetidos.

Então, de acordo com o conjunto de dados expostos, podemos concluir que a segunda hipótese desse estudo foi confirmada, pois realmente foram encontrados dois QTL significativos em testes comportamentais relacionados ao aprendizado/memória no cromossomo 4 dos ratos F2 derivados de LEW e SHR.

6.2 SEGUNDA ESTRATÉGIA COMPORTAMENTAL

A terceira hipótese desse trabalho sugeria que as linhagens SLA16 e SHR exibiriam comportamentos contrastantes nos testes que avaliam aprendizado/memória, principalmente naqueles onde os QTL foram encontrados. As linhagens congênicas permitem tanto confirmar o QTL como também servem para reduzir o intervalo desse *locus.* Para testar essa hipótese, as

linhagens SLA16 e SHR foram submetidas a vários testes comportamentais relacionados à ansiedade, ao aprendizado e à memória. Como já relatado anteriormente, a linhagem congênica SLA16 possui seu genoma idêntico ao do SHR com exceção de uma região de 86,3 Mpb, flanqueada pelos marcadores moleculares D4Rat76 e D4Mgh11, que é proveniente da linhagem LEW. Dessa maneira, podemos dizer que as diferenças comportamentais observadas entre as linhagens SLA16 e SHR são devido a esse *locus*, uma vez que ambas são sempre criadas no mesmo ambiente de laboratório.

Os resultados obtidos no LCEM mostraram que os animais da linhagem SLA16 tiveram um maior percentual de tempo gasto nos braços aversivos do que a linhagem SHR durante a sessão de treino quando a sessão inteira foi considerada (**Figura 16a**), sugerindo uma possível diferença de aprendizado. Entretanto, essa diferença foi observada apenas nos cinco primeiros minutos do teste, não permanecendo nos cinco últimos minutos (**Figura 16b**). Considera-se que nos primeiros cinco minutos desse teste ocorram o aprendizado e, caso o animal tenha aprendido a tarefa, ele evitará o braço aversivo nos minutos finais (RIBEIRO et al., 2010). Nesse caso, os animais SLA16 apresentam uma diminuição da exploração dos braços aversivos nos cinco minutos finais, porém essa diferença não é significativa a ponto de podermos afirmar que o animal aprendeu a tarefa. Essa diferença na exploração dos braços aversivos pode ser devido a uma diferença na atividade exploratória demonstrada pela linhagem SLA16, uma vez que essa linhagem possui maior número de entradas totais no LCEM do que a linhagem SHR (**Figura 18a**). Porém não podemos afirmar isso diretamente, uma vez que o número de entradas não é uma medida direta da atividade locomotora desses animais.

Já na sessão de teste, não foram observadas diferenças na porcentagem de tempo gasto nos braços aversivos (**Figura 16c**). Inicialmente, a duração da sessão de teste era de três minutos, considerada suficiente para mostrar a evocação da memória no LCEM (SILVA; FRUSSA-FILHO, 2000). No presente estudo, a duração da sessão de teste foi aumentada para dez minutos (igual à Ribeiro et al. (2010)), com o objetivo de se estudar a evocação e extinção da

memória. Aqui não parece ter acontecido a evocação da memória aversiva, previamente pareada com som e iluminação forte, sendo que nesse caso também não podemos falar de extinção da memória.

Em relação ao percentual de tempo gasto nos braços abertos durante a sessão de treino do LCEM, a linhagem congênica SLA16 apresentou maior percentual de tempo nesses braços que a linhagem SHR (**Figura 17a**). Sugere-se que essa medida avalie os níveis de emocionalidade dos animais, uma vez que há estudos que demonstram que drogas ansiolíticas aumentam a exploração desses braços, enquanto drogas ansiogênicas fazem o oposto, ou seja, diminuem o tempo de exploração dos braços abertos no LCEM (RIBEIRO et al., 2011; SILVA; FRUSSA-FILHO, 2000). Esse resultado sugere, então, que a linhagem SLA16 possui menores níveis de "ansiedade" em relação aos ratos SHR, corroborando estudos anteriores nesse sentido (DE MEDEIROS et al., 2013; MEDEIROS et al., 2014). Quando a sessão foi dividida em blocos de cinco minutos, essa diferença foi observada apenas nos minutos iniciais dessa sessão, não permanecendo nos minutos finais (**Figura 17b**). Já na sessão de teste, não foram observadas diferenças significativas na exploração desses braços entre as linhagens (**Figura 17c**), apesar de nos minutos iniciais da sessão de teste (**Figura 17d**) ser observada uma tendência significativa, com os animais da linhagem SLA16 explorando mais os braços abertos do que os da linhagem SHR. Esses resultados estão de acordo com resultados prévios de estudos envolvendo o modelo clássico do LCE, no qual o animal reexposto ao aparato exibe um comportamento conhecido como "tolerância de primeira passagem" (mais conhecido pelo termo em inglês "*one-trial tolerance*") (CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005). Há diversas hipóteses para explicação desse fenômeno, incluindo uma habituação locomotora ou uma mudança na natureza da resposta aversiva desencadeada entre as sessões, de uma resposta de medo incondicionada para uma resposta de esquiva aprendida (para revisão, ver CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005).

É interessante notar que mesmo na sessão de teste do LCEM o número de entradas totais é maior na linhagem SLA16 do que na linhagem SHR (**Figura 18c**), contrapondo resultados

anteriores envolvendo essas linhagens. Em estudos prévios, foi levantada a possibilidade do *locus* diferencial inserido na linhagem congênica SLA16 afetar outras características além das emocionais, como por exemplo, a atividade motora. Entretanto, após 22,5 h de habituação na caixa de atividade, bem como em suas caixas moradias, nenhuma diferença na atividade locomotora entre as linhagens foi observada, sugerindo que *Anxrr16* parecia modular a reatividade emocional a ambientes novos mais que a atividade locomotora espontânea (DE MEDEIROS et al., 2013).

Em relação ao teste do CA, a linhagem SLA16 apresentou maior locomoção central e periférica nesse teste em relação à linhagem SHR, o que corrobora os efeitos desse *locus* descritos inicialmente por Ramos et al. (1999). Esse dado confirma dados previamente relatados por De Medeiros et al. (2013), os quais demonstraram que a linhagem SLA16 apresentava maior locomoção central e periférica no teste do CA, sugerindo que essa linhagem apresenta menores índices de "ansiedade" quando comparado com os ratos SHR. Como já mencionado, as diferenças relacionadas à locomoção periférica é frequentemente considerada um índice de atividade locomotora, entretanto diversos autores sugerem que medidas tidas como locomotoras podem também ser moduladas por diferentes níveis de ansiedade (MORMEDE et al., 2002; ROY et al., 2009). Soma-se a essa ideia o fato dos diversos testes de ansiedade serem baseados no comportamento exploratório (incluindo o CA) não sendo possível realizar uma separação entre os comportamentos relacionados à ansiedade ou à locomoção (TAKAHASHI et al., 2006). Além disso, esses resultados são consistentes com a correlação anteriormente demonstrada entre a locomoção central e periférica no CA.

Os resultados do RO não revelaram diferenças significativas entre as linhagens em relação ao índice de discriminação de objetos. Porém, ambas as linhagens apresentaram índices de discriminação maiores que zero, indicando que os animais aprenderam a tarefa, o que pode ser também observado na **Figura 20b**. Como já mencionado, esse teste avalia principalmente a memória declarativa episódica, que é a memória necessária para se recordar de eventos

anteriores (WINTERS et al., 2008). Esse resultado indica que as duas linhagens não possuem prejuízo nesse tipo de memória, ao menos com os tipos de objetos utilizados neste trabalho. Um estudo realizado por Pires et al. (2009) relatou que a linhagem SHR foi capaz de distinguir apenas entre objetos mais distintos e não foi capaz de diferenciar objetos muitos semelhantes. Tendo isso em vista, serão necessários estudos utilizando diferentes tipos de objetos para que seja possível avaliar se ambas as linhagens conseguirão fazer tal distinção.

Em relação à tarefa envolvendo memória espacial no teste de AE, não foram encontradas diferenças significativas entre as linhagens, sugerindo que não há diferença de memória espacial entre as duas linhagens (**Figura 21a**). Nesse mesmo teste, o número total de entradas em todos os braços foi avaliado como tentativa de medida locomotora dos animais, o qual revelou não existir diferença entre as linhagens. É interessante notar que as linhagens diferem em medidas relacionadas à atividade locomotora ou atividade geral em testes que envolvem um componente emocional (DE MEDEIROS et al., 2013), enquanto no teste de AE, no qual todos os braços são fechados (não possuindo um componente aversivo), as linhagens não diferem para um índice relacionado à atividade locomotora (RIBEIRO et al., 2010).

No teste do MC, observou-se uma diferença no tempo de congelamento durante o condicionamento na sessão de treino, com a linhagem SLA16 apresentando menor tempo de congelamento do que a linhagem SHR (**Figura 22a**). Na sessão de condicionamento é onde ocorre a distribuição de choque nas patas, sendo que a diferença de comportamento nessa etapa poderia significar uma alteração na sensibilidade à dor. Em um estudo realizado por Ramos et al. (2002), verificou-se que as linhagens LEW e SHR possuem diferenças relacionadas à nocicepção no teste da formalina na pata. Na fase tardia desse teste, a qual parece relacionar-se com um tipo de dor mais persistente envolvendo respostas inflamatórias, os ratos LEW pareceram apresentar hiperalgesia em relação aos SHR. É possível que genes relacionados à nocicepção também estejam presente no *locus* diferencial da linhagem congênica e isso precisará ser mais bem investigado em trabalhos futuros.

Na sessão de teste do MC, não foi observada diferença significativa no tempo de congelamento entre as linhagens (**Figura 22a**). Entretanto, há um efeito significativo geral da sessão, mostrando que ambas as linhagens apresentam maior duração de congelamento na sessão de teste do que durante o pré-condicionamento, sugerindo que as duas linhagens aprenderam a tarefa. Embora as duas linhagens não tenham apresentado diferença no tempo de congelamento na sessão de teste, apresentaram diferença na tentativa de escape, sendo que a linhagem SLA16 apresentou maior número de tentativas de escape quando comparada com a linhagem SHR (**Figura 22b**). Como já mencionado, estudos envolvendo modelos animais humanos e não humanos revelaram diferenças individuais na forma de enfrentar os desafios ambientais ameaçadores e, em roedores, os comportamentos defensivos podem ser agrupados em enfrentamento passivo ou enfrentamento ativo (METNA-LAURENT et al., 2012). Os resultados da sessão de teste do MC sugerem que possa existir uma diferença na estratégia comportamental entre essas duas linhagens, indicando que exista uma preferência por uma resposta ativa pela linhagem SLA16, enquanto a linhagem SHR adotaria uma resposta passiva. De forma alternativa, o comportamento de escape aumentado notado na linhagem SLA16 pode ser devido ao aumento da atividade geral dessa linhagem, como observado nos resultados já mostrados nesse trabalho.

Esses resultados são interessantes, pois eles corroboram a existência dos QTL encontrados neste trabalho no *locus* diferencial presente na linhagem congênica SLA16, bem como seus efeitos sobre comportamentos relacionados à memória emocional e atividade em geral. Assim, pode-se dizer que os resultados obtidos confirmam nossa terceira hipótese de que as linhagens SLA16 e SHR exibiriam comportamentos contrastantes nos testes que avaliam memória/aprendizado e ansiedade/emocionalidade. Ressaltando que ambas as linhagens apresentaram diferenças de aprendizado apenas nos testes que envolviam um componente emocional.

Por fim, porque o SHR foi criado por meio de um programa de reprodução seletiva visando uma hipertensão espontânea (OKAMOTO; AOKI, 1963), um objetivo adicional do presente estudo foi verificar se as linhagens SHR e SLA16 iriam apresentar diferenças nos níveis de pressão arterial. Embora não esperado, a linhagem SHR foi considerada hipertensa em relação à SLA16 (**Figura 23**). Esse resultado não era esperado, pois um estudo realizado por Ramos et al. (1998), com uma população F2 originária do cruzamento entre as linhagens LEW e SHR, mostrou que a pressão arterial não parecia estar associada a comportamentos relacionados à ansiedade.

De acordo com os resultados apresentados, permite-se concluir que a linhagem SLA16 exibe menores índices de ansiedade/emocionalidade, apresenta diferença de aprendizado em testes que envolvam um componente emocional e não difere em tarefas de aprendizado e memória que não envolva emocionalidade, em relação à linhagem SHR. Além disso, a linhagem SLA16 parece apresentar maior atividade geral que a linhagem SHR em ambientes novos, corroborando resultados prévios da caixa de atividade, na qual após 22,5 h de habituação nessa caixa, nenhuma diferença na atividade locomotora entre as linhagens foi observada, sugerindo que o *locus* diferencial parece modular a reatividade emocional a ambientes novos mais que a atividade locomotora espontânea (DE MEDEIROS et al., 2013). Entretanto, este ponto será futuramente melhor investigado em nosso laboratório, pois acreditamos que a linhagem SLA16 pode ser uma ferramenta potencialmente interessante para o estudo de TDAH. Uma vez que além de apresentar uma maior atividade que a linhagem SHR, ela parece ser uma linhagem normotensa, o que auxilia nesse trabalho, já que há estudos que tentam relacionar a hipertensão do SHR com a sua hiperatividade (MENESES et al., 1997).

Existem diversos QTL na região compreendida pelos *locus* diferencial presente na linhagem congênica SLA16 (região de 86,3 Mpb, entre os marcadores D4Rat76 e D4Mgh11) (CARR et al., 1998; IZIDIO et al., 2011; POTENZA et al., 2004; RAMOS et al., 1999). Uma maneira de se isolar diferentes QTL presentes em um *locus* diferencial é a utilização de um

conjunto de linhagens sub-congênicas. Nessa linhagem a região do *locus* diferencial é fragmentada, originando várias linhagens, cada uma possuindo um pedaço desse *locus* (ARMSTRONG et al., 2006). Dessa forma, o efeito de cada QTL pode ser verificado em cada conjunto de linhagens sub-congênicas, que são um próximo passo rumo à identificação do(s) gene(s) candidato(s) responsável(is) pelo efeitos desse *locus*.

Dentre os potenciais genes candidatos para os efeitos desse *locus*, podemos citar o *Grm7*, localizado na posição de 142 Mpb do cromossomo 4 do rato (próximo ao marcador D4Rat104), que codifica o receptor metabotrópico de glutamato 7 (mGluR7), envolvido na regulação negativa da liberação de glutamato (DATABASE, 2014). Evidências sugerem que a ativação sistêmica de mGluR7 reduz o consumo e preferência pelo álcool bem como a estimulação locomotora provocada pelo álcool. Além disso, níveis de mGluR7 no *nucleus accumbens* regulam a responsividade ao álcool e é um importante alvo para regulação dos efeitos aditivos dessa droga (BAHI, 2013).

O gene que codifica o neuropeptídeo Y (*Npy*) é expresso principalmente na amígdala e no hipocampo e pode estar associado com as diferenças comportamentais entre as linhagens SHR e SLA16. Esse gene está localizado na posição de 79 Mpb do cromossomo 4 do rato, praticamente na mesma posição do marcador D4Wox22, coincidindo com o LOD escore máximo do QTL encontrado para tentativa de escape no teste do MC, tornando-se um excelente candidato para os efeitos desse QTL. Já foi demonstrado que o *Npy* possui propriedades ansiolíticas e parece participar do controle do apetite. Além disso, a expressão de *Npy* parece estar diminuída em ratos considerados ansiosos e em ratos que possuem alto consumo de etanol (EHLERS et al., 1998; STEWART et al., 1993).

Outro gene interessante é o *Syn2*, localizado na posição 147 Mpb do cromossomo 4 do rato (próximo ao marcador D4rat59), que codifica uma sinapsina dependente de cálcio envolvida na secreção de neurotransmissores e tem sido associada com esquizofrenia (DATABASE, 2014). Evidências sugerem que receptores de dopamina podem regular a expressão de sinapsina II,

envolvida com a liberação de neurotransmissores e sinaptogênese (CHONG et al., 2006). Além disso, foi demonstrado que esse gene parece estar envolvido com plasticidade sináptica, déficits cognitivos e autismo (GIOVEDI et al., 2014; VANGUILDER et al., 2011).

Um gene de interesse também localizado nesse intervalo é o *Grip2* que codifica uma proteína que interage com o receptor de glutamato (GRIP2). O gene *Grip2* é amplamente expresso no córtex, hipocampo e no bulbo olfatório (SRIVASTAVA et al., 1998). Foi observado que a GRIP2 interage com algumas subunidades do receptor ionótropico AMPA do glutamato (DONG et al., 1997), envolvido nos processos de aprendizado e memória (BLISS; COLLINGRIDGE, 1993). Esse gene está localizado na posição 123 Mpb do cromossomo 4 do rato (próximo ao marcador D4Rat49), bem próximo ao pico do QTL encontrado para a distância percorrida no LCEM.

Outro candidato interessante é o gene *Snca* já mencionado anteriormente. Esse gene codifica a proteína alfa-sinucleína que é altamente expressa no sistema nervoso central (MORI et al., 2006), abundante em neurônios dopaminérgicos e tem sido associada com a doença de Parkinson (POLYMEROPOULOS et al., 1996). Esse gene está localizado na posição de 89,6 Mpb do cromossomo 4 do rato (próximo ao marcador D4Rat76), muito próximo do QTL encontrado para tentativa de escape no teste do MC. Estudos com camundongos mostram que mutações nesse gene podem conferir um perfil menos ansioso aos animais (GRAHAM; SIDHU, 2010). Liang et al. (2003) propuseram que a expressão diferencial de *Snca* poderia contribuir na preferência por álcool em linhagens isogênicas dos ratos P e NP. Além disso, como já relatado, Chiavegatto et al. (2009) encontraram diferenças na expressão do gene e da proteína no hipocampo entre as linhagens LEW e SHR. Nesse estudo, os autores sugerem que o *Snca* seria um bom candidato a estar influenciando as diferenças nos comportamentos relacionados à ansiedade entre essas duas linhagens, uma vez que a variante vinda da linhagem LEW, quando em homozigoze, aumentou os escores de locomoção central no CA de animais F2.

É importante ressaltar que os genes aqui mencionados representam somente prováveis responsáveis pelas diferenças comportamentais entre as linhagens SLA16 e SHR, com base em dados obtidos da literatura. Apenas estratégias mais pontuais, como *microarrays*, sequenciamento de genes e transgenias deverão elucidar os genes responsáveis por essas diferenças comportamentais.

7 CONCLUSÕES

A hipótese de que existisse um significado psicológico em comum entre medidas de diferentes testes de ansiedade/emocionalidade e aprendizado/memória foi confirmada, pois todos os fatores envolveram medidas de emocionalidade e aprendizado e memória.

A segunda hipótese deste trabalho, de que o cromossomo 4 que influencia comportamentos de ansiedade/emocionalidade, também influenciaria comportamentos relacionados ao aprendizado/memória também foi confirmada, uma vez que foram encontrados dois QTL significativos em teste que avaliam ansiedade e memória. Dos QTL encontrados, o que influenciou a medida de tentativa de escape no LCEM é o quarto com maior LOD escore (4,45) e o único que está mapeado no cromossomo 4 do rato de acordo com o RGD. Além disso, pela primeira vez foi encontrado um QTL em um teste que avalia memória emocional em ratos.

Em relação à terceira hipótese deste trabalho, foi possível concluir que a linhagem SLA16 exibe menores índices de ansiedade/emocionalidade, apresenta diferença de aprendizado em testes que envolvam um componente emocional e não difere em tarefas de aprendizado e memória que não envolva emocionalidade, em relação à linhagem SHR. Assim, conclui-se que o *locus* diferencial afeta fenótipos associados à emocionalidade, bem como comportamentos relacionados à memória aversiva. Além disso, a linhagem SLA16 parece apresentar maior atividade geral que a linhagem SHR em ambientes novos. Isso corrobora estudos anteriores, nos quais mostraram que após um período de habituação, nenhuma diferença na atividade locomotora entre as linhagens foi observada (DE MEDEIROS et al., 2013), sugerindo que o *locus* diferencial parece modular a reatividade emocional a ambientes novos mais que a atividade locomotora espontânea. Assim, a linhagem congênica SLA16 representa uma importante ferramenta na busca de genes candidatos envolvidos na regulação desses comportamentos.

Sendo assim, o presente estudo encontrou dois QTL inéditos e confirmou seus efeitos em uma linhagem congênica de ratos. Além disso, este trabalho propõe a linhagem congênica

SLA16 como um potencial modelo genético para o estudo de alguns aspectos do TDAH. Uma vez que a linhagem congênica SLA16 apresenta maior atividade geral que a linhagem SHR, quando exposta a situações de novidade, além de ser uma linhagem normotensa, tornando possível, então, a dissociação desse transtorno com a hipertensão.

REFERÊNCIAS

ABIOLA, O.; ANGEL, J. M.; AVNER, P.; BACHMANOV, A. A.; BELKNAP, J. K.; BENNETT, B.; BLANKENHORN, E. P.; BLIZARD, D. A.; BOLIVAR, V.; BROCKMANN, G. A.; BUCK, K. J.; BUREAU, J. F.; CASLEY, W. L.; CHESLER, E. J.; CHEVERUD, J. M.; CHURCHILL, G. A.; COOK, M.; CRABBE, J. C.; CRUSIO, W. E.; DARVASI, A.; DE HAAN, G.; DERMANT, P.; DOERGE, R. W.; ELLIOT, R. W.; FARBER, C. R.; FLAHERTY, L.; FLINT, J.; GERSHENFELD, H.; GIBSON, J. P.; GU, J.; GU, W.; HIMMELBAUER, H.; HITZEMANN, R.; HSU, H. C.; HUNTER, K.; IRAQI, F. F.; JANSEN, R. C.; JOHNSON, T. E.; JONES, B. C.; KEMPERMANN, G.; LAMMERT, F.; LU, L.; MANLY, K. F.; MATTHEWS, D. B.; MEDRANO, J. F.; MEHRABIAN, M.; MITTLEMANN, G.; MOCK, B. A.; MOGIL, J. S.; MONTAGUTELLI, X.; MORAHAN, G.; MOUNTZ, J. D.; NAGASE, H.; NOWAKOWSKI, R. S.; O'HARA, B. F.; OSADCHUK, A. V.; PAIGEN, B.; PALMER, A. A.; PEIRCE, J. L.; POMP, D.; ROSEMANN, M.; ROSEN, G. D.; SCHALKWYK, L. C.; SELTZER, Z.; SETTLE, S.; SHIMOMURA, K.; SHOU, S.; SIKELA, J. M.; SIRACUSA, L. D.; SPEAROW, J. L.; TEUSCHER, C.; THREADGILL, D. W.; TOTH, L. A.; TOYE, A. A.; VADASZ, C.; VAN ZANT, G.; WAKELAND, E.; WILLIAMS, R. W.; ZHANG, H. G.; ZOU, F. The nature and identification of quantitative trait loci: a community's view. **Nature Reviews Genetics,** v. 4, n. 11, p. 911-916. 2003.

AGGLETON, J. P.; ALBASSER, M. M.; AGGLETON, D. J.; POIRIER, G. L.; PEARCE, J. M. Lesions of the rat perirhinal cortex spare the acquisition of a complex configural visual discrimination yet impair object recognition. **Behavioral Neuroscience,** v. 124, n. 1, p. 55-68. 2010.

AITMAN, T. J.; CRITSER, J. K.; CUPPEN, E.; DOMINICZAK, A.; FERNANDEZ-SUAREZ, X. M.; FLINT, J.; GAUGUIER, D.; GEURTS, A. M.; GOULD, M.; HARRIS, P. C.; HOLMDAHL, R.; HUBNER, N.; IZSVAK, Z.; JACOB, H. J.; KURAMOTO, T.; KWITEK, A. E.; MARRONE, A.; MASHIMO, T.; MORENO, C.; MULLINS, J.; MULLINS, L.; OLSSON, T.; PRAVENEC, M.; RILEY, L.; SAAR, K.; SERIKAWA, T.; SHULL, J. D.; SZPIRER, C.; TWIGGER, S. N.; VOIGT, B.; WORLEY, K. Progress and prospects in rat genetics: a community view. **Nature Genetics,** v. 40, n. 5, p. 516-522. 2008.

ANTUNES, M.; BIALA, G. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. **Cognitive Processing,** v. 13, n. 2, p. 93-110. 2012.

ARMSTRONG, N. J.; BRODNICKI, T. C.; SPEED, T. P. Mind the gap: analysis of marker-assisted breeding strategies for inbred mouse strains. **Mammalian Genome,** v. 17, n. 4, p. 273-87. 2006.

BAHI, A. Viral-mediated knockdown of mGluR7 in the nucleus accumbens mediates excessive alcohol drinking and increased ethanol-elicited conditioned place preference in rats. **Neuropsychopharmacology,** v. 38, n. 11, p. 2109-2119. 2013.

BARBOSA, F. F.; SANTOS, J. R.; MEURER, Y. S.; MACEDO, P. T.; FERREIRA, L. M.; PONTES, I. M.; RIBEIRO, A. M.; SILVA, R. H. Differential Cortical c-Fos and Zif-268 Expression after Object and Spatial Memory Processing in a Standard or Episodic-Like Object Recognition Task. **Frontiers in Behavioral Neuroscience,** v. 7, p. 112. 2013.

BICE, P.; FOROUD, T.; BO, R.; CASTELLUCCIO, P.; LUMENG, L.; LI, T. K.; CARR, L. G. Genomic screen for QTLs underlying alcohol consumption in the P and NP rat lines. **Mammalian Genome,** v. 9, n. 12, p. 949-955. 1998.

BIGNAMI, G. Selection for high rates and low rates of avoidance conditioning in the rat. **Animal Behaviour,** v. 13, n. 2, p. 221-227. 1965.

BLISS, T. V.; COLLINGRIDGE, G. L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. **Nature,** v. 361, n. 6407, p. 31-39. 1993.

BROADHURST, P. L. The Maudsley reactive and nonreactive strains of rats: a survey. **Behavior Genetics,** v. 5, n. 4, p. 299-319. 1975.

BROMAN, K. W. **A guide to QTL mapping with R/qtl**. Madison: Springer, 2009.

BRYDA, E. C. The Mighty Mouse: the impact of rodents on advances in biomedical research. **Missouri Medicine,** v. 110, n. 3, p. 207-211. 2013.

BURKE, S. N.; WALLACE, J. L.; NEMATOLLAHI, S.; UPRETY, A. R.; BARNES, C. A. Pattern separation deficits may contribute to age-associated recognition impairments. **Behavioral Neuroscience,** v. 124, n. 5, p. 559-573. 2010.

CALDARONE, B.; SAAVEDRA, C.; TARTAGLIA, K.; WEHNER, J. M.; DUDEK, B. C.; FLAHERTY, L. Quantitative trait loci analysis affecting contextual conditioning in mice. **Nature Genetics,** v. 17, n. 3, p. 335-337. 1997.

CAROBREZ, A. P.; BERTOGLIO, L. J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews,** v. 29, n. 8, p. 1193-1205. 2005.

CARR, L. G.; FOROUD, T.; BICE, P.; GOBBETT, T.; IVASHINA, J.; EDENBERG, H.; LUMENG, L.; LI, T. K. A quantitative trait locus for alcohol consumption in selectively bred rat lines. **Alcoholism Clinical and Experimental Research,** v. 22, n. 4, p. 884-887. 1998.

CARR, L. G.; HABEGGER, K.; SPENCE, J. P.; LIU, L.; LUMENG, L.; FOROUD, T. Development of congenic rat strains for alcohol consumption derived from the alcohol-preferring and nonpreferring rats. **Behavior Genetics,** v. 36, n. 2, p. 285-290. 2006.

CHIAVEGATTO, S.; IZIDIO, G. S.; MENDES-LANA, A.; ANEAS, I.; FREITAS, T. A.; TORRAO, A. S.; CONCEICAO, I. M.; BRITTO, L. R.; RAMOS, A. Expression of alpha-synuclein is increased in the hippocampus of rats with high levels of innate anxiety. **Molecular Psychiatry,** v. 14, n. 9, p. 894-905. 2009.

CHONG, V. Z.; SKOBLENICK, K.; MORIN, F.; XU, Y.; MISHRA, R. K. Dopamine-D1 and -D2 receptors differentially regulate synapsin II expression in the rat brain. **Neuroscience,** v. 138, n. 2, p. 587-599. 2006.

CHURCHILL, G. A.; DOERGE, R. W. Empirical threshold values for quantitative trait mapping. **Genetics,** v. 138, n. 3, p. 963-971. 1994.

DATABASE, R. G. Medical College of Wisconsin. **Strain search.** Disponível em: < http://rgd.mcw.edu/rgdweb/search/strains.html?100 >. Acesso em: jan, 2014a.

DAVIS, M. The role of the amygdala in fear-potentiated startle: implications for animal models of anxiety. **Trends in Pharmacological Sciences,** v. 13, n. 1, p. 35-41. 1992.

DAVIS, M.; RAINNIE, D.; CASSELL, M. Neurotransmission in the rat amygdala related to fear and anxiety. **Trends in Neurosciences,** v. 17, n. 5, p. 208-214. 1994.

DE MEDEIROS, G. F.; PEREIRA, E.; GRANZOTTO, N.; RAMOS, A. Low-anxiety rat phenotypes can be further reduced through genetic intervention. **PLoS One,** v. 8, n. 12, p. e83666. 2013.

DODART, J. C.; MATHIS, C.; UNGERER, A. Scopolamine-induced deficits in a two-trial object recognition task in mice. **Neuroreport,** v. 8, n. 5, p. 1173-1178. 1997.

DONG, H.; O'BRIEN, R. J.; FUNG, E. T.; LANAHAN, A. A.; WORLEY, P. F.; HUGANIR, R. L. GRIP: a synaptic PDZ domain-containing protein that interacts with AMPA receptors. **Nature,** v. 386, n. 6622, p. 279-284. 1997.

DOWNING, C.; RODD-HENRICKS, K. K.; FLAHERTY, L.; DUDEK, B. C. Genetic analysis of the psychomotor stimulant effect of ethanol. **Genes, Brain and Behavior,** v. 2, n. 3, p. 140-151. 2003.

