



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS  
CENTRO BIOMÉDICO

**ESTUDO COMPARATIVO DOS COMPORTAMENTOS  
EXPLORATÓRIOS, PREDATÓRIOS E AGONÍSTICOS DE  
RATOS WISTAR, SELVAGENS (*Rattus norvegicus sp*) E  
LINHAGENS DERIVADAS**

**Tese de Doutorado em Ciências Fisiológicas**

**MSc. Raner Miguel Ferreira Póvoa**

**Orientador:**

**Prof. Dr. Luiz Carlos Schenberg**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro Biomédico da Universidade Federal do Espírito Santo, para obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas.**

**Vitória, 31 de Maio de 2007**

Autor: Póvoa, Raner Miguel Ferreira.

Título: ESTUDO COMPARATIVO DOS  
COMPORTAMENTOS EXPLORATÓRIOS,  
PREDATÓRIOS E AGONÍSTICOS DE RATOS  
WISTAR, SELVAGENS (*Rattus Norvegicus Sp*) E  
LINHAGENS DERIVADAS

Raner Miguel Ferreira Póvoa – Vitória, 2007.  
Tese de Doutorado – Programa de Pós-  
Graduação em Ciências Fisiológicas, Centro das  
Ciências da Saúde, Universidade Federal do  
Espírito Santo.

Orientador: Prof. Dr. Luiz C. Schenberg

1. Comportamento Agressivo, 2. Comportamento  
Defensivo, 3. Comportamento Predatório, 4.  
Genética, 5. Matéria Cinzenta Periaquedutal, 6.  
Rato.

**ESTUDO COMPARATIVO DOS COMPORTAMENTOS  
EXPLORATÓRIOS, PREDATÓRIOS E AGONÍSTICOS DE RATOS  
WISTAR, SELVAGENS (*Rattus norvegicus sp*) E LINHAGENS  
DERIVADAS**

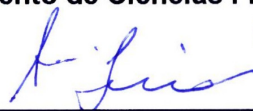
Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para a obtenção do Título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

**Raner Miguel Ferreira Póvoa**

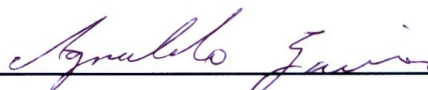
Banca Examinadora:



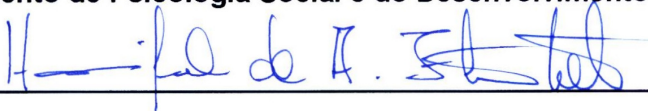
Prof. Dr. Luiz Carlos Schenberg – Orientador  
Departamento de Ciências Fisiológicas - UFES



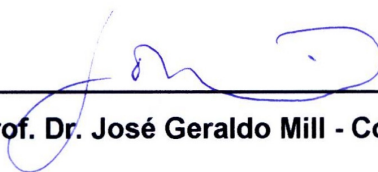
Prof. Dr. Aldo Bolten Lucion  
Departamento de Fisiologia – UFRGS



Prof. Dr. Agnaldo Garcia  
Departamento de Psicologia Social e do Desenvolvimento – UFES



Prof. Dr. Henrique de Azevedo Futuro Neto  
Departamento de Ciências Fisiológicas – UFES



Prof. Dr. José Geraldo Mill - Coordenador do PPGCF

Vitória, 31 de Maio de 2007

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Professor Doutor Luiz Carlos Schenberg pela confiança depositada em mim logo que ingressei no Programa de Pós-Graduação, ainda como Estagiário de Aperfeiçoamento, e que, apesar de meus erros, depositou em mim paciência e confiança. E às centenas de horas de orientação e grande dedicação ao longo da presente tese.

À toda a minha família, os verdadeiros agentes fomentadores da minha pesquisa, por todo o suporte que tornou possível mais esta conquista.

Ao Professor Doutor Henrique de Azevedo Futuro-Neto, que sempre esteve ao meu lado, participando muitas vezes de formas direta e indireta, de todas as minhas conquistas.

Ao amigo de incontáveis horas no Biotério do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Flávio Rogério Valle Gaudio, pela sua boa vontade e prontidão em auxiliar nas aquisições dos diversos grupos de ratos utilizados neste e em outros trabalhos.

Aos Professores Doutores André de Avila Ramos, Aldo Bolten Lucion, Agnaldo Garcia e Rosana Suemi Tokumaru. Suas sugestões foram valiosas.

Ao corpo técnico do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas e do Biotério Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas que tiveram participações decisivas em todas as etapas do trabalho, demonstrando, em todas elas, boa vontade.

Aos meus amigos dos Laboratórios de Neurobiologia, Neurofisiologia e Neuropsicofarmacologia, e demais laboratórios do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

***Como qualquer organismo vivo,  
o ser humano está geneticamente  
programado para aprender.  
No momento em que nasce, lhe é  
oferecido pela natureza todo um  
leque de possibilidades.***

***François Jacob***

## RESUMO

**COMPORTAMENTOS EXPLORATÓRIOS, PREDATÓRIOS E AGONÍSTICOS DE RATOS WISTAR, SELVAGENS (*Rattus norvegicus* sp) E LINHAGENS DERIVADAS.** Póvoa, R.M.F, *Laboratório de Neurobiologia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo.* Os comportamentos de agressão e defesa têm uma função crucial na sobrevivência da espécie, tanto no que diz respeito à defesa dos membros contra predadores quanto em relação à conquista de um território e estabelecimento de hierarquias sociais. Contudo, estes comportamentos foram grandemente atenuados, ou quase abolidos, nas linhagens domesticadas para fins de pesquisa. Portanto, os estudos abaixo foram realizados para examinar as diferenças destes comportamentos entre linhagens selvagens e domesticadas do rato norueguês (*Rattus norvegicus*).

**Estudo I)** O comportamento predatório é aquele no qual o animal captura, mata e ingere a presa. O presente estudo comparou o comportamento de predação de camundongos de ratos selvagens, domesticados ou híbridos. Foram utilizados ratos selvagens (SEL, *Rattus norvegicus* sp), Wistar (WIS), ratos espontaneamente hipertensos (SHR), Wistar-Kyoto (WKY) e híbridos WIS/SEL (HBR) privados de alimentos por um período de 48 horas foram confrontados com os seguintes alvos: 1) um camundongo vivo, 2) um camundongo morto que foi empalhado com as presas expostas na postura de boxear, 3) um camundongo recém-morto por deslocamento cervical e, 4) um camundongo morto, porém, congelado. Os confrontos foram registrados por 5 minutos por meio de duas filmadoras. A frequência das respostas foi obtida pela análise dos vídeos em câmera lenta. A duração da ingestão e a frequência de ataques/mordidas foram examinadas por ANOVA seguida de testes-t de Bonferroni. As correlações entre os comportamentos agressivos foram examinadas por análise de fator. Os resultados sugerem que:

1. Embora privados de alimento por 48 h, a fome contribuiu de forma secundária para o muricídio.
2. As linhagens têm alvos preferenciais e diferiram marcadamente em relação ao mesmo alvo.



3. A linhagem SEL foi a única que atacou e mordeu todos os alvos.
4. A análise de fator da agressão muricida sugere a existência de 2 fenótipos, (a) carnívoro (SEL), que ataca preferencialmente o camundongo vivo e (b) carniceiro (WIS, SHR e WKY), que prefere os camundongos mortos.

**Estudo II)** Este estudo comparou o comportamento exploratório de ratos machos e fêmeas das linhagens WIS, SEL, HBR, SHR e WKY e híbridos provenientes do retrocruzamento dos HBR com os SEL (SHB), na arena e no labirinto-em-cruz elevado . O tempo despendido na exploração dos braços aberto e fechado e o número de entradas nos braços aberto e fechado foram registrados durante um período de 5 minutos. Na arena registrou-se a atividade locomotora total bem como a exploração da periferia (peritaxia) e do centro (centrotaxia) durante 10 min. Os dados foram comparados por ANOVA para 2 vias seguida de testes-t de Bonferroni. Os dados sugerem que:

1. Exceto pela defecação acentuada das fêmeas WIS e SHR, a exploração da arena foi bastante similar para ambos os sexos.
2. Não foram observadas diferenças na peritaxia de machos e fêmeas para nenhuma linhagem estudada.
3. Os ratos WKY apresentaram os menores valores de peritaxia e centrotaxia.
4. A única diferença no labirinto-em-cruz elevado foi a porcentagem menor de entradas no braço aberto das fêmeas SHR.
5. As linhagens WIS e SEL exploraram o labirinto de forma similar, apresentando os níveis mais elevados de ansiedade.
6. Os ratos SHR, WKY e SHB foram os menos ansiosos, enquanto os ratos HBR apresentaram níveis intermediários.
7. O presente estudo justifica o desenvolvimento de linhagens endogâmicas de ratos selvagens para fins de pesquisa da ansiedade.

**Estudo III)** No estudo anterior verificamos que o desempenho na arena e LCE difere tanto em relação às linhagens quanto em relação ao sexo. No presente estudo examinamos o mesmo conjunto de dados quanto às correlações entre os comportamentos da arena e LCE. Os procedimentos e as variáveis foram os mesmos do Estudo II. Contudo, ao invés da comparação da magnitude das

respostas na arena e labirinto, utilizou-se a análise de fator para examinar as correlações entre as variáveis. As principais conclusões foram as seguintes:

1. A CENTROTAXIA correlacionou-se exclusivamente com atividade nos ratos SEL e SHR, e com ansiólise nos ratos HBR.
2. Nas linhagens WIS e SHB, a CENTROTAXIA correlacionou-se tanto com atividade quanto ansiólise.
3. A CENTROTAXIA carregou forte e positivamente com atividade nos machos SHR, mas com sedação nas fêmeas, revelando um claro dimorfismo sexual nesta linhagem.
4. A CENTROTAXIA carregou forte e positivamente com a atividade de machos e fêmeas WIS, mas com sedação nas fêmeas WKY.
5. O comportamento dos ratos machos das linhagens WIS e SHR é controlado, predominantemente, pela ansiedade e das fêmeas pela atividade.
6. A exploração dos braços abertos das fêmeas WIS correlacionou-se positivamente com a peritaxia, mas inversamente com a centrotaxia, sugerindo que as fêmeas mais ativas entram mais vezes (e permanecem por um tempo maior) nos braços abertos do labirinto.
7. A exploração do braço aberto e a peritaxia das fêmeas WIS correlacionaram-se inversamente com ansiedade, sugerindo a influência inibitória da ansiedade na exploração da arena.
8. A defecação foi a resposta mais variável, carregando em atividade nos ratos SHR e HBR, em ansiedade nos WIS, ansiólise nos SEL e em nenhum fator nos WKY e SHB.
9. Na análise por sexo, a defecação só carregou em ansiedade nos machos SHB, mas correlacionou-se forte e positivamente com ansiólise de machos e fêmeas SEL.
10. Estes resultados sugerem que a defecação dos ratos SEL seja mais relacionada à exploração (demarcação territorial) que à 'emocionalidade'.
11. Nos ratos WIS, SEL e SHB de ambos os sexos e fêmeas SHR foi observada uma correlação inversa de peritaxia e entradas nos braços fechados, sugerindo que os ratos mais ativos na arena sejam menos ativos nos braços fechados do labirinto.

12.A ansiedade foi a influência predominante no comportamento dos machos e fêmeas SEL e HBR. Contudo, enquanto a exploração do braço aberto carregou forte e negativamente em ansiedade, o tempo no braço fechado carregou em sedação.

13.A característica mais importante dos ratos SHR foi a segregação completa das variáveis do LCE e arena nos fatores ansiedade e atividade, respectivamente.

**Estudo IV)** O comportamento exploratório é essencial para a sobrevivência pois aumenta a possibilidade do animal de encontrar alimento, água, parceiro sexual e abrigo contra predadores. O presente estudo investigou os comportamentos exploratório e de agressão defensiva no teste do corredor linear, em ratos SEL, HBR e SHB. Adicionalmente, avaliou as alterações nestes comportamentos ao longo de 9 gerações. Os ratos foram privados de alimento por 48 h antes do teste do corredor para facilitar o comportamento exploratório. O corredor tinha cerca de 40 m de comprimento por 1 m de largura e era dividido em seções de 1 m com fitas indicando a metragem. Ao final havia uma barreira com 1 m de altura. No dia do teste, os ratos eram introduzidos na extremidade de um corredor e observados por 10 minutos pelo experimentador imóvel. Em seguida, este aproximava-se do rato na velocidade de 1 m/s, parando toda vez que o rato orientava-se em sua direção, registrando o número de quadrantes entre ele e o rato, bem como os quadrantes percorridos pelo animal durante a fuga. Terminado o teste, o experimentador encurralava o rato no final do corredor e registrava os comportamentos de agressão defensiva. As respostas de exploração, detecção, fuga, perseguição ao experimentador das diversas linhagens foram comparadas por ANOVA seguida de testes-t de Bonferroni. Os efeitos da hibridização ao longo de 9 gerações de ratos HBR foram analisados por ANOVA para medidas repetidas seguida de contrastes lineares para interações entre gerações e linhagem. As principais conclusões foram as seguintes:

1. As linhagens diferiram significativamente quanto às respostas de explorar, fugir e, mais acentuadamente, salto e perseguir, mas não diferiram quanto à resposta de detecção.
2. Os ratos SEL apresentaram um número significativamente maior de saltos de ataque e perseguições que os ratos HBR e SHB.

3. Contudo, a amplitude de fuga dos ratos HBR foi significativamente maior que a dos ratos SEL.
4. As respostas de exploração, detecção, fuga e salto de ataque foram atenuadas ao longo de 10 gerações de ratos HBR.
5. O teste do corredor linear foi capaz de detectar diferenças significativas nos comportamentos agressivo e exploratório tanto em relação às linhagens quanto às gerações.

**Estudo V)** Este estudo utilizou o paradigma residente-intruso para examinar as diferenças nos comportamentos de agressão territorial dos ratos SEL, WIS e HBR. Os ratos das linhagens mencionadas eram alojados individualmente (residentes) numa caixa de madeira com teto e frente de vidro e assoalho coberto com maravalha. Após um período de 5 dias, introduzia-se outro rato (intruso), das linhagens mencionadas, e registrava-se os comportamentos por 2 minutos, por meio de câmeras dentro e fora da caixa.

1. Os comportamentos de aproximar, ameaça lateral, perseguir e salto de ataque foram única ou majoritariamente emitidos pelos ratos SEL residentes.
2. Os comportamentos de submissão, fuga de galope, fuga de trote e ataque supino foram única ou predominantemente exibidos pelos ratos SEL intrusos.
3. Embora mais frequentes nos ratos SEL residentes, os comportamentos de gritar, morder, boxear, chiar e expor presas foram apresentados tanto por residentes quanto intrusos.
4. Os ratos SEL intrusos não apresentaram o comportamento de aproximação.
5. O Fator-I carregou forte e positivamente em ameaça lateral, salto de ataque, fuga de trote e boxear, representando o repertório fundamental do rato SEL residente.
6. O Fator-II carregou positivamente em aproximar e expor presas (ítems ofensivos), mas negativamente em boxear e fuga de trote (ítems defensivos), sugerindo que os últimos sejam os ítems de defesa do residente SEL aos contra-ataques dos intrusos da mesma linhagem.
7. Chiar correlacionou-se tanto com os ítems ofensivos (salto de ataque) quanto defensivos (boxear) do rato SEL residente

8. Morder correlacionou-se com perseguição, mostrando que a perseguição ao rato intruso freqüentemente resulta em danos físicos.
9. Nos ratos SEL intrusos, o Fator-I carregou forte e positivamente nos comportamentos de fuga de trote e morder, sugerindo que as mordidas são o recurso final à perseguição do residente.
10. O Fator-II dos intrusos carregou positivamente em submissão, mas forte e negativamente em ataque supino e fuga de galope, indicando que as tendências submissivas inibem as últimas respostas.
11. O Fator-III mostrou uma correlação inversa das respostas de morder com chiar, boxear e submissão, sugerindo que as últimas desempenham funções 'apaziguadoras'.
12. Os fatores principais dos WIS intrusos correlacionaram-se forte e positivamente com as variáveis de defesa ou agressão defensiva (fuga de trote, boxear e ataque supino).
13. O Fator-II revelou uma correlação inversa de aproximar (ofensa) e submissão (defesa). Como a aproximação não ocorreu no intruso SEL, o rato WIS é menos ansioso ou tem dificuldades em reconhecer o residente hostil, ou ambas as coisas.
14. Por fim, o Fator-III associou fuga de galope à resposta de morder, sugerindo que a mordida é um recurso do rato WIS encurralado pelo residente.
15. Nos HBR intrusos, a fuga de trote correlacionou-se positivamente com gritar e morder (Fator-I) mas, negativamente com boxear e submissão (Fator-II). Portanto, enquanto o Fator-I corresponde à defesa ativa do HBR intruso, o Fator-II representa comportamentos apaziguadores, na qual a fuga (recuo) de trote é substituída por boxear e submissão.
16. Ao contrário dos ratos WIS, a aproximação dos HBR intrusos ao residente correlacionou-se com gritar, indicando o reconhecimento do rato hostil.
17. Curiosamente, enquanto gritar não carregou em nenhum fator dos intrusos SEL e WIS, chiar carregou no Fator-III dos intrusos SEL. Portanto, a resposta de gritar dos HBR pode ser o resultado da hibridização pela modificação da resposta de chiar dos seus ancestrais SEL

**Estudo VI)** A estimulação elétrica da matéria cinzenta periaquedutal dorsal (MCPD) de ratos produz as respostas de defesa de exoftalmia, imobilidade tensa, micção, defecação, trote, galope e saltos. O presente estudo avaliou as diferenças destas respostas em ratos machos WIS, SEL, HBR, SHR e WKY (n=20/grupo). Ratos com eletrodos na MCPD foram estimulados com pulsos senoidais de intensidades crescentes (0-70  $\mu$ A, 60 Hz). As intensidades medianas ( $I_{50}$ ) limiaries e a responsividade máxima ( $R_{50}$ , inclinação da curva de limiar em  $I_{50}$ ) foram estimadas mediante a análise logística de limiaries. As curvas foram comparadas por testes de  $\chi^2$  da razão de verossimilhanças para locação e paralelismo. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes quanto à localização dos eletrodos das várias linhagens. Seguem abaixo os principais resultados:

1. Notavelmente, os ratos WIS apresentam os menores limiaries de defesa à estimulação da MCPD, e os SEL os maiores.
2. A defecação e micção foram apresentadas por menos da metade dos ratos WIS, SEL e HBR, mas foram virtualmente ausentes nos ratos SHR.
3. Em contraste, a defecação foi apresentada por todos os ratos WKY.
4. Houve uma dupla-dissociação dos limiaries e responsividade. Assim, ratos WIS e SHR, que apresentaram os menores limiaries foram os menos responsivos (curvas rasas à esquerda). Em contraste, ratos SEL e WKY, que apresentaram os maiores limiaries, foram os mais responsivos (curvas íngremes à direita).
5. O ratos WKY foram os únicos que combinaram limiaries reduzidos e responsividade elevada para todas as respostas de defesa.
6. Nossos dados sugerem que os limiaries baixos para detecção de predadores (alta reatividade) dos ratos SEL não se deve à MCPD.
7. Em contraste, a resposta imediata dos ratos à detecção do predador (alta responsividade) deve-se às características próprias da MCPD.
8. A linhagem WKY reúne os elementos para um modelo genético da comorbidade de pânico e depressão.

## ÍNDICE

<b>INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>1</b>
Referências.....	12
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>18</b>
<b>ESTUDO I - Comportamento Agressivo de Ratos Wistar, Selvagens e Linhagens Derivadas Contra Camundongos Vivos, Empalhados, Recém-Mortos e Congelados .....</b>	<b>19</b>
Resumo.....	20
Introdução.....	22
Métodos .....	24
Resultados.....	28
Discussão.....	37
Referências.....	43
<b>ESTUDO II – Influência da Linhagem e Sexo no Comportamento Exploratório na Arena e no Labirinto-em-Cruz Elevado em Ratos Selvagens (<i>Rattus norvegicus sp</i>), Wistar e Linhagens Derivadas .....</b>	<b>47</b>
Resumo.....	48
Introdução.....	50
Métodos .....	55
Resultados.....	59
Discussão.....	68
Referências.....	74
<b>ESTUDO III – Análise de Fator do Comportamento Exploratório na Arena e no Labirinto-em-Cruz Elevado em Ratos Selvagens (<i>Rattus norvegicus sp</i>), Wistar e Linhagens Derivadas .....</b>	<b>81</b>
Resumo.....	82
Introdução.....	85
Métodos .....	90
Resultados.....	91
Discussão.....	106
Referências.....	114
<b>ESTUDO IV – Análise do Comportamento de Defesa Interespecífico e Exploratório de Ratos Selvagens e Híbridos no Corredor Linear .....</b>	<b>117</b>
Resumo.....	118
Introdução.....	120
Métodos .....	123
Resultados.....	125
Discussão.....	129
Referências.....	134

<b>ESTUDO V – Comportamentos Agressivos de Ratos Selvagens, Wistar e Híbridos no Teste Residente-Intruso .....</b>	<b>138</b>
Resumo.....	139
Introdução.....	141
Métodos .....	148
Resultados.....	151
Discussão.....	160
Referências.....	166
<b>ESTUDO VI – Comportamentos Defensivos Induzidos por Estimulação da Matéria Cinzenta Periaquedutal de Ratos Wistar, Selvagens, Híbridos, Hipertensos (SHR) e Wistar-Kyoto .....</b>	<b>170</b>
Resumo.....	171
Introdução.....	172
Material e métodos .....	175
Resultados.....	183
Discussão.....	192
Referências.....	197



## ÍNDICE DE FIGURAS

### ESTUDO I

Figura 1	Comportamentos agressivos dos ratos selvagem, Wistar, híbridos SELxWIS, hipertensos e Wistar-Kyoto contra camundongos vivos e mortos .....	29
Figura 2	Duração do comportamento de ingestão dos camundongos abatidos durante o confronto .....	30
Figura 3	Fatores principais dos comportamentos agressivos dirigidos a camundongos vivos, empalhados, recém-mortos ou congelados para a população total de ratos .....	31

### ESTUDO II

Figura 1	Efeito do sexo sobre o comportamento de exploração da arena das diversas linhagens .....	62
Figura 2	Efeito da linhagem sobre o comportamento de exploração da arena .....	63
Figura 3	Efeito do sexo sobre o comportamento de exploração do labirinto-em-cruz elevado das diversas linhagens .....	64
Figura 4	Efeito do sexo das linhagens sobre o comportamento de exploração do labirinto-em-cruz elevado .....	65
Figura 5	Efeito da linhagens sobre o comportamento de exploração do labirinto-em-cruz elevado .....	66
Figura 6	Efeito das linhagens sobre o comportamento de exploração do labirinto-em-cruz elevado .....	67

### ESTUDO III

Figura 1	Fatores principais (ansiedade e atividade) da exploração da arena e do labirinto-em-cruz elevado para a população total de ratos e subpopulações derivadas dos ratos Wistar e selvagem.	93
Figura 2	Fatores principais (ansiedade e atividade) da exploração da arena e do labirinto-em-cruz elevado para ratos das linhagens WIS, SHR, WKY, SEL, HBR e SHB .....	96
Figura 3	Fatores principais (ansiedade e atividade) da exploração da arena e do labirinto-em-cruz elevado para ratos machos e fêmeas das populações W e S .....	98
Figura 4	Principais diferenças entre ratos machos e fêmeas na exploração da arena e do labirinto-em-cruz elevado .....	102

### ESTUDO IV

Figura 1	Efeitos da hibridização dos ratos selvagens sobre os comportamentos de defesa no corredor linear .....	127
Figura 3	Efeitos da endogamia sobre os comportamentos de exploração e defesa dos ratos híbridos .....	128

### ESTUDO V

Figura 1	Freqüências médias das respostas agressivas de ratos WIS, SEL e HBR, residentes ou intrusos, confrontados a oponentes de várias linhagens .....	153
Figura 2	Fatores dos comportamentos agressivos do teste residente-intruso da população total de ratos selvagens .....	1546

**ESTUDO VI**

Figura 1	Fatores dos comportamentos agressivos do teste residente-intruso da população total de ratos selvagens .....	185
Figura 2	Curvas de limiar das respostas de defesa induzidas por estimulação elétrica do teto do mesencéfalo de ratos Wistar, selvagens e linhagens derivadas .....	186
Figura 3	Intensidades medianas e respectivos intervalos de confiança das respostas de defesa induzidas por estimulação do teto do mesencéfalo de ratos Wistar, selvagens e linhagens derivadas	188
Figura 4	Responsividade máxima e respectivos intervalos de confiança das respostas de defesa induzidas por estimulação do teto do mesencéfalo de ratos Wistar, selvagens e linhagens derivadas	189
Figura 5	Etográfico das respostas de defesa produzidas por estimulação elétrica com intensidades crescentes da MCPD ...	191

## ÍNDICE DE TABELAS

### ESTUDO I

- Tabela 1 Fatores principais do comportamento da agressão muricida da população total de ratos. 34
- Tabela 2 Fatores principais do comportamento de agressão predatória dos ratos das linhagens selvagem, Wistar, híbrida, hipertensa e Wistar-Kyoto. 36

### ESTUDO III

- Tabela 1 Fatores principais da exploração do Labirinto-Em-Cruz Elevado e da Arena da população total de ratos e das subpopulações de derivação Wistar selvagem. 91
- Tabela 2 Fatores dos comportamentos do Labirinto-Em-Cruz Elevado e da Arena das linhagens Wistar, Wistar Kyoto e ratos espontaneamente hipertensos 94
- Tabela 3 Fatores dos comportamentos do Labirinto-Em-Cruz Elevado e da Arena das linhagem SEL, HBR e SHB 95
- Tabela 4 Influência do sexo nos comportamentos do Labirinto-Em-Cruz Elevado e da Arena da população total de ratos e subpopulações W e S 100
- Tabela 5 Influência do sexo nos comportamentos do Labirinto-Em-Cruz Elevado e da Arena dos ratos WIS, SHR e WKY 103
- Tabela 6 Influência do sexo nos comportamentos do Labirinto-Em-Cruz Elevado e da Arena dos ratos SEL, HBR e SHB 105

### ESTUDO IV

- Tabela 1 Etograma 125
- Tabela 2 Comportamento de defesa dos ratos híbridos das linhagens Wistar e selvagem (HBR) ao longo de 9 gerações de endogamia agrupadas em épocas de 3 gerações. 128

### ESTUDO V

- Tabela 1 Etograma dos comportamentos no teste de agressão residente-intruso. 149
- Tabela 2 Freqüências absolutas e porcentagens dos comportamentos de agressão territorial dos ratos SEL no teste residente-intruso. 154
- Tabela 3 Fatores principais do comportamento de agressão territorial da população total de ratos SEL (residentes e intrusos,  $n=30$ ) confrontados a várias linhagens. 155
- Tabela 4 Comparação dos fatores principais do comportamento de agressão territorial dos ratos SEL residentes. 157
- Tabela 5 Comparação dos fatores principais dos ratos intrusos SEL, WIS e HBR 159

### ESTUDO VI

- Tabela 1 Etograma do rato na ausência ou presença da estimulação elétrica da matéria cinzenta periaqueductal dorsal. 180
- Tabela 2 Localização dos eletrodos das linhagens individuais nas estruturas do teto do mesencéfalo. 185

## ABREVIATURAS

ATQ - Ataque  
CV – Camundongo vivo  
CE – Camundongo empalhado  
RM – Camundongo recém-morto  
CC – Camundongo morto e congelado  
CX – Centrotaxia na arena  
DEF (ou D ou DF) – Defecação  
EBA (ou EA) – Entradas nos braços abertos do LCE  
EBF (ou EF) - Entradas nos braços fechados do LCE  
EXO (ou E) – Exoftalmia  
F-1 – Fator 1  
F-2 – Fator 2  
F-3 – Fator 3  
GLP (ou G) – Galope  
HBR - Ratos Híbridos das linhagens Wistar e selvagem (*Rattus norvegicus* sp)  
IMO (ou I) – Imobilidade  
ING – Ingere camundongo  
MCPA – Matéria cinzenta periaquedutal  
MCPAdm – Matéria cinzenta periaquedutal dorsomedial  
MCPAdl – Matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral  
MCPAlat – Matéria cinzenta periaquedutal lateral  
MCPAvl – Matéria cinzenta periaquedutal ventrolateral  
MIC (ou M) – Micção  
MOR – Morde camundongo  
PX – Peritaxia na arena  
S - Todos os ratos derivados na linhagem Selvagem  
SEL – Ratos selvagens  
SHB – Ratos derivados do retrocruzamento dos híbridos com selvagens.  
SHR - Ratos espontaneamente hipertensos.  
SLT (ou S) – Salto  
TBA (ou TA) - Tempos nos braços abertos do LCE  
TBF (ou TF) - Tempos nos braços fechados do LCE  
TRT (ou T) – Trote  
W – Todos os ratos derivados na linhagem Wistar  
WIS – Ratos Wistar  
WKY - Ratos Wistar-Kyoto

## I. INTRODUÇÃO GERAL

Charles Darwin (1859) ressaltou que a 'luta pela sobrevivência' é a causa principal da seleção das espécies, tanto plantas quanto animais. A luta pela sobrevivência implica em relações de interdependência entre as espécies e, acima de tudo, na *sua aptidão e bom êxito em deixar descendentes* (Darwin, 1859). O sucesso de uma espécie dependerá das vantagens advindas de mutações que se transmitam ao longo de gerações. Estas vantagens podem advir do aprimoramento de sistemas fisiológicos homeostáticos ou de comportamentos fundamentais à sobrevivência, tais como os comportamentos alimentar, reprodutor, agressivo ou defensivo (Schenberg *et al.*, 2005). Assim, a seleção age tanto nos aspectos morfológicos quanto fisiológicos e comportamentais.

Embora a etologia tenha suas raízes no estudo admirável de Charles Darwin '*A Expressão das Emoções no Homem e nos Animais*' (1872), ela desenvolveu-se ao longo do século XX como a ciência da evolução e organização do comportamento animal (Darwin, 1873). Como tal, a Etologia interessa-se primariamente pela finalidade do comportamento em termos de valor adaptativo. Contudo, a finalidade adaptativa do comportamento depende da estrutura espaço-temporal dos atos envolvidos e dos estímulos naturais que os eliciam (Schenberg *et al.*, 2005). Além disso, a etologia também se interessa pelos aspectos fisiológicos, motivacionais e de desenvolvimento do comportamento, bem como das condições nas quais os comportamentos têm maior probabilidade de ocorrência (Schenberg *et al.*, 2005).

Konrad Lorenz, um dos pais da etologia, foi um dos primeiros autores a sugerir que o comportamento é controlado por '*mecanismos liberadores inatos*' (MLI) do (Lorenz, 1981). Segundo Lorenz, existe '*um aparato fisiológico responsável pela recepção e reconhecimento dos estímulos sensoriais mais importantes, e outro aparato comportamental responsável pelos padrões motores*' (1995). Estes mecanismos obedeceriam a um programa genético que seria expresso no ato do nascimento ou em momentos futuros sob circunstâncias específicas da vida do animal, tal como ocorre, por exemplo, no amadurecimento sexual sob influências hormonais e ambientais (Lorenz, 1981).

Tinbergen, em sua obra clássica '*Um Estudo do Instinto*' (1951), define instinto como um '*mecanismo nervoso hierarquicamente organizado que é suscetível de algum tipo de inicialização, liberando e direcionando impulsos de origem tanto interna quanto externa*'. Embora não explicitamente, a definição de instinto como um mecanismo nervoso 'hierárquico' já implicava na noção de programa, ou seja, de uma seqüência de comandos geneticamente herdados que poderiam ser executados de forma praticamente automática sob a ação de estímulos desencadeadores específicos. Adicionalmente, Tinbergen (1951) enfatizou a necessidade da investigação das causas imediatas do comportamento, colocando como tarefa dos etólogos '*a condução da análise desde os níveis superiores até aqueles dos neurofisiologistas*' (Tinbergen, 1951). Com este objetivo propôs a combinação da etologia e da neurofisiologia como um campo da biologia, a etofisiologia, a qual viria a ser chamada de 'neuroetologia' (Ewert, 1980).

Diferenças acentuadas nos comportamentos de espécies e linhagens diferentes mostram que a constituição genética observada na estrutura corporal dos indivíduos é importante (Skinner, 1981). A seleção natural só pode agir sobre diferenças genéticas dos comportamentos. Dentre as diferenças herdadas, algumas podem conferir maior sucesso reprodutivo (Jacobson, 1991).

A compreensão dos mecanismos genéticos e neurobiológicos envolvidos no comportamento de homens e animais tem sido um dos principais objetivos de diversas áreas do conhecimento (Watanabe *et al.*, 1999; Barnett e Stoddart, 1969; Drori e Folman, 1986; Festing, 1979a,b; Rezvani *et al.*, 2002). Contudo, foi somente à partir das últimas décadas, com a revolução operada pela biologia molecular, que foram fornecidas as ferramentas necessárias ao estudo das bases genéticas do comportamento (Watanabe *et al.*, 1999; Levan *et al.*, 1981 e Grutzner *et al.*, 1999).

Alguns métodos são fundamentais no estudo do modo pelo qual os genes influenciam o comportamento, quais sejam: 1) investigação das características comportamentais de indivíduos portadores de mutações específicas; 2) linhagens endogâmicas distintas são comparadas quanto às características comportamentais; 3) utilização da seleção artificial em populações com reprodução aleatória para demonstrar a variabilidade genética para características quantitativas (*quantitative trait loci*); 4) utilização de camundongos nos quais alguns genes foram inativados temporária ou permanentemente (*knock-out*). Estes enfoques mostram que há uma variabilidade genética para características comportamentais quantitativas (Vogel e Motulsky, 2000). Desta forma, pode-se produzir linhagens

selecionadas escolhendo pais que apresentam valores extremos de algum caráter comportamental (Vogel e Motulsky, 2000). Por exemplo, padrões fenotípicos desviantes em camundongos foram estudados para elucidar mecanismos do desenvolvimento embrionário normal no sistema nervoso central. Um exemplo é a mutação '*reeler*', que causa graves dificuldades de manutenção do equilíbrio (Vogel e Motulsky, 2000). O cérebro destes camundongos desenvolve-se normalmente, exceto para o neocórtex e hipocampo, que apresentam uma desorganização do alinhamento celular e das conexões sinápticas intracorticais (Vogel e Motulsky, 2000).

A observação de que diferentes linhagens de animais possam responder de forma diferente aos desafios ambientais sugere que os fatores genéticos sejam parcialmente responsáveis pela variação individual das respostas ao estresse (Tesser, 1993). Foi proposto, ainda, que linhagens diferentes possam ser uma ferramenta útil no estudo de mecanismos biológicos envolvidos nas desordens relacionadas ao estresse (Rex, *et al.*, 1996; Trullas and Skolnick, 1993). Por exemplo, num estudo comparativo, demonstrou-se que as respostas ao medo dos ratos Fischer são mais pronunciadas que aquelas dos ratos Wistar em todos os testes utilizados (Rex, *et al.*, 1996). Em adição, este estudo investigou a relação entre variações comportamentais e bioquímicas, tais como a liberação de serotonina no hipocampo ventral, durante o teste no labirinto-em-cruz elevado. A exposição ao LCE aumentou a concentração hipocampal de 5-HT nos ratos Fischer (mais ansiosos), mas não nos ratos Wistar (menos ansiosos). Estes e outros resultados corroboram a influência de fatores genéticos na emocionalidade dos ratos e demonstram



uma estreita relação entre o sistema serotoninérgico e o comportamento de ansiedade (Rex *et al.*, 1999).

Resultados similares também foram obtidos com estressores endógenos. Assim, enquanto as ratas Lewis apresentaram após artrite uma única injeção de estreptococos-A, as fêmeas da linhagem F344 foram resistentes ao estímulo (Wilder *et al.*, 1991). Adicionalmente, as fêmeas Lewis apresentaram respostas de corticosterona mais baixas do que as fêmeas F344 em resposta a outros tipos de estressores (Glowa *et al.*, 1992). Por fim, os ratos Lewis apresentam níveis mais baixos de 5-HT e menor densidade de receptores 5-HT<sub>1A</sub> no hipocampo do que os ratos F344, o que pode estar associado com a relativa hiporresponsividade do eixo HPA (Glowa *et al.*, 1992).

Também foram observadas diferenças tanto interespecíficas quanto intraespecíficas nos comportamentos de defesa de linhagens distintas de ratos (Takahashi e Blanchard, 1982). A seleção natural preserva a habilidade de se defender e até mesmo de um certo aprendizado que aprimore esta habilidade durante o desenvolvimento (Wade, 2006). Estas informações são transmitidas para a prole que habitará o mesmo nicho ecológico dos seus pais e seus predadores. Desta forma, genes e ambiente desempenham papéis importantes na expressão intraespecífica do medo (Oliverio e Castellano, 1988). Nos animais, o medo e a ansiedade têm sido considerados em termos de categorias comportamentais como a condicionamento de esquiva, imobilidade e/ou fuga (Schenberg *et al.*, 2005).

Atualmente, estudos comparativos entre diferentes linhagens de ratos são desenvolvidos com o intuito de verificar as bases genéticas dos comportamentos emocionais (Armário *et al.*, 1995). Grande parte das vezes,

tais estudos utilizam programas de seleção de linhagens nos quais os acasalamentos ocorrem entre irmãos ao longo de várias gerações (*inbreeding*), gerando linhagens isogênicas (Festing, 1979a,b; Festing, 1989; Overstreet e Rezvani, 1996 e Overstreet *et al.*, 1999). Escorihuela e colaboradores (1999) demonstraram que as linhagens de ratos romanos de alta (*high-avoidance*) e baixa (*low-avoidance*) reatividades apresentavam diferenças comportamentais significativas em vários testes, principalmente no LCE. Além da atividade mais intensa no LCE e da frequência mais elevada de autolimpeza, os ratos romanos do primeiro grupo apresentaram um número maior de entradas e do tempo de exploração dos braços abertos. Tais resultados sugerem níveis menores de ansiedade nos ratos romanos de alta reatividade.

A variante albina do *Rattus norvegicus* é amplamente utilizada em modelos experimentais de doenças poligênicas humanas, tais como hipertensão e diabetes melito (Buang, 1994; Rapp, 2000 e Kuijpers e de Jong, 1986). A complexidade destas doenças advém tanto da heterogeneidade genética quanto da influência dos fatores ambientais (Brown e Grunberg, 1998). Uma forma de contornar os fatores ambientais é a utilização de cruzamentos dirigidos (Flaherty e Bolivar, 2007). Desta maneira, a seleção artificial de linhagens tornou-se uma ferramenta bastante útil nas últimas décadas (Courvoisier *et al.*, 96; Kulikov, 1997; Mathis *et al.*, 1995; Ramos *et al.*, 1997). Todavia, o cruzamento endogâmico ao longo de várias gerações, sob condições ambientais otimizadas, pode causar a seleção indesejável de determinados genótipos, resultando em modificações substanciais do comportamento (Peeler e Nowakowsky, 1987).

Faraday *et al.* (2002), por exemplo, demonstrou que os ratos machos e fêmeas da linhagem Long-Evans eram mais ativos na arena (*open-field*) que os ratos Sprague-Dawley. Estes autores também mostraram que os primeiros consumiam quantidades maiores de alimento no dia em que eram submetidos a um estímulo estressante (ruído).

A domesticação dos ratos criados em biotério é outro ponto de grande importância nos estudos que comparam diferentes linhagens ou diferenças comportamentais de uma mesma linhagem (Sgoifo *et al.*, 2001; Boice, 1972, 1977; Castle, 1947 e Galef, 1971). A domesticação de animais tem sido praticada há milênios, nas mais diversas espécies de animais (Trut, 1999, Hammer *et al.*, 1992).

De acordo com Immelmann (1983), existem dois tipos de modificações nos animais domesticados: 1) apresentam grande variabilidade intraespecífica na estrutura, fisiologia e características comportamentais, 2) apresentam modificações no sistema nervoso central, por exemplo, redução do peso do cérebro e pouca diferenciação das estruturas filogeneticamente mais recentes. Dentre as modificações comportamentais, destaca-se a acentuada redução dos comportamentos agressivos e defensivos, bem como dos comportamentos direcionados aos cuidados da prole (Nowak, 1991). A aprendizagem também parece sofrer prejuízos. Em determinadas espécies pode ocorrer o desaparecimento, ou 'atrofia', de outros comportamentos, tal como o canto estridente em algumas raças de canários (Carlson, 2002; Bentley e Hoy, 1974). Adicionalmente, observa-se com freqüência a acentuação do comportamento sexual (McClintock e Adler, 1981). De fato, animais domésticos

apresentam um número maior de cópulas e perda parcial da sazonalidade e do comportamento de corte (Cooke *et al.*, 1998; Schultz e Lore, 1993).

Uma das principais causas destas modificações é a direção e intensidade das forças seletivas que afetam os organismos (Cools *et al.*, 1990). A troca da seleção natural pela artificial acentua a pressão seletiva dado o número relativamente pequeno de animais na população doméstica (Krinke, 2000). Por exemplo, os animais menos agressivos são selecionados em vista do manuseio e menor periculosidade. O mesmo pode ser dito para o comportamento sexual, selecionando-se os animais que demonstram maior fertilidade (Krinke, 2000 e Namuenko *et al.*, 1989).

Modificações importantes também foram relatadas com relação ao cérebro dos animais domesticados. Assim, demonstrou-se que os cérebros dos ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) são 8,3% menores que aqueles dos ratos selvagens (*Rattus norvegicus sp*) de peso similar (Kolb, 1990). Também foi constatada a redução do volume do bulbo (1,6%), cerebelo (10,3%), estriado (10,9%) telencéfalo (10,6%), formação hipocampal (10,2%) e, particularmente, neocórtex (12,5%) (Kruska, 1975a,b).

Assim, tornou-se necessário a realização de experimentos com linhagens que forneçam informações ausentes ou perdidas no repertório das espécies domesticadas. A utilização de ratos selvagens pode possibilitar a superação deste problema, principalmente em relação aos comportamentos inatos de defesa e agressão.

O sistema neuroendócrino também varia consideravelmente nas diferentes linhagens de ratos, sejam elas selvagens ou domesticadas (Pfaff *et al.*, 2002). Por exemplo, estudos clássicos de Richter (1959) em ratos

selvagens e de laboratório mostraram que os hormônios das adrenais têm influências específicas sobre determinados comportamentos. De acordo com este autor, a domesticação do rato para propósitos científicos iniciou-se em 1859, contabilizando cerca de trezentas gerações até meados do século passado. Dentre as várias pressões seletivas que possam ter operado neste processo (dieta, confinamento, etc.), a seleção pela redução da emocionalidade foi, sem dúvida, a principal. Comparado ao rato selvagem, o animal de laboratório tem menos medo do homem e de sua própria espécie, sendo menos agressivo em ambos os tipos de confronto (Gray, 1991).

Segundo Gray (1991), as observações de Richter são corroboradas pelo decréscimo das glândulas adrenais nos ratos de laboratório, a quais apresentam a metade do peso das glândulas dos ratos selvagens. A menor eficiência das adrenais dos ratos de laboratório pode ser demonstrada de inúmeras maneiras. Como as adrenais são de importância vital para a conservação do sal do organismo, uma dieta com baixo teor de sal produz danos à saúde mais acentuados nos ratos de laboratório que nos ratos selvagens (Gray, 1991). A maior dependência dos ratos selvagens com relação às adrenais também é demonstrada pela morte destes animais imediatamente após a retirada das adrenais, o que não ocorre nos ratos de laboratório (Gray, 1991).

O funcionamento endócrino em humanos é uma das influências mais poderosas sobre o cérebro. A análise do sistema neuroendócrino é, portanto, muito importante na medida em que, tanto neurotransmissores quanto hormônios, podem promover o comportamento agressivo. Por exemplo, a exposição de camundongos a uma dose única de testosterona, no quarto dia

de vida, induziu o comportamento agressivo nas fêmeas da linhagem BALB/cBy, mas não na C57BL/6By. Outro fator é a interação do gene com estímulos ambientais. Assim, o isolamento de camundongos por cerca de 14 dias tem um efeito acentuado sobre o comportamento agressivo inter-machos de animais com predisposição genética (Hoffmann *et al.*, 1993).

A linhagem Wistar (Donaldson, 1924), descendente albina do rato da Noruega, passou por este processo de seleção, resultando numa linhagem 'domesticada' de agressividade reduzida, mas alta fertilidade em cativeiro. Em particular, os comportamentos de defesa do rato selvagem foram fortemente atenuados, ou mesmo abolidos, nos ratos Wistar. Estudos recentes de nosso laboratório corroboraram a ausência quase completa das respostas defensivas nestes ratos, mesmo quando confrontados a um cão agressivo. Em contraste, ratos descendentes de espécies selvagens, porém nascidos e criados em biotério, fugiram à mera detecção do cão, apresentando galopes vigorosos intercalados com saltos em direção ao predador e gritos estridentes (ataques defensivos). Notavelmente, descendentes híbridos das linhagens selvagem e Wistar, nascidos em biotério, também apresentaram estas respostas, mesmo quando amamentados por ratas albinas. Adicionalmente, no teste de aproximação do experimentador num corredor linear de 40 m, as distâncias necessárias para a deflagração das reações de congelamento e fuga dos ratos selvagens foram dez vezes maiores que as distâncias observadas para os ratos Wistar, qual seja, os ratos selvagens têm maior reatividade (limiares mais baixos) ao predador (Póvoa, 2003).

Os estudos sobre a interação de diferentes linhagens genéticas com o ambiente podem ser decisivos para a construção de um modelo que nos

auxilie na compreensão de várias psicopatologias (Bellack e Hersen, 1993; Rezvani *et al.*, 2002; Tachibana *et al.*, 2003).

O presente estudo comparou diferentes linhagens de ratos quanto aos comportamentos exploratórios na arena, no corredor linear e no labirinto em cruz-elevado, e comportamentos agonísticos de agressão muricida, defesa territorial e agressão interespecífica. Por fim, as linhagens também foram comparadas quanto às respostas defensivas induzidas pela estimulação elétrica das estruturas do teto do mesencéfalo, em particular, da matéria cinzenta periaquedutal.

## Referências

- Armário A, Gavaldá A e Marti J (1995). Comparison of the behavioural and neuroendocrine response to forced swimming stress in five inbred strains of rats. *Psychoneuroendocrinology*, 20: 879-90.
- Barnett SA e Stoddart RC (1969). Effects of breeding in captivity on conflict among wild rats. *J. Mammal*, 50: 321-325.
- Bellack AS e Hersen M (1993). *Psychopathology in adulthood*, Needham Heights: Allyn and Bacon.
- Bentley D e Hoy RR (1974). The neurobiology of cricket song. *Scientific American*, 231: 34-44.
- Bittencourt, A.S.; Carobrez, A.P.; Zamprogno, L.P.; Tufik, S.; Schenberg, L.C. (2004). Organization of single components of defensive behaviors within distinct columns of periaqueductal gray matter of the rat: role of N-methyl-D-aspartic acid glutamate receptors. *Neuroscience* 125:71-89.
- Boice R (1972). Some behavioral tests of domestication in Norway rats. *Behavior*, 42: 198-231.
- Boice R (1977). Burrows of wild and albino rats: effects of domestication, outdoor raising, age, experience, and maternal state. *J Comp Physiol Psychol.*, 91: 649-61.
- Brown KJ e Grunberg NE (1998). Effects of environment conditions on food consumption in female and male rats. *Physiology and Behavior*, 60: 293-7.
- Cannon WB (1898). The movements of the stomach studied by means of roentigen rays. *American Journal of Medical Sciences*, 1: 359-82.
- Cannon WB (1935). Stresses and strains of homeostasis. *American Journal of Medical Sciences*, 189: 1-14.
- Castle, W. E. 1947. The domestication of the rat. *Genetics*. 33: 109-117
- Castellano C, Oliverio A, Schwab C, Brueckner G, Biesold D. (1988). Age-dependent differences in cholinergic drug response in two strains of mice. *Neurosci Lett.*, 84 :335-8.



- Cooke B, Hegstrom CD, Villeneuve LS e Breedlove SM (1998). Sexual differentiation of the vertebrate brain: principles and mechanisms. *Frontieres of Neuroendocrinology*, 19: 323-62.
- Cools AR, Brachten R, Heeren D, Willemen A e Ellenbrock B (1990). Search after neurobiological profile of individual-specific features of Wistar rats. *Brain Research Bulletin*, 24: 49-69.
- Courvoisier H, Moisan MP, Sarrieau A, Hendley ED e Mormède P (1996). Behavioral and neuroendocrine reactivity to stress in the WKHA/Wistar inbred rat strains, a multifactorial and genetic analysis. *Brain Res.*, 743: 77-85.
- Darwin, C. (1873). *The expression of the Emotions in the Man and Animals*. London: John Murray.
- Donaldson HH (1924). *The rat*. 2nd edition. Wistar Institute, Philadelphia.
- Drori D e Folman Y (1986). Interactive environmental and genetic effects on longevity in the male rat: litter size, exercise, electric shocks and castration. *Exp Aging Res.*, 12:59-64.
- Escorihuela RM, Fernandez-Teruel A, Gil L, Aguilar R, Tobeña A e Driscoll P (1999). Inbred Roman High-and Low-Avoidance Rats: differences in anxiety, novelty-seeking and shuttlebox behaviors. *Physiology and Behavior*, 67: 19-26.
- Ewert, (1980). *Neuroethology. An Introduction to the Neurophysiological Fundamentals of Behavior*. Berlin: Springer Verlag.
- Faraday MM, Blakeman KH, Grunberg NE. (2005). Strain and sex alter effects of stress and nicotine on feeding, body weight, and HPA axis hormones. *Pharmacol Biochem Behav.*, 80: 577-89.
- Festing MFW (1979). *Inbred strains in biomedical research*. Oxford University Press. New York. a
- Festing MFW (1979). Inbred strains. In: Baker, H. J., Lindsey, J. R., and Weisbroth S. H. (eds). *The Laboratory Rat: Vol I. Biology and Diseases*. Academic Press, New York, pp. 55-72.
- Festing MFW (1989). Inbred strains of mice. In: Luon, M. F. and Searle, A. G. (eds). *Genetic variants and strains of the laboratory mouse*. 2nd Edition. Oxford University Press, New York, pp. 636-648.

- Flaherty L e Bolivar V (2007). Animal resources in behavioral neurogenetics. In: Jones B e Mormède P (eds). Neurobehavioral genetics. New York: Taylor and Francis. Pp 129-47.
- Flannelly KJ, Blanchard RJ, Muraoka MY, Flannelly L. (1982). Copulation increases offensive attack in male rats. *Physiol Behav.*, 29: 381-5.
- Frankenhauser M, Dunne E e Lundberg U (1976). Sex differences in sympathetic-adrenal medullary reactions induced by different stressors. *Psychopharmacology*, 47: 1-5.
- Galef, B. G. Jr. and M. M. Clark. 1971. Social factors in the poison avoidance and feeding behavior of wild and domesticated rat pups. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*. 78: 213-219.
- Glowa JR, Sternberg EM, Gold PW. (1992). Differential behavioral response in LEW/N and F344/N rats: effects of corticotropin releasing hormone. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.*, 16:549-60.
- Grutzner F, Himmelbauer H, Paulsen M, Ropers HH, Haaf T (1999). Comparative mapping of mouse and rat chromosomes by fluorescence in situ hybridization. *Genomics*, 55: 306-13.
- Hammer RP Jr., Hori KM, Blanchard RJ, Blanchard DJ (1992). Domestication alters 5-HT<sub>1A</sub> receptor binding in rat brain. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 42: 25-28.
- HOFFMANN, H.J., SCHNEIDER, R., CRUSIO, W.E. Genetic analysis of AB mice. *Behavior Genetic*, 23 : 391-394, 1993.
- Immelmann K (1983). Introduction to ethology. New York : Plenum.
- Jacobson M (1991). Developmental neurobiology. New York: Plenum.
- Kolb B (1990). The cerebral cortex of the rat. Cambridge : MIT Press.
- Krinke GJ (2000). The laboratory rat. Tracie Bunton & Gillian Bullock: Academic Press.
- Kulikov A, Aguerre S, Berton O, Ramos A, Mormède P e Chaouloff F (1997). Central serotonergic systems in the spontaneously hypertensive and LEW rats strains differ in the elevated plus-maze test of anxiety. *J. Pharmacol. Exper. Therap.*, 281: 775-784.
- Kruska D (1975). Comparative quantitative study on brains of wild and laboratory rats. I. Comparison of volume of total brain and classical brain parts. *J Hirnforsch*, 16: 469-83. a

- Kruska D (1975). Comparative quantitative study on brains of wild and laboratory rats. II. Comparison of size of allocortical brain centers. *J Hirnforsch*, 16: 485-96. b
- Levan G, Szpirer J, Szpirer C, Klinga K, Hanson C, Islam MQ (1991). The gene map of the Norway rat (*Rattus norvegicus*) and comparative mapping with mouse and man. *Genomics*, 10: 699-718
- Lorenz, K. (1981). *The Foundations of Ethology*. Edição brasileira, 1995. São Paulo : Editora Universidade Estadual Paulista.
- Mathis C, Neumann PE, Gerschenfeld SM e Crawley JN (1995). Genetic analysis of anxiety-related behaviors and response to benzodiazepine-related drugs in AXB and BXA recombinant inbred mouse strains. *Behav. Genet.*, 25: 557-568.
- McClintock MK e Adler NT (1981). The role of the female during copulation in wild and domestic Norway rats (*Rattus norvegicus*). *Behaviour*, 67: 67-96.
- Namuenko EV, Popova NK, Nikulina EM, Dygalo NN, Shishkina GT, Boradin PM, Markel AL (1989). Behavior, adrenocortical activity, and brain monoamines in Norway rats selected for reduced aggressiveness towards man. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 33: 85-91.
- Nowak (1991). Rodentia, Muridae, Genus *Rattus*. Rats. In: *Walker's Mammals of the World*. Vol. II. John Hopkins University Press: Baltimore & London.
- Overstreet DH, Rezvani AH (1996). Behavioral differences between two inbred strains of Fawn-Hooded rat: a model of serotonin dysfunction. *Psychopharmacology*, 128:328-30
- Overstreet DH, Rezvani AH, Parsian A (1999). Behavioural features of alcohol-preferring rats: focus on inbred strains. *Alcohol Alcohol.*, 34:378-385
- Peeler DF e Nowakowsky RS (1987). Genetic factors and the measurement of exploratory activity. *Behav. Neur. Biol.*, 48: 90-103.
- Pfaff DW, Arnold AP, Etgen AM, Fahrbach SE e Rubin RT (2002). *Hormones, brain, and behavior*. Amsterdam: Academic.
- Póvoa RMF (2003). Influências do sexo e linhagem nos limiares da reação de defesa induzida pela estimulação elétrica da matéria cinzenta

- periaquedutal de ratos. Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas, UFES.
- Rapp JP (2000). Genetic analysis of inherited hypertension in the rat. *Physiological Review*, 80: 135-72.
- Ramos A, Berton O, Mormède P e Chaouloff F (1997). A multiple-test study of anxiety-related behaviours in six inbred rat strains. *Behav. Brain Res.*, 85: 57-69.
- Redgrave P e Dean P (1991). Does the PAG learn about emergencies from the superior colliculus? In: Depaulis A e Bandler R, (Eds). *The Midbrain Periaqueductal Gray Matter: Functional, Anatomical and Neurochemical Organization*. New York: Plenum.
- Rex A, Sondern U, Voigt JP, Franck S, Fink H. (1996). Strain differences in fear-motivated behavior of rats. *Pharmacol Biochem Behav.*, 54: 107-11.
- Rezvani AH, Parsian A, Overstreet DH (2002). The Fawn-Hooded (FH/Wjd) rat: a genetic animal model of comorbid depression and alcoholism. *Psychiatr Genet.*, 12:1-16
- Robinson R (1965). *Genetics of the Norway Rat*. Pergamon Press, Oxford.
- Sgoifo A, Koolhaas J, Alleva E, Musso E e Parmigiani S (2001). Social stress: acute and long-term effects on physiology and behavior. *Physiology and Behavior*, 23: 253-254.
- Schenberg LC, Bittencourt AS, Caldellas AV, AL Prado da Costa, Póvoa RMF (2005). Uma abordagem neuroetológica dos comportamentos de defesa das linhagens Wistar e Selvagem do rato (*Rattus norvegicus*). Em 'Etologia: uma perspectiva histórica e tendências contemporâneas', editado por Garcia A, Tokumaru RS e Borloti EB, Editora Multiplicidade, Vitória, ES.
- Schultz LA e Lore RK (1993). Communal reproductive success in rats (*Rattus norvegicus*): effects of group composition and prior social experience. *J Comp Psychol.*, 107: 216-222.
- Skinner, B.F. (1938). *The Behavior of Organisms*. New York, Appleton-Century-Crofts.
- Takahashi LK, RJ Blanchard (1982). Attack and defense in laboratory and wild Norway and black rats. *Behavioural Processes*, 7: 49-62
- Tinbergen, N. (1951) *A Study of Instinct*. New York: Oxford University Press.

- Trullas R e Skolnick P (1993). Differences in fear motivated behaviors among inbred mouse strains. *Psychopharmacology*, 111: 323-31.
- Trut LN (1999). Early and domestication: the farm-fox experiment. *American Scientist.*, 87: 160-169.
- Wallace MT, Stein BE. (2000). Onset of cross-modal synthesis in the neonatal superior colliculus is gated by the development of cortical influences. *J Neurophysiol.*, 83: 3578-82.
- Wade N (2006). Nice rats, nasty rats, maybe it's all in the genes. *New York Times*, 25.
- Watanabe, TK, Bihoreau M-T, McCarthy LC, Kiguwa SL, Hishigaki H, Tsuji A, Browne J, Yamasaki Y, Mizoguchi-Miyakita A, Oga K, Ono T, Okuno S, Kanemoto N, Takahashi E-I, Tomita K, Hayashi H, Adachi M, Webber C, Davis M, Kiel S, Knights C, Smith A, Critcher R, Miller J, Thangarajah T, Day PJR, Hudson Jr JR, Irie Y, Takagi T, Nakamura Y, Goodfellow PN, Lathrop GM, Tanigami A & James MR (1999). A radiation hybrid map of the rat genome containing 5,255 markers. *Nature Genetics*, 22: 27 – 36
- Wilder RL, Case JP, Crofford LJ, Kumkumian GK, Lafyatis R, Remmers EF, Sano H, Sternberg EM, Yocum DE. (1991). Endothelial cells and the pathogenesis of rheumatoid arthritis in humans and streptococcal cell wall arthritis in Lewis rats. *J Cell Biochem.*, 45: 162-6.

## OBJETIVOS

**ESTUDO I:** Estudar as diferenças de magnitude (análise de variância) e correlações (análise de fator) dos comportamentos de agressão de ratos selvagens puros ou híbridos, ou de linhagens domesticadas, contra camundongos vivos, mortos, empalhados ou congelados.

*Objetivo de Publicação: Behavioral Brain Research (impacto 3.0).*

**ESTUDO II:** Examinar a influência da linhagem e do sexo na frequência dos comportamentos exploratórios de ratos selvagens (*Rattus norvegicus sp*), Wistar e linhagens derivadas, na arena e no labirinto-em-cruz elevado.

*Objetivo de Publicação: Genes, Brain and Behavior (impacto 4.1).*

**ESTUDO III:** Examinar a influência da linhagem e do sexo nas correlações (análise de fator) dos comportamentos exploratórios de ratos selvagens (*Rattus norvegicus sp*), Wistar e linhagens derivadas, na arena e no labirinto-em-cruz elevado

*Objetivo de Publicação: Genes, Brain and Behavior (impacto 4.1).*

**ESTUDO IV:** Analisar o comportamento defensivo interespecífico e exploratório de ratos selvagens e híbridos no teste inédito do corredor linear.

*Objetivo de Publicação: Behavior Genetics (impacto 2.2).*

**ESTUDO V:** Comparar a magnitude e correlações dos comportamentos dos ratos selvagens, Wistar e híbridos no teste residente-intruso de agressão territorial.

*Objetivo de Publicação: Behavioral Brain Research (impacto 3.0).*

**ESTUDO VI:** Mediante a análise logística de limiares, comparar os comportamentos defensivos induzidos por estimulação da matéria cinzenta periaquedutal dorsal de ratos Wistar, selvagens, híbridos, hipertensos (SHR) e Wistar-Kyoto.

*Objetivo de Publicação: Behavior and Brain Science (impacto 7.1).*

**ESTUDO I****COMPORTAMENTO AGRESSIVO DE RATOS WISTAR,  
SELVAGENS E LINHAGENS DERIVADAS CONTRA  
CAMUNDONGOS VIVOS, EMPALHADOS, RECÉM-MORTOS E  
CONGELADOS**

## Resumo

**Introdução:** O comportamento predatório é aquele no qual o animal captura, mata e ingere a presa. O comportamento do rato de predação de camundongos, ou 'muricídio', consiste num ataque rápido, estereotipado cujo alvo preferencial é o dorso do camundongo. **Objetivos:** Comparar a frequência de ataques e mordidas de ratos selvagens, domesticados ou híbridos dirigidos a camundongos vivos, recém-mortos, congelados ou empalhados. **Método:** Foram utilizados 14 ratos selvagens (SEL, *Rattus norvegicus* sp), 14 ratos Wistar (WIS), 15 ratos da linhagem espontaneamente hipertensa (SHR), 15 ratos Wistar-Kyoto (WKY) e 15 ratos híbridos (HBR) provenientes do cruzamento dos ratos SEL e WIS. Ratos privados de alimentos por um período de 48 horas foram confrontados com os seguintes alvos: 1) um camundongo vivo (CV), 2) um camundongo morto que foi empalhado com as presas expostas na postura de boxear (CE), 3) um camundongo recém-morto por deslocamento cervical (RM) e, 4) um camundongo morto, porém, congelado (CC). Os confrontos foram registrados por 5 minutos por meio de duas filmadoras. A frequência das respostas foi obtida pela análise dos vídeos em câmera lenta. A duração da ingestão e a frequência de ataques/mordidas foram examinadas por análises de variância de 1 (linhagem) e 2 (linhagem e alvo) vias seguidas de testes-t de Bonferroni, respectivamente. As diferenças foram consideradas significantes para o nível de 5%. As correlações entre os comportamentos agressivos foram examinadas por análise de fator. Os fatores principais foram submetidos à rotação ortogonal (método varimax) para a determinação das contribuições independentes de cada fator à variância do comportamento. **Resultados:** Os dados mostram que a fome contribuiu de forma secundária para o muricídio. Adicionalmente, além das linhagens diferirem marcadamente em relação ao mesmo alvo, nossos resultados mostram que elas têm alvos preferenciais. A linhagem SEL foi a única que atacou e desferiu mordidas em todos os alvos. **Conclusão:** A análise da agressão muricida sugere a existência de 2 fenótipos, carnívoro, com ataque preferencial ao CV, e carniceiro, que atacam preferencialmente camundongos mortos. O primeiro é mais evidente na linhagem SEL, enquanto o segundo é



característico das linhagens WIS, SHR e WKY. Os ratos HBR apresentaram elementos de ambos os fenótipos.

**Palavras-chaves: Agressão, Agressão Predatória, Comportamento Muricida, Genética, Análise de Fator, Rato.**

## INTRODUÇÃO

Os comportamentos ofensivos e defensivos de ratos selvagens ou de laboratório têm elos comuns com a agressão humana, sendo utilizados tanto em estudos de neurofisiologia e neurofarmacologia da agressão, como em modelos de transtornos psiquiátricos (Blanchard e Blanchard, 1989; Coccaro, 1996; Coccaro e Kavoussi, 1997). Os modelos de agressão são variados, englobando diversas formas de comportamento (Blanchard e Blanchard, 1981, Blanchard *et al.*, 2003).. Por exemplo, comportamentos agressivos intra- ou inter-específicos podem ser induzidos por choques aplicados a uma ampla variedade de espécies, de répteis a primatas (Azrin, 1967; Ulrich *et al.*, 1964). A remoção do reforço também pode induzir respostas agressivas (agressão induzida por frustração). Adicionalmente, o comportamento agressivo também pode ser induzido por drogas (van der Staay, 2006). Dentre estas, as mais utilizadas são a anfetamina, apomorfina e derivados canabinóides que, combinados à privação de alimento ou sono, alteram a função do sistema dopaminérgico e aumentam a frequência da postura de boxear (Rosenzweig *et al.*, 2005).

Os comportamentos agressivos de ratos também podem ser induzidos por estimulação do hipotálamo lateral ou lesões do bulbo olfatório, núcleo amigdalóide, região septal e hipotálamo (Albert *et al.*, 1979, 1985; Lammers *et al.*, 1988; Adams *et al.*, 1993; Hsuchou *et al.*, 2002; Ho *et al.*, 2004). Os efeitos das lesões sobre comportamentos agressivos variam conforme a localização da lesão, tornando improvável a existência de um circuito genérico para todos tipos de agressão. De fato, estudos recentes com

imunoistoquímica para proteína c-Fos discriminaram os circuitos específicos do rato envolvidos na agressão predatória de baratas e comportamentos de defesa ao gato (Canteras e Goto, 1999, Comoli *et al.*, 2003, 2005).

Os ratos são bastante adaptados no que se refere às suas preferências alimentares. Embora a maior parte da dieta do rato provenha de vegetais, principalmente, cereais, material orgânico e restos alimentares da população humana, eles também podem predar outros animais, perseguindo-os, capturando-os, abatendo-os e consumindo-os (Huntingford e Turner, 1987). De fato, eles são reconhecidos pela predação de uma grande variedade de pequenos animais, incluindo invertebrados, outros roedores, morcegos, pássaros (Heather *et al.*, 2002) e outras pequenas presas Hsuchou *et al.*, 2002). Dentre estes comportamentos predatórios, a predação de camundongos (agressão muricida) tem sido estudada em laboratório.

Definimos o comportamento predatório como aquele no qual o animal captura, mata e, freqüentemente, ingere a presa. Estudos clássicos demonstraram que 70% dos ratos selvagens e 12% dos ratos domésticos (ou de laboratório), machos ou fêmeas, predam camundongos, mesmo quando os ratos selvagens nasceram e foram criados em biotério (Curio, 1975). O ato de predar camundongos ou 'muricídio', é um comportamento rápido, estereotipado cujo alvo preferencial é o dorso do camundongo (Hsuchou *et al.*, 2002). A análise de 671 camundongos abatidos por ratos mostrou que 89% das mordidas encontravam-se na linha da coluna espinhal (65% na região cervical, 13% na região torácica e 11% na região lombar). Das restantes, apenas 4% localizaram-se na cabeça da presa (Curio, 1975). Os ratos muricidas consomem as presas de forma total ou parcial. A diferença mais marcante

entre ratos selvagens e domesticados, é que os primeiros iniciam o comportamento de ingestão logo após a mordida fatal, enquanto os ratos domesticados podem demorar minutos ou horas para iniciar a ingestão (Pellis, 1988).

O muricídio é um comportamento complexo, envolvendo diversos neurotransmissores (Miachon e Cespuglio, 1997; Miachon *et al.*, 1995; Tadano *et al.*, 1997; Ueda *et al.*, 1999), áreas cerebrais (Canteras e Goto, 1999, Markham *et al.*, 2004, Adamec *et al.*, 2006)) e sistemas neuroendócrinos (Rastegar *et al.*, 1993; Miachon *et al.*, 1995). O muricídio também é influenciado pelo nível de atividade exploratória, condições ambientais, condições sociais, dieta e aprendizado (Dielenberg e McGregor, 2001, Bac *et al.*, 2002, Augier *et al.*, 2003). Dentre estas, a fome é um fator crucial na eliciação do comportamento predatório no rato (Hsuchou *et al.*, 2002).

Não obstante, ainda não existem estudos comparativos entre linhagens selvagens e domesticadas neste modelo. Portanto, o presente estudo comparou a freqüência de ataques e mordidas de ratos selvagens, domesticados ou híbridos dirigidos a camundongos vivos, recém-mortos, congelados ou empalhados.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### *Animais.*

Foram utilizados 14 ratos selvagens (SEL, *Rattus norvegicus sp*), 14 ratos Wistar (WIS), 15 ratos da linhagem espontaneamente hipertensa (SHR), 15 ratos Wistar-Kyoto (WKY) e 15 ratos híbridos (HBR) provenientes do

cruzamento dos ratos SEL e WIS. Como presas, foram utilizados camundongos albinos (*Mus musculus*), machos, adultos, pesando cerca de 25 g, com idades entre 90 e 120 dias. Os ratos WIS e linhagens derivadas foram fornecidos pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo. Os ratos SEL eram descendentes de ratos capturados numa granja avícola das cercanias de Vitória. Todos os procedimentos do presente estudo respeitaram as normas estabelecidas pelo International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals (CIOMS) - Genebra (1985), e atualmente está sendo analisada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA), da Faculdade de Medicina EMESCAM, Vitória, ES.

#### *Registros Comportamentais*

Todos os experimentos foram realizados numa caixa em formato de 'L' especialmente projetada para o registro do comportamento predatório, na qual o compartimento maior tinha 65 cm de comprimento e o menor 25 cm. Os compartimentos tinham 20 cm de largura e 40 cm de altura e eram forrados com maravalha. A caixa tinha tampa e paredes de vidro, nas quais haviam escalas em centímetros que permitiam o cálculo aproximado da distância presa-predador. Os confrontos entre ratos e camundongos eram registrados durante 5 minutos por meio de duas filmadoras (uma câmera VHS JVC®, GR-SX887UM, e uma filmadora digital SONY Handycam, DCR-HC21), em ângulos distintos. A frequência das respostas comportamentais foi obtida mediante análise dos vídeos exibidos em camera lenta. Os ratos eram submetidos à privação alimentar por um período de 48 horas. Após isto, o rato era colocado

na caixa, 5 minutos antes da apresentação dos seguintes alvos: 1) um camundongo vivo (CV), 2) um camundongo morto que foi empalhado com as presas expostas na postura de boxear (CE), 3) um camundongo recém-morto por deslocamento cervical (RM) e, 4) um camundongo morto, porém, congelado (CC). Tomou-se o cuidado de manter os ratos na extremidade do compartimento maior, enquanto os alvos eram introduzidos na extremidade oposta do compartimento menor. Durante o confronto registrou-se a frequência de ataques e mordidas aos diversos alvos, bem como a duração da ingestão dos camundongos vivo, recém-morto e congelado. Todos os experimentos foram conduzidos entre 14:00 e 17:00 h, numa sala com atenuação sonora e baixa luminosidade (15 lux).

### *Análise Estatística*

A duração da ingestão e a frequência de ataques/mordidas foram examinadas por análises de variância de 1 (linhagem) e 2 (linhagem e alvo) vias seguidas de testes-t de Bonferroni. As diferenças foram consideradas significantes para o nível de 5%.

As correlações entre os comportamentos agressivos foram examinadas por análise de fator. Como esta análise é mais adequada para amostras grandes, ela foi conduzida tanto para a população total ( $n=73$ ), quanto para as amostras menores, descritas acima, das linhagens individuais. Para isto, os dados foram inicialmente submetidos à análise de componente principal. Comportamentos com variância condicional igual a zero foram excluídos do respectivo grupo. Em seguida, os dados foram submetidos à análise de fator, fixando-se o número de fatores segundo o número de

componentes principais com autovalores (*eigenvalues*) maiores que 1 (método mineigen) e mediante 'gráficos de sopé' (*scree plots*). Os fatores principais foram submetidos à rotação ortogonal (método varimax) para a determinação das contribuições independentes de cada fator à variância. Por fim, os fatores ortogonais foram submetidos à rotação oblíqua (método promax). Os fatores foram interpretados com base na estrutura de fator da rotação ortogonal e/ou estrutura de referência da rotação oblíqua. Somente fatores com coeficientes maiores que 0,35 (valor absoluto) foram apresentados nos gráficos e tabelas. Os gráficos representam a estrutura de referência da rotação oblíqua.

Todos os procedimentos estatísticos (análises de variância e fator) foram realizados com o programa SAS (Statistical Analysis Systems, Cary, EUA).

## RESULTADOS

### *Padrão Geral da Agressão Muricida*

Em geral, o ataque do rato ao camundongo ocorreu numa distância de cerca de 7 cm. Com algumas exceções, o padrão mais freqüente de predação foi (1) detecção do camundongo, (2) perseguição curta, (3) mordidas iniciais, (4) mordida fatal, (5) manipulação do camundongo e (6) ingestão do camundongo. Em 70% dos casos de muricídio, a primeira mordida foi fatal, independente da linhagem. Pudemos notar, ainda, que a maioria dos ratos desferiu suas mordidas nas regiões laterais e superiores do dorso do camundongo.

### *Influência da Linhagem e Alvos nos Comportamentos de Agressão Predatória*

Embora a freqüência dos ataques não tenha sido afetada pelos alvos da predação, ela foi influenciada pela linhagem ( $F_{4,272}=15,89$ ;  $P<0,0001$ ) e pela interação desta os alvos da predação ( $F_{12,272}=1,97$ ;  $P<0,02$ ). Em contraste, a freqüência de mordida foi significativamente influenciada pela linhagem ( $F_{4,272}=19,43$ ;  $P<0,0001$ ), alvos ( $F_{3,272}=14,68$ ;  $P<0,0001$ ) e interação destes fatores ( $F_{12,272}=7,06$ ;  $P<0,0001$ ) (Fig.1). Em geral, os comportamentos diferiram caso os alvos fossem, por um lado, camundongos vivos ou empalhados ou, por outro, recém-mortos ou congelados (Fig.1). Isto foi particularmente claro para a linhagem SEL cujo comportamento agressivo foi muito mais pronunciado na presença dos camundongos vivos ou empalhados.



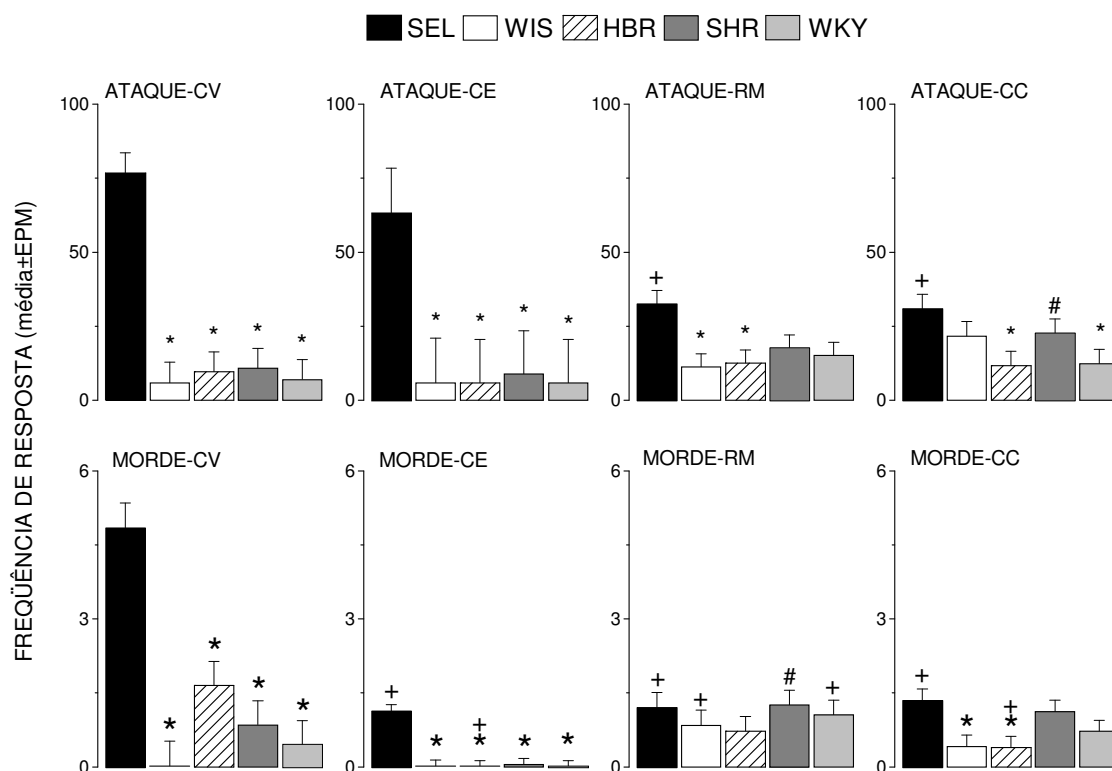


Figura 1. Comportamentos agressivos dos ratos selvagem (SEL), Wistar (WIS), híbridos SELxWIS (HBR), hipertensos (SHR) e Wistar-Kyoto (WKY) contra camundongos vivos e mortos. Abreviaturas: CV - camundongo vivo, CE – camundongo empalhado, RM – camundongo recém morto, CC – camundongo congelado. \* diferenças significantes em relação à linhagem SEL para o mesmo alvo; + # diferenças significantes em relação aos alvos CV e CE para a mesma linhagem, respectivamente ( $P < 0,05$ , ANOVA seguida de testes de Bonferroni).

As comparações mais relevantes estão representadas na Fig.1. Por fim, os ratos SEL também diferiram significativamente quanto ao tempo gasto na ingestão do camundongo morto durante o confronto ( $F_{4,68}=7,5$ ;  $P < 0,0001$ ) (Fig.2). Em contraste, a ingestão dos camundongos mortos (frescos ou congelados) foi virtualmente nula.

### *Fatores Principais dos Comportamentos Agressivos*

Os 3 fatores principais da população total de ratos foram responsáveis por 63,4 % da variância do comportamento agressivo (Tab.1, Fig.3). As contribuições

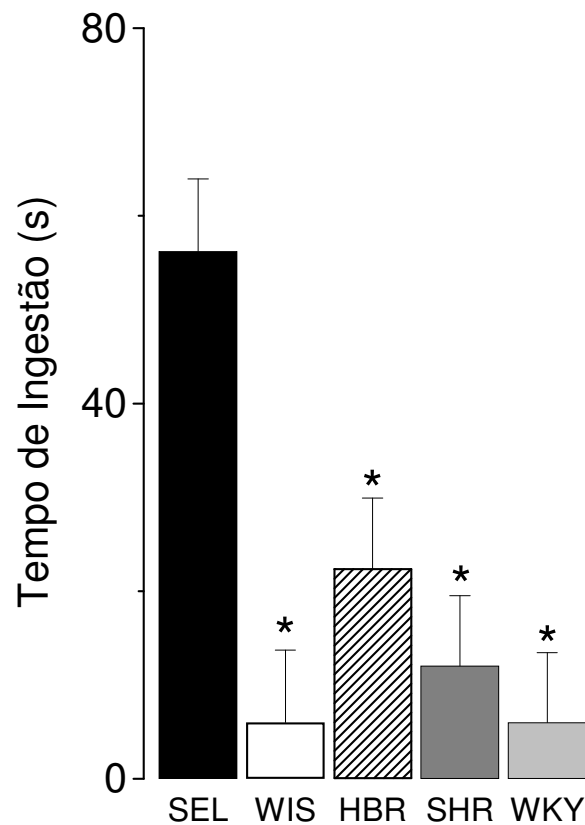


Figura 2. Duração do comportamento de ingestão dos camundongos abatidos durante o confronto. \*  $P < 0,05$ , diferenças significantes em relação à linhagem SEL (ANOVA seguida de testes de Bonferroni).

individuais destes fatores à variância foram de 27,2; 25,3 e 11,0% (rotação varimax) (Tab.1). A estrutura de referência da rotação oblíqua foi bastante similar à estrutura de fator da rotação varimax (Tab.1). Os fatores diferiram quanto ao alvo da predação. Assim, enquanto o Fator-I somente carregou nos ataques e mordidas aos camundongos recém-mortos ou congelados (alvos preteridos pelos ratos SEL). Adicionalmente, o Fator-II carregou nos ataques e mordidas aos camundongos vivos e empalhados (alvos preferidos pelos ratos

SEL) e o Fator-III nas variáveis relacionadas à ingestão do camundongo morto durante o confronto.

Os fatores ortogonais (rotação varimax) e a estrutura de referência (rotação promax) das linhagens individuais estão representados na

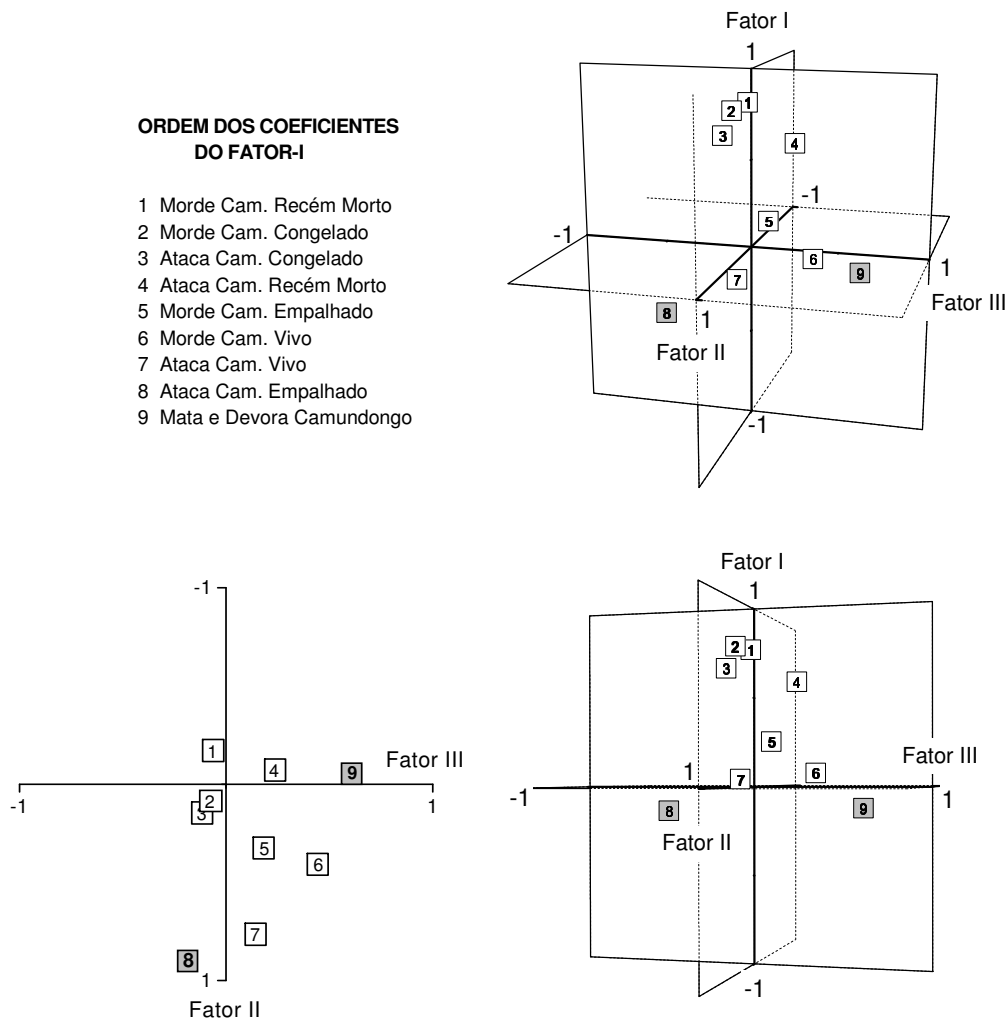


Figura 3. Fatores principais dos comportamentos agressivos dirigidos a camundongos vivos, empalhados, recém-mortos ou congelados para a população total de ratos ( $n=73$ ). Símbolos escuros representam as correlações negativas com o Fator-I. Variáveis cujos coeficientes foram menores que 0,35 (valor absoluto) para os 3 fatores não foram representadas. Os coeficientes são as correlações semi-parciais das variáveis com os eixos de referência da rotação oblíqua (método promax) dos fatores ortogonais obtidos pelo método varimax. Note-se que enquanto os itens 1-4 correlacionam-se forte e positivamente com o Fator-I (gráficos 3D), os itens 7-8 o fazem com o Fator-II e os itens 6 e 9 com o Fator-III (gráfico 2D).

Tabela 2. Foram extraídos 3 fatores para as linhagens SEL e SHR e 2 fatores para WIS, HBR e WKY. A análise de fator de todos os comportamentos da agressão predatória somente foi possível para a linhagem SEL. Nas outras linhagens, vários comportamentos foram excluídos devido à frequência extremamente reduzida destas respostas e variância condicional zero. Dentre estes, destacam-se os comportamentos de ataque e mordida ao camundongo empalhado que só foram observados para a linhagem SEL. Conforme pode ser observado, a estrutura de referência forneceu a descrição mais parcimoniosa das correlações entre as variáveis, servindo de indicação da estrutura mais provável dos fatores (Tab.2).

Os 3 fatores principais da linhagem SEL contribuíram com 72,7% da variância (Fig.3, Tab.2). Os fatores ortogonais contribuíram com 31,5; 25,7 e 15,5 % (rotação varimax). Estes valores foram bastante similares aos dos fatores principais, fatores oblíquos (não apresentados) e fatores da estrutura de referência, indicando a baixa correlação entre fatores da linhagem SEL.

O Fator-I da linhagem SEL carregou nas mesmas variáveis que o Fator-II da população geral, quais sejam, ataques e mordidas aos camundongos vivo ou empalhado. Em contraste, o Fator-II da linhagem SEL foi praticamente idêntico ao Fator-I da população geral, carregando em ataques e mordidas aos camundongos recém-mortos e congelados. Tal como na população geral, o Fator-III da linhagem SEL também carregou fortemente nas variáveis relacionadas à ingestão. Contudo, revelou uma correlação inversa entre os comportamentos dirigidos ao camundongo vivo (mordidas e ingestão) com aqueles relacionados aos camundongos recém-morto e empalhado.

Diferentemente da linhagem SEL, os ratos Wistar somente apresentaram comportamentos significativos em relação aos camundongos recém-morto ou congelado. Os fatores ortogonais desta linhagem foram responsáveis por 84,4 % da variância, dos quais 54,3 % foram devidos ao Fator-I e 30,1 % ao Fator-II (Tab.2). O Fator-I carregou tanto nas variáveis do camundongo recém-morto quanto congelado, representando o comportamento

Tabela 1. Fatores principais do comportamento da agressão muricida da população total de ratos. Os coeficientes representam as correlações com os fatores ou correlações semiparciais no caso da estrutura de referência. Coeficientes entre -0,35 e 0,35 não foram representados. ATQ - ataque, ING - ingestão, MOR - mordida, CV - camundongo vivo, RM - camundongo recém-morto, CC - camundongo congelado, CE – camundongo empalhado.

Compto	Alvo	Fatores Principais			Rotação Varimax			Rotação Promax			Estrutura de Referência		
		I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
ATQ	CV	0,81	-0,48			0,88			0,93	0,51			0,77
ATQ	RM	0,60	0,37		0,66			0,69		0,42		0,59	
ATQ	CC	0,62	0,36		0,69			0,72				0,66	
ATQ	CE	0,59	-0,60	-0,39		0,93			0,90				0,91
ING	CV			0,56			0,64			0,63			0,61
MOR	CV	0,72				0,57	0,56	0,37	0,68	0,70		0,42	0,45
MOR	RM	0,49	0,63		0,80			0,77				0,79	
MOR	CC	0,70	0,47		0,83			0,85				0,79	
MOR	CE	0,62				0,44		0,43	0,53	0,43			
Variância		38,3	18,0	7,1	27,2	25,3	11,0	30,8	30,2	17,9	23,6	19,8	8,3
Var.Acumulada		38,3	56,3	63,4	27,2	52,4	63,4	30,8	61,0	78,8	23,6	43,4	51,6

agressivo geral da linhagem WIS. O Fator-II contribuiu com uma parcela bem menor da variância e carregou em ataques e mordidas ao camundongo recém-morto na rotação ortogonal e apenas em mordidas na rotação oblíqua, expressando a agressividade contra este alvo.

Os fatores ortogonais da linhagem HBR contribuíram com 86,7 % da variância, dos quais 51,4 % foram devidos ao Fator-I e 35,3 % ao Fator-II (Tab.2). Diferentemente dos ratos SEL e WIS, o Fator-I da linhagem HBR carregou tanto nas variáveis dos camundongos vivos quanto mortos, expressando a agressividade muricida geral desta linhagem. Contudo, o Fator-II correlacionou-se forte e positivamente com as variáveis do camundongo vivo, carregando em ataques, mordidas e ingestão dos camundongos mortos durante o confronto.

Os fatores ortogonais da linhagem SHR foram responsáveis por 69 % da variância (Tab.2). Os fatores I e II contribuíram com 40,2 e 17,3 % da variância. Respectivamente, expressam a agressividade dos ratos SHR contra camundongos mortos e vivos, respectivamente. O Fator-III, que contribuiu com apenas 11,4 % da variância, expressa a oposição (correlação inversa) entre os ataques aos camundongos vivo e congelado.

Os fatores ortogonais da linhagem WKY contribuíram com 65,9 % da variância, dos quais 45,1 % foram devidos ao Fator-I e 20,8 % ao Fator-II. Apesar da similaridade da rotação varimax e estrutura de referência, os fatores da linhagem WKY são de difícil interpretação. O Fator-I não encerra maiores problemas uma vez que somente carregou nas variáveis dos camundongos recém-mortos ou congelados. Contudo, o Fator-II carregou em

Tabela 2. Fatores principais do comportamento de agressão predatória dos ratos das linhagens selvagem (SEL), Wistar (WIS), híbrida (HBR), hipertensa (SHR) e Wistar-Kyoto (WKY). (-) variáveis excluídas da análise de fator da respectiva linhagem (variância condicionada zero). Demais detalhes como na Tabela 1.

Fatores Ortogonais da Rotação Varimax (correlações da estrutura de fator)													
Compto	Alvo	SEL			WIS		HBR		SHR			WKY	
		I	II	III	I	II	I	II	I	II	III	I	II
ATQ	CV	0,93			-	-		0,86		0,37	-0,52		0,72
ATQ	RM		0,72		0,85	0,53	0,85	0,48	0,83			0,35	
ATQ	CC	0,38	0,77		0,68		0,97		0,45		0,70	0,73	0,63
ATQ	CE	0,99			-	-	-	-	-	-	-	-	-
ING	CV		-0,41	0,43	-	-		0,82		0,72		-	-
MOR	CV	0,78	0,41	0,39	-	-	0,56	0,75		0,72		-	-
MOR	RM		0,46	-0,43		0,87	0,82	0,52	0,90			0,93	
MOR	CC		0,77		0,94		0,96		0,96			0,85	
MOR	CE			-0,87	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Variância		31,5	25,7	15,5	54,3	30,1	51,4	35,3	40,2	17,3	11,4	45,1	20,8
Var.Acum.		31,5	57,2	72,7	54,3	84,4	51,4	86,7	40,2	57,6	69,0	45,1	65,9
Fatores Oblíquos da Rotação Promax (correlações semiparciais da estrutura de referência)													
Compto	Alvo	SEL			WIS		HBR		SHR			WKY	
		I	II	III	I	II	I	II	I	II	III	I	II
ATQ	CV	0,91			-	-		0,81			-0,53		0,69
ATQ	RM		0,73		0,63		0,74		0,80				
ATQ	CC		0,71		0,54		0,95				0,66	0,52	0,41
ATQ	CE	0,99			-	-	-	-	-	-	-	-	-
ING	CV			0,38	-	-		0,81		0,66			
MOR	CV	0,66		0,42	-	-	0,40	0,63		0,70			
MOR	RM		0,44	-0,37		0,72	0,70		0,84			0,87	
MOR	CC		0,71		0,80		0,95		0,87			0,73	
MOR	CE			-0,84	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Variância		28,3	22,7	13,6	33,6	14,4	33,8	22,4	26,2	11,4	8,3	18,8	7,5
Var.Acum.		28,3	51,0	64,6	33,6	48,0	33,8	56,2	26,2	37,6	45,8	18,8	26,3



variáveis aparentemente díspares, quais sejam, ataques aos camundongos vivos e congelados.

## **Discussão**

Todos os ratos que predam camundongos os consomem. A diferença mais marcante, no caso dos ratos selvagens, é que eles iniciam o comportamento de ingestão logo após a mordida fatal, enquanto para os ratos domesticados há uma latência de minutos ou horas (Pellis, 1988). No presente estudo, o ataque ao camundongo foi facilitado pela privação alimentar dos ratos por um período de 48 horas (Albert *et al.*, 1985). Portanto, os comportamentos agressivos foram duplamente motivados pela fome e agressividade. Não obstante, a fome não induziu a agressão predatória em todos os ratos. Nossos resultados mostraram que o comportamento agressivo das linhagens difere em relação ao mesmo alvo e que as linhagens tem alvos preferenciais. Assim, embora similares quanto às mordidas ao camundongo recém-morto, as linhagens diferiram quanto aos ataques e mordidas aos camundongos vivos, congelados ou empalhado.

A linhagem SEL foi a única que atacou e desferiu mordidas em todos os alvos. Em particular, os ratos SEL foram muito mais agressivos em relação aos camundongos vivo e empalhado e apresentaram um comportamento muito mais pronunciado de ingestão da presa. Curiosamente, embora inanimado e sem odores espécie-específicos, o camundongo empalhado induziu um número de ataques similar àquele observado para os camundongos vivos. Possivelmente, estes ataques foram eliciados pela

postura agressiva (ereta com exposição das presas) na qual o camundongo foi empalhado. Em contraste, o número de mordidas ao camundongo empalhado foi significativamente inferior ao número de mordidas desferidas contra o camundongo vivo. Portanto, enquanto os ataques dos ratos SEL podem ser eliciados por estímulos basicamente visuais e estáticos, as mordidas parecem requerer estímulos de outra natureza, tais como o movimento da presa, seus odores e, provavelmente, textura. Por outro lado, o ataque dos ratos da linhagem WIS e derivadas pode ter sido inibido pela postura agressiva do camundongo empalhado. De fato, ao contrário da linhagem SEL, os ratos WIS somente atacaram os camundongos recém-mortos ou congelados.

Contudo, também houve semelhanças entre linhagens. Assim, além da similaridade do número de mordidas ao camundongo recém-morto, as linhagens SEL, SHR e WKY também foram similares quanto ao número de ataques a este alvo. No mesmo sentido, o comportamento agressivo da linhagem SEL contra o camundongo congelado foi similar àquele da linhagem WIS (no número de ataques) e, principalmente, àquele das linhagens SHR e WKY (no número de ataques e mordidas).

Os fatores principais da população total de ratos mostraram como estas variáveis se correlacionam. O Fator-I parece ser a representação da agressividade na ausência de fome, pois carregou em todas as variáveis exceto a ingestão. O Fator-II contrastou os ataques aos camundongos vivo e empalhado com as demais variáveis, representando, aparentemente, o comportamento dos ratos SEL. Por sua vez, o Fator-III parece representar a fome, uma vez que carregou forte e positivamente em ingestão, mas negativamente no ataque ao camundongo empalhado. Entretanto, o Fator-I da

rotação ortogonal carregou apenas nas variáveis dos camundongos recém-mortos ou congelados, que foram os alvos preteridos pelos ratos SEL e não foram ingeridos por ratos de nenhuma linhagem. Portanto, este fator deve ser interpretado como a agressividade de todas as linhagens exceto a SEL. Reciprocamente, o Fator-II da rotação ortogonal correlacionou-se forte e positivamente com as variáveis dos camundongos vivo e empalhado, que foram os alvos preferenciais dos ratos SEL, reafirmando a interpretação feita para o segundo fator principal. Também não houve alteração na interpretação do Fator-III, uma vez que ele carregou em mordidas e ingestão do camundongo, comportamentos diretamente relacionados à fome. A estrutura de referência da rotação oblíqua foi praticamente idêntica à estrutura de fator da rotação ortogonal, carecendo de informações adicionais. Em resumo, os fatores ortogonais da população total representam o comportamento agressivo das linhagens WIS, HBR, SHR e WKY (F-I), o comportamento agressivo da linhagem SEL (F-II) e a agressividade relacionada à privação alimentar (F-III). Portanto, na população total, a agressão inter-específica teve um papel muito mais importante do que a agressão induzida por fome.

Conforme esperado, a linhagem SEL apresentou um padrão inverso ao da população total, vale dizer, agressão contra camundongos vivos e empalhados (os alvos preferidos) carregaram no Fator-I e agressão contra camundongos mortos (os alvos preteridos) no Fator-II. Adicionalmente, além de se correlacionar com a ingestão, o Fator-III contrastou as mordidas e ingestão do camundongo abatido no confronto com as mordidas aos alvos inanimados (camundongos recém-morto e empalhado). A correlação inversa das mordidas a estes alvos sugere que elas são controladas por, pelo menos, dois

mecanismos motivacionais, presumivelmente, fome e agressão. Adicionalmente, sugere que os ratos possuam 2 fenótipos relativamente antagônicos de agressão muricida, quais sejam, 'carnívoro' (ataques ao camundongo vivo) e 'carniceiro' (ataques aos camundongos mortos). A correlação inversa dos ataques aos 2 tipos de alvos também foi observada no Fator-III da linhagem SHR. Assim, enquanto o fenótipo carnívoro seria dominante na linhagem SEL, o fenótipo carniceiro predominaria nas linhagens WIS, SHR e WKY, que são desprovidas de agressividade. Contrariamente, não houve nem segregação completa, nem correlação inversa dos 2 tipos de alvos, nos ratos HBR. De fato, o Fator-I desta linhagem correlacionou-se tanto com as variáveis do camundongo vivo quanto dos mortos (mas não empalhado). Este resultado sugere a incorporação de traços selvagens ao fenótipo WIS. O Fator-II dos ratos WKY também carregou em ataques a alvos díspares (camundongos vivo e congelado). Contudo, a contribuição à variância deste fator foi menos da metade (20,8 %) da observada para o Fator-I (45,1 %). Portanto, o Fator-II parece expressar os alvos secundários da linhagem WKY (note-se que os ataques e mordidas ao camundongo empalhado não foram incluídos na análise desta linhagem).

Paul e Posner (1973) já haviam mostrado que os ratos selvagens atacavam 70% dos camundongos a eles apresentados, enquanto os ratos de laboratório apenas 12%. Segundo Calvo-Torrent e colaboradores (1999), a grande vantagem dos ratos em ambiente selvagem diz respeito à sua alta eficiência em se adaptar a um novo nicho ecológico. Um dos principais fatores deste sucesso é o comportamento predatório direcionado para as espécies nativas que disputam a mesma área com eles. De fato, o muricídio ocorre de

maneira bastante rápida, geralmente em alguns segundos apenas (Hsuchou *et al.* 2002). Os predadores desenvolveram características específicas no que diz respeito ao reconhecimento da presa, onde o tamanho e o formato são elementos cruciais. De modo geral, a seqüência mais comum do comportamento predatório do rato consiste em detecção da presa, perseguição, mordida, abate, manipulação e ingestão (Huntingford e Turner, 1987). Esta seqüência se mantém relativamente constante, mas pode sofrer modificações com o tamanho da presa (Huntingford e Turner, 1987). Por exemplo, quando um rato caça e abate um grilo ou outro inseto similar, a seqüência consiste em perseguição, derrubar, morder, capturar com as patas dianteiras, morder novamente a cabeça, e remover as pernas e as asas dando início ao comportamento de devorar (Ivanco, 1996). Por sua vez, quando um rato persegue e mata um camundongo, ele geralmente desfere a primeira mordida na cabeça, pescoço e/ou parte superior da anca, freqüentemente, matando o camundongo (Hsuchou *et al.*, 2002). Pistas odoríferas, movimentos e vocalizações emitidas pela presa também são elementos fundamentais para o início do ataque. No presente estudo, o equipamento utilizado limitou o comportamento de fuga do camundongo, tornando dispensável a maioria destes elementos. Contudo, pudemos observar que existe uma distância de cerca de 7 cm na qual o ataque do rato torna-se mais provável. Com algumas exceções, o padrão mais freqüente de predação foi: 1) detecção, 2) perseguição curta, 3) mordidas iniciais, 4) mordida fatal, 5) manipulação do camundongo e, 6) ingestão. Como utilizamos sempre o mesmo tipo de presa num ambiente invariante, os ataques foram bastante estereotipados. Mesmo com alguns camundongos apresentando comportamentos defensivos, por

exemplo, postura de boxear, mordidas, vocalizações e fuga, os ratos não tinham dificuldades em atacá-los e desferir a mordida fatal. Não obstante, perseguição e mordida fatal não foram eliciados pelos camundongos mortos. Contudo, em 70% dos casos de muricídio do presente estudo, a primeira mordida foi fatal, independentemente da linhagem. Notamos, ainda, que a maioria dos ratos mordem os camundongos nas regiões laterais e dorsais. Este comportamento foi semelhante para todas as linhagens, revelando um padrão geneticamente preservado.

O presente estudo revelou diferenças e similaridades do comportamento muricida das cinco linhagens investigadas. As distinções são mais evidentes quando comparamos a linhagem SEL e as demais, provavelmente, devido aos níveis mais elevados de agressividade da primeira. A análise de fator demonstrou como as variáveis se correlacionam com 3 fatores, quais sejam, agressividade contra camundongos mortos, porém não empalhados, agressividade contra camundongos vivos ou empalhados em postura agressiva e agressividade relacionada à fome. Em conjunto, estes resultados sugerem a existência de dois fenótipos relacionados ao muricídio, quais sejam, carnívoro e carniceiro. O primeiro é mais evidente na linhagem SEL, enquanto o segundo é característico das linhagens WIS, SHR e WKY. Os ratos HBR apresentaram elementos de ambos os fenótipos.

## REFERÊNCIAS

- Adamec RE, Blundell J, Burton P (2006). Relationship of the predatory experience to neural plasticity, pCREB expression and neuroendocrine response. *Neurosc Biobehav Rev.*, 30, 35-75.
- Adams DB, Boudreau W, Cowan CW, Kokonowski C, Oberteuffer K, Yohay K (1993). Offense produced by chemical stimulation of the anterior hypothalamus of the rat. *Physiol Behav*, 53:1127-1132.
- Albert DJ, Nanji N, Brayley KN, Madryga FJ (1979). Hyperreactivity as well as mouse killing is induced by electrical stimulation of the lateral hypothalamus in the rat. *Behav Neural Biol*, 27:59-71.
- Albert DJ, Walsh ML, White R (1985). Mouse killing induced by parachlorophenylalanine injections or septal lesions but not olfactory bulb lesions is similar to that of food-deprived spontaneous killers. *Behav Neurosci*, 99: 546-554
- Alcock J (2005). *Animal behavior*. 8<sup>ed</sup>. Sinauer Associates, Massachussets.
- Augier S, Penes MC, Debilly, Miachon AS (2003). Polyunsaturated fatty acids in the blood of spontaneously or induced muricidal male Wistar rats. *Brain Res.*, 60: 161-65.
- Azrin, N (1967). Pain and aggression. *Psychol Today*, 1: 27-33.
- Bac P, Pages N, Herrenknecht C, Dupont C, Maurois P, Vamecq J, Durlach J (2002). THC aggravates rat muricide behavior induced by two levels of magnesium deficiency. *Physiol Behav*. 77:189-195.
- Blanchard RJ, Blanchard DC (1981). The organization and modeling of animal aggression. In: Brain, PF e Denton D (Eds.). *The Biology of Aggression*. Alphen and Rijn: Sythoff and Noordhoff, pp. 529-561.
- Blanchard RJ, Blanchard DC (1989). Attack and defense in rodents as ethoexperimental models for the study of emotion. *Progress in Neuro-Psychopharm Biol Psychiat*, 13:S3-S14.
- Blanchard RJ, wall PM, Blanchard DC (2003). Problems in the study of rodent aggression. *Horm Behav.*, 44: 161-70.

- Calvo-Torrent A, Brain PF, Martinez M (1999). Effect of predatory stress on sucrose intake and behavior on the plus-maze in male mice. *Physiol Behav*, 67:189-196.
- Canteras NS, Goto M (1999). Fos-like immunoreactivity in the periaqueductal gray of rats exposed to a natural predator. *NeuroReport*, 10: 413-418.
- Coccaro EF (1996). Neurotransmitter correlates of impulsive aggression in humans. *Ann NY Acad Sci*, 794:82-89.
- Coccaro EF; Kavoussi RJ (1997). Fluoxetine and impulsive aggressive behavior in personality-disordered subjects. *Arch Gen Psychiat*, 54:1081-1088.
- Comoli E, Ribeiro-Barbosa ER, Canteras NS (2003). Predatory hunting and exposure to a live predator induce opposite patterns of Fos immunoreactivity in the PAG. *Behav Brain Res.*, 138:17-28.
- Comoli E, Ribeiro-Barbosa ER, Negrão N, Goto M; Canteras NS (2005). Functional mapping of the prosencephalic systems involved in organizing predatory behavior in rats. *Neuroscience*, 130:1055–1067.
- Curio E (1976). *The Ethology of Predation*. New York: Springer-Verlag.
- Dielenberg RA, McGregor IS (2001). Defensive behavior in rats towards predatory odors: a review. *Neurosc Biobehav Rev.*, 25: 597-609.
- Heather LM; Jones IL (2002). Impacts of the Norway Rat on the auklet breeding colony at Sirius Point, Kiska Island. *Ethology*, 44:123-129 (**apud ???**).
- Ho YJ, Chen KH, Tai MY, Tsai YF (2004). MK-801 suppresses muricidal behavior but not locomotion in olfactory bulbectomized rats: involvement of NMDA receptors. *Pharmacol Biochem Behav*, 77: 641-646.
- Hsuchou H, Ho YJ, Shui HA, Tai MY, Chen KH, Tsai YF (2002). Effects of incisor-cutting on muricidal behavior induced by olfactory bulbectomy in rats. *Physiol Behav*. 76:669-675.
- Huntingford F, Turner A (1987). *Animal Conflict*. New York : Chapman and Hall.
- Ivanco TL, Pellis SM, Whishaw IQ (1996). Skilled forelimb movements in prey catching and in reaching by rats (*Rattus norvegicus*) and opossums (*Monodelphis domestica*): relations to anatomical differences in motor systems. *Behav Brain Res*. 79:163-181.
- Kruk MR, Van der Poel AM, Lammers JHCM, Hagg T, de Hey AMDM, Oostwegel S (1987). Ethopharmacology of hypothalamic aggression in the rat. In: Olivier B, Mós J, Brain PF (Eds.). *Ethopharmacology of*



- agonistic behaviour in animals and humans. Dordrecht: Martinus Nijhoff, pp. 35-45.
- Lammers JHCM, Kruk MR, Meelis W, Van der Poel AM (1988). Hypothalamic substrates for brain stimulation-induced attack, teeth-chattering and social grooming in the rat. *Brain Res.*, 449: 311-327.
- Markham CM, Blanchard DC, Canteras NS, Cuyno CD, Blanchard RJ (2004). Modulation of predatory odor processing following lesions to the dorsal premmillary nucleus. *Neurosc Lett.*, 372: 22-26.
- Miachon S, Cespuglio R (1997). Prevention of ACTH- and adrenalectomy-induced muricidal behavior: by benzodiazepinic ligands. *Peptides*, 18:185 -199.
- Miachon S, Claustrat B, Cespuglio R (1995). Induction of muricidal behavior by ACTH or adrenalectomy in young male Wistar rats. *Brain Res Bull*, 36:119- 123
- Paul L e Posner I (1973). Predation and feeding: comparisons of feeding behaviour of killer and nonkiller rats. *J Comp Physiol Psychol*, 84: 258-264.
- Pellis SM (1988). Agonistic versus amicable targets of attack and defense: consequences for the origin, function and descriptive classification of playfighting. *Agress Behav*, 14:85-104.
- Rastegar A, Ciesielski L, Simler S, Messripour M, Mandel P. 1993. Brain monoamines following castration of aggressive muricidal rats. *Neurochem Res*, 18:471-477
- Rosenzweig MR, Breedlove SM, Watson NV (2005). *Biological psychology: an introduction to behavioral and cognitive neuroscience*. Sinauer Associates, massachussets.
- Tadano T, Abe Y, Morikawa Y, Asao T, Hozumi M, Takahashi N, Tan-no K, Kisara K (1997). Involvement of dopaminergic neurons in mouse-killing aggression in rats. *Meth Exp Clin Pharmacol*. 19:527-531.
- Ueda S, Isizuya-Oka A, Nishimura A, Takeuchi Y, Yoshimoto K (1999). Hypothalamic aggression area under serotonergic control in mouse-killing behaviour of rats. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2:255-261.
- Ulrich RE, Wolff PC, Azrin NH (1964). Shock as an elicitor of intra- and inter-species fighting behaviour. *Anim Behav*, 12:14-15.

van der Staay FJ (2006). Animal models of behavioral dysfunctions: basic concepts and classifications, and an evaluation strategy. *Brain Res Rev.*, 52:131-59.

## **ESTUDO II**

**INFLUÊNCIA DA LINHAGEM E SEXO NO COMPORTAMENTO  
EXPLORATÓRIO NA ARENA E NO LABIRINTO-EM-CRUZ  
ELEVADO EM RATOS SELVAGENS (*RATTUS NORVEGICUS*  
*SP*), WISTAR E LINHAGENS DERIVADAS**

## RESUMO

**Introdução:** Os fatores genéticos têm uma influência determinante nos comportamentos. Por sua vez, as respostas exploratórias da arena e do labirinto-em-cruz elevado (LCE) têm sido usadas para averiguar o comportamento exploratório de um ambiente novo e os respectivos níveis de ansiedade (neofobia). **Objetivo:** Comparar os comportamentos exploratórios da arena e LCE nos ratos selvagens, Wistar e linhagens derivadas. **Método:** Foram utilizados ratos WIS (20 machos e 15 fêmeas), SHR (33 machos e 15 fêmeas), WKY (21 machos e 21 fêmeas), SEL (7 machos e 16 fêmeas), HBR (89 machos e 94 fêmeas) e híbridos provenientes do retrocruzamento dos HBR com os SEL (SHB, 7 machos e 15 fêmeas), pesando entre 250 e 300g. No LCE registrou-se o tempo despendido na exploração dos braços aberto (TA) e fechado (TF) e o número de entradas nos braços aberto (EA) e fechado (EF) foram registrados durante um período de 5 minutos. Na arena registrou-se tanto a atividade locomotora como a exploração da periferia (PX, peritaxia) e do centro (CX, centrotaxia) e o número de bolos fecais (DF, defecação) durante 10 min. Os dados foram comparados por ANOVA para 2 vias seguida de testes de Bonferroni. As diferenças foram consideradas significantes para  $P < 0,05$ . **Resultados:** A exploração da arena foi bastante similar para ambos os sexos. Contudo, as fêmeas apresentaram uma frequência mais elevada de defecação na linhagem SHR ( $\Delta=89\%$ ) e, em grau ainda mais acentuado, nos ratos WIS ( $\Delta=540\%$ ). A CX também foi levemente maior nas fêmeas da linhagem HBR ( $\Delta=29\%$ ) e SHR ( $\Delta=144\%$ ). Em contraste, não foram observadas diferenças na PX de machos e fêmeas para nenhuma linhagem estudada. A similaridade entre sexos justificou o seu agrupamento para a comparação das linhagens. Dentre as linhagens estudadas, chamam a atenção os valores reduzidos de PX e CX dos ratos WKY. Em média, a PX desta linhagem foi 88% menor que as linhagens de derivação Wistar e 95% menor que aquelas de derivação selvagem. Por sua vez, a CX dos ratos WKY foi 91% e 88% menor que os valores médios das linhagens Wistar e selvagem, respectivamente. Não foram observadas diferenças de sexo na exploração do LCE ds linhagens WIS, SEL e SHB. Nos ratos HBR, a única diferença foi o TF ligeiramente superior ( $\Delta=11\%$ ) das fêmeas. Diferenças mais acentuadas foram observadas para as linhagens

SHR e WKY. Entretanto, quando a exploração dos braços é expressa como porcentagem do tempo e número de total de entradas, a única diferença detectada foi o número menor de entradas no braço aberto das fêmeas SHR. Portanto, a similaridade entre sexos no LCE também justifica o seu agrupamento para a comparação das linhagens. A observação mais importante na comparação das linhagens foi a semelhança da exploração do LCE dos ratos WIS e SEL, tanto em relação ao tempo dispendido quanto ao número de entradas nos braços abertos e fechados. Considerando-se os valores percentuais, as linhagens WIS e SEL apresentaram os níveis mais elevados de ansiedade. Sob este aspecto, os grupos menos ansiosos foram as linhagens SHR, WKY e SHB. Níveis intermediários foram observados para os ratos HBR. Não obstante, a análise de fator do comportamento exploratório dos ratos WIS e SEL (ver Estudo III) sugere que a exploração do braço fechado nas linhagens WIS e SEL é controlada por fatores distintos. **Conclusão:** O presente trabalho justifica o desenvolvimento de linhagens endogâmicas de ratos selvagens para fins de pesquisa dos mecanismos da ansiedade.

**Palavras-chaves:** Ansiedade, Exploração, Rato Wistar, Rato Selvagem, Rato Wistar-Kyoto, Rato Espontaneamente Hipertenso.

## INTRODUÇÃO

É sabido, através dos estudos clássicos, que o estresse afeta as respostas fisiológicas e ambientais (Cannon, 1935; Selye, 1936, 1946). Já se reconhece, por mais de um século, que os organismos dentro de uma mesma espécie podem apresentar marcantes diferenças nas respostas fisiológicas e comportamentais frente ao estresse (Mason, 1961; Frankenhaeuser, 1976; McEwen, 1986).

Atualmente, cresce o número de evidências que reforçam a influência também marcante, dos fatores genéticos sobre os comportamentos (Bouchard, 1994, Vendruscolo *et al.*, 2006, Hinojosa *et al.*, 2005, Izidio *et al.*, 2005, Ramos *et al.*, 2003, Mormède *et al.*, 2002, Ramos *et al.*, 1999, Ramos e Mormède *et al.*, 1998). Um paradigma utilizado por estes estudos que investigam as influências genéticas sobre diversos tipos de comportamento, é a comparação de ratos da mesma linhagem, que passaram por sucessivos cruzamentos endogâmicos (inbreeding), a fim de manter a isogenia.

No geral, as diferenças entre as linhagens podem ser resumidas da seguinte forma: os ratos machos da linhagem Sprague-Dawley apresentam alta reatividade no teste da arena e na resposta de sobressalto a um estímulo acústico, o contrário ocorreu com as fêmeas (Mormède *et al.*, 2002). Na linhagem Long-Evans, tanto os machos quanto as fêmeas apresentam o mesmo nível de reatividade para ambos paradigmas comportamentais (Mormède *et al.*, 2002).

Klenerová e colaboradores (2002) demonstraram que diferenças comportamentais entre diferentes linhagens podem decorrer de atividades

distintas do eixo hipotálamo-ptuitária-adrenal. Utilizando as linhagens de ratos Lewis e Sprague-Dawley, eles demonstraram que os ratos da primeira linhagem apresentaram baixa reatividade do eixo HPA frente aos estressores, ao mesmo tempo em que, tornou mais fácil o processo de habituação ao ambiente novo. Os ratos da segunda linhagem, ao contrário, demonstraram alta reatividade do eixo HPA e maior dificuldade no processo de habituação ao ambiente novo (Klenerová *et al.*, 2002). Mais ainda, os ratos da linhagem Lewis, nos testes do labirinto em cruz-elevado (LCE) e da arena, demonstraram reatividade maior a estímulos aversivos quando comparados à linhagem Sprague-Dawley (Klenerová *et al.*, 2002).

As respostas comportamentais exibidas no teste da arena são usadas para averiguar, de modo direto, o comportamento exploratório em um ambiente novo, o que também inclui certo nível de comportamento ansioso (Renner e Seltzer, 1991, Eilam e Golani, 1989). Contudo, esta abordagem tem seu valor aumentado a partir do momento no qual o rato é submetido uma única vez ao ambiente da arena, ou pelo menos o seja, no caso de mais vezes, em tempos bastante distantes, a fim de evitar os efeitos da aprendizagem (Babcock *et al.*, 2002). Este paradigma é, ainda, importante no que se refere à exposição das diferenças sexuais relacionadas aos comportamentos de conteúdo emocional, como explicitado acima (Beatty e Fessler, 1976).

O LCE, por sua vez, é largamente utilizado como um paradigma comportamental (Rodgers e Cole, 1995), o qual presumivelmente mensura o comportamento de esquiva a um medo motivado (Hogg, 1996, Pellow *et al.*, 1985). Durante um experimento típico neste equipamento, os animais passam a maior parte do tempo nos braços fechados do labirinto; um comportamento

que demonstra seu medo por locais abertos (Treit, 1985). A administração de drogas ansiolíticas tende a reduzir este comportamento aversivo natural, enquanto as drogas ansiogênicas podem potencializá-lo (Pellow *et al.*, 1985 e Treit, 1985). Contudo, vários experimentos demonstraram que ratos, mesmo de linhagens, sexo e idade idênticos, podem sistematicamente apresentar diferenças nestas respostas comportamentais no LCE (Decousa, 1998). Esta variabilidade nos resultados pode se dever, parcialmente, ao patrimônio genético que pode diferenciar ratos da mesma linhagem.

Schwartzing e colaboradores (1998) baseando-se no tempo gasto na exploração dos braços abertos do labirinto, demonstraram que ratos Wistar machos podem ser subdivididos em dois subgrupos, quais sejam, de baixa ansiedade (LA) e alta ansiedade (HA). Estes grupos diferenciam-se nos níveis de serotonina no estriado ventral, mas não no neostriado, córtex frontal, corpo amigdalóide e hipocampo ventral. Além do mais, ambos os grupos não apresentam diferenças significantes no que diz respeito aos níveis de noradrenalina e dopamina nestas mesmas regiões cerebrais (Schwartzing, 1998).

Interessante que o estriado ventral, o qual inclui o núcleo accumbens, é conhecido por exercer um papel crítico no comportamento motivado. Ying-Jui *et al.* (2002) demonstraram, ainda, que a ansiedade no LCE não relaciona-se com o comportamento locomotor na arena, o qual também apresenta diferenças comportamentais em ratos de linhagens iguais. Em conjunto, estes comportamentos parecem refletir o funcionamento de mecanismos cerebrais dopaminérgicos e colinérgicos relacionados a ativação



psicomotora, respondendo a uma situação nova, a um impulso motivacional e também a adicção e estresse (Thiel *et al.*, 1998).

No teste do LCE, os ratos machos podem, também, apresentar comportamentos relacionados ao medo, em maior intensidade do que as fêmeas (Johnston e File, 1991). Por exemplo, baixa taxa de ambulação e altos níveis de defecação no teste da arena, assim como número reduzido de entradas nos braços abertos do LCE (Johnston e File, 1991).

Diferenças relacionadas a idade dos ratos também vem sendo foco de interessantes estudos realizados, no que se refere ao aspecto emocional dos comportamentos destes (Masur *et al.*, 1980). Por exemplo, Imhof *et al.* (1993) demonstraram que tantos os ratos machos quanto as fêmeas apresentam um aumento dos níveis daqueles comportamentos relacionados ao medo no LCE em função da idade. Os animais de ambos os sexos, abaixo dos 60 dias de idade, apresentam padrões similares de respostas, com elevados índices de entradas nos braços abertos, bem como o tempo gasto na exploração destes. Este padrão de resposta é freqüentemente obtido com o tratamento de benzodiazepínicos nos ratos adutos (Pellow *et al.*, 1985).

Imhof *et al.* (1993) demonstraram, ainda, que as diferenças sexuais apresentadas no teste do LCE não foram observadas após o 120º dia de idade. Além do mais, a análise dos dados obtidos com ratos entre 120 e 150 dias de vida revelou baixos índices de entrada e tempo de exploração dos braços abertos. Conclui-se, a partir daí, que os ratos mais jovens são menos ansiosos do que os ratos mais velhos, independentemente do sexo (Imhof *et al.*, 1993).

Por outro lado, ao redor do 90º dia de vida, diferenças significantes entre ratos machos e fêmeas no que se refere aos braços abertos, sugerem que os machos são mais reativos do que as fêmeas (Imhof *et al.*,1993). Todavia, nenhuma diferença consistente foi encontrada para estes parâmetros em outras idades. Assim, pode ser que ambos os ratos machos e fêmeas, durante o crescimento, exibam marcantes diferenças em seus respectivos padrões de comportamento exploratório entre o 60º e 90º dia para os machos, enquanto nas fêmeas o mesmo ocorre um pouco mais tarde, entre o 90º e 120º dia de vida. Em conjunto, todos estes resultados sugerem a existência de um período crítico, durante o qual modificações gênero-específicas ocorrem (Imhof *et al.*,1993).

Nos últimos anos, uma série de estudos comportamentais evidenciaram um déficit em ratos WKY jovens-adultos. Tanto a memória de trabalho quanto a capacidade de aprender sobre o ambiente foram muito baixos nesta linhagem de ratos quando submetidos ao labirinto aquático de Morris (Diana *et al.*,1994). Questiona-se desde então o real valor destes ratos WKY como controles de ratos SHR, principalmente em testes comportamentais, uma vez que existem diversas outras diferenças fisiológicas além da pressão arterial. Uma conclusão muito importante destes estudos e a constatação de que os declínios cognitivos associados com a idade são linhagem-dependentes (Diana *et al.*,2002).

Surpreendentemente, tanto o SHR quanto o WKY não apresentam um declínio severo na capacidade de aprender entre os 6 e 10 meses de idade (Diana *et al.*,1994). Os mecanismos envolvidos dos déficits de aprendizagem em ambas as linhagens já estaria presente antes mesmo da

idade de 6 meses. Outra conclusão é de que a baixa capacidade de aprendizado dos ratos SHR não é explicada simplesmente como decorrente da hipertensão (Diana *et al.*,1994).

O objetivo do presente estudo é comparar o comportamento exploratório do rato selvagem e híbrido com a linhagem Wistar tradicionalmente utilizada em laboratório, a qual perdeu o padrão natural deste comportamento, devido os processos de domesticação e de seleção programada realizadas há várias décadas nos biotérios.

## **MÉTODOS**

### *Animais*

Foram utilizados ratos Wistar, machos (n=20) e fêmeas (n=15) (*Rattus norvegicus albinus*), adultos e isogênicos pesando entre 250 e 300g, com idade variando entre 90 e 120 dias, fornecidos pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, da Universidade Federal do Espírito Santo. Estes ratos são descendentes de uma cepa original provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo – USP, em 1992. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas, de polietileno (40 x 30 x 30 cm) e assoalho coberto com serragem, comportando no máximo de 4 a 5 animais. Os ratos tiveram livre acesso à água e comida e foram mantidos em ambiente com ciclo de iluminação de 12 h (luzes acesas às 7:00 h, com intensidade de 54 Lux) e temperatura controlada (20-25°C). Todos os experimentos foram realizados entre as 14:00 e 17:00 horas.

Foram utilizados ratos Wistar Espontaneamente Hipertensos (SHR), machos (n=33) e fêmeas (n=15) (*Rattus norvegicus albinus*), adultos e isogênicos pesando entre 250 e 300g, com idade variando entre 90 e 120 dias, da linhagem SHR. Foram, também, utilizados ratos Wistar Kyoto machos (n=42) e fêmeas (n=42) (*Rattus norvegicus albinus*), adultos e isogênicos pesando entre 250 e 300g, com idade variando entre 90 e 120 dias, fornecidos pelo do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, da Universidade Federal do Espírito Santo. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas, de polietileno (40 x 30 x 30 cm) e assoalho coberto com serragem, comportando no máximo de 4 a 5 animais. Estes ratos são descendentes de uma cepa original provenientes do biotério central da Universidade Estadual de São Paulo – UNESP, Botucatu, em 1994. Os ratos tiveram livre acesso à água e comida e foram mantidos em ambiente com ciclo de iluminação de 12 h (luzes acesas às 7:00 h, com intensidade de 54 Lux) e temperatura controlada (20-25°C). Todos os experimentos foram realizados entre as 14:00 e 17:00 horas.

Foram utilizados ratos Híbridos (HBR), machos (n=94) e fêmeas (n=89) (*Rattus norvegicus sp.*), adultos e pesando entre 250 e 300g, com idade variando entre 90 e 120 dias, provenientes do cruzamento entre alguns espécimes originais dos ratos machos selvagens capturados e ratas Wistar. Foram também utilizados ratos híbridos provenientes do retrocruzamento entre ratos SEL e HBR (SHB), machos (n=14) e fêmeas (n=30) (*Rattus norvegicus albinus*), adultos e pesando entre 250 e 300g, com idade variando entre 90 e 120 dias, fornecidos pelo do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, da Universidade Federal do Espírito Santo. Os animais foram

mantidos em gaiolas coletivas, de polietileno (40 x 30 x 30 cm) e assoalho coberto com serragem, comportando no máximo de 4 a 5 animais. Estes ratos são descendentes de uma cepa original provenientes do biotério central da Universidade Estadual de São Paulo – UNESP, Botucatu, em 1994. Os ratos tiveram livre acesso à água e comida e foram mantidos em ambiente com uma iluminação que mimetiza as condições naturais de vida destes animais (4 lux) e temperatura controlada (20-25°C). Todos os experimentos foram realizados entre as 14:00 e 17:00 horas.

Os ratos denominados por nós de ‘selvagens’ (*Rattus norvegicus sp*) originam-se de ratos capturados em ambientes urbanos e, posteriormente, procriados em biotério. No geral, conseguimos prolongar os cruzamentos endogâmicos até a 3ª geração, onde os ratos não mais demonstraram nenhum tipo de comportamento reprodutivo, mesmo com administração de hormônios específicos. Ao todo foram utilizados 13 animais, machos e fêmeas provenientes da 1ª geração desenvolvida em biotério, 11 animais da 2ª geração e 6 animais da 3ª geração. Na época do experimento, os ratos adultos pesavam entre 250 e 300g, com idade variando entre 90 e 120 dias, Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas, de polietileno (40 x 30 x 30 cm) e assoalho coberto com serragem, comportando no máximo de 4 a 5 animais. Os ratos tiveram livre acesso à água e comida e foram mantidos em ambiente com uma iluminação que mimetiza as condições naturais de vida destes animais (4 Lux) e temperatura controlada (20-25°C).

Todos os procedimentos do presente estudo respeitaram as normas estabelecidas pelo International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals (CIOMS) - Genebra (1985), e atualmente está

sendo analisada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA), da Faculdade de Medicina EMESCAM, Vitória, ES.

## **TESTES COMPORTAMENTAIS**

### *Labirinto-em-cruz elevado*

Foi utilizado um LCE de madeira e fórmica branca, com dois braços abertos e dois fechados por paredes laterais medindo 30 cm de altura. Os braços têm 50 cm de comprimento por 10 cm de largura, e posicionam-se numa altura de 80 cm do solo. Os braços abertos têm uma borda de acrílico, com 1 cm de altura. Os ratos de todas as linhagens foram colocados na região central. Durante um período de 5 minutos, foram registrados os tempos despendidos nas explorações dos braços abertos e fechados, bem como o número de entradas com as quatro patas em cada um dos braços. Entre cada sessão, o aparelho foi limpo com álcool etílico (10%), a fim de remover pistas olfatórias. A sala experimental foi preparada de forma a reduzir ao máximo ruídos externos. Os experimentos foram realizados entre 14:00 e 18:00, com intensidade luminosa de 14 lux. Os ratos foram testados uma única vez.

### *Teste da arena*

Os ratos de todas as linhagens foram colocados em uma arena de fórmica branca (1,60 x 1,60 m) especialmente projetada para evitar fugas e proporcionar segurança e eficiência na observação dos comportamentos, quando se tratava das linhagens SEL, HBR e SHB. Esta arena era equipada por rodas para sua melhor manipulação, bem como por paredes destacáveis. A

iluminação era mantida constante durante todas as sessões (14 Lux). Para colocar os animais na arena, utilizamos as mesmas tocas de aço que permaneceriam no interior das caixas coletivas do biotério do Laboratório de Neurobiologia II, as quais foram encaixadas na entrada da arena, permitindo então o acesso dos ratos. Durante um período de 10 minutos, os ratos foram observados, quantificando o número de quadrantes atravessados na periferia, bem como o número de cruzamentos no perímetro central. Após o término da sessão, estes mesmos animais foram induzidos a entrar novamente em suas respectivas tocas, comportamento realizado com grande facilidade devido à alta defensividade destes animais. A sala experimental foi preparada de forma a reduzir ao máximo ruídos externos. Os experimentos foram realizados entre 14:00 e 18:00, com intensidade luminosa de 14 lux. Os ratos foram testados uma única vez.

## RESULTADOS

### *Comportamento das Linhagens na Arena*

O comportamento de PX apresentou diferenças acentuadas ( $F_{11,341} = 58,57$ ,  $P < 0,0001$ ) entre grupos. Estas diferenças foram devidas, principalmente, à linhagem ( $F_{5,341} = 118,61$ ,  $P < 0,0001$ ) e, em menor grau, sexo ( $F_{1,341} = 23,67$ ,  $P < 0,05$ ). De fato, não foram detectadas diferenças significantes entre sexos da mesma linhagem, nem mesmo para os ratos Wistar onde as diferenças foram mais evidentes (machos:  $33,3 \pm 4,0$ , fêmeas:  $43,4 \pm 3,7$ ) (Fig.1). Portanto, as linhagens podem ser convenientemente analisadas pela média

dos sexos. Como podemos observar, a PX variou de valores tão baixos como 5,7 (WKY) a 126,8 (SHB) espaços/10 min (Fig.2).

Também foram observadas diferenças altamente significantes para o comportamento de CX ( $F_{11,341} = 17,68$ ;  $P < 0,0001$ ). As diferenças foram devidas primariamente às linhagens ( $F_{5,341} = 33,79$ ;  $P < 0,0001$ ) mas também à interação entre linhagem e sexo ( $F_{5,341} = 10,41$ ;  $P < 0,0001$ ). Assim, enquanto as fêmeas apresentaram valores maiores de CX nas linhagens SHR ( $t_{46} = 7,57$ ;  $P < 0,0001$ ) e HBR ( $t_{181} = 2,27$ ;  $P < 0,05$ ), os machos SHB exploraram a área central mais intensamente ( $t_{20} = 2,05$ ;  $P < 0,05$ ).

A resposta de DF diferiu acentuadamente para os grupos estudados ( $F_{11,341} = 37,45$ ;  $P < 0,0001$ ). Contudo, ao contrário das demais variáveis, esta resposta sofreu influências significantes tanto da linhagem ( $F_{5,341} = 60,01$ ;  $P < 0,0001$ ) quanto do sexo ( $F_{1,341} = 43,25$ ;  $P < 0,0001$ ) e da interação destes fatores ( $F_{5,341} = 28,02$ ;  $P < 0,0001$ ).

### *Comportamento das Linhagens no LCE*

Diferentemente da arena, as variáveis do LCE diferiram tanto em relação ao sexo quanto à linhagem. O sexo teve efeitos significantes quanto às entradas ( $F_{1,341} = 6,97$ ,  $P < 0,01$ ) e tempo ( $F_{1,341} = 7,71$ ,  $P < 0,0001$ ) de exploração do braço fechado (Figs.3-4). Em contraste, o TA não foi afetado de forma significativa pelo sexo. Tampouco foram observadas interações significantes entre sexo e linhagem nesta variável. Assim, as diferenças no TA foram virtualmente devidas às diferenças entre linhagens (Fig.5). Também foram observadas interações significantes entre sexo e linhagem para EA ( $F_{5,341} =$



4,34,  $P < 0,001$ ), EF ( $F_{5,341} = 5,72$ ,  $P < 0,0001$ ) e TF ( $F_{5,341} = 3,40$ ,  $P < 0,005$ ). De fato, enquanto o sexo teve um efeito significativo nas EA das linhagens WKY ( $t_{40} = 2,09$ ,  $P < 0,05$ ) e SHR ( $t_{46} = 4,05$ ,  $P < 0,0001$ ), o sexo somente influenciou as EF na linhagem WKY ( $t_{40} = 5,82$ ,  $P < 0,0001$ ) (Fig.3). Por outro lado, o sexo teve uma influência significativa no TF das linhagens WKY ( $t_{40} = 2,07$ ,  $P < 0,05$ ), SHR ( $t_{46} = 2,48$ ,  $P < 0,01$ ) e HBR ( $t_{181} = 2,19$ ,  $P < 0,05$ ) (Fig.3). Contudo, quando estas variáveis foram expressas em porcentagem da atividade total, o sexo somente teve influência no número de EF da linhagem SHR ( $t_{46} = 2,97$ ;  $P < 0,005$ ) (Fig.4).

Diferentemente do sexo, as linhagens tiveram efeitos significantes sobre todas as variáveis do LCE, vale dizer, EA ( $F_{5,341} = 26,19$ ,  $P < 0,0001$ ), TA ( $F_{5,341} = 26,94$ ,  $P < 0,0001$ ), EF ( $F_{5,341} = 28,93$ ,  $P < 0,0001$ ) e TF ( $F_{5,341} = 12,22$ ,  $P < 0,0001$ ) (Fig.5). Notadamente, as linhagens WIS e SEL apresentaram níveis maiores, porém, similares de ansiedade, apresentando uma reduzida exploração dos braços abertos. As linhagens SHR e WKY também apresentaram desempenhos similares, porém, em sentido inverso, sugerindo níveis menores de ansiedade (Fig.5).

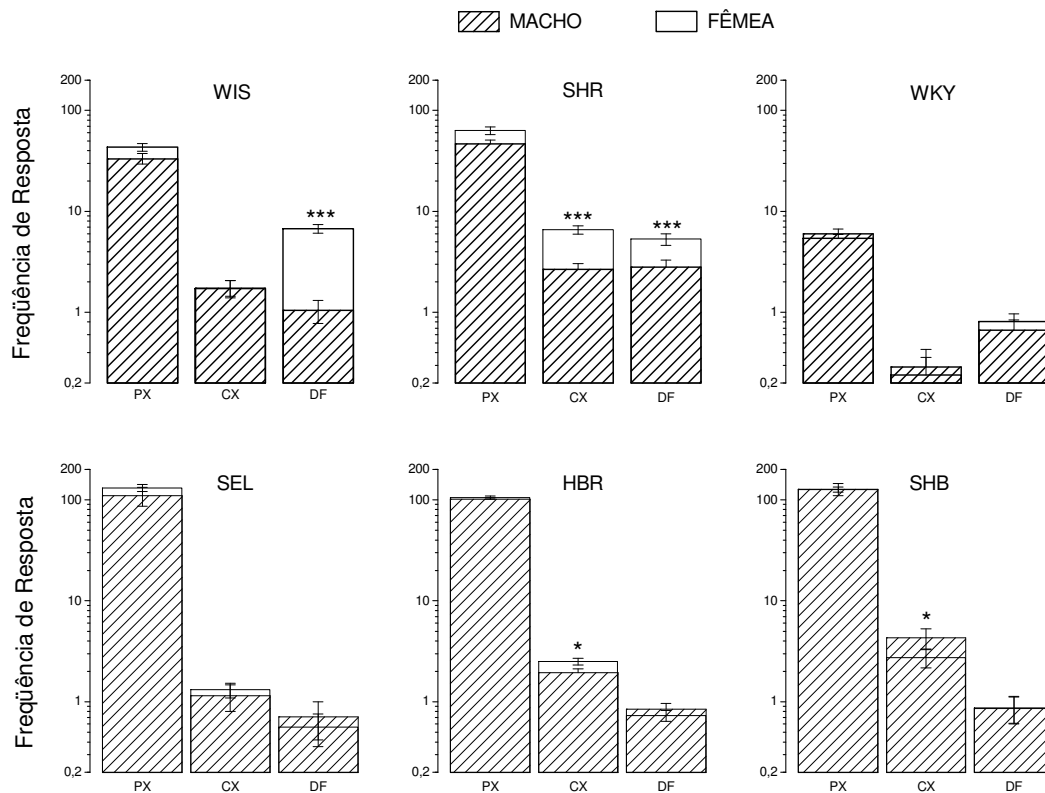


Figura 1. Efeito do sexo sobre o comportamento de exploração da arena das diversas linhagens. Abreviaturas: PX – peritaxia, CX – centrotaxia, DF – defecação, WIS – Wistar, SHR – ratos espontaneamente hipertensos, WKY – Wistar-Kyoto, SEL – selvagem, HBR – híbridos WISxSEL, SHB – híbridos SELxHBR. \*  $P < 0,05$ , \*\*\*  $P < 0,005$ , diferenças significantes entre sexos (testes-t para grupos independentes).

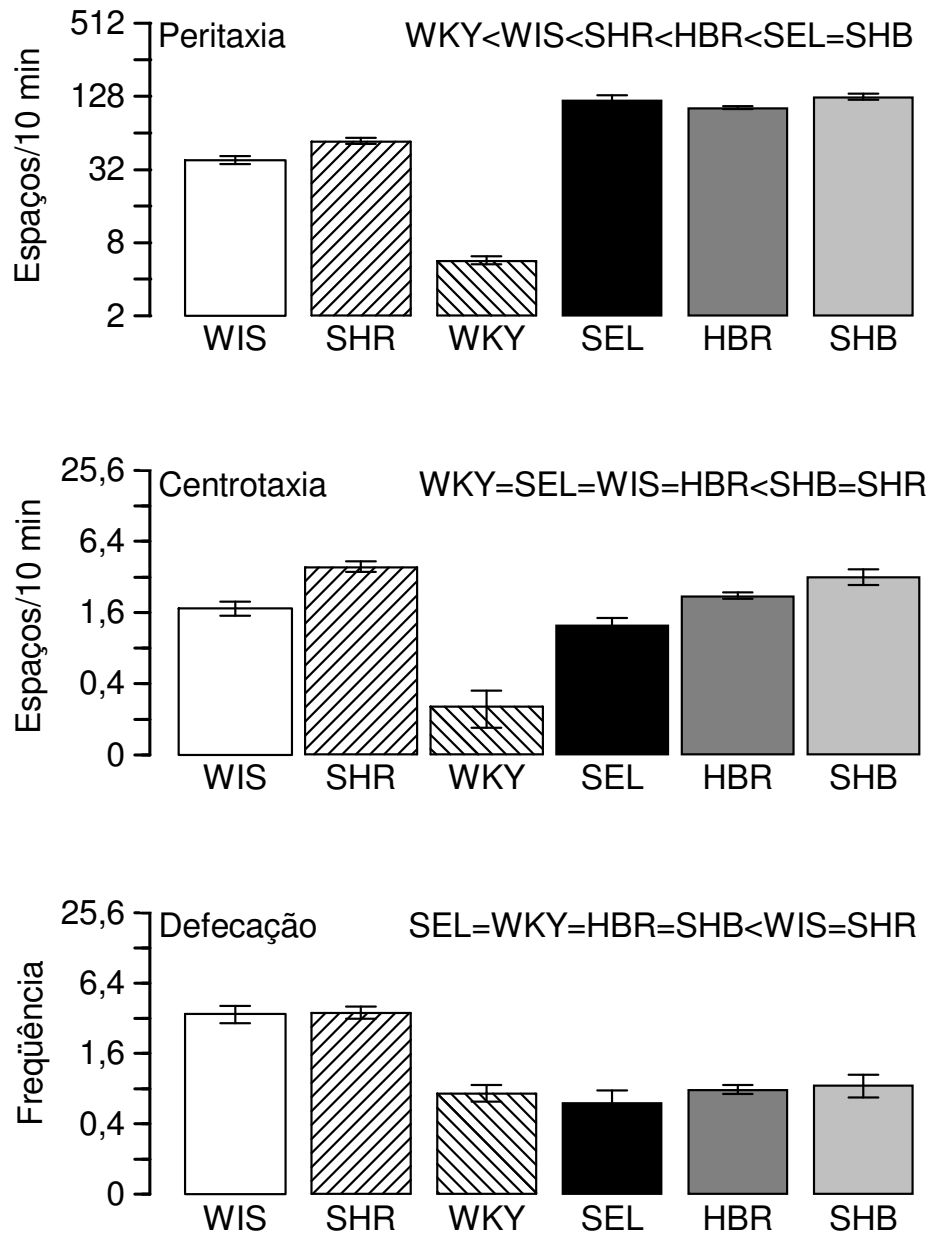


Figura 2. Efeito da linhagens sobre o comportamento de exploração da arena. Ordenada em escala logarítmica de base 2. As desigualdades (<) indicam diferenças significativas entre as linhagens (ANOVA seguida de testes-t de Bonferroni). Demais detalhes como na Fig.1.

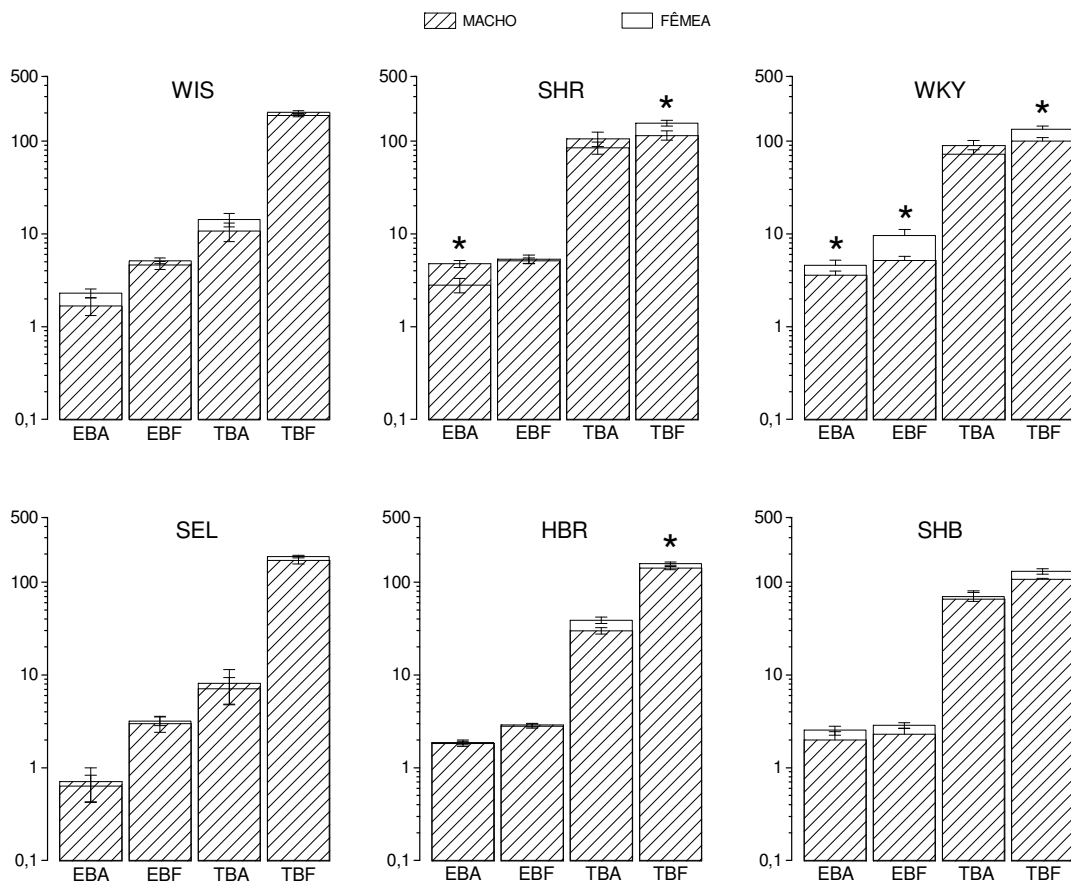


Figura 3. Efeito do sexo sobre o comportamento de exploração do labirinto-em-cruz elevado das diversas linhagens. Abreviaturas: EA – entradas nos braços abertos, EF – entradas nos braços fechados, TA – tempo nos braços abertos, TF – tempo nos braços fechados. Ordenadas em escala logarítmica de base 10. \*  $P < 0,05$ , diferenças significantes entre sexos (testes-t para grupos independentes). Demais detalhes como na Fig.1.

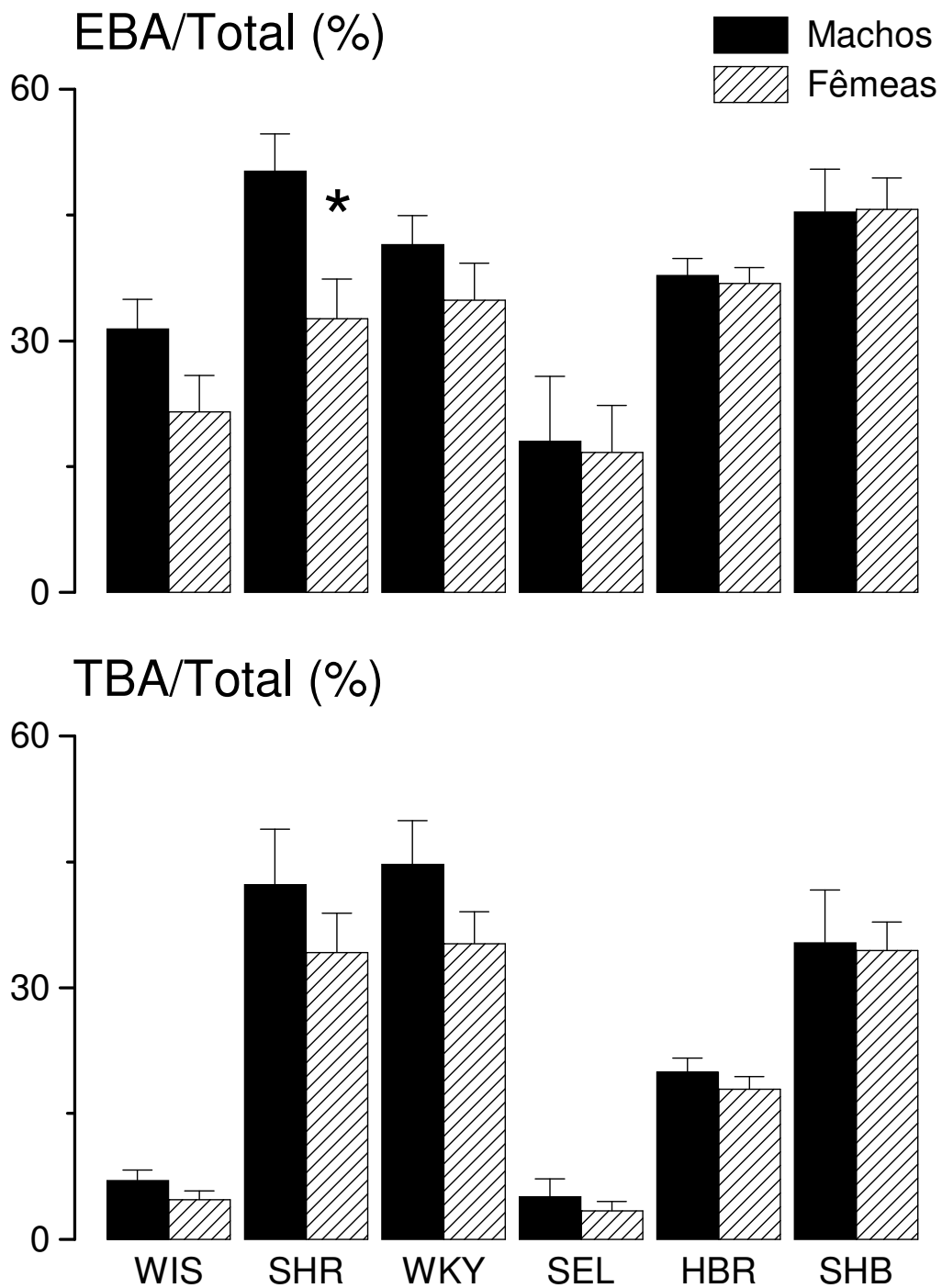


Figura 4. Efeito do sexo das linhagens sobre o comportamento de exploração do labirinto-em-cruz elevado. Abreviaturas: EA/Total (%) – percentagem de entradas nos braços abertos, TA/Total (%) – percentagem de tempo nos braços abertos. Demais detalhes como na Fig.1.

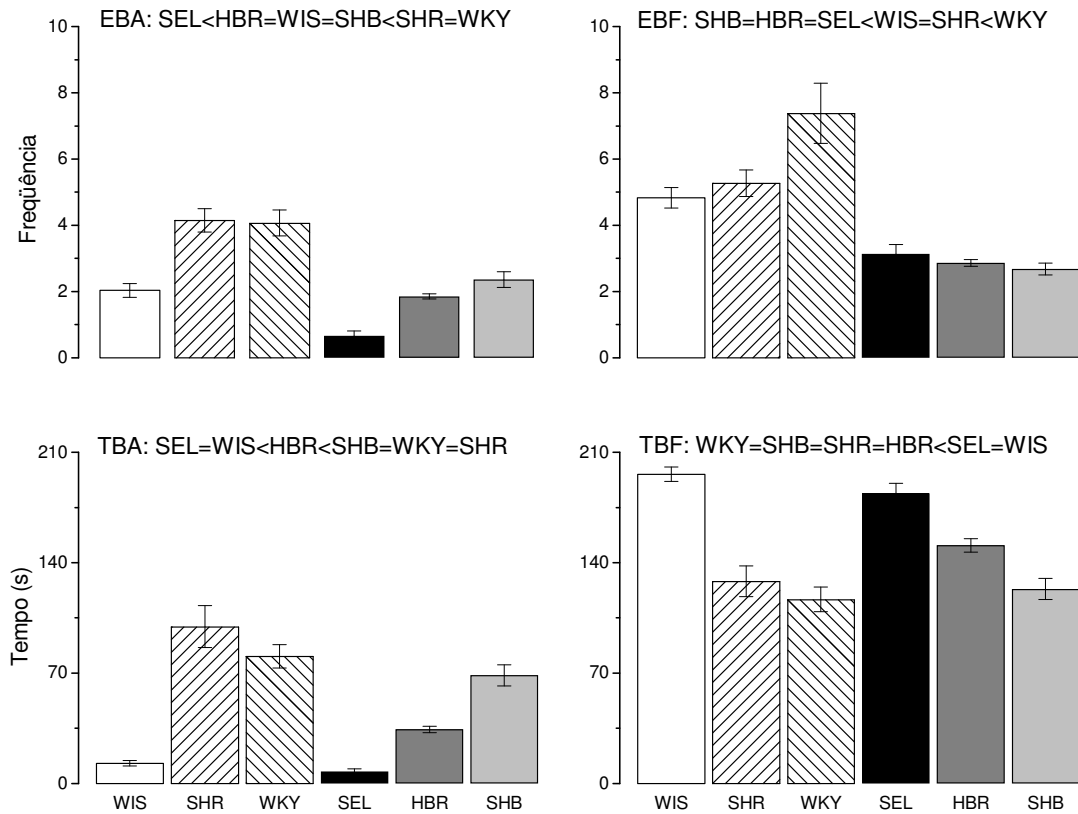


Figura 5. Efeito da linhagens sobre o comportamento de exploração do labirinto-em-cruz elevado. As desigualdades (<) indicam diferenças significantes ( $P < 0,05$ ) entre as linhagens (ANOVA seguida de testes-t de Bonferroni).

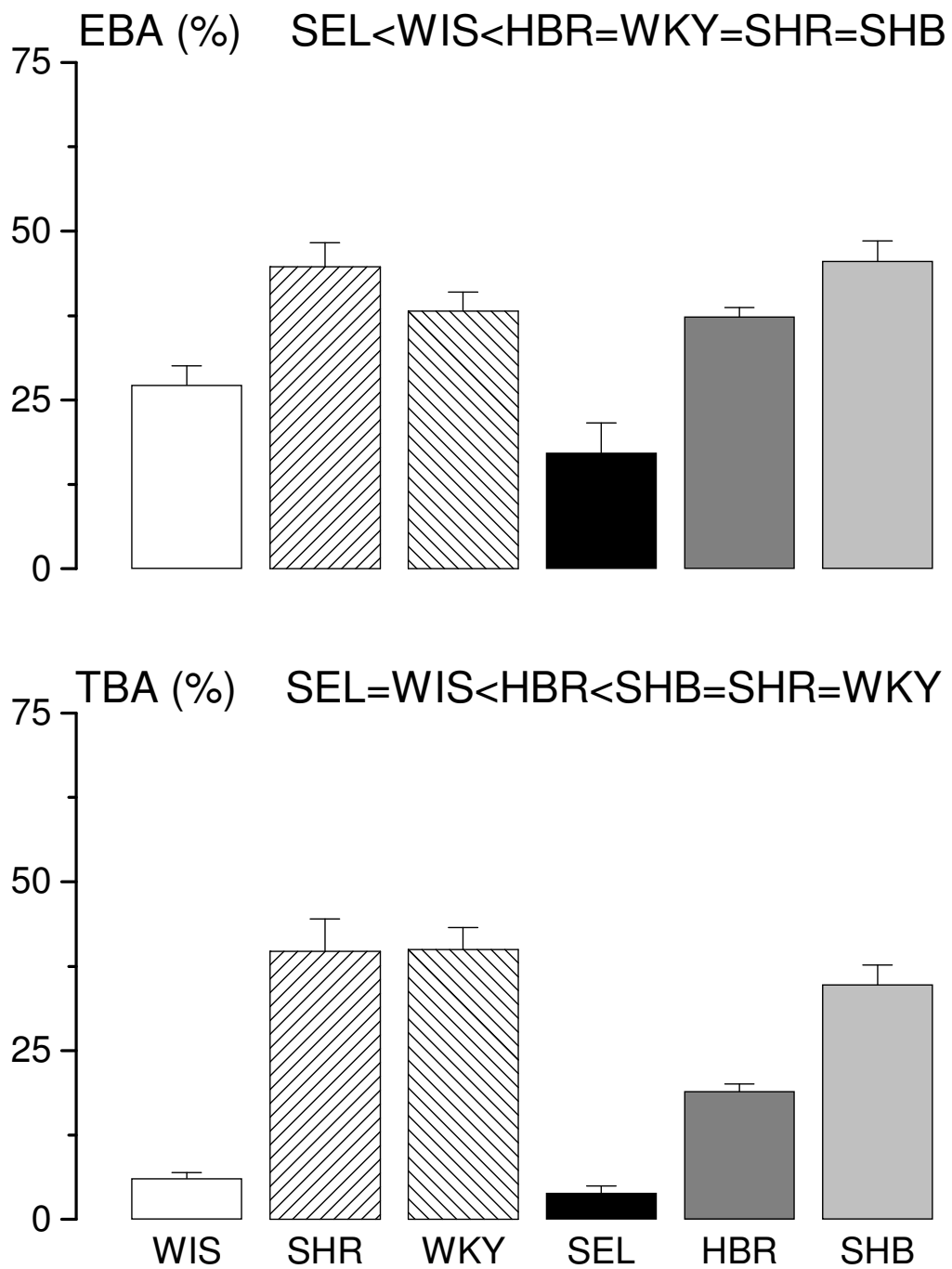


Figura 6. Efeito das linhagens sobre o comportamento de exploração do labirinto-em-cruz elevado. Demais detalhes como na Fig.4.

## DISCUSSÃO

A exploração da arena foi bastante similar para ambos os sexos. Contudo, machos e fêmeas diferiram acentuadamente nas linhagens WIS e SHR. As fêmeas apresentaram uma frequência mais elevada de defecação na linhagem SHR ( $\Delta=89\%$ ) e, em grau ainda mais acentuado, nos ratos WIS ( $\Delta=540\%$ ). As fêmeas da linhagem SHR também apresentaram uma frequência mais elevada de CX ( $\Delta=144\%$ ). A CX também foi levemente maior nas fêmeas da linhagem HBR ( $\Delta=29\%$ ). Em contraste, não foram observadas diferenças na PX de machos e fêmeas para nenhuma linhagem estudada.

A similaridade entre sexos justifica o seu agrupamento para a comparação das linhagens. Dentre as linhagens estudadas, chamam a atenção os valores reduzidos de PX e CX dos ratos WKY. Em média, a PX desta linhagem foi 88% inferior às demais linhagens de derivação Wistar e 95% inferior àquelas de derivação selvagem. Embora a CX dos ratos WKY tenha sido mais variável que a PX, a CX foi 91% e 88% inferior aos valores médios das linhagens de derivação Wistar e selvagem, respectivamente.

A exploração do LCE também foi muito similar para machos e fêmeas. De fato, não foram observadas diferenças entre sexos para as linhagens WIS, SEL e SHB. Nos ratos HBR, a única diferença foi o TF ligeiramente superior ( $\Delta=11\%$ ) das fêmeas. Contudo, a significância estatística deste dado pode ter sido devida ao número elevado de ratos HBR. Diferenças mais acentuadas foram observadas para as linhagens SHR e WKY. Na primeira, a frequência de EA dos machos foi 70% maior que a das fêmeas. Em contraste, o TF das fêmeas foi 35% maior que o dos machos. Na linhagem



WKY as fêmeas exploraram os braços fechados por um tempo maior ( $\Delta=34\%$ ) e apresentaram freqüências maiores de entradas nos braços abertos ( $\Delta=28\%$ ) e fechado ( $\Delta=84\%$ ). Entretanto, quando a exploração dos braços é expressa como porcentagem em relação ao tempo e número de entradas totais, a única diferença detectada foi o menor número de entradas no braço aberto das fêmeas SHR. Portanto, a similaridade entre sexos no LCE também justifica o seu agrupamento para a comparação das linhagens.

A observação mais importante na comparação das linhagens foi a semelhança da exploração do LCE dos ratos WIS e SEL, tanto em relação ao tempo dispendido quanto ao número de entradas nos braços abertos e fechados. Considerando-se os valores percentuais, as linhagens WIS e SEL apresentaram os níveis mais elevados de ansiedade. Sob este aspecto, os grupos menos ansiosos foram as linhagens SHR, WKY e SHB. Níveis intermediários foram observados para os ratos HBR. Não obstante, a análise de fator do comportamento exploratório dos ratos WIS e SEL (ver Estudo II) sugere que a exploração do braço fechado nas linhagens WIS e SEL é controlada por fatores distintos. Assim, enquanto ambas as linhagens evitam o braço aberto em função da ansiedade, a permanência no braço fechado é inversamente relacionada à ansiedade nos ratos WIS, mas à atividade nos ratos SEL.

Contrariamente aos resultados encontrados por nós no presente estudo, estudos seminais (Söderpalm, 1989 e Paré, 1989), e também mais atuais (Ramos *et al.*, 1997 e Durand *et al.*, 1999), indicaram que os ratos WKY, por exemplo, apresentam níveis mais acentuados de ansiedade e pouca atividade locomotora quando comparados com os animais da linhagem SHR.

Durand e colaboradores (2000), investigando as ações da desipramina sobre os comportamentos de ambos os grupos na arena e no LCE, confirmaram estes achados.

Diversos estudos (Paré, 1989 ab, Redei *et al.*, 1994, Ito *et al.*, 1990, Shichijo *et al.*, 1991) demonstraram que os ratos WKY caracterizam-se por apresentar hiperresponsividade ao estresse. Paré (1994) demonstrou que estes manifestam vários comportamentos que sugerem um quadro de depressão. Quando comparados com outras linhagens, os ratos WKY demonstram um pronunciado déficit motor na arena; um tempo longo de reação ao choque, ou seja, apresenta com muito mais facilidade o comportamento de desamparado aprendido; demonstra com muita intensidade a imobilidade no teste do nado-forçado rapidamente adquire a resposta de esquiva passiva e congelamento em testes de condicionamento defensivos.

O fato de que os ratos WKY são bastante susceptíveis a desenvolver úlceras no teste do estresse induzido pela restrição, e também apresentam altos níveis de hormônio adrenocorticotrópico em resposta ao estresse de retenção sugerem que a linhagem WKY são hiperresponsíveis a situações de estresse. O antidepressivo, desipramina, reduz o tempo de imobilidade no teste do nado-forçado, assim como a incidência da úlcera causada pelo estresse nesta linhagem (Paré, 1992).

O grande valor do estudo de Paré (1994a,b) reside no fato de que medidas múltiplas de comportamento foram obtidas no mesmo tipo de animal. A análise de correlação indicou que não existe uma relação entre os testes da arena, do desamparo aprendido e do nado-forçado. Assim, a imobilidade obtida num destes testes não implica, necessariamente, imobilidade em outros testes.

Estes resultados concordam com outros estudos (Alonso *et al.*, 1991), os quais revelaram que a imobilidade nos testes da arena e do nado-forçado seriam controlados por diferentes mecanismos. Contudo, a mais interessante observação vem do fato de os comportamentos registrados durante o nado-forçado e o desamparo aprendido revelarem uma correlação positiva, apenas para estes ratos WKY. Este resultado sugere que os ratos WKY apresentam índices elevados de comportamento depressivo em um destes modelos de depressão.

Paré e colaboradores (1999) demonstraram, ainda, que os ratos WKY são mais propensos ao consumo de álcool e ulcerações gástricas quando comparados aos ratos da linhagem Sprague-Dawley. Esta grande reatividade comportamento deste grupo ao estresse é verificada em vários paradigmas, tais como a imobilidade apresentada nos testes da arena (Paré 1989b,c), a imobilidade nos testes do nado-forçado (Paré 1989a,d), a rápida aquisição da resposta de esquiva-passiva (Paré 1994), a exibição reduzida de comportamentos exploratórios em uma ambiente novo (Paré 1989d), a permanência dentro dos braços fechados na maior parte do tempo no teste de LCE (Paré, 1992).

Os ratos SHR, por sua vez, são utilizados como modelos para varias desordens associadas a hipertensão. Os ratos SHR compõem um modelo comportamental para a desordem de hiperatividade e déficit de atenção (Sagvolden, 2001). Comparados com seus progenitores e controles normotensos, os ratos WKY, os SHR são mais hiperativos, são menos atentos e mais impulsivos (Boix *et al.*, 1998). A maioria das pesquisas envolvendo os ratos SHR são realizadas em indivíduos jovens-adultos, com poucas

referências para as fêmeas SHR e, além do mais, a linhagem WKY pode não ser a mais apropriada para controle da linhagem SHR.

Os ratos SHR, quando idosos, servem, ainda, como modelo experimental para os prejuízos cognitivos às vezes observados em pessoas idosas. Os efeitos da idade sobre as habilidades cognitivas, tais como, memória e aprendizagem, nesta linhagem já são apontadas por alguns estudos. Meneses e colaboradores (1996) demonstraram que a performance do ratos SHR era pior do que a do WKY no comportamento operante, o qual envolve um nível mínimo de aprendizado. Os efeitos deletérios da hipertensão sobre a aprendizagem e a memória, os quais são observados em diferentes idades - entre 3 e 24 meses -, são potencializados pela idade (Meneses *et al.*, 1996). Por fim, o presente trabalho justifica a produção e utilização de uma linhagem endocruzada de ratos selvagens, os quais tendem a manter o padrão natural de comportamento exploratório nos paradigmas comportamentais relatados.

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram a existência de diferenças acentuadas entre linhagens e sexo na ansiedade. Neste caso, as fêmeas da linhagem WIS e SHR apresentaram níveis mais elevados de DEF e CX, em contraste com os valores reduzidos dos ratos WKY. A exploração do LCE não foi influenciada de forma relevante pelo sexo no caso dos grupos WIS, SEL e SHB. No entanto, diferenças acentuadas foram observadas entre as linhagens SHR e WKY. No primeiro caso os machos foram menos ansiosos, ao contrário do que ocorreu com o último grupo. De maneira surpreendente, as linhagens WIS e SEL apresentaram os níveis mais elevados de ansiedade no LCE. Os grupos que apresentaram menor

ansiedade, neste caso, foram SHR, WKY e SHB. Níveis intermediários foram obtidos pelos ratos HBR. Este resultado sugere uma influência genética bastante seletiva sobre o comportamento exploratório entre os diferentes grupos. Além do mais, parecem existir dois tipos de fatores controlando este comportamento, ou seja, enquanto as linhagens WIS e SEL evitam os braços abertos do LCE devido a ansiedade, uma vez nos braços fechados, a linhagem SEL permanece bastante ativa, ao contrário dos ratos WIS.

## REFERÊNCIAS

- Alonso SJ, Castellamo MA, Afonso D, Rodriguez M (1991). Sex differences in behavioral despair: relationship between behavioral despair and open field activity. *Physiology and Behavior*, 49: 69-72.
- Babcock AM, Wright J, Bjerkeness D, Hartman H e Tall Bear N (2002). Effects of prior apparatus experience and novelty of testing environment on locomotor activity following MK-801. *Physiology and Behavior*, 77: 177-81.
- Beatty WW e Fessler RG (1976). Ontogeny of sex differences in open-field behavior and sensitivity to electric shock in the rat. *Physiology and Behavior*, 16: 413-17.
- Bellack AS, Hersen M (1993). *Psychopathology in adulthood*. Needham Heights (MA): Allyn and Bacon.
- Blanchard DC, Griebel G, Blanchard RJ (1995). Gender bias in the preclinical psychopharmacology of anxiety: male models for (predominantly) female disorders. *J Psychopharmacol.*, 9: 79–82.
- Boix F, Qiao SW, Kolpus T, Sagvolden T (1998). Chronic L-deprenyl treatment alters brain monoamine levels and reduces impulsiveness in an animal model of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Behavioural Brain Research*, 94: 153-162.
- Bouchard TJ (1994). Genes, environment and personality. *Science*, 264, 1700–1701.
- Broadhurst PL (1975). The Maudsley reactive and nonreactive strains of rats: A survey. *Behav Genet.*, 5:299-319.
- Cannon WB (1935). Stresses and strains of homeostasis. *Am J Med Sei.*
- Cardno AG, Holmans PA, Harvey I, Williams MB, Owen MJ, McGuffin P (1997). Factor-derived subsyndromes of schizophrenia and familial morbid risks. *Schizophr Res.*, 23: 231–8.
- Castanon N, Perez-Diaz F, Mormède P (1995). Genetic analysis of the relationships between behavioral and neuroendocrine traits in Roman High and Low Avoidance rat lines. *Behav Genet.*, 25: 371–84.

- Chaouloff F (1994). Failure to find behavioural differences between lean and obese Zucker rats exposed to novel environments. *Int J Obes.*, 18: 780–2.
- Chaouloff F, Castanon N, Mormède P (1994). Paradoxical differences in animal models of anxiety among the Roman rat lines. *Neurosci Lett.*, 182:217–21.
- Chaouloff F, Durand M, Mormède P (1997). Anxiety- and activity-related effects of diazepam and chlordiazepoxide in the rat light: dark and dark-light tests. *Behav Brain Res.*, 85:27–35.
- Decousa NJ, Wunderlich GR, De Cabo C, Vaccarino FJ (1998). Individual differences in sucrose intake predict behavioral reactivity in rodent models of anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 60: 841-6.
- Diana G, Domenici MR, Loizzo A, Scotti de Carolis A e Sagratella S (1994). Age and strain differences in rat place learning and hippocampal dentate gyrus frequency-potentiation. *Neuroscience Letters*, 171: 113-6.
- Diana G (2002). Does hypertension alone lead to cognitive decline in spontaneously hypertensive rats? *Behavioural Brain Research*, 134: 113-21.
- Durand M, Aguerre S, Fernandez F, edno L, Combourieu I, Mormède P e Chaouloff F (2000). Strain-dependent neurochemical and neuroendocrine effects of desipramine, but not fluoxetine or imipramine, in Spontaneously Hypertensive and Wistar–Kyoto rats. *Neuropharmacology*, 39: 2464–2477.
- Durand M, Berton O, Aguerre S, Edno L, Combourieu I, Mormède P (1999). Effects of repeated fluoxetine on anxietyrelated behaviours, central serotonergic systems, and the corticotropic axis in SHR and WKY rats. *Neuropharmacology* 38, 893–907.
- Eilam D e Golani J (1989). Home base behavior of rats (*Rattus norvegicus*) exploring a novel environment. *Behavior Brain Research*, 34: 199-211.
- Fernandez-Teruel A, Escorihuela RM, Driscoll P, Tobena A, Battig K (1994). Evaluating activity and emotional reactivity in a hexagonal tunnel maze: correlational and factorial analysis from a study with the Roman: Verh rat lines. *Behav Genet.*, 24: 419–25.

- File SE (1992). Behavioural detection of ansiolytic action. In: Elliott JM, Heal DJ e Marsdsen CA. Experimental approaches to anxiety and depression. New York: John Wiley and sons.
- Flaherty L e Bolivar V (2007). Animal resources in behavioral neurogenetics. In: Jones B e Mormède P (eds). Neurobehavioral genetics. New York: Taylor and Francis. Pp 129-47.
- Flint J, Corley R, DeFries JC, Fulker DW, Gray J, Miller S, Collins AC (1995). A simple genetic basis for a complex psychological trait in laboratory mice. *Science*, 269: 1432–5.
- Frankenhaeuser M, Dunne E, Lundberg U (1976). Sex differences in sympathetic-adrenal medullary reactions induced by different stressors. *Psychopharmacology*, 47: 1-5.
- Gray JA (1979). Emotionality in male and female rodents: a reply to Archer. *Br J Psychol.*, 70: 425–40.
- Grisel JE, Belknap JK, O'Toole LA, Helms ML, Wenger CD, Crabbe JC (1997). Quantitative trait loci affecting methamphetamine responses in BXD recombinant inbred mouse strains. *J Neurosci.*, 17: 745–54.
- Hendley ED, Atwater DG, Myers MM, Whitehorn D (1983). Dissociation of genetic hyperactivity and hypertension in SHR. *Hypertension*, 5: 211–7.
- Hinojosa FR, Spricigo L, Izidio GS, Bruske GR, Lopes DM, Ramos A (2005). Evaluation of two genetic animal models in behavioral tests of anxiety and depression. *Behavioural Brain Research*.
- Hogg S (1996). A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 54: 21-30.
- Imhof JT, Zuleide MI, Schmitt ML, Morato GS, Carobrez AP (1993). Influence of gender and age on performance of rats in the elevated plus maze apparatus. *Behavioural Brain Research*, 56: 177-80.
- Ito M, Shichijo K, Kawase Y, Shikuwa S, Hsu C, Sekine I, Niwa M, Ogaki M, Imamura R (1990). Neuro stress induced ulcer in SHRSP. *Jpn. Heart J.*, 31: 553–555.
- Izidio GS, Spricigo L, Ramos A (2005). Genetic differences in the elevated plus-maze persist after first Exposure of inbred rats to the test apparatus. *Behavioural Processes*, 68: 129–134.



- Johnston AL e File SE (1991). Sex differences in animal tests of anxiety. *Physiology and Behavior*, 49: 245-50.
- Klenerová V, Kaminsky O, Pavel S, Krejci I, Hlinak Z e hynie S (2002). Impaired passive avoidance acquisition in Sprague-Dawley and Lewis rats after restraint and cold stress. *Behavioural Brain Res.*, 136: 21-29.
- Krinke GJ (2000). *The laboratory rat*. San Diego: Academic Press.
- Lahmame A, Armario A (1996). Differential responsiveness of inbred strains of rats to antidepressants in the forced swimming test: are Wistar Kyoto rats an animal model of subsensitivity to antidepressants? *Psychopharmacology*, 123:191–8.
- Lassale J (2007). Animal resources in behavioral neurogenetics. In: Jones B e Mormède P (eds). *Neurobehavioral genetics*. New York: Taylor and Francis. 129-47.
- Lesch KP, Bengel D, Heils A, Sabol SZ, Greenberg BD, Petri S, Benjamin J, Müller CR, Hamer DH, Murphy DL (1996). Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. *Science*, 274: 1527–31.
- Mason JW, Mangan GF, Brady JV, Conrad D, Rioch D (1961). Concurrent plasma epinephrine, norepinephrine and 17-hydroxycorticosteroid levels during conditioned emotional disturbances in monkeys. *Psycho-Med.*, 23:344.
- Masur J, Schutz MT, Boerngen R (1980). Gender differences in open-field behavior as a function of age. *Development Psychobiology*, 13: 107-10.
- McEwen BS, De Kloet ER, Rostene W (1986). Adrenal steroid receptors and actions in the nervous system. *Physiol Rev.*, 66: 1121-88.
- Melo JA, Shendure J, Pociask K, Silver LM (1996). Identification of sex-specific quantitative trait loci controlling alcohol preference in C57BL:6 mice. *Nature Genet.*, 13: 147–53.
- Meneses A, Castillo C, Ibarra M e Hong E (1996). Effects of aging and hypertension on learning, memory, and activity in rats. *Physiology and Behavior*, 60: 341-5.
- Mormède P, Courvoisier H, Ramos A, Marissal-Arvy N, Ousova O, Desautels C, Duclos M, Chaouloff F, Moisan MP (2002). Molecular genetic approaches to investigate individual variations in behavioral and

- Neuroendocrine stress responses. *Psychoneuroendocrinology*, 27: 563–583.
- Paré WP (1994a). Open field, learned helplessness, defensive burying and forced swim tests in WKY rats. *Physiol. Behav.* 55:433–438.
- Paré WP (1994b). Hyponeophagia in Wistar Kyoto (WKY). rats. *Physiol. Behav.* 55:975–978.
- Paré WP (1989c). Strain, age, but not gender, influence ulcer severity induced by water-restraint stress. *Physiol. Behav.* 45:627–632.
- Paré WP (1989d). Stress ulcer susceptibility and depression in Wistar Kyoto (WKY). rats. *Physiol. Behav.* 46:993–998.
- Paré WP (1989e). Stress ulcer and open field behavior of spontaneously hypertensive, normotensive and Wistar rats. *Pavlov. J. Biol. Sci.* 24:54–57.
- Paré WP (1989f). Behavioral despair test predicts ulceration in WKY rats. *Physiol. Behav.* 46:483–487.
- Paré WP (1996g). Enhanced retrieval of unpleasant memories influenced by shock controllability, shock sequence, and rat strain. *Biol. Psychiatry* 39:808–813.
- Paré AMT, Paré WP, Kluczynski J (1999). *Physiology & Behavior*, Vol. 67, No. 2, pp. 219–225.
- Pellow S, Chopin P, File SE e Briley M (1985). Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 14: 149-67.
- Ramos A, Berton O, Mormède P, Chaouloff F (1997). A multiple-test study of anxiety-related behaviours in six inbred rat strains. *Behavioural Brain Research*, 85: 57-69.
- Ramos A, Mellerin Y, Mormède P, Chaouloff F (1998). A genetic and multifactorial analysis of anxiety-related behaviours in Lewis and SHR intercrosses. *Behavioural Brain Research*, 96: 195–205.
- Ramos A, Moisan MP, Chaouloff F, Mormède C, Mormède P (1999). Identification of female-specific QTL affecting an emotionality-related behavior in rats. *Molecular Psychiatry*, 4: 453–462.

- Ramos A, Correia EC, Izídio GS, Brüske GR (2003). Genetic Selection of Two New Rat Lines Displaying Different Levels of Anxiety-Related Behaviors. *Behavior Genetics*, 33: 6.
- Ramos A and Mormède P (1998). Stress and Emotionality: a Multidimensional and Genetic Approach. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 22, 1, 33–57.
- Ramos A, Berton O, Mormède P, Chaouloff F. (1997). A multiple test study of anxiety related behaviours in six inbred rat strains. *Behavioral Brain Research* 85, 57–69.
- Redei E, Paré WP, Aird F, Kluczynski J (1994). Strain differences in hypothalamic–pituitary–adrenal activity and stress ulcer. *Am. J. Physiol.*, 266: 353–60.
- Renner MJ e Seltzer CP (1991). Molar characteristics of exploratory and investigatory behavior in the rat (*Rattus norvegicus*). *Journal of Comparative Psychology*, 105: 326-39.
- Rodgers RJ e Cole JC (1995). The elevated plus-maze: pharmacology, methodology and ethology. In: Cooper SJ e Hendrine CA. *Ethology and psuchopharmacology*. London : Wiley.
- Sagvolden T (2001). The spontaneously hypertensive rat as a model of ADHA. In: Solanto MV, Arnsten AFT e Castellanos FX. *Stimulant drugs and ADHA: Basic and clinical neuroscience*. New York: Oxford.
- Schwartzing RK, Thiel CM, Muller CP e Huston JP (1998). Relationship between anxiety and serotonin in the ventral striatum. *Neuroreport*, 9: 1025-9.
- Selye H. A syndrome produced by diveise nocuous agents (1936). *Nature*, 138: 32.
- Selye H (1946). The General Adaptation Syndrome and the diseases of adaptation. *J Clin Endocrinol*, 6: 117-230.
- Söderpalm B (1989). The SHR exhibits less 'anxiety' but increased sensitivity to the anticonflict effect of clonidine compared to normotensive controls. *Pharmacology and Toxicology* 65, 381–386.
- Shichijo K, Ito M, Sekine I (1991). The mechanism of low susceptibility to stress in gastric lesions of spontaneously hypertensive rats. *Life Sci.*, 49: 2023–2029.

- Thiel CM, Huston JP e Schwarting RK (1998). Cholinergic activation in frontal cortex and nucleus accumbens related to basic behavioral manipulations: handling, and the role of post-handling experience. *Brain Research*, 81: 121-132.
- Treit D (1985). Animal models for the study of anti-anxiety agents: a review. *Neuroscience Biobehavioral Review*, 9: 203-22.
- Trullas R, Skolnick P (1993). Differences in fear motivated behaviors among inbred mouse strains. *Psychopharmacology*, 111: 323–31.
- Van Luytelaar ELJM e Coenen AML (1970). Na EEG averaging technique for automated sleep-wake stage identification in the rat. *Physiol Beh.*, 5: 541-42.
- Vendruscolo LF, Terenina-Rigaldie E, Raba F, Ramos A, Takahashi RN, Mormède P (2006). A QTL on rat chromosome 7 modulates prepulse inhibition, a neuro-behavioral trait of ADHD in a Lewis x SHR intercross. *Behavioral and Brain Functions*, 2:21.

## **ESTUDO III**

**ANÁLISE DE FATOR DO COMPORTAMENTO EXPLORATÓRIO  
NA ARENA E NO LABIRINTO-EM-CRUZ ELEVADO EM RATOS  
SELVAGENS (*RATTUS NORVEGICUS SP*), WISTAR E  
LINHAGENS DERIVADAS.**

## RESUMO

**Introdução:** No estudo anterior verificamos que o desempenho na arena e LCE difere tanto em relação às linhagens quanto em relação ao sexo. **Objetivo:** No presente estudo examinamos o mesmo conjunto de dados quanto às correlações entre os comportamentos da arena e LCE. **Método:** Os procedimentos e as variáveis foram os mesmos do Estudo II. Contudo, ao invés de comparar a magnitude das respostas na arena e LCE, as correlações entre as variáveis foram examinadas por análise de fator principal seguida de rotações ortogonal (varimax) e oblíqua (promax). Somente foram consideradas correlações maiores que 0,35 (valor absoluto). **Resultados:** Nas linhagens agrupando ambos os sexos, a CX correlacionou-se exclusivamente com atividade nos ratos SEL e SHR, e com ansiólise nos ratos HBR. Contudo, a CX das linhagens WIS e SHB correlacionou-se tanto com atividade quanto ansiólise. Adicionalmente, CX carregou forte e positivamente com a atividade de machos e fêmeas WIS e machos SHR, mas com sedação nas fêmeas WKY e SHR, revelando um claro dimorfismo sexual para os SHR. As linhagens WIS e SHR apresentaram padrões similares, quais sejam, a influência predominante da ansiedade nos ratos machos e da atividade nas fêmeas, corroborando os dados da literatura para ratos WIS. Contudo, nas fêmeas TA e EA correlacionaram-se positivamente com PX, mas inversamente com CX, correlações ausentes nos SHR machos. Estes dados sugerem que as fêmeas mais ativas na arena tendem a entrar um maior número de vezes nos braços abertos do LCE, aumentando TA. Entretanto, TA e PX correlacionaram-se inversamente com ansiedade nas fêmeas, sugerindo a influência inibitória da ansiedade na exploração da arena. Por sua vez, DF correlacionou-se com atividade nas linhagens SHR e HBR, mas em ansiedade na linhagem WIS, ansiólise na SEL e não carregou em fator algum nas linhagens WKY e SHB. Na análise por sexo, DF carregou em atividade para machos e fêmeas HBR e machos SHR. Notavelmente, DF só correlacionou-se com ansiedade nos machos SHB, constituindo-se na única evidência da concepção clássica de que que relaciona esta resposta com medo e ansiedade. Contrariamente, a DF correlacionou-se fortemente com ansiólise nos ratos machos e fêmeas da linhagem SEL. Estes resultados sugerem que a DF desta e outras linhagens

esteja mais relacionada à exploração (demarcação territorial) que à 'emocionalidade'. Nos ratos WIS, SEL e SHB de ambos os sexos e fêmeas SHR foi observada uma correlação inversa de PX e EF, sugerindo que os ratos mais ativos na arena sejam menos ativos nos braços fechados do LCE. Constitui-se, portanto, num traço bastante generalizado do comportamento exploratório do rato. Como a rotação ortogonal forneceu resultados similares, a correlação inversa de PX e EF destas linhagens é independente da ansiedade, sendo determinado pelas características físicas dos ambientes, quais sejam, ambientes amplos (arena) ou restritos (braço fechado), exclusivamente. Em outras palavras, ratos cuja atividade é estimulada por ambientes amplos teriam uma atividade inibida em ambientes restritos. Portanto, a PX destas linhagens parece expressar uma busca instintiva por um 'abrigo' independente do grau de ansiedade vivenciado pelo rato. Esta atividade seria desnecessária no braço fechado do LCE. Por outro lado, os fatores principais contribuíram com apenas 16,6% da variância acumulada dos ratos WKY. Estes dados sugerem a influência predominante de fatores específicos, principalmente nas fêmeas desta linhagem, que não foram detectados por nossos equipamentos. De fato, a linhagem WKY tem sido utilizada como modelo de depressão. A ansiedade também foi representada no Fator-I da linhagem SEL. Contudo, enquanto TA e EA carregaram forte e negativamente neste fator, TF correlacionou-se fortemente com sedação. Isto foi observado tanto para o conjunto dos ratos SEL quanto para os sexos separadamente. Portanto, a permanência do rato SEL no braço fechado parece estar mais associada à sedação que ansiedade. A ansiedade também foi a influência predominante no comportamento dos machos e fêmeas da linhagem HBR, reproduzindo o padrão dos ratos SEL. Portanto, por serem derivados dos ratos SEL, os HBR corroboram as observações feitas para o pequeno número de ratos SEL. Ao contrário dos ratos de derivação WIS, a ansiedade foi a influência preponderante no comportamento exploratório dos machos e fêmeas da linhagem SEL. Por outro lado, a característica mais importante dos ratos SHR foi a segregação completa das variáveis do LCE e arena nos fatores ansiedade e atividade, respectivamente. Este padrão foi virtualmente conservado nos ratos machos, mas não nas fêmeas que apresentaram um comportamento extremamente complexo, onde TF foi a única variável que carregou forte e exclusivamente em

ansiedade. Em contraste, PX correlacionou-se tanto com atividade e ansiedade, TA com atividade e ansiólise e CX com sedação. Estes resultados reinteram a necessidade de desenvolvimento de linhagens selvagens para o estudo dos comportamentos de defesa.

**Palavras-chaves: Análise de fator, Exploração, Rato Wistar, Linhagens derivadas, Arena, Labirinto-em-cruz elevado.**



## INTRODUÇÃO

A influência dos fatores genéticos nas respostas a estímulos estressores, que podem variar em natureza e intensidade, foram demonstradas em diversas espécies animais, incluindo os seres humanos (Ramos *et al.*, 1997, 1998). Contudo, tal componente genético Parece ser responsável apenas por parte da grande variação interindividual comumente observada para este tipo de comportamento (Ramos *et al.*, 1997, Cardno *et al.*, 1997, Castanon *et al.*, 1995). Além do mais, a utilização de grupos intraespecíficos de animais, os quais podem ou não diferir no histórico genético, são cada vez mais propostos como ferramentas úteis na investigação das bases neurobiológicas das desordens psicológicas (Ramos *et al.*, 1997, Flint *et al.*, 1995, Trullas e Skolnick *et al.*, 1993).

Neste sentido, segundo Ramos e colaboradores (1997), uma das principais estratégias que se desenvolveu nas últimas décadas foi a utilização de programas bidirecionais de cruzamento de linhagens selecionadas, as quais divergem em suas respostas comportamentais frente uma série de situações estressoras. No caso do rato, alguns dos modelos genéticos estabelecidos incluem os ratos das linhagens as seguintes: Maudsley, Romana, Wistar-Kyoto e derivados e Tsukuba (Ramos *et al.*, 1997). Uma estratégia alternativa, no entanto, é justamente procurar diferenças entre as linhagens não selecionadas de acordo com um critério de reatividade emocional. Em cada um dos casos citados, o inter-cruzamento de linhagens que se diferenciam muito numa dada resposta, seguido pelo estudo da segregação entre as gerações provou ser um meio eficiente na investigação dos possíveis elos entre os parâmetros

fisiológicos e comportamentais de uma resposta relacionada ao estresse (Chaouloff *et al.*, 1994). Além do mais, cada vez mais consolida-se a associação desta concepção com protocolos envolvendo a genética molecular na procura de genes envolvidos na variação da reatividade emocional (Mormède *et al.*, 2002, Ramos *et al.*, 1999).

Um número cada vez maior de estudos exalta a importância das diferenças entre as linhagens no que se refere aos testes de ansiedade, por exemplo, no labirinto em cruz-elevado (LCE) (Chaouloff *et al.*, 1997, Gray, 1979, Grisel *et al.*, 1997, Melo *et al.*, 1996). O reconhecimento de linhagens específicas de animais que apresentam grande contraste na sua forma de responder a estímulos ansiogênicos pode nos auxiliar no estabelecimento de novos conceitos entre os parâmetros comportamental, fisiológico e neuroquímico envolvidos nas respostas ansiosas. Mais ainda, tal enfoque metodológico pode isolar linhagens com elevados índices de respostas ao estresse, e outras com baixo nível para o mesmo caso, tal como realizado por Ramos *et al.* (1997), com relação aos ratos Lewis e SHR, respectivamente.

O teste da arena (open-field) também é fundamental neste processo de constatação de diferentes comportamentos entre diferentes linhagens. Por exemplo, no que se refere à peritaxia e centrotaxia nos ratos WKY e SHR, Durand e colaboradores (1999) demonstraram que estes comportamentos carregaram para uma única dimensão. Mais ainda, o número de entradas nos braços fechados do LCE, maior na linhagem WKY do que na SHR, carregaram para o mesmo fator, indicando que, para esta última linhagem, deva correlacionar-se com a atividade locomotora. Ao contrário, a centrotaxia dos ratos WKY carregou em uma dimensão adicional de emotividade. Além do

mais, a centrotaxia nos ratos WKY refletiu um conflito comportamental do tipo 'aproximar/afastar', o que é reduzido com administração aguda de diazepam. Tal observação sugere que este comportamento é ligado à ansiedade. Contudo, devido a centrotaxia ser independente dos comportamentos relacionados aos braços abertos (e tempo nos braços fechados) no LCE, há indicação de que a exposição dos ratos WKY no LCE e na arena permite o reconhecimento de uma dimensão locomotora comum, e duas dimensões relacionadas à emotividade, as quais podem representar dois estados distintos de ansiedade (Durand *et al.*, 2000).

Nestes modelos que investigam a influência dos genes sobre os comportamentos emocionais em diferentes linhagens, a utilização do cruzamento endogâmico (inbreeding) apresenta uma grande vantagem na dissociação entre os componentes genéticos e ambientais, a partir do momento no qual os indivíduos da mesma linhagem são, teoricamente, idênticos do ponto de vista genotípico. Tal característica só vem favorecer a busca pela associação entre os genes e o fenótipo em estudos que envolvem a genética molecular (Jones e Mormède, 2007).

Todos estes resultados explicitados acima reforçam a concepção na qual o estresse é uma resposta emocional múltipla, ou seja, que não contém uma única dimensão (Blanchard *et al.*, 1995, Lahmame e Armário, 1996). Tal fato decorre da observação de que diferentes testes podem mensurar diferentes formas de ansiedade (Flint *et al.*, 1995, Ramos *et al.*, 1998, Lesch *et al.*, 1996). A confrontação de diferentes modelos realizados pela análise multifatorial geralmente falha na confirmação de um único fator que represente integralmente a ansiedade (Flint *et al.*, 1995, Ramos *et al.*, 1998).

Ramos e colaboradores (1997), utilizando o teste da arena, demonstraram que os ratos dos grupos SHR e BN (Brown Norway), apresentam elevados índices de atividade e porcentagem relativamente baixa de esquiva à região central no teste da arena. Os ratos WKY, ao contrário, apresentam baixos índices de atividade e porcentagem alta de esquiva à região central da arena. Os ratos LEW (Lewis), por sua vez, apresentaram níveis de médio para alto no que se refere à atividade, e alta porcentagem de esquiva ao centro da arena. Por fim, os ratos BN e SHR apresentaram os valores mais e menos elevados para a defecação na arena, respectivamente. Diferenças significativas relacionadas ao sexo também foram demonstradas no número total de locomoção e peritaxia nas linhagens SHR, WKY, BN e LEW (Ramos *et al.*, 1997).

Utilizando o LCE no mesmo estudo, Ramos *et al.* (1997), verificaram que as linhagens SHR e LEW demonstraram os mais elevados e menos elevados níveis de exploração nos braços abertos, respectivamente, não diferindo, contudo, no número total de entradas, ou número de entradas nos braços fechados. Nas fêmeas, ao contrário, efeitos significativos da linhagem foram observados apenas para o comportamento de avaliação de risco na plataforma central e para os braços abertos do LCE. Da mesma forma, diferenças significativas entre os sexos foram encontradas para o número de entradas nos braços fechados e número total de entradas em ambos os braços nas linhagens SHR e LEW. Resultado semelhante foi observado nas fêmeas WKY e LEW que permanecem mais tempo explorando os braços abertos, assim como entram um maior número de vezes nestes (Ramos *et al.*, 1997).

Através de um programa de intercruzamentos entre as linhagens SHR e LEW, Ramos e colaboradores (1998) demonstraram a existência de diferenças entre ambas, fato comprovado pela relação dos fatores I e II evidenciados ao longo do estudo. Neste trabalho, apenas para citar alguns resultados, o grupo SHR, de ambos os sexos, permaneceram mais tempo nos braços abertos e menos tempo nos braços fechados do LCE, quando comparados à linhagem LEW. A porcentagem de entradas nos braços abertos, também revelou-se maior no grupo SHR. Não foram observadas diferenças importantes entre as linhagens no número total de entradas nos braços e nem nos braços fechados do LCE. No teste da arena, por sua vez, tanto os machos quanto as fêmeas da linhagem SHR apresentaram elevados índices de centrotaxia na área central, o que não ocorreu com os ratos LEW. Por fim, tanto a defecação quanto a peritaxia não apresentaram diferenças significativas em ambas linhagens (Ramos *et al.*, 1998).

Podemos considerar que, com o auxílio da análise de fatores, confirma-se cada vez mais, a idéia de que o conceito de uma única dimensão para a emocionalidade é errôneo. Por exemplo, enquanto em alguns estudos (Fernandez-Teruel *et al.*, 1994), a locomoção em ambientes novos carregou no mesmo eixo da defecação, o que combina com resultados da literatura clássica (Gray, 1979), medidas de ansiedade no LCE e locomoção na arena apresentaram duas formas independentes de fatores (Flint *et al.*, 1995, Trullas e Skolnick, 1993).

Segundo Ramos *et al.* (1997), o fato de 19 medidas comportamentais utilizadas em diferentes modelos animais, em diferentes linhagens, não refletir uma única dimensão fenotípica é comprovado pela

presença de três eixos ortogonais resultantes da análise multifatorial. Devido ao fato de diversas destas variáveis estarem associadas com respostas emocionais, o resultado falhou em apresentar apenas um fator principal.

Podemos concordar que um único par de linhagens não é o suficiente para representar todos os aspectos dos traços relacionados à ansiedade (Ramos *et al.*, 1998). Neste sentido, apesar da importância deste tipo de abordagem metodológica, a investigação de novos modelos utilizando novas linhagens pode acrescentar informações importantes no atual estado do entendimento sobre a complexa ação dos fenótipos sobre as mais diversas respostas comportamentais. Desta maneira, o presente estudo investigou a diferença nas respostas comportamentais a situações estressoras na arena e no LCE, em 6 linhagens, quais sejam, WIS, SHR, WKY, SEL, HBR e SHB.

## **MÉTODOS**

Utilizou-se os mesmos dados do Estudo I. Contudo, ao invés da magnitude das respostas, o presente estudo utilizou a análise de fator para examinar as correlações entre os comportamentos da arena e LCE. Como esta análise é mais adequada para amostras grandes, ela foi conduzida tanto para a população total, quanto para as amostras menores das linhagens individuais. Para isto, os dados foram inicialmente submetidos à análise de componente principal. Em seguida, os dados foram submetidos à análise de fator, fixando-se o número de fatores segundo o número de componentes principais com autovalores (*eigenvalues*) maiores que 1 (método mineigen) e mediante 'gráficos de sopé' (*scree plots*). Os fatores principais foram submetidos à rotação ortogonal (método varimax) para a determinação das contribuições

independentes de cada fator à variância. Por fim, os fatores ortogonais foram submetidos à rotação oblíqua (método promax). Os fatores foram interpretados com base na estrutura de fator da rotação ortogonal e/ou estrutura de referência da rotação oblíqua. Somente fatores com coeficientes maiores que 0,35 (valor absoluto) foram apresentados nos gráficos e tabelas. Os gráficos representam a estrutura de referência da rotação oblíqua. Todos os procedimentos estatísticos (análises de variância e fator) foram realizados com o programa SAS (Statistical Analysis Systems, Cary, EUA).

## RESULTADOS

### *Influência da Linhagem*

Os fatores principais da população total de ratos contribuíram com uma parcela reduzida da variância do comportamento exploratório (34%), indicando a influência significativa de fatores específicos não detectáveis pelos equipamentos (Tab.1).

Tabela 1. Fatores principais da exploração do Labirinto-Em-Cruz Elevado e da Arena da população total de ratos (Total,  $n=353$ ) e das subpopulações de derivação Wistar (W=WIS+WKY+SHR,  $n=125$ ) e selvagem (S=SEL+HBR+SHB,  $n=228$ ). As cargas são as correlações parciais das variáveis com fatores ortogonais obtidos por rotação varimax. Coeficientes entre -0,35 e 0,35 foram excluídos. Res – variância residual devida aos fatores específicos.

	Total			W			S		
	I	II	Res	I	II	Res	I	II	Res
EA	-0,41	-0,51		-0,35			-0,73		
TA	-0,72			-0,88			-0,70		
EF		-0,60							
TF	0,67			0,85			0,40		
DF					0,63			0,38	
PX		0,66			0,77			0,39	
CX					0,74		-0,48		
Variância (%)	17,2	16,8		24,2	23,6		20,6	5,6	
Var.Acum. (%)	17,2	34,0	66,0	24,2	47,8	52,2	20,6	26,1	73,8

Não obstante, a exploração dos braços abertos (EA e TA) correlacionou-se de forma negativa com o Fator-I, caracterizando-o como 'ansiedade' (Fig.1, Tab.1). O Fator-II correlacionou-se forte e positivamente com PX, mas negativamente com EA e EF, representando a atividade motora independente da ansiedade. Como veremos, a correlação inversa de PX e EF com a atividade (Fator-II) foi observada em vários grupos, em especial, na população total de machos e fêmeas, na subpopulação W de fêmeas, nos ratos machos das linhagens SEL e SHB e fêmeas SEL e WIS (Tabs.5-6,9).

Os fatores principais da subpopulação W (WIS+SHR+WKY), foram responsáveis por 47,8% da variância (Tab.1). Contudo, enquanto o Fator-I carregou de forma similar ao observado na população total, o Fator-II carregou exclusivamente nas variáveis da arena (PX, CX, DF), representando a atividade exploratória neste equipamento (Tab.1, Fig.1).

Os fatores principais da subpopulação S (SEL+SHR+SHB) contribuíram com apenas 26,1% da variância (Tab.1), sugerindo uma influência mais acentuada de fatores específicos no comportamento exploratório desta subpopulação. Esta influência foi basicamente devida às linhagens HBR e SHB, e não à linhagem SEL, na qual os fatores principais contribuíram com uma parcela bastante expressiva da variância (60%) (Tab.3). O Fator-I da subpopulação S também expressou a ansiedade. Entretanto, a CX correlacionou-se negativamente com a ansiedade, sugerindo a aversão mais pronunciada dos ratos de derivação selvagem aos espaços abertos (Fig.1, Tab.1).



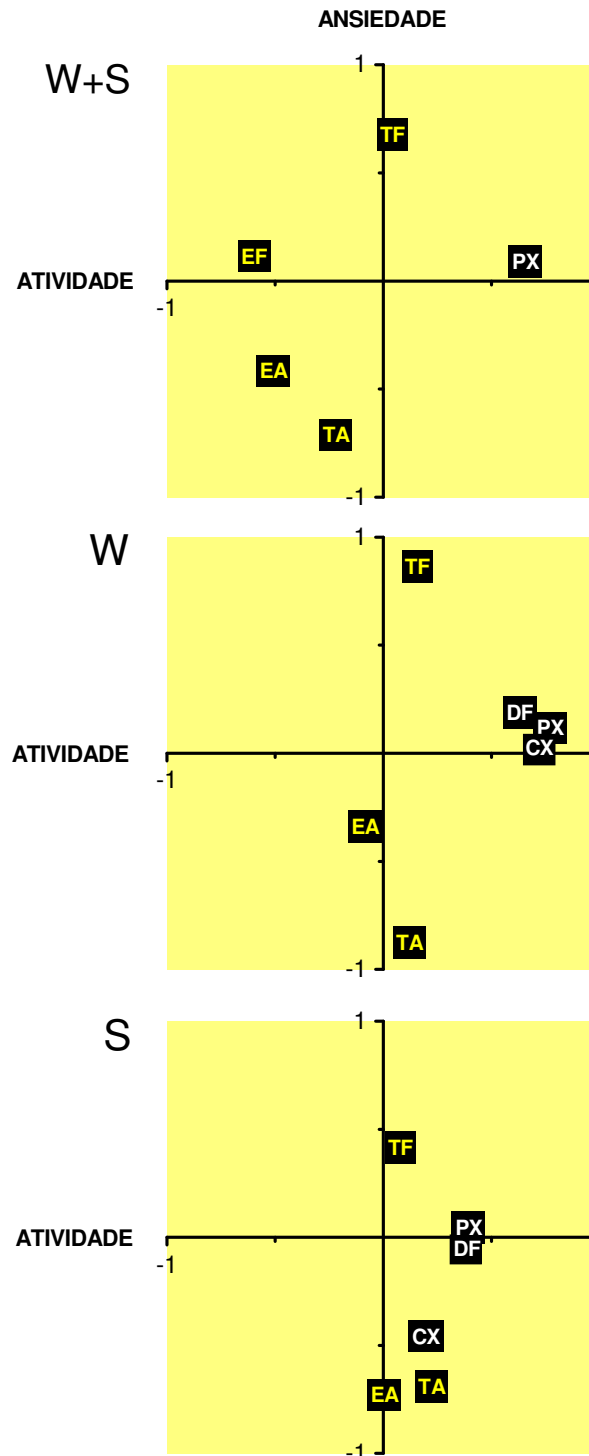


Figura 1. Fatores principais (ansiedade e atividade) da exploração da arena e do labirinto-em-cruz elevado para a população total de ratos (W+S,  $n= 353$ ) e subpopulações derivadas dos ratos Wistar (W,  $n= 125$ ) e selvagem (S,  $n= 228$ ). TA – tempo no braço aberto, EA – entradas no braço aberto, TF – tempo no braço fechado, EF – entradas no braço fechado, PX – peritaxia, CX – centrotaxia, DF – defecação. Correlações entre 0,35 e -0,35 para ambos os fatores não foram representadas. Os coeficientes são as correlações das variáveis com fatores ortogonais obtidos por rotação varimax.

Os fatores principais das linhagens WIS, SHR e WKY contribuíram com 39,8, 52,2 e 16,5% da variância, respectivamente (Tab.2). Embora ansiedade e atividade tenham sido representadas pelos respectivos Fatores I e II destas linhagens, as variáveis carregaram de forma bastante distinta, principalmente, para a linhagem WKY (Fig.2, Tab.2). Por exemplo, a correlação negativa da CX com ansiedade, característica da subpopulação S, só foi observada para a linhagem WIS (Fig.2, Tab.2). Por sua vez, a DF correlacionou-se positivamente com o Fator-I da linhagem WIS, sugerindo sua associação com níveis maiores de ansiedade. Por fim, EF correlacionou-se negativamente e TF, positivamente, com a atividade (Fator-II). Estes dados sugerem que os ratos WIS mais ativos na arena sejam menos ativos nos braços fechados, aumentando o tempo de permanência nos mesmos.

Tabela 2. Fatores dos comportamentos do Labirinto-Em-Cruz Elevado e da Arena das linhagens Wistar (WIS,  $n= 35$ ), Wistar Kyoto (WKY,  $n= 42$ ) e ratos espontaneamente hipertensos (SHR,  $n= 48$ ). Detalhes como na Tabela 1.

	WIS			SHR			WKY		
	I	II	Res	I	II	Res	I	II	Res
EA	-0,81							0,54	
TA	-0,80			-0,95			-0,52		
EF		-0,57		0,82					
TF		0,48		0,89			0,36		
DF	0,45				0,66				
PX		0,49			0,51			0,36	
CX	-0,43	0,40			0,65				
Variância (%)	25,4	14,4		33,9	18,3		8,6	7,9	
Var.Acum. (%)	25,4	39,8	60,2	33,9	52,2	47,8	8,6	16,5	83,5

As linhagens SHR e WKY apresentaram padrões distintos da linhagem WIS. Com relação à linhagem SHR, destacam-se tanto a contribuição considerável dos fatores principais para a variância do comportamento exploratório (52,2%) quanto a segregação praticamente completa das variáveis

do LCE e da arena (Fig.2, Tab.2). Assim, TA, EA e TF carregaram no Fator-I e PX, CX e DF no Fator-II, exclusivamente.

Notadamente, os fatores principais da linhagem WKY contribuíram com apenas 16,5% da variância, sugerindo influências outras que não a ansiedade e atividade na determinação do comportamento exploratório destes ratos (Tab.2). Contudo, embora as variáveis do LCE também tenham carregado no Fator-I da linhagem WKY, justificando sua relação com ansiedade, a EA carregou no Fator-II e correlacionou-se positivamente com PX, diferindo tanto dos ratos WIS quanto dos SHR. Portanto, na linhagem WKY a EA parece ser determinada pela atividade.

Tabela 3. Fatores dos comportamentos do Labirinto-Em-Cruz Elevado e da Arena das linhagem SEL ( $n= 23$ ), HBR ( $n= 183$ ) e SHB ( $n= 22$ ). Demais detalhes como na Tabela 1.

	SEL			HBR			SHB		
	I	II	Res	I	II	Res	I	II	Res
EA	-0,93			-0,67			-0,63	-0,39	
TA	-0,95			-0,59			-0,84		
EF	0,43			-0,36				-0,50	
TF		-0,61		0,32					
DF	-0,70				0,41				
PX		0,79			0,36			0,65	
CX		0,79					-0,38	0,63	
Variância (%)	35,6	24,4		18,3	5,8		20,8	17,5	
Var.Acum. (%)	35,6	60,0	40,0	18,3	24,1	75,9	20,8	38,3	61,7

Os fatores principais das linhagens SEL, HBR e SHB também contribuíram com parcelas distintas da variância do comportamento exploratório (Tab.3). Em especial, eles foram responsáveis por 60% da variância da linhagem SEL. Este valor só foi inferior às contribuições excepcionais dos fatores principais à variância dos ratos machos SEL (75,3%) e SHB (74,1%) e fêmeas SEL (61,8%) (Tab.6).

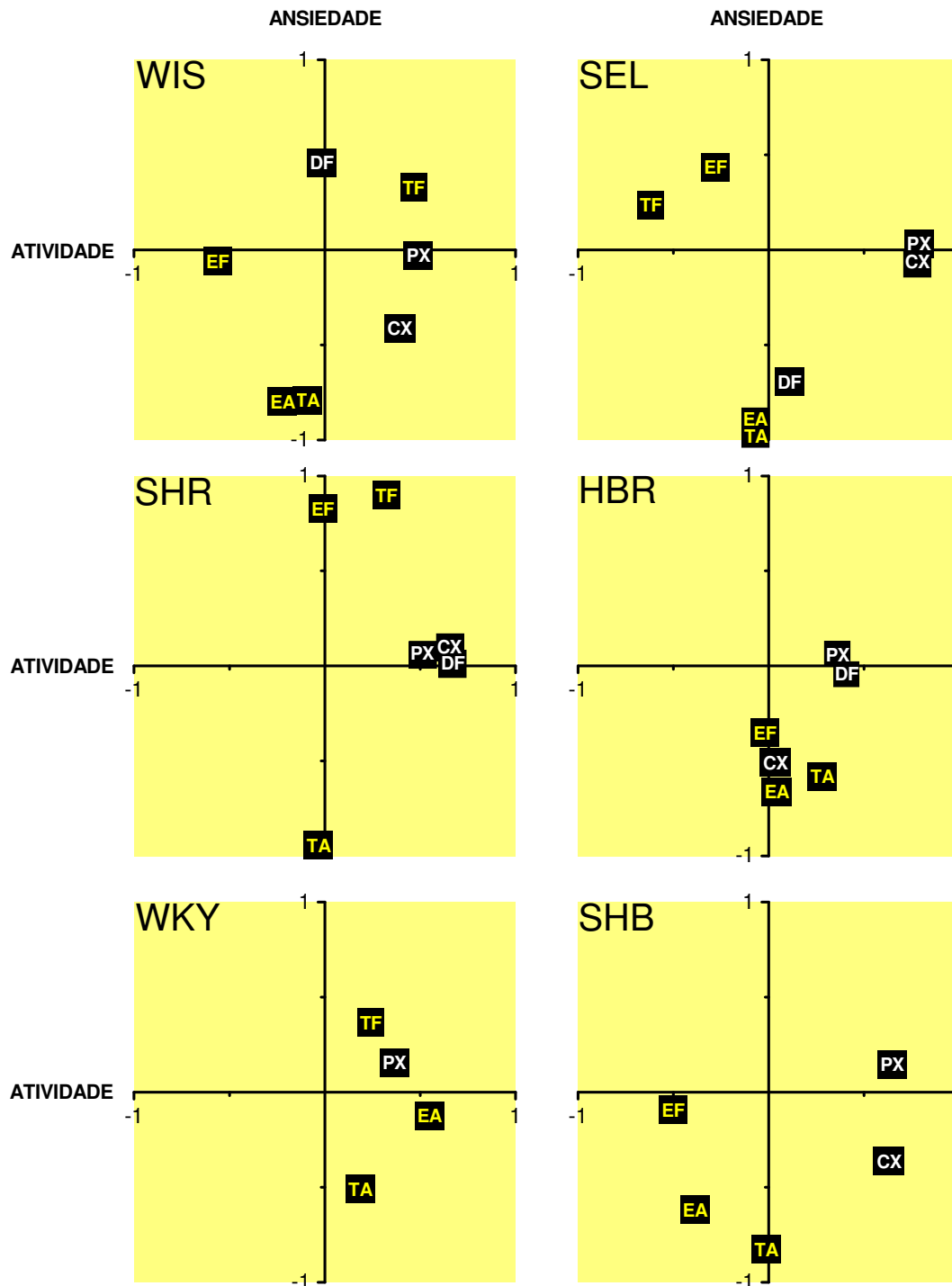


Figura 2. Fatores principais (ansiedade e atividade) da exploração da arena e do labirinto-em-cruz elevado para ratos das linhagens WIS ( $n=35$ ), SHR ( $n=48$ ), WKY ( $n=42$ ), SEL ( $n=23$ ), HBR ( $n=183$ ) e SHB ( $n=22$ ). Demais detalhes como na Fig. 1.

Em contraste, os fatores principais das linhagens HBR e SHB foram responsáveis por apenas 24,1 e 38,3% da variância, respectivamente. As variáveis da arena e LCE da linhagem SEL também apresentaram uma acentuada segregação. Assim, EA e TA carregaram em ansiedade, e PX e CX em atividade, exclusivamente. Curiosamente, embora a DF também tenha se correlacionado com a ansiedade, o fez de forma negativa, um padrão oposto ao observado para a linhagem WIS. Conforme já mencionamos, o Fator-II (atividade) correlacionou-se positivamente com PX e CX, mas negativamente com TF, sugerindo que os ratos SEL mais ativos na arena exploram o braço fechado com menos intensidade.

Na linhagem HBR, as variáveis do LCE (EA, TA, EF e TF) carregaram no Fator-I e PX e DF no Fator-II, exclusivamente. No Fator-I, TF carregou positivamente (ansiedade) e TA, EA e CX negativamente (ansiólise), tal como observamos para a maioria das linhagens (Fig.2, Tab.3). O Fator-I da linhagem SHB também representou a ansiedade, correlacionando-se negativamente com EA, TA e CX. O Fator II correlacionou-se positivamente para PX e CX, mas negativamente para EA e EF (Fig.2, Tab.3). Portanto, o Fator-II pode ser interpretado como um contraste entre as variáveis da arena e LCE.

#### *Influência do Sexo*

Os fatores principais contribuíram com parcelas similares da variância do comportamento exploratório dos ratos machos e fêmeas da população total (W+S), quais sejam, 40,3 e 31,6%, respectivamente (Tab.4). Contudo, a dimensão ansiedade das fêmeas foi representada pelo Fator-II,

contribuindo com uma parcela da variância ligeiramente inferior (13,8%) àquela da atividade (17,8%) (Tab.4). Exceto pelo papel preponderante da atividade no comportamento exploratório das fêmeas, as variáveis carregaram de forma praticamente idêntica nos fatores representativos da ansiedade e atividades de machos e fêmeas.

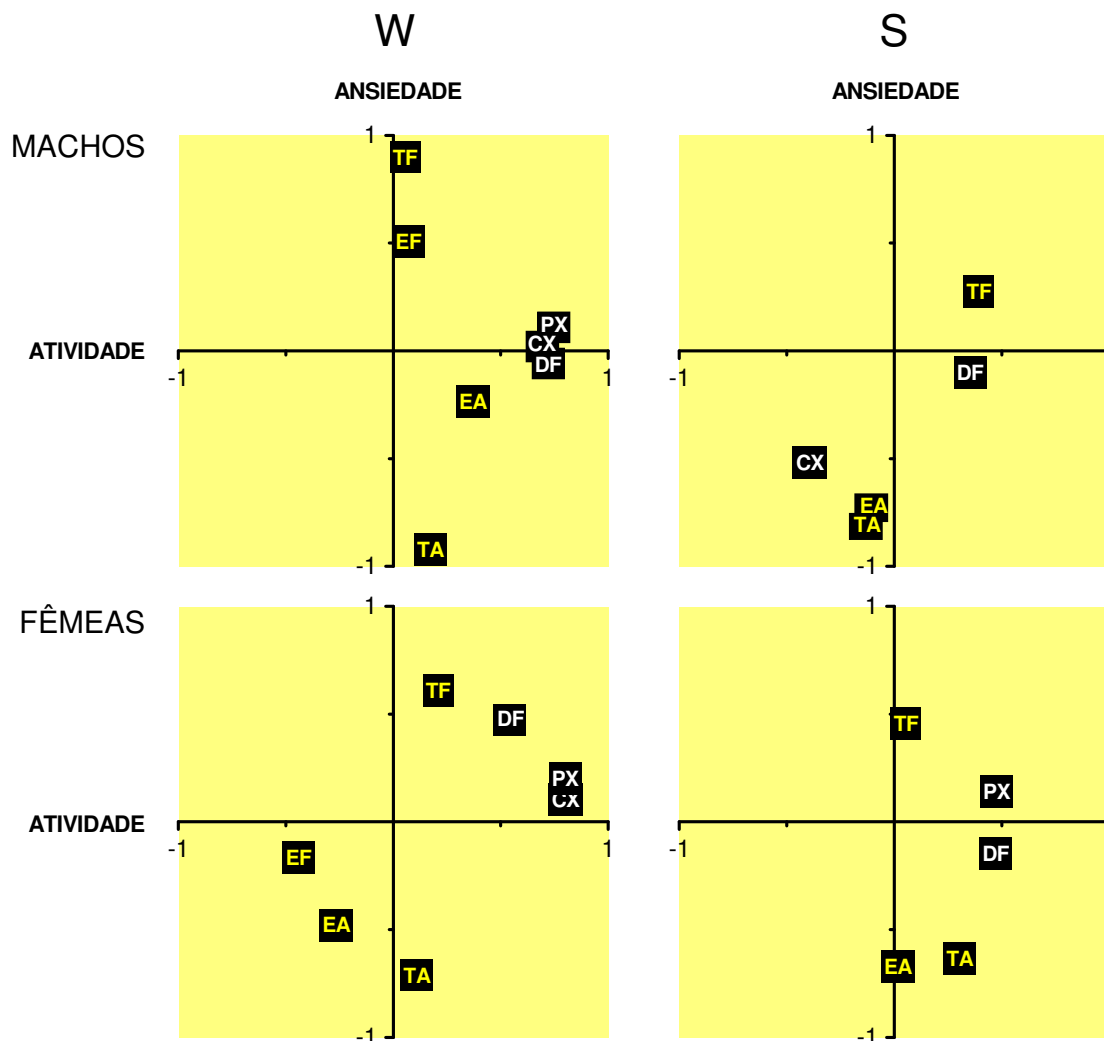


Figura 3. Fatores principais (ansiedade e atividade) da exploração da arena e do labirinto-em-cruz elevado para ratos machos e fêmeas das populações W ( $\sigma$ ,  $n=74$ ;  $\sigma$ ,  $n=51$ ) e S ( $\sigma$ ,  $n=103$ ;  $\sigma$ ,  $n=125$ ). Demais detalhes como na Figura 1.

A subdivisão da população total nas subpopulações W e S resultou numa alteração dramática, porém, esclarecedora, dos padrões do comportamento exploratório de machos e fêmeas (Fig.3, Tab.4). Estas

alterações foram primordialmente devidas ao comportamento exploratório da subpopulação S, na qual ansiedade e atividade foram respectivamente representadas pelos fatores I e II em ambos os sexos (Fig.3, Tab.4).

As variáveis do LCE da subpopulação W carregaram no Fator-I dos ratos machos e Fator-II das fêmeas, reproduzindo o padrão observado na população total (Fig.3, Tab.4). TA e TF correlacionaram-se forte, porém inversamente, com o fator ansiedade de ratos machos (Fator-I) e fêmeas (Fator-II). A correlação positiva das variáveis da arena (PX, CX e DF) com EA dos ratos machos (Fator-II) e negativa com EF das fêmeas (Fator-I), foram as diferenças mais marcantes entre os sexos na subpopulação W (Tab.4, Fig.3). Adicionalmente, a EF correlacionou-se única e positivamente com a ansiedade nos ratos machos, porém única e negativamente com a atividade nas fêmeas. Por fim, DF correlacionou-se positivamente e EA, negativamente, com o fator ansiedade das fêmeas W.

Na subpopulação S, o Fator-I expressou a ansiedade tanto em machos quanto em fêmeas (Fig.3, Tab.4). Contudo, não foi observada correlação significativa de TF com o Fator-I (ansiedade) dos ratos machos. Tampouco foi observada a correlação negativa de CX com a ansiedade nas fêmeas. Diferenças ainda mais importantes foram observadas no Fator-II. De fato, enquanto este fator expressou a atividade das fêmeas na arena, carregando forte e exclusivamente em PX e DF, a PX não carregou no Fator-II dos ratos machos, descaracterizando-o como uma expressão da atividade. Contudo, o Fator-II dos machos SEL carregou positivamente em TF e DF, mas negativamente em CX. Portanto, o Fator-II deste grupo também representa a

ansiedade, porém, sob outro ângulo, contrastando TF com as variáveis da arena DF e CX. Considerando-se os 2 fatores principais como expressões da

Tabela 4. Influência do sexo nos comportamentos do Labirinto-Em-Cruz Elevado e da Arena da população total de ratos (♂,  $n= 177$ ; ♀,  $n= 176$ ) e subpopulações W (♂,  $n= 74$ ; ♀,  $n= 51$ ) e S (♂,  $n= 103$ ; ♀,  $n= 125$ ). Note-se que na população total e subpopulação W, a ansiedade está representada pelo Fator-I nos machos e Fator-II nas fêmeas e vice-versa para a atividade. Demais detalhes como na Tabela 1.

		♂			♀		
		I	II	Res.	I	II	Res.
Total (W+S)	EA	-0,42	-0,60		-0,40	-0,49	
	TA	-0,83				-0,66	
	EF		-0,60		-0,64		
	TF	0,77				0,43	
	DF						
	PX		0,52		0,71		
	CX						
		Variância (%)	23,0	17,3		17,8	13,8
	Var.Acum. (%)	23,0	40,3	59,7	17,8	31,6	68,4
W	EA		0,37			-0,48	
	TA	-0,93				-0,72	
	EF	0,50			-0,44		
	TF	0,90				0,61	
	DF		0,71		0,54	0,47	
	PX		0,73		0,80		
	CX		0,70		0,80		
		Variância (%)	0,28	24,3		26,8	20,4
	Var.Acum. (%)	0,28	52,9	47,1	26,8	47,2	52,8
S	EA	-0,77			-0,68		
	TA	-0,78			-0,63		
	EF						
	TF		0,39		0,45		
	DF		0,35			0,47	
	PX					0,48	
	CX	-0,52	-0,40				
		Variância (%)	22,4	7,1		17,8	9,0
	Var.Acum. (%)	22,4	29,6	70,4	17,8	26,8	73,2

ansiedade, esta foi responsável por 29,6% da variância dos machos da subpopulação S. A ausência da correlação de PX com o Fator-II também foi



observada nos ratos machos da linhagem HBR (Tab.6). Aparentemente, a amostra numerosa destes ratos ( $n=89$ ) pode ter sido responsável pelo predomínio do padrão deste grupo nos ratos machos da subpopulação S.

O sexo também teve uma influência manifesta no comportamento exploratório das linhagens individuais. Esta influência foi particularmente clara na linhagem WIS (Fig.4, Tab.5). Assim, enquanto a ansiedade e a atividade foram responsáveis por 28,1 e 15,5% da variância do comportamento dos ratos machos, a contribuição destes fatores foi praticamente igual nas fêmeas, qual seja, 29 e 28,5%, respectivamente.

Conforme já mencionamos, a linhagem WKY foi a mais anômala dentre todos os grupos estudados. Não obstante, nos ratos machos WKY, EA e TA correlacionaram-se negativamente com o Fator-I, e PX, positivamente com o Fator-II, tal como observamos para as demais linhagens (Tab.5). Em contraste, TA e EA não carregaram no Fator-II (ansiedade) das fêmeas WKY (Tab.5). Por outro lado, enquanto PX correlacionou-se forte e positivamente com o Fator-I, sugerindo sua relação com a atividade, CX e TA correlacionaram-se negativamente com este fator.

Notavelmente, os fatores principais dos ratos SEL foram responsáveis por 75,3% (machos) e 61,8% (fêmeas) da variância do comportamento exploratório (Fig.4, Tab.6). Contudo, diferentemente da linhagem WIS, a ansiedade foi representada pelo Fator-I tanto nos ratos machos quanto em fêmeas, contribuindo com 47,8 e 39,1% da variância, respectivamente. Conseqüentemente, o Fator-II representou a atividade em ambos os sexos, contribuindo com 27,5 e 22,7% da variância, respectivamente.

Este padrão foi obtido a despeito do número bastante inferior de ratos machos (machos,  $n=7$ ; fêmeas,  $n=16$ ).

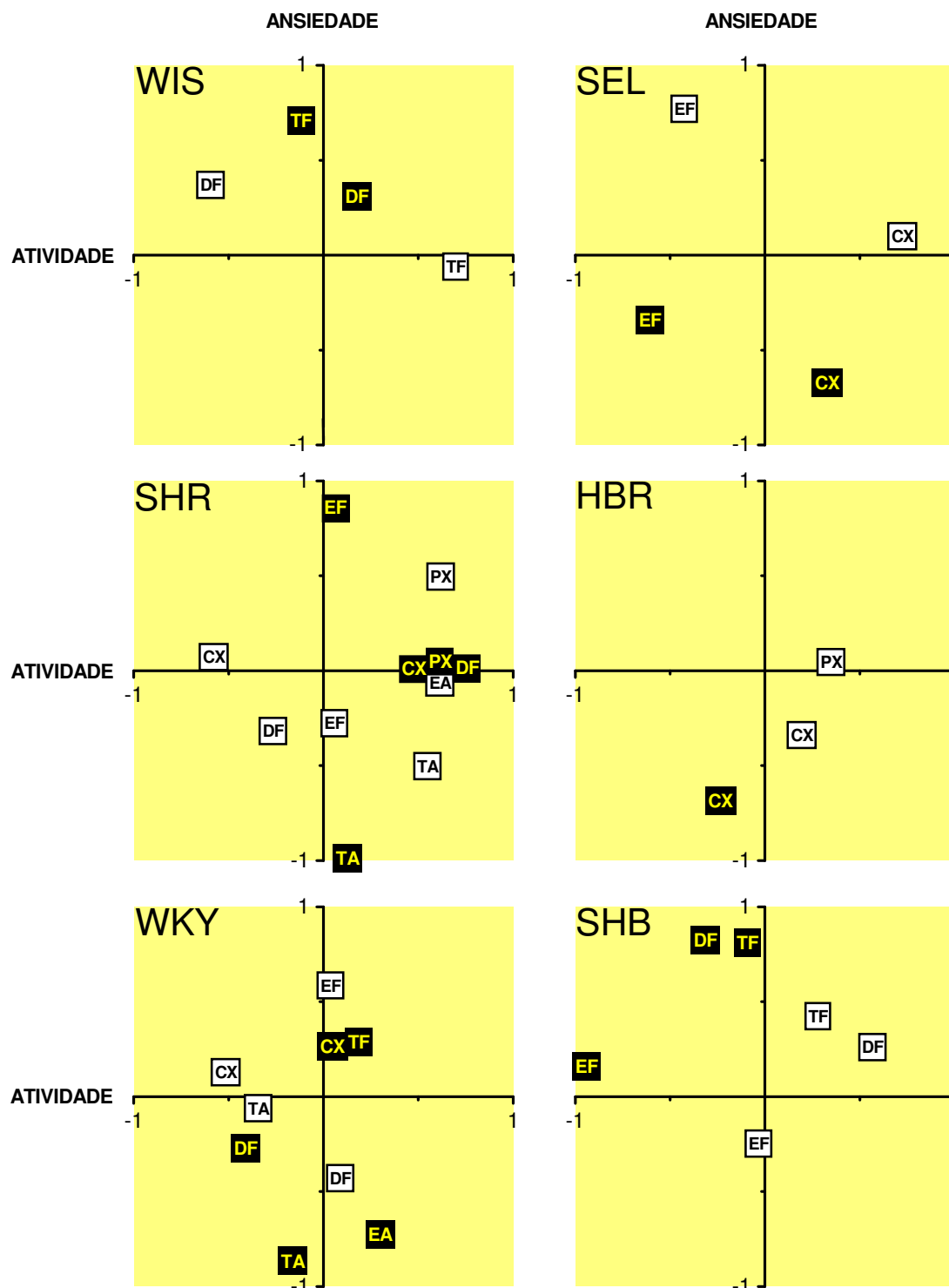


Figura 4. Principais diferenças entre ratos machos e fêmeas na exploração da arena e do labirinto-em-cruz elevado. Machos: símbolos pretos, Fêmeas: símbolos brancos. Coeficientes similares para ambos os sexos não foram representados. Demais detalhes como na Figura 2.

Tabela 5. Influência do sexo nos comportamentos do Labirinto-Em-Cruz Elevado e da Arena dos ratos WIS (♂,  $n=20$ ; ♀,  $n=15$ ), SHR (♂,  $n=33$ ; ♀,  $n=15$ ) e WKY (♂,  $n=21$ ; ♀,  $n=21$ ). Demais detalhes como na Tabela 1.

		♂			♀		
		I	II	Res.	I	II	Res.
WIS	EA	-0,76				-0,91	
	TA	-0,60				-0,94	
	EF	-0,56			-0,57		
	TF	0,76			0,70		
	DF				-0,60	0,40	
	PX		0,63		0,75		
	CX		0,57		0,53		
		Variância (%)	28,1	15,5		29,0	28,5
	Var.Acum. (%)	28,1	43,6	56,4	29,0	57,5	42,6
SHR	EA				0,58		
	TA	-0,98			0,58	-0,52	
	EF	0,87					
	TF	0,95				0,83	
	DF		0,70				
	PX		0,62		0,61	0,47	
	CX		0,53		-0,58		
		Variância (%)	38,2	18,3		20,8	19,6
	Var.Acum. (%)	38,2	56,5	43,5	20,8	40,3	59,7
WKY	EA	-0,78	0,37				
	TA	-0,88			-0,34		
	EF					0,59	
	TF						
	DF		-0,39			-0,43	
	PX		0,56		0,67		
	CX				-0,52		
		Variância (%)	22,6	9,8		13,1	8,6
	Var.Acum. (%)	22,6	32,4	67,6	13,1	21,7	78,3

Diferentemente da linhagem WIS, a CX dos ratos machos e a DF de machos e fêmeas da linhagem SEL correlacionaram-se negativamente com o Fator-I (ansiedade) ou, vice-versa, positivamente com ansiólise. Tal como observamos em outros grupos, a PX dos machos SEL correlacionou-se positivamente com CX mas inversamente com a exploração no braço fechado (EF e TF).

Ainda que em menor grau, a ansiedade também foi a influência predominante (Fator-I) no comportamento exploratório dos ratos HBR machos e fêmeas, contribuindo com 23,8 e 14,4% da variância, respectivamente. Contudo, enquanto o Fator-II dos ratos machos representou a contribuição isolada da defecação, a qual foi responsável por 5,8% da variância, o Fator-II das fêmeas carregou fortemente em PX e DF, constituindo uma representação inequívoca da atividade. No entanto, o último fator contribuiu com apenas 9,9% da variância do comportamento das fêmeas HBR.

Por outro lado, embora TA e EA tenham carregado de forma similar no Fator-I (ansiedade) dos ratos machos e fêmeas da linhagem HBR (Tab.6), TF só carregou no Fator-I dos HBR machos e a CX correlacionou-se negativamente com o Fator-I de ambos os sexos, indicando a relação desta variável com níveis menores de ansiedade.

O retrocruzamento (*backcross*) dos ratos HBR com os SEL, causou uma redução significativa da influência de fatores específicos no comportamento exploratório. De fato, a contribuição dos fatores principais à variância do comportamento exploratório dos machos SHB (74,2%) foi 2,5 vezes maior do que aquela dos ratos HBR do mesmo sexo (29,6%), equiparando-se ao valor observado para os ratos machos SEL (75,3%). Contudo, este efeito somente foi observado para os machos SHB. De forma similar ao observado para os ratos SEL e HBR, a ansiedade foi a influência predominante (Fator-I) no comportamento exploratório dos ratos SHB machos e fêmeas, contribuindo com cerca de 46,4 e 19,2% da variância, respectivamente (Tab.6). Por sua vez, a atividade (Fator-II) contribuiu com 27,8% da variância nos ratos machos, mas apenas 17,7% nas fêmeas.

Tabela 6. Influência do sexo nos comportamentos do Labirinto-Em-Cruz Elevado e da Arena dos ratos SEL (♂, n=7; ♀, n=16), HBR (♂, n=89; ♀, n=94) e SHB (♂, n=7; ♀, n=15). Demais detalhes como na Tabela 1.

		♂			♀		
		I	II	Res.	I	II	Res.
SEL	EA	-0,94			-0,88		
	TA	-0,93			-0,86	-0,40	
	EF		-0,59		0,73	-0,34	
	TF	0,60	-0,75			-0,43	
	DF	-0,62			-0,80		
	PX		0,85			0,68	
	CX	-0,84	0,51			0,76	
		Variância (%)	47,8	27,5		39,1	22,7
	Var.Acum. (%)	47,8	75,3	24,7	39,1	61,8	38,2
HBR	EA	-0,74			-0,58		
	TA	-0,71			-0,49		
	EF				-0,46		
	TF	0,36					
	DF		0,42			0,61	
	PX					0,40	
	CX	-0,63			-0,37		
		Variância (%)	23,8	5,8		14,4	9,9
	Var.Acum. (%)	23,8	29,6	70,4	14,4	24,3	75,7
SHB	EA	-0,91	-0,34		-0,51		
	TA	-0,94			-0,73		
	EF		-0,94				
	TF	0,81			0,38		
	DF	0,80				0,55	
	PX	0,45	0,83			0,81	
	CX		0,44		-0,51	0,46	
		Variância (%)	46,4	27,8		19,2	17,7
	Var.Acum. (%)	46,4	74,2	25,8	19,2	36,9	63,1

Exceto pelas variáveis do LCE (EA, TA e EF), que carregaram de forma extremamente similar, as variáveis carregaram diferentemente segundo o sexo dos ratos SHB (Fig.4, Tab.6). Assim, PX carregou em ambos fatores dos ratos machos, mas apenas no Fator-II das fêmeas. Adicionalmente, DF carregou no Fator-I dos machos e Fator-II das fêmeas.

## Discussão

As premissas básicas deste estudo consideram que a exploração dos braços abertos (TA e EA) seja indicativa de ansiólise, tal como demonstraram os estudos com administração de doses não-sedativas de ansiolíticos (File, 1992), e que a PX expressa a atividade 'geral' do rato, tal como tem sido tradicionalmente aceito em estudos comportamentais. Contudo, é importante notar que mesmo quando a atividade é independente da ansiedade, ela subsume inúmeros processos e motivações (ritmos circadianos, ciclo menstrual, demarcação territorial, busca por água, comida, parceiros, etc). Não há consenso, por outro lado, sobre os fatores determinantes da CX e DF, ou sobre as correlações entre as variáveis da arena e do LCE. Em vista disto, o presente estudo analisou o comportamento exploratório do rato por meio de análise de fator das variáveis de ambos equipamentos. A escolha da extração dos fatores por rotação oblíqua deveu-se à descrição mais parcimoniosa dos resultados. Contudo, exceto quando indicado, somente foram considerados os resultados similares nas rotações ortogonal e oblíqua. Na grande maioria dos casos, os fatores extraídos foram bidimensionais, com correlações positivas e negativas. Portanto, as correlações negativas com o fator ansiedade devem ser consideradas como indicativas de ansiólise e as correlações negativas com o fator atividade, sedação.

O padrão observado para a população total de ratos corroborou as premissas acima. De fato, embora a PX tenha carregado tanto em ansiedade quanto atividade na rotação ortogonal, a PX e as variáveis do LCE (TF e TA) carregaram em fatores distintos após a rotação oblíqua. A

segregação destas variáveis foi confirmada para as subpopulações W e S, tanto para a rotação ortogonal quanto oblíqua, sugerindo sua veracidade.

Em contraste, CX e DF não carregaram significativamente em nenhum fator da população total, sugerindo sua maior variabilidade nas linhagens individuais. Assim, enquanto CX carregou em atividade na subpopulação W e ansiedade na subpopulação S, a DF carregou em atividade em ambas as subpopulações. Estas correlações também foram observadas para a rotação ortogonal, sugerindo a independência da contribuição ansiedade e atividade para estas variáveis.

Nas linhagens agrupando ambos os sexos, CX correlacionou-se exclusivamente com atividade para os ratos SEL e SHR, e com ansiólise nos ratos HBR. Por outro lado, a CX das linhagens WIS e SHB correlacionou-se tanto com atividade quanto ansiólise. Embora as correlações exclusivas de CX com atividade e ansiólise nas subpopulações respectivas W e S não tenham sido conservadas na análise das linhagens agrupando ambos os sexos, estas correlações foram observadas para os sexos de algumas linhagens, individualmente. Assim, CX carregou forte e positivamente com a atividade de machos e fêmeas WIS e machos SHR. Em contraste, correlacionou-se com sedação nas fêmeas WKY e SHR. No último caso temos um claro exemplo de dimorfismo sexual.

A linhagem SHR apresentou um padrão similar àquele da linhagem WIS, qual seja, a influência predominante (Fator-I) da ansiedade nos ratos machos e da atividade nas fêmeas (Tab.5). Contudo, as variáveis carregaram diferentemente nos fatores principais das fêmeas. No Fator-I (atividade), TA e EA correlacionaram-se positivamente com PX, mas

inversamente com CX, relações que não foram observadas para os SHR machos. Estes dados sugerem que as fêmeas mais ativas na arena tendem a entrar um maior número de vezes nos braços abertos do LCE, aumentando o tempo dispendido na exploração dos mesmos. Contudo, TA e PX correlacionaram-se inversamente com o Fator-II (ansiedade) das fêmeas, sugerindo a influência inibitória da ansiedade na exploração da arena.

A correlação de DF com atividade observada nas subpopulações W e S só se repetiu nas linhagens SHR e HBR. Nas demais, a DF carregou diferentemente para cada linhagem. Assim, carregou em ansiedade na linhagem WIS, ansiólise na SEL e não carregou em fator algum nas linhagens WKY e SHB. Na análise por sexo, a DF carregou em atividade de machos e fêmeas HBR e machos SHR. Contrariamente, correlacionou-se com ansiedade nos ratos machos SHB, constituindo-se na única confirmação da concepção clássica que relaciona esta resposta com medo e ansiedade ou, em termos mais gerais, 'alta emocionalidade', (Broadhurst, 1975). Surpreendentemente, a DF correlacionou-se fortemente com ansiólise nos ratos machos e fêmeas da linhagem SEL. Estes resultados sugerem que a DF dos ratos SEL e outras linhagens estejam mais relacionadas à exploração (demarcação territorial) que à 'emocionalidade'

A população total também revelou uma correlação inversa de PX e EF, sugerindo que os ratos mais ativos na arena sejam menos ativos nos braços fechados do LCE. Esta observação foi confirmada para os ratos WIS, SEL e SHB de ambos os sexos e fêmeas SHR. Constitui-se, portanto, num traço bastante generalizado do comportamento exploratório do rato. Como a rotação ortogonal forneceu resultados similares, a correlação inversa de PX e



EF destas linhagens é independente da ansiedade, sendo determinado pelas características físicas dos ambientes, quais sejam, ambientes amplos (arena) ou restritos (braço fechado), exclusivamente. Em outras palavras, ratos cuja atividade é estimulada por ambientes amplos teriam uma atividade inibida em ambientes restritos. Portanto, a PX destas linhagens parece expressar uma busca instintiva por um 'abrigo' que é independente do grau de ansiedade vivenciado pelo rato. Esta atividade seria desnecessária no braço fechado do LCE. De fato, estes ratos saíam prontamente da arena no momento em que a portinhola da parede lateral era aberta para a remoção dos mesmos. Isto foi particularmente evidente para os ratos selvagens, que não precisaram de estímulos para forçar sua saída.

Por outro lado, os fatores principais contribuíram com apenas 16,6% da variância acumulada dos ratos WKY, ou 32,9% nos machos e apenas 22,1% nas fêmeas desta linhagem. Estes dados sugerem a influência predominante de fatores específicos, principalmente nas fêmeas desta linhagem, que não foram detectados por estes equipamentos. A extração de 3 fatores principais forneceu resultados similares, descartando um eventual viés resultante da extração de somente 2 fatores. Portanto, a interpretação do comportamento dos ratos WKY requer testes adicionais, em particular, o teste da natação forçada uma vez que esta linhagem tem sido associada com comportamentos similares à depressão. Os ratos WKY apresentam diversas peculiaridades que os capacitam a ser considerados um bom modelo experimental para a depressão, por exemplo, redução do peso corporal e distúrbios do sono REM (pare, 1994). Além disso, apresentam, ainda, aumento do tempo de imobilidade no teste do nado-forçado e um grande nível de

anedonia em resposta a condições de estresse crônico e agudo (Overstreet, 1993, 2002). Esta linhagem WKY apresenta, também, anormalidades em determinados sistemas neurotransmissores (Overstreet, 1993, 2002). Quando submetidos ao teste de agressão residente-intruso, os ratos WKY tiveram o eixo HPA intensamente ativados, exibindo altos níveis de ACTH (Malkesman *et al.*, 2006).

De fato, as variáveis correlacionaram-se fracamente com ansiedade ou atividade ( $0,35 < \lambda < 0,50$ ). Não obstante, TA correlacionou-se com ansiólise na linhagem total e nos machos WKY. Porém, EA correlacionou-se com atividade na linhagem WKY, carregando em ansiedade nos machos e não se correlacionando com fator algum nas fêmeas. Sem dúvida, este foi o grupo mais anômalo deste estudo.

A ansiedade também foi representada no Fator-I da linhagem SEL. Contudo, enquanto TA e EA carregaram forte e negativamente neste fator, TF não apresentou correlação significativa ( $\lambda=0,23$ ). Ao contrário, correlacionou-se fortemente com sedação. Isto foi observado tanto para o conjunto dos ratos SEL quanto para os sexos separadamente. Portanto, a permanência prolongada do rato SEL no braço fechado parece estar mais associada à sedação que ansiedade. Os resultados também indicam que a exploração reduzida do braço aberto nem sempre correspondeu a uma permanência mais prolongada no braço fechado. Aparentemente, isto foi devido à exploração da plataforma central. Assim, enquanto alguns ratos com alta frequência de avaliação de risco, podem ter permanecido na plataforma central, evitando ambos os braços do LCE, ratos com frequência reduzida deste comportamento permaneceram a maior parte do tempo no interior do

braço fechado. Estes ratos também apresentaram um impulso mais acentuado de fuga, expresso por um número elevado de saltos (mas não quedas) para o assoalho, o que pode ter influenciado os resultados. Por fim, o comportamento dos ratos SEL sugere que TA e EA são as variáveis fundamentais do LCE.

A ansiedade também foi a influência predominante no comportamento exploratório dos machos e fêmeas da linhagem HBR, reproduzindo o padrão dos ratos SEL. Portanto, por ser derivado da linhagem SEL, o padrão do comportamento exploratório dos ratos HBR corrobora as observações feitas para o pequeno número de ratos da primeira linhagem.

Adicionalmente, nossos resultados corroboram os achados de Fernandez *et al.* (1999), mostrando enquanto a ansiedade cumpre um papel mais importante no comportamento exploratório dos ratos machos, a atividade é o fator mais influente nas fêmeas da linhagem WIS. Contudo, a ansiedade foi a influência preponderante no comportamento exploratório dos machos e fêmeas da linhagem SEL. Os fatores principais contribuíram com uma parcela considerável da variância do comportamento exploratório (60%), principalmente para os machos desta linhagem (91,7%).

A característica mais importante do comportamento exploratório dos ratos SHR foi a segregação completa das variáveis do LCE e arena nos fatores ansiedade e atividade, respectivamente. Este padrão foi virtualmente conservado nos ratos machos. Contudo, as fêmeas apresentaram um comportamento extremamente complexo, onde TF foi a única variável que carregou forte e exclusivamente em ansiedade. Em contraste, PX correlacionou-se tanto com atividade e ansiedade, TA com atividade e ansiólise e CX com sedação.

Por fim, devemos ressaltar a influência de vários outros fatores, sejam eles, ambientais, experimentais e específicos das linhagens de ratos pesquisadas. No que diz respeito ao ciclo sono-vigília, os ratos são animais de hábitos noturnos, com a vigília predominando à noite, dormindo apenas 33% neste período (Van Luytelaar e Coenen, 1983). Por razões logísticas, a maior parte dos experimentos foram realizadas no período vespertino, ou seja, em um momento no qual os ratos não estariam em seu estado pleno de atividade, mesmo com a manutenção artificial da luminosidade no biotério. Outro fator que poderia ter influenciado alguns dos resultados advém do ciclo estral das ratas utilizadas, pois, como é sabido, as ratas são animais poliétricos, apresentando ovulação espontânea e o estro ocorrendo por um período de 12 a 14 horas a cada 4 ou 5 dias (Krinke, 2000). Ao longo destas fases, alterações hormonais podem modificar padrões comportamentais específicos, por exemplo, exploração, ansiedade, agressão, etc.

De modo geral, os resultados do presente estudo sustentam a concepção clássica de que a exploração dos braços abertos, medida pelo tempo e número de entradas, refira-se a um estado de ansiólise. De modo semelhante, a peritaxia parece expressar a atividade geral do animal. No entanto, não podemos descartar a influência de diversos fatores ambientais e motivacionais sobre estes comportamentos. A comparação derivada dos equipamentos utilizados neste estudo demonstra que ambientes amplos teriam um efeito estimulante sobre o comportamento exploratório do rato, ao contrário de ambientes mais restritos. Neste sentido, a peritaxia pode estar relacionado com a busca por um abrigo, independentemente do grau de ansiedade 'experenciado' pelo animal. Tal fato não ocorreria no LCE. A linhagem SEL

apresentou comportamento ansioso, permanecendo muito tempo no braço fechado do LCE. Contudo, a permanência na plataforma central também foi grande, o que poderia estar relacionado com a investigação de uma rota de fuga mais segura. Tal fato é corroborado por um grande número de ratos que saltaram no labirinto em pleno experimento. A linhagem HBR também foi influenciada pela ansiedade, assim como os ratos SEL. No caso do grupo WIS, o comportamento exploratório dos machos é marcado pela ansiedade, enquanto que nas fêmeas, pela atividade. Os ratos SHR, por sua vez, apresentaram um padrão comportamental distinto para os machos e fêmeas. No caso dos primeiros, houve uma segregação completa entre os fatores referentes à ansiedade e atividade, tanto na arena quanto no LCE. Nas fêmeas, tal organização não ocorreu. Somado a todos os resultados apresentados, não podemos descartar a influência de inúmeros fatores sobre os ratos das diferentes linhagens.

## REFERÊNCIAS

- Blanchard DC, Griebel G, Blanchard RJ (1995). Gender bias in the preclinical psychopharmacology of anxiety: male models for (predominantly) female disorders. *J Psychopharmacol.*, 9: 79–82.
- Broadhurst PL (1975). The Maudsley reactive and nonreactive strains of rats: a survey. *Behav Genet.*, 5: 299–319.
- Castanon N, Perez-Diaz F, Mormède P (1995). Genetic analysis of the relationships between behavioral and neuroendocrine traits in Roman High and Low Avoidance rat lines. *Behav Genet.*, 25: 371–84.
- Cardno AG, Holmans PA, Harvey I, Williams MB, Owen MJ, McGuffin P (1997). Factor-derived subsyndromes of schizophrenia and familial morbid risks. *Schizophr Res.*, 23: 231–8.
- Chaouloff F (1994). Failure to find behavioural differences between lean and obese Zucker rats exposed to novel environments. *Int J Obes.*, 18: 780–2.
- Chaouloff F (1994). Castanon N, Mormède P. Paradoxical differences in animal models of anxiety among the Roman rat lines. *Neurosci Lett.*, 182:217–21.
- Chaouloff F, Durand M, Mormède P (1997). Anxiety- and activity-related effects of diazepam and chlordiazepoxide in the rat light: dark and dark:light tests. *Behav Brain Res.*, 85: 27–35.
- Durand M, Aguerre S, Fernandez F, edno L, Combourieu I, Mormède P e Chaouloff F (2000). Strain-dependent neurochemical and neuroendocrine effects of desipramine, but not fluoxetine or imipramine, in Spontaneously Hypertensive and Wistar–Kyoto rats. *Neuropharmacology* 39: 2464–2477.
- Fernandez-Teruel A, Escorihuela RM, Driscoll P, Tobena A, Battig K (1994). Evaluating activity and emotional reactivity in a hexagonal tunnel maze: correlational and factorial analysis from a study with the Roman:Verh rat lines. *Behav Genet.*, 24: 419–25.

- Flint J, Corley R, DeFries JC, Fulker DW, Gray J, Miller S, Collins AC (1995). A simple genetic basis for a complex psychological trait in laboratory mice. *Science*, 269:1432–5.
- Jones B e Mormède P (2007). *Neurobehavioral genetics*. New York: Taylor and Francis.
- Glowa JR, Sternberg EM, Gold PW (1992). Differential behavioral response in LEW:N and F344:N rats: effects of corticotropin releasing hormone. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatr.*, 16:549–60.
- Gray JA (1979). Emotionality in male and female rodents: a reply to Archer. *Br J Psychol.*, 70: 425–40.
- Grisel JE, Belknap JK, O'Toole LA, Helms ML, Wenger CD, Crabbe JC (1997). Quantitative trait loci affecting methamphetamine responses in BXD recombinant inbred mouse strains. *J Neurosci.*, 17: 745–54.
- Hall CS (1936). Emotional behavior in the rat. III. The relationship between emotionality and ambulatory activity. *J Comp Psychol.*, 22: 345–452.
- Hard E, Carlsson SG, Jern S, Larsson K, Lindh A, Svensson L (1985). Behavioral reactivity in spontaneously hypertensive rats. *Physiol Behav.*, 35: 487–92.
- Hendley E D, Atwater D G, Myers M M, Whitehorn D (1983). Dissociation of genetic hyperactivity and hypertension in SHR. *Hypertension*, 5: 211–7.
- Lahmame A e Armario A (1996). Differential responsiveness of inbred strains of rats to antidepressants in the forced swimming test: are Wistar Kyoto rats an animal model of subsensitivity to antidepressants? *Psychopharmacology*, 123: 191–8.
- Lesch K-P, Bengel D, Heils A, Sabol SZ, Greenberg BD, Petri S, Benjamin J, Müller CR, Hamer DH, Murphy DL (1996). Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. *Science*, 274: 1527–31.
- Malkesman M, Braw Y, Yadid G, Maayan R, Overstreet DH, Shabat-Simon M (2006). Two different genetic animal models of childhood depression. *Biol Psychiatry*, 59:17–23.
- Malkesman O, Maayan R, Weizman A, Weller A (2006). Aggressive behavior and HPA axis hormones after social isolation in adult rats of two different

- genetic animal models for depression. *Behavioural Brain Research*, 175: 408-14.
- Melo JA, Shendure J, Pociask K, Silver LM (1996). Identification of sex-specific quantitative trait loci controlling alcohol preference in C57BL:6 mice. *Nature Genet.*, 13: 147–53.
- Mora S, Dussaubat N, Diaz-Veliz G (1996). Effects of the estrous cycle and ovarian hormones on the behavioral indices of anxiety in female rats. *Psychoneuroendocrinology*, 21: 609–20.
- Overstreet DH (2002). Behavioral characteristics of rat lines selected for differential hypothermic responses to cholinergic or serotonergic agonists. *Behav Genet.*, 32: 335–48.
- Overstreet DH (1993). The flinders sensitive line rats: a genetic animal model of depression. *Neurosci Biobehav Rev.*, 17: 51–68.
- pare WP (1994). Open field, learned helplessness, conditioned defensive burying, and forced-swim tests in WKY rats. *Physiol Behav.*, 55: 433–9.
- Ramos A e Mormède P (1998). Stress and emotionality: a multidimensional and genetic approach. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 22: 33-57.
- Ramos A, Mellerin Y, Mormède P e Chaouloff F (1998). A genetic and multifactorial analysis of anxiety-related behaviours in LEW and SHR intercrosses. *Behav. Brain Res.*, 96: 195-205.
- Ramos A, Berton O, Mormède P e Chaouloff F (1997). A multiple-test study of anxiety-related behaviours in six inbred rat strains. *Behav. Brain Res.*, 85: 57-69.
- Soderpalm B (1989). The SHR exhibits less but increased sensitivity to the anticonflict effect of clonidine compared to normotensive controls. *Pharmacol Toxicol.*, 65: 381–6.
- Trullas R e Skolnick P (1993). Differences in fear motivated behaviors among inbred mouse strains. *Psychopharmacology*, 111: 323–31.



## **ESTUDO IV**

# **ANÁLISE DO COMPORTAMENTO DE DEFESA INTERESPECÍFICO E EXPLORATÓRIO DE RATOS SELVAGENS E HÍBRIDOS NO CORREDOR LINEAR**

## RESUMO

**Introdução:** O comportamento exploratório é essencial para a sobrevivência pois aumenta a possibilidade do animal de encontrar alimento, água, parceiro sexual e abrigo contra predadores. **Objetivos:** O presente estudo investigou os comportamentos exploratório e de agressão defensiva no teste do corredor linear, em ratos SEL, HBR e SHB. Adicionalmente, avaliou as alterações nestes comportamentos ao longo de 9 gerações. **Método:** Foram utilizados ratos SEL capturados ou nascidos em biotério (38 machos e 20 fêmeas), HBR (94 machos 83 fêmeas) e SHB (11 machos e 11 fêmeas). Os ratos foram privados de alimento por 48 h antes do teste do corredor. O corredor tinha cerca de 40 m de comprimento por 1 m de largura e era dividido em seções de 1 m com fitas adesivas brancas e placas numeradas indicando a metragem. Ao final do corredor foi construída uma barreira com 1 m de altura. No dia do teste, os ratos eram introduzidos na extremidade de um corredor e observados por 10 minutos pelo experimentador imóvel. Em seguida, este aproximava-se do rato na velocidade de 1 m/s, parando toda vez que o rato orientava-se em sua direção, registrando o número de quadrantes entre ele e o rato, bem como os quadrantes percorridos pelo animal durante a fuga. Terminado o teste, o experimentador encurralava o rato no final do corredor e registrava os comportamentos de agressão defensiva. As respostas de exploração, detecção, fuga, perseguição ao experimentador das diversas linhagens foram comparados por ANOVA seguida de testes de Bonferroni. Para a análise dos efeitos da hibridização, as 9 gerações de ratos HBR foram agrupadas em 3 épocas (G2-4, G5-7, G8-10) e submetidas à ANOVA para medidas repetidas seguida de contrastes lineares para interações entre época e linhagem. As diferenças foram consideradas significantes para  $P < 0,05$ . **Resultados:** As linhagens diferiram significativamente quanto às respostas de explorar, fugir e, mais acentuadamente, salto e perseguir. Contudo, não diferiram quanto à resposta de detecção. Embora a exploração tenha sido similar para as 3 linhagens, os ratos HBR exploraram o corredor de forma muito mais intensa ( $58,9 \pm 1,9$  m) que os ratos SHB ( $52,1 \pm 2,1$  m) e SEL ( $49,6 \pm 3,4$  m). A amplitude de fuga dos ratos HBR ( $13,6 \pm 0,6$  m) também foi significativamente maior que aquela dos ratos SEL ( $11,1 \pm 0,7$  m). Particularmente, os saltos de ataque dos ratos SEL ( $5,44 \pm 0,16$ ) foram muito mais numerosos que aqueles dos ratos

HBR ( $1,85 \pm 0,2$ ) e SHB ( $1,54 \pm 0,3$ ). Os ratos SEL também apresentaram um número maior de perseguições ( $4,7 \pm 0,2$ ) que os ratos HBR ( $1,0 \pm 0,1$ ) e SHB ( $2,1 \pm 0,2$ ). As 3 épocas dos ratos HBR diferiram significativamente quanto às respostas de exploração, detecção, fuga e salto de ataque. Exceto por um aumento significativo da amplitude de fuga na Época-2, as respostas foram atenuadas ao longo das gerações, efeito que já pode ser observado na segunda época do protocolo (gerações 5-7). Nas duas últimas épocas, as respostas de explorar e saltar foram atenuadas em cerca de 25% e 30%, respectivamente. A amplitude de fuga apresentou efeitos variáveis, aumentando cerca de 35% na Época-2, mas retornando aos valores iniciais na Época-3. Por fim, a endogamia não teve efeito algum sobre a resposta de detecção. **Conclusão:** O teste do corredor linear foi capaz de detectar diferenças significativas nos comportamentos agressivo e exploratório tanto em relação às linhagens quanto às gerações.

**Palavras-chaves:** Corredor Linear, Agressão, Defesa, Exploração, Ratos Selvagens, Ratos Híbridos, Domesticação.

## INTRODUÇÃO

O comportamento exploratório de um ambiente novo é essencial para a sobrevivência, pois garante fontes de alimento, água, parceiros sexuais, abrigo contra predadores ou incêndios, inundações e alterações dramáticas do clima (Whishaw *et al.*, 2006). Este comportamento é, em boa medida, determinado por características genéticas do indivíduo. Tal como observamos em experimentos anteriores, ratos Wistar, selvagens e linhagens derivadas diferem acentuadamente quanto à exploração de uma arena ou do labirinto-em-cruz elevado (LCE) (ver Estudos II e III). Também foram observadas diferenças acentuadas na exploração da arena entre as linhagens Maudsley reativa e não-reativa (Berretini *et al.*, 1994), Wistar e Wistar-Kyoto (Malkesman *et al.*, 2005), Wistar e ratos encapuzados (Rebouças e Schmidek, 1997), Wistar-Kyoto e Flinder sensível (Braw *et al.*, 2006), Wistar, Wistar-Kyoto Sprague-Dawley e ratos hipertensos (SHR) (Ferguson e Cada, 2003, Sagvolden *et al.*, 1993). O comportamento exploratório das diversas linhagens também interage com o sexo do indivíduo (ver Estudos II e III) e fase do ciclo circadiano (Krauchi *et al.*, 1983). As diferenças no comportamento exploratório entre as linhagens romana de alta e baixa atividades (Corda *et al.*, 2005, Guitart-Masip *et al.*, 2006), linhagens Lewis e Fisher 344 (Stohr *et al.*, 1998), Wistar e Sprague-Dawley (Zamudio *et al.*, 2005) e linhagens de Nápoles de alta e baixa excitabilidades (Viggiano *et al.*, 2003), parecem ser devidas a características específicas do sistema dopaminérgico mesocortical. Adicionalmente, os ratos selvagens apresentam índices maiores de neofobia que os ratos domesticados (Mitchell, 1976).

Contudo, o comportamento exploratório é influenciado por motivações conflitantes, por exemplo, entre explorar um ambiente potencialmente perigoso ou permanecer no abrigo, ou num ambiente previamente reconhecido como seguro (File, 2003). Assim, a exploração do ambiente desconhecido é concomitantemente influenciada pela motivação em explorar (ou 'curiosidade') e pela neofobia (Harro, 1993). Conseqüentemente, os testes para estudo do comportamento exploratório em roedores têm sido adaptados para avaliação dos efeitos ansiolíticos ou ansiogênicos de drogas psicoativas, tais como as arena (*open-fields*) clássicas ou modificadas, caixas claro-escura (*bright and dark box*) e alvinegra (*black and white box*), labirintos, tábua de buracos (*holeboard test*), etc (File, 1992, Panksepp, 1998). Nestes casos, a detecção da ansiedade, ou efeitos relacionados, pode ser amplificada pela introdução de outros estímulos, como um bastão eletrificado (*defensive burying test*) (De Boer e Koolhaas. 2003, Baum *et al.* 2006), o odor do predador (Blanchard *et al.*, 2001) ou o próprio predador, tal como ocorre no modelo das colônias em túneis transparentes (*visible-burrow system*) (Blanchard e Blanchard, 1989).

Existem diferenças quantitativas e qualitativas marcantes entre comportamento defensivo do *Rattus norvegicus* selvagem e as variedades de laboratório, principalmente, quanto à reatividade a estímulos ameaçadores e aos humanos (Blanchard, 1997, Blanchard *et al.*, 1986). Dentre estas, destaca-se a maior intensidade das respostas agressivas e de fuga e os limiares reduzidos das respostas de defesa, isto é, os ratos selvagens reagem precocemente à aproximação do experimentador. No geral, estas diferenças não são atribuídas à experiência prévia do animal, na medida que as linhagens

selvagens nascidas em laboratório apresentam padrões semelhantes aos ratos selvagens capturados (Blanchard *et al.*, 1986). Em resumo, estas diferenças sugerem a grande limitação em se estudar comportamentos defensivos com linhagens exclusivamente de laboratório, ou seja, que já passaram pelo processo de domesticação.

Em particular, Blanchard *et al.* (1986) estudaram a defesa interespecífica de ratos selvagens contra o ser humano em um corredor oval de 8 m de comprimento. Neste paradigma, o experimentador aproxima-se diversas vezes do rato, registrando-se as distâncias nas quais os comportamentos específicos de defesa eram eliciados. O teste era realizado na ausência ou presença de 2 obstáculos colocados nos pólos do corredor que reduziam o comprimento para 4 m e impediam a fuga do rato à aproximação do experimentador. Blanchard *et al.* (1986) observaram que o comportamento defensivo dos ratos selvagens depende tanto da distância presa-predador, quanto da viabilidade de escape. Se a fuga é possível, os ratos fogem, ameaçam e atacam o experimentador quando este se encontra a cerca de 2,5, 1 e 0,5 m de distância, respectivamente. Se a fuga é inviável, os ratos não alteram as distâncias de ameaça e ataque, mas, ao invés da fuga, apresentam a resposta de 'congelamento' (*freezing*) quando o experimentador se encontra a 2,5 m de distância.

O presente estudo teve por objetivos investigar os comportamentos exploratórios e de agressão defensiva à aproximação do experimentador num corredor linear, utilizando ratos selvagens e híbridos de ratos Wistar e selvagens (HBR) ou originários do retrocruzamento de ratos HBR com selvagens (SHB). Como a procura por alimento é um estímulo

poderoso para motivar a exploração do meio ambiente, seja ele conhecido ou desconhecido (Onuki *et al.*, 2005), nossos ratos foram adicionalmente submetidos à privação alimentar de 48 horas antes de examiná-los no teste do corredor.

## MÉTODOS

Foram utilizados ratos selvagens (*Rattus norvegicus sp.*) machos (n=38) e fêmeas (20), tanto capturados em ambiente urbano quanto nascidos no biotério do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo. Ratos híbridos, resultantes do cruzamento entre as linhagens selvagem e Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) machos (n=94) e fêmeas (n=83), do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, da Universidade Federal do Espírito Santo. Por fim, foram utilizados ratos híbridos resultantes do retrocruzamento entre a linhagem híbrida e selvagem (machos, n=11; fêmeas, n=11), também fornecidos pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo. Os ratos tinham idade similar, variando entre 3 e 4 meses na época do procedimento experimental. Todos os procedimentos do presente estudo respeitaram as normas estabelecidas pelo International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals (CIOMS) - Genebra (1985), e atualmente está sendo analisada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA), da Faculdade de Medicina EMESCAM, Vitória, ES.

Como o experimento foi realizado em um ambiente distante do biotério, os animais foram transportados 48 horas antes do experimento, a fim de se evitar os efeitos do estresse sobre o comportamento. Todos os ratos foram privados de alimento 48 horas antes com o objetivo de aumentar o impulso exploratório. Os ratos eram posicionados num dos lados de um corredor com 34 m de comprimento por 1,1 m de largura. O corredor foi dividido em seções de 1x1 m com fitas adesivas brancas, facilitando a observação do experimentador, bem como por placas numeradas colocadas nas laterais de cada quadrante, indicando a metragem. Ao final do corredor foi construída uma barreira de 1 m de altura. A barreira tinha uma portinhola acionada por um sistema de roldanas, permitindo a recaptura dos ratos numa armadilha colocada atrás da barreira. Quando soltos, os ratos exploraram o corredor por um período de 10 minutos. O número de quadrantes atravessados foi registrado com o auxílio de um binóculo (Sakura 15, 180x100 c/ zoom).

Todos os experimentos foram realizados entre o período de 14:00 e 17:00 h. Passado o período de exploração, o experimentador entrou no corredor e, com velocidade de 1 m por segundo, aproximou-se do rato, parando ao primeiro reflexo de orientação do rato em sua direção. O número de quadrantes entre o experimentador e o rato (distância limiar), bem como os quadrantes percorridos pelo animal ao fugir do experimentador (amplitude de fuga) foram registrados. Terminado o teste, o experimentador encurralou o rato no canto do corredor para observar seus comportamentos de defesa. Os comportamentos de exploração e defesa foram definidos segundo um etograma (Tab.1).



A distância explorada, a frequência de perseguições e saltos de ataque e as distâncias limiars de detecção e fuga foram examinadas por análise de variância de 1 via (linhagem) seguida de testes-t de Bonferroni.

Tabela 1. Etograma dos comportamentos do rato norueguês no corredor linear

Exploração	Análise do ambiente por meio de movimentos verticais e horizontais da cabeça e do corpo, podendo adotar postura ereta e marchar ou trotar.
Detecção do Experimentador	Movimento da cabeça do rato em direção ao camundongo, seguido ou não de imobilidade por um breve espaço de tempo.
Perseguição	Locomoção rápida do rato em direção ao experimentador, alternando movimentos de apoio e projeção dos membros anteriores e posteriores, em forma de galope.
Fuga	Locomoção muito rápida do animal na direção oposta ao experimentador, alternando movimentos de apoio e projeção dos membros anteriores e posteriores.
Salto de Ataque	Impulso oblíquo em direção ao experimentador.

O efeito da hibridização ao longo de 9 gerações foi examinado agrupando-se as gerações em 3 épocas (E1: G2-G4, E2:G5-G7, E3: G8-G10). Estes dados foram submetidos à análise de variância para medidas repetidas seguida de contrastes lineares. para a interação das épocas e linhagem.

As diferenças foram consideradas significantes para o nível de 5% (critério de Bonferroni). A estatística foi realizada com o programa SAS (Cary, NC, EUA).

## RESULTADOS

### *Efeitos da Hibridização dos Ratos Selvagens no Teste do Corredor Linear*

As linhagens diferiram significativamente quanto às respostas de explorar ( $F_{2,148}= 4,3$ ;  $P<0,05$ ), fugir ( $F_{2,148}= 3,7$ ;  $P<0,02$ ) e, mais acentuadamente, salto ( $F_{2,148}= 116,9$ ;  $P<0,0001$ ) e perseguir ( $F_{2,148}= 136,1$ ;  $P<0,0001$ ). Contudo, não diferiram quanto à resposta de detecção.

Embora a exploração tenha sido similar para as 3 linhagens, a exploração da linhagem HBR ( $58,9\pm 1,9$  m) foi maior que aquela dos ratos SHB ( $52,1\pm 2,1$  m,  $t_{91}=2,37$ ;  $P<0,02$ ) e SEL ( $49,6\pm 3,4$  m;  $t_{127}=2,4$ ,  $P<0,02$ ). A amplitude de fuga dos ratos HBR ( $13,6\pm 0,6$  m) também foi maior que aquela dos ratos SEL ( $11,1\pm 0,7$  m,  $t_{127}=2,69$ ;  $P<0,01$ ).

Ao contrário das diferenças marginais das respostas anteriores, os saltos de ataque dos ratos SEL ( $5,44\pm 0,16$ ) foram muito mais numerosos que aqueles dos ratos HBR ( $1,85\pm 0,2$ ,  $t_{127}=14,1$ ;  $P<0,0001$ ) e SHB ( $1,54\pm 0,3$ ;  $t_{78}=10,1$ ;  $P<0,0001$ ). Não houve diferenças, no entanto, para as últimas linhagens.

Por fim, os ratos SEL também apresentaram um número maior de perseguições ( $4,7\pm 0,2$ ) que os ratos HBR ( $1,0\pm 0,1$ ,  $t_{127}=16,39$ ;  $P<0,0001$ ) e SHB ( $2,1\pm 0,2$ ;  $t_{78}=8,1$ ;  $P<0,0001$ ). As linhagens HBR e SHB também diferiram estatisticamente ( $t_{91}=3,6$ ;  $P<0,0005$ ).

*Efeitos da Endogamia dos Ratos Híbridos (HBR) no Teste do Corredor Linear*

As 3 épocas das gerações dos ratos HBR diferiram quanto as respostas de exploração ( $F_{2,174}=16,9$ ;  $P<0,0001$ ), detecção ( $F_{2,174}=3,1$ ;  $P<0,005$ ), fuga ( $F_{2,174}=13,7$ ;  $P<0,0001$ ) e salto de ataque ( $F_{2,174}=4,1$ ;  $P<0,02$ ).

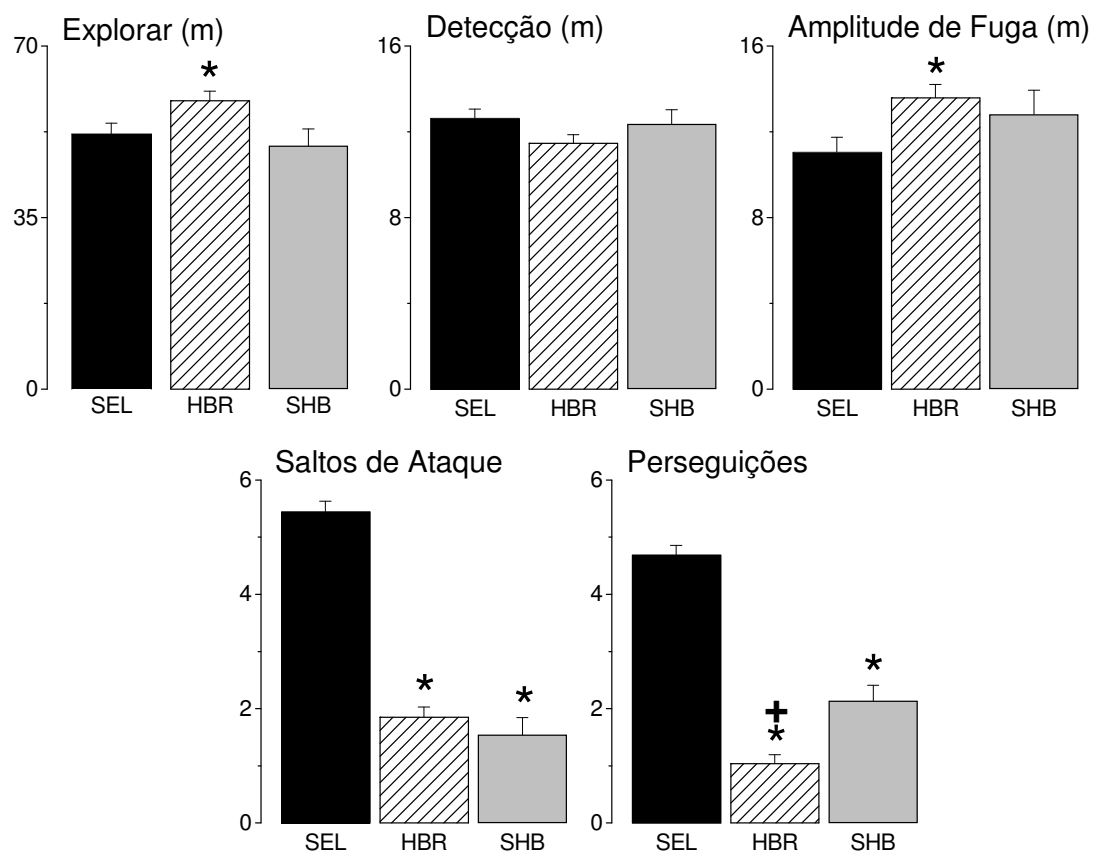


Figura 1. Efeitos da hibridização dos ratos selvagens sobre os comportamentos de defesa no corredor linear. \*, +  $P<0,05$ , significativamente diferente da linhagem SEL e SHB, respectivamente (critério de 5% de Bonferroni).

Conforme podemos observar, exceto pelo aumento significativo da amplitude de fuga na Época-2, as respostas foram atenuadas ao longo das gerações (Tab.2). Os efeitos da endogamia já puderam ser observados na segunda época do protocolo (gerações 5-7). Nas duas últimas épocas, as respostas de explorar e saltar foram atenuadas em cerca de 25% e 30%,

Tabela 2 – Comportamento de defesa dos ratos híbridos das linhagens Wistar e selvagem (HBR) ao longo de 9 gerações de endogamia agrupadas em épocas de 3 gerações. \* , + significativamente diferente das épocas 1 e 3, respectivamente (critério de Bonferroni para 5%).

Época	E1	E2	E3
Geração	2-4	5-7	8-10
Explorar	59,0 ± 2,0	43,8 ± 2,1*	45,0 ± 2,5*
(%)	100	74,2	76,2
Detectar	11,5 ± 0,3	10,4 ± 0,3*	10,6 ± 0,4
(%)	100	90,4	92,1
Fugir	13,6 ± 0,7	18,4 ± 0,8**	13,5 ± 0,9
(%)	100	135,2	99,2
Salto	1,9 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,3 ± 0,2*
(%)	100	73,7	68,4
Perseguir	1,0 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,2 ± 0,1
(%)	100	110	120

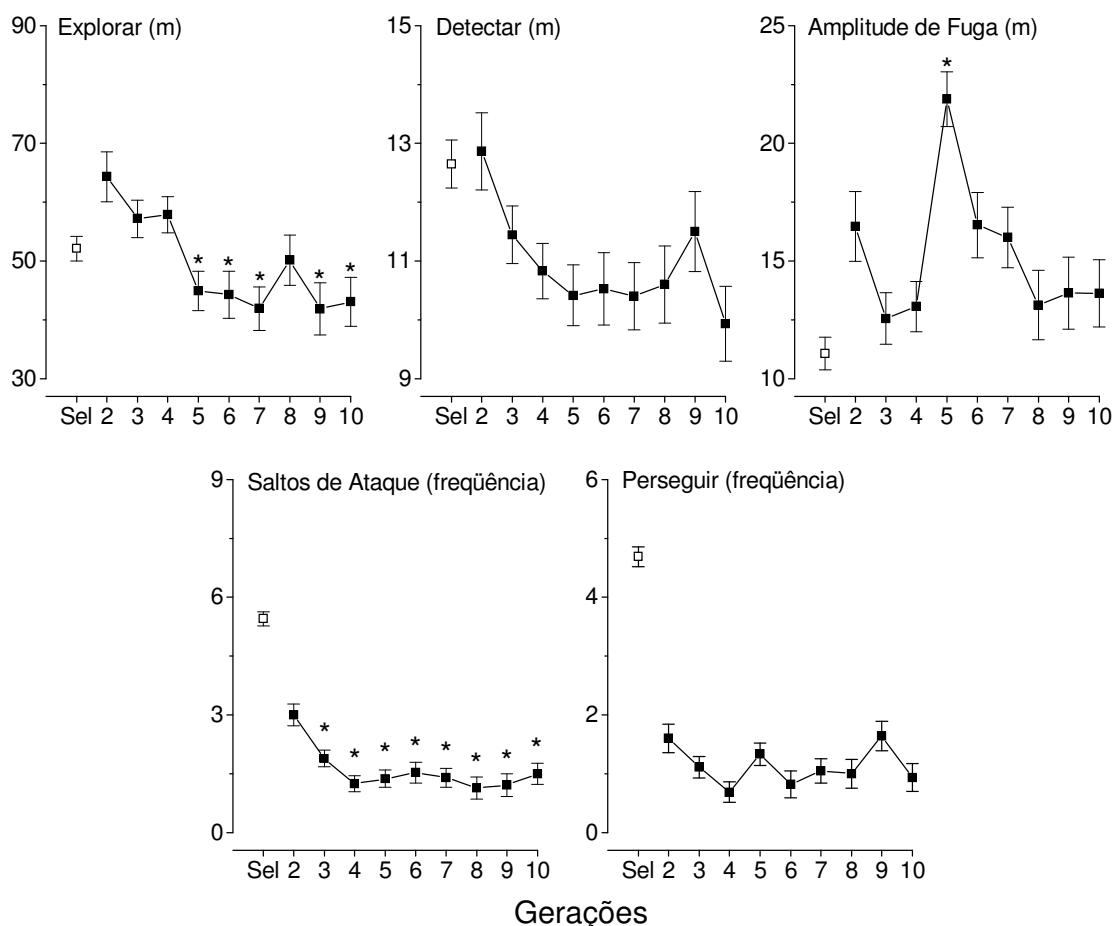


Figura 2 – Efeitos da endogamia sobre os comportamentos de exploração e defesa dos ratos híbridos (HBR). Os símbolos vazios representam os valores da linhagem selvagem (SEL). \* P<0,05, diferenças significantes em relação à primeira geração de ratos híbridos (geração 2).

respectivamente. A amplitude de fuga apresentou efeitos variáveis, aumentando cerca de 35% na Época-2, mas retornando aos valores iniciais na Época-3. Embora a frequência da resposta de perseguir tenha aumentado ao longo das gerações em até 20%, estes efeitos não atingiram significância estatística. Por fim, a endogamia não teve efeito algum sobre a resposta de detecção.

## **DISCUSSÃO**

As linhagens diferiram apenas marginalmente quanto à exploração e amplitude de fuga. No entanto, como o corredor era fechado, a amplitude de fuga tinha um limite físico e dependia da posição do rato no momento da detecção do experimentador, sendo menor para aqueles que se encontravam próximos ao fim do corredor. Assim, embora as linhagens SEL e HBR tenham diferido quanto à amplitude de fuga, a ausência de informação acerca da posição do rato no início da fuga impossibilita uma análise conclusiva sobre a causa destas diferenças.

Contudo, as diferenças mais marcantes foram observadas para as respostas de perseguir e salto de ataque, as quais foram muito menos frequentes nas linhagens híbridas. É interessante notar que o retrocruzamento dos ratos HBR com os SEL, gerando os híbridos SHB, aumentou a frequência da resposta de perseguir. Portanto, a principal diferença entre as linhagens híbridas e a SEL foi a redução do comportamento de agressão defensiva das primeiras. No entanto, como o retrocruzamento causou a recuperação apenas parcial da resposta de perseguir, não tendo efeitos no salto de ataque, os

comportamentos individuais da agressão defensiva parecem ser determinados por mecanismos poligênicos relativamente independentes.

Os efeitos da endogamia já puderam ser observados na segunda época do protocolo (gerações 5-7). Nas duas últimas épocas, a endogamia atenuou as respostas de explorar e saltar em torno de 25% e 30%, respectivamente. A amplitude de fuga apresentou efeitos variáveis ao longo das gerações, aumentando cerca de 35% na Época-2, mas retornando aos valores iniciais na Época-3. Embora a freqüência da resposta de perseguir tenha aumentado ao longo das gerações, chegando a ser 20% maior na terceira época do estudo, estes efeitos não atingiram significância estatística. Por fim, a endogamia não teve efeito algum sobre a resposta de detecção.

Um dos pontos cruciais que podemos ressaltar no presente estudo diz respeito ao processo de hibridização, que resultou na perda parcial da agressão defensiva (investidas e saltos de ataque), sem alteração da defesa não-agressiva. Portanto, o presente estudo revelou um efeito diferencial da hibridização sobre itens individuais do comportamento defensivo interespecífico. Os autores chegaram a esta conclusão, pois os efeitos da nicotina sobre a agressão foi diferente para os modelos de agressão defensiva (mordida em decorrência de um choque na cauda) e a agressão ofensiva (residente versus intruso) em camundongos. Além do mais, o comportamento é influenciado por diversos fatores. Por exemplo, alterações endócrinas e cuidados maternos contribuem decisivamente para a expressão do comportamento agressivo mais tarde e, também, redução do medo nos ratos (Ferreira *et al.*, 2002).

Segundo de Boer e colaboradores (2003), em todos os

laboratórios, todas as linhagens, *outbred* ou *inbred*, de camundongos ou ratos foram severamente alteradas em virtude do processo de seleção artificial ao longo da domesticação dos animais. Para obter níveis interessantes de agressão nestes animais, os experimentadores deveriam submetê-los as mais variadas formas de estresse (isolamento social, rápidas instigações ou provocações, aplicações de estímulos aversivos, estimulação elétrica cerebral, administração de agentes farmacológicos ou inativação de genes específicos. Todavia, todas estas metodologias resultariam em variáveis intervenientes no comportamento que não seria necessariamente típico da espécie. Uma saída foi o desenvolvimento de modelos comportamentais e genéticos com populações de roedores naturalmente agressivos. No presente estudo, pudemos observar o processo de hibridização resultando em uma espécie menos agressivas de ratos.

Estas alterações no comportamento agressivo seriam resultados de uma ampla variedade de processos fisiológicos nervosos, neuroendócrinos e autonômicos periféricos. Por exemplo, numa linhagem de ratos agressivos denominada de 'WTG', os machos apresentaram reatividade simpática elevada em situações desafiadoras, ao contrário dos ratos não-agressivos (de Boer *et al.*, 2003). Esta alta responsividade simpatoadrenal reflete-se em respostas elevadas de noradrenalina e adrenalina no plasma e aumento da frequência cardíaca, pressão arterial e níveis de glicose no sangue frente a uma ampla variedade de eventos estressores. Nestes ratos WTG, os adrenoceptores  $\beta_2$  pré e pós-sinápticos são mais funcionais do que nos ratos Wistar. Os adrenoceptores  $\alpha_2$  pré-sinápticos são similares. Mais ainda, a agressão induzida pelo medo e a imobilidade são os tipos mais básicos de

comportamentos defensivos. A estratégia do comportamento defensivo depende de fatores genéticos (Kulikov *et al.*, 1992) e ambientais (Blanchard e Blanchard, 1984). Ambos os fatores atuam diretamente sobre tais comportamentos, na medida em que tornam diferentes as bases neurofisiológicas dos mesmos. Desta maneira, por exemplo, o circuito serotoninérgico funciona de maneiras distintas naqueles ratos mais agressivos e, portanto, que demonstram o comportamento agressivo de modo mais pronunciado, do que nos ratos menos agressivos (Popova *et al.*, 1998). Neste sentido, seria interessante a verificação de determinadas drogas que atuem seletivamente sobre a neurotransmissão da serotonina em diversas linhagens de ratos, principalmente, nas linhagens selvagens e seus descendentes. Guillot e Chapouthier (1996) demonstraram a existência de algumas diferenças entre os comportamentos de ataque a um macho da mesma espécie, em diversas linhagens de camundongos. Provavelmente, também ocorra nos ratos e, entre outras razões, devido a funcionamentos distintos de alguns sistemas neurotransmissores mais particularmente envolvidos com a agressão, quais sejam, a serotonina e o GABA (Miczek *et al.*, 1994). Desta forma, uma possibilidade para futuros estudos seria a investigação dos efeitos de agonistas e antagonistas GABAérgicos e serotoninérgicos sobre estes comportamentos agressivos, principalmente, nas linhagens SEL e HBR. Neste caso, torna-se interessante se estudar, futuramente, a influência de determinadas drogas sobre a agressão defensiva interespecífica exibida pelos ratos selvagens e HBR quando acudados nos final do corredor.



Ao contrário do que ocorreu com a capacidade de detecção do experimentador, que não foi alterada nos ratos híbridos, o comportamento exploratório, que manteve níveis mais elevados na linhagem híbrida, quando comparada à linhagem selvagem. Tal fato poderia ser explicado pelas fortes influências do estresse sobre o comportamento, uma vez que os ratos SEL são mais reativos a esta condição. O estresse é uma variável muito importante quando se estuda o comportamento, pois ele pode alterar significativamente a expressão deste (Dal-Zotto *et al.*, 2003). Além do mais, a ação do estresse afeta de diferentes formas, diferentes comportamentos, e em linhagens distintas de ratos (Stam *et al.*, 2002). Por exemplo, Beda e colaboradores (2004) demonstraram que o estresse induzido por choques nas patas alterou os comportamentos exploratórios em diferentes linhagens de ratos no LCE e arena. