UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS
DEPARTAMENTO DE PSICOLOGIA
PROGRAMA DE PG EM PSICOBIOLOGIA
LABORATÓRIO DE COMPORTAMENTO EXPLORATÓRIO

THIAGO MARQUES DE BRITO

Seleção genética da exploração dos braços abertos por ratos albinos e seu efeito na emocionalidade e aprendizagem

Ribeirão Preto
2015

THIAGO MARQUES DE BRITO

Seleção genética da exploração dos braços abertos por ratos albinos e seu efeito na emocionalidade e aprendizagem

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Psicobiologia

Orientador: Prof. Dr. Silvio Morato de Carvalho

Ribeirão Preto
2015

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Brito, Thiago Marques
Seleção genética da exploração dos braços abertos por ratos albinos e seu efeito na emocionalidade e aprendizagem.
67 p.; 20 il. ; 30 cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Psicobiologia.
Orientador: Morato, Silvio.

1. Comportamento exploratório. 2. Seleção genética bidirecional. 3. Ansiedade. 4. Medo. 5. Impulsividade. 6. Aprendizagem aversiva.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Thiago Marques de Brito

"Seleção genética da exploração dos braços abertos por ratos albinos e seu efeito na emocionalidade e aprendizagem".

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências. Área: Psicobiologia.

Aprovado em: _____ /_____ /_____

Banca Examinadora

Prof (a). Dr (a)._____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof (a). Dr (a)._____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof (a). Dr (a)._____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof (a). Dr (a)._____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Dedico este trabalho à Luciana Kimie, minha musa inspiradora, companheira de longa data, melhor amiga e confidente, figura indispensável a minha vida.

Agradecimentos

A Deus, por ter permitido que eu caminhasse até aqui tanto na minha vida pessoal como acadêmica.

Ao meu orientador e amigo Silvio Morato, pela confiança depositada em mim, por todos os ensinamentos compartilhados ao longo desses 6 anos, pela imensurável contribuição tanto pessoal como acadêmica, pelas parcerias na música, cafés, e, claro, cervejas e pela amizade sincera.

Ao meu eterno mestre e grande amigo Amauri Gouveia Jr., por ter me iniciado na carreira acadêmica, por ter despertado em mim a paixão pela pesquisa, por ter contribuído para que eu estivesse hoje na pós-graduação e laboratório que sempre desejei, pelas sempre bem-humoradas conversas, por muitas vezes ter sido um pai, irmão, ou simplesmente, e não menos importante, um indispensável amigo.

Ao professor Luiz Guilherme Araújo por toda a compreensão e amizade dispensada durante a finalização dessa tese.

À banca examinadora, pela atenção dispensada na leitura da dissertação.

À Renata Vicentini, pela amizade sincera, por toda ajuda, conselhos e pro-atividade na resolução de problemas.

A todos os funcionários da sessão de pós-graduação, pelo auxílio e disponibilidade em ajudar sempre que necessário.

Ao amigo Paulinho Castrechini, pelos vários ensinamentos, conversas hilárias, e ajuda em todos os momentos necessários à realização dessa tese.

Aos amigos do laboratório de Comportamento Exploratório, Javi, Julian e Carol, pelo companheirismo, ajuda e contribuição na minha adaptação a Ribeirão Preto e a USP.

Ao pequeno/grande companheiro e amigo de laboratório Rafa, pelas várias contribuições ao longo do andamento e finalização dessa tese.

Ao amor da minha vida Luciana Kimie, a quem também dedico essa tese, por sempre estar disposta a oferecer ouvidos, palavras e abraços nos momentos mais oportunos. Por todo o companheirismo, amor, dedicação, incentivo, e paciência ao longo desses 12 anos. Por permitir que a minha vida seja leve e feliz.

Aos meus pais, Geny e Isael, pelo amor e esforço incondicional que permitiram que eu chegasse até aqui. Por sempre terem sido um modelo de honestidade, humildade, esforço pessoal, amizade e companheirismo. Mamãe, Papai, obrigado por tudo. Amo vocês!

Aos meus amigos/irmãos Sil, Rafa, Ginê e Gorete, por todo carinho, amor, amizade, companheirismo e sinceridade ao longo desses 11 anos. Por terem sido determinantes para minha formação pessoal e acadêmica, e por me fazer acreditar que o fato de se compartilhar pai e mãe, não é condição *sine qua non* para chama-los de irmãos.

Ao meu grande irmão “manolo” Beto, por ter sido minha família ao longo de vários anos em Ribeirão Preto, por toda a dedicação, companheirismo e amizade, por me socorrer nas horas que mais precisei, e por compartilhar os imensuráveis momentos felizes na terrinha do chopp.

Às queridas, Josi e Paty, por todo o carinho, incentivo, amor e por me fazer acreditar que a primeira sílaba da palavra cunhada, é um mero capricho da língua portuguesa, pois não reflete a verdadeira relação de carinho, respeito, amizade, admiração e amor que tenho por vocês.

Ao amigo Jão, pelo carinho, amizade e companheirismo.

Ao meu amigo/irmão Marcelo, carinhosamente chamado de Gordinho, por todos esses anos de amizade, carinho, sinceridade e cumplicidade, compartilhando os momentos mais importantes e tristes de nossas vidas.

Aos meus avós paternos e maternos, Olivia, Otacílio (*in memorian)*, Brito (*in memorian)* e Maria (*in memorian)* por todas as orações, incentivo, carinho e amor.

Aos avós escolhidos por mim, Inézio e Ana (*in memorian)*, que aprendi a respeitar e amar como se sempre estivessem presentes em minha vida.

À minha sobrinha Duda, pelo amor e carinho e por sempre tornar o meu final de semana maravilhoso, mesmo que os demais eventos conspirem contra isso.

Ao meu sogro e sogra, Vilson e Helena, por todo carinho e amizade.

Aos meus amigos da psicobiologia, Brunão, Léo, Rui, Hugo, Fantin, Diegão, Rafa, Fernandinho, Lucas e Dudu, pelos momentos e histórias memoráveis e divertidíssimas do café, bandejão, corredores e congressos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pelo apoio financeiro.

“Todo homem que lê demais e usa o cérebro de menos, adquire a preguiça de pensar”.

Albert Einstein

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 12

2 OBJETIVOS 16

3 MATERIAL E MÉTODO 16
3.1. Sujeitos 16
3.2. Condições do Biotério 17
3.3. Equipamento 21
3.4. Procedimento 26
3.5 Análise dos Resultados

4. RESULTADOS 26
4.1. Seleçâo das linhagens Filô-HE e Filô-LE 26
4.2. Testes realizados nas gerações S6, S9 e S12 29
4.3. Comparações entre a geração S12 e animais controles 39

5. DISCUSSÃO 47
5.1. Seleçâo das linhagens Filô-HE e Filô-LE 47
5.2. Testes realizados nas gerações S6, S9 e S12 49
5.3. Comparações entre a geração S12 e animais controles 54

6. CONCLUSÃO 60

7. REFERÊNCIAS 61

RESUMO

BRITO, T. M. **Seleção genética da exploração dos braços abertos por ratos albinos e seu efeito na emocionalidade e aprendizagem.** 2015. 67f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

A seleção genética de comportamentos relacionados a um componente emocional do tipo ansiedade, associada ao estudo das possíveis influências desse traço sobre outros componentes emocionais como o medo, impulsividade e tarefas de aprendizagem aversiva, podem contribuir para o entendimento da ansiedade, bem como, fornecer uma base sólida para investigações neurofisiológicas, bioquímicas e moleculares da mesma. Assim, o presente trabalho selecionou duas linhagens de ratos da linhagem Wistar: uma com característica de alta exploração dos braços abertos do labirinto em cruz-elevado (Filô-HE) e outra com baixa exploração desses braços (Filô-LE), e comparou os efeitos da seleção dessas duas linhagens sobre comportamentos associados à ansiedade, medo, impulsividade e aprendizagem aversiva. Para isso, um lote de animais fornecidos pelo Biotério Central da USP-RP foram distribuídos em dois grupos distintos: (1) os que apresentavam maior exploração dos braços abertos do Labirinto em Cruz Elevado (LCE) - (Filô-HE) e (2) os com menor exploração desses braços (Filô-LE) ao longo de doze gerações (de S1 a S12, sem contar o grupo inicial do qual derivam as gerações). Na sexta, nona e décima segunda gerações, os animais foram submetidos aos seguintes testes comportamentais: LCE, Campo Aberto (somente na décima segunda), esquiva passiva, labirinto aquático de Morris (somente na décima segunda), sobressalto (que avalia a resposta de medo), e gradiente de aversão elevado (desenvolvido em nosso laboratório para medir impulsividade). Os dados indicaram a seleção de duas linhagens de ratos Wistar com características distintas para a exploração dos braços abertos do LCE. De um lado, foi selecionada a linhagem Filô-HE, que possui como principal característica, altos índices de exploração de ambientes que geralmente são evitados por outros animais. De outro, foi selecionada (até a oitava geração), a linhagem Filô-LE, que explorava muito pouco ambientes potencialmente aversivos. Tais resultados podem ser interpretados, respectivamente, como (a) baixa e alta frequência de comportamentos associados à ansiedade e medo, (b) baixa e alta frequência de comportamentos associados à impulsividade, (c) altos e baixos níveis de dificuldade na aprendizagem relacionada a memórias emocionais, ou (d) até mesmo o efeito conjunto de todas essas características comportamentais. Porém, para um conhecimento mais confiável, é necessário que os estudos supracitados passem a explorar aspectos neurofisiológicos, psicofarmacológicos, bioquímicos e genéticos, ampliando a investigação dos componentes emocionais selecionados. Bem como, promovendo um controle mais rígido dos traços selecionados e de suas relações com outros componentes que possam interferir na seleção.

Palavras-Chave: Comportamento exploratório, Seleção genética bidirecional, Ansiedade, Medo, Impulsividade, Aprendizagem aversiva.

ABSTRACT

BRITO, T. M. **Genetic selection of an elevated plus-maze open arms by albino rats and its effect in emotion and learning.** 2015. 63f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

The genetic selection of behaviors related to an anxiety-like emotional component, associated to the study of the possible influences of this trait over other emotional components like fear, impulsivity and aversive learning, can contribute to the understanding of anxiety as well as supply a solid basis for its neurophysiological, biochemical and molecular investigation. Thus, the present work selected two strains of Wistar rats: one characterized by a high exploration of the open arms of an elevated plus-maze (Filô-HE) and another with a low exploration of these arms (Filô-LE), and compared the effects of such a selection on behaviors associated with anxiety, fear, impulsivity and aversive learning. For this, a batch of animals supplied by the animal house of the USP at Ribeirão Preto were distributed into two distinct groups: (1) one presenting more exploration of the open arms of an elevated plus-maze (EPM) — Filô-HE — and (2) one with less open arm exploration —Filô-LE — along twelve generations (from S1 to S12, not counting the initial group from which all generations derived). On the sixth, ninth and twelfth generations the animals were submitted to the following behavioral tests: LCE, open-field (only in the twelfth generation), passive avoidance, Morris aquatic maze (only in the twelfth generation), startle (which evaluates a fear response), and elevated aversion gradient (developed in our laboratory to measure impulsivity). The data indicated a selection of two Wistar rats strains with distinct characteristics concerning the exploration of the open arms of and EPM. On the one hand, the strain Filô-HE was selected exhibiting as the main characteristic high measures of exploration of environments which are usually avoided by other animals. On the other hand, the strain Filô-LE was selected (up to the eighth generation) exhibiting very little exploration of potentially dangerous environments. These results may be interpreted as, respectively, (a) low and high frequency of behaviors associated to anxiety and fear, (b) low and high frequency of behaviors associated to impulsivity, (c) high and low levels of difficulty in learning related to emotional memories, or (d) even the joint effect of all these behavioral characteristics. However, for a more reliable knowledge it is necessary that the studies above begin to explore neurophysiological, psychopharmacological, biochemical and genetic aspects, broadening the investigation ot hte selected emotional components, as well as promoting a more strict control of the selected traits and of its relations with other components that may interfere in the selection.

Keywords: Exploratory behavior, Bidirectional genetic selection, Anxiety, Fear, Impulsivity, Aversive learning.

1 INTRODUÇÃO

Ramos et al. (2003) definem seleção genética bidirecional como “o cruzamento seletivo de animais com maior ou menor score para um determinado traço de comportamento ao longo de gerações”. Esse tipo de seleção permite que, com um número menor de cruzamentos (entre 3 e 20 gerações), se possa obter com segurança duas linhagens distintas de animais, com comportamentos que se diferem a partir das características selecionadas nos cruzamentos ao longo das gerações.

O clássico trabalho de Bignami (1965) descreveu os resultados dos cruzamentos de cinco gerações de ratos Wistar expostos à tarefa de esquiva condicionada. A seguir, os ratos de cada geração foram colocados em uma shuttle-box e selecionados conforme o número de respostas de esquiva (alta ou baixa frequência de respostas de esquiva). Os animais desses dois grupos eram cruzados entre si, produzindo, ao final de cinco gerações, duas linhagens distintas em termos de respostas de esquiva: uma com altas taxas e outra com baixas taxas de respostas de esquiva (linhagens *Roman+ e Roman*).

Brush et al. (1985; para uma revisão, ver BRUSH, 2003), que também já haviam selecionado ratos com base em respostas de esquiva (*Siracuse*+ e *Siracuse*-), levantaram a possibilidade de que as características selecionadas nesses tipos de estudos estariam relacionadas a emocionalidade, entendida como o conjunto de traços emocionais herdados que são expressados a partir de determinadas características comportamentais, e não à resposta de esquiva propriamente dita.

No entanto, não havia relatos de seleção de emocionalidade até Liebsch et al. (1998a). Esses autores, entendendo que o tempo gasto nos braços

abertos de um labirinto em cruz elevado (LCE) seria um bom indicador de ansiedade (vale dizer de emocionalidade), usaram esse critério para acasalar seletivamente ratos Wistar das linhagens *Leipsig*+ e *Leipsig*-. Estas linhagens que apresentavam respectivamente, alto e baixo desempenho comportamental no tarefa de discriminação de brilho motivada pelo choque nas patas foram acasaladas com linhagens de ratos Wistar que apresentavam alta e baixa exploração dos braços abertos do LCE. Relataram que, animais da linhagem com baixa ansiedade e alto desempenho na tarefa de discriminação eram mais ativos e frequentavam mais o centro do campo aberto que os animais da linhagem com características opostas. Da mesma forma, estes mesmos animais apresentaram comportamentos que indicavam maior resistência a situações estressantes que os ratos da outra linhagem, aquela com altos níveis de ansiedade. Em um relato posterior (LIEBSCH et al., 1998b), esse grupo demonstrou que tais traços emocionais herdados e associados ao desempenhos dos animais das diferentes linhagens no labirinto em cruz elevado poderia ser avaliada por medidas fisiológicas e alterada por drogas ansiolíticas.

Landgraf e Wigger (2002) ampliaram os resultados de Liebsch et al. (1998a, b). Mostraram que habilidades cognitivas e estratégias de resistência a situações estressantes se correlacionavam com emocionalidade (medo/ansiedade). Isso levou os autores a sugerirem que tal modelo (linhagens de ratos mais e menos ansiosos) poderia fornecer dados importantes na identificação e caracterização de correlatos neurobiológicos, neuroendócrinos e genéticos tanto de traços de ansiedade, como de depressão, em humanos.

Desde então, a abordagem da seleção genética bidirecional tem sido usada com várias finalidades no estudo do comportamento, como exemplificado a seguir: Dichter et al. (1996) (ratos, Columbia+ e Columbia-, Estados Unidos); Radcliffe et al. (2000) (camundongos, Colorado+ e Colorado-, Estados Unidos); Ramos et al. (2003) (ratos, Floripa+ e Floripa-, Santa Catarina, Brasil); Castro-Gomes e Landeira-Fernandez (2008) e Dias et al (2009) (ratos, Carioca+ e Carioca-, Rio de Janeiro, Brasil); Runke e McIntyre (2008) (ratos, Carleton+ e Carleton-, Canadá). Todos esses exploraram diferenças comportamentais, neurofisiológicas e neuroanatômicas em linhagens de animais que possuíam diferentes padrões de responsividade emocional.

Assim, todos os trabalhos revisados até aqui investigaram a exploração de características comportamentais dos traços emocionais herdados e/ou características neufisiológicas, bioquímicas e moleculares da de tais traços emocionais.

Entretanto, apesar da investigação de um determinado componente emocional ser facilitada pela diminuição da variabilidade promovida pela seleção genética, toda emoção associada a uma classe de respostas de defesa, como a ansiedade, só é devidamente explorada se exposta a diferentes condições ambientais, sejam elas relacionadas a respostas incondicionadas ou aprendidas de defesa.

Dessa forma, levanta-se a hipótese de que a seleção genética de um componente emocional relacionado à ansiedade, e a investigação das possíveis correlações do mesmo com respostas incondicionadas e condicionadas de defesa, e dos determinantes associados à diminuição de

comportamentos de avaliação de risco frente a situações potencialmente perigosas (impulsividade), poderiam contribuir para uma interpretação mais ampla e precisa dos comportamentos associados à própria ansiedade e o medo, bem como, fornecer uma base sólida para investigações neurofisiológicas, bioquímicas e moleculares dos mesmos.

Para isso, foi necessária a realização de um estudo que selecionasse animais com base em traços emocionais herdados e relacionados às respostas comportamentais do tipo ansiedade e posteriormente investigasse a relação da das mesmas com outras tarefas de aprendizagem aversiva, impulsividade, e medo (sobressalto).

Para essa finalidade, nosso estudo previu o uso dos testes (a) do labirinto em cruz elevado (teste clássico para medir comportamentos associados à ansiedade; PELOW ET AL. 1985, 1986); (b) da esquiva passiva (na qual o animal aprende a evitar um choque nas patas; JOHNSON, 1976; para uma revisão, ver MYHRER, 2002); (c) do sobressalto (mede a intensidade do salto em resposta a um estímulo sonoro súbito; KNOLLl et al., 2007; LÓPEZ-AUMATELL et al., 2009); e (d) do gradiente de aversão elevado (um teste inspirado no labirinto em cruz elevado e que possivelmente mede impulsividade; RICO, 2011); (e) campo aberto (teste associado à medidas locomotoras relacionadas à ansiedade, RAMOS ET AL., 2003, para uma revisão, ver PRUT; BELZUNG, 2003); (f) labirinto aquático de Morris (teste que mede aprendizagem de fuga e memória espacial, MORRIS, 1984, , para uma revisão, ver D’HOOGE; DE DEYN, 2001).