EHLERS, C. L.; LI, T. K.; LUMENG, L.; HWANG, B. H.; SOMES, C.; JIMENEZ, P.; MATHE, A. A. Neuropeptide Y levels in ethanol-naive alcohol-preferring and nonpreferring rats and in Wistar rats after ethanol exposure. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research,** v. 22, n. 8, p. 1778-1782. 1998.

EILAM, D. Open-field behavior withstands drastic changes in arena size. **Behavioural Brain Research,** v. 142, n. 1-2, p. 53-62. 2003.

EYSENCK, M. W.; DERAKSHAN, N.; SANTOS, R.; CALVO, M. G. Anxiety and cognitive performance: attentional control theory. **Emotion,** v. 7, n. 2, p. 336-353. 2007.

FENDT, M.; FANSELOW, M. S. The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews,** v. 23, n. 5, p. 743-760. 1999.

FERNANDEZ-TERUEL, A.; DRISCOLL, P.; GIL, L.; AGUILAR, R.; TOBENA, A.; ESCORIHUELA, R. M. Enduring effects of environmental enrichment on novelty seeking, saccharin and ethanol intake in two rat lines (RHA/Verh and RLA/Verh) differing in incentive-seeking behavior. **Pharmacology Biochemistry and Behavior,** v. 73, n. 1, p. 225-231. 2002.

FLINT, J. Genetic effects on an animal model of anxiety. **FEBS Letters,** v. 529, n. 1, p. 131-134. 2002.

FLINT, J.; VALDAR, W.; SHIFMAN, S.; MOTT, R. Strategies for mapping and cloning quantitative trait genes in rodents. **Nature Reviews Genetics,** v. 6, n. 4, p. 271-286. 2005.

GIBBS, R. A.; WEINSTOCK, G. M.; METZKER, M. L.; MUZNY, D. M.; SODERGREN, E. J.; SCHERER, S.; SCOTT, G.; STEFFEN, D.; WORLEY, K. C.; BURCH, P. E.; OKWUONU, G.; HINES, S.; LEWIS, L.; DERAMO, C.; DELGADO, O.; DUGAN-ROCHA, S.; MINER, G.; MORGAN, M.; HAWES, A.; GILL, R.; CELERA; HOLT, R. A.; ADAMS, M. D.; AMANATIDES, P. G.; BADEN-TILLSON, H.; BARNSTEAD, M.; CHIN, S.; EVANS, C. A.;

FERRIERA, S.; FOSLER, C.; GLODEK, A.; GU, Z.; JENNINGS, D.; KRAFT, C. L.; NGUYEN, T.; PFANNKOCH, C. M.; SITTER, C.; SUTTON, G. G.; VENTER, J. C.; WOODAGE, T.; SMITH, D.; LEE, H. M.; GUSTAFSON, E.; CAHILL, P.; KANA, A.; DOUCETTE-STAMM, L.; WEINSTOCK, K.; FECHTEL, K.; WEISS, R. B.; DUNN, D. M.; GREEN, E. D.; BLAKESLEY, R. W.; BOUFFARD, G. G.; DE JONG, P. J.; OSOEGAWA, K.; ZHU, B.; MARRA, M.; SCHEIN, J.; BOSDET, I.; FJELL, C.; JONES, S.; KRZYWINSKI, M.; MATHEWSON, C.; SIDDIQUI, A.; WYE, N.; MCPHERSON, J.; ZHAO, S.; FRASER, C. M.; SHETTY, J.; SHATSMAN, S.; GEER, K.; CHEN, Y.; ABRAMZON, S.; NIERMAN, W. C.; HAVLAK, P. H.; CHEN, R.; DURBIN, K. J.; EGAN, A.; REN, Y.; SONG, X. Z.; LI, B.; LIU, Y.; QIN, X.; CAWLEY, S.; COONEY, A. J.; D'SOUZA, L. M.; MARTIN, K.; WU, J. Q.; GONZALEZ-GARAY, M. L.; JACKSON, A. R.; KALAFUS, K. J.; MCLEOD, M. P.; MILOSAVLJEVIC, A.; VIRK, D.; VOLKOV, A.; WHEELER, D. A.; ZHANG, Z.; BAILEY, J. A.; EICHLER, E. E.; TUZUN, E.; BIRNEY, E.; MONGIN, E.; URETA-VIDAL, A.; WOODWARK, C.; ZDOBNOV, E.; BORK, P.; SUYAMA, M.; TORRENTS, D.; ALEXANDERSSON, M.; TRASK, B. J.; YOUNG, J. M.; HUANG, H.; WANG, H.; XING, H.; DANIELS, S.; GIETZEN, D.; SCHMIDT, J.; STEVENS, K.; VITT, U.; WINGROVE, J.; CAMARA, F.; MAR ALBA, M.; ABRIL, J. F.; GUIGO, R.; SMIT, A.; DUBCHAK, I.; RUBIN, E. M.; COURONNE, O.; POLIAKOV, A.; HUBNER, N.; GANTEN, D.; GOESELE, C.; HUMMEL, O.; KREITLER, T.; LEE, Y. A.; MONTI, J.; SCHULZ, H.; ZIMDAHL, H.; HIMMELBAUER, H.; LEHRACH, H.; JACOB, H. J.; BROMBERG, S.; GULLINGS-HANDLEY, J.; JENSEN-SEAMAN, M. I.; KWITEK, A. E.; LAZAR, J.; PASKO, D.; TONELLATO, P. J.; TWIGGER, S.; PONTING, C. P.; DUARTE, J. M.; RICE, S.; GOODSTADT, L.; BEATSON, S. A.; EMES, R. D.; WINTER, E. E.; WEBBER, C.; BRANDT, P.; NYAKATURA, G.; ADETOBI, M.; CHIAROMONTE, F.; ELNITSKI, L.; ESWARA, P.; HARDISON, R. C.; HOU, M.; KOLBE, D.; MAKOVA, K.; MILLER, W.; NEKRUTENKO, A.; RIEMER, C.; SCHWARTZ, S.; TAYLOR, J.; YANG, S.; ZHANG, Y.; LINDPAINTNER, K.; ANDREWS, T. D.; CACCAMO, M.; CLAMP, M.; CLARKE, L.; CURWEN, V.; DURBIN, R.; EYRAS, E.; SEARLE, S. M.; COOPER, G. M.; BATZOGLOU, S.; BRUDNO, M.; SIDOW, A.; STONE, E. A.; PAYSEUR, B. A.; BOURQUE, G.; LOPEZ-OTIN, C.; PUENTE, X. S.; CHAKRABARTI, K.; CHATTERJI, S.; DEWEY, C.; PACHTER, L.; BRAY, N.; YAP, V. B.; CASPI, A.; TESLER, G.; PEVZNER, P. A.; HAUSSLER, D.; ROSKIN, K. M.; BAERTSCH, R.; CLAWSON, H.; FUREY, T. S.; HINRICHS, A. S.; KAROLCHIK, D.; KENT, W. J.; ROSENBLOOM, K. R.; TRUMBOWER, H.; WEIRAUCH, M.; COOPER, D. N.; STENSON, P. D.; MA, B.; BRENT, M.; ARUMUGAM, M.; SHTEYNBERG, D.; COPLEY, R. R.; TAYLOR, M. S.; RIETHMAN, H.; MUDUNURI, U.; PETERSON, J.; GUYER, M.; FELSENFELD, A.; OLD, S.; MOCKRIN, S.; COLLINS, F. Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. **Nature,** v. 428, n. 6982, p. 493-521. 2004.

GIOVEDI, S.; CORRADI, A.; FASSIO, A.; BENFENATI, F. Involvement of synaptic genes in the pathogenesis of autism spectrum disorders: the case of synapsins. **Frontiers in Pediatrics,** v. 2, p. 94. 2014.

GOSWAMI, S.; SAMUEL, S.; SIERRA, O. R.; CASCARDI, M.; PARE, D. A rat model of post-traumatic stress disorder reproduces the hippocampal deficits seen in the human syndrome. **Frontiers in Behavioral Neuroscience,** v. 6, p. 26. 2012.

GOZZI, A.; JAIN, A.; GIOVANNELLI, A.; BERTOLLINI, C.; CRESTAN, V.; SCHWARZ, A. J.; TSETSENIS, T.; RAGOZZINO, D.; GROSS, C. T.; BIFONE, A. A neural switch for active and passive fear. **Neuron,** v. 67, n. 4, p. 656-666. 2010.

GRAEFF, F. G. Minor tranquilizers and brain defense systems. **Brazilian Journal Of Medical and Biological Research,** v. 14, n. 4-5, p. 239-265. 1981.

GRAEFF, F. G. Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviors and related emotions in mammals. **Brazilian Journal Of Medical and Biological Research,** v. 27, n. 4, p. 811-829. 1994.

GRAHAM, D. R.; SIDHU, A. Mice expressing the A53T mutant form of human alpha-synuclein exhibit hyperactivity and reduced anxiety-like behavior. **Journal of Neuroscience Research,** v. 88, n. 8, p. 1777-1783. 2010.

GRAY, J. A.; MCNAUGHTON, N. **The neuropsychology of anxiety: an enquiry into the functions of the septo-hippocampal system**. Oxford: Oxford University Press, 2000.

HALL, C. S. Emotional behavior in the rat. **Journal of Comparative Psychology,** v. 18, n. 3, p. 843-849. 1934.

HAMEISTER, T. M.; IZÍDIO, G. S.; VALIATI, V. H.; RAMOS, A. Association of a locus on rat chromosome 4 with anxiety-related behaviors in two selectively bred rat lines. **Genetics and Molecular Biology,** v. 31, n. 4, p. 843-849. 2008.

HEAL, D. J.; SMITH, S. L.; KULKARNI, R. S.; ROWLEY, H. L. New perspectives from microdialysis studies in freely-moving, spontaneously hypertensive rats on the pharmacology of drugs for the treatment of ADHD. **Pharmacology Biochemistry and Behavior,** v. 90, n. 2, p. 184-197. 2008.

HERRERA, V. L.; PASION, K. A.; TAN, G. A.; RUIZ-OPAZO, N. Dahl (S x R) rat congenic strain analysis confirms and defines a chromosome 17 spatial navigation quantitative trait locus to <10 Mbp. **PLoS One,** v. 8, n. 2, p. e58280. 2013.

HOFSTETTER, J. R.; TROFATTER, J. A.; KERNEK, K. L.; NURNBERGER, J. I.; MAYEDA, A. R. New quantitative trait loci for the genetic variance in circadian period of locomotor activity between inbred strains of mice. **Journal of Biological Rhythms,** v. 18, n. 6, p. 450-462. 2003.

HOVATTA, I.; BARLOW, C. Molecular genetics of anxiety in mice and men. **Annals of Medicine,** v. 40, n. 2, p. 92-109. 2008.

HUANG, G.; TONG, C.; KUMBHANI, D. S.; ASHTON, C.; YAN, H.; YING, Q. L. Beyond knockout rats: new insights into finer genome manipulation in rats. **Cell Cycle,** v. 10, n. 7, p. 1059-1066. 2011.

IZIDIO, G. S.; LOPES, D. M.; SPRICIGO, L., JR.; RAMOS, A. Common variations in the pretest environment influence genotypic comparisons in models of anxiety. **Genes, Brain and Behavior,** v. 4, n. 7, p. 412-419. 2005.

IZIDIO, G. S.; OLIVEIRA, L. C.; OLIVEIRA, L. F.; PEREIRA, E.; WEHRMEISTER, T. D.; RAMOS, A. The influence of sex and estrous cycle on QTL for emotionality and ethanol consumption. **Mammalian Genome,** v. 22, n. 5-6, p. 329-340. 2011.

IZQUIERDO, I. **Memória**. Porto Alegre: Artmed, 2011.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. **Neurobiology of Learning and Memory,** v. 68, n. 3, p. 285-316. 1997.

JACOB, H. J. Functional genomics and rat models. **Genome Research,** v. 9, n. 11, p. 1013-1016. 1999.

JARAMILLO, S.; ZADOR, A. M. Mice and rats achieve similar levels of performance in an adaptive decision-making task. **Frontiers in Systems Neuroscience,** v. 8, p. 173. 2014.

KALUEFF, A. V.; MURPHY, D. L. The importance of cognitive phenotypes in experimental modeling of animal anxiety and depression. **Neural Plasticity,** v. 2007, p. 52087. 2007.

KEPECS, A.; UCHIDA, N.; ZARIWALA, H. A.; MAINEN, Z. F. Neural correlates, computation and behavioural impact of decision confidence. **Nature,** v. 455, n. 7210, p. 227-231. 2008.

KITAMURA, O.; WEE, S.; SPECIO, S. E.; KOOB, G. F.; PULVIRENTI, L. Escalation of methamphetamine self-administration in rats: a dose-effect function. **Psychopharmacology (Berl),** v. 186, n. 1, p. 48-53. 2006.

KOSTEN, T. A.; AMBROSIO, E. HPA axis function and drug addictive behaviors: insights from studies with Lewis and Fischer 344 inbred rats. **Psychoneuroendocrinology,** v. 27, n. 1-2, p. 35-69. 2002.

LANDER, E.; KRUGLYAK, L. Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. **Nature Genetics,** v. 11, n. 3, p. 241-247. 1995.

LANDER, E. S.; LINTON, L. M.; BIRREN, B.; NUSBAUM, C.; ZODY, M. C.; BALDWIN, J.; DEVON, K.; DEWAR, K.; DOYLE, M.; FITZHUGH, W.; FUNKE, R.; GAGE, D.; HARRIS, K.; HEAFORD, A.; HOWLAND, J.; KANN, L.; LEHOCZKY, J.; LEVINE, R.; MCEWAN, P.; MCKERNAN, K.; MELDRIM, J.; MESIROV, J. P.; MIRANDA, C.; MORRIS, W.; NAYLOR, J.; RAYMOND, C.; ROSETTI, M.; SANTOS, R.; SHERIDAN, A.; SOUGNEZ, C.; STANGE-THOMANN, N.; STOJANOVIC, N.; SUBRAMANIAN, A.; WYMAN, D.; ROGERS, J.; SULSTON, J.; AINSCOUGH, R.; BECK, S.; BENTLEY, D.; BURTON, J.; CLEE, C.; CARTER, N.; COULSON, A.; DEADMAN, R.; DELOUKAS, P.; DUNHAM, A.; DUNHAM, I.; DURBIN, R.; FRENCH, L.; GRAFHAM, D.; GREGORY, S.; HUBBARD, T.; HUMPHRAY, S.; HUNT, A.; JONES, M.; LLOYD, C.; MCMURRAY, A.; MATTHEWS, L.; MERCER, S.; MILNE, S.; MULLIKIN, J. C.; MUNGALL, A.; PLUMB, R.; ROSS, M.; SHOWNKEEN, R.; SIMS, S.; WATERSTON, R. H.; WILSON, R. K.; HILLIER, L. W.; MCPHERSON, J. D.; MARRA, M. A.; MARDIS, E. R.; FULTON, L. A.; CHINWALLA, A. T.; PEPIN, K. H.; GISH, W. R.; CHISSOE, S. L.; WENDL, M. C.; DELEHAUNTY, K. D.; MINER, T. L.; DELEHAUNTY, A.; KRAMER, J. B.; COOK, L. L.; FULTON, R. S.; JOHNSON, D. L.; MINX, P. J.; CLIFTON, S. W.; HAWKINS, T.; BRANSCOMB, E.; PREDKI, P.; RICHARDSON, P.; WENNING, S.; SLEZAK, T.; DOGGETT, N.; CHENG, J. F.; OLSEN, A.; LUCAS, S.; ELKIN, C.; UBERBACHER, E.; FRAZIER, M.; GIBBS, R. A.; MUZNY, D. M.; SCHERER, S. E.; BOUCK, J. B.; SODERGREN, E. J.; WORLEY, K. C.; RIVES, C. M.; GORRELL, J. H.; METZKER, M. L.; NAYLOR, S. L.; KUCHERLAPATI, R. S.; NELSON, D. L.; WEINSTOCK, G. M.; SAKAKI, Y.; FUJIYAMA, A.; HATTORI, M.; YADA, T.; TOYODA, A.; ITOH, T.; KAWAGOE, C.; WATANABE, H.; TOTOKI, Y.; TAYLOR, T.; WEISSENBACH, J.; HEILIG, R.; SAURIN, W.; ARTIGUENAVE, F.; BROTTIER, P.; BRULS, T.; PELLETIER, E.; ROBERT, C.; WINCKER, P.; SMITH, D. R.; DOUCETTE-STAMM, L.; RUBENFIELD, M.; WEINSTOCK, K.; LEE, H. M.; DUBOIS, J.; ROSENTHAL, A.; PLATZER, M.; NYAKATURA, G.; TAUDIEN, S.; RUMP, A.; YANG, H.; YU, J.; WANG, J.; HUANG, G.; GU, J.; HOOD, L.; ROWEN, L.; MADAN, A.; QIN, S.;

DAVIS, R. W.; FEDERSPIEL, N. A.; ABOLA, A. P.; PROCTOR, M. J.; MYERS, R. M.; SCHMUTZ, J.; DICKSON, M.; GRIMWOOD, J.; COX, D. R.; OLSON, M. V.; KAUL, R.; SHIMIZU, N.; KAWASAKI, K.; MINOSHIMA, S.; EVANS, G. A.; ATHANASIOU, M.; SCHULTZ, R.; ROE, B. A.; CHEN, F.; PAN, H.; RAMSER, J.; LEHRACH, H.; REINHARDT, R.; MCCOMBIE, W. R.; DE LA BASTIDE, M.; DEDHIA, N.; BLOCKER, H.; HORNISCHER, K.; NORDSIEK, G.; AGARWALA, R.; ARAVIND, L.; BAILEY, J. A.; BATEMAN, A.; BATZOGLOU, S.; BIRNEY, E.; BORK, P.; BROWN, D. G.; BURGE, C. B.; CERUTTI, L.; CHEN, H. C.; CHURCH, D.; CLAMP, M.; COPLEY, R. R.; DOERKS, T.; EDDY, S. R.; EICHLER, E. E.; FUREY, T. S.; GALAGAN, J.; GILBERT, J. G.; HARMON, C.; HAYASHIZAKI, Y.; HAUSSLER, D.; HERMJAKOB, H.; HOKAMP, K.; JANG, W.; JOHNSON, L. S.; JONES, T. A.; KASIF, S.; KASPRYZK, A.; KENNEDY, S.; KENT, W. J.; KITTS, P.; KOONIN, E. V.; KORF, I.; KULP, D.; LANCET, D.; LOWE, T. M.; MCLYSAGHT, A.; MIKKELSEN, T.; MORAN, J. V.; MULDER, N.; POLLARA, V. J.; PONTING, C. P.; SCHULER, G.; SCHULTZ, J.; SLATER, G.; SMIT, A. F.; STUPKA, E.; SZUSTAKOWSKI, J.; THIERRY-MIEG, D.; THIERRY-MIEG, J.; WAGNER, L.; WALLIS, J.; WHEELER, R.; WILLIAMS, A.; WOLF, Y. I.; WOLFE, K. H.; YANG, S. P.; YEH, R. F.; COLLINS, F.; GUYER, M. S.; PETERSON, J.; FELSENFELD, A.; WETTERSTRAND, K. A.; PATRINOS, A.; MORGAN, M. J.; DE JONG, P.; CATANESE, J. J.; OSOEGAWA, K.; SHIZUYA, H.; CHOI, S.; CHEN, Y. J. Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature,** v. 409, n. 6822, p. 860-921. 2001.

LAULEDERKIND, S. J.; HAYMAN, G. T.; WANG, S. J.; SMITH, J. R.; LOWRY, T. F.; NIGAM, R.; PETRI, V.; DE PONS, J.; DWINELL, M. R.; SHIMOYAMA, M.; MUNZENMAIER, D. H.; WORTHEY, E. A.; JACOB, H. J. The Rat Genome Database 2013--data, tools and users. **Briefings in Bioinformatics,** v. 14, n. 4, p. 520-526. 2013.

LAZAR, J.; MORENO, C.; JACOB, H. J.; KWITEK, A. E. Impact of genomics on research in the rat. **Genome Research,** v. 15, n. 12, p. 1717-1728. 2005.

LEDOUX, J. Rethinking the emotional brain. **Neuron,** v. 73, n. 4, p. 653-676. 2012.

LIANG, T., SPENCE, J., LIU, L., STROTHER, W.N., CHANG, H.W., ELLISON, J.A., LUMENG, L., LI, T.K., FOROUD, T. AND CARR, L.G. α-Synuclein Maps to a Quantitative Trait Locus for Alcohol Preference and Is Differentially Expressed in Alcohol-Preferring and -Nonpreferring Rats. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, n.100, p. 4690-4695. 2003.

LIKHTIK, E.; STUJENSKE, J. M.; TOPIWALA, M. A.; HARRIS, A. Z.; GORDON, J. A. Prefrontal entrainment of amygdala activity signals safety in learned fear and innate anxiety. **Nature Neuroscience,** v. 17, n. 1, p. 106-113. 2014.

LLAMAS, B.; CONTESSE, V.; GUYONNET-DUPERAT, V.; VAUDRY, H.; MORMEDE, P.; MOISAN, M. P. QTL mapping for traits associated with stress neuroendocrine reactivity in rats. **Mammalian Genome,** v. 16, n. 7, p. 505-515. 2005.

LOPEZ-AUMATELL, R.; MARTINEZ-MEMBRIVES, E.; VICENS-COSTA, E.; CANETE, T.; BLAZQUEZ, G.; MONT-CARDONA, C.; JOHANNESSON, M.; FLINT, J.; TOBENA, A.; FERNANDEZ-TERUEL, A. Effects of environmental and physiological covariates on sex differences in unconditioned and conditioned anxiety and fear in a large sample of genetically heterogeneous (N/Nih-HS) rats. **Behavioral and Brain Functions,** v. 7, p. 48. 2011.

MARTINEZ, R. C.; GUPTA, N.; LAZARO-MUNOZ, G.; SEARS, R. M.; KIM, S.; MOSCARELLO, J. M.; LEDOUX, J. E.; CAIN, C. K. Active vs. reactive threat responding is associated with differential c-Fos expression in specific regions of amygdala and prefrontal cortex. **Learning & Memory,** v. 20, n. 8, p. 446-452. 2013.

MASHIMO, T.; SERIKAWA, T. Rat resources in biomedical research. **Current Pharmaceutical Biotechnology,** v. 10, n. 2, p. 214-220. 2009.

MATHEWS, A. Why worry? The cognitive function of anxiety. **Behaviour Research and Therapy,** v. 28, n. 6, p. 455-468. 1990.

MAURICIO, R. Mapping quantitative trait loci in plants: uses and caveats for evolutionary biology. **Nature Reviews Genetics,** v. 2, n. 5, p. 370-381. 2001.

MCGAUGH, J. L. The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. **Annual Review of Neuroscience,** v. 27, p. 1-28. 2004.

MCNAUGHTON, N. Cognitive dysfunction resulting from hippocampal hyperactivity--a possible cause of anxiety disorder? **Pharmacology Biochemistry and Behavior,** v. 56, n. 4, p. 603-611. 1997.

MEDEIROS, G. F. D.; CORRÊA, F. J.; CORVINO, M. E.; IZÍDIO, G. D. S.; RAMOS, A. The Long Way from Complex Phenotypes to Genes: The Story of Rat Chromosome 4 and Its Behavioral Effects. **World Journal of Neuroscience,** v. 4, p. 203-215. 2014.

MENESES, A.; PEREZ-GARCIA, G.; PONCE-LOPEZ, T.; TELLEZ, R.; GALLEGOS-CARI, A.; CASTILLO, C. Spontaneously hypertensive rat (SHR) as an animal model for ADHD: a short overview. **Review of Neuroscience,** v. 22, n. 3, p. 365-371. 2011.

MENESES, A.; TERRON, J. A.; IBARRA, M.; HONG, E. Effects of nimodipine on learning in normotensive and spontaneously hypertensive rats. **Behavioural Brain Research,** v. 85, n. 1, p. 121-125. 1997.

METNA-LAURENT, M.; SORIA-GOMEZ, E.; VERRIER, D.; CONFORZI, M.; JEGO, P.; LAFENETRE, P.; MARSICANO, G. Bimodal control of fear-coping strategies by CB(1) cannabinoid receptors. **The Journal of Neuroscience,** v. 32, n. 21, p. 7109-7118. 2012.

MOORE, K. J.; NAGLE, D. L. Complex trait analysis in the mouse: The strengths, the limitations and the promise yet to come. **Annual Review of Genetics,** v. 34, p. 653-686. 2000.

MORI, F.; NISHIE, M.; KAKITA, A.; YOSHIMOTO, M.; TAKAHASHI, H.; WAKABAYASHI, K. Relationship among alpha-synuclein accumulation, dopamine synthesis, and neurodegeneration in Parkinson disease substantia nigra. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology,** v. 65, n. 8, p. 808-815. 2006.

MORMEDE, P.; COURVOISIER, H.; RAMOS, A.; MARISSAL-ARVY, N.; OUSOVA, O.; DESAUTES, C.; DUCLOS, M.; CHAOULOFF, F.; MOISAN, M. P. Molecular genetic approaches to investigate individual variations in behavioral and neuroendocrine stress responses. **Psychoneuroendocrinology,** v. 27, n. 5, p. 563-583. 2002.

MORMEDE, P.; MONEVA, E.; BRUNEVAL, C.; CHAOULOFF, F.; MOISAN, M. P. Marker-assisted selection of a neuro-behavioural trait related to behavioural inhibition in the SHR strain, an animal model of ADHD. **Genes, Brain and Behavior,** v. 1, n. 2, p. 111-116. 2002.

NADEAU, J. H. Modifier genes in mice and humans. **Nature Review Genetics,** v. 2, n. 3, p. 165-174. 2001

NIGAM, R.; LAULEDERKIND, S. J.; HAYMAN, G. T.; SMITH, J. R.; WANG, S. J.; LOWRY, T. F.; PETRI, V.; DE PONS, J.; TUTAJ, M.; LIU, W.; JAYARAMAN, P.; MUNZENMAIER, D. H.; WORTHEY, E. A.; DWINELL, M. R.; SHIMOYAMA, M.; JACOB, H. J. Rat Genome Database: a unique resource for rat, human, and mouse quantitative trait locus data. **Physiological Genomics,** v. 45, n. 18, p. 809-816. 2013.

OBINU, M. C.; REIBAUD, M.; MIQUET, J. M.; PASQUET, M.; ROONEY, T. Brain-selective stimulation of nicotinic receptors by TC-1734 enhances ACh transmission from frontoparietal cortex and memory in rodents. **Progress in Neuropsychopharmacol Biological Psychiatry,** v. 26, n. 5, p. 913-918. 2002.

OKAMOTO, K.; AOKI, K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. **Japanese Circulation Journal,** v. 27, p. 282-293. 1963.

PANDEY, S. C.; ZHANG, H.; ROY, A.; XU, T. Deficits in amygdaloid cAMP-responsive element-binding protein signaling play a role in genetic predisposition to anxiety and alcoholism. **The Journal of Clinical Investigation,** v. 115, n. 10, p. 2762-2773. 2005.

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

PETERS, L. L.; ROBLEDO, R. F.; BULT, C. J.; CHURCHILL, G. A.; PAIGEN, B. J.; SVENSON, K. L. The mouse as a model for human biology: a resource guide for complex trait analysis. **Nature Review Genetics,** v. 8, n. 1, p. 58-69. 2007.

PICETTI, R.; CACCAVO, J. A.; HO, A.; KREEK, M. J. Dose escalation and dose preference in extended-access heroin self-administration in Lewis and Fischer rats. **Psychopharmacology,** v. 220, n. 1, p. 163-172. 2012.

PICETTI, R.; HO, A.; BUTELMAN, E. R.; KREEK, M. J. Dose preference and dose escalation in extended-access cocaine self-administration in Fischer and Lewis rats. **Psychopharmacology (Berl),** v. 211, n. 3, p. 313-323. 2010.

PIRES, V.A.; PAMPLONA, F.A.; PANDOLFO, P.; FERNANDES, D.; PREDIGER, R.D.; TAKAHASHI, R.N. Adenosine receptor antagonists improve short-term object-recognition ability of spontaneously hypertensive rats: a rodent model of attention-deficit hyperactivity disorder. **Behavioural Pharmacology,** v. 20, n. 2, p. 134-145. 2009.

PLOMIN, R.; DE FRIES, J. C.; MC CLEARN, G. R.; RUTTER, M. **Behavioral genetics**. New York: W. H. Freeman and Company, 1997.

PLOMIN, R.; OWEN, M. J.; MCGUFFIN, P. The genetic basis of complex human behaviors. **Science,** v. 264, n. 5166, p. 1733-1739. 1994.

POLYMEROPOULOS, M. H.; HIGGINS, J. J.; GOLBE, L. I.; JOHNSON, W. G.; IDE, S. E.; DI IORIO, G.; SANGES, G.; STENROOS, E. S.; PHO, L. T.; SCHAFFER, A. A.; LAZZARINI, A. M.; NUSSBAUM, R. L.; DUVOISIN, R. C. Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q21-q23. **Science,** v. 274, n. 5290, p. 1197-1199. 1996.

PONDER, C. A.; MUNOZ, M.; GILLIAM, T. C.; PALMER, A. A. Genetic architecture of fear conditioning in chromosome substitution strains: relationship to measures of innate (unlearned) anxiety-like behavior. **Mammalian Genome,** v. 18, n. 4, p. 221-228. 2007.

POTENZA, M. N.; BRODKIN, E. S.; JOE, B.; LUO, X.; REMMERS, E. F.; WILDER, R. L.; NESTLER, E. J.; GELERNTER, J. Genomic regions controlling corticosterone levels in rats. **Biological Psychiatry,** v. 55, n. 6, p. 634-641. 2004.

PREDIGER, R. D.; PAMPLONA, F. A.; FERNANDES, D.; TAKAHASHI, R. N. Caffeine improves spatial learning deficits in an animal model of attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) -- the spontaneously hypertensive rat (SHR). **The International Journal of Neuropsychopharmacology,** v. 8, n. 4, p. 583-594. 2005.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European Journal of Pharmacology,** v. 463, n. 1-3, p. 3-33. 2003.

RAMOS, A.; BERTON, O.; MORMEDE, P.; CHAOULOFF, F. A multiple-test study of anxiety-related behaviours in six inbred rat strains. **Behavioural Brain Research,** v. 85, n. 1, p. 57-69. 1997.

