



Universidade de Brasília
Instituto de Biologia

EFEITOS COMPORTAMENTAIS DA IPSAPIRONA EM RATOS SELECIONADOS PARA ALTOS E BAIXOS ÍNDICES DE CONGELAMENTO CONDICIONADO

Marcelo de Faria Salviano

Brasília, DF
- 2008 -



Universidade de Brasília
Instituto de Biologia

EFEITOS COMPORTAMENTAIS DA IPSAPIRONA EM RATOS SELECIONADOS PARA ALTOS E BAIXOS ÍNDICES DE CONGELAMENTO CONDICIONADO

Marcelo de Faria Salviano

Orientadora: Profa. Dra. Marília Barros

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade de Brasília, como requisito parcial para
obtenção do Título de Mestre em Biologia Animal.

Brasília, DF
- 2008 -

Dedico este trabalho a meus pais, Antônio e Olívia,
pela educação, apoio, amor e incentivo incondicionais.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra. Marília Barros, pelos ensinamentos, competência, dedicação, paciência e por ser um exemplo de pesquisadora.

Ao meu co-orientador Dr. Antonio Pedro de Mello Cruz, por seus ensinamentos, dedicação e ajuda na elaboração e desenvolvimento desse trabalho; e ainda pela orientação da minha formação pessoal.

Ao prof. Dr. Jesus Landeira Fernandez, Vitor Castro e Alex da PUC-RJ, pelo fornecimento dos ratos e apoio no desenvolvimento do trabalho.

À amiga e “pseudo”-orientadora Graziela Ferreira, pelo incentivo, apoio, dedicação, companheirismo, descontração e por ser minha “psicóloga particular”.

Aos colegas que apoiaram e ajudaram no desenvolvimento do trabalho, Grazi, Gabriela, Anderson, Kaliu, Juliano, Juliana e Cintia.

À UnB e aos professores do Instituto de Biologia e de Psicologia, pelos seus ensinamentos, orientações e “cobranças” desde a graduação.

Ao laboratório de Psicobiologia, ao Biotério da Faculdade de Ciências da Saúde e ao laboratório de Farmacologia Molecular, pelo suporte à pesquisa e cuidado com os animais.

À minha família, pelo constante apoio, incentivo e amor.

Aos meus amigos, pelas momentos de descontração, companheirismo, carinho, incentivo e ajuda nas horas certas.

Aos meus ratinhos, pela colaboração essencial ao trabalho.

Lista de Abreviações.....	VI
Resumo.....	VIII
Abstract.....	IX
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Neuroanatomia e fisiologia do medo/ansiedade.....	3
1.2. Modelos animais de medo/ansiedade.....	7
1.2.1. Modelos baseados em aprendizagem.....	9
1.2.2. Modelos etologicamente fundamentados.....	10
1.2.3. Modelos genéticos do comportamento.....	13
1.2.3.1. Linhagens com altos e baixos padrões de congelamento.....	16
1.3. Serotonina e ansiedade.....	17
1.4. Relevância do estudo.....	20
2. OBJETIVOS.....	22
3. MÉTODOS.....	24
3.1. Aspectos Éticos.....	255
3.2. Sujeitos.....	25
3.3. Equipamentos.....	26
3.3.1. Labirinto em Cruz Elevado.....	26
3.3.2. Caixa de Condicionamento da Resposta de Congelamento (CRC).....	27
3.4. Droga.....	29
3.5. Procedimento Experimental.....	29
3.5.1. Experimento 1.....	29
3.5.2. Experimento 2.....	31
3.6. Análise Comportamental.....	32
3.6.1. Labirinto em Cruz Elevado.....	32
3.6.2. Condicionamento da Resposta de Congelamento.....	33
3.7. Análise Estatística.....	34

4. RESULTADOS.....	35
4.1. Experimento 1	36
4.1.1. Teste de Congelamento ao Contexto	36
4.1.2. Teste do Labirinto em Cruz Elevado.....	38
4.2. Experimento 2.....	42
4.2.1. Teste de Condicionamento ao Contexto.....	42
4.2.2. Teste do Labirinto em Cruz Elevado.....	44
5. DISCUSSÃO.....	49
5.1. Análise comportamental das linhagens CBC/CAC	50
5.2. Análise farmacológica nas linhagens CBC/CAC.....	55
6. CONCLUSÃO	59
7. REFERÊNCIAS	61
ANEXOS.....	

Lista de Abreviaturas

TAG: Transtorno da Ansiedade Generalizada

LCE: Labirinto em Cruz Elevado

5-HT: Serotonina

DSM: Manual de Diagnóstico e Estatística das Doenças Mentais

TOC: Transtorno Obsessivo-Compulsivo

MCP: Matéria Cinzenta Periaquedutal

SMA: eixo Simpático-Medular Adrenal

HPA: eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal

CRF: Fator de Liberação de Corticotropina

ACTH: Hormônio Adrenocorticotrópico

TA: Transtornos de Ansiedade

CRC: Condicionamento da Resposta de Congelamento

SHR: Spontaneously Hipertensive Rats

GABA: Ácido Gama-Aminobutírico

SNC: Sistema Nervoso Central

CAC: Carioca de Alto Congelamento

CBC: Carioca de Baixo Congelamento

S3: terceira geração da seleção genética/comportamental

S4: quarta geração da seleção genética/comportamental

EBA: Número de Entradas nos Braços Abertos

TBA: Tempo de Permanência nos Braços Abertos

EBF: Número de Entradas nos Braços Fechados

“O único homem que está isento de erros é aquele que não arrisca acertar.” – *Albert Einstein*

“Se você deseja um trabalho bem feito, escolha um homem ocupado; os outros não têm tempo.” – *Benjamin Franklin*

RESUMO

Modelos animais têm sido muito utilizados no estudo de mecanismos neuropsicológicos que envolvem os transtornos da ansiedade, assim como o efeito comportamental de novos compostos ansiolíticos. Porém, estudos de animais com diferentes níveis de ansiedade não têm sido muito utilizados. O presente estudo avaliou os efeitos comportamentais da administração sistêmica do ansiolítico serotoninérgico ipsapirona em ratos com altos, normais e baixos níveis de reações de defesa submetidos a dois diferentes testes de ansiedade: o labirinto em cruz elevado (LCE) e o teste de condicionamento da resposta de congelamento (CRC). Para isso, foram utilizados animais de duas gerações consecutivas de linhagens que vêm sendo selecionadas de acordo com sua resposta de congelamento no teste de CRC no laboratório de psicologia da PUC-RJ, denominados Carioca de Baixo Congelamento (CBC) e Carioca de Alto Congelamento (CAC). Os resultados do teste de CRC indicaram diferenças comportamentais entre os animais controle e as linhagens selecionadas geneticamente, onde a linhagem CAC mostrou níveis de ansiedade mais elevados. Tais resultados não se repetiram no LCE, apesar de ter sido identificada uma tendência para tal. A ipsapirona administrada agudamente teve efeito ansiogênico e mais significativo na linhagem CBC. Adicionalmente, a resposta ao tratamento farmacológico foi significativamente influenciada pelo nível de ansiedade dos animais. Os resultados obtidos no presente trabalho indicam um possível efeito diferencial da droga sobre as linhagens desenvolvidas no teste de CRC, que pode estar relacionado ao nível de ansiedade específico dos ratos testados. Além disso, o uso de animais selecionados geneticamente pode ser uma importante ferramenta no desenvolvimento de novos compostos ansiolíticos/ansiogênicos.

Palavras-chave: ansiedade, serotonina, modelo genético, traço comportamental, ipsapirona

ABSTRACT

Animal models have been extensively employed to study the neuropsychological mechanisms underlying anxiety disorders, as well as the behavioral effects of putative/novel anxiolytics. However, little attention has been given to the use of animals with different anxiety-like traits. In the present study, male Wistar rats of two consecutive generations, selectively bred for either high or low anxiety-like behavior, were submitted to either a 5-HT_{1A}-receptor agonist ipsapirone (2,5mg/Kg; i.p.) or saline (i.p.) treatment and tested in the conditioned freezing procedure and in the elevated plus maze (EPM). The rat lines were developed according to their fear-induced context-conditioned freezing behavior at the PUC-RJ laboratory and were named *Carioca de Alto Congelamento* (CAC) and *Carioca de Baixo Congelamento* (CBC), with high and low levels of freezing, respectively. The animals reacted differently, according to the anxiety-like trait, in the conditioned freezing test, with a significant increase in freezing behavior in the CAC rats. Differences in the EPM test were not significant but followed the same trend as for the previous test: CAC animals showing higher levels of anxiety behaviors than CBC rats. Acute ipsapirone administration significantly increased anxious-like behavioral parameters, with a more accentuated response in the CBC rats. In addition, response to the drug treatment was found to be significantly influenced by the level of anxiety. Taken together, the present results indicate a possible differential effect of the drug on the different strains of rats in the conditioned freezing procedure, which may be related to the specific high/low anxiety-like trait in the animals tested. Furthermore, the use of selectively bred animals may provide a unique approach for screening novel anxiolytic/anxiogenic compounds.

Key-words: anxiety, serotonin, genetic model, trait, ipsapirone.

1. INTRODUÇÃO

Todo animal está sujeito a diversas ameaças e pressões do seu meio, seja por um possível predador ou por uma tarefa a ser cumprida a tempo. Para superar tais situações, seu organismo é capaz de se adaptar, resultando, por exemplo, em um estado emocional mais apropriado aos estímulos ambientais presentes. Entre as emoções mais evidenciadas frente a situações desta natureza destacam-se o medo e a ansiedade (Calabrese e cols, 2007). O primeiro ocorre principalmente quando a integridade física do indivíduo está sob risco iminente de um estímulo/situação definido, enquanto o segundo é caracterizado por um perigo potencial, não tão evidente ou não conscientemente percebido (LeDoux, 1998). Ambos parecem estar intimamente associados, estando inclusive o circuito neural do medo envolvido em alguns tipos de ansiedade (LeDoux, 1998).

O medo e a ansiedade são emoções normais que aumentam a chance de sobrevivência frente a diferentes tipos de estímulos estressógenos e, portanto, têm um valor adaptativo importante (Darwin, 1859; Nesse, 1999; Blanchard, 2003; Graeff e Hetem, 2004). Ademais, a ansiedade pode ser identificada sob dois aspectos gerais. O primeiro, denominado ansiedade-traço, refere-se à predisposição de um indivíduo para reagir com maior ou menor grau de ansiedade diante de uma situação potencialmente ameaçadora. O traço é determinado por fatores genéticos e ambientais (Graeff e Hetem, 2004). O segundo aspecto, denominado ansiedade-estado, está relacionado ao momento de vida do indivíduo, ou seja, um estado emocional transitório. Esse varia de acordo com um evento estressógeno (Lister, 1990).

Um grau moderado de ansiedade é considerado um facilitador para resolução de tarefas cognitivas (Diamond e cols., 1999; Nicholas e cols., 2006; Calabrese e cols., 2007). Porém, é uma resposta desconfortável e não-prazerosa que induz alterações comportamentais, psicofisiológicas e cognitivo-subjetivas (Calabrese e cols, 2007). Ademais, o grau de exigência a que estamos submetidos atualmente tem sido apontado como um dos principais fatores para o aparecimento de psicopatologias relacionadas ao excesso de medo ou ansiedade. Portanto, a ansiedade pode se tornar patológica no homem

em virtude de sua intensidade e/ou duração frente a um determinado estímulo/situação (Graeff, 1989; Sapolsky, 1993).

Com o intuito de se classificar os transtornos relacionados a deficiências mentais, foi criado em 1952 o *Manual de Diagnóstico e Estatística das Doenças Mentais* (DSM). Nele, a ansiedade aparece dentro da categoria de psiconeuroses, com os nomes “reação ansiosa”, “reação fóbica” e “reação obsessivo-compulsiva”. Em 1994, na última edição publicada (DSM-IV), foram definidos alguns transtornos de ansiedade, com base nos seus sintomas específicos, curso natural, história familiar e resposta diferenciada aos tratamentos farmacológicos disponíveis atualmente, tais como: Transtorno da Ansiedade Generalizada (TAG), Transtorno do Pânico e Transtorno Obsessivo-Compulsivo (TOC).

Assim, um melhor entendimento das alterações neurofisiológicas causadores de tais transtornos seria de grande valia para a saúde e bem estar dos indivíduos, incluindo-se aqui, os seres humanos.

1.1. Neuroanatomia e fisiologia do medo/ansiedade

O circuito neural envolvido no medo/ansiedade (normal e patológico) envolve, primeiramente, a percepção e integração das informações sensoriais advindas dos estímulos sinalizadores de perigo (inatos ou aprendidos). Durante e após o processamento sensorial, as informações resultantes são enviadas ao tálamo, que por sua vez projeta para a amígdala. Esta última pode ocorrer por dois caminhos distintos; uma via direta (tálamo-amígdala) e uma indireta fazendo interface com regiões corticais (tálamo-córtex-amígdala; Fig. 1). As informações, provenientes da primeira via, chegam aos núcleos laterais da amígdala que organizam uma série de reações fisiológicas e comportamentais para a defesa do organismo. As informações vindas da via tálamo-córtex-amígdala, são enviadas pelo tálamo para o córtex cerebral, o qual, após análise mais refinada das informações de perigo, projeta para a amígdala, uma importante estrutura relacionada ao processamento de aspectos mnemônicos e emotivos (Fanselow e LeDoux, 1999).

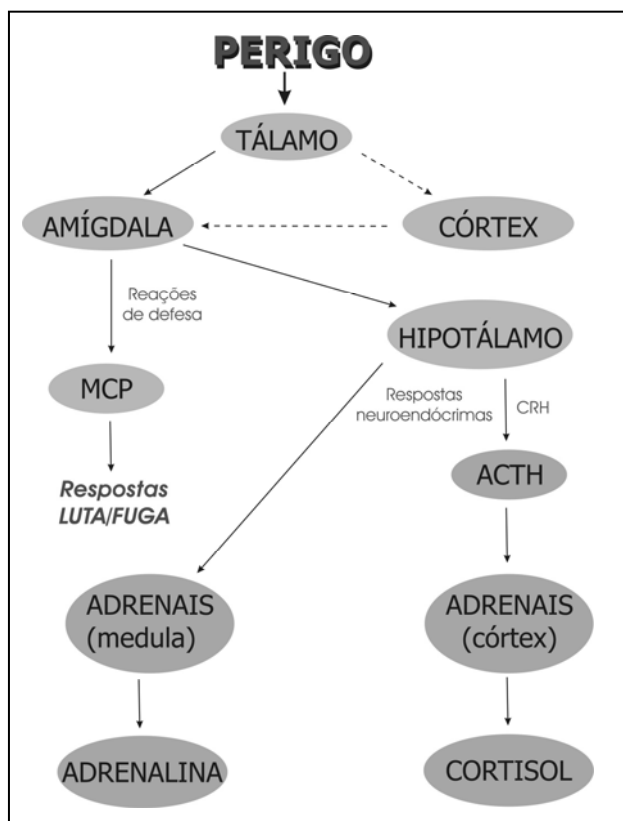


Fig. 1. Circuito de ativação neuroendócrina frente a um estímulo aversivo. (Baseado em Fanselow e LeDoux, 1999).

A amígdala, por sua vez, emite um comando para duas outras estruturas, a matéria cinzenta periaquedutal (MCP) e o hipotálamo (Kim e Gorman, 2005). A MCP é responsável, dentre outros aspectos, pela deflagração dos principais componentes comportamentais do padrão de luta/fuga. Já o hipotálamo comanda diversas reações neuroendócrinas. Uma destas é regulada pela sua porção lateral, que envia impulsos nervosos, através da medula espinhal, para a porção medular das glândulas supra-renais para liberação de adrenalina (eixo simpático-medular adrenal; SMA). Através do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), entra em cena um segundo padrão de reação fisiológica. O hipotálamo paraventricular comanda o fator de liberação de corticotropina (CRF, do inglês *corticotropin-releasing factor*) que, através de uma atuação na hipófise, faz com que a glândula libere na corrente sanguínea o hormônio adrenocorticotrópico (ACTH). O ACTH atuará, por sua vez, na porção cortical das glândulas supra-renais ordenando que essa libere glicocorticóides, em especial o cortisol (Korte, 2001). A dosagem de cortisol no sangue de humanos ou

corticosterona em roedores pode, portanto, ser utilizada como uma medida do grau de ativação do eixo HPA e, possivelmente, do nível de medo e ansiedade em animais (Andersen e cols., 2004; Kim e Gorman, 2005).

Após a resposta de defesa, o animal precisa consolidar em sua memória características como cheiro, cor, aparência, localização e som do predador ou do contexto aversivo. O cortisol, além de ajudar no restabelecimento da homeostase corporal, age como efeito consolidador e potencializador do medo (Korte, 2001). Assim, o animal aumenta significativamente suas chances de sobrevivência caso se depare novamente com aquele agente aversivo.

Estudos por estimulações elétricas diretamente no encéfalo, vêm confirmando a ação de várias áreas neurais como responsáveis pela deflagração de comportamentos de defesa. Hess e Brugger (1943), por exemplo, estimularam o hipotálamo de gatos e observaram que esses manifestaram comportamentos de defesa, acompanhados de respostas autonômicas. Além das estruturas já mencionadas, os colículos superiores e inferiores também vêm sendo considerados constituintes desse “sistema” que ativa as respostas de fuga/luta. Portanto, o teto mesencefálico – constituído por amígdala, MCP e colículos superiores e inferiores – juntamente com o hipotálamo têm sido tradicionalmente agrupados como o “sistema cerebral aversivo” (LeDoux e cols., 1986; Graeff, 1990, 1997; Brandão e cols. 2003).

A estimulação elétrica dessas estruturas culmina em respostas, inatas ou aprendidas, de forma similar àquela apresentada quando o sujeito percebe estímulos aversivos naturais. Tais respostas preparam o organismo para enfrentar ou escapar do perigo, uma vez que produzem estado de alerta, congelamento e, finalmente, reações de fuga. Muito interessante é o fato da estimulação elétrica produzir as mesmas respostas e, ainda, proporcionais à intensidade aplicada (Brandão et al., 1997). A MCP, mais especificamente, provavelmente está intimamente relacionada ao comportamento de congelamento (*freezing*), devido à sua implicação com transtornos de pânico (Jenck et al., 1983, 1995).

Quando o “sistema cerebral aversivo”, ou mais especificamente o teto mesencefálico, é super-estimulado, o sujeito é levado a experimentar estados de apreensão como medo ou ansiedade. No entanto, se o estímulo – natural ou induzido – for mantido de forma crônica, é esperado que seja induzido um estresse no organismo, juntamente com todos os eventos neuro-humorais que caracterizam tal condição (Gunnar e Quevedo, 2007). Além disso, o estresse e estímulos aversivos inescapáveis são considerados as principais causas de certos tipos de depressão, transtornos de ansiedade (como TOC ou TAG) e ainda déficits cognitivos e do sistema imune (Brandão e cols., 2003; Fig. 2).

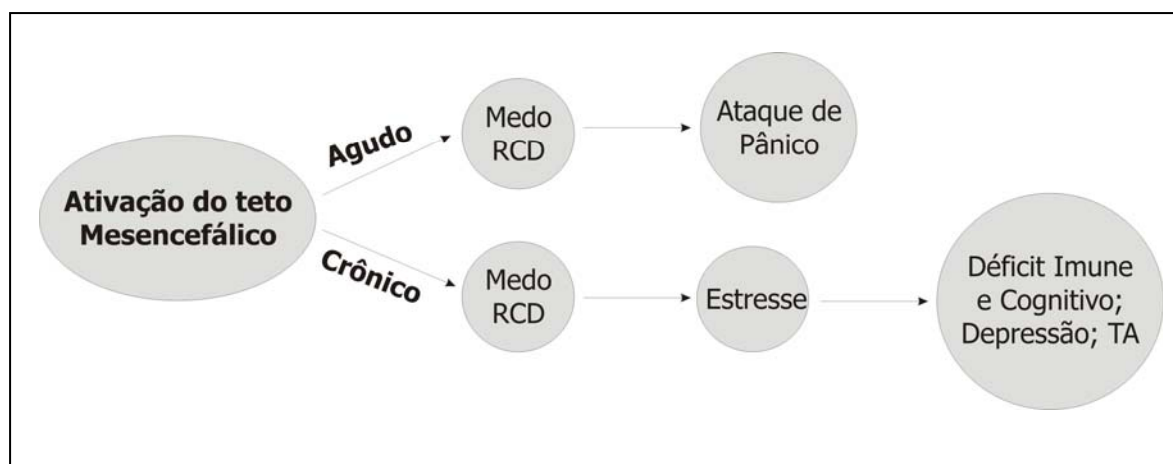


Fig. 2. Esquema hipotético do envolvimento do teto mesencefálico no medo. RCD = repertório comportamental de defesa; TA = Transtornos de Ansiedade. (Fonte: Adaptado de Brandão e cols., 2003).

Apesar das respostas de luta/fuga serem mais extensivamente estudadas, sabe-se que existem outras respostas também relacionadas à defesa. Tais padrões estão, possivelmente, relacionados à distância e às evidências concretas do perigo (Blanchard e cols., 2001). Em ratos, os comportamentos defensivos consistem em fuga, esconder-se, congelamento, ameaça defensiva (p.ex. vocalização), ataque defensivo e avaliação de risco (*risk assessment*). Os estímulos ativadores das respostas de defesa são complexos, mas relativamente claros. Um estímulo concreto/alcançável evoca a fuga do animal, quando esse possui uma via de escape, ou o animal se esconde se houver um local apropriadamente seguro, ou ainda permanece imóvel (*freezing*), se nenhuma dessas

alternativas estiverem presentes. Se o estímulo se aproximar e encostar no animal, ele reagirá com comportamentos de ameaça defensiva e, então com ataque defensivo (Vianna e cols., 2001; Blanchard e cols., 2003).

Os estímulos aversivos podem ainda provocar comportamentos de avaliação do risco, que são claramente identificáveis. Tais comportamentos permitem que o animal investigue a fonte ameaçadora de forma a minimizar a probabilidade de ser detectado pela ameaça (Cruz e cols., 1994; Blanchard e Griebel, 2003).

Os comportamentos de defesa descritos, além de outros descritos mais adiante, são comumente utilizados como parâmetros indicativos de medo/ansiedade. Como o presente trabalho visa averiguar o nível de medo/ansiedade dos animais testados, sempre que descrito, este nível será referente aos comportamentos de defesa identificados no teste empregado.

Apesar de vários aspectos neuroanatômicos e neurofisiológicos já terem sido elucidados, diferentes aspectos ainda precisam ser esclarecidos. Com o intuito de ampliar nosso conhecimento acerca das bases biológicas das emoções – normais e patológicas – diferentes testes/modelos experimentais têm sido desenvolvidos em animais. Ao se considerar os aspectos evolutivos acima citados relacionados à emocionalidade, pode-se deduzir que importantes informações podem ser obtidas a partir de estudos realizados em animais. Em termos de medo e ansiedade, passe-se agora a apresentar diversos modelos animais empregados com esta finalidade.

1.2. Modelos animais de medo/ansiedade

O controle das emoções traz vantagens evolutivas, especialmente em animais sociais, como os mamíferos. Aparentemente, os animais mais complexos foram selecionados segundo o mesmo padrão de respostas de defesa, uma vez que tais padrões aumentam significativamente as chances de sobrevivência do animal (Darwin, 1859). Isto pode

significar que eles apresentam mecanismos emocionais semelhantes (Darwin, 1872; Nesse, 1999).

O estudo das emoções em humanos demonstra diversos desafios importantes. Primeiramente, é necessário considerar as dificuldades de se definir e medir quantitativamente uma determinada emoção (Ramos e Mormede, 2007). Além disso, estudos realizados em humanos apresentam uma série de restrições éticas e metodológicas (Lassalle, 2007), assim como precisam isolar e analisar os diversos fatores relacionados à causa e efeito das mesmas. Tais aspectos muitas vezes implicam na realização de muitos experimentos. Por isso, busca-se modelos animais que possam substituir o homem como objeto de estudo. Estes permitem uma maior abrangência no sentido de se esclarecer mecanismos neurofisiológicos relacionados ao comportamento, minimizando as restrições acima citadas associadas aos estudos em humanos (Lassalle, 2007).

Para que um modelo animal seja validado, ele deve ser avaliado de acordo com os critérios de semelhança, previsibilidade da resposta farmacológica e homologia (Treit e cols., 1993; Blanchard e cols., 2001). A semelhança diz respeito ao grau de similaridade fenomenológica entre a ansiedade humana e o comportamento definido operacionalmente no modelo como ansiedade, enquanto a previsibilidade da resposta farmacológica visa estabelecer correlações entre os efeitos de uma mesma droga na clínica e no modelo animal. Desta forma, se um tratamento farmacológico demonstra efeito ansiolítico ou ansiogênico de um dado composto no modelo animal, este deve induzir os mesmos efeitos na clínica, e vice-versa. Finalmente, a homologia pressupõe que as mesmas variáveis psicobiológicas envolvidas na etiologia e tratamento da ansiedade em humanos atuem também no modelo animal.

Os modelos experimentais empregados no estudo do medo e ansiedade podem ser, essencialmente, classificados em dois tipos: os testes baseados na etologia e os baseados na aprendizagem, que serão discutidos a seguir.

1.2.1. Modelos baseados em aprendizagem

Os modelos animais que visam o estudo da ansiedade baseados em aprendizagem mais utilizados atualmente são: testes de conflito (Geller e Seifter, 1960), resposta de sobressalto intensificada pelo medo (Davis, 1986; Menard e Treit, 1999) e postura de congelamento em ratos (Fanselow, 1990; Cruz, Bueno e Graeff, 1993). Este último foi um dos modelos utilizados no presente trabalho.

Baseado nos comportamentos de resposta dos animais a estímulos aversivos foi desenvolvido na década de 70 o modelo de Condicionamento da Resposta de Congelamento (CRC) (Bouton e Bolles, 1980). Este é uma forma de condicionamento pavloviano onde os animais são treinados a associar um estímulo neutro (p.ex. um som, uma luz ou um determinado contexto ambiental) a um estímulo aversivo (p.ex. um choque elétrico). Depois que essa associação é formada, o animal passa a apresentar reações de medo diante do estímulo condicionado aversivo. A associação aversiva pode ser conseguida com apenas uma única sessão e permanecer por muito tempo.

A resposta de congelamento é altamente adaptativa, pois movimentos tornam o animal mais detectável por seus predadores e porque predadores costumam atacar preferencialmente presas móveis ao invés de imóveis (para revisão, ver Fendt e Fanselow, 1999).

Uma contribuição atual dos modelos animais é o fato deles se mostrarem muito eficientes quanto à ação de drogas psicotrópicas. Os animais experimentais são ferramentas vivas primordiais para o desenvolvimento de novos medicamentos mais eficazes e com menos efeitos colaterais (Graeff, 1999). Sendo assim, as primeiras análises farmacológicas mostraram que modelos de conflito tinham maior valor preditivo que os de supressão condicionada (Zangrossi e Graeff, 2004). Entretanto, os testes de conflito foram pouco eficazes para detectar os efeitos ansiolíticos de drogas que atuam primariamente sobre a neurotransmissão serotoninérgica. Tais estudos reforçaram o uso de modelos

etológicos, uma vez que esses se mostraram mais eficientes para fins farmacológicos (Cruz e cols., 1997).

1.2.2. Modelos etologicamente fundamentados

Por volta da década de 30, começou a ser considerada a necessidade de se estudar a ansiedade experimental, sem que houvesse necessidade de treino prévio ou condicionamento do comportamento do animal (File e Hyde, 1978). Surgiram, assim, os modelos de ansiedade etologicamente fundamentados.

Esses tipos de modelos visam a manipulação direta das respostas de defesa espécie-específicas, interferindo minimamente em outros mecanismos psicobiológicos, como memória, dor e atenção (Cruz e cols., 1997; Ferreira, 2005). Neste caso, os estímulos manipulados experimentalmente fazem parte da ecologia do animal e induzem estados de ansiedade de maneira inata. Para ratos, por exemplo, o odor ou o som de um felino são estímulos que sinalizam a presença potencial deste felino, desencadeando reações fisiológicas e comportamentais de defesa (Blanchard e Blanchard, 1998; Blanchard e cols., 1993)

Um dos primeiros modelos animais de ansiedade utilizados nesse sentido foi o teste de interação social, validado na década de 70 por File e Hyde (1978). Esse consistiu na utilização de uma forma natural do comportamento de ratos, a interação social, como medida dependente. Era medido o tempo de interação social (cheirar, seguir ou catar o parceiro) entre um par de ratos machos. Tais procedimentos tinham algumas vantagens em relação aos modelos de aprendizagem, uma vez que dispensavam a privação de comida ou água, aplicação de choques elétricos ou de treinamentos prévios extensos.

Atualmente, existem diversos modelos animais etologicamente fundamentados sendo extensivamente utilizados (para uma revisão, ver Cruz e cols., 1997), incluindo transição claro/escuro, vocalização ultrasônica, interação presa-predador, campo aberto e o labirinto em cruz elevado (Pellow e cols., 1985; Blanchard e cols., 1990a; Blanchard e cols.,

1993; Cruz e cols., 1997; Rodgers e cols., 1997). Vale ressaltar que este último foi utilizado no presente trabalho e portanto será descrito a seguir com mais detalhes.

O Labirinto em Cruz Elevado (LCE) foi desenvolvido por Handley e Mithani (1984) e validado farmacológica, fisiológica e comportamentalmente por Pellow, Chopin, File e Briley (1985). O LCE é um modelo animal etologicamente baseado no medo natural de roedores a espaços abertos e a alturas. Pela sua simplicidade, validade ecológica e sensibilidade bidirecional (utilizado para drogas ansiolíticas e ansiogênicas), esse modelo apresenta inúmeras vantagens no estudo da ansiedade (Pellow e cols., 1985; Cruz e cols., 1997). Por exemplo, este é um ótimo modelo para o desenvolvimento de novas drogas ansiolíticas e ansiogênicas, não requer treinamento dos animais – o que encurta o tempo do experimento – e possui um baixo custo experimental.

A exposição ao LCE consiste em colocar ratos na encruzilhada de quatro braços (dois abertos, e dois fechados), dispostos perpendicularmente uns aos outros e elevados 50 cm em relação ao solo. Quando ratos são expostos a essa situação experimental, tendem a evitar os braços abertos, permanecendo mais tempo nos braços fechados. Vale ressaltar que o espaço aberto é, mais do que a altura e a novidade do ambiente, a principal causa do comportamento de defesa, que poderia ser denominado como medo (Treit e cols., 1993). Além disso, nos braços abertos o animal está impossibilitado de realizar comportamento de tigmotaxia, outro fator aversivo (Moreira, 2001).

O comportamento de defesa do animal no modelo do LCE é computado a partir de índices tradicionais de exploração: número de entradas e tempo de permanência nos braços abertos. Para estudos com drogas que atuam sobre o complexo de receptores GABA-benzodiazepínicos essas medidas têm apresentado grande poder de previsibilidade farmacológica. Contudo, alguns resultados inconsistentes vêm sendo descritos com o uso dessas medidas para drogas ansiolíticas mais seletivas, que atuam sobre receptores serotoninérgicos. Neste contexto, alguns estudos utilizando administração de agonistas de receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A} apresentaram efeitos ansiolíticos (Almeida e cols., 1991; File e Gonzalez, 1996), ansiogênicos (Critchley e Handley, 1987a; Moser, 1989; Motta e

cols., 1992), ou até mesmo ausência de efeitos (Pellow e cols., 1987; File e Andrews, 1991; Artai e cols., 1995; Gonzalez e cols., 1996).

Outras medidas comportamentais de ansiedade, além dos índices convencionais de comportamento de defesa anteriormente descritos, vêm sendo investigadas no LCE. Alguns padrões de comportamento de avaliação de risco (*risk assessment*) têm se mostrado mais sensíveis do que as categorias clássicas da simples avaliação da exploração, particularmente no que se refere aos resultados do esperado efeito ansiolítico de agonistas 5-HT_{1A} (Cole e Rodgers, 1994; Cao e Rodgers, 1997; Griebel e cols., 1997). Cruz, Frei e Graeff (1994), utilizando uma análise etofarmacológica do comportamento de ratos no LCE, categorizaram outras medidas etológicas de comportamentos que eram alteradas em sentidos opostos por drogas ansiolíticas (nitrazepam e midazolam) e ansiogênicas (pentilenotetrazol e FG-7142). Assim, diversos estudos passaram a utilizar, além das medidas clássicas, também as denominadas medidas etológicas para mensurar comportamentos de defesa (que estão correlacionados com a ansiedade) em animais expostos ao modelo do LCE. Essas consistiam nos comportamentos de espreitar, esquadrihar e exploração das extremidades dos braços abertos. O primeiro, interpretado como um comportamento indicativo de maior ansiedade, consiste na saída parcial do animal dos braços fechados, colocando a cabeça e as patas dianteiras na plataforma central ou nas entradas dos braços abertos, freqüentemente acompanhado de um estiramento do corpo. Os demais são interpretados como um indicativo de menor ansiedade, onde esquadrihar é considerado quando o animal coloca a cabeça em direção ao precipício do braço aberto, olhando em qualquer direção.

Vale ressaltar que a maioria dos testes comportamentais mencionados avalia a ansiedade-estado dos animais, ou seja, como eles enfrentam uma situação aversiva em um dado momento. Portanto, não correspondem necessariamente a transtornos de ansiedade humanos, que são caracterizados por um estado crônico de ansiedade. Tais deficiências estariam mais fortemente relacionadas a distúrbios na ansiedade-traço desses indivíduos. A fim de aprimorar o teor seletivo dos modelos animais utilizados frente ao seu valor de face e

predição, têm-se buscado o estudo do comportamento em ratos selecionados ao longo das gerações para expressarem mais ou menos uma determinada característica, a exemplo de animais mais ou menos ansiosos. Assim, tais testes avaliam a ansiedade-traço dos animais experimentais (para revisão, ver Ramos e Mormede, 1998; Staay, 2006).

1.2.3. Modelos genéticos do comportamento

Nos últimos 50 anos, foram desenvolvidos diversos modelos animais de ansiedade, cuja utilidade para o desenvolvimento de novos compostos ansiolíticos e para a compreensão das bases psicobiológicas da ansiedade é indiscutível (Blanchard e cols., 2003). Contudo, de uma maneira geral, esses modelos apresentam uma limitação muito importante ao manipularem, na verdade, reações de defesa plenamente adaptativas de um organismo frente a uma ameaça em potencial (Cruz e cols., 1997). Qualquer indivíduo está sujeito a diferentes níveis de medo/ansiedade, podendo se comportar de forma diferenciada a algum tipo de teste ou modelo. Por exemplo, qual a patologia relacionada ao comportamento de um rato ao evitar os braços abertos de um labirinto em cruz elevado (supostamente um ambiente aversivo) ou ao exibir a postura de congelamento em um contexto potencialmente ameaçador (choques elétricos)? Baseados nestas perguntas que permanecem sem resposta, alguns pesquisadores têm até mesmo questionado o uso destes modelos como fontes de acesso às bases psicobiológicas da ansiedade patológica.

Na busca de um modelo que solucionasse parte desse problema, vem sendo desenvolvidas linhagens de diferentes roedores com níveis altos ou baixos de medo/ansiedade, avaliados em diversos testes animais de ansiedade, incluindo o LCE (p.ex., Liebsch e cols., 1998a; Conti e cols., 2004), o campo aberto (p.ex. Ramos e cols., 2003) e o medo condicionado (Ponder e cols., 2007a). Vale ressaltar que um modelo animal representa ou corresponde a um comportamento análogo em humanos, enquanto que o teste avalia tal comportamento. O teste se refere ao processo no qual as observações são coletadas (Staay, 2006).

Outro fator abordado por esse tipo de procedimento é a análise dos fatores genéticos sobre o comportamento dos animais. A maioria dos testes comportamentais avalia a ansiedade-estado dos animais, ou seja, como eles enfrentam uma situação aversiva em um dado momento. O estudo de animais com diferentes níveis de ansiedade, por meio do uso de linhagens com altos e baixos índices de reações de defesa, fornece dados mais fiéis sobre a interação gene-ambiente e pode explicar as diferenças encontradas em pacientes que apresentam respostas fisiológicas e comportamentais diferenciadas, mesmo se tratando de um mesmo tratamento farmacológico ou psicológico (Mormède e Ramos, 1999).

Nos últimos anos vem-se estudando a influência dos genes sobre o comportamento dos animais, principalmente a partir da publicação do livro “Origem das Espécies” de Charles Darwin (1859). Nele encontram-se diversos argumentos que fundamentam as principais idéias evolutivas aceitas atualmente. Dentre elas, a importância das variações individuais que são transmitidas hereditariamente e como estas contribuem para a sobrevivência e sucesso reprodutivo do indivíduo.

Desde então, diversos modelos animais com nematelmintos, moscas-da-fruta, cachorros domésticos e ratos, têm sido utilizados na tentativa de explicar (1) as variações genéticas envolvidas no processo cognitivo, na personalidade, psicopatologias, e adicção; e (2) as causas que levam a essas diferenças. Com isso, será possível desvencilhar as causas genéticas das causas ambientais como fatores de variação do comportamento, e ainda identificar com exatidão os genes responsáveis por isso (Maxson, 2007).

O meio ambiente influencia a expressão dos genes. Esses, por sua vez, influenciam o comportamento do indivíduo. Portanto, o fenótipo (incluindo o comportamento) se dá em função do genótipo, do ambiente e da relação gene-ambiente e gene-gene. A maioria dos fenótipos relacionados com os estudos cérebro-comportamento lidam com traços complexos, em que múltiplas variáveis interferem no resultado. Uma pessoa pode, por exemplo, ter um fenótipo fixo (herdado dos pais), porém expressar genótipos

momentaneamente ativos, resultado da ativação de genes em instantes particulares ao longo da vida (Jones, 2007).

Com o intuito de se produzir animais geneticamente selecionados, os ratos mostram-se como ótimos modelos por apresentarem um curto período de vida, uma vez que um grande número de gerações é necessário. Além disso, eles têm um alto potencial biótico, gerando uma grande prole em pouco tempo. Outra vantagem desses animais é o fato do seu genoma já ter sido completamente seqüenciado (fonte: <http://ratmap.gen.gu.se>), o que viabiliza estudos genéticos mais refinados (Lassalle, 2007). Um tipo de seleção que vem sendo praticada é através de endocruzamentos (irmão x irmã), e quando são obtidas 20 gerações de animais dessa forma, passam a ser chamados de uma linhagem isogênica (Lassalle, 2007). Atualmente, existem centenas de linhagens isogênicas de roedores obtidos segundo esse critério, sendo alguns deles extensivamente utilizados, como é o caso dos ratos Wistar Kyoto (WKY), Lewis (LEW), Fisher (FISH), dentre outros.

Muitos trabalhos vêm buscando explicações genéticas sobre o comportamento de animais. Ramos e cols. (1997), por exemplo, realizaram um estudo comparando a reatividade de ratos de diferentes linhagens frente a um ambiente aversivo (o braço aberto do LCE). Trabalhos como esses apontam para o fato de que fatores genéticos têm uma grande influência sobre as diferenças inter-individuais (Ramos e Mormede, 2007).

Tomando essa influência como verdadeira, pode-se supor que cruzamentos seletivos podem influenciar a característica de uma população. Assim, trabalhos como os realizados por Hendley e cols. (1983), Landgraf e Wigger (2002) e Ramos e cols. (2003) demonstraram claramente que cruzamentos seletivos, mantidos por várias gerações, criam populações com níveis comportamentais e neurofisiológicos diferenciados das linhagens de origem.

Ao se identificar diferenças comportamentais causadas pela seleção genética, deve-se averiguar, com cautela, se o traço selecionado é, de fato, responsável pela característica apontada, uma vez que uma informação gênica pode ser responsável por dois ou mais traços diferentes e vice-versa. Hendley e cols. (1983), em um estudo genético feito com

ratos, utilizaram linhagens de animais naturalmente hipertensos (SHR, do inglês *spontaneously hypertensive rats*) que, além de apresentarem pressão sanguínea elevada, também se mostravam comportamentalmente mais ativos quando expostos à ambientes novos ou familiares. Apesar de existirem muitas razões que justifiquem uma ligação gênica entre esses fenótipos (pressão sanguínea e atividade locomotora) (Tucker e Johnson, 1981), Hendley e Ohlsson (1991) mostraram que esses traços se segregavam independentemente, uma vez que foram capazes de produzir duas novas linhagens a partir das SHR: uma hipertensa mas normotativa (WKHT) e outra normotensa mas hiperativa (WKHA).

1.2.3.1. Linhagens com altos e baixos padrões de congelamento

Muitos modelos animais de ansiedade com roedores são altamente sensíveis a fatores ambientais, mas não têm associações claras quando comparados com humanos (Wahlste e cols., 2006). Por outro lado, o aprendizado ao medo e à ansiedade também é visto em humanos. Apesar de existirem correlações neuroanatômicas e farmacológicas dessas respostas, a influência genética ainda não foi totalmente elucidada. De fato, o medo aprendido parecer ser um fator hereditário tanto em roedores (Caldarone e cols., 1997) quanto em humanos (Hettema e cols., 2003). Além disso, a neuroanatomia envolvida em tal processo é similar nos dois organismos (LeDoux, 2000). Portanto, o uso do modelo de medo condicionado vem sendo utilizado com o intuito de produzir linhagens de ratos com níveis comportamentais diferentes, (Ponder e cols., 2007a).