2 OBJETIVOS

Selecionar duas linhagens de ratos Wistar: uma com características de alta exploração dos braços abertos do labirinto em cruz-elevado, que denominamos de Filô-HE (**H**igh **E**xploration), em homenagem à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, e outra com baixa exploração desses braços, denominada de Filô-LE (**L**ow **E**xploration), também em homenagem a mesma Faculdade. Além disso, comparar os efeitos da seleção dessas duas linhagens sobre os processos de aprendizagem, ansiedade, medo e a impulsividade.

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 SUJEITOS

Como indicado abaixo pela Tabela 1, foram utilizados 387 ratos *Wistar* (machos e fêmeas) das linhagens Filô-HE e Filô-LE, selecionadas no Laboratório de Comportamento Exploratório da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, cuja origem foi um grupo de ratos provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo, *campus* de Ribeirão Preto.

Tabela 1. Número total de ratos utilizados ao longo de doze gerações, agrupados por linhagens (Filô-HE e Filô-LE), e por sexo (Machos e Fêmeas).

	Filô-HE		Filô-LE	
Gerações	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas
S0 (n = 24)	6	6	6	6
S1 (n = 30)	7	7	6	10
S2 (n = 49)	11	17	11	10
S3 (n = 43)	10	16	10	7
S4 (n = 45)	10	9	8	12
S5 (n = 32)	10	8	5	9
S6 (n = 26)	8	6	4	8
S7 (n = 22)	6	4	4	8
S8 (n = 36)	10	8	5	2
S9 (n = 19)	10	9	-	-
S10 (n = 17)	8	9	-	-
S11 (n = 23)	10	13	-	-
S12 (n = 21)	12	9	-	-

3.2 CONDIÇÕES DO BIOTÉRIO

Atendendo aos princípios éticos e práticos no uso de animais de laboratório (ANDERSEN et al., 2004), os animais foram alojados em caixas de polipropileno com dimensões 41 x 34 x 17 cm, forradas com maravalha e com tampas altas (10 cm de altura) de arame zincado, com livre acesso a comida e água. Os animais filhotes foram alojados juntos a mãe até completarem 21 dias. Após os 21 dias, os animais foram separados por sexo, e alojados em número de no máximo 4 ratos por caixa, garantindo assim, ao menos 350cm^2 de área por animal.

O sistema de ventilação, como recomendando por Andresen at al. (2004), caracterizava-se por apresentar baixo nível de ruído, passava por manutenções constantes, permitindo 30 trocas de ar por hora. O uso de ar-condicionado central fez com que a umidade relativa do ar nunca ultrapasse os 55%, e mantivesse a temperatura do biotério entre 23 e 25ºC. O biotério

também contava com um controle de ciclo claro-escuro (12/12h), com as luzes acesas as 07:00 h.

3.3 EQUIPAMENTOS

Foram utilizados os aparatos descritos a seguir. Com a exceção dos testes de aprendizagem, os demais tiveram as sessões gravadas por uma câmera de vídeo localizada no teto da sala de testes e um computador localizado em sala anexa.

3.3.1 Labirinto em Cruz elevado

O aparato era constituído por dois braços abertos (50 x 10 cm) cruzados perpendicularmente a dois braços fechados opostos e de mesma dimensão. Esses últimos são fechados por paredes de madeira de 40 cm de altura, salvo pela parte central onde os braços se cruzam. Todo o conjunto é elevado a 50 cm do piso (para maiores detalhes ver ESTANISLAU; MORATO, 2006).

3.3.2 Campo Aberto

O aparato era constituído por uma arena de piso e paredes de madeira com 60 cm de comprimento, por 60 cm de largura e paredes de 30 cm de altura (para maiores detalhes ver (LAMPREA et al., 2008).

3.3.3 Caixa de Sobressalto

O aparato era constituído por 2 caixas independentes construídas em aço inoxidável e suspensas em uma armação de PVC, medindo internamente 16,5 x 7,5 x 7,5 cm. As caixas de aço eram abrigadas em caixas de atenuação sonora (64 x 60 x 40 cm), fabricadas em madeira, com revestimento

acústico de espuma (ENV-018S, Med Associates). A resposta de sobressalto foi registrada por meio de uma plataforma sensível à pressão (estabilímetro, PHM250-60, Med Associates). O sobressalto do animal gerava movimentos nesta plataforma que eram captados por sensores e analisados por um programa computacional (Startle Reflex, versão 4.10, Med Associates). A resposta de sobressalto era medida após a apresentação de um estímulo sonoro (100 dB, 50 ms) liberado por alto-falantes localizados a 10 cm de distância da caixa que continha o animal. Um ruído branco de fundo (55 dB) era apresentado pelo mesmo alto-falante. Uma lâmpada vermelha de 6 W e uma câmera de vídeo, instaladas no interior das câmaras de isolamento acústico, permitiram a observação dos animais durante as sessões de habituação e teste. As plataformas eram calibradas no início de cada sessão para garantir igual nível de sensibilidade ao longo dos experimentos.

3.3.4 Gradiente de Aversão Elevado

O aparato consistia em uma pista de fórmica de 210 cm de comprimento, 20 cm de largura e elevada a 40 cm do piso. A pista era dividida em três áreas de 70 cm de comprimento. O primeiro terço da pista era formado por um compartimento fechado, semelhante a um túnel, com piso e duas paredes (25 cm de altura) forrados de fórmica preta, com uma porta do tipo guilhotina (onde é introduzido o animal) na extremidade inicial e cobertura de acrílico vermelho transparente (que permite a visibilidade do animal sendo testado). Uma abertura comunicava o túnel com os próximos 70 cm de pista, que era formada por um compartimento semelhante ao braço fechado de um labirinto em cruz elevado (piso de fórmica preta fechado por duas paredes

laterais de 60 cm de altura, também forradas com fórmica preta). A ultima parte da pista era semelhante ao braço aberto de um labirinto em cruz elevado, formada por uma plataforma com piso de fórmica branca, cercado por bordas de acrílico branco (1 cm de altura). Um lâmpada incandescente de 60 W iluminava a sala de testes permitindo uma intensidade luminosa de 2 lux no túnel, 20 lux no braço fechado e 35 lux no braço aberto.

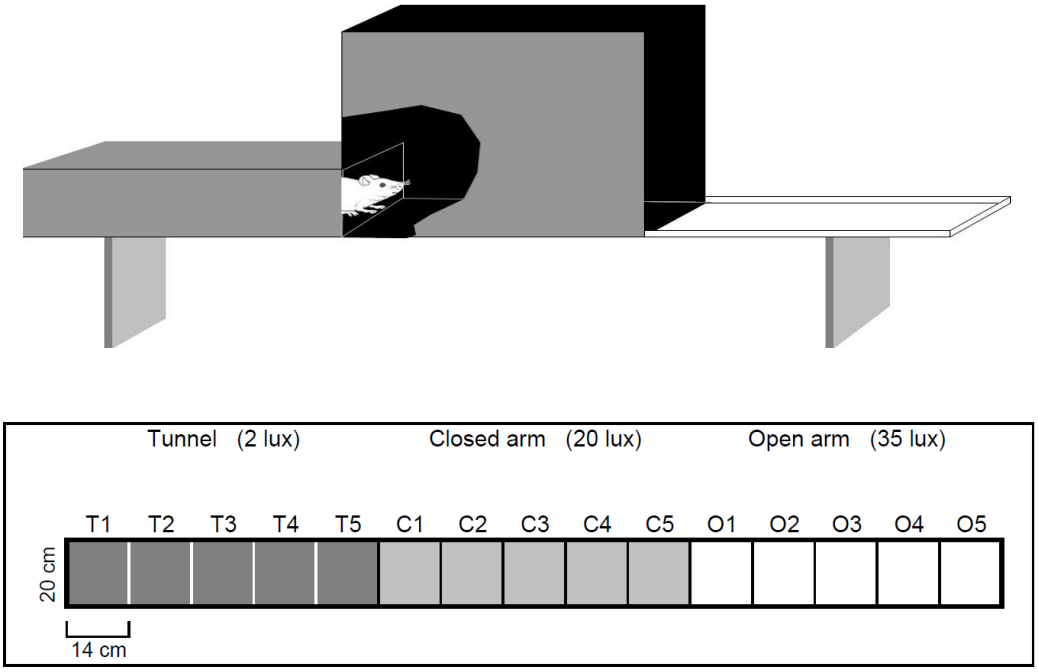

Figura 1. Perspectiva e Esquema do Gradiente de Aversão Elevado

3.3.5 Caixa de Esquiva Passiva

Foi usada uma caixa de esquiva (Insight, modelo EP 104R, Brasil), com piso de barras de aço inoxidável com espaçamento de 1,25 cm entre si e eletrificáveis.

3.3.6 Labirinto Aquático de Morris

O aparato (MORRIS, 1981) consistia de um tanque circular de 1,5m de diâmetro e 39 cm de altura, esmaltado com tinta preta, dividido em quatro

quadrantes imaginários, numerados em sentido horário (quadrantes 1, 2, 3 e 4). O tanque era preenchido com água e continha uma plataforma circular feita de acrílico transparente de 12 cm de diâmetro e 25 cm de altura, submersa completamente 1,5 cm abaixo do nível da água. Esse aparato ficava alojado em uma sala que continha pistas visuais distais tais como quadros na parede, porta e janela. Acima do labirinto era fixada uma câmera conectada a um tracejador ligado a um computador (*Ethovision*) para possibilitar o monitoramento, registro e análise das sessões experimentais (para maiores detalhes ver (FUKUDA; FRANÇOLIN-SILVA; ALMEIDA, 2002).

3.3.7. Determinação das Fases do Ciclo Estral das Ratas.

Para a determinação das fases do ciclo estral foram utilizadas pipetas plástica, para a coleta da secreção vaginal; solução salina (NaCl 0,9%), lâminas de vidro para fixação do material vaginal coletado e um microscópio óptico binocular (Bel Photonics, modeloBiostar B3, Piracicaba, São Paulo, Brasil) para análise dos diferentes tipos de células encontradas.

3.4 PROCEDIMENTO

3.4.1 Seleção das Linhagens de Ratos Wistar.

Foram colocados para cruzar dois casais de ratos que passaram mais tempo no braço aberto, e outros dois casais de ratos que passaram menos tempo nesses braços, utilizando um critério de cruzamentos poligâmico, a fim de preservar o padrão reprodutivo natural da espécie e de promover uma controlada variabilidade genética, diminuindo dessa forma a probabilidade de transmissão de características não desejadas. Nas gerações F6 e F9 e F12,

todos os animais foram preservados para serem expostos a todos os testes. Os casais somente foram formados, após a exposição a todos os testes. Este procedimento foi repetido a cada três gerações.

3.4.2 Labirinto em Cruz Elevado.

Os animais foram gentilmente colocados na área central do labirinto, com o focinho virado para um dos braços fechados, e podiam explorar livremente o aparato por cinco minutos. Foram registradas as frequências de entradas, tempo gasto (medida de seleção das linhagens) e distância percorrida nos braços aberto e fechado, bem como frequência de entradas nas extremidades dos braços abertos do labirinto, frequência do comportamento de esticar-se nos braços fechados (quando o animal estica seu corpo usando as patas dianteiras e retorna à posição inicial sem movimentar as patas posteriores) e frequência do comportamento de limpar-se.

3.4.3 Campo Aberto.

Os animais foram gentilmente colocados na área periférica do campo aberto (junto a uma das paredes), com o focinho virado para as áreas centrais do aparato, e podiam explorar livremente o aparato por cinco minutos. Foram registradas a latência de entradas e o tempo gasto na exploração das áreas centrais do aparato.

3.4.4 Sobressalto

Ao longo de três dias, com intervalos de 24 horas, os ratos foram colocados na caixa de sobressalto, para habituação, com a presença do ruído

branco. No quarto dia, em uma sessão de dez minutos, os animais foram colocados na mesma caixa e, somado ao ruído branco, foi apresentado o estímulo sonoro com intervalos de 3,3 minutos. Foram registrados a latência da resposta de sobressalto e o peso exercido pelo salto de cada animal sobre a balança.

3.4.5 Gradiente de Aversão Elevado

Os animais foram introduzidos no gradiente de aversão elevado na extremidade do túnel, registrando-se, ao longo de três minutos, o número de entradas, o tempo gasto e a latência de entrada no braço aberto (medidas de impulsividade), bem como o número de entradas e o tempo gasto no braço fechado, e a distância percorrida no túnel (medidas de ansiedade e locomoção). Como medidas de avaliação de riscos foram analisadas a frequência de levantamentos e o tempo gasto na área de transição túnel-braço fechado.

3.4.6 Esquiva Passiva

No dia do treino, os animais foram colocados sobre a plataforma da caixa. Assim que o animal descia da plataforma, apoiando as quatro patas no piso eletrificável, era apresentado um choque elétrico (0,6 mA, 2 s). Após isso, o animal era imediatamente retirado da caixa de esquiva passiva e devolvido à gaiola-viveiro. Após 24 horas, cada animal era novamente colocado na plataforma da caixa de esquiva passiva e era medida a latência da descida (com as quatro patas) para o piso de grades. Não houve choque elétrico nesta sessão.

3.4.7 Labirinto Aquático de Morris

Antes do início da sessão experimental, o animal foi colocado na plataforma durante 60 segundos. Logo após esse período o animal foi colocado no centro de um dos quatro quadrantes imaginários, de costas para o centro do tanque, e deveria nadar em busca da plataforma de fuga por um período de 60 segundos. A plataforma permanecia na mesma localização durante todo o experimento. Foram realizadas 12 tentativas diárias durante dois dias consecutivos, totalizando 24 tentativas, a cada tentativa, o animal era colocado em um quadrante diferente do último utilizado, quadrante esse que foi escolhido randomicamente. A seqüência da localização do animal em cada tentativa foi mantida para todos os animais testados, caso o animal não conseguisse alcançar a plataforma dentro do tempo estabelecido, ele era retirado e colocado sobre a plataforma. Foram analisados os tempos gastos pelos animais para encontrar a plataforma em cada uma das sessões (latência de fuga).

3.4.8 Determinação das Fases do Ciclo Estral das Ratas

O procedimento para determinação das fases do ciclo estral foi o mesmo descrito por Marcondes; Bianchi; Tano (2002). As ratas eram retiradas do biotério e levadas a uma sala equipada para o procedimento. Este consistia em introduzir na vagina da rata, não profundamente, uma pipeta plástica preenchida com 10 µl de solução salina (NaCl 0,9%), para coletar o fluído vaginal. Este era colocado em uma lâmina de vidro e levado ao microscópio para contagem e identificação dos tipos de células, se nucleadas e redondas (epiteliais), irregulares e sem núcleo (cornificadas) ou pequenas e redondas

(leucócitos). A proporção entre elas foi utilizada para determinar as fases do ciclo estral, ou seja: proestro (predominância de células epiteliais), estro (predominância de células cornificadas), metaestro (ou diestro I, proporção semelhante entre células epiteliais, cornificadas e leucócitos), diestro (ou diestro II, predominância de leucócitos).

Ao longo de todas as gerações, o procedimento de determinação das fases do ciclo estral foi realizado para que se tivesse um controle maior sobre as possíveis interferências das diferentes fases do ciclo estral, sobre os demais procedimentos aplicados a essas fêmeas. Além disso, todas as fêmeas foram expostas ao LCE apenas quando nas fases proestro e estro do ciclo, fases de maior exploração dos braços abertos (MORA, et al., 1996, MARCONDES, et al., 2001).

Os procedimentos foram desenvolvidos segundo a Tabela 2, abaixo. Os casais foram formados após o teste do labirinto em cruz elevado e em seguida colocados para o acasalamento. Na sexta, nona e décima segunda gerações, entretanto, os casais foram formados dessa mesma forma, porém os animais só se acasalaram depois de passarem por todos os testes programados.

Tabela 2. Idade de realização dos testes comportamentais

Testes ou medidas	Idade (dias)
Determinação da fase do ciclo estral	48 a 49
Labirinto em cruz elevado	60 a 62
Sobressalto	63 a 66
Gradiente de Impulsividade	67
Esquiva passiva	67 e 68
Labirinto Aquático de Morris	73 e 74

3.5 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os resultados foram analisados a partir de testes paramétricos e quando necessários, testes não paramétricos (quando a distribuição dos dados não foi normal). Dados com mais de duas amostras, um, dois ou três fatores foram tratados com análise de variância (ANOVA) usando-se o teste de *Student Newman-Keuls* como teste *post-hoc*. Comparações entre dois grupos foram efetuadas com o uso do teste *t* de Student e o teste *U* de Mann-Whitney, para medidas independentes. Em todos os casos, o nível de significância foi estabelecido em $P < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 SELEÇÃO DAS LINHAGENS FILÔ-HE E FILÔ-LE

A Figura 2 representa o tempo gasto na exploração dos braços abertos do LCE de ratos machos e fêmeas das linhagens Filô-HE e Filô-LE, divididos entre as gerações (S0), gerações intermediárias (S6 e S8), última geração (S12) e animais controle. O teste *t* de *Student* para medidas independentes, indicou diferenças para machos e fêmeas das linhagens Filô-HE e Filô-LE das gerações S0, respectivamente, ($t_{[11]} = 4,897$, P=0,001), ($t_{[11]} = 3,041$, P=0,012); S6, respectivamente, ($U_{[11]} = 28,0$, P=0,048), ($U_{[11]} = 4,0$, P=0,008); S8, respectivamente, ($U_{[24]} = 50,0$, P=0,002), ($t_{[10]} = 8,01$, P<0,001) e por fim, F12 respectivamente, ($U_{[21]} = 112,0$, P<0,001), ($U_{[18]} = 125,0$, P=<0,001).