RAMOS, A.; CORREIA, E. C.; IZIDIO, G. S.; BRUSKE, G. R. Genetic selection of two new rat lines displaying different levels of anxiety-related behaviors. **Behavior Genetics,** v. 33, n. 6, p. 657-668. 2003.

RAMOS, A.; KANGERSKI, A. L.; BASSO, P. F.; DA SILVA SANTOS, J. E.; ASSREUY, J.; VENDRUSCOLO, L. F.; TAKAHASHI, R. N. Evaluation of Lewis and SHR rat strains as a genetic model for the study of anxiety and pain. **Behavioural Brain Research,** v. 129, n. 1-2, p. 113-123. 2002.

RAMOS, A.; MELLERIN, Y.; MORMEDE, P.; CHAOULOFF, F. A genetic and multifactorial analysis of anxiety-related behaviours in Lewis and SHR intercrosses. **Behavioural Brain Research,** v. 96, n. 1-2, p. 195-205. 1998.

RAMOS, A.; MOISAN, M. P.; CHAOULOFF, F.; MORMEDE, C.; MORMEDE, P. Identification of female-specific QTLs affecting an emotionality-related behavior in rats. **Molecular Psychiatry,** v. 4, n. 5, p. 453-462. 1999.

RAMOS, A.; MORMEDE, P. Stress and emotionality: a multidimensional and genetic approach. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews,** v. 22, n. 1, p. 33-57. 1998.

RIBEIRO, A. M.; BARBOSA, F. F.; GODINHO, M. R.; FERNANDES, V. S.; MUNGUBA, H.; MELO, T. G.; BARBOSA, M. T.; EUFRASIO, R. A.; CABRAL, A.; IZIDIO, G. S.; SILVA, R.

H. Sex differences in aversive memory in rats: possible role of extinction and reactive emotional factors. **Brain and Cognition,** v. 74, n. 2, p. 145-151. 2010.

RIBEIRO, A. M.; BARBOSA, F. F.; MUNGUBA, H.; COSTA, M. S.; CAVALCANTE, J. S.; SILVA, R. H. Basolateral amygdala inactivation impairs learned (but not innate) fear response in rats. **Neurobiology of Learning and Memory,** v. 95, n. 4, p. 433-440. 2011.

ROBERTSON, B. A.; CLEMENTS, K. M.; WAINWRIGHT, P. E. The working memory capabilities of the spontaneously hypertensive rat. **Physiology & Behavior,** v. 94, n. 3, p. 481-486. 2008.

ROY, V.; CHAPILLON, P.; JELJELI, M.; CASTON, J.; BELZUNG, C. Free versus forced exposure to an elevated plus-maze: evidence for new behavioral interpretations during test and retest. **Psychopharmacology (Berl),** v. 203, n. 1, p. 131-141. 2009.

RUDY, J. W.; HUFF, N. C.; MATUS-AMAT, P. Understanding contextual fear conditioning: insights from a two-process model. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews,** v. 28, n. 7, p. 675-685. 2004.

RUIZ-OPAZO, N.; TONKISS, J. X-linked loci influence spatial navigation performance in Dahl rats. **Physiological Genomics,** v. 16, n. 3, p. 329-333. 2004.

SHUMYATSKY, G. P.; MALLERET, G.; SHIN, R. M.; TAKIZAWA, S.; TULLY, K.; TSVETKOV, E.; ZAKHARENKO, S. S.; JOSEPH, J.; VRONSKAYA, S.; YIN, D.; SCHUBART, U. K.; KANDEL, E. R.; BOLSHAKOV, V. Y. stathmin, a gene enriched in the amygdala, controls both learned and innate fear. **Cell,** v. 123, n. 4, p. 697-709. 2005.

SILVA, G. J.; PEREIRA, A. C.; KRIEGER, E. M.; KRIEGER, J. E. Genetic mapping of a new heart rate QTL on chromosome 8 of spontaneously hypertensive rats. **BMC Medical Genetics,** v. 8, p. 17. 2007.

SILVA, R. H.; FRUSSA-FILHO, R. The plus-maze discriminative avoidance task: a new model to study memory-anxiety interactions. Effects of chlordiazepoxide and caffeine. **Journal of Neuroscience Methods,** v. 102, n. 2, p. 117-125. 2000.

SMITS, B. M.; CUPPEN, E. Rat genetics: the next episode. **Trends in Genetics,** v. 22, n. 4, p. 232-240. 2006.

SPEARMAN, C. 'General intelligence', objectively determined and measured. **American Journal of Psychology,** v. 15, p. 201-293. 1904.

SOKOLOWSKA, E.; HOVATTA, I. Anxiety genetics - findings from cross-species genome-wide approaches. **Biology of Mood & Anxiety Disorders,** v. 3, n. 1, p. 9. 2013.

SPINEDI, E.; SALAS, M.; CHISARI, A.; PERONE, M.; CARINO, M.; GAILLARD, R. C. Sex differences in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis response to inflammatory and neuroendocrine stressors. Evidence for a pituitary defect in the autoimmune disease-susceptible female Lewis rat. **Neuroendocrinology,** v. 60, n. 6, p. 609-617. 1994.

SRIVASTAVA, S.; OSTEN, P.; VILIM, F. S.; KHATRI, L.; INMAN, G.; STATES, B.; DALY, C.; DESOUZA, S.; ABAGYAN, R.; VALTSCHANOFF, J. G.; WEINBERG, R. J.; ZIFF, E. B.

Novel anchorage of GluR2/3 to the postsynaptic density by the AMPA receptor-binding protein ABP. **Neuron,** v. 21, n. 3, p. 581-591. 1998.

STEWART, R. B.; GATTO, G. J.; LUMENG, L.; LI, T. K.; MURPHY, J. M. Comparison of alcohol-preferring (P) and nonpreferring (NP) rats on tests of anxiety and for the anxiolytic effects of ethanol. **Alcohol,** v. 10, n. 1, p. 1-10. 1993.

TAKAHASHI, A.; KATO, K.; MAKINO, J.; SHIROISHI, T.; KOIDE, T. Multivariate analysis of temporal descriptions of open-field behavior in wild-derived mouse strains. **Behavior Genetics,** v. 36, n. 5, p. 763-774. 2006.

TERENINA-RIGALDIE, E.; JONES, B. C.; MORMEDE, P. Pleiotropic effect of a locus on chromosome 4 influencing alcohol drinking and emotional reactivity in rats. **Genes, Brain and Behavior,** v. 2, n. 3, p. 125-131. 2003.

TERENINA-RIGALDIE, E.; MOISAN, M. P.; COLAS, A.; BEAUGE, F.; SHAH, K. V.; JONES, B. C.; MORMEDE, P. Genetics of behaviour: phenotypic and molecular study of rats derived from high- and low-alcohol consuming lines. **Pharmacogenetics,** v. 13, n. 9, p. 543-554. 2003.

TSETSENIS, T.; MA, X. H.; LO IACONO, L.; BECK, S. G.; GROSS, C. Suppression of conditioning to ambiguous cues by pharmacogenetic inhibition of the dentate gyrus. **Nature Neuroscience,** v. 10, n. 7, p. 896-902. 2007.

VANGUILDER, H. D.; FARLEY, J. A.; YAN, H.; VAN KIRK, C. A.; MITSCHELEN, M.; SONNTAG, W. E.; FREEMAN, W. M. Hippocampal dysregulation of synaptic plasticity-associated proteins with age-related cognitive decline. **Neurobiology of Disease,** v. 43, n. 1, p. 201-212. 2011.

VENDRUSCOLO, L. F.; TERENINA-RIGALDIE, E.; RABA, F.; RAMOS, A.; TAKAHASHI, R. N.; MORMEDE, P. Evidence for a female-specific effect of a chromosome 4 locus on anxiety-related behaviors and ethanol drinking in rats. **Genes, Brain and Behavior,** v. 5, n. 6, p. 441-450. 2006.

VENTER, J. C.; ADAMS, M. D.; MYERS, E. W.; LI, P. W.; MURAL, R. J.; SUTTON, G. G.; SMITH, H. O.; YANDELL, M.; EVANS, C. A.; HOLT, R. A.; GOCAYNE, J. D.; AMANATIDES, P.; BALLEW, R. M.; HUSON, D. H.; WORTMAN, J. R.; ZHANG, Q.; KODIRA, C. D.; ZHENG, X. H.; CHEN, L.; SKUPSKI, M.; SUBRAMANIAN, G.; THOMAS, P. D.; ZHANG, J.; GABOR MIKLOS, G. L.; NELSON, C.; BRODER, S.; CLARK, A. G.; NADEAU, J.; MCKUSICK, V. A.; ZINDER, N.; LEVINE, A. J.; ROBERTS, R. J.; SIMON, M.; SLAYMAN, C.; HUNKAPILLER, M.; BOLANOS, R.; DELCHER, A.; DEW, I.; FASULO, D.; FLANIGAN, M.; FLOREA, L.; HALPERN, A.; HANNENHALLI, S.; KRAVITZ, S.; LEVY, S.; MOBARRY, C.; REINERT, K.; REMINGTON, K.; ABU-THREIDEH, J.; BEASLEY, E.; BIDDICK, K.; BONAZZI, V.; BRANDON, R.; CARGILL, M.; CHANDRAMOULISWARAN, I.; CHARLAB, R.; CHATURVEDI, K.; DENG, Z.; DI FRANCESCO, V.; DUNN, P.; EILBECK, K.; EVANGELISTA, C.; GABRIELIAN, A. E.; GAN, W.; GE, W.; GONG, F.; GU, Z.; GUAN, P.; HEIMAN, T. J.; HIGGINS, M. E.; JI, R. R.; KE, Z.; KETCHUM, K. A.; LAI, Z.; LEI, Y.; LI, Z.; LI, J.; LIANG, Y.; LIN, X.; LU, F.; MERKULOV, G. V.; MILSHINA, N.; MOORE, H. M.; NAIK, A. K.; NARAYAN, V. A.; NEELAM, B.; NUSSKERN, D.; RUSCH, D. B.; SALZBERG, S.; SHAO, W.; SHUE, B.; SUN, J.; WANG, Z.; WANG, A.; WANG, X.; WANG, J.; WEI, M.; WIDES, R.; XIAO, C.; YAN, C.; YAO, A.; YE, J.; ZHAN, M.; ZHANG, W.; ZHANG, H.; ZHAO, Q.; ZHENG, L.; ZHONG, F.;

ZHONG, W.; ZHU, S.; ZHAO, S.; GILBERT, D.; BAUMHUETER, S.; SPIER, G.; CARTER, C.; CRAVCHIK, A.; WOODAGE, T.; ALI, F.; AN, H.; AWE, A.; BALDWIN, D.; BADEN, H.; BARNSTEAD, M.; BARROW, I.; BEESON, K.; BUSAM, D.; CARVER, A.; CENTER, A.; CHENG, M. L.; CURRY, L.; DANAHER, S.; DAVENPORT, L.; DESILETS, R.; DIETZ, S.; DODSON, K.; DOUP, L.; FERRIERA, S.; GARG, N.; GLUECKSMANN, A.; HART, B.; HAYNES, J.; HAYNES, C.; HEINER, C.; HLADUN, S.; HOSTIN, D.; HOUCK, J.; HOWLAND, T.; IBEGWAM, C.; JOHNSON, J.; KALUSH, F.; KLINE, L.; KODURU, S.; LOVE, A.; MANN, F.; MAY, D.; MCCAWLEY, S.; MCINTOSH, T.; MCMULLEN, I.; MOY, M.; MOY, L.; MURPHY, B.; NELSON, K.; PFANNKOCH, C.; PRATTS, E.; PURI, V.; QURESHI, H.; REARDON, M.; RODRIGUEZ, R.; ROGERS, Y. H.; ROMBLAD, D.; RUHFEL, B.; SCOTT, R.; SITTER, C.; SMALLWOOD, M.; STEWART, E.; STRONG, R.; SUH, E.; THOMAS, R.; TINT, N. N.; TSE, S.; VECH, C.; WANG, G.; WETTER, J.; WILLIAMS, S.; WILLIAMS, M.; WINDSOR, S.; WINN-DEEN, E.; WOLFE, K.; ZAVERI, J.; ZAVERI, K.; ABRIL, J. F.; GUIGO, R.; CAMPBELL, M. J.; SJOLANDER, K. V.; KARLAK, B.; KEJARIWAL, A.; MI, H.; LAZAREVA, B.; HATTON, T.; NARECHANIA, A.; DIEMER, K.; MURUGANUJAN, A.; GUO, N.; SATO, S.; BAFNA, V.; ISTRAIL, S.; LIPPERT, R.; SCHWARTZ, R.; WALENZ, B.; YOOSEPH, S.; ALLEN, D.; BASU, A.; BAXENDALE, J.; BLICK, L.; CAMINHA, M.; CARNES-STINE, J.; CAULK, P.; CHIANG, Y. H.; COYNE, M.; DAHLKE, C.; MAYS, A.; DOMBROSKI, M.; DONNELLY, M.; ELY, D.; ESPARHAM, S.; FOSLER, C.; GIRE, H.; GLANOWSKI, S.; GLASSER, K.; GLODEK, A.; GOROKHOV, M.; GRAHAM, K.; GROPMAN, B.; HARRIS, M.; HEIL, J.; HENDERSON, S.; HOOVER, J.; JENNINGS, D.; JORDAN, C.; JORDAN, J.; KASHA, J.; KAGAN, L.; KRAFT, C.; LEVITSKY, A.; LEWIS, M.; LIU, X.; LOPEZ, J.; MA, D.; MAJOROS, W.; MCDANIEL, J.; MURPHY, S.; NEWMAN, M.; NGUYEN, T.; NGUYEN, N.; NODELL, M.; PAN, S.; PECK, J.; PETERSON, M.; ROWE, W.; SANDERS, R.; SCOTT, J.; SIMPSON, M.; SMITH, T.; SPRAGUE, A.; STOCKWELL, T.; TURNER, R.; VENTER, E.; WANG, M.; WEN, M.; WU, D.; WU, M.; XIA, A.; ZANDIEH, A.; ZHU, X. The sequence of the human genome. **Science,** v. 291, n. 5507, p. 1304-51. 2001.

WALKER, D. L.; DAVIS, M. Anxiogenic effects of high illumination levels assessed with the acoustic startle response in rats. **Biological Psychiatry,** v. 42, n. 6, p. 461-471. 1997.

WATERSTON, R. H.; LINDBLAD-TOH, K.; BIRNEY, E.; ROGERS, J.; ABRIL, J. F.; AGARWAL, P.; AGARWALA, R.; AINSCOUGH, R.; ALEXANDERSSON, M.; AN, P.; ANTONARAKIS, S. E.; ATTWOOD, J.; BAERTSCH, R.; BAILEY, J.; BARLOW, K.; BECK, S.; BERRY, E.; BIRREN, B.; BLOOM, T.; BORK, P.; BOTCHERBY, M.; BRAY, N.; BRENT, M. R.; BROWN, D. G.; BROWN, S. D.; BULT, C.; BURTON, J.; BUTLER, J.; CAMPBELL, R. D.; CARNINCI, P.; CAWLEY, S.; CHIAROMONTE, F.; CHINWALLA, A. T.; CHURCH, D. M.; CLAMP, M.; CLEE, C.; COLLINS, F. S.; COOK, L. L.; COPLEY, R. R.; COULSON, A.; COURONNE, O.; CUFF, J.; CURWEN, V.; CUTTS, T.; DALY, M.; DAVID, R.; DAVIES, J.; DELEHAUNTY, K. D.; DERI, J.; DERMITZAKIS, E. T.; DEWEY, C.; DICKENS, N. J.; DIEKHANS, M.; DODGE, S.; DUBCHAK, I.; DUNN, D. M.; EDDY, S. R.; ELNITSKI, L.; EMES, R. D.; ESWARA, P.; EYRAS, E.; FELSENFELD, A.; FEWELL, G. A.; FLICEK, P.; FOLEY, K.; FRANKEL, W. N.; FULTON, L. A.; FULTON, R. S.; FUREY, T. S.; GAGE, D.; GIBBS, R. A.; GLUSMAN, G.; GNERRE, S.; GOLDMAN, N.; GOODSTADT, L.; GRAFHAM, D.; GRAVES, T. A.; GREEN, E. D.; GREGORY, S.; GUIGO, R.; GUYER, M.; HARDISON, R. C.; HAUSSLER, D.; HAYASHIZAKI, Y.; HILLIER, L. W.; HINRICHS, A.; HLAVINA, W.; HOLZER, T.; HSU, F.; HUA, A.; HUBBARD, T.; HUNT, A.; JACKSON, I.; JAFFE, D. B.; JOHNSON, L. S.; JONES, M.; JONES, T. A.; JOY, A.; KAMAL, M.; KARLSSON, E. K.; KAROLCHIK, D.; KASPRZYK, A.; KAWAI, J.; KEIBLER, E.; KELLS, C.; KENT, W. J.; KIRBY, A.; KOLBE, D. L.; KORF, I.; KUCHERLAPATI, R. S.; KULBOKAS, E. J.; KULP, D.; LANDERS, T.; LEGER, J. P.; LEONARD, S.; LETUNIC, I.;

LEVINE, R.; LI, J.; LI, M.; LLOYD, C.; LUCAS, S.; MA, B.; MAGLOTT, D. R.; MARDIS, E. R.; MATTHEWS, L.; MAUCELI, E.; MAYER, J. H.; MCCARTHY, M.; MCCOMBIE, W. R.; MCLAREN, S.; MCLAY, K.; MCPHERSON, J. D.; MELDRIM, J.; MEREDITH, B.; MESIROV, J. P.; MILLER, W.; MINER, T. L.; MONGIN, E.; MONTGOMERY, K. T.; MORGAN, M.; MOTT, R.; MULLIKIN, J. C.; MUZNY, D. M.; NASH, W. E.; NELSON, J. O.; NHAN, M. N.; NICOL, R.; NING, Z.; NUSBAUM, C.; O'CONNOR, M. J.; OKAZAKI, Y.; OLIVER, K.; OVERTON-LARTY, E.; PACHTER, L.; PARRA, G.; PEPIN, K. H.; PETERSON, J.; PEVZNER, P.; PLUMB, R.; POHL, C. S.; POLIAKOV, A.; PONCE, T. C.; PONTING, C. P.; POTTER, S.; QUAIL, M.; REYMOND, A.; ROE, B. A.; ROSKIN, K. M.; RUBIN, E. M.; RUST, A. G.; SANTOS, R.; SAPOJNIKOV, V.; SCHULTZ, B.; SCHULTZ, J.; SCHWARTZ, M. S.; SCHWARTZ, S.; SCOTT, C.; SEAMAN, S.; SEARLE, S.; SHARPE, T.; SHERIDAN, A.; SHOWNKEEN, R.; SIMS, S.; SINGER, J. B.; SLATER, G.; SMIT, A.; SMITH, D. R.; SPENCER, B.; STABENAU, A.; STANGE-THOMANN, N.; SUGNET, C.; SUYAMA, M.; TESLER, G.; THOMPSON, J.; TORRENTS, D.; TREVASKIS, E.; TROMP, J.; UCLA, C.; URETA-VIDAL, A.; VINSON, J. P.; VON NIEDERHAUSERN, A. C.; WADE, C. M.; WALL, M.; WEBER, R. J.; WEISS, R. B.; WENDL, M. C.; WEST, A. P.; WETTERSTRAND, K.; WHEELER, R.; WHELAN, S.; WIERZBOWSKI, J.; WILLEY, D.; WILLIAMS, S.; WILSON, R. K.; WINTER, E.; WORLEY, K. C.; WYMAN, D.; YANG, S.; YANG, S. P.; ZDOBNOV, E. M.; ZODY, M. C.; LANDER, E. S. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. **Nature,** v. 420, n. 6915, p. 520-562. 2002.

WELLS, A. M.; JANES, A. C.; LIU, X.; DESCHEPPER, C. F.; KAUFMAN, M. J.; KANTAK, K. M. Medial temporal lobe functioning and structure in the spontaneously hypertensive rat: comparison with Wistar-Kyoto normotensive and Wistar-Kyoto hypertensive strains. **Hippocampus,** v. 20, n. 6, p. 787-797. 2010.

WINTERS, B. D.; SAKSIDA, L. M.; BUSSEY, T. J. Object recognition memory: neurobiological mechanisms of encoding, consolidation and retrieval. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews,** v. 32, n. 5, p. 1055-1070. 2008.