Ao se utilizar tais modelos de aprendizagem ao medo para a produção de linhagens genética e comportamentalmente diferentes, é importante averiguar se os traços selecionados são realmente referentes a uma diferença no sistema de emoção do animal ou se é no processo de aprendizado em si. Surge, então, a necessidade de submeter a linhagem selecionada a outros modelos animais que visem esclarecer esse tipo de associação. Pode-se utilizar, para isso, modelos como o labirinto aquático de Morris, para

averiguar diferenças no processo de aprendizado, concomitantemente a testes de ansiedade, como o campo aberto, labirinto em zero elevado e o teste de transição claro/escuro (Ponder, 2007a) ou ainda o próprio LCE (Liebsch e cols., 1998b)

Conhecendo-se as estruturas neurais e a ocorrência/distribuição dos principais receptores no cérebro, é possível elaborar tratamentos que visem a ativação ou inibição de uma determinada via neural que se encontra desequilibrada. Esse pode ser por meio de lesões locais, estimulações com eletrodos ou mesmo com administração de fármacos que resultam em uma menor ou maior ativação dos estados de alerta, e ainda dos estados emotivos. O uso de fármacos tem sido a opção mais utilizada, pela sua praticidade, custo e reversibilidade.

1.3. Serotonina e ansiedade

Diversos neurotransmissores estão envolvidos na ansiedade, incluindo dopamina, noradrenalina, adrenalina, neuropeptídeos e aminoácidos como o ácido gama-aminobutírico (GABA). Além destes, a serotonina também tem sido implicada na modulação desta emoção.

A serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) é uma amina biogênica sintetizada a partir do aminoácido triptofano. No interior dos neurônios, este aminoácido é convertido em 5-hidroxitriptofano para, em seguida, formar a 5-HT. Uma vez liberada na fenda sináptica, pode se ligar a vários tipos e subtipos de receptores serotoninérgicos pré e pós-sinápticos, desencadeando, assim, seus efeitos. Apesar de projetar para inúmeras áreas neurais (principalmente amígdala, hipocampo e MCP), o sistema 5-HTérgico do SNC tem origem principalmente nos núcleos da rafe do mesencéfalo (Kapczinski e cols., 1998).

Até o presente momento, já foram identificados sete tipos distintos de receptores para a 5-HT (5-HT₁₋₇), sendo vários deles divididos em diferentes subtipos. Dentre todos os tipos/subtipos de receptores serotoninérgicos, o 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2C} e 5-HT₃ já foram demonstrados estarem diretamente envolvidos na ansiedade (para revisão vide Hoyer e

cols, 1994; Barnes e Sharp, 1999). Os receptores 5-HT_{1A}, especificamente, são encontrados em diversas áreas do sistema límbico, particularmente no hipocampo, septo lateral, hipotálamo, porção central da amígdala, e nos corpos celulares somatodendríticos dos núcleos da rafe. Estes últimos têm uma ação diferenciada dos demais, por ser do tipo auto-receptor (Boess e Martin, 1994; Cooper, 1996).

As primeiras observações sobre o envolvimento serotoninérgico na mediação de estados de ansiedade surgiram a partir de estudos com modelos animais, em especial com o teste de conflito (Robichaud e Sledge, 1969). Neste teste, ratos ou pombos foram colocados em uma caixa de condicionamento e modelados para uma determinada resposta (por exemplo, pressionar a barra ou bicar um disco), seguida de um reforço (água ou comida). Uma vez estabelecida a resposta, esta passa a ser, ao mesmo tempo, reforçada e punida (usualmente com choque elétrico aplicado nas patas). Nessa nova situação, a taxa de resposta declina. Robichaud e Sledge (1969) demonstraram que antagonistas da neurotransmissão serotoninérgica apresentavam efeito anti-conflito em ratos, assim como ansiolíticos benzodiazepínicos liberavam o comportamento punido, restaurando a taxa de resposta.

No ano seguinte, Graeff e Shoenfeld (1970) mostraram que os antagonistas serotoninérgicos metisergida e para-cloro-fenilalanina apresentavam efeitos anti-conflito em pombos, semelhantes aos observados com benzodiazepínicos. Portanto, drogas que reduzem a ação da 5-HT pareciam apresentar potencial ansiolítico. Este efeito, o qual curiosamente era mais marcante em pombos do que em ratos, era semelhante aos de ampla faixa de benzodiazepínicos nesse teste (p. ex., Graeff e Shoenfeld, 1970). A partir de então, muitos estudos replicaram esses resultados (para revisão ver Cruz, Zangrossi e Graeff, 1995).

Além disso, estudos neuroquímicos indicaram que os benzodiazepínicos diminuía a taxa de renovação de serotonina no encéfalo (p. ex., Wise e cols., 1972). Conjugando essas descobertas neuroquímicas com os estudos comportamentais que demonstravam efeito anti-conflito de drogas que antagonizavam a serotonina, Stein e cols. (1973)

propuseram a teoria serotoninérgica clássica da ansiedade. De acordo com ela, a serotonina teria efeito ansiogênico, e drogas ou manipulações experimentais que diminuíssem a ação desse neurotransmissor teriam efeito ansiolítico (Stein e cols., 1973).

A introdução na prática clínica da buspirona, o primeiro ansiolítico de ação seletiva sobre a neurotransmissão serotoninérgica, também corrobora esta hipótese (para revisão vide Ninan e cols., 1998). Dentre as drogas seletivas para receptores serotoninérgicos mais usadas estão a buspirona e a ipsapirona, agonistas parciais de receptores 5-HT_{1A}. A ativação desses auto-receptores pré-sinápticos por estes compostos diminui a quantidade de 5-HT em nível pós-sináptico. Desta forma, a ação ansiogênica da 5-HT parece ser minimizada sob o efeito dessas drogas, quando administradas de forma crônica (Fulton, 1997; Bond, 2003). A buspirona, por exemplo, tem se mostrado efetiva no tratamento do TAG, além de outros transtornos relacionados à depressão (Gorman, 2003).

Estudos subseqüentes mostraram, porém, que a modulação de estados de ansiedade depende da área cerebral em que a serotonina exerce seus efeitos (Menard e Treit, 1999). Considerando a alta complexidade do sistema serotoninérgico e as múltiplas vias e tipos/sub-tipos de seus receptores, é difícil atribuir um papel unitário à 5-HT na ansiedade. Por exemplo, resultados de experimentos utilizando a microinjeção de serotonina ou de agonistas serotoninérgicos diretamente na amígdala revelaram um aumento nos níveis de ansiedade em animais expostos a diferentes modelos animais (Menard e Treit, 1999), ao passo que a microinjeção destes compostos na MCP dorsal, ao contrário, promovia efeitos ansiolíticos (Gonzalez, Andrews e File, 1996). Tais efeitos paradoxais promovidos pela 5-HT no encéfalo é conhecido como a teoria da ação dual da 5-HT, proposta por Deakin e Graeff (1991).

A redução da função serotoninérgica, especialmente em áreas límbicas como a amígdala, córtex frontal e hipocampo, pode fundamentar as propriedades desinibitórias de certas drogas e deste modo ser consistente com a teoria de que a diminuição central da 5-HT reduz as respostas de ansiedade (Iversen, 1984). Em suporte a essa teoria, Higgins e cols. (1988) mostraram que os agonistas dos receptores 5-HT_{1A}, buspirona e ipsapirona,

microinjetadas no núcleo dorsal da rafe, aumentaram tanto a interação social, como a taxa de resposta no teste de conflito de Vogel, demonstrando o efeito ansiolítico provocado pela ativação dos receptores 5-HT_{1A} nesta região, com base no comportamento desinibido dos sujeitos tratados.

1.4. Relevância do estudo

Modelos animais vêm sendo amplamente utilizados em pesquisas biomédicas para o estudo da ansiedade. Tais modelos são úteis não só para a seleção de novos compostos com propriedades ansiolíticas e ansiogênicas, como também para o mapeamento dos circuitos neurais envolvidos nas reações de defesa. No entanto, uma das limitações destes modelos refere-se ao fato de manipularem, na verdade, reações de defesa adaptativas diante de situações ambientais potencialmente perigosas. Assim, como utilizar tais respostas adaptativas como modelos de reações de caráter desajustador e não adaptativo observadas nos diversos transtornos de ansiedade?

Na tentativa de se buscar um modelo que minimize – em parte – este aspecto, foram desenvolvidas linhagens de ratos com altos e baixos níveis de reação de defesa (CAC=Carioca de Alto Congelamento; e CBC=Carioca de Baixo Congelamento), selecionadas a partir de uma série de estudos preliminares envolvendo o Laboratório de Psicobiologia do Instituto de Psicologia da UnB e o Laboratório de Neurociências e Comportamento da PUC/RJ. O presente estudo constitui uma importante contribuição para o desenvolvimento destas linhagens através da realização de modelos comportamentais e farmacológicos, melhorando assim sua validade para o estudo do medo/ansiedade. Com isso, busca-se aprimorar também as ferramentas disponíveis para auxiliar no desenvolvimento de novos compostos mais eficientes e com menos efeitos colaterais para o tratamento dos distúrbios da ansiedade.

Como resultado, esperava-se encontrar diferenças comportamentais entre as linhagens testadas, com a CAC apresentando maiores níveis de ansiedade e a CBC,

menores níveis. Era esperado ainda, uma resposta farmacológica diferenciada entre as linhagens e com tais resultados sendo igualmente corroborados nos dois testes empregados, CRC e LCE.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente estudo avaliou os efeitos comportamentais da administração sistêmica do ansiolítico serotoninérgico ipsapirona em ratos com altos, normais e baixos índices de congelamento condicionado submetidos a dois diferentes testes de ansiedade, afim de aprimorar o desenvolvimento dessas linhagens.

2.2. Objetivos específicos

Mais especificamente, este trabalho se propôs a:

- avaliar o perfil comportamental de ratos com altos (CAC) e baixos (CBC) níveis de reações de defesa nos testes de ansiedade do LCE e do CRC;
- analisar o efeito comportamental da administração sistêmica do agonista parcial de receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A} ipsapirona em ratos com normais, altos (CAC) e baixos (CBC) níveis de reação de defesa submetidos aos testes de ansiedade listados acima;
- comparar o comportamento das mesmas linhagens nas gerações 3 e 4;
- avaliar o uso de linhagens de ratos com altos e baixos níveis de reações de defesa como modelo experimental com uma maior analogia aos distúrbio da ansiedade em humanos.

3. MÉTODOS

3.1. Aspectos Éticos

O presente estudo fez parte do projeto submetido e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília (UnB) (Anexo 1).

3.2. Sujeitos

Foram utilizados ratos Wistar com altos e baixos níveis de reações de defesa, provenientes do Instituto de Psicologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-RJ). Lá, as duas linhagens de ratos com níveis diferenciados de reações de defesa foram obtidas a partir de cruzamentos selecionados de ratos que apresentavam padrões comportamentais semelhantes. A seleção foi feita de acordo com a porcentagem do comportamento de congelamento apresentada pelos animais após serem submetidos ao modelo de CRC (vide detalhes abaixo). Os animais que apresentaram as maiores porcentagens de congelamento foram denominados Carioca de Alto Congelamento (CAC) e os que apresentaram menores taxas, denominados Carioca de Baixo Congelamento (CBC). Os animais classificados num mesmo padrão comportamental foram cruzados entre si e seus filhotes submetidos ao mesmo protocolo sobrescrito.

Esta seleção comportamental teve início em agosto de 2006 com ratos Wistar oriundos da Fundação Oswaldo Cruz – RJ. Cada linhagem foi constituída inicialmente a partir de uma única população com aproximadamente 100 animais, da onde foram selecionados os 10 machos e fêmeas que apresentaram a maior porcentagem de congelamento. Esses foram cruzados entre si para gerar a próxima geração do CAC. O mesmo procedimento foi feito para a linhagem CBC, porém o critério de seleção foram os animais que apresentaram a menor porcentagem de congelamento. No acasalamento, evitou-se cruzamentos endogâmicos (irmão x irmã) e assim, essa linhagem é classificada como *Outbred* (para maiores detalhes ver Gomes, 2008).

As linhagens enviadas ao Laboratório de Psicobiologia do Departamento de Psicologia da UnB pertenciam à segunda geração (S2) da seleção

genética/comportamental. Os animais da linhagem CAC foram acasalados entre si, assim como os da linhagem CBC e seus filhotes (S3), utilizados no experimento 1 (descrito adiante), após atingirem o peso de 250-300g. Como as condições encontradas no biotério de Brasília não são as mesmas das encontradas no da PUC/RJ, tais filhotes da geração S2 não são os mesmos dos produzidos na PUC/RJ. Portanto, não podem ter a mesma denominação dada por esse laboratório. Com isso, a geração S3 criada em Brasília, para diferenciar daquela criada no RJ, foi denominada S3b. Os animais com índices normais de congelamento (denominados Controle) empregados neste estudo foram fornecidos pelo Biotério Central da UnB, porém não nasceram nem cresceram juntos com os animais das linhagens selecionadas.

No Laboratório de Psicobiologia da UnB, todos os animais foram alojados em caixas-ninho (45 x 28 x 13 cm) em grupos de até 5 animais num biotério próprio, em condições padronizadas de acordo com as normas estabelecidas pela Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC) e os Guias de Cuidado e Uso de Animais Laboratoriais da UnB. Os ratos foram mantidos em um ciclo claro-escuro de 12 horas, sendo os experimentos realizados apenas na fase clara do ciclo, no período de 14 às 19 horas. Água e comida foram fornecidos *ad libitum*.

3.3. Equipamentos

3.3.1. Labirinto em Cruz Elevado

O LCE (Fig. 3) seguiu as especificações de Pellow e colaboradores (1985), consistindo em um aparato de madeira com cor natural e com quatro braços (50x10 cm cada) dispostos em forma de cruz, elevados a 50 cm do solo. Dois dos braços eram abertos e continham uma pequena borda de acrílico transparente de 0,5 cm de altura para minimizar eventuais quedas dos animais. Os outros dois braços, dispostos perpendicularmente aos abertos, eram revestidos por paredes laterais de 50 cm de altura e foram denominados braços fechados. Uma arena central de 10x10cm unia os quatro braços entre si.

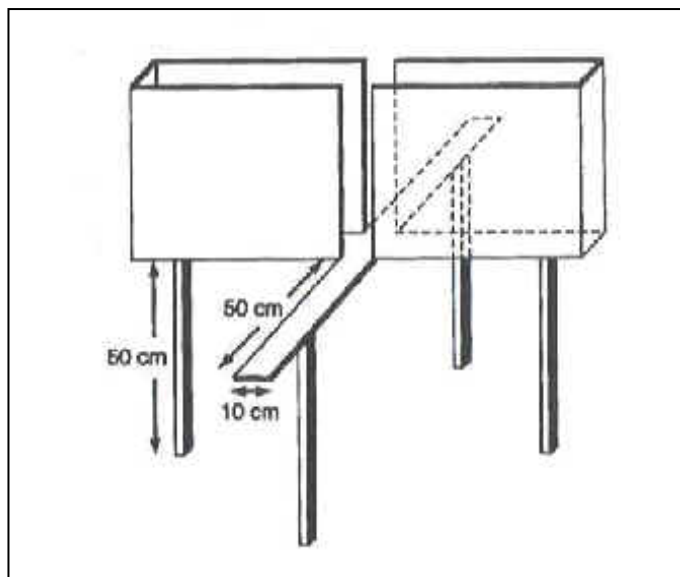


Fig. 3. Ilustração do Labirinto em Cruz Elevado utilizado no experimento.

Este labirinto ficava situado em um cubículo experimental iluminado por uma lâmpada fluorescente (20W), colocada verticalmente a 150 cm acima do aparato. As sessões experimentais foram filmadas e gravadas por meio de uma vídeo-câmara (Sony Handycam, modelo CCD TR 330BR), montada verticalmente acima do labirinto e conectada a um monitor de TV e um vídeo-cassete instalados em uma sala adjacente a sala de experimento.

3.3.2. Caixa de Condicionamento da Resposta de Congelamento (CRC)

A caixa de condicionamento (Fig. 4) consistiu de uma caixa com paredes de acrílico transparente (27,5 x 30,5 cm) e assoalho gradeado (18 barras de aço inoxidável espaçadas a 1 cm entre si) que permitiam a passagem de uma corrente elétrica para administração de um choque elétrico. A corrente elétrica, foi liberada por meio de um estimulador de choques (Grason-Stadler (EUA), modelo E 600B), comandado por um programa de computador e um sistema de interface para computador que permite controlar o número de choques elétricos e os intervalos entre esses estímulos.

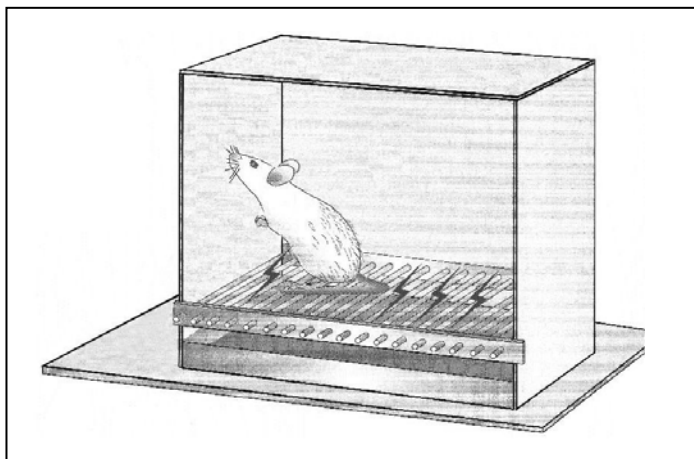


Fig. 4. Esquema ilustrativo da caixa de condicionamento da resposta de congelamento (*freezing*).

A caixa ficava situada dentro de uma câmara de isolamento acústico parcial, a qual era iluminada por uma lâmpada incandescente amarela (20W). Uma ventoinha instalada na câmara de isolamento atuava como exaustor de ar e ruído de fundo. Uma micro-câmera, acoplada à câmara de isolamento, estava conectada a um monitor de TV e um vídeo-cassete instalados em uma sala adjacente a sala de experimento permitindo a gravação das sessões experimentais (Fig. 5).

Um pequeno bip gerado por um programa de computador foi apresentado em intervalos fixos de 2s. Este sinal serviu de marcação para o registro, pelo observador, da ocorrência ou não da resposta de congelamento. O registro foi feito manualmente pelo observador em protocolo de registro padronizado para esta situação experimental.

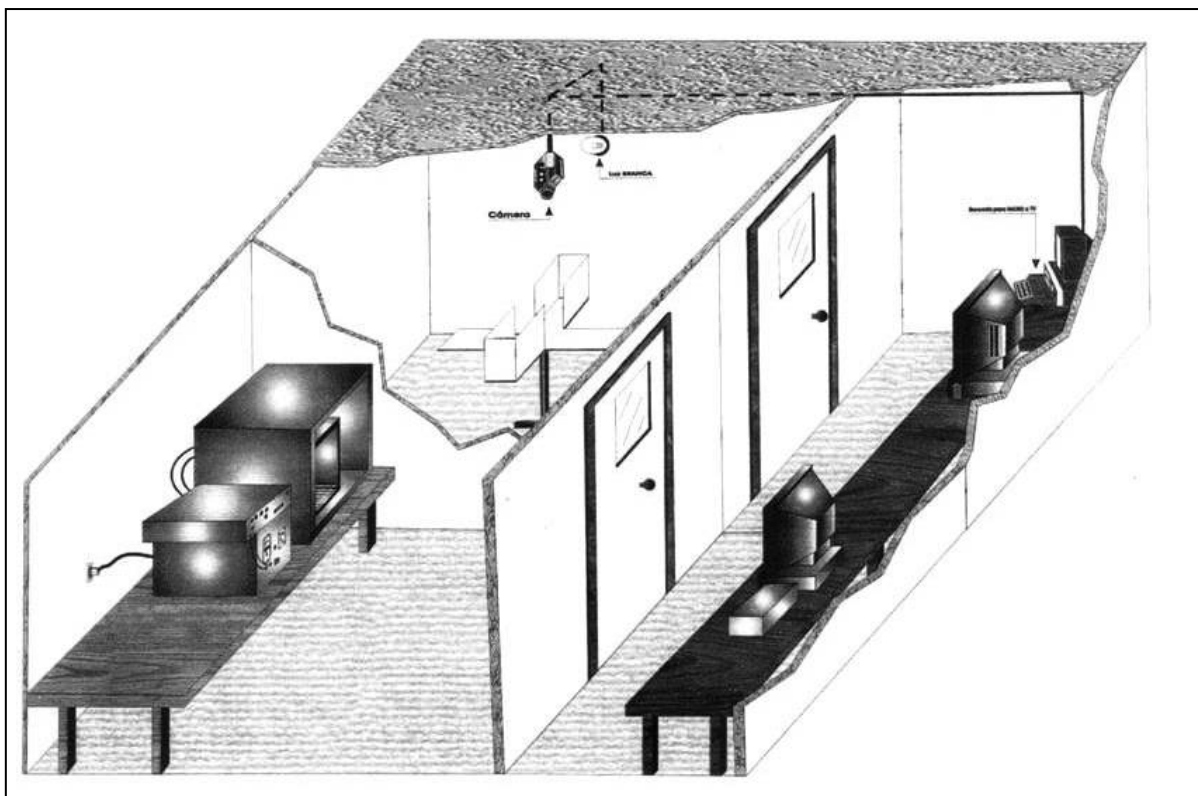


Fig. 5. Figura esquemática ilustrando o ambiente experimental de coleta com os testes do LCE (sala de cima) e da caixa de condicionamento (sala de baixo).

3.4. Droga

Foi utilizado o ansiolítico ipsapirona (IPS) (Tocris Co, USA), um agonista parcial de receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT_{1A}. O fármaco foi dissolvido em solução salina estéril (NaCl 0,9%) e injetado intraperitonealmente (i.p.) em um volume de 1,0 ml/kg na dose de 2,5 mg/kg. A dose empregada no estudo foi baseado em estudos anteriores, empregando metodologias experimentais semelhantes, que demonstram um efeito ansiolítico (Seten e cols., 1999).

3.5. Procedimento experimental

3.5.1. Experimento 1

Os animais da geração S3b (ver item 3.2 acima) foram alocados em três grandes grupos, de acordo com a sua linhagem: (1) normal (Controle), (2) baixa (CBC) e (3) alta resposta de

congelamento ao contexto (CAC). Cada grupo foi subdividido em um subgrupo teste (n=8), submetido ao tratamento farmacológico com a IPS na dose 2,5 mg/kg, e um grupo controle (n=8) que foi injetado com solução salina. Na Tabela 1 encontra-se um resumo do esquema de administração que foi empregado nesta fase do estudo.

Tabela 1. Divisão dos sujeitos empregados no estudo, de acordo com a sua linhagem de nível normal, alto e baixo de respostas de congelamento ao contexto.

Grupo	Nº. de animais	Tratamento
Controle	8	salina
	8	IPS* 2,5 mg/kg
CBC	8	salina
	8	IPS* 2,5 mg/kg
CAC	8	salina
	8	IPS* 2,5 mg/kg

*IPS=ipsapirona

Todos os animais foram manipulados (*handling*) por 3 min durante os 3 dias que antecederam os experimentos. No dia do experimento, 30 min após a injeção de salina (grupo controle) ou de ipsapirona (grupo teste), de acordo com a Tabela 1, os animais correspondentes a cada uma das linhagens (normal, baixo e alto índice de resposta de congelamento ao contexto) foram expostos ao LCE. Cada sujeito foi colocado na plataforma central do LCE (Fig. 3), com a cabeça voltada para um dos braços fechados, podendo explorá-lo livremente por 5 min. Após cada sessão, o aparato foi higienizado com uma flanela umedecida com solução de etanol a 20%.

Imediatamente após a sessão no LCE, cada rato foi submetido a uma sessão treino no modelo de medo condicionado ao contexto. Nesta sessão, cada animal foi colocado dentro da caixa de condicionamento (Fig. 4), podendo explorá-la livremente por 4 min. Ao término deste intervalo, três choques (1 segundo de duração e 0,6 mA de intensidade) foram liberados no assoalho da caixa de CRC, em intervalos fixos de 20 s. A intensidade utilizada no presente experimento foi baseada no estudo de Baldi e cols. (2004). Após o

terceiro choque, o sujeito permaneceu na caixa de CRC por mais 2 min, sendo em seguida reconduzido ao biotério. Ao final de cada sessão treino o assoalho e as paredes da caixa de CRC foram limpos com um papel umedecido com solução amoníaca (2%) e secados com um secador de cabelo. Vinte e quatro horas após a sessão treino, cada animal foi submetido a uma sessão teste. Esta consistiu em administrar o tratamento pré-estabelecido (salina ou ipsapirona) e, 35 min depois, recolocar o sujeito na caixa de CRC por um período de 8 min, sem a aplicação de choques elétricos. A Fig. 6 apresenta um resumo ilustrativo do procedimento experimental empregado nesta fase do estudo.

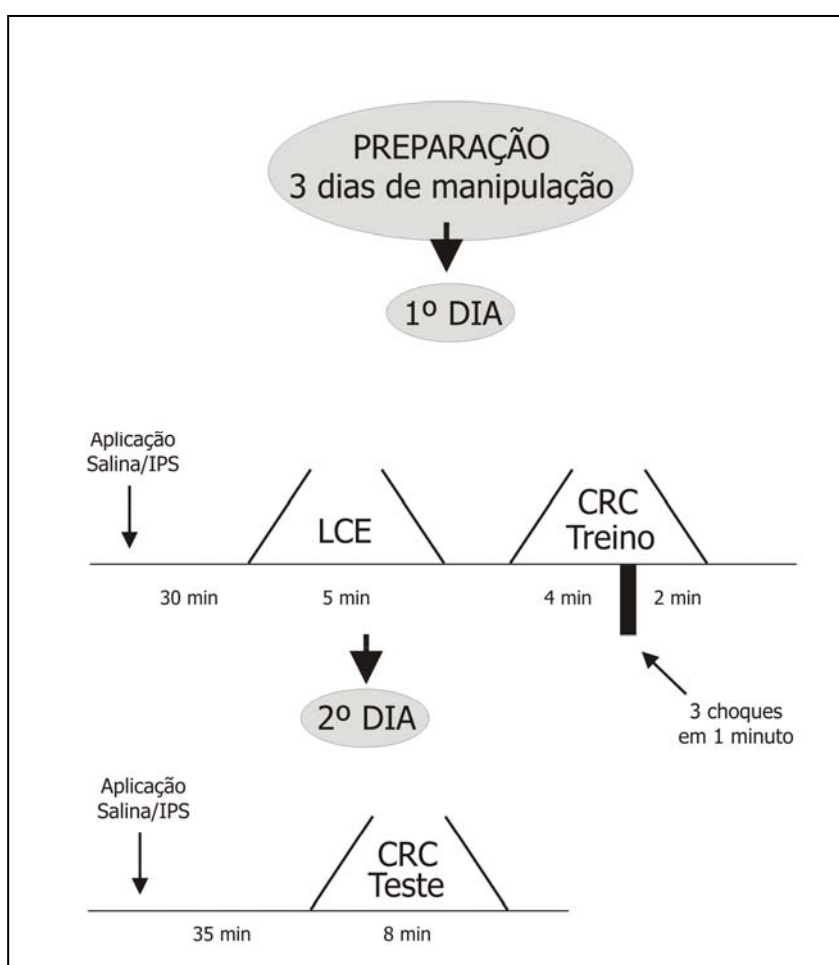


Fig. 6. Esquema ilustrativo do procedimento experimental empregado no experimento 1.

3.5.2. Experimento 2

Nesta segunda fase do estudo, foram utilizados 9 ratos Wistar da linhagem CAC, 8 CBC e 10 com níveis normais de reação de defesa (Controle), pesando 300-380g. Todos os

animais, inclusive os do grupo Controle, foram provenientes do Instituto de Psicologia da PUC-RJ e consistiram em animais da 4ª geração (S4) que já haviam passado pelo teste de medo condicionado no referido laboratório. O procedimento de produção e manutenção destas linhagens com níveis diferenciados foi o mesmo descrito para o Experimento 1. Ao chegarem na UnB, os animais permaneceram no biotério próprio do Laboratório de Psicobiologia da UnB por duas semanas para se aclimatarem ao novo ambiente. As condições de alojamento foram semelhantes às mencionadas no Experimento 1.

Após esta fase de aclimatização, os animais foram submetidos ao mesmo procedimento descrito acima para o Experimento 1 (vide item 3.5.1. *Experimento 1*). Nesta segunda fase do estudo, porém, todos os ratos testados foram tratados apenas com salina, em um volume de 1,0 ml/kg, administrada por via i.p. O intuito desse segundo experimento foi comparar o comportamento de animais de diferentes gerações, submetidos aos mesmos procedimentos experimentais, sem intervenção de um tratamento farmacológico.

3.6. Análise comportamental

O registro do comportamento dos animais no LCE e na caixa de CRC (do Experimento 1 e 2) foi realizado por dois pesquisadores previamente treinados, sendo o registro feito ao mesmo tempo em que as sessões estavam sendo realizadas. O índice de concordância entre os examinadores foi maior que 90%.

3.6.1. Labirinto em Cruz Elevado

Nas sessões do LCE foram analisados os parâmetros comportamentais clássicos e os etológicos. O primeiro consistiu: (1) número de entradas nos braços abertos (EBA); (2) porcentagem de entradas nos braços abertos ($100 \times \text{entradas nos abertos} / (\text{entradas nos abertos} + \text{entradas nos fechados})$) (%EBA); (3) tempo de permanência nos braços abertos (TBA); (4) porcentagem de tempo nos braços abertos ($100 \times \text{tempo no aberto} / (\text{tempo no aberto} + \text{tempo no fechado})$) (%TBA); (5) número de entradas nos braços fechados (EBF);

(6) tempo de permanência nos braços fechados (TBF); (7) tempo de permanência na plataforma central; (8) atividade locomotora. Um aumento no EBA, %EBA, TBA e/ou %TBA são considerados como indicadores comportamentais de um efeito ansiolítico no LCE (Cruz, 1994).

O segundo conjunto de parâmetros consistiu na análise do número de explorações da extremidade dos braços abertos e o tempo despendido realizando os comportamentos de espreitar e esquadrinhar. Espreitar foi definido como a saída parcial do animal dos braços fechados, colocando a cabeça e as patas dianteiras na plataforma central ou nas entradas dos braços abertos, freqüentemente acompanhado de um estiramento do corpo. Esquadrinhar, por sua vez, foi considerado quando o animal colocava a cabeça em direção ao precipício do braço aberto, olhando em qualquer direção. Estes últimos vêm se mostrando úteis para a detecção de efeitos de manipulações farmacológicas dos sistemas serotoninérgicos e GABAérgicos (Cruz e cols, 1994; Fernandes e cols., 1996; Setem e cols, 1999; Griebel e cols., 2002).

3.6.2. Condicionamento da Resposta de Congelamento

O registro da resposta de congelamento para o Experimento 1 e 2, nas sessões treino e teste, seguiu a técnica de amostragem de evento. A cada intervalo de 2 s, indicado por um bip emitido pelo programa do computador, o observador marcou manualmente em uma folha de registro se uma resposta de congelamento ocorreu ou não ao final desse intervalo. A resposta de congelamento foi definida, operacionalmente, como sendo a ausência de qualquer movimento motor corporal, exceto o respiratório. Baseado no registro de ocorrência foi calculado a porcentagem de congelamento nas sessões treino e teste. Na análise das sessões treino, só foi considerado o período de 4 min que antecedeu o choque.

3.7. Análise estatística

A porcentagem da resposta de congelamento observada na sessão treino vs. a de teste do modelo de CRC foram comparadas por meio de uma Análise de Variância unifatorial (*one-way ANOVA*) para medidas repetidas, sendo as medidas repetidas relacionadas às sessões de treino e teste. Já para analisar as possíveis diferenças entre os diferentes tratamentos e linhagens, foi realizada uma ANOVA bifatorial (*two-way ANOVA*) para amostras independentes da porcentagem de congelamento na sessão teste do modelo de CRC, sendo as linhagens (Controle/CBC/CAC) e os tratamentos farmacológicos (salina/ipsapirona) considerados como o primeiro e segundo fator, respectivamente. As comparações dos índices de exploração no LCE e das gerações S3b vs. S4 também foram realizadas por meio de uma ANOVA bifatorial (*two-way ANOVA*) para amostras independentes, sendo o primeiro fator referente às linhagens (Controle/CBC/CAC) e o segundo referente ao tratamento farmacológico (salina/ipsapirona, quando analisada apenas a geração S3b) ou à geração (S3b/S4). Nos casos onde a ipsapirona não foi administrada no Experimento 2, cada parâmetro comportamental mensurado nos testes de CRC e LCE foi comparado via uma ANOVA unifatorial para amostras independentes para detectar possíveis diferenças entre os grupos com diferentes níveis de ansiedade.

Em todos os casos onde foi observado um efeito significativo na ANOVA, empregou-se o teste de Bonferroni para comparações *post hoc* entre os grupos, a um nível de significância de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Experimento 1

Como a seleção das linhagens foi realizada usando o modelo de CRC, e um dos objetivos desse experimento inicial foi averiguar a validade de tal seleção, os resultados deste teste serão apresentados primeiro.

4.1.1. Teste de Congelamento ao Contexto

Os animais Controle e com diferentes níveis de ansiedade da geração S3b (CBC/CAC), submetidos ao modelo de CRC, apresentaram uma porcentagem de resposta condicionada de congelamento ao contexto significativamente diferente entre as sessões treino e teste [$F(11,77)=17,13$; $p<0,01$; Fig. 7].

Ao se comparar os animais com níveis distintos de reações de defesa, apenas na sessão teste, a porcentagem da resposta condicionada de congelamento ao contexto também foi significativamente diferente [$F(2,42)=9,49$; $p<0,01$; Fig. 8]. Entre os animais tratados com salina, análises *post hoc* indicaram que a porcentagem de congelamento apenas da linhagem CAC foi significativamente [$p<0,05$] maior que das demais. Já nos animais tratados com ipsapirona, a resposta de congelamento foi maior nas linhagens CAC e CBC, comparada ao Controle, apesar de atingir níveis significativos apenas para o primeiro [CAC: $p<0,05$; CBC: $p=0,051$].

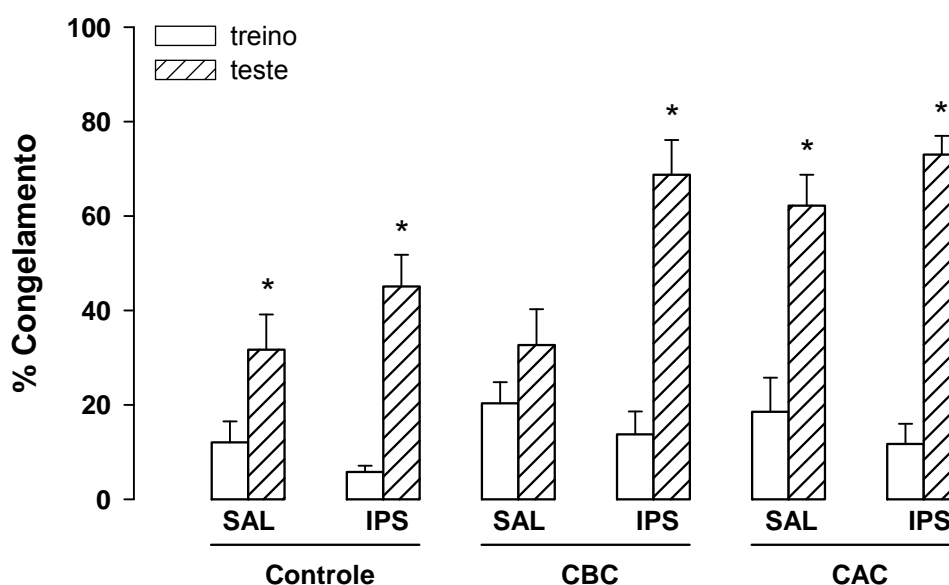


Figura 7. Porcentagem média (+ e.p.m.) da resposta condicionada de congelamento ao contexto nas sessões de treino (colunas brancas) e teste (colunas hachuradas) dos animais com diferentes níveis de reações de defesa (Controle; CBC=carioca de baixo congelamento; CAC=carioca de alto congelamento) injetados com salina ou ipsapirona (IPS, 2,5 mg/kg, ip). * $p < 0,05$ vs. sessão treino do respectivo grupo experimental.

Além disso, na sessão teste do CRC, também foram encontradas diferenças significativas entre os animais de um mesmo nível de ansiedade submetidos à salina ou ipsapirona [$F(1,42)=13,37$; $p < 0,01$; Fig. 8]. Análises posteriores indicaram que, entre os animais da linhagem CBC, a porcentagem de congelamento na sessão teste foi significativamente [$p < 0,05$] maior naqueles injetados com ipsapirona, comparados aos que foram tratados com salina. Embora tenha sido observado um perfil semelhante para os ratos Controle e CAC, as diferenças encontradas não atingiram níveis significativos [$p > 0,05$]. Por fim, não houve uma interação significativa entre o tratamento farmacológico e a linhagem na sessão teste do CRC [$F(2,42)=2,13$; $p=0,13$].

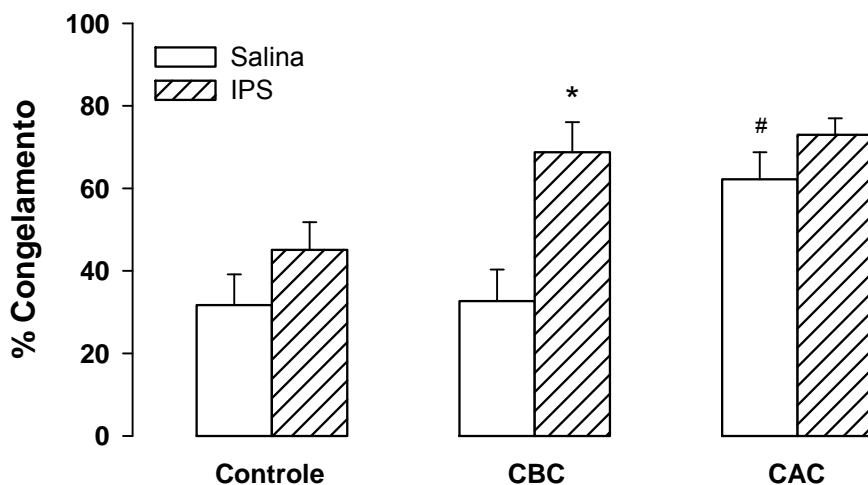


Fig. 8. Porcentagem média (+ e.p.m.) da resposta condicionada de congelamento ao contexto do grupo Controle e das diferentes linhagens (CBC=carioca de baixo congelamento; CAC=carioca de alto congelamento) injetados com salina (colunas brancas) ou ipsapirona (colunas hachuradas; IPS; 2,5 mg/kg, ip). * $p < 0,05$ vs. grupo salina da mesma linhagem. # $p < 0,05$ vs. grupo salina/Controle e vs. salina/CBC.

4.1.2. Teste do Labirinto em Cruz Elevado

Com relação à porcentagem de entrada nos braços abertos no LCE (Fig. 9A), não foram observadas diferenças significativas entre as linhagens [$F(2,37)=0,83$; $p=0,44$] e entre os tratamentos farmacológicos [$F(1,37)=0,04$; $p=0,85$], assim como de interação entre esses dois fatores [$F(2,37) = 1,47$; $p=0,24$]. Um perfil semelhante foi visto para a porcentagem de tempo gasto nos braços abertos [linhagem: $F(2,37)=0,17$; $p=0,84$; tratamento farmacológico: $F(1,37)=0,04$; $p=0,84$; interação: $F(2,37)=0,58$; $p=0,57$; Fig. 9B]. Contudo, para o número absoluto de entradas nos braços fechados do LCE, os tratamentos farmacológicos diferiram significativamente entre si [$F(1,37) = 11,53$; $p < 0,01$; Fig. 9C]. Esta resposta estava significativamente [$p < 0,05$] maior nos animais injetados com ipsapirona, que nos tratados com salina. Diferenças significativas entre os animais com níveis distintos de reações de defesa não foram verificadas para este parâmetro do LCE [$F(2,37)=2,56$; $p=0,09$], assim como não houve uma interação significativa entre linhagem-tratamento farmacológico [$F(2,37)=0,95$; $p=0,39$].