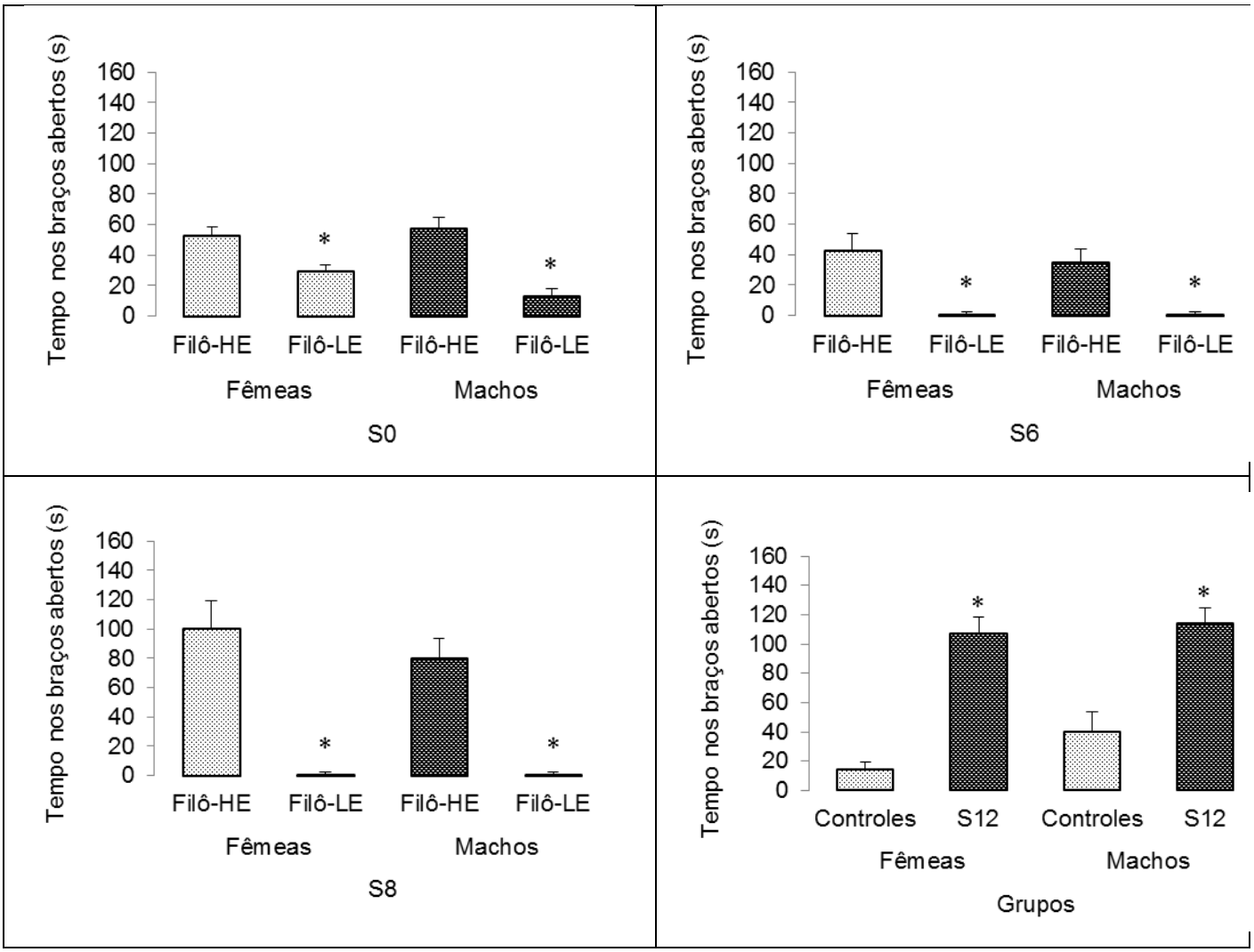

Figura 2. Tempo gasto na exploração dos braços abertos do labirinto em cruz elevado, em machos e fêmeas das linhagens Filô-HE e Filô-LE, para as gerações S0, S6, S8 e S12 e animais controle.
*, Diferente de Filô-HE e dos animais controle (*t* de Student, P < 0,05 e *U* de Mann-Whitney).

A Figura 3 compara os animais provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo, *campus* de Ribeirão Preto (S0), gerações intermediárias (S6 e S9) e a geração atual (S12) quanto ao tempo gasto na exploração dos braços abertos do labirinto em cruz elevado por ratos machos e fêmeas das linhagens Filô-HE e Filô-LE,. A ANOVA de 2 vias (Gerações e Linhagens) indicou diferenças nos tempos de exploração dos braços abertos para as fêmeas da linhagem Filô-HE quando comparadas as fêmeas da linhagem Filô-LE ($F_{[1,48]}$ = 92,062; P < 0,001), bem como para as fêmeas das

diferentes gerações (S0, S6, S8, S12) ($F_{[3,48]}$ = 5,005; P= 0,005), sendo que o teste *post hoc* revelou que as fêmeas das gerações S6, S8 e S12 da linhagem Filô-HE apresentaram diferenças quando comparadas as fêmeas das gerações S0, e as gerações S9 e S12, apresentaram diferenças quando comparadas as fêmeas das gerações S6. As gerações S6 e S8 da linhagem Filô-LE apresentaram diferenças quando comparadas as fêmeas das gerações F0. De forma semelhante, a ANOVA de duas vias (Gerações e Linhagens) indicou diferenças para os machos da linhagem Filô-HE quando comparados a linhagem Filô-LE ($F_{[1,50]}$ = 107,513; P < 0,001), bem como para os machos das diferentes gerações (S0, S6, S8, S12) ($F_{[3,50]}$ = 5,787; P = 0,002), sendo que o teste *post hoc* revelou que os machos das gerações S6, S8 e S12 das linhagens Filô-HE apresentaram diferenças quando comparados aos machos da geração F0, os machos das gerações S8 e S12 apresentaram diferenças quando comparados aos machos das gerações S6, e os machos da geração S12 apresentaram diferenças quando comparados aos machos da geração S8.

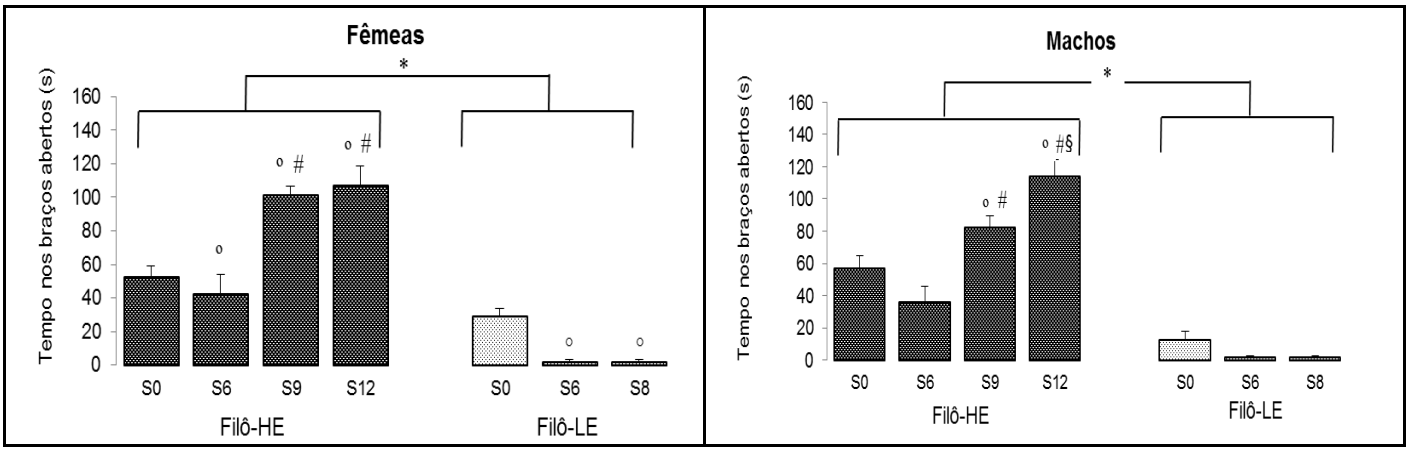

Figura 3. Comparação das gerações S0, S6, S8, S9 e S12, para o tempo gasto na exploração dos braços abertos do labirinto em cruz elevado, em machos e fêmeas das linhagens Filô-HE e Filô-LE).

*, Diferente dos animais da linhagem Filô-HE. º, Diferente dos animais da geração S0. #, Diferente dos animais da geração S6. §, Diferente dos animais da geração S9. (*Student Newman Keuls*, P < 0,05).

4.2 TESTES REALIZADOS NA SEXTA, NONA E DÉCIMA SEGUNDA GERAÇÕES (S6, S9 E S12).

A Figura 4 representa a comparação do tempo gasto na exploração dos braços abertos do labirinto em cruz elevado em ratos machos e fêmeas das linhagens Filô-HE pertencentes as gerações seis, nove e doze (S6, S9 e S12), e Filô-LE pertencentes as gerações seis e oito (S6 e S8). A ANOVA de 2 vias (Gerações e Linhagens) indicou que tanto machos como fêmeas da linhagem Filô-HE gastam mais tempo explorando os braços abertos do LCE, que os animais da linhagem Filô-LE, respectivamente, ($F_{[1,40]}$ = 89,291; P<0,001), ($F_{[1,33]}$ = 78,391; P<0,001). Da mesma forma, machos e fêmeas das gerações S9 e S12, exploram de forma diferente os braços abertos do LCE, que os animais da geração S6, respectivamente, ($F_{[1,40]}$ = 7,343; P=0,002), ($F_{[1,33]}$ = 6,109; P=0,006), sendo que o *post-hoc*, indicou que S9 e S12 são diferentes de S6 em ambos os sexos, e S12 é diferente de S9 para os machos da linhagem Filô-HE.

A ANOVA de duas vias (Gerações e Linhagens) também indicou que machos e fêmeas da linhagem Filô-HE entram mais nos braços abertos do LCE que os animais da linhagem Filô-LE, respectivamente, ($F_{[1,40]}$ = 56,965; P< 0,001), ($F_{[1,33]}$ = 34,918; P< 0,001). Entretanto, não foram encontradas diferenças entre as gerações S6, S9 e S12, tanto para machos, como para as fêmeas das linhagens Filô-HE e Filô-LE, respectivamente, ($F_{[1,40]}$ = 0,949; P= 0,396), ($F_{[1,33]}$ = 0,105; P=0,900).

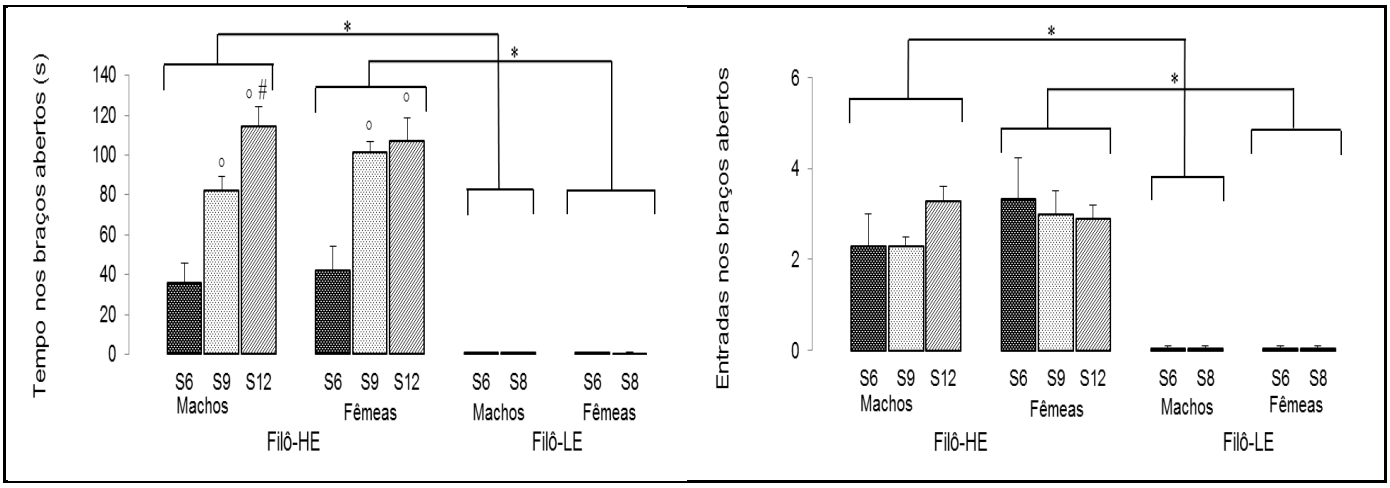

Figura 4. Tempo de exploração e frequência de entradas nos braços abertos do labirinto em cruz elevado, em machos e fêmeas das linhagens Filô-HE e Filô-LE).
*, Diferente dos animais da linhagem Filô-HE. º, Diferente dos animais da geração S6. #, Diferente dos animais da geração S9 (*Student Newman Keuls*, P < 0,05).

A Figura 5 apresenta a comparação das amplitudes médias e latências das respostas de sobressalto em ratos machos e fêmeas das linhagens Filô-HE pertencentes as gerações seis, nove e doze (S6, S9 e S12), e Filô-LE pertencentes as gerações seis e oito (S6 e S8). A ANOVA de 2 vias (Gerações e Linhagens) indicou diferenças para a amplitude do sobressalto em fêmeas e machos da linhagem Filô-HE quando comparados as fêmeas e machos da linhagem Filô-LE, respectivamente ($F_{[1,33]}$ = 12,195; P=0,002), ($F_{[1,40]}$ = 41,775; P<0,001). Da mesma forma, fêmeas e machos da geração S6 e S9 da linhagem Filô-HE também apresentam diferenças quando comparados aos animais da geração S12, respectivamente ($F_{[1,33]}$ = 5,482; P=0,012), ($F_{[1,40]}$ = 6,125; P=0,005).

A ANOVA de duas vias (Gerações e Linhagens) indicou ainda que fêmeas e machos da linhagem Filô-HE não apresentam diferenças nas latências de sobressalto quando comparados aos animais da linhagem Filô-LE, respectivamente, ($F_{[1,33]}$ = 2,031; P= 0,149), ($F_{[1,40]}$ = 1,024; P= 0,318). Além disso, fêmeas e machos da geração S6 e S9 não possuem diferenças para a

latência de sobressalto quando comparados as fêmeas e machos da geração S12, respectivamente, ($F_{[1,33]}$ = 0,792; P= 0,462), ($F_{[1,40]}$ = 0,878; P=0,424).

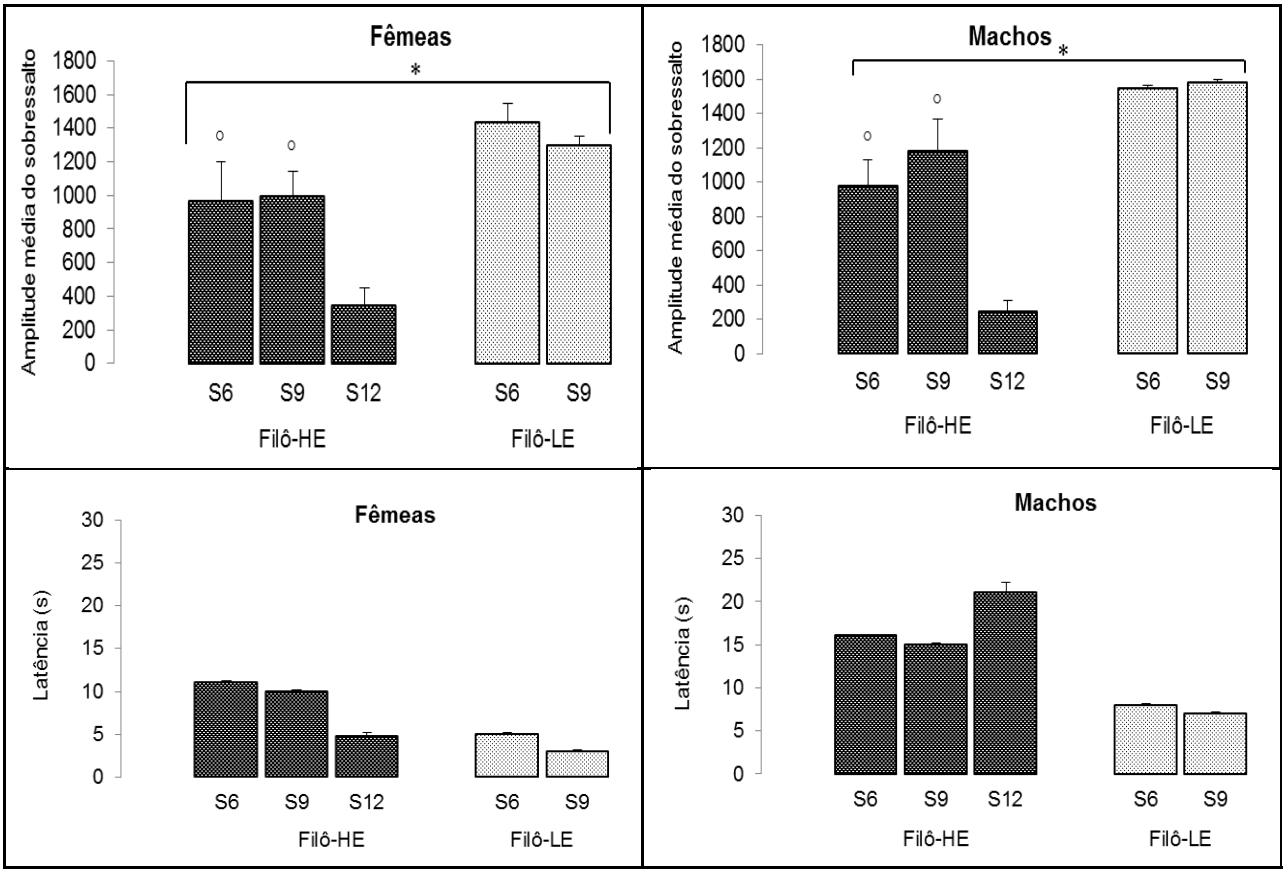

Figura 5. Amplitude média e latência das respostas de sobressalto de fêmeas e machos da sexta, nona e décima segunda gerações (S6, S9 e S12).

*, Diferente de Filô-HE, °, Diferente de S12. (*Student Newman Keuls*, P < 0,05).