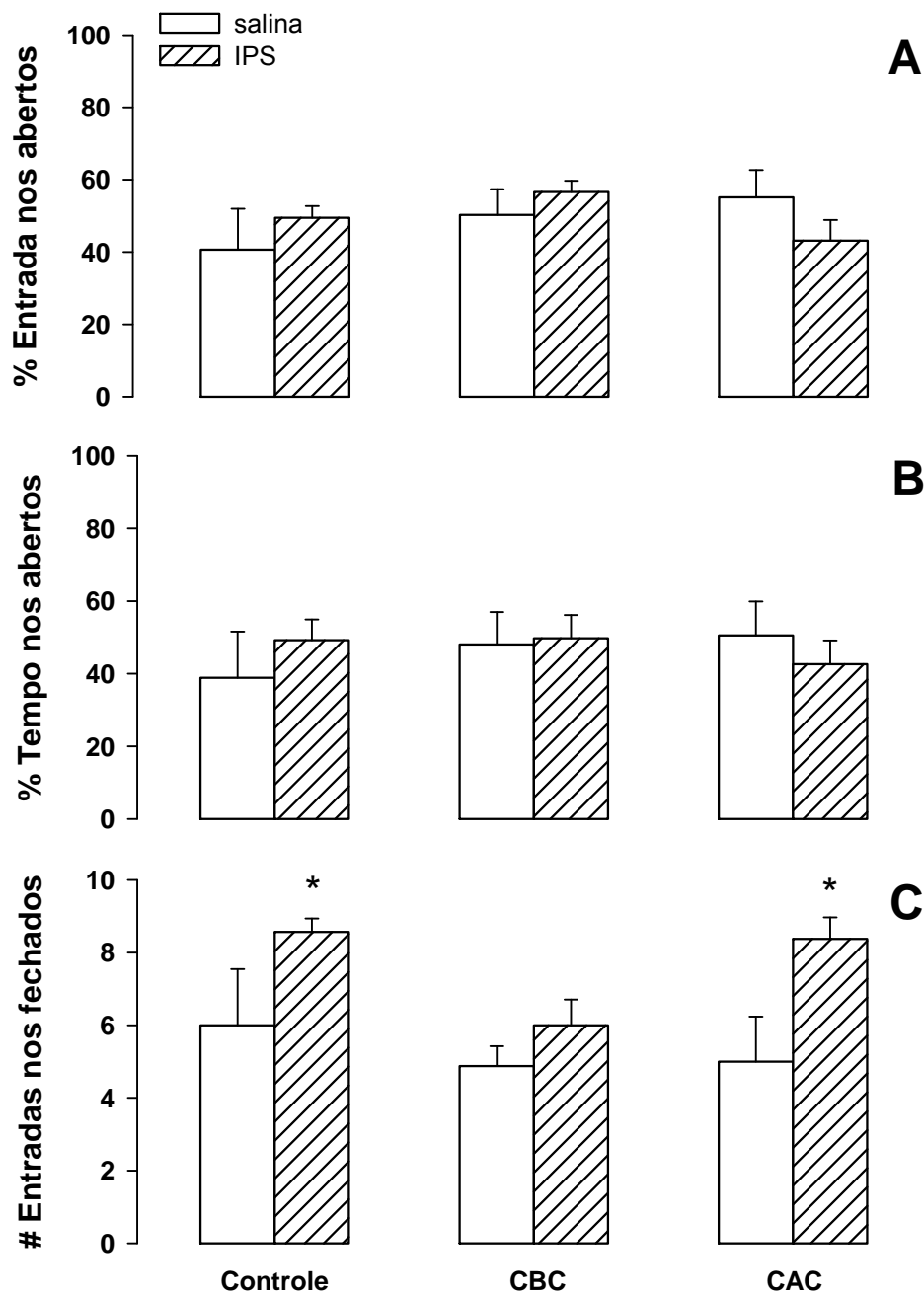


Fig. 9. Porcentagem média (+e.p.m.) de entrada (A) e de tempo (B) gasto nos braços abertos e o número de entradas nos braços fechados do LCE nos três grupos experimentais com diferentes níveis de ansiedade (Controle; CBC=carioca de baixo congelamento; CAC=carioca de alto congelamento), injetados com salina ou ipsapirona (2,5 mg/kg; ip). * $p < 0,05$ vs. grupo salina da mesma linhagem.

Ao avaliar o comportamento de espreitar (Fig. 10A), foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos farmacológicos [$F(1,37) = 12,17$; $p < 0,01$]. Análises *post hoc* indicaram que a frequência de espreitar foi maior nos animais injetados com ipsapirona, do que nos que foram tratados com salina, apesar de atingir níveis significativos [$p < 0,05$] apenas na linhagem CBC. Para o comportamento de esquadrihar (Fig. 10B), os tratamentos farmacológicos também diferiram significativamente entre si [$F(1,37)=27,12$; $p < 0,01$], tendo-se uma frequência significativamente [$p < 0,05$] maior desta resposta nos animais administrados ipsapirona, que nos com salina, exceto na linhagem CAC. Além disso, o tratamento farmacológico ainda surtiu efeito significativo no número de explorações das extremidades dos braços abertos [$F(1,37)=4,13$; $p < 0,05$; Fig. 10C], tendo os animais injetados com ipsapirona níveis significativamente [$p < 0,05$] mais elevados deste parâmetro que os que receberam salina, mas apenas na linhagem CBC.

Contudo, em nenhuma das categorias etológicas do LCE foram identificadas diferenças significativas entre os animais com níveis distintos de reações de defesa [espreitar: $F(2,37)=2,16$; $p=0,13$; esquadrihar: $F(2,37)=0,47$; $p=0,63$; exploração das extremidades dos braços abertos: $F(2,37)=0,94$; $p=0,40$]. Ademais, no LCE, uma interação significativa entre linhagem e tratamento farmacológico foi observada apenas para o comportamento de esquadrihar [espreitar: $F(2,37)=0,76$; $p=0,48$; esquadrihar [$F(2,37)=3,55$ $p < 0,05$; exploração das extremidades: $F(2,37)=1,61$; $p=0,12$].

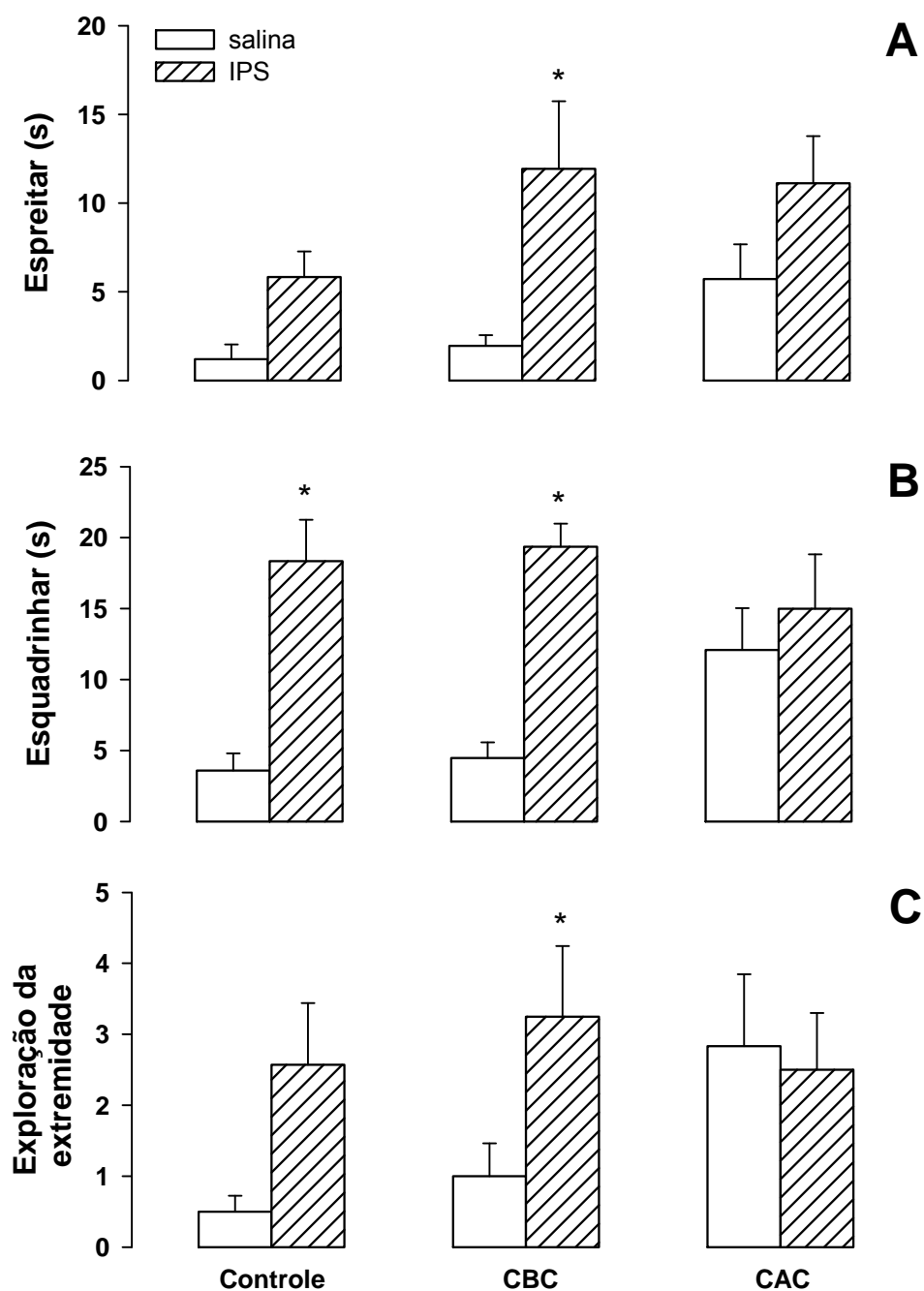


Fig. 10. Média (+e.p.m.) do tempo gasto nas categorias espreitar (A) e esquadrinhar (B) e do número de explorações da extremidade dos braços abertos (C) do LCE entre os três grupos experimentais com diferentes níveis de ansiedade (Controle; CBC=carioca de baixo congelamento; CAC=carioca de alto congelamento), injetados com salina ou ipsapirona (2,5 mg/kg; ip). * $p < 0,05$ vs. grupo salina da mesma linhagem.

4.2. Experimento 2

4.2.1. Teste de Condicionamento ao Contexto

Na geração S4, os animais Controle e com diferentes níveis de ansiedade (CBC/CAC), submetidos ao modelo de CRC, apresentaram uma porcentagem de resposta condicionada de congelamento ao contexto significativamente maior na sessão teste do que na sessão treino [F(1,42)=99,23; $p<0,01$; Fig. 11]. Contudo, não foram observadas diferenças significativas entre os animais com níveis distintos de reações de defesa [F(2,42)=1,68; $p=0,43$], nem um efeito significativo de interação entre a sessão experimental (treino e teste) e a linhagem [F(2,42)=0,03; $p=0,98$].

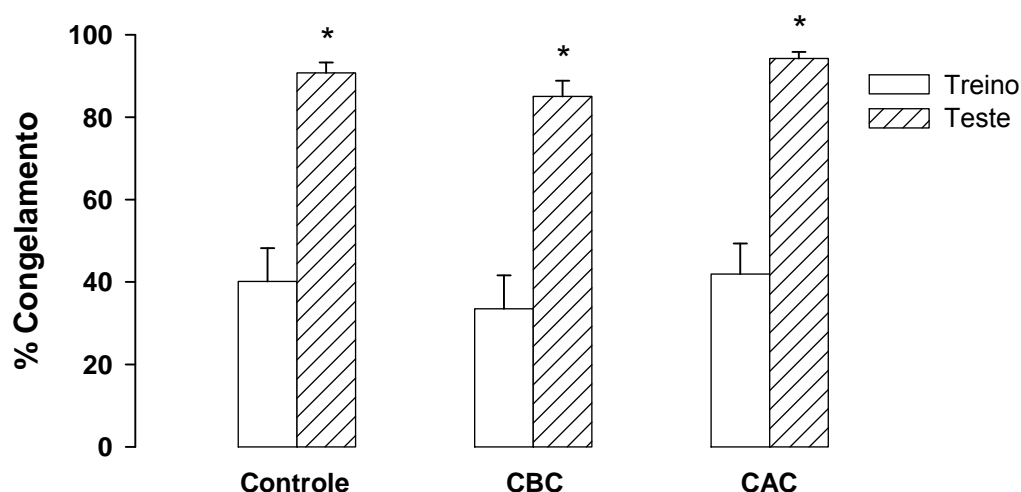


Fig. 11. Porcentagem média (+ e.p.m.) da resposta condicionada de congelamento ao contexto nas sessões de treino (colunas brancas) e teste (colunas hachuradas) dos animais com diferentes níveis de ansiedade da geração S4 (Controle; CBC=carioca de baixo congelamento; CAC=carioca de alto congelamento) injetadas com salina (1,0 ml/kg; ip). * $p<0,01$ vs. sessão treino do respectivo grupo experimental.

Ao comparar a geração S4 com os animais S3b injetados com salina do experimento anterior, foi detectado que as porcentagens de congelamento diferiam significativamente nas sessões treino [F(1,45)=14,23; $p<0,01$; Fig. 12A] e teste [F(1,45)=125,94; $p<0,01$; Fig. 12B]. Análises *post hoc* indicaram que a resposta de congelamento da geração S4 foi

significativamente [$p < 0,05$] maior que da S3b, exceto na sessão treino do grupo CBC. Para este, não foi obtido um nível significativo [$p = 0,20$], embora o perfil tenha sido semelhante ao dos demais grupos experimentais.

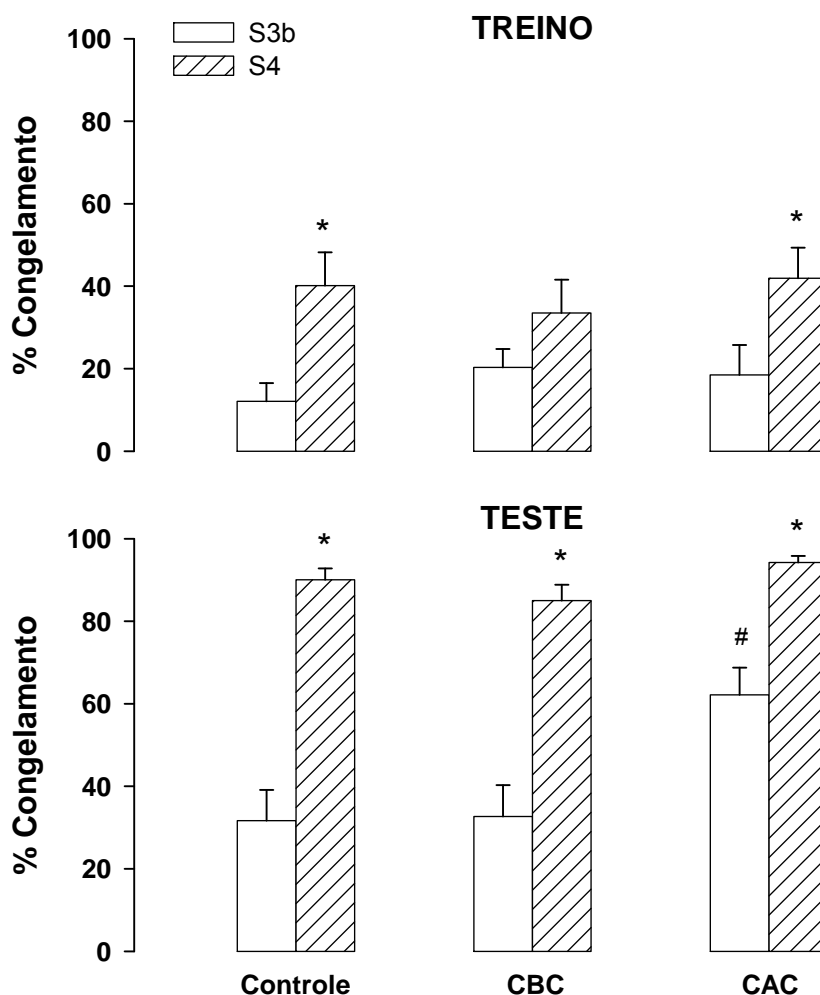


Fig. 12. Porcentagem média (+ e.p.m.) da resposta condicionada de congelamento ao contexto nas sessões treino e teste dos animais da geração S3b (colunas brancas) e S4 (colunas hachuradas) com diferentes níveis de ansiedade (Controle; CBC=carioca de baixo congelamento; CAC=carioca de alto congelamento) injetados com salina (1,0 ml/kg; ip). * $p < 0,05$ vs. geração S3b do respectivo grupo experimental; # $p < 0,05$ vs. grupos Controle e CBC da geração S3b.

Ao se analisar, separadamente, a porcentagem de congelamento das gerações S4 e S3b nas diferentes sessões do modelo de CRC, foi observada uma diferença significativa entre as linhagens apenas na sessão teste [treino: $F(2,45) = 0,20$; $p = 0,82$; teste:

$F(2,45)=8,15$; $p<0,01$; Fig. 12]. Análises posteriores mostraram que estas diferenças estavam apenas entre as linhagens da geração S3b, conforme detectadas no Experimento 1 (Fig. 8). Uma interação significativa entre os fatores linhagem e geração também só foi encontrada para sessão teste [treino: $F(2,45)=0,58$; $p=0,56$; teste: $F(2,45)=3,68$; $p<0,05$].

4.2.2. Teste de Labirinto em Cruz Elevado

Ratos CAC, CBC e Controle da geração S4 não diferiram significativamente em termos das porcentagens de entrada [$F(2,23)=1,64$; $p=0,22$; Fig. 13A] e de tempo gasto nos braços abertos [$F(2,23)=1,80$; $p=0,19$; Fig. 13B], assim como no número de entradas nos braços fechados [$F(2,23)=0,89$; $p=0,42$; Fig. 13C]. Contudo, mesmo que não significativo, os da linhagem CBC tiveram uma tendência a maior porcentagem de entrada e tempo de exposição aos braços abertos, comparado aos animais Controle, enquanto que os da linhagem CAC apresentaram o perfil oposto, ou seja, menos entradas e duração nos braços abertos do LCE.

Em termos dos parâmetros etológicos, também não houve uma diferença significativa entre os animais com níveis distintos de reações de defesa da geração S4 [espreitar: $F(2,23)=0,29$; $p=0,75$; esquadrihar: $F(2,23)=0,51$; $p=0,60$; exploração das extremidades dos braços abertos: $F(2,23) = 2,63$; $p=0,18$; Fig. 14]. Contudo, mesmo que não significativo, índices maiores de esquadrihar e exploração das extremidades dos braços abertos foram vistos na linhagem CBC, comparado aos dos animais Controle.

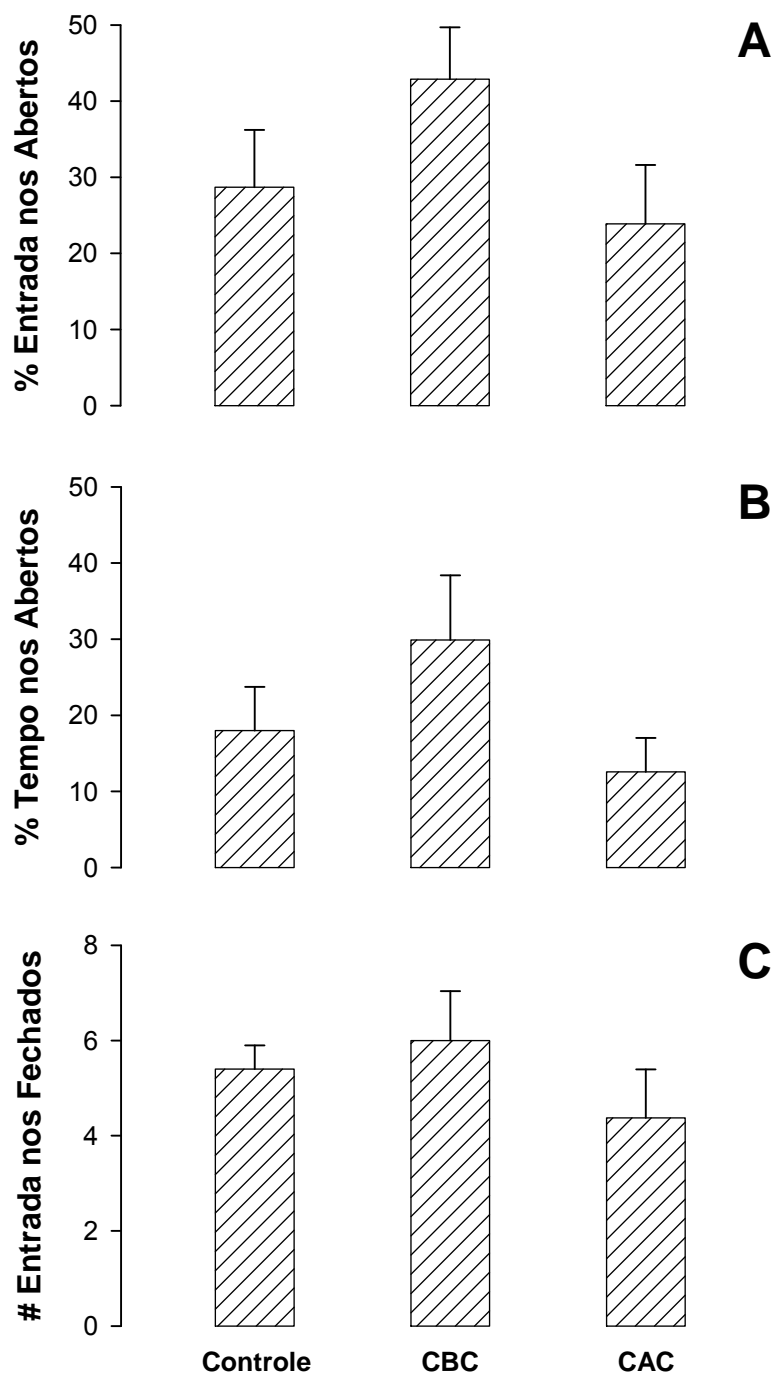


Figura 13. Porcentagem média (+e.p.m.) de entrada (A) e de tempo (B) gasto nos braços abertos e o número de entradas nos braços fechados do LCE (C) pelos três grupos experimentais com diferentes níveis de ansiedade da geração S4 (Controle; CBC=carioca de baixo congelamento; CAC=carioca de alto congelamento) injetados com salina (1,0 ml/kg; ip).

Ao comparar a geração S4 com a geração S3b injetada com salina, foi observado que os animais da geração S4, de uma maneira geral, apresentaram uma menor porcentagem de entrada [$F(1,40)=6,54$; $p<0,05$; Fig. 15A] e menor tempo gasto nos braços abertos [$F(1,40)=14,68$; $p<0,01$; Fig. 15B]. Contudo, estes parâmetros não diferiram em termos das linhagens [entrada: $F(2,40)=1,15$; $p=0,33$; tempo: $F(2,40)=0,91$; $p=0,41$; Fig. 15] e uma interação linhagem–geração também não foi observada [entrada: $F(2,40)=1,19$; $p=0,31$; tempo: $F(2,40)=0,83$; $p=0,44$].

Em relação ao comportamento de espreitar, os animais da geração S4 apresentaram maiores níveis do que os da geração S3b [$F(1,40) = 15,70$; $p<0,01$; Fig. 15C]. Além disso, diferenças significativas não foram observadas para este comportamento em termos das linhagens [$F(2,40)=0,26$; $p=0,77$] e de interação linhagem–geração [$F(2,40)=0,44$; $p=0,65$].

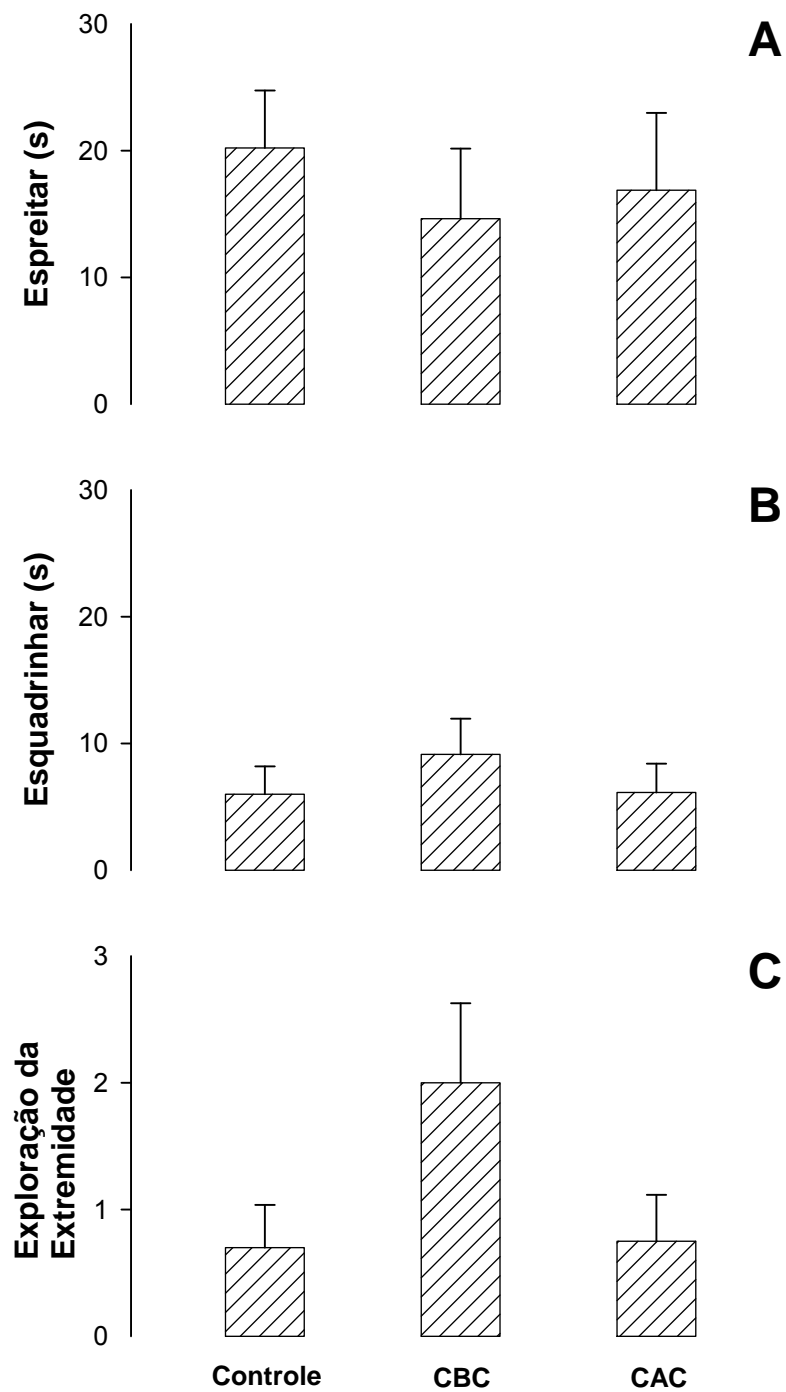


Figura 14. Média (+e.p.m.) do tempo gasto nas categorias espreitar (A) e esquadrinhar (B) e do número de explorações da extremidade dos braços abertos (C) do LCE entre os três grupos experimentais de ratos com diferentes níveis de ansiedade (Controle, CBC, CAC), injetados com salina (1,0 ml/kg; ip) da geração S4.

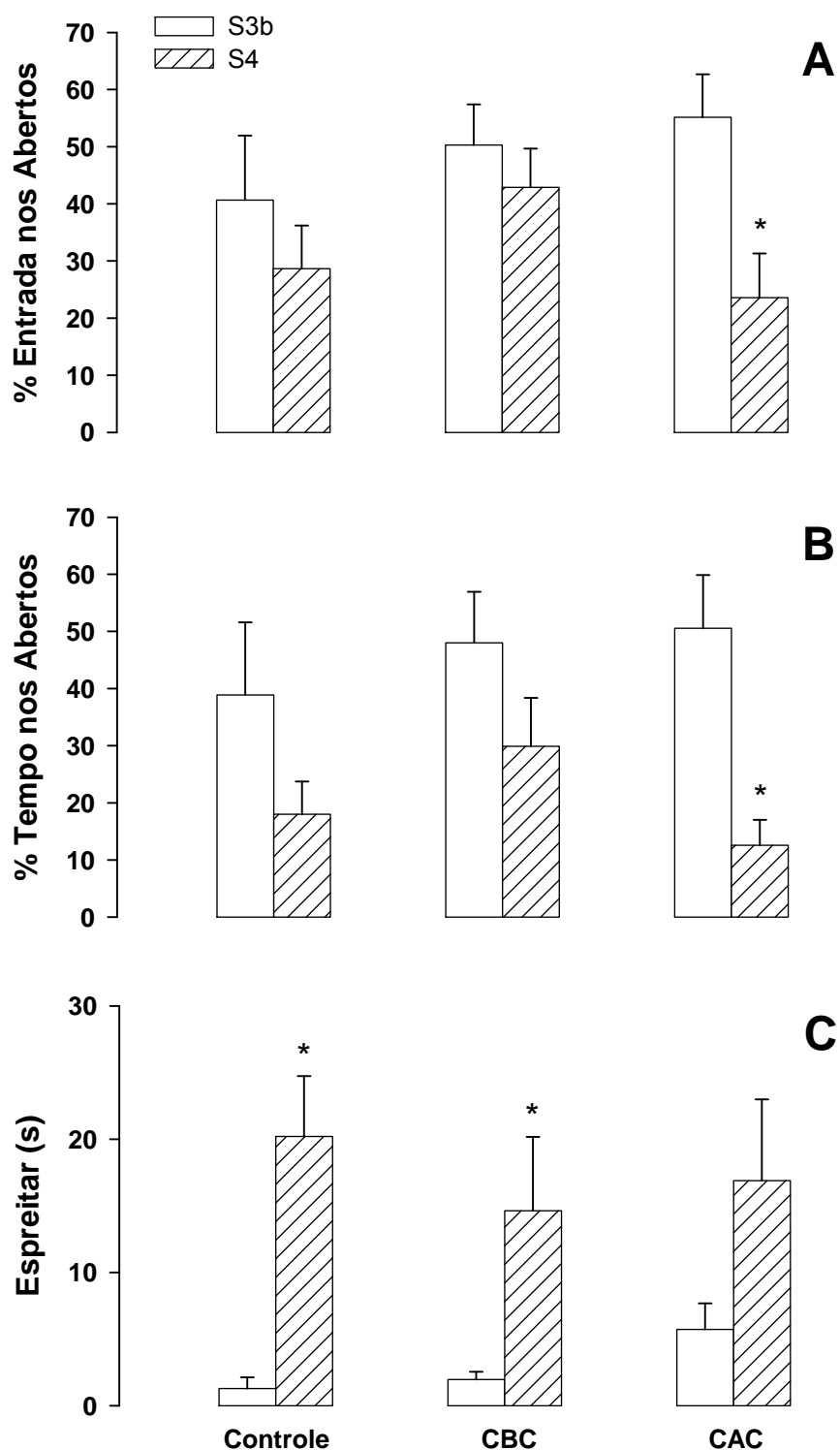


Fig. 15. Porcentagem média (+e.p.m.) de entrada (A) e de tempo (B) gasto nos braços abertos do LCE e média (+e.p.m.) do tempo gasto na categoria espreitar (C) pelos três grupos experimentais de ratos com diferentes níveis de ansiedade (Controle, CBC, CAC) das gerações S3b (colunas brancas) e S4 (colunas hachuradas). * $p < 0,05$ vs. geração S3b do respectivo grupo experimental.

5. DISCUSSÃO

Os resultados dos Experimentos 1 e 2 sugerem, de uma forma geral, que os grupos selecionados para diferentes níveis de congelamento diferem comportamentalmente quando submetidos ao teste do CRC, mas não do LCE. Além disso, eles parecem responder diferentemente às manipulações farmacológicas do sistema serotoninérgico. Para um melhor entendimento de tais resultados, o efeito da seleção genética e do tratamento farmacológico sobre as respostas comportamentais indicativas de medo/ansiedade nos testes de CRC e LCE serão discutidos, separadamente, a seguir.

5.1 Análise comportamental das linhagens CBC/CAC

Para melhor avaliar o efeito do uso de diferentes linhagens nos modelos de ansiedade utilizados neste estudo, torna-se essencial se analisar – primeiramente – aqueles animais que não foram submetidos a uma intervenção farmacológica, ou seja, os que receberam apenas injeções de salina.

Em termos do modelo de CRC, este se mostrou eficaz para avaliar as respostas de defesa apresentadas pelos diferentes grupos experimentais, uma vez que foi observado um efeito de aprendizagem da resposta condicionada de medo ao contexto nos Experimentos 1 e 2 (gerações S3b e S4, respectivamente). De fato, a porcentagem da resposta de congelamento dos diferentes grupos experimentais foi, em geral, significativamente maior na sessão teste do que na de treino. Inclusive, os índices de congelamento apresentados pela linhagem Controle foram semelhantes aos de outros estudos com ratos que utilizaram o modelo de CRC (p.ex. Fanselow, 2000; Miyamoto e cols., 2000, 2004; Landeira-Fernandez e cols., 2006; Ponder e cols., 2007a, 2007b).

Ademais, neste procedimento experimental, os animais ingênuos da linhagem CAC (geração S3b) apresentaram uma maior porcentagem de congelamento na sessão teste, em relação aos Controle, enquanto os da linhagem CBC comportaram-se de forma muito semelhante aos que não foram selecionados (Controle). Gomes (2008), usando as mesmas linhagens, obteve resultados semelhantes, onde os animais CAC expressaram um aumento

na porcentagem de congelamento, enquanto que os CBC não diferiram muito dos animais não selecionados. Inclusive, o perfil comportamental da linhagem CAC, foi próximo da encontrada em outros estudos genéticos (Ponder e cols., 2007a; Radcliff e cols., 2000). Radcliff e cols. (2000), também utilizando o modelo de CRC como parâmetro de seleção de linhagens com diferentes níveis comportamentais, verificou que a 3ª geração dos animais selecionados para altos índices de congelamento ao contexto demonstraram os mesmos 60% de congelamento apresentados pelos animais testados no experimento 1. Para os animais com baixos níveis de ansiedade, esses mesmos pesquisadores relataram uma porcentagem de congelamento significativamente menor (aproximadamente, 20%) – algo que não ocorreu com os animais testados no presente estudo.

Ainda assim, os resultados obtidos sugerem que o nível de ansiedade da linhagem pode ter influenciado no aprendizado observado entre as sessões treino e teste do CRC. Neste contexto, o grupo CAC teve um maior aprendizado de padrões de defesa frente a um estímulo aversivo e, portanto, teriam um comportamento mais ansioso neste procedimento (Fanselow e Helmstetter, 1988; Kalin e cols., 1988; Miyamoto e cols., 2004; Ponder e cols., 2007a).

De fato, por se tratar de mecanismos de defesa similares, o nível de ansiedade do sujeito tem sido correlacionado com sua suscetibilidade ao medo aprendido. Esta relação vem sendo útil tanto em estudos com humanos (p.ex. Baas e cols., 2004; Lissek e cols., 2005), como em roedores (p.ex. Smith e cols., 2006). Assim, o desenvolvimento de animais com níveis de ansiedade diferenciados pode ser adquirido através de uma seleção baseada no condicionamento a um estímulo aversivo (Ponder e cols., 2007a). Inclusive, estudos de mapeamento genético têm sugerido que padrões comportamentais relacionados à ansiedade e o medo condicionado estão relacionados a genes em comum (Aguilar e cols., 2002).

Contudo, na geração S4 do presente estudo, os animais selecionados para apresentarem diferentes níveis de congelamento (CBC e CAC) não diferiram significativamente em termos da porcentagem de congelamento no teste de CRC,

comparados aos animais não selecionados (Controle) e entre si. O fato dos animais da 4ª geração já terem sido testados num experimento similar alguns meses antes (vide item 3.5.2), pode ter sido responsável pela elevada porcentagem de congelamento observada (em torno de 90%). Na verdade, estes níveis estão muito acima dos já relatados em experimentos similares (p.ex. Fanselow, 2000; Radcliff e cols., 2000; Brandão e cols., 2007). Inclusive, Ponder e cols. (2007a), demonstraram que foram necessárias sete sessões de re-exposição ao contexto, sem a apresentação do estímulo aversivo, para que os animais apresentassem uma extinção do comportamento condicionado. Essa porcentagem elevada de congelamento aqui apresentada pode, portanto, ter dificultado o aparecimento de diferenças significativas entre os animais com diferentes níveis comportamentais, sugerindo que a aprendizagem prévia colocou os animais no mesmo patamar de ansiedade, sobrepujando o efeito do nível de ansiedade neste modelo do medo contextual.

Os resultados comportamentais observados no teste de CRC levantam, portanto, o seguinte questionamento: será que a seleção das linhagens foi feita segundo diferenças nos níveis de ansiedade dos animais ou na capacidade de aprendizado? Baseado em outros estudos utilizando modelos genéticos (Dichter, 1996; Ramos e cols., 2003; Hinojosa e cols., 2006; Ponder, 2007a), para solucionar tal questionamento, era de se esperar que os animais selecionados no modelo de CRC – utilizados no presente estudo – também apresentassem diferenças claras quando submetidos a outros modelos de ansiedade, como o LCE, caixa de transição claro/escuro e campo aberto (Pellow e cols., 1985; Costall e cols., 1989). Porém, as diferenças encontradas no teste do CRC para as linhagens CBC e CAC não foram corroboradas pelos resultados obtidos no teste do LCE.

Nos parâmetros clássicos do LCE, esperava-se que os animais com altos níveis de ansiedade (linhagem CAC) entrassem menos e permanecessem menos tempo nos braços abertos do LCE, enquanto que os animais com baixa ansiedade (CBC) apresentassem o perfil oposto. Já para os parâmetros etológicos, era esperado que a linhagem CAC tivesse os maiores níveis de espreitar e os menores nas de esquadrihar e exploração das

extremidades, enquanto que para os CBC era esperado o oposto. Este perfil foi baseado no fato do comportamento de espreitar ser considerado como um indicativo de maiores níveis de ansiedade, enquanto que as categorias de esquadrihar e exploração das extremidades como indicadores de menores níveis deste estado emocional (Cruz e cols, 1994; Fernandes e File, 1996; Setem e cols, 1999).

Contudo, para os parâmetros clássicos do LCE – porcentagem de entradas e tempo de permanência nos braços abertos – o perfil esperado não foi observado no presente estudo, uma vez que não foram detectadas diferenças significativas entre as linhagens sendo avaliadas, tanto na geração S3b, como na S4.

Os resultados observados no teste de LCE, e em comparação aos do CRC, podem ser devido, em parte, à possibilidade das linhagens testadas neste estudo terem sido selecionadas quanto à sua capacidade de aprendizado ou memória e não, necessariamente, de medo ou ansiedade, conforme mencionado anteriormente. Como os resultados do teste do LCE, que visavam esclarecer este aspecto, não foram suficientemente conclusivos, novos estudos são necessários para melhor elucidar este possível fator.

Ademais, existe a possibilidade que a seleção das linhagens tenha afetado, na verdade, a locomoção dos animais. Neste caso, a linhagem CBC poderia ter sido selecionada para apresentar um quadro de hiperatividade, enquanto que a CAC um de hipoatividade. Inclusive, como a análise do comportamento do LCE está diretamente relacionada ao parâmetro de locomoção dos animais no aparato experimental, existe uma preocupação em se analisar se as diferenças encontradas são, de fato, referentes às diferenças emocionais e não locomotoras (Liebsch e cols., 1998a). Neste sentido, a quantidade de entradas nos braços fechados do LCE é usualmente empregada como uma medida da atividade locomotora (Cruz e cols., 1994; Ramos e cols., 1997; Setem e cols., 1999). No presente trabalho, assim como o de outros autores (p.ex. Ramos e cols., 2003), os animais das diferentes linhagens e gerações não diferiram quanto ao número de

entradas no braço fechado do LCE. Isso sugere, portanto, que a locomoção dos animais não foi afetada pelo processo de seleção das diferentes linhagens.

Uma terceira possibilidade para as discrepâncias observadas entre os resultados do CRC e LCE, consiste na baixa quantidade de gerações selecionadas, uma vez que os animais utilizados pertenciam à 3ª e 4ª gerações. Na verdade, ao comparar os dados obtidos da 3ª com os da 4ª geração, pode-se observar que estes últimos se comportam mais próximos do esperado no LCE, tanto em relação às categorias clássicas, quanto às etológicas.

Diversos estudos utilizando modelos genéticos vêm relatando a existência de uma correlação positiva entre a geração sendo estudada e a seleção do nível de ansiedade desejado, ou seja, quanto maior o número da geração testada, mais evidentes tornam-se as diferenças analisadas (Crabbe e cols., 1999; Ramos e cols., 2003; Lassale, 2007). Inclusive, Ponder e cols. (2007a), também utilizando o modelo de CRC como parâmetro de seleção de linhagens com diferentes níveis comportamentais, verificaram que a 4ª geração dos animais selecionados para altos índices de congelamento ao contexto demonstraram um perfil mais ansiosos nos testes de LCE, campo aberto e caixa de claro/escuro, enquanto que os selecionados para baixos índices eram menos ansiosos.

Conforme visto em outros trabalhos que analisaram gerações consecutivas até a produção de uma linhagem estável (p.ex., Radcliff e cols., 2000; Ramos e cols., 2003; Ponder e cols., 2007a), espera-se obter resultados significativos entre as linhagens em testes com gerações posteriores a deste estudo, assim como o encontrado em outros estudos (Brunelli e Hofer, 2007; Ponder, 2007a; Gomes, 2008).

Em conjunto, os resultados obtidos no presente estudo sugerem que, pelo menos até a 4ª geração, o cruzamento seletivo de ratos com altos e baixos padrões de congelamento foi parcialmente eficiente na produção de linhagens com níveis comportamentais diferenciados. Adicionalmente, o modelo de CRC parece ser mais sensível em identificar possíveis diferenças comportamentais das linhagens mais ansiosas

selecionadas a partir da resposta de congelamento, uma vez que os dados obtidos com a linhagem CAC foram mais pronunciadas e significativas.

O fato das linhagens não terem diferido significativamente em todos os parâmetros analisados sugere que um grande número de genes, com pequeno efeito fenotípico, podem estar influenciando o comportamento selecionado (Lassale, 2007). Assimetrias na resposta à seleção bidirecional são freqüentes e podem ser causadas por fatores como deriva genética, seleção diferencial, seleção natural contra seleção artificial de traços, arquitetura genética ou interações com o ambiente (Falconer, 1987; Crabbe, 1999), em vista da natureza instável da maioria das medidas comportamentais. Até mesmo em ambientes altamente controlados e com genótipos idênticos, comportamentos relacionados às emoções podem variar significativamente de um experimento a outro e/ou entre laboratórios que usam exatamente o mesmo protocolo (Crabbe e cols., 1999).

5.2. Análise farmacológica nas linhagens CBC/CAC

Outro parâmetro analisado no presente estudo foi o possível efeito de manipulações farmacológicas do sistema serotoninérgico nas diferentes linhagens sendo avaliadas (Experimento 1). Para este fim, foi administrado o composto ipsapirona, na dose de 2,5 mg/kg. Ela, assim como suas análogas buspirona e gepirona, atua como agonista parcial dos receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT_{1A}, induzindo na prática clínica um efeito ansiolítico e antidepressivo (para revisão, ver Eriksson e Humble, 1990; Gaeff e cols., 1990, 1998; Chessick e cols., 2006).

A localização dos receptores 5-HT_{1A}, pré-sinápticamente, tem importantes correlações funcionais. A ativação dos autoreceptores somatodendríticos 5-HT_{1A} por agonistas seletivos inibe a neurotransmissão serotoninérgica (Montigny e Blier, 1992). No entanto, uma inibição da neurotransmissão serotoninérgica só ocorre quando há uma

indução duradoura, viabilizada por agonistas de receptores 5-HT_{1A}. Portanto, o efeito ansiolítico crônico das azaspironas parece decorrer de uma dessensibilização progressiva dos autoreceptores 5-HT_{1A} somatodendríticos (Blier e De Montigny, 1987; Motta e cols., 1992). Já o tratamento agudo com agonistas de receptores 5-HT_{1A}, além de não induzir esta dessensibilização pré-sináptica, aumenta a liberação de 5-HT na fenda sináptica devido à ativação pré-sináptica dos autoreceptores 5-HT_{1A}. Segundo a teoria serotoninérgica clássica da ansiedade, isso resulta em um efeito ansiogênico (Blier e cols., 1987; Montigny e Blier, 1992; Motta e cols., 1992; Silva e Brandão, 2000).

No teste de CRC, a administração da ipsapirona induziu um aumento significativo na porcentagem da resposta de congelamento dos animais, comparado aos que receberam salina, ou seja, gerou um efeito ansiogênico. O mesmo efeito também já foi observado com a administração aguda de outros tipos de agonistas do receptor serotoninérgico 5-HT_{1A} (p. ex. ipsapirona, buspirona, 8-OH-DPAT) (Silva e Brandão, 2000; Broiz e cols., 2008), apesar de uma ação ansiolítica ter sido verificada em alguns estudos (Wisłowska-Stanek e cols., 2005). Por outro lado, a administração crônica de agonistas de receptores 5-HT_{1A} parece induzir efeitos ansiolíticos, a exemplo da buspirona que é amplamente usada na prática clínica (Goa e Ward, 1986; Fulton e Brogden, 1997; Bond e cols., 2003). Porém, em modelos animais, principalmente naqueles envolvendo choque ou conflito, ela possui resultados inconsistentes (Witkin and Perez, 1989; Sanger, 1990; Martin e cols., 1993; Meneses e Hong, 1993; Benvenga e Leander, 1996;)

O LCE, por sua vez, é um teste de ansiedade amplamente usado em roedores, com sensibilidade comprovada para compostos benzodiazepínicos atuando na via GABAérgica (para revisão vide Rodgers e Cole, 1994). Porém, esse procedimento experimental gera dados contraditórios quando avalia compostos serotoninérgicos. Estes já induziram um efeito ansiogênico (Critchley e Handley 1987a; Critchley e cols., 1992; Klint, 1991; Motta e Brandão, 1992), ansiolítico (Critchley e Handley, 1987b; Setem e cols., 1999) ou nenhum efeito sobre os parâmetros clássicos de ansiedade analisados no LCE (Pellow e File, 1986; Critchley e Handley 1987a, 1987b; Pellow e cols., 1987; Moser e cols., 1990; File e

Andrews, 1991; Critchley e cols., 1992). Tais inconsistências levaram alguns autores a sugerirem que o LCE é insensível a compostos que atuam na via serotoninérgica, ou que este teste estaria medindo, em roedores, mecanismos que não têm relação com a ansiedade humana (Moser, 1989; Moser e cols., 1990).

No presente estudo, a administração da ipsapirona também não induziu um efeito significativo sobre os parâmetros clássicos no LCE, como a porcentagem de entradas e tempo de permanência nos braços abertos. Para os parâmetros etológicos, os resultados foram, na verdade, contraditórios. Ao mesmo tempo em que a ipsapirona causou um aumento no tempo despendido espreitando – efeito ansiogênico –, ela também induziu, de forma geral, um aumento na categoria esquadrinhar e exploração da extremidade dos braços abertos do LCE – efeito ansiolítico.

Diversos ligantes serotoninérgicos têm sido identificados como tendo efeitos que vão desde ansiolíticos ou ansiogênicos, para uma ausência completa de efeito em vários modelos animais (para revisão, vide Treit, 1991; Rodgers e cols., 1997). No LCE, mais especificamente, estas inconsistências podem ser consequência de diferenças laboratoriais como, por exemplo, a maneira de registrar o comportamento, o quanto e como é feita a manipulação (*handling*) prévia dos animais, a presença ou não de bordas protetoras ao longo dos braços abertos, o fato do animal ser ou não ingênuo, o nível de iluminação, a duração das sessões, a espécie utilizada, a linhagem, o número de animais mantidos em cada caixa-ninho e a hora do dia que ocorreu a sessão (Fernandes e File, 1996; para revisão vide Hogg, 1996; Rodgers e Cole, 1994). As causas específicas para esta maior vulnerabilidade dos ligantes 5-HT a esses fatores metodológicos continuam incertas.

Quanto comparados os animais CAC, CBC e Controle, foi vista uma resposta de congelamento ao contexto, na sessão teste, significativamente maior no grupo CAC/IPS, que no Controle/IPS. Este resultado sugere, novamente, que a linhagem CAC apresenta uma maior sensibilidade ao efeito do condicionamento no teste de CRC. No teste do LCE, as diferentes linhagens não diferiram significativamente entre si quando administrada a ipsapirona. Novas gerações destas linhagens são fundamentais para um melhor

esclarecimento a cerca dos efeitos de manipulações farmacológicas, a exemplo do que foi observado entre a 3ª e 4ª geração dos animais tratados apenas com salina.

Mesmo que as linhagens selecionadas quanto ao seu padrão de resposta de congelamento (CBC e CAC) não apresentaram grandes diferenças comportamentais quando submetidas aos diferentes tratamentos farmacológicos (salina vs. ipsapirona) nos testes de CRC e LCE, estudos desta natureza são importantes para o estabelecimento de linhagens com comportamentos emocionais extremos. Tais estudos também são necessários para o desenvolvimento de novos compostos com potencial valor terapêutico, uma vez que, em humanos, temos indivíduos com diferentes níveis de ansiedade. De fato, sabe-se que uma droga psicotrópica pode atuar diferentemente, de acordo com o nível de ansiedade sendo testado (p.ex. Keck e cols., 2005). Por exemplo, em altos níveis basais de parâmetros indicativos de medo/ansiedade, diferentes tratamentos farmacológicos aumentaram o comportamento de avaliação de risco, mas em níveis basais mais baixos, o mesmo tratamento teve seu efeito diminuído (Blanchard e cols., 1990a, 1990b, 1993; Liebsch e cols. , 1998b).

A relevância do desenvolvimento de linhagens de animais geneticamente selecionados tem sido amplamente estudada. Esse processo, no entanto, é longo e inexato, como por exemplo, os resultados apresentados pelas linhagens utilizadas no presente trabalho. Afim de melhorar o padrão comportamental das linhagens selecionadas de acordo com seu perfil genético, algumas medidas podem ser tomadas para estudos futuros, como: padronização das condições de alojamento e dos modelos experimentais dos dois laboratórios envolvidos na pesquisa (PUC-RJ e UnB); utilização de animais Controle submetidos ao mesmo processo de cruzamento seletivo, porém sem selecionar níveis comportamentais diferenciados; utilizar sempre animais ingênuos; testar os animais a serem selecionados em outros modelos de ansiedade clássicos, como campo aberto; expor os animais a serem selecionados em testes de aprendizado/memória, como o labirinto aquático de Morris; e promover o mesmo processo de seleção genética no laboratório da UnB, paralelamente ao que já é feito na PUC-RJ, para comparação futura.

6. CONCLUSÃO

De maneira geral, os resultados do presente trabalho apontaram para uma ausência de influência da seleção genética sobre o comportamento dos animais testados nos dois modelos comportamentais e sobre o efeito do tratamento farmacológico. Com base no exposto, pode-se concluir que: (a) a seleção genética não influenciou no perfil comportamental dos animais testados, uma vez que os sujeitos não tratados farmacologicamente não apresentaram diferenças nos parâmetros indicativos de ansiedade na maioria dos testes utilizados; (b) a linhagem CAC da geração S3b mostrou-se mais ansiosa que os animais Controle e CBC apenas no teste de CRC; (c) ao observar um comportamento diferenciado entre animais da mesma linhagem, mas de gerações diferentes, o nível de ansiedade foi influenciado pela geração dos animais selecionados; (d) a ipsapirona administrada de forma aguda teve efeito ansiogênico na maioria dos parâmetros comportamentais avaliados, sendo seu efeito mais eficiente na linhagem CBC; (e) o aprendizado prévio dos animais utilizados no experimento 2 prejudicou o aparecimento de diferenças comportamentais no modelo de CRC e elevou o nível de ansiedade dos animais testados no LCE; (f) o nível de ansiedade dos animais influenciou no efeito da ipsapirona, o que reforça o uso desse tipo de modelo animal em testes farmacológicos.

7. REFERÊNCIAS

- Aguilar, R., Gil, L., Flint, J., Gray, J., Dawson, G. R., Driscoll, P., e cols. (2002). Learned fear, emotional reactivity and fear of heights: a factor analytic map from a large F2 intercross of Roman rat strains. *Brain Res Bull*, 57: 17–26.
- Almeida, S. S., de Oliveira, L. M. e Graeff, F. G. (1991). Early life protein malnutrition changes exploration of the elevated plus-maze and reactivity to anxiolytics. *Psychopharmacology*, 103: 513-518.
- Andersen, M. L., Bignotto, M., Machado, R. B., Tufik, S. (2004). Different stress modalities result in distinct steroid hormone responses by male rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 37: 791-797.
- Artaiz, I., Romero, G., Zazpe, A., Monge, A., Calderó, J. M., Roca, J., Lasheras, B. e Del Rio, J. (1995). The pharmacology of VA21B7: an atypical 5-HT₃ receptor antagonist with anxiolytic-like properties in animal models. *Psychopharmacology*, 117: 137-148.
- Avgustinovich, D. F.; Alekseyenko, O. V.; Koryakina, L. A. (2003). Effects of chronic treatment with ipsapirone and buspirone on the C57BL/6J strain mice under social stress. *Life Sciences*, 72: 1437–1444.
- Baas, J. M., Nugent, M., Lissek, S., Pine, D. S., Grillon, C. (2004). Fear conditioning in virtual reality contexts: a new tool for the study of anxiety, *Biological Psychiatry*, 55: 1056–1060.
- Baldi, E., Lorenzini, C. A., Bucherelli, C. (2004). Footshock intensity and generalization in contextual and auditory-cued fear conditioning in the rat. *Neurobiology of Learning and Memory*, 81: 162–166.
- Barnes, N. M., Sharp, T. (1999). A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology*, 38: 1083-1152.
- Benvenga, M. J., Leander, J. D. (1996). Anticonflict effects of 5HT_{1A} agonists in pigeons are dependent on the level of response suppression. *Behav Pharmacol.*, 7: 540–550.

- Blanchard, D. C., Blanchard, R. J., Tom, R. J. (1990a). Diazepam changes risk assessment in an anxiety/defense test battery. *Psychopharmacology*, 101: 511-518.
- Blanchard, D. C.; Blanchard, R. J.; Rodgers, R. J.; Weiss, S. M. (1990b). Pharmacological and neural control of anti-predator defense in the rat. *Aggress. Behav.*, 16:165–176.
- Blanchard, R. J., Yudko, E. B., Rodgers, R. J., Blanchard, D. C. (1993). Defense system psychopharmacology: an ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. *Behavioural Brain Research.*, 58: 155-165.
- Blanchard, D. C., Blanchard, R. J. (1998). Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. *Annual Reviews of Psychology*, 39: 43-68.
- Blanchard, D. C., Griebel, G., Blanchard, R. J., (2001). Mouse defensive behaviors: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 25: 205– 218.
- Blanchard, D. C., Griebel, G., Blanchard, R. J. 2003. The Mouse Test Battery: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. *Eur J Pharmacol*, 463: 97– 116.
- Blier, P., De Montigny, C. (1987). Modification of 5-HT neuron properties by sustained administration of the 5-HT_{1A} agonist gepirone: Electrophysiological studies in the rat brain. *Synapse*, 1: 470–480.
- Blier, P., De Montigny, C., Chaput, Y. (1987). Modifications of the serotonin system by antidepressant treatments: Implications for the therapeutic response in major depression. *J. Clin. Psychopharmacol*, 7: 24–35.
- Boess, F. G., Martin, I. L. (1994). Molecular biology of 5-HT receptors. *Neuropharmacology*, 33: 275-317.
- Bond, A. J., Wingrove, J., Baylis, M., Dalton, J. (2003). Buspirone decreases physiological reactivity to unconditioned and conditioned aversive stimuli. *Psychopharmacology*, 165: 291-295.
- Bouton, M. E., Bolles, R. C. (1980). Conditioned fear assessed by freezing and by the suppression of three different baselines. *Anim Learn Behav.*, 8: 429–434.

- Brandão, M. L., Troncoso, A. C., Melo, L. L., Sandner, G., (1997). Active avoidance learning using brain stimulation applied to the inferior colliculus as negative reinforcement in rats: evidence for latent inhibition. *Neuropsychobiology*, 35: 30–35.
- Brandão, M. L., Troncoso, A. C., De Souza Silva, M. A., Huston, J. P. (2003). The relevance of neuronal substrates of defense in the midbrain tectum to anxiety and stress: empirical and conceptual considerations, *European Journal of Pharmacology*, 463: 225–233.
- Brandão, M., Zanoveli, J. M., Ruiz-Martinez, R. C., Oliveira, L. C., Landeira-Fernandez, J. (2007). Different patterns of freezing behavior organized in the periaqueductal gray of rats: Association with different types of anxiety. *Behavioural Brain Research*. Article in Press, Corrected Proof.
- Broiz, A. C., Oliveira, L. C., Brandão, M. C. (2008). Regulation of conditioned and unconditioned fear in rats by 5-HT_{1A} receptors in the dorsal periaqueductal gray. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 89: 76-84.
- Brunelli, S. A., Hofer, M. A. (2007). Selective breeding for infant rat separation-induced ultrasonic vocalizations: Developmental precursors of passive and active coping styles. *Behavioural Brain Research*, 182: 193-207.
- Calabrese, E. J., Bachmann, K. A., Bailer, A. J., Bolger, P. M., Borak, J., Cai, L., e cols. (2007). Biological stress response terminology: Integrating the concepts of adaptive response and preconditioning stress within a hormetic dose–response framework, *Toxicol Appl Pharmacol.*, 222: 122–128.
- Caldarone, B., Saavedra, C., Tartaglia, K., Wehner, J. M., Dudek, B. C., Flaherty, L. (1997) Quantitative trait loci analysis affecting contextual conditioning in mice. *Nat Genet.*, 17: 335–337.
- Cao, B. J. e Rodgers, R. J. (1997). Influence of 5-HT_{1A} receptor antagonism on plus maze behavior in mice II WAY 100635, SDZ 216-525 and NAN 190. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 58: 593-603.

- Chessick, C. A., Allen, M. H., Thase, M., Miralha, A. B. C., Kapczinski, F. F., Lima, M. S., Souza, J. J. S. (2006). Azapirones for generalized anxiety disorder. *Cochrane Database Syst Rev.*, 19;3.
- Cole, J. C. e Rodgers, R. J. (1994). Ethological evaluation of the effects of acute and chronic buspirone treatment in murine elevated plus-maze test: Comparison with haloperidol. *Psychopharmacology*, 4: 288-296.
- Conti, L. H., Jirout, M., Breen, L. Vanella, J. J., Schork, N. J., Printz, M. P. (2004). Identification of quantitative trait Loci for anxiety and locomotion phenotypes in rat recombinant inbred strains. *Behaviour Genetics*, 34: 93-103.
- Cooper, J. R., Bloom, F. E., Roth, R. H. (1996). Serotonin (5-Hydroxytryptamine) and Histamine. In: Cooper, J.R., Bloom, F.E., Roth, R.H. (Eds.), *The Biochemical Basis of Neuropharmacology*, vol 7. Oxford University Press, New York, pp. 352-409.
- Costall, B., Jones, B. J., Kelly, M. E., Naylor, R. J., and Tomkins, D. M. (1989). Exploration of mice in a black and white test box: Validation as a model of anxiety, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 32:777–785.
- Crabbe, J. C. (1999). Animal models in neurobehavioral genetics: Methods for estimating genetic correlation. In: B. C. Jones, and P. Mormède (eds.), *Neurobehavioral genetics: Methods and applications*, pp. 121–138, Boca Raton: CRC Press.
- Critchley, M. A., Handley, S. L. (1987a). 5-HT_{1A} ligand effects in the X-maze anxiety test. *Br. J. Pharmacol.*, 92: 660P.
- Critchley, M. A., Handley, S. L. (1987b). Effects on the X-maze anxiety model of agents acting at 5-HT₁ and 5-HT₂ receptors. *Psychopharmacology (Berlin)*, 93: 502–506.
- Critchley, M. A. E., Njung'e, K., Handley, S. L. (1992). Actions and some interactions of 5-HT_{1A} ligands in the elevated X-maze and effects of dorsal raphe lesions. *Psychopharmacology (Berlin)*, 106: 484–490.

- Cruz, A. P. M., Bueno, J. L. O., Graeff, F. G. (1993). Influence of stimulus preexposure and of context familiarity and conditioned freezing behavior. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 26: 615- 621.
- Cruz, A. P. M., Frei, F. e Graeff, F. G. (1994). Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacology, Biochemistry e Behavior*, 49: 171-176.
- Cruz, A. P. M., Zangrossi, H., Graeff, F. G. (1995). Psicobiologia da ansiedade. In: Rangé, B. P.(org) . *Psicoterapia Comportamental e Cognitiva: pesquisa, prática, aplicações e problemas*. Campinas, Editorial Psy, p. 301-312.
- Cruz, A. P. M., Zangrossi, H., Graeff, F. G. e Landeira-Fernandez, J. (1997). Modelos Etofarmacológicos e suas Implicações Para a Seleção de Drogas Ansiolíticas. *Psicologia: Teoria e Pesquisa*, 13: 269-278.
- Darwin, C. (1859). *Origem das espécies*. Belo Horizonte: Ed. Itatiaia [reimpresso, 2002]
- Darwin, C. (1872): *The Expression of the Emotions in Man and Animals*. Chicago: University of Chicago Press [reprint, 1965].
- Davis, M. (1986). Pharmacological and anatomical analysis of fear conditioning using the fear-potentiated startle paradigm. *Behavioral Neuroscience*, 100: 814-824.
- De Boer, S. F.; Lesourd, M.; Mocaer, E.; Koolhaas, J. M. (1999). Selective antiaggressive effects of alnespirone in resident-intruder test are mediated via 5-hydroxytryptamine_{1a} receptors: a comparative pharmacological study with 8-hydroxy-2- ipropylaminotetralin, ipsapirone, buspirone, eltoprazine, and way-100635. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 288: 1125-1133.
- Deakin, J. F. W., Graeff, F. G. (1991). 5-HT and mechanisms of defense. *Journal of Psychopharmacology*, 5: 305-315.
- Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders - Fourth Edition (DSM-IV)*. American Psychiatric Association, Washington D.C. 1994.

- Diamond, D. M., Park, C. R., Heman, K. L., Rose, G. M. (1999). Exposing rats to a predator impairs spatial working memory in the radial arm water maze. *Hippocampus*, 9: 542–552
- Dichter, G. S., Brunelli, S. A., Hofer, M. A. (1996). Elevated plus-maze behavior in adult offspring of selectively bred rats, *Physiology & Behavior*, 60: 299–304.
- Ennaceur, A., Michalikova, S., Van Rensburg, R., Chazot, P. L. (2006). Models of anxiety: responses of mice to novelty and open spaces in a 3D-maze, *Behav Brain Res*, 174: 9–38.
- Eriksson, E., Humble, M. (1990). Serotonin in psychiatric pathophysiology: A review of data from experimental and clinical research. In: Pohl, R.; Gershon, S., eds. *Progress in basic clinical pharmacology*, vol. 3: The biological basis of psychiatric treatment. Basel: Karger; 66-1 19.
- Falconer, D. S. (1987). *Introdução à genética quantitativa*, p. 279, Imprensa Universitária da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- Fanselow, M. S., Helmstetter, F. J. (1988). Conditional analgesia, defensive freezing, and benzodiazepines. *Behav. Neurosci*, 102: 233–243.
- Fanselow, M.S. (1990). Factors governing one-trial contextual conditioning. *Animal Learning and Behavior*, 18: 264-270
- Fanselow, M. S., Ledoux, J. E. (1999). Why we think plasticity underlying Pavlovian fear conditioning occurs in the basolateral amygdala. *Neuron*, 23: 229-232.
- Fanselow, M. S. (2000). Contextual fear, gestalt memories, and the hippocampus, *Behavioural Brain Research. Special issue: Pavlovian conditioning, behaviour and the brain*, 110: 73–81.
- Fendt, M., Fanselow, M. S. (1999). The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 23: 743-760.
- Fernandes, C., File, S. E., Berry, D. (1996). Evidence against oppositional and pharmacokinetic mechanisms of tolerance to diazepam's sedative effects. *Brain Res.*, 734: 236–242.

- Fernandes, C., File, S. (1996). The influence of open arm ledges and maze experience in the elevated plus-maze. *Pharmacol. Biochem. Behav*, 54: 21–30.
- Ferreira, G. G. S. (2005), *Atenuação de estados de ansiedade em ratos expostos ao labirinto em cruz elevado como efeito de infusões de um antagonista serotoninérgico no hipocampo ventral*. Dissertação de Mestrado. Instituto de Psicologia, UnB, Brasília. 76p.
- File, S. E., Hyde, J. R. (1978). Can social interaction be used to measure anxiety? *Br. J. Pharmacol*, 62: 19–24.
- File, S. E., Andrews, N. (1991). Low but not high doses of buspirone reduces the anxiogenic effects of diazepam withdrawal. *Psychopharmacology (Berlin)*, 105: 578–582.
- File, S. E. e Gonzalez, L. E. (1996). Anxiolytic effects in the plus-maze of 5-HT_{1A}-receptor ligands in dorsal raphe and ventral hippocampus. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 54: 123-128.
- Fulton, B., Brogden, R. N. (1997). Buspirone, an updated review of its clinical pharmacology and therapeutic applications. *CNS Drugs*, 7: 68–88.
- Geller, I., Seifter, J. (1960). The effects of meprobamate, barbiturates, d-amphetamine and promaxine on experimentally induced conflict in the rat. *Pharmacology*, 1: 482- 492.
- Goa, K. L., Ward, A. (1986). Buspirone: a preliminary review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy as an anxiolytic. *Drugs*, 32:114–129.
- Gomes, V.C. (2008). *Participação do Complexo Amigdalóide na Resposta de Congelamento em Ratos Geneticamente Selecionados*. Dissertação de Mestrado. Instituto de Psicologia, PUC, Rio de Janeiro.
- Gonzalez, L. E., Andrews, N., File, S. E. (1996). 5- HT_{1A} and benzodiazepine receptors in the basolateral modulate anxiety in the social interaction test, but not in the elevated plus maze test. *Brain Research*, 732: 145- 153.
- Gorman, J. M. (2003). Treating generalized anxiety disorder. *J. Clin Psychiatry*, 64: Suppl 2:24-9.

- Graeff, F. G., Shoenfeld, R. L. (1970). Tryptamine mechanisms in punished and non punished behavior. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 173: 277-283.
- Graeff, F. G. (1989). .Ansiolíticos. In: *Drogas psicotrópicas e seu modo de ação*. Ed. EPU, São Paulo. p.61-83.
- Graeff, F. G., (1990). Brain defense systems and anxiety. In: Roth, M., Burrow, G.D., Noyes, R. (Eds.), *Handbook of Anxiety*, vol. 3. Elsevier, New York, pp. 307–354.
- Graeff, F. G., Audi, E. A., Almeida, S. S., Graeff, E. O., Hunziker, M. H. (1990). Behavioral effects of 5-HT receptor ligands in the aversive brain stimulation, elevated plus-maze and learned helplessness tests. *Neurosci Biobehav Rev*, 14: 501-506.
- Graeff, F. G. (1997). Serotonergic systems. *Psychiatr. Clin. North Am*, 20: 723– 739.
- Graeff, F. G., Netto, C. F., Zangrossi, H. Jr. (1998). The elevated T-maze as an experimental model of anxiety. *Neurosci Biobehav Rev.*, 23: 237-246.
- Graeff, F. G. (1999). Ansiedade, In: Graeff, F.G. & Brandão, M.L. (eds.) – *Neurobiologia das Doenças Mentais*. 5ª ed. Lemos, São Paulo, pp. 135-78,
- Graeff, F. G., Hetem, L. A. B. (2004). Neurobiologia. In: Hetem, L.A.B., Graeff, F.G. (Eds.), *Transtornos de Ansiedade*, Atheneu, São Paulo, pp. 107-132.
- Griebel, G., Rodgers, R. J., Perrault, G. e Sanger, D. J. (1997). A comparative study of the effects of selective and non-selective 5-HT₂ receptor subtype antagonists in rat and mouse models of anxiety. *Neuropharmacology*, 36 (6): 793-802.
- Griebel, G., Simiand, J., Serradeil-Le Gal, C., Wagnon, J., Pascal, M., Scatton, B. e cols. (2002). Anxiolytic- and antidepressant-like effects of the non-peptide vasopressin V_{1b} receptor antagonist, SSR149415, suggest an innovative approach for the treatment of stress-related disorders, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 99: 6370–6375.
- Gunnar, M., Quevedo, K. (2007). The Neurobiology of stress and development. *Annual Review Psychology*, 28: 145-173.

- Handley, S. L. and Mithani, S. (1984). Effects of alpha-adrenoceptor agonists in a maze-exploration model of "fear"-motivated behavior. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 327: 1262-1267.
- Hendley, E. D., Atwater, D. G., Myers, M. M., Whitehorn, D. (1983). Dissociation of genetic hyperactivity and hypertension in SHR. *Hypertension*, 5: 211-217.
- Hendley, E. D., Ohlsson, W. G. (1991). Two new inbred rat strains derived from SHR: WKHA, hyperactive, and WKHT, hypertensive, rats. *Amer J Physiol*, 261: H583-H589.
- Hess, W. R., Brugger, M. (1943). Das subkortikale zentrum der affectiven abwehrreaktion. *Helv. Physiol. Pharmacol. Acta*, 1, 33-52.
- Hettema, J. M., Annas, P., Neale, M. C., Kendler, K. S., Fredrikson, M. (2003). A twin study of the genetics of fear conditioning. *Arch Gen Psychiatry*, 60: 702-708.
- Higgins, G. A., Bradbury, A. J., Jones, B. J., Oakley, N. R. (1988). Behavioural and biochemical consequences following activation of 5-HT₁-like and GABA receptors in the dorsal raphe nucleus of rat. *Neuropharmacology*, 27: 993-1001.
- Hinojosa, F. R., Spricigo, L. Jr., Izídio, G. S., Bruske, G. R., Lopes, D. M., Ramos, A. (2006). Evaluation of two genetic animal models in behavioral tests of anxiety and depression. *Behavioural Brain Research*, 168: 127-136.
- Hogg, S. (1996). A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 53: 271-275.
- Hoyer, D., Clark, D. E., Fozard, J. R., Hartig, P. R., Martin, G. R., Mylecharane, E. J., Saxena, P. R., Humphrey, P. P. (1994). International Union of Pharmacology classification of receptors of 5-Hydroxytryptamine (serotonin). *Pharmacology Review*, 46: 157-203.
- Iversen, S. D. (1984). 5-HT and anxiety. *Neuropharmacology*, 23: 1553-1560.
- Jenck, F., Schmitt, P., Karli, P. (1983). Morphine applied to the mesencephalic central gray suppresses brain stimulation escape. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 19: 189-195.

- Jenck, F., Moreau, J. L., Martin, J. R. (1995). Dorsal periaqueductal gray-induced aversion as a simulation of panic anxiety: elements of face and predictive validity. *Psychiatry Res.*, 57: 181–191.
- Jones, B. C. (2007). Some basics, mendelian traits, polygenic traits, complex traits. In: Jones, B.C., Mormede, P. (Eds.), *Neurobehavioral Genetics: methods and applications*. CRC press. USA. pp. 29-36.
- Kalin, N. H., Sherman, J. E., Takahashi, L. K. (1988). Antagonism of endogenous CRH systems attenuates stress-induced freezing behavior in rats. *Brain Res.*, 457: 130–135.
- Kapczinski, F., Buscnello, J. V., de Abreu, M. R., Carrão, A. D. (1998). Aspectos da fisiologia do triptofano. *Revista de Psiquiatria Clinica*, 25: 158-165.
- Keck, M. E., Sartori, S. B., Welt, T., Muller, M. B., Ohl, F., Holsboer, F., Landgraf, R., Singewald, N. (2005). Differences in serotonergic neurotransmission between rats displaying high or low anxiety/depression-like behaviour: effects of chronic paroxetine treatment. *Journal of Neurochemistry*, 92: 1170–1179.
- Kim, J., Gorman, J. (2005). The psychobiology of anxiety. *Clinical Neuroscience Research*, 4: 335-347.
- Klint, T. (1991). Effects of 8-OH-DPAT and buspirone in a passive avoidance test and in the elevated X-maze test in rats. *Behav. Pharmacol.*, 168: 481–489.
- Korte, S. M. (2001). Corticosteroids in relation to fear, anxiety and psychopathology. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 25: 117-142.
- Landeira-Fernandez, J., DeCola, J. P., Kim, J. J., Fanselow, M. S. (2006). Immediate Shock Deficit in Fear Conditioning: Effects of Shock Manipulations. *Behavioral Neuroscience*, 120: 873–879.
- Landgraf, R., Wigger, A. (2002). High vs. Low anxiety-related behavior rats: an animal model of extremes in trait anxiety. *Behav Genet*, 32: 301-314.

- Lassalle, J. M. (2007). Animal resources in behavioral neurogenetics. In: Jones, B.C., Mormede, P. (Eds.), *Neurobehavioral Genetics: methods and applications*. CRC press. USA. pp. 129-148.
- LeDoux, J. E., Iwata, J., Pearl, D., Reis, D. J. (1986). Disruption of auditory but not visual learning by destruction of intrinsic neurons in the medial geniculate body of the rat. *Brain Res*, 371: 395–399.
- LeDoux, J. E. (1998). Fear and the brain: where have we been, and where are we going? *Biological Psychiatry*, 44: 1229-1238.
- Ledoux, J. E. (2000). Emotion Circuits in the Brain. *Annual Review of Neuroscience*, 23:155 – 184.
- Liebsch, G., Linthorst, A. C. E, Neumann, I. D., Reul, J. M. H. M., Holsboer, F. M. D., Landgraf, R. (1998a). Behavioral, Physiological, and Neuroendocrine Stress Responses and Differential Sensitivity to Diazepam in Two Wistar Rat Lines Selectively Bred for High- and Low-Anxiety-Related Behavior. *Neuropsychopharmacology*, 19: 381-396.
- Liebsch, G., Montkowski, A., Holsboer, F., Landgraf, R. (1998b). Behavioural profiles of two Wistar rat lines selectively bred for high or low anxiety-related behaviour. *Behavioural Brain Research*, 94: 301–310.
- Lissek, S., Powers, A. S., Mc Clure, E. B., Phelps, E. A., Woldehawaiat, G., Grillon, C., Pine, D. S. (2005). Classical fear conditioning in anxiety disorders: a meta-analysis, *Behaviour Research and Therapy*, 43: 1391–1424.
- Lister, RG. Ethologically based animal models of anxiety disorders. *Pharmacolol. Therap.* 46: 321-340; 1990.
- Martin, J. R., Moreau, J. L., Jenck, F., Cumin, R. (1993). Acute and chronic administration of buspirone fails to yield anxiolytic-like effects in mouse operant punishment paradigm. *Pharmacol Biochem Behav*, 46: 905–910.
- Maxson, S. C. (2007). A history of behavior genetics. In: Jones, B.C., Mormede, P. (Eds.), *Neurobehavioral Genetics: methods and applications*. CRC press. USA. pp. 1-16.

- Menard J, Treit, D. (1999). Effects of centrally administered anxiolytic compounds in animal models of anxiety. *Neuroscience Biobehavioral Review*, 23: 591-613.
- Meneses, A., Hong, E. (1993). Modification of the anxiolytic effects of 5-HT_{1A} agonists by shock intensity. *Pharmacol Biochem Behav*, 46: 569–573.
- Miyamoto, J., Tsuji, M., Takeda, H., Nawa, H., Matsumiya, T. (2000). Pretreatment with diazepam suppresses the reduction in defensive freezing behavior induced by fluvoxamine in the conditioned fear stress paradigm in mice. *European Journal of Pharmacology*, 409: 81–84
- Miyamotoa, J., Tsujia, M., Takeda, H., Ohzekia, M., Nawa, H., Matsumiya, T. (2004). Characterization of the anxiolytic-like effects of fluvoxamine, milnacipran and risperidone in mice using the conditioned fear stress paradigm. *European Journal of Pharmacology*, 504: 97– 103.
- Montigny, C., Blier, P. (1992). Electrophysiological evidence for the distinct properties of presynaptic and postsynaptic 5-HT_{1A} receptors: Possible clinical relevance. In: Langer, S. Z.; Brunello, N.; Racagni, G.; Mendlewicz, J., eds. *Serotonin receptor subtypes: Pharmacological significance and clinical implications*. Vol. 1. Basel: Karger :80–88.
- Moreira, H. B. T. (2001). *Efeitos de microinjeções de um agonista e de um antagonista de receptor 5-HT₂ na matéria cinzenta periaquedutal dorsal de ratos submetidos a um modelo animal de ansiedade*. Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília, Brasília.
- Mormède, P., Ramos, A. (1999). Genetics and emotional behaviors—experimental studies. In: Jones BC, Mormède P, editors. *Neurobehavioral genetgenetics: methods and applications*. Boca Raton: CRC Press; pp. 301–315.
- Moser, P. C. (1989). An evaluation of the elevated plus-maze test using the novel anxiolytic buspirone. *Psychopharmacology (Berlin)*, 99: 48–53.

- Moser, P. C., Tricklebank, M. D., Middlemiss, D. N., Mir, A. K., Hibert, M. F., Fozard, J. R. (1990). Characterization of MDL 73005EF as a 5-HT_{1A} ligand and its effects in animal models of anxiety: comparison with buspirone, 8-OH-DPAT and diazepam. *Br. J. Pharmacol.*, 99: 343–349.
- Motta, V., Maissonette, S., Morato, S., Castrechini, P., Brandão, M. L. (1992). Effects of blockade of 5-HT₂ receptors and activation of 5-HT₁ receptors on the exploratory activity of rats in the elevated plus-maze. *Psychopharmacology (Berlin)*, 107: 135–139.
- Nesse, R. M. (1999). Proximate and evolutionary studies of anxiety, stress and depression: synergy at the interface. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 23: 895–903.
- Nicholas, A., Munhoz, C. D., Ferguson, D., Campbell, L., Sapolsky, R. (2006). Enhancing cognition after stress with gene therapy. *The Journal of Neuroscience*, 26: 11637–11643.
- Ninan, P. T., Cole, J. O. e Yonkers, K. A. (1998). Nonbenzodiazepine anxiolytics. In: Schatzberg, A.F. e Nemeroff, C.B. (Eds.). *Psychopharmacology*. American Psychiatry Press. Washington, pp. 287-300.
- Palmer, A. A. & Phillips, T. J. (2002). Effect of forward and reverse selection for ethanol-induced locomotor response on other measures of ethanol sensitivity. *Alcohol Clin Exp Res*, 26: 1322–1329.
- Pellow, S., Chopin, P., File, S. e Briley, M. (1985). Validation of open:close arm entries in a elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 14: 149-167.
- Pellow, S., File, S. E. (1986). Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav*, 24: 525–529.
- Pellow, S., Johnston, A. L., File, S. E. (1987). Selective agonists and antagonists for 5-hydroxytryptamine receptor subtypes, and interactions with yohimbine and FG 7142 using the elevated plus-maze test in rats. *J. Pharm. Pharmacol.*, 39: 917–928.

- Ponder, C. A., Kliethermes, C. L., Drew, M. R., Muller, J., Das, K., Risbrough, V. B., Crabbe, J. C., Conrad Gilliam, T., Palmer, A. A. (2007a). Selection for contextual fear conditioning affects anxiety-like behaviors and gene expression. *Genes, Brain and Behavior*, 6: 736-749.
- Ponder, C. A., Munoz, M. T., Gilliam, C., Palmer, A. A. (2007b). Genetic architecture of fear conditioning in chromosome substitution strains: relationship to measures of innate (unlearned) anxiety-like behavior. *Mamm Genome*, 18: 221–228.
- Radcliffe, R. A., Lowe, M. V., Wehner, J. M. (2000). Confirmation of Contextual Fear Conditioning QTLs by Short-Term Selection. *Behavior Genetics*, 30: 183-191.
- Ramos, A., Berton, O., Mormède, P., and Chaouloff, F. (1997). A multiple-test study of anxiety-related behaviours in six inbred rat strains. *Behav. Brain Res.*, 85: 57–69.
- Ramos, A., Mormede, P. (1998). Stress and emotionality: a multidimensional and genetic approach. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 22: 33-57.
- Ramos, A., Correia, E. C., Izidio, G. S., Bruske, G. R. (2003). Genetic selection of two new rat lines displaying different levels of anxiety-related behaviors. *Behavior Genetics*, 33: 657-668.
- Ramos, A., Mormede, P. (2007). Genetic analysis of emotional behaviors using animal models. In: Jones, B.C., Mormede, P. (Eds.), *Neurobehavioral Genetics: methods and applications*. CRC press. USA. pp. 291-306.
- Robichaud, R. C., Sledge, K. L. (1969). The effects of p-chlorophenylalanine on experimentally induced conflict in the rat. *Life Science*, 8: 965- 969.
- Rodgers, R. J., Cole, J. C. (1994). The elevated plus-maze: Pharmacology, methodology and ethology. In: Cooper, S. J.; Hendrie, C. A., eds. *Ethology and psychopharmacology*. Chichester: John Wiley and Sons. p. 9–44.
- Rodgers, R. J., Cao, B. J., Dalvi, A., Holmes, A. (1997). Animal models of anxiety: An ethological perspective. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 30: 289–304.
- Sanger, D. J. (1990). Effects of buspirone and related compounds on suppressed operant responding in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 254: 420–427.

- Sapolsky, R. M. (1993). Neuroendocrinology of the Stress-response. In: Becker, J. B.; Breedlove, S. M.; Crews, D.(Eds) *Behavioral endocrinology*. The MIT Press, Cambridge, London. p. 287-324,
- Setem, J., Pinheiro, A. P., Motta, V. A., Morato, S., Cruz, A. P. (1999). Ethopharmacological analysis of 5-HT ligands on the rat elevated plus-maze. *Pharmacology Biochemistry Behavior*, 62: 515-521.
- Silva, R. C. B., Brandão, M. L. (2000). Acute and chronic effects of gepirone and Fluoxetine in Rats Tested in the Elevated Plus-maze: An Ethological Analysis. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 65: 209–216.
- Smith, L. N., McDonald, C. G., Bergstrom, H. C., Brielmaier, J. M., Eppolito, A. K., Wheeler, T. L., e cols. (2006). Long-term changes in fear conditioning and anxiety-like behavior following nicotine exposure in adult versus adolescent rats, *Pharmacol Biochem Behav*, 85: 91–97.
- Staay, J. (2006). Animal models of behavioral dysfunctions: Basic concepts and classifications, and an evaluation strategy. *Brain Research Reviews*, 52: 131-159.
- Stein, L., Wise, C. D., Berger, D. B. (1973). Antianxiety actions of benzodiazepines: Decreases in activity of serotonin neurons on the punished systems. In: S. Gratini, E., Mussini e L. O. Randall (Eds) *Benzodiazepines*. New York, Raven Press, p. 299-326.
- Treit, D. (1991). Anxiolytic effects of benzodiazepines and 5-HT_{1A} agonists: Animal models. In: Rodgers, R. J.; Cooper, S. J., eds. *5-HT_{1A} agonists, 5-HT₃ antagonists and benzodiazepines: Their comparative behavioural pharmacology*. Chichester: John Wiley & Sons. p. 107–131.
- Treit, D., Menard, J., Royan, C. (1993). Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 44: 463- 469.
- Tucker, D. C., Johnson, A. K. (1981). Behavioral correlates of spontaneous hypertension. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 5: 463-471.

- Vianna, D. M. L., Graeff, F. G., Landeira-Fernandez, J., Brandão, M. L. (2001). Lesion of the ventral periaqueductal gray reduces conditioned fear but does not change freezing induced by stimulation of the dorsal periaqueductal gray. *Learn. Mem.*, 8: 164-169.
- Wahlsten, D., Bachmanov, A., Finn, D. A., Crabbe, J. C. (2006). Stability of inbred mouse strain differences in behavior and brain size between laboratories and across decades. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103: 16364–16369.
- Wise, C. D., Berger, B. D., Stein, L. (1972). Benzodiazepines: anxiety-reducing activity by reduction of serotonin turnover in the brain. *Science*, 177: 180-3.
- Wisłowska--Stanek, A., Zienowicz, M., Lehner, M., Taracha, E., Bidzinski, A. Maciejak, P., e cols. (2005). Buspirone attenuates conditioned fear-induced c-Fos expression in the rat hippocampus, *Neurosci Lett*, 389: 115–120.
- Witkin, J. M., Perez, L. A. (1989). Comparison of effects of buspirone and gepirone with benzodiazepines and antagonists of dopamine and serotonin receptors on punished behavior of rats. *Behav Pharmacol*, 1: 247–254.
- Zangrossi, H. J., Graeff, F. G. (2004). Modelos animais. Em: Hetem, L. A. B. e Graeff, F. G. (eds). *Transtornos de ansiedade*. Atheneu. Sao Paulo. Pp. 55-74.