A Figura 6 apresenta o número e latência de entradas no braço aberto, e o tempo gasto no braço aberto do gradiente de aversão elevado em ratos machos e fêmeas das linhagens Filô-HE pertencentes as gerações seis, nove e doze (S6, S9 e S12), e Filô-LE pertencentes as gerações seis e oito (S6 e S8). A ANOVA de 2 vias (Gerações e Linhagens) indicou diferenças para o número de entradas no braço aberto do gradiente de aversão elevado para fêmeas e machos da linhagem Filô-HE quando comparados com as fêmeas e machos da linhagem Filô-LE, respectivamente ($F_{[1,33]}$ = 37,416; P<0,001), ($F_{[1,40]}$ = 32,409; P < 0,001). Porém, não indicou diferenças para machos e fêmeas das gerações S6 e S9, quando comparados às fêmeas e machos da geração S12, respectivamente, ($F_{[1,33]}$ = 0,179; P=0,835), ($F_{[1,40]}$ = 0,075; P=0,927).

A ANOVA de duas vias (Gerações e Linhagens) indicou também que fêmeas e machos da linhagem Filô-HE exploram mais o braço aberto do gradiente de aversão elevado que os animais da linhagem Filô-LE, respectivamente, ($F_{[1,33]}$ = 48,999; P < 0,001), ($F_{[1,40]}$ = 38,500; P < 0,001). Entretanto, não indicou diferenças para fêmeas e machos das gerações S6 e S9, quando comparados às fêmeas e machos da geração S12, respectivamente, ($F_{[1,33]}$ = 0,822; P=0,449), ($F_{[1,40]}$ = 0,222; P=0,802).

Por fim, a ANOVA de 2 vias (Gerações e Linhagens) indicou diferenças para a latência de entradas no braço aberto do gradiente de aversão elevado para fêmeas e machos da linhagem Filô-HE quando comparados com os machos e fêmeas da linhagem Filô-LE, respectivamente ($F_{[1,33]}$ = 158,116; P < 0,001), ($F_{[1,40]}$ = 958,049; P < 0,001). Porém, não indicou diferenças para fêmeas e machos da geração S6 e S9, quando comparados aos machos e

fêmeas da geração S12, respectivamente, ($F_{[1,33]}$ = 1,077; P=0,354), ($F_{[1,40]}$ = 1,796; P=0,180).

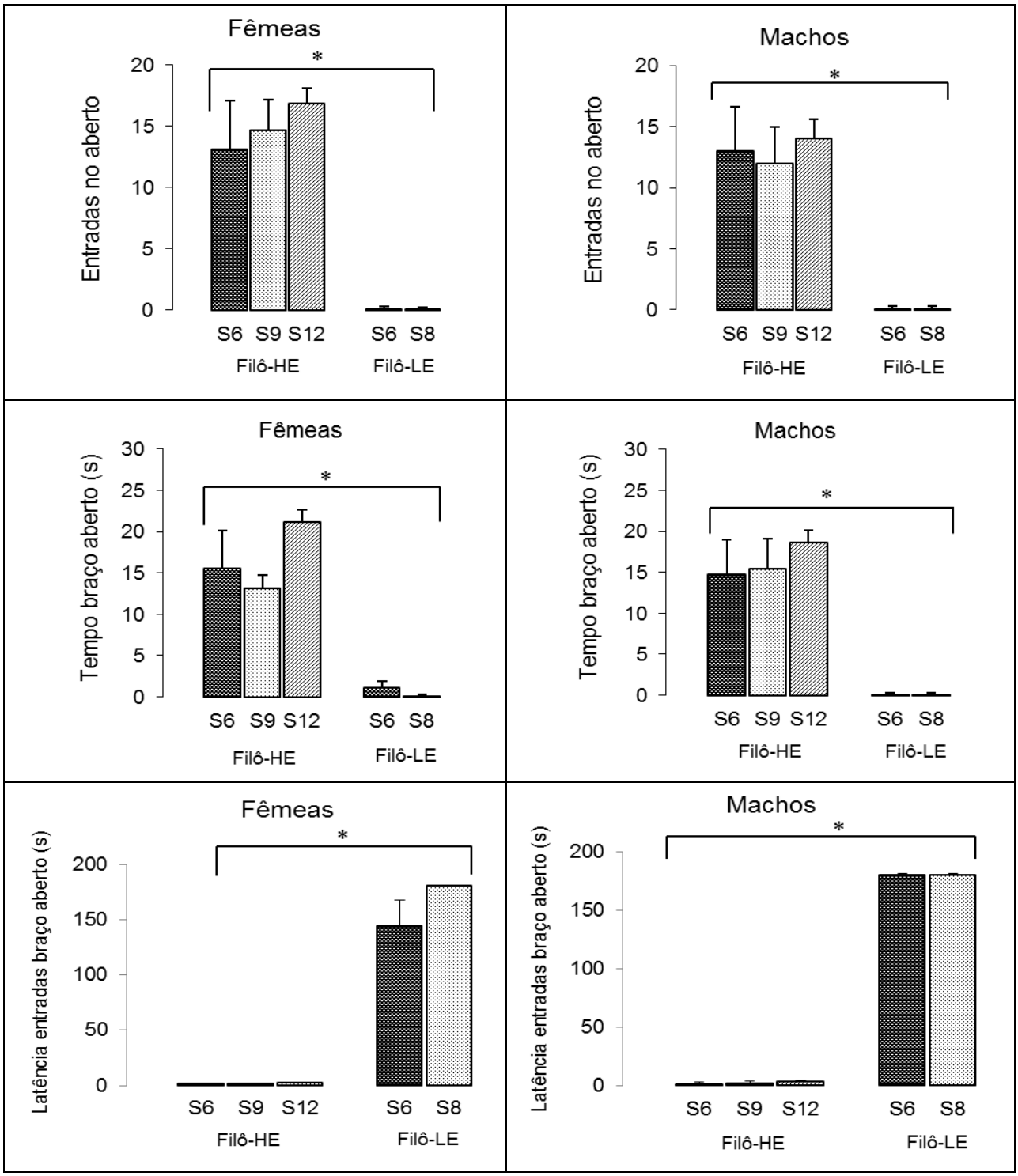

Figura 6. Frequência e latência de entradas no braço aberto, e tempo gasto no braço aberto do gradiente de aversão elevado em fêmeas e machos da sexta, nona e décima segunda gerações (S6, S9 e S12). *, Diferente de Filô-HE. (*Student Newman Keuls*, P < 0,05).

A Figura 7 representa o número de entradas no braço fechado, o tempo gasto no braço fechado, e a distância percorrida no túnel do gradiente de aversão elevado em ratos machos e fêmeas das linhagens Filô-HE pertencentes as gerações seis, nove e doze (S6, S9 e S12), e Filô-LE pertencentes as gerações seis e oito (S6 e S8). A ANOVA de 2 vias (Gerações e Linhagens) indicou diferenças para o número de entradas no braço fechado do gradiente de aversão elevado para fêmeas e machos da linhagem Filô-HE quando comparados com às fêmeas e machos da linhagem Filô-LE, respectivamente ($F_{[1,33]}$ = 109,039; P < 0,001), ($F_{[1,40]}$ = 48,999; P < 0,001). Indicou ainda que as fêmeas da linhagem Filô-HE, das gerações S6 e S12, entram mais no braço fechado do gradiente de aversão elevado, quando comparadas as fêmeas Filô-HE da geração S9, ($F_{[1,33]}$ = 4,267; P=0,023). Não foram encontradas diferenças para o número de entradas no fechado nos machos das gerações S6, S9 e S12 ($F_{[1,40]}$ = 2,421; P=0,102).

A ANOVA de duas vias (Gerações e Linhagens) indicou também que fêmeas e machos da linhagem Filô-HE gastam mais tempo explorando o braço fechado do gradiente de aversão elevado que os animais da linhagem Filô-LE, respectivamente, ($F_{[1,33]}$ = 61,977; P < 0,001), ($F_{[1,40]}$ = 45,880; P < 0,001). Entretanto, não indicou diferenças para fêmeas e machos da geração S6 e S9, quando comparados às fêmeas e machos da geração S12, respectivamente, ($F_{[1,33]}$ = 1,680; P=0,203), ($F_{[1,40]}$ = 0,376; P=0,689).

Por fim, a ANOVA de 2 vias (Gerações e Linhagens) indicou diferenças para a distância percorrida no túnel do gradiente de aversão elevado para fêmeas e machos da linhagem Filô-HE quando comparados com as fêmeas e machos da linhagem Filô-LE, respectivamente ($F_{[1,33]}$ = 34,101; P < 0,001),

($F_{[1,40]}$ = 193,432; P < 0,001). Porém, não indicou diferenças para fêmeas e machos da geração S6 e S9, quando comparados com as fêmeas e machos da geração S12, respectivamente, ($F_{[1,33]}$ = 0,716; P=0,497), ($F_{[1,40]}$ = 0,238; P=0,790).

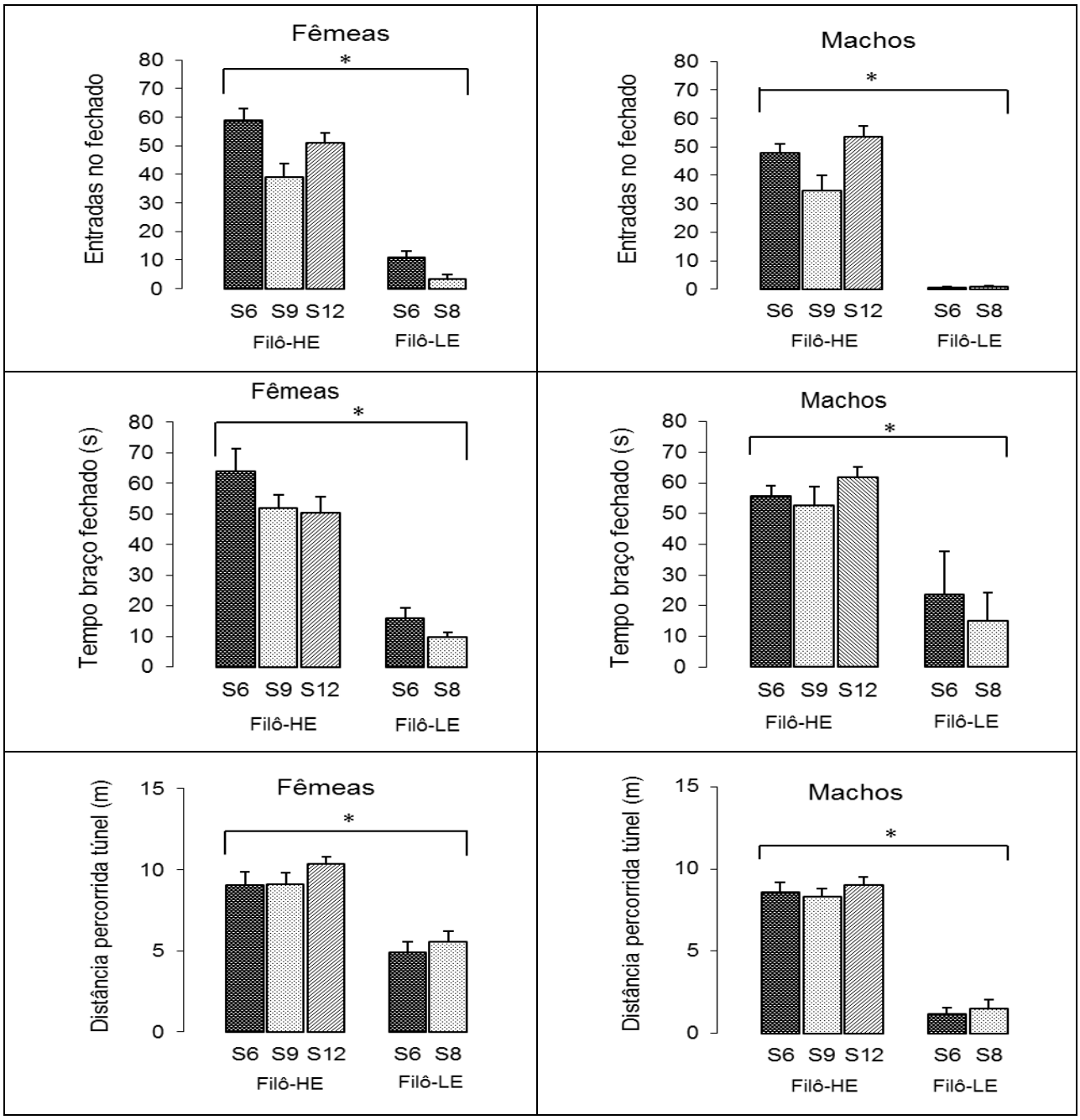

Figura 7. Número de entradas no braço fechado, tempo gasto no braço fechado e distância percorrida no túnel do gradiente de aversão elevado em fêmeas e machos da sexta, nona e décima segunda gerações (S6, S9 e S12).

*, Diferença entre as linhagens Filô-HE e Filô-LE. (*Student Newman Keuls*, P < 0,05).

A Figura 8 apresenta a frequência de levantamentos e o tempo gasto na área de transição túnel-braço fechado do gradiente de aversão elevado em ratos machos e fêmeas das linhagens Filô-HE pertencentes as gerações seis, nove e doze (S6, S9 e S12), e Filô-LE pertencentes as gerações seis e oito (S6 e S8). A ANOVA de 2 vias (Gerações e Linhagens) indicou diferenças para a frequência de levantamentos na área de transição túnel-braço fechado do gradiente de aversão elevado para fêmeas e machos da linhagem Filô-HE quando comparados com as fêmeas e machos da linhagem Filô-LE, respectivamente ($F_{[1,33]}$ = 21,779; P < 0,001), ($F_{[1,40]}$ = 75,869; P < 0,001). Indicou também diferenças entre as fêmeas da linhagem Filô-HE, das gerações S6, S9 e S12, ($F_{[2,33]}$ = 14,425; P < 0,001), sendo que o *post-hoc* indicou que S6 era diferente de S9 e S12; S9, era diferente de S6 e S12 e S12 era diferente de S6 e S9. Além disso, a ANOVA de duas vias demonstrou que os machos Filô-HE da geração S6 levantam mais na área de transição túnel-braço fechado, quando comparados aos machos Filô-HE das gerações S9 e S12, ($F_{[2,40]}$ = 13,818; P < 0,001).

A ANOVA de duas vias (Gerações e Linhagens) indicou também que fêmeas e machos da linhagem Filô-HE gastam mais tempo na área de transição túnel-braço fechado do gradiente de aversão elevado que os animais da linhagem Filô-LE, respectivamente, ($F_{[1,33]}$ = 15,716; P<0,001), ($F_{[1,40]}$ = 46,093; P<0,001). Indicou ainda, diferenças entre os machos da linhagem Filô-HE, das gerações S6, S9 e S12, ($F_{[1,40]}$ = 5,518; P=0,008), sendo que o *post-hoc* indicou que S6 era diferente de S9 e S12; S9 era diferente de S6 e S12 e S12 era diferente de S6 e S9. De forma contrária, a ANOVA de duas vias não

indicou diferenças entre as fêmeas das gerações S6, S9 e S12 ($F_{[2,33]}$ = 1,694; P=0,201).

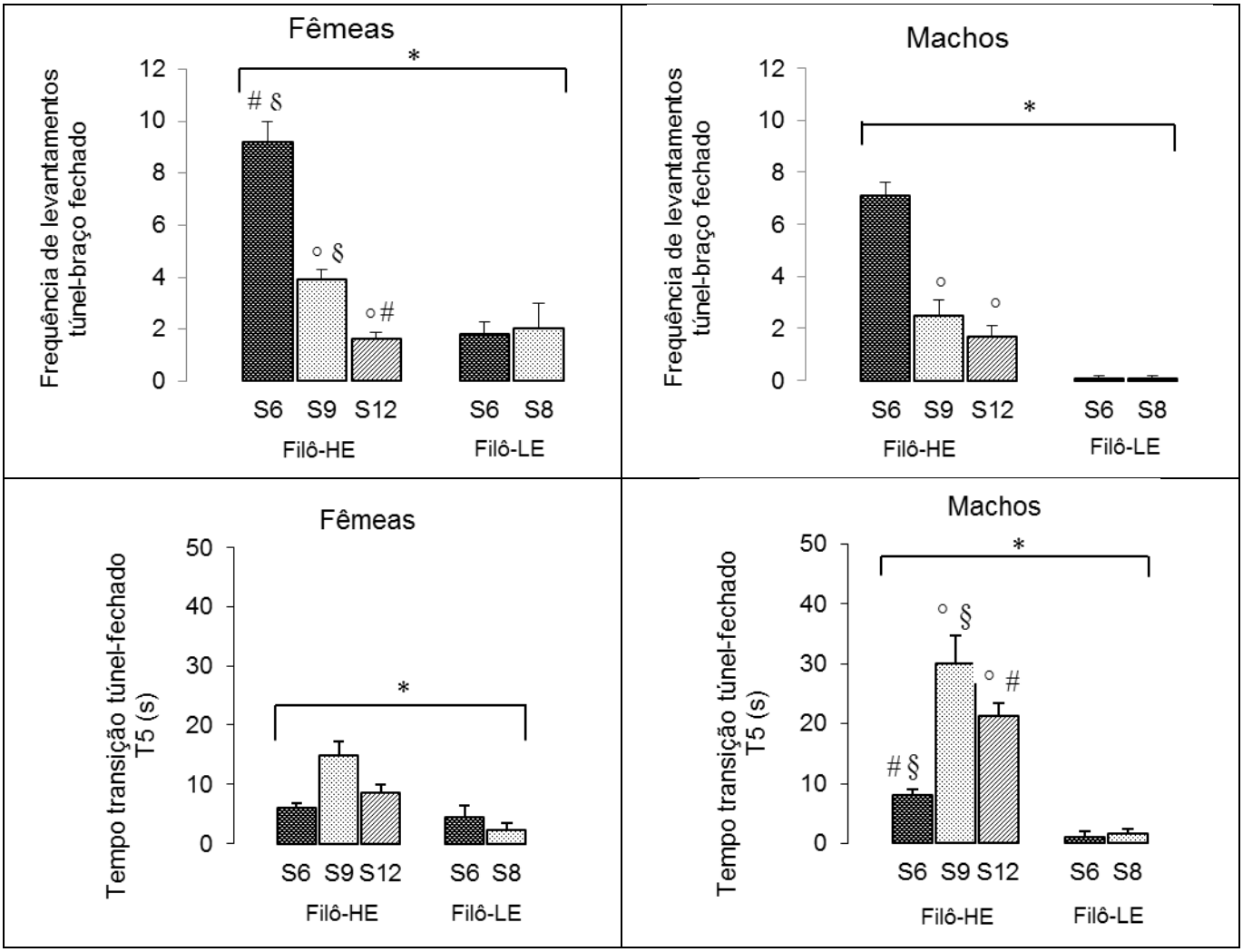

Figura 8. Frequência de levantamentos e tempo gasto na área de transição túnel-braço fechado em fêmeas e machos da sexta, nona e décima segunda gerações (S6, S9 e S12).

*, Diferença entre as linhagens Filô-HE e Filô-LE, ° Diferente de S6, #, Diferente de S9, §, Diferente de S12. (*Student Newman Keuls*, P < 0,05).

A Figura 9 apresenta as latências de descidas da plataforma do *step-down* em ratos fêmeas e machos das linhagens Filô-HE pertencentes as gerações seis, nove e doze (S6, S9 e S12), e Filô-LE pertencentes as gerações seis e oito (S6 e S8). A ANOVA de 3 vias [Gerações, Linhagens e Dias (Treino e Teste)] indicou diferenças para as latências de descidas da plataforma em fêmeas e machos da linhagem Filô-HE quando comparados com as fêmeas e machos da linhagem Filô-LE, respectivamente ($F_{[1,33]}$ = 186,271; P < 0,001), ($F_{[1,40]}$ = 2513,560; P < 0,001). Porém,

não indicou diferenças para fêmeas e machos da linhagem Filô-HE da geração S6 e S9, quando comparados às fêmeas e machos Filô-HE da geração S12, respectivamente, ($F_{[2,33]}$ = 2,160; P=0,121), ($F_{[2,40]}$ = 0,627; P=0,695), bem como, para os diferentes dias de exposição ao *step-down* (treino e teste), respectivamente, ($F_{[1,33]}$ = 1,150; P=0,288), ($F_{[1,40]}$ = 2,033; P=0,149).

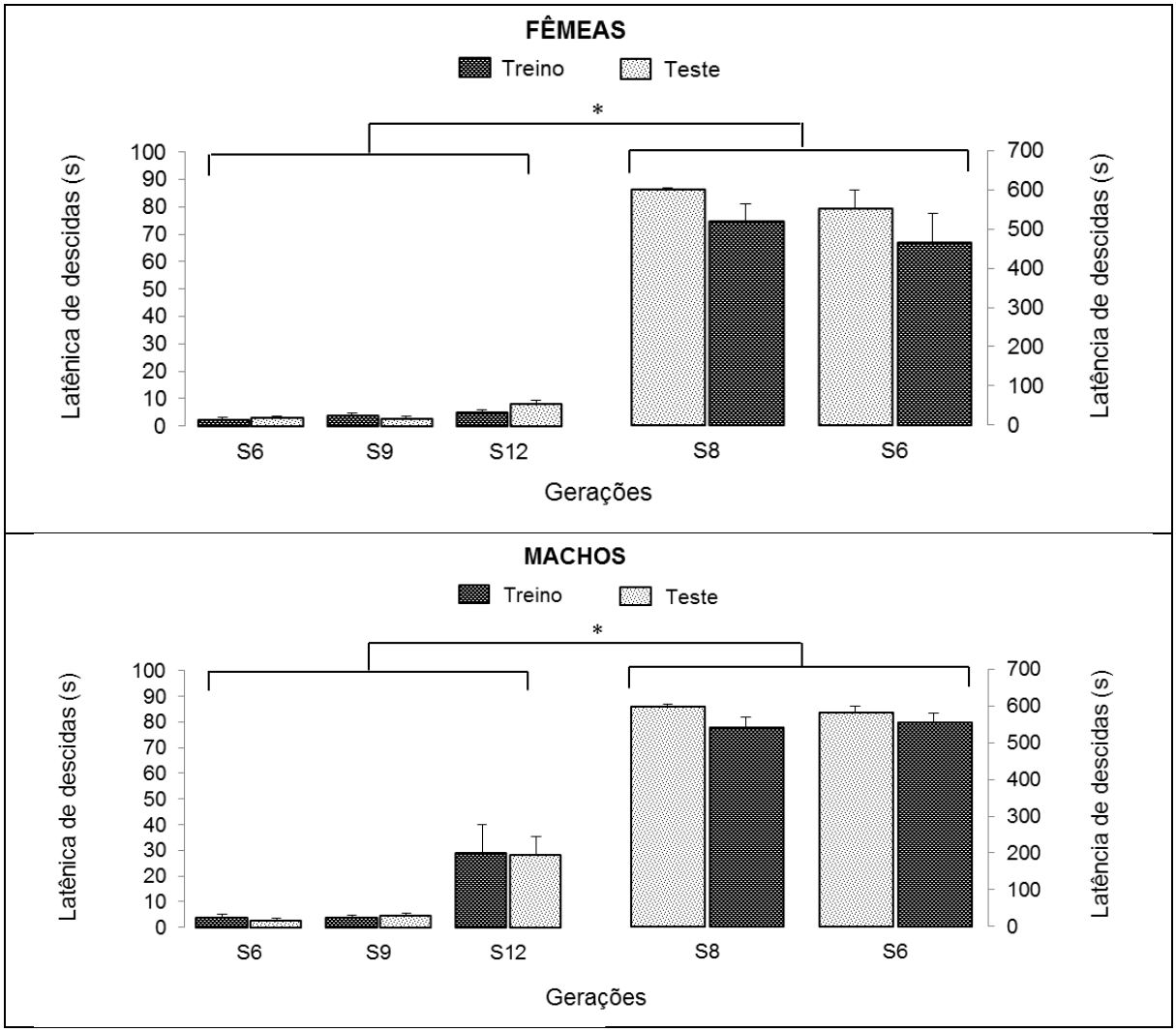

Figura 9. Latência de descida (s) da plataforma no teste *step-down* em fêmeas e machos da sexta geração, nona e décima segunda gerações (S6, S9 e S12).
*, Diferente da linhagem Filô-HE. (*Student Newman Keuls*, P < 0,05).

4.3. COMPARAÇÕES ENTRE A GERAÇÃO S12 (FILÔ-HE) E ANIMAIS CONTROLES

A Figura 10 representa a comparação do numero de entradas e tempo gasto na exploração dos braços abertos do labirinto em cruz elevado em ratos machos e fêmeas das linhagens Filô-HE (S12) e animais controles. O teste *U* de Mann-Whitney indicou que tanto fêmeas como machos da linhagem Filô-HE gastam mais tempo explorando os braços abertos do LCE que os animais controles, respectivamente, ($U_{[18]}$ = 0,00; P<0,001), ($U_{[21]}$ = 112,00; P<0,001). De forma semelhante, as fêmeas geração S12, entram mais nos braços abertos do LCE, que as fêmeas controles, ($U_{[18]}$ = 12,500; P=0,007). Não foram encontradas diferenças para o número de entradas nos braços abertos entre os machos da geração S12 e os machos controles ($t_{[21]}$ = -1,141; P=0,267).

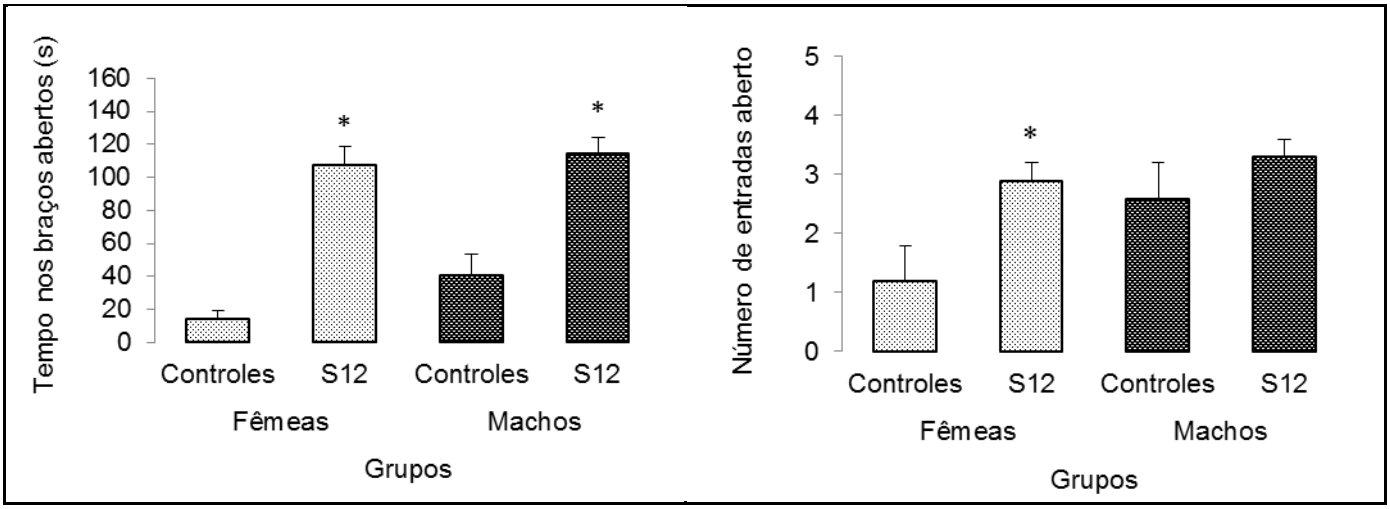

Figura 10. Tempo de exploração e frequência de entradas nos braços abertos do labirinto em cruz elevado, em machos e fêmeas da linhagen Filô-HE (S12) e animais controles.
*, Diferente dos animais controles (*Student Newman Keuls*, P < 0,05).

A Figura 11 representa a comparação da distância percorrida nos braços abertos e fechados, número de entradas nas extremidades dos braços abertos, frequência de comportamentos associados à limpeza e frequência de esticadas em áreas protegidas do labirinto em cruz elevado em ratos machos e fêmeas

das linhagens Filô-HE (S12) e animais controles. Os testes *U* de Mann-Whitney e *t* de *Student* indicaram que tanto fêmeas como machos da linhagem Filô-HE percorrem uma distância maior nos braços abertos do LCE que os animais controles, respectivamente, ($U_{[18]}$ = 000,00; P<0,001), ($U_{[21]}$ = 120,00; P<0,001). De forma semelhante, fêmeas e machos geração S12, entram mais nos braços abertos do LCE, que as fêmeas e machos controles, respectivamente, ($U_{[18]}$ = 10,500; P=0,005), ($t_{[21]}$ = 6,805; P<0,001), e apresentam uma frequência menor no número de comportamentos associados à limpeza, quando comparados aos animais controles, respectivamente ($t_{[18]}$ = -8,427; P<0,001), ($t_{[21]}$ = -6,878; P<0,001). Fêmeas e machos da geração S12 também apresentaram uma frequência menor de esticadas em área protegida, quando comparados aos animais controles, respectivamente, ($U_{[18]}$ = 10,500; P=0,005), ($U_{[21]}$ = 5,500; P<0,001). Não foram encontradas diferenças para a distância percorrida nos braços fechados do labirinto em cruz elevado quando comparados fêmeas e machos da geração S12 e fêmeas e machos controles, respectivamente, ($t_{[18]}$ = -1,204; P=0,245), ($t_{[21]}$ = -1,094; P=0,287).

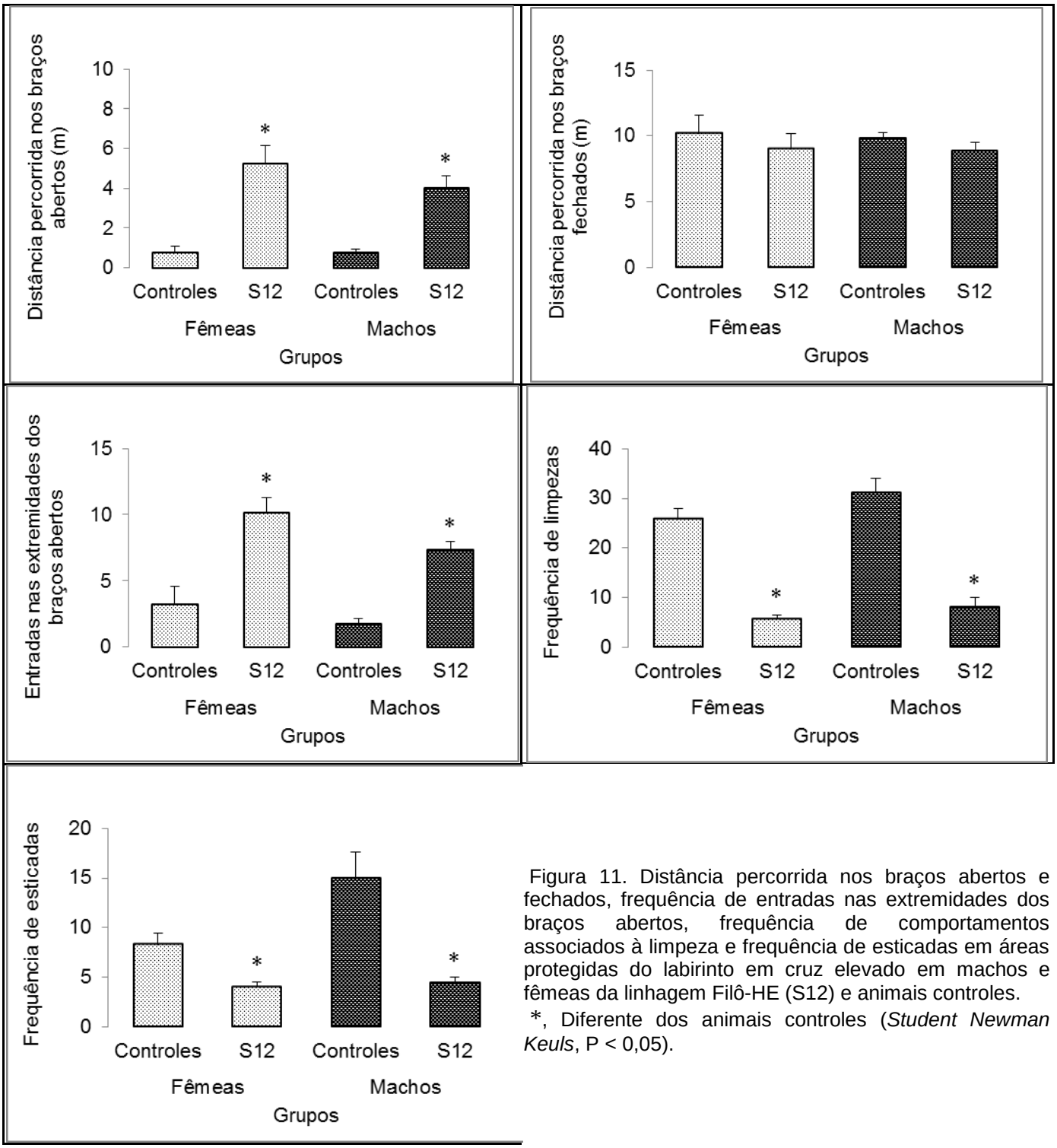

Figura 11. Distância percorrida nos braços abertos e fechados, frequência de entradas nas extremidades dos braços abertos, frequência de comportamentos associados à limpeza e frequência de esticadas em áreas protegidas do labirinto em cruz elevado em machos e fêmeas da linhagem Filô-HE (S12) e animais controles. *, Diferente dos animais controles (*Student Newman Keuls*, P < 0,05).

A Figura 12 apresenta a comparação das latências de entradas na área central e tempo gasto nas áreas centrais do campo aberto em ratos machos e fêmeas das linhagens Filô-HE (S12) e animais controles. Os testes *U* de Mann-Whitney e *t* de *Student* indicaram que tanto fêmeas como machos da linhagem

Filô-HE apresentam uma menor latência de entradas na área central do campo aberto que os animais controles, respectivamente, ($U_{[18]}$ = 81,500; P=0,003), ($U_{[21]}$ = 7,000; P<0,001). De forma semelhante, fêmeas e machos da geração S12 gastaram mais tempo explorando as áreas centrais do aparato, quando comparados aos animais controles, respectivamente, ($t_{[18]}$ = 15,116; P<0,001), ($t_{[21]}$ = 12,870; P<0,001).

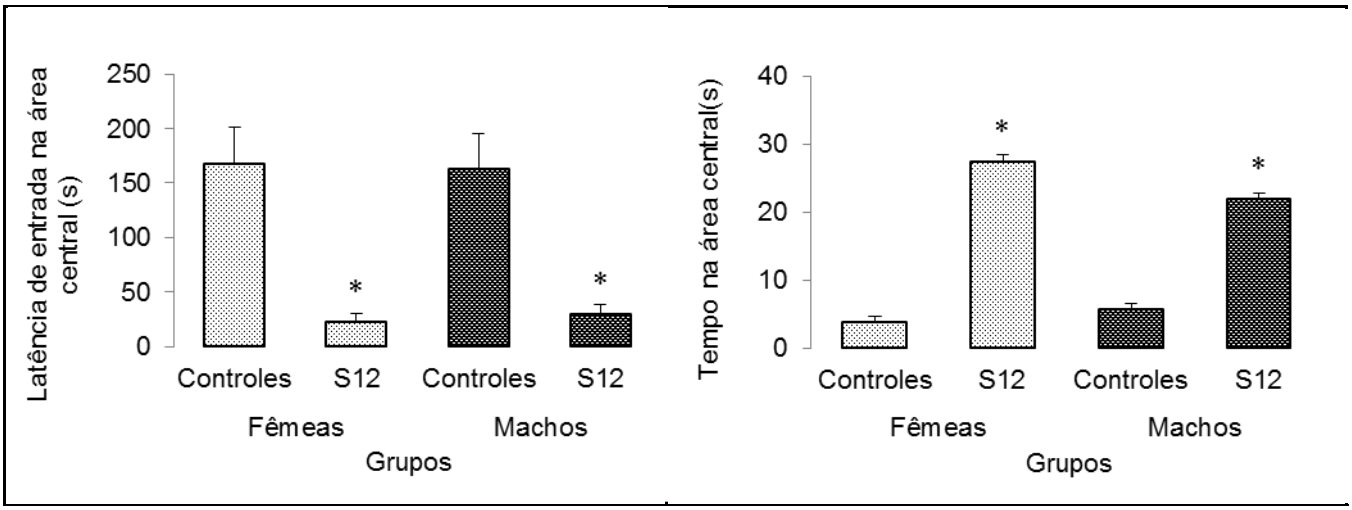

Figura 12. Latência de entrada nas áreas centrais e tempo gasto nas áreas centrais do Campo Aberto.
*, Diferente dos animais controles (*Student Newman Keuls*, P < 0,05).

A Figura 13 apresenta a comparação das amplitudes médias e latências das respostas de sobressalto em ratos machos e fêmeas das linhagens Filô-HE (S12) e animais controles. O teste *t* de *student* para medidas independentes indicou que tanto fêmeas como machos da linhagem Filô-HE possuem uma amplitude menor no sobressalto que os animais controles, respectivamente, ($t_{[18]}$ = 3,009; P=0,008), ($t_{[21]}$ = 4,735; P<0,001). De forma semelhante, os machos da geração S12 apresentam uma latência maior no sobressalto quando comparados ao controle, ($U_{[21]}$ = 94,500; P=0,025). Não foram encontradas diferenças para as latências de sobressalto entre as fêmeas da geração S12 e as controles ($U_{[18]}$ = 33,000; P=0,345).

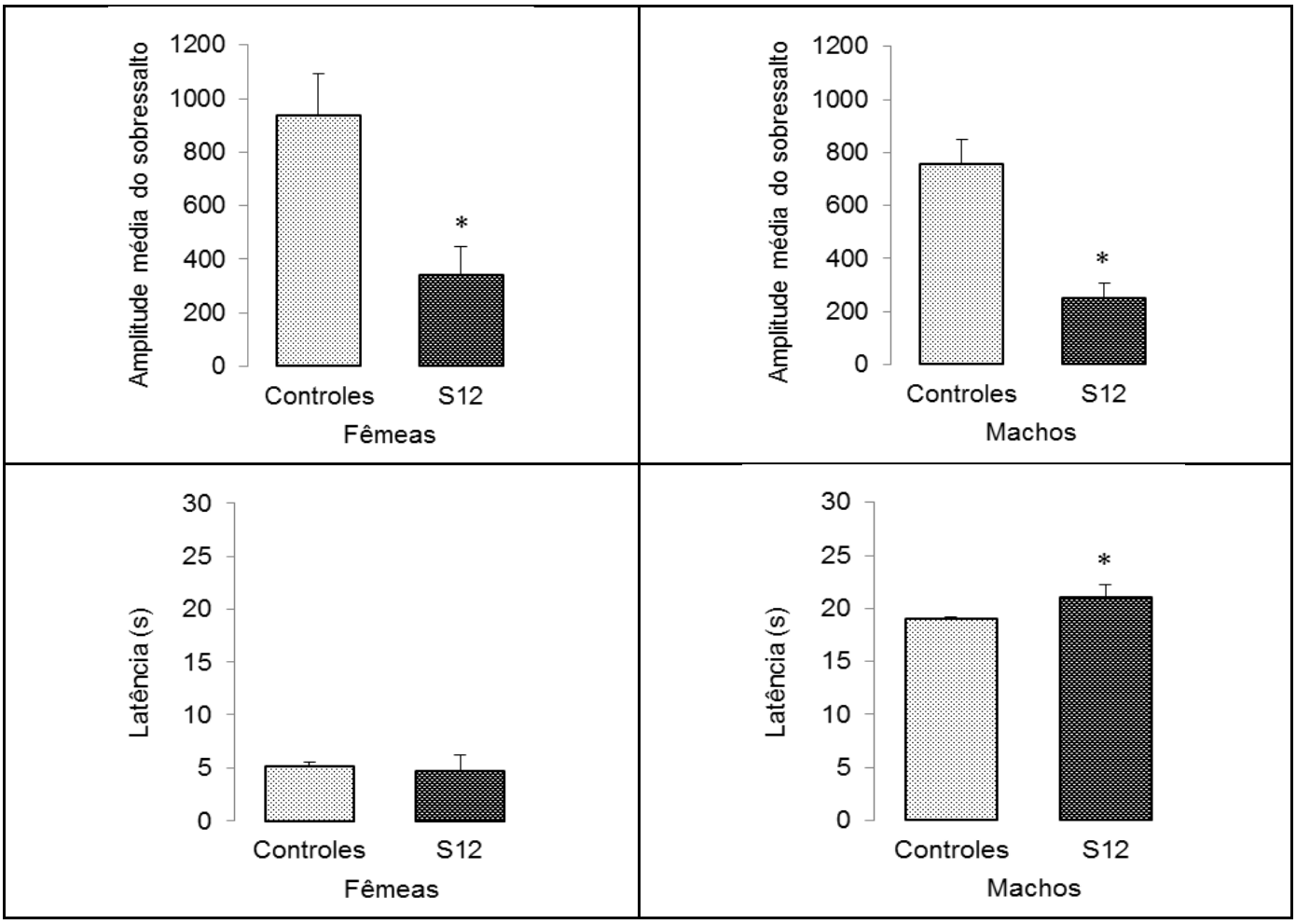

Figura 13. Amplitude média e latência das respostas de sobressalto em fêmeas e machos da geração S12 e dos animais controles.
*, Diferente dos animais controles (*Student Newman Keuls*, P < 0,05).

A Figura 14 apresenta a comparação do tempo de exploração do braço aberto e latência de entrada no aberto do gradiente de aversão elevado em ratos fêmeas e machos das linhagens Filô-HE (S12) e animais controles. O teste *U* de *Mann-Whitney* indicou que tanto fêmeas como machos da linhagem Filô-HE passam mais tempo explorando o braço aberto do gradiente de aversão elevado que os animais controles, respectivamente, ($U_{[18]}$ = 1,000; P<0,001), ($U_{[21]}$ = 120,000; P<0,001). De forma semelhante, fêmeas e machos da geração S12 apresentam latências de entradas no braço aberto do gradiente de aversão elevado menores que os animais controle, respectivamente, ($U_{[18]}$ = 90,000; P<0,001), ($U_{[21]}$ = 0,000; P<0,001).

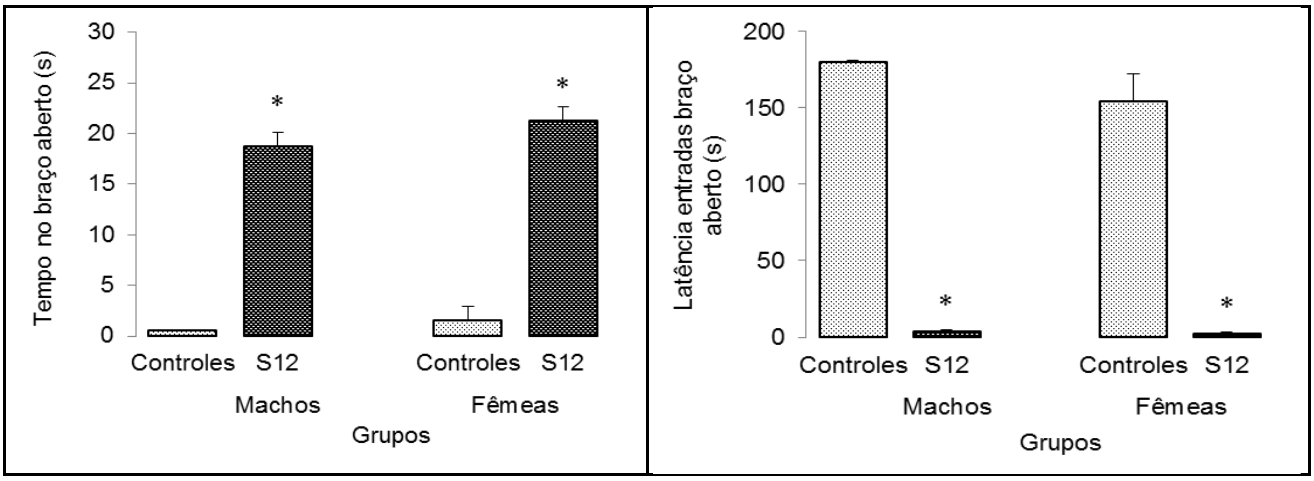

Figura 14. Tempo de exploração e latências de entrada no braço aberto do gradiente de aversão elevado em fêmeas e machos da geração S12 e dos animais controles.
*, Diferente dos animais controles (*Student Newman Keuls*, P < 0,05).

A Figura 15 apresenta a comparação do tempo de exploração do braço fechado e frequências de levantadas na área de transição túnel-braço fechado do gradiente de aversão elevado em ratos fêmeas e machos da linhagem Filô-HE (S12) e animais controles. O teste *t* de *Student* para medidas independentes indicou que os machos da linhagem Filô-HE passam mais tempo explorando o braço fechado do gradiente de aversão elevado que os animais controles ($t_{[21]}$ = 5,387; P<0,001), entretanto, não foram encontradas diferenças para o tempo de exploração do braço fechado do gradiente de aversão elevado entre as fêmeas da geração S12 e as controles, ($t_{[18]}$ = -3,473; P=0,708). Além disso, o teste *t* de *Student* para medidas independentes indicou que as fêmeas controle apresentam uma frequência maior de levantadas na área de transição túnel-braço fechado do gradiente de aversão elevado que os animais da geração S12 ($t_{[18]}$ = 2,542; P=0,021), entretanto, não foram encontradas diferenças para a frequência de levantadas na área de transição túnel-braço fechado do gradiente de aversão elevado entre os machos da geração S12 e os controles, ($t_{[21]}$ = 0,954; P=0,352).

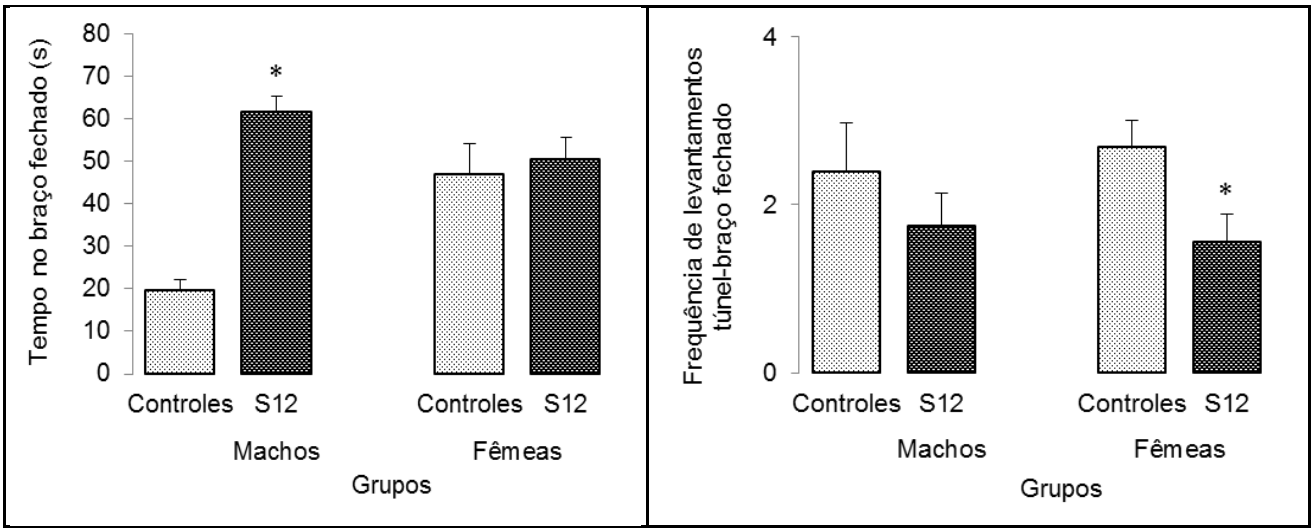

Figura 15. Tempo de exploração do braço fechado e frequência de levantadas na área de transição túnel-braço fechado do gradiente de aversão elevado em fêmeas e machos da geração S12 e dos animais controles.
*, Diferente dos animais controles (*Student Newman Keuls*, P < 0,05).

A Figura 16 apresenta a comparação das latências de descidas da plataforma na esquiva passiva em ratos fêmeas e machos das linhagens Filô-HE (S12) e animais controles. O teste *U* de *Mann-Whitney* indicou que tanto as fêmeas como os machos controles possuem uma latência maior para descer da plataforma no *step-down*, quando comparados às fêmeas e machos da geração S12, respectivamente, ($U_{[18]}$ = 115,000; P<0,001), ($U_{[21]}$ = 70,000; P=0,035).

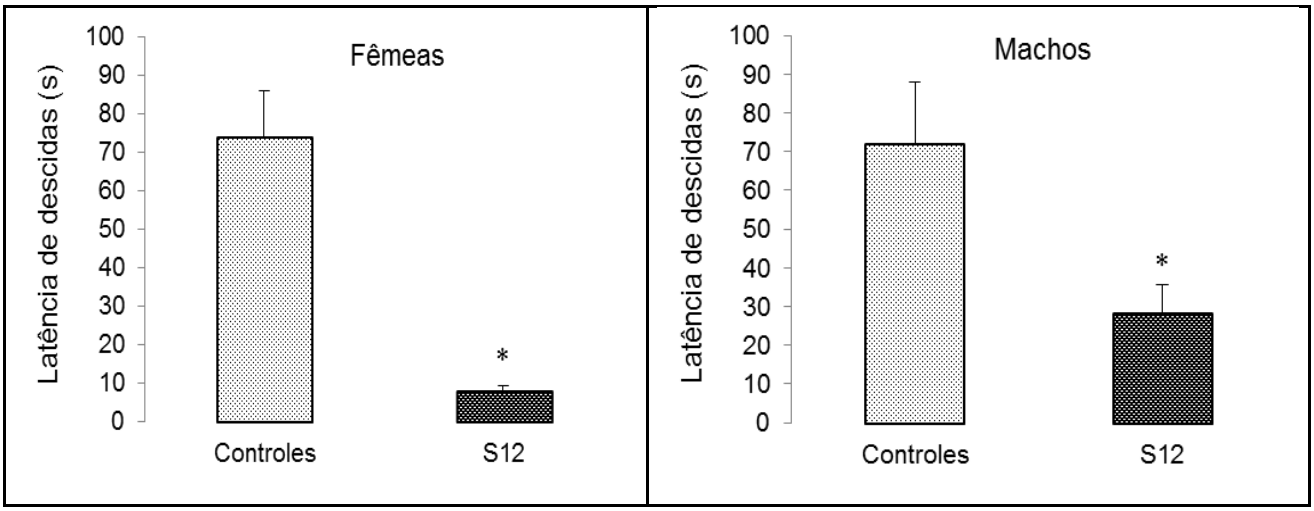

Figura 16. Latências de descidas da plataforma no teste *step-down* em fêmeas e machos da geração S12 e dos animais controles. *, Diferente dos animais controles (*Student Newman Keuls*, P < 0,05).

A Figura 17 apresenta a comparação das latências de encontro da plataforma submersa no labirinto aquático de Morris em ratos fêmeas e machos das linhagens Filô-HE (S12) e animais controles. O teste *U* de *Mann-Whitney* não indicou diferenças para as latências de encontro da plataforma submersa quando comparados fêmeas e machos da geração S12, com os animais controles, respectivamente, ($U_{[18]}$ = 27,000; P=0,251), ($U_{[21]}$ = 21,000; P=0,093).

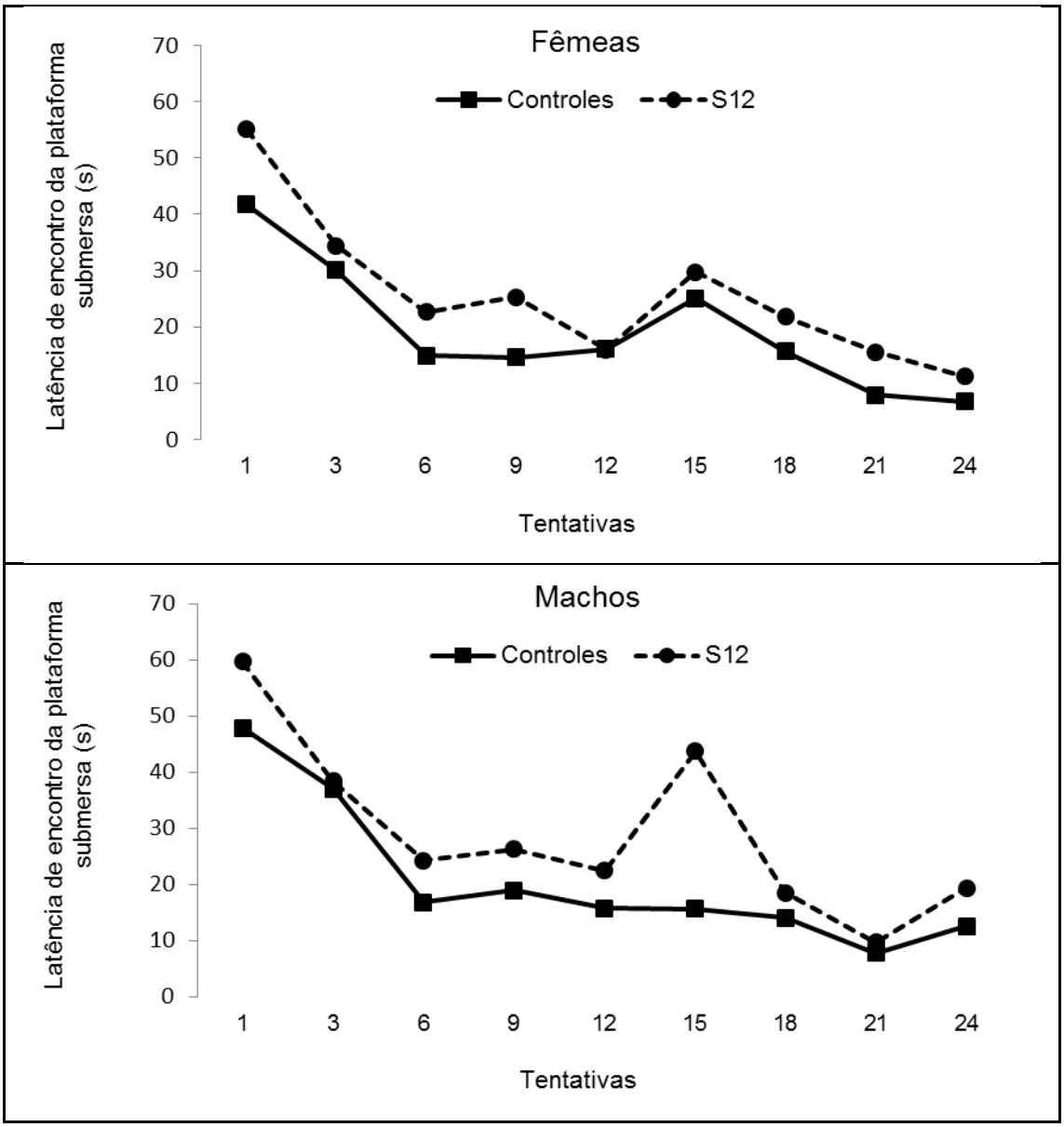

Figura 17. Latências de encontro da plataforma no labirinto aquático de Morris em fêmeas e machos da geração F12 e dos animais controles.

5. DISCUSSÃO

5.1 SELEÇÃO DAS LINHAGENS FILÔ-HE E FILÔ-LE

Os dados apresentados nas Figuras 2, 3 evidenciam de forma clara o processo de seleção de duas linhagens de ratos *Wistar* com características distintas para a exploração dos braços abertos do labirinto em cruz elevado, uma linhagem com características de alta exploração (Filô *High Exploration* – Filô-HE), e uma outra com características de baixa exploração (Filô *Low Exploration* – Filô-LE).

Como citado anteriormente, umas das vantagens da seleção genética bidirecional está relacionada à necessidade de um menor número de gerações para que uma determinada característica seja selecionada, ou seja, em poucas gerações apresentam-se populações com características distintas, fato esse que pode ser observado na Figura 2. A partir da terceira geração, tem-se um aumento gradativo da exploração dos braços abertos do LCE para os animais da linhagem Filô-HE, e uma diminuição gradativa da exploração para os animais da linhagem Filô-LE.

De forma semelhante, para além das diferenças entre as duas linhagens (Filô-HE e Filô-LE), no que se refere à exploração dos braços abertos do LCE, a Figura 2 demonstrou padrão semelhante ao relatado por Liebsch et al. (1998a), e Ramos et al. (2002), com relação às semelhanças de desempenho entre machos e fêmeas, ou seja, mesmo com pequenas variações entre os tempos gastos na exploração dos braços abertos do LCE, não foi encontrada diferença significativa entre os sexos ao longo das doze gerações, tanto para a linhagem Filô-HE, como para a linhagem Filô-LE.

Tal fato é interessante de ser observado considerando que alguns dados da literatura como de Johnston e File (1990), demonstraram que fêmeas de ratos encapuzados exploravam mais os braços abertos do LCE que os machos. Essa diferença encontrada entre o presente trabalho e alguns dados da literatura pode estar relacionada à acentuação do traço emocional causada pela seleção promovida, que ao longo das doze (12) gerações parece ter sido cada vez mais fortalecido.

O aumento gradativo da exploração dos braços abertos pelos animais da linhagem Filô-HE torna-se ainda mais evidente quando comparamos as gerações iniciais (S0 e S6), com as gerações mais recentes (S9 e S12), como pode ser observado na Figura 3. Os animais da geração S12 passam o dobro de tempo explorando os braços abertos do labirinto em cruz elevado (LCE) quando comparados aos animais provenientes do Biotério Central da USP-RP (S0), o que indica que os componentes herdados através da seleção genética associados à emoção poderiam estar cada vez mais presentes nos animais dessa linhagem.

Landgraf; Wigger (2002) apontaram em seu estudo, que mesmo após doze gerações de cruzamentos seletivos de seus ratos, parte dos animais da linhagem *low anxiety-related behavior* (LAB), ainda frequentavam os braços abertos do LCE. Entretanto, como pode-se observar nos dados apresentados pelas Figuras 2 e 3, os ratos da linhagem Filô-LE deixaram de frequentar os braços abertos já na sexta geração (S6), o que pode ser um bom indicativo do fortalecimento de características emocionais associadas a determinados padrões comportamentais herdados ao longo das gerações.

5.2 TESTES REALIZADOS NAS GERAÇÕES (S6, S9 E S12)

Os dados apresentados na Figura 4 indicaram, assim como nas demais gerações, uma clara diferença entre as linhagens que foram selecionadas. Os animais da linhagem Filô-HE, exploraram mais os braços abertos do LCE que os animais da linhagem Filô-LE. Além disso, pode-se observar que os animais da geração S12 da linhagem Filô-HE, passam quase 3 vezes mais tempo nos braços abertos que os animais da geração S6 dessa mesma linhagem, o que demonstra que as características emocionais associadas a esse padrão exploratório foram se tornando cada vez mais acentuadas ao longo das gerações.

Pellow et al. (1985) e Pellow; File (1986), afirmavam que a exploração dos braços abertos estaria relacionada a diferentes níveis de ansiedade, de forma que, quanto maior o tempo explorando os braços abertos, menores os níveis de ansiedade associados, e quanto menor o tempo de exploração, maiores os níveis de ansiedade. Levando-se em conta tais apontamentos, poder-se-ia sugerir que os animais da linhagem Filô-HE seriam menos ansiosos, ou teriam menos comportamentos associados à ansiedade (LIEBSCH et al.,1998a,b; LANDGRAF; WIGGER, 2002).

Já os animais da linhagem Filô-LE, seriam mais ansiosos, ou teriam mais comportamentos associados à ansiedade. No entanto, estudos complementares (comportamentais, farmacológicos, etc) se fazem necessários para que se possam confirmar tais hipóteses, até porque outros dados apresentados nesse estudo (discutidos posteriormente), também apontam para a seleção de outros componentes emocionais.

Os dados apresentados na Figura 5 representaram o desempenho das duas linhagens (Filô-HE e Filô-LE), nas gerações S6, S9 e S12, em uma adaptação do teste do sobressalto potencializado pelo medo. Os resultados encontrados indicaram uma diferença clara entre as linhagens, principalmente quando comparamos os animais da geração S12 (Filô-HE), com os animais da linhagem Filô-LE. Esse achado é semelhante ao encontrado por Aumatell-López et al. (2009), que afirmava em seu trabalho que os ratos da linhagem *Roman Low-Avoidance* (RLA) apresentaram níveis maiores de respostas de medo condicionado e isso poderia indicar um nível maior de comportamentos associados ao medo. O mesmo poderia estar ocorrendo com os animais da linhagem menos exploradora (Filô-LE).

Outro dado interessante de ser observado na figura 5 é a queda significativa na amplitude média da resposta de sobressalto que ocorre tanto nas fêmeas como nos machos da geração S12 (Filô-HE), quando comparados aos animais das gerações S6 e S9 (Filô-HE), tal fato poderia estar associado a uma diminuição da responsividade emocional de tais animais a um contexto aversivamente condicionado, porém, estudos posteriores envolvendo outros modelos de aversividade condicionada se fazem necessários para que se possa ter uma maior clareza acerca de tais respostas comportamentais.

A Figura 6 apresenta os dados, que segundo Rico (2011), seriam medidas de avaliação dos níveis de impulsividade no gradiente de aversão elevado. Diante disso, poder-se-ia sugerir que os animais da linhagem Filô-HE (S6, S9 e S12), apresentariam mais comportamentos associados à impulsividade que os animais da linhagem Filô-LE (S6 e S8), até mesmo porque, o desempenho dos animais da linhagem Filô-HE, foi superior ao

descrito por Rico (2011) com ratos sob o efeitos de ansiolíticos gabaérgicos e drogas monoaminérgicas: pronunciado efeito sobre comportamentos impulsivos em modelos operantes (EVENDEN, 1998; 1999; DAVIDS et al., 2003; EVEDEN; KO, 2005).

De forma semelhante, a figura 7 indica que os animais da linhagem Filô-HE (S6, S9 e S12) entraram mais nos braços fechados, gastaram mais tempo no mesmo e percorreram uma distância maior na área do túnel, medidas que, segundo Rico (2011), estariam associadas a menores níveis de ansiedade e a maiores níveis de locomoção. Assim, poder-se-ia sugerir que os animais da linhagem Filô-HE seriam menos ansiosos e mais exploradores que os animais da linhagem Filô-LE, até mesmo porque o desempenho dos ratos da linhagem mais exploradora apresentaram um desempenho superior ao de ratos sob o efeito de ansiolíticos gabaérgicos e drogas monoaminérgicas do estudo de Rico (2011).

Cabe ressaltar que as fêmeas da geração S9 da linhagem Filô-HE entraram significativamente menos tempo no braço aberto do gradiente de aversão elevado, que as fêmeas da geração S6, entretanto, tal fato deve estar relacionado a um padrão exploratório diferente, pois o tempo gasto no braço aberto do aparato não foi comprometido, até mesmo porque, as Fêmeas da geração S12 apresentaram desempenho semelhante às fêmeas da geração S6.

Por fim, os dados da Figura 8 representariam, segundo Rico (2011), medidas de avaliação de risco apresentadas pelos animais quando expostos ao gradiente de aversão elevado. Pode-se observar que os animais da linhagem Filô-HE (S6, S9 e S12), apresentam mais comportamentos de

avaliação de risco que os animais da linhagem Filô-LE. Segundo Blanchard et al. (1990) e Rodgers e Cole (1993), um número maior comportamentos relacionados à avaliação de risco poderia estar relacionado a maiores níveis de ansiedade.

Entretanto, os demais dados relacionados ao gradiente de aversão elevado indicaram que os animais da linhagem Filô-HE exploram muito mais o aparato que os animais da linhagem Filô-LE e, por conta disso, os maiores índices de avaliação de risco devem estar relacionados a altos índices de exploração do aparato, e não a altos níveis de ansiedade, até mesmo porque, a Figura 7 apresentou dados que indicam um menor nível de ansiedade nos animais da linhagem Filô-HE.

Apesar dos dados citados acima, a Figura 8 indicou também, que os animais da geração S9 e, principalmente, S12 da linhagem Filô-HE de ambos os sexos apresentam uma diminuição significativa nos comportamentos de levantar quando comparados aos animais da geração S6, fato que poderia indicar uma diminuição nas respostas de avaliação de risco apresentadas no gradiente de aversão elevado.

Entretanto, observa-se também que os machos da geração S9 e S12 (Filô-HE) gastam significativamente mais tempo na área de segurança (transição túnel-fechado) do gradiente de aversão elevado, que os animais da geração S6 da mesma linhagem, dado esse, que em contraposição ao citado acima, poderia indicar que os machos da geração S9 apresentam mais comportamentos associados à avaliação de risco. Porém, tal incoerência poderia ser melhor explicada por padrões exploratórios distintos, até mesmo porque, tais diferenças não são encontradas nas fêmeas dessas gerações.

A Figura 09 inclui os dados referentes ao desempenho das linhagens no teste de esquiva passiva (*step-down*) e pode-se observar que os animais da linhagem Filô-LE (S6, S9 e S12) exibem uma latência muito maior na descida da plataforma, quando comparados com os animais da linhagem Filô-HE. Beuzen; Belzung (1995) afirmam em seu trabalho que camundongos mais ansiosos apresentavam desempenho melhor na tarefa de esquiva passiva, que os animais menos ansiosos, dados esses que permitiram aos autores concluírem que, para esses animais, altos níveis de ansiedade se correlacionariam positivamente com altas performances no teste de memória emocional (*step-dow).*

De forma semelhante, poder-se-ia considerar que os animais da linhagem Filô-LE também apresentaram uma performance melhor no teste de memória emocional, quando comparados aos animais da linhagem Filô-HE. Entretanto, pode-se observar que tantos os animais da linhagens Filô-HE, como os da Filô-LE de ambos o sexo, apresentam um déficit acentuado na aquisição da resposta de esquiva, pois não foram encontradas diferenças entre os dias de treino e teste.

Por outro lado, considerando que o comportamento de permanecer na plataforma poderia indicar uma reação de medo, subjacente à reposta de esquiva, poder-se-ia considerar também, que os animais da linhagem Filô-LE seriam mais reativos a estímulos aversivos que os animais da linhagem Filô-HE.

5.3 COMPARAÇÕES ENTRE A GERAÇÃO S12 (FILÔ-HE) E ANIMAIS CONTROLES

A figura 10 evidencia de forma clara que os animais selecionados a partir do critério de maior tempo de exploração dos braços abertos (Filô-HE-F12), de fato apresentam um padrão exploratório associado ao tempo de exposição às áreas de risco do LCE muito superior ao de animais controles. Interessante de ser observado é que tal desempenho dos animais da linhagem Filô-HE se assemelha ao de outros dados da literatura (PELLOW; FILE, 1986; CRUZ; FREI; GRAEFF, 1994; GARCIA et al., 2005)**.** Porém os mesmos faziam uso de drogas ansiolíticas clássicas, que aumentavam o tempo de exploração dos braços abertos no LCE. Tais evidências apontam para o fato de que a seleção promovida ao longo de doze gerações, possivelmente reduziu comportamentos relacionados à ansiedade.

Corroborando esses dados, a figura 11 apresenta resultados que demonstram semelhanças na exploração dos braços fechados do LCE quando se compara o deslocamento total dos animais da linhagem Filô-HE e controles.

Tal resultado, apesar de chamar a atenção para a hipótese de que a exploração dos braços fechados não teria sido alterada pela seleção, na verdade, poderia indicar que os animais da linhagem Filô-HE estão dividindo o tempo de exploração dos braços fechados e abertos do LCE de forma bastante semelhante, pois como é demonstrado na figura 11, o deslocamento nos braços fechados do LCE é apenas ligeiramente maior que o deslocamento nos braços abertos para os animais da linhagem Filô-HE, dado esse que provavelmente indique uma diminuição da aversividade dos braços abertos

nessa linhagem, pois a mesma distribuição exploratória do LCE não se apresenta para os animais controle.

De forma semelhante, a figura 11 indica uma significativa diferença entre os animais da linhagem Filô-HE e controles para a frequência de entradas nas extremidades dos braços abertos do LCE, sendo que os primeiros frequentam muito mais as extremidades dos braços abertos que os segundos. Essa frequência chega a ser superior até mesmo à de animais sob efeito de apomorfina, agonista dopaminérgico (D2) que altera respostas comportamentais de defesa, aumentando a motivação associada à exploração de ambientes potencialmente aversivos do LCE (GARCIA et al., 2005).

Outro dado que chama a atenção na figura 11 é a baixa frequência de comportamentos de limpeza dos animais da linhagem Filô-HE, quando comparados aos animais controle. Os comportamentos de limpeza sempre figuraram entre as medidas associadas à exploração do LCE em roedores, mas pouco se discutia sobre a sua real função no repertório comportamental de defesa desses animais.

Trabalhos como o de Escorihuela, et al. (1999) e Estanislau et al. (2011, 2012, 2013) sugeriram que os comportamentos de limpeza teriam uma associação com o contexto onde os mesmos se apresentavam, além de apresentarem uma correlação com comportamentos associados à ansiedade no LCE, ou seja, animais que exploravam menos os braços abertos, também apresentavam uma frequência maior de comportamentos de limpeza, e animais que frequentavam mais esses braços do LCE, apresentariam uma frequência menor de comportamentos de limpeza (ESTANISLAU et al., 2011).

Considerando tais dados da literatura e o desemprenho dos animais da linhagem Filô-HE, poder-se-ia sugerir que a baixa frequência de comportamentos de limpeza nesses animais, também poderia ser um indicativo da seleção associada a uma diminuição de comportamentos do tipo ansiedade.

A figura 11 demonstra ainda, uma baixa frequência dos comportamentos de esticar em área protegida nos animais da linhagem Filô-HE, quando comparados aos animais controle. Tais comportamentos vêm sendo descritos na literatura (COLE; RODGERS, 1993, CRUZ; FREI; GRAEFF, 1994, RODGERS; DALVI, 1997) como uma das principais respostas de defesa associadas à avaliação de risco de roedores quando expostos a ambientes potencialmente aversivos.

Frente a isso, poder-se-ia afirmar que os animais da linhagem Filô-HE apresentariam uma baixa frequência de respostas de avaliação de risco frente a tais ambientes, fato que para alguns autores (BLINDER; et al., 2004, PAWLAC; et al., 2012) poderia ser um bom indicativo de comportamentos associados à impulsividade.

De forma semelhante, a figura 12 indica um padrão exploratório do campo aberto, próximo ao encontrado no LCE, ou seja, os animais da linhagem Filô-HE frequentam mais as áreas potencialmente aversivas do aparato (áreas centrais) que os animais controle.

O tempo gasto na exploração das áreas centrais do aparato nos animais da linhagem Filô-HE, é muito semelhante aos encontrados nos animais da linhagem *Floripa High* (RAMOS et al., 2003), que foram selecionados a partir do critério de maior exploração das áreas centrais do campo aberto, fato esse

que, assim como os próprios autores sugerem, poderia ser interpretado como uma diminuição de comportamentos associados à ansiedade nessas linhagens.

Outro dado interessante apresentado na figura 12 refere-se ao fato dos animais da linhagem Filô-HE apresentarem baixa latência de entrada nas áreas centrais do campo aberto, quando comparados aos animais controle.

Pawlac; et al., (2012) sugerem que essa poderia ser uma boa medida para mensurar comportamentos associados à impulsividade, e tomando essa sugestão com base, somado ao fato de que à frequência de esticadas no LCE também é baixa nos animais da linhagem Filô-HE, poderíamos sugerir que os animais dessa linhagem apresentam uma alta frequência de comportamentos associados à aproximação de ambientes potencialmente perigosos, o que por conseguinte, poderia indicar níveis maiores de impulsividade.

As figuras 13 e 16 parecem indicar que a seleção imposta aos animais da linhagem Filô-HE, produziu ratos com uma responsividade menor a situações aversivamente condicionadas, pois a resposta de sobressalto desses animais foi muito menor quando comparados aos animais controles.

Por outro lado, as latências de descidas da plataforma dos animais da linhagem Filô-HE, vinte e quatro horas após tomarem choques nas patas, foram muito inferiores as dos animais controles que passaram pelas mesmas condições experimentais. Esse fato reforça a hipótese de uma atenuação da responsividade emocional à situações aversivas, ou mesmo, levanta uma nova hipótese associada a seleção de outros componentes emocionais, ou seja, a atenuação do medo, e a acentuação da impulsividade.

Tomando como base essa última hipótese, as figuras 14 e 15 reforçam a possibilidade de se ter selecionado, para além de componentes emocionais

associados à ansiedade e ao medo, a impulsividade. Rico (2011) aponta que a latência de entrada no braço aberto no gradiente de aversão elevado e o tempo de permanência no mesmo seriam as principais medidas associadas à impulsividade, e a figura 15 indica latência muito baixa dos animais da linhagem Filô-HE, quando comparados aos animais controles.

Esse dado citado anteriormente, pode indicar que, ao contrário dos animais controles, que avaliam bastante o risco de se expor ao ambiente mais aversivo do aparato (braço aberto), os animais da linhagem Filô-HE parecem avaliar pouco o risco de se expor a tal ambiente, e essa hipótese é ainda reforçada pelo menor número de comportamentos de levantar na área de transição túnel-braço fechado, principal medida associada à avaliação de risco no gradiente de aversão elevado (RICO, 2011).

Por outro lado, vários estudos que utilizam o reforço diferencial de baixa frequência (DRL) (RICHARDS; SEIDEN, 1991, SANABRIA; KILLEEN, 2008, ORDUÑA; VALENCIA-TORRES; BOUZAS, 2009), o labirinto em cruz elevado (ALMEIDA; GARCIA; OLIVEIRA, 1993, ALMEIDA; TONKISS; GALLER, 1996) e o labirinto aquático de Morris (FUKUDA; FRANÇOLIN-SILVA; ALMEIDA, 2002, FUKUDA, et al., 2007), sugerem que a aprendizagem poderia estar comprometida em animais que apresentam frequência alta de comportamentos associados à impulsividade.

Todavia, a figura 17 não indicou uma diferença significativa na curva de aprendizagem (representada pela latência de encontro da plataforma submersa no labirinto aquático de Morris) dos animais da linhagem Filô-HE, quando comparados aos animais controle. Tal fato poderia ser explicado pela escolha da tarefa, que por se basear na exploração do aparato como estratégia para

encontrar a plataforma submersa, poderia favorecer em alguns momentos àqueles animais que mais exploram o labirinto, característica essa, fortemente presente nos animais da linhagem Filô-HE.

Os dados encontrados na tarefa de esquiva passiva (figura 16) poderiam fortalecer essa hipótese, já que existe um forte comprometimento na aprendizagem de esquiva ao choque nos animais da linhagem Filô-HE, quando comparados aos controles.

Assim, comportamentos como: a) baixa frequência de esticadas em área protegida no LCE, b) baixa latência de entradas nas áreas centrais do campo aberto; c) baixa latência de entradas e alto tempo de exploração no braço aberto do gradiente de aversão elevado; d) dificuldade na aprendizagem da tarefa de esquiva ao choque nas patas no *step-down*, caracterizam algumas evidências que apontam para o fato de que os animais da linhagem Filô-HE apresentariam uma frequência maior de comportamentos associados à impulsividade.

Essa hipótese poderia ser melhor confirmada com o acréscimo de testes comportamentais como o reforço diferencial de baixa frequência (DRL), e testes de exploração neuroquímica, direcionados principalmente, ao estudo do funcionamento do sistema de inibição comportamental, que poderia estar hipo-reativo às alterações ambientais, favorecendo as respostas de aproximação de ambientes potencialmente perigosos (impulsividade).

6 CONCLUSÃO

De uma forma geral, os dados indicaram a seleção de duas linhagens de ratos Wistar com características distintas para a exploração dos braços abertos do labirinto em cruz elevado. De um lado, foi selecionada a linhagem Filô-HE, que possui como principal característica, altos índices de exploração de ambientes que geralmente são evitados por outros animais. De outro, foi selecionada (até a oitava geração), a linhagem Filô-LE, que pouco explorava ambientes potencialmente aversivos.

Esses índices apresentados pelas diferentes linhagens, poderiam ser interpretados, respectivamente, como baixa e alta frequência de comportamentos associados à ansiedade e medo, baixa e alta frequência de comportamentos associados à impulsividade, altos e baixos níveis de comprometimento na aprendizagem relacionada a memórias emocionais, ou até mesmo a somatória de todas essas características comportamentais.

Porém, faz-se necessário que os estudos supracitados avancem no sentido de explorar aspectos neurofisiológicos, psicofarmacológicos, bioquímicos e genotípicos, ampliando a investigação dos componentes emocionais selecionados, bem como, promovendo um controle mais rígido dos traços selecionados e de suas relações com outros componentes que possam interferir na seleção.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, S. S.; GARCIA, R. A.; DE OLIVEIRA, L. M. Effects of early protein malnutrition and repeated testing upon locomotor and exploratory behaviors in the elevated plus-maze. **Physiology & behavior**, v. 54, n. 4, p. 749-752, 1993.

ALMEIDA, S. S.; TONKISS, J.; GALLER, J. R. Prenatal protein malnutrition affects exploratory behavior of female rats in the elevated plus-maze test.**Physiology & behavior**, v. 60, n. 2, p. 675-680, 1996.

ANGER, D. The dependence of interresponse times upon the relative reinforcement of different interresponse times. **Journal of Experimental Psychology**, v. 52, n. 3, p. 145-161, 1956.

ANDERSEN, M. L.; D'ALMEIDA, V.; KO, G. M.; KAWAKAMI, R.; MARTINS, P. J. F.; MAGALHÃES, L. E.; et al. **Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação**. 1ª Ed. Universidade Federal Paulista/SBCAL, Brasil, 2004.

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

BEUZEN, A.; BELZUNG, C. Link between emotional memory and anxiety states: a study by principal component analysis. **Physiology and Behavior**, v. 58, n.1, p. 111-118, 1995.

BELL, D. D.; ZUCKER, I. Sex differences in body weight and eating: organization and activation by gonadal hormones in the rat. **Physiology and Behavior**, v. 7, n.1, p. 27-34, 1971.

BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J; TOM, P.; RODGERS, R. J. Diazepam changes risk assessment in an anxiety/defence test battery. **Psychopharmacology**, v. 101, n. 4, p. 511-518, 1990.

BINDER, E. et al. Regular voluntary exercise reduces anxiety-related behaviour and impulsiveness in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 155, n. 2, p. 197-206, 2004.

BRUSH, F R, BARON, S., FROEHLICH, J. C., ISON, J. R., PELLEGRINO, L. J., PHILLIPS, D. S., SAKELLARIS, P. C., ET AL. Genetic differences in avoidance learning by Rattus norvegicus: escape/avoidance responding, sensitivity to electric shock, discrimination learning, and open-field behavior. **Journal of Comparative Psychology (Washington, D.C.: 1983),** v. 99, n.1, p. 60-73, 1985.

BRUSH, F R. Selection for differences in avoidance learning: the Syracuse strains differ in anxiety, not learning ability. **Behavior Genetics**, v. 33, n. 6, 677-696, 2003.

CASTRO GOMES, V.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Amygdaloid lesions produced similar contextual fear conditioning disruption in the Carioca high- and low-conditioned freezing rats. **Brain Research**, v. 123, n.3, 137-145, 2008.

CHEN, W.; SHIELDS, J.; HUANG, W.; KING, J. A. Female fear: Influence of estrus cycle on behavioral response and neuronal activation. **Behavioural Brain Research**, v. 201, n. 1, p. 8-13, 2009.

COLE, J. C.; RODGERS, R. J. Anxiety enhancement in the murine elevated plus-maze by immediate prior exposure to social stressors. **Physiology and Behavior**, v. 53, n. 2, p. 383-388, 1993.

CRUZ, A. P. M.; FREI, F.; GRAEFF, F. G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 49, n. 1, p. 171-176, 1994.

DAVIDS, E.; ZHANG, K.; TARAZI, F.I.; BALDESSARINI, R. J. Animal models of attention-deficit hyperactivity disorder. **Brain Research Reviews**, v. 42, n. 4, p. 1-21, 2003.

DEVALL, A. J.; LOVICK, T. A. Differential activation of the periaqueductal gray by mild anxiogenic stress at different stages of the estrous cycle in female rats. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 5, p. 1174-1185, 2010.

DIAS, G. P.; BEVILAQUA, M. C.; SILVEIRA, A. C. D.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J.; GARDINO, P. F. Behavioral profile and dorsal hippocampal cells in carioca high-conditioned freezing rats. **Behavioural Brain Research**, v. 205, n. 2, p. 342-348, 2009.

D'HOOGE, R.; DE DEYN, P. P. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. **Brain Research Reviews**, v. 36, n. 1, p. 60-90, 2001.

ESCORIHUELA, R. M. et al. Inbred Roman high-and low-avoidance rats: differences in anxiety, novelty-seeking, and shuttlebox behaviors.**Physiology & Behavior**, v. 67, n. 1, p. 19-26, 1999.

ESTANISLAU, C.; MORATO, S. Behavior ontogeny in the elevated plus-maze: prenatal stress effects. **International Journal of Developmental Neuroscience: The Official Journal of the International Society for Developmental Neuroscience**, v. 24, n. 4, p. 255-262, 2006.

ESTANISLAU, C. et al. Individual differences in the elevated plus-maze and the forced swim test. **Behavioural processes**, v. 86, n. 1, p. 46-51, 2011.

ESTANISLAU, C. Cues to the usefulness of grooming behavior in the evaluation of anxiety in the elevated plus-maze. **Psychology & Neuroscience**, v. 5, n. 1, p. 105-112, 2012.

ESTANISLAU, C. et al. Context-dependent differences in grooming behavior

among the NIH heterogeneous stock and the Roman high-and low-avoidance rats. **Neuroscience research**, v. 77, n. 4, p. 187-201, 2013.

EVENDEN, J. L. The pharmacology of impulsive behavior in rats II: the effects of amphetamine, haloperidol, imipramine, chlordiazepoxide and other drugs on fixed consecutive number schedules (FCN 8 and FCN 32). **Psychopharmacology**, v. 138, n. 3-4, p. 283-294, 1998.

EVENDEN, J. L. The pharmacology of impulsive behavior in rats VII: the effects of serotonergic agonists and antagonists on responding under a discrimination task using unreliable visual stimuli. **Psychopharmacology**, v. 146, n. 4, p. 422-431, 1999.

EVENDEN, J. L.; KO, T. The pharmacology of impulsive behavior in rats VIII: the effects of amphetamine, methylphenidate, and other drugs on responding maintained by a fixed consecutive number avoidance schedule. **Psychopharmacology**, v. 180, n. 2, p. 294-305, 2005.

FUKUDA, M. T. H.; FRANÇOLIN-SILVA, A. L.; ALMEIDA, S. S. Early postnatal protein malnutrition affects learning and memory in the distal but not in the proximal cue version of the Morris water maze. **Behavioural brain research**, v. 133, n. 2, p. 271-277, 2002.

FUKUDA, M. T. H. et al. Effects of early protein malnutrition and scopolamine on learning and memory in the Morris water maze. **Nutritional neuroscience**, v. 10, n. 5-6, p. 251-259, 2007.

FRYE, C. A.; PARIS, J. J. Infusions of bicuculline to the ventral tegmental area attenuates sexual, exploratory, and anti-anxiety behavior of proestrous rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 93, n. 4, p. 474-481, 2009.

GARCIA, Andrea Milena Becerra et al. Effects of apomorphine on rat behavior in the elevated plus-maze. **Physiology & behavior**, v. 85, n. 4, p. 440-447, 2005.

JOHNSON, F. N. The effect of lithium chloride on one-trial passive avoidance learning in rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 56, n. 1, p. 87-91, 1976.

JOHNSTON, A. L.; FILE, S. E. Sex differences in animal tests of anxiety. **Physiology and Behavior**, v. 49, n.2, p. 245-250, 1991.

KNOLL, A. T.; MELONI, E. G.; THOMAS, J. B.; CARROLL, F. I.; CARLEZON, W. A. Anxiolytic-like effects of kappa-opioid receptor antagonists in models of unlearned and learned fear in rats. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 323, n. 3, p. 838-845, 2007.

LAMPREA, M. R. et al. Thigmotactic responses in an open-field. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 41, n. 2, p. 135-140, 2008.

LANDGRAF, R.; WIGGER, A. High vs low anxiety-related behavior rats: an animal model of extremes in trait anxiety. **Behavior Genetics**, v. 32, n. 5, p. 301-314, 2002.

LAWRENCE, D. H.; MILLER, N. E. A positive relationship between reinforcement and resistance to extinction produced by removing a source of confusion from a technique that had produced opposite results. **Journal of Experimental Psychology**, v. 37, n. 6, p. 494-509, 1947.

LIEBSCH, G.; MONTKOWSKI, A.; HOLSBOER, F.; LANDGRAF, R. Behavioural profiles of two Wistar rat lines selectively bred for high or low anxiety-related behaviour. **Behavioural Brain Research**, v. 94, n. 2, p.301-310, 1998.

LIEBSCH, G.; LINTHORST, A. C.; NEUMANN, I. D.; REUL, J. M.; HOLSBOER, F.; LANDGRAF, R. 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: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 19, n. 5, p. 381-396, 1998.

LÓPEZ-AUMATELL, R.; BLÁZQUEZ, G.; GIL, L.; AGUILAR, R.; CAÑETE, T.; GIMÉNEZ-LLORT, L.; TOBEÑA, A., ET AL. The Roman High- and Low-Avoidance rat strains differ in fear-potentiated startle and classical aversive conditioning. **Psicothema**, v. 21, n. 1, p. 27-32, 2009.

LLANEZA, D. C.; FRYE, C. A. Progestogens and estrogen influence impulsive burying and avoidant freezing behavior of naturally cycling and ovariectomized rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 93, n. 3, p. 337-342, 2009.

MARCONDES, F. K.; MIGUEL, K. J.; MELO, L. L.; SPADARI-BRATFISCH, R. C. Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze test. **Physiology and Behavior**, v.74, n. 4-5, p. 435-440, 2001.

MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Brazilian Journal of Biology**, v. 62, n. 4, p. 609-614, 2002.

MCGRADY, A. V. Effects of psychological stress on male reproduction: a review. **Systems Biology in Reproductive Medicine**, v. 13, n. 1, p. 1-7, 1984.

MILAD, M. R.; IGOE, S. A.; LEBRON-MILAD, K.; NOVALES, J. E. Estrous cycle phase and gonadal hormones influence conditioned fear extinction. **Neuroscience**, v. 164, n. 3, 2009.

MORA, S.; DUSSAUBAT, N.; DÍAZ-VÉLIZ, G. Effects of the estrous cycle and ovarian hormones on behavioral indices of anxiety in female rats. **Psychoneuroendocrinology**, v. 21, n. 7, p. 609-620, 1996.

MORRIS, R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. **Journal of neuroscience methods**, v. 11, n. 1, p. 47-60, 1984.

MYHRER, T. Neurotransmitter systems involved in learning and memory in the rat: a meta-analysis based on studies of four behavioral tasks. **Brain Research Reviews**, v. 41, n. 2-3, p. 268-287, 2003.

ORDUÑA, V.; VALENCIA-TORRES, L.; BOUZAS, A. DRL performance of spontaneously hypertensive rats: dissociation of timing and inhibition of responses. **Behavioural brain research**, v. 201, n. 1, p. 158-165, 2009.

O'DONNELL, J. M.; MAREK, G. J.; SEIDEN; L. S. Antidepressant effects assessed using behavior maintained under a differential-reinforcement-of-low-rate (DRL) operant schedule. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 29, n. 4-5, p. 785-798, 2005.

PAWLAK, C R. et al. The Elevated Plus-Maze Test: Differential Psychopharmacology of Anxiety-Related Behavior. **Emotion Review**, v. 4, n. 1, p. 98-115, 2012.

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

RADCLIFFE, R. A.; LOWE, M. V.; WEHNER, J. M. Confirmation of contextual fear conditioning QTLs by short-term selection. **Behavior Genetics**, v. 30, n. 3, 183-191, 2000.

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

RICHARDS, J. B.; SEIDEN, L S. A quantitative interresponse-time analysis of DRL performance differentiates similar effects of the antidepressant desipramine and the novel anxiolytic gepirone. **Journal of the Experimental Analysis of Behavior**, v. 56, n. 2, p. 173-192, 1991.

RICO, J. L. R. **Efeito da infecção bacteriana com lipopolissacarídeo em ratos recém-nascidos sobre respostas emocionais à novidade na adolescência**. 2011. 65 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto / USP, Ribeirão Preto, 2011.

RODGERS, R. J.; DALVI, A. Anxiety, defence and the elevated plus-maze.**Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 21, n. 6, p. 801-810, 1997.

RUNKE, D.; MCINTYRE, D. C. Assessment of anxiety-like behaviors in female rats bred for differences in kindling susceptibility and amygdala excitability. **Brain Research**, 1240, 2008.

SANABRIA, F.; KILLEEN, P. R. Evidence for impulsivity in the Spontaneously Hypertensive Rat drawn from complementary response-withholding tasks. **Behav Brain Funct**, v. 4, n. 7, 2008.

STEIMER, T.; DRISCOLL, P. Divergent stress responses and coping styles in psychogenetically selected Roman high-(RHA) and low-(RLA) avoidance rats: behavioural, neuroendocrine and developmental aspects. **Stress (Amsterdam, Netherlands***)*, v. 6, n. 2, p. 87-100, 2003.

STRONGMAN, K. T. The effect of anxiety on food intake in the rat. **Quarterly journal of experimental psychology**, v.17, n. 3, p. 255-260.

VELLANI, E.; COLASANTE, A.; MAMAZZA, L.; MINASI, M. G.; GRECO, E.; BEVILACQUA, A. **Fertility and sterility**, v. 99, n. 6, 2013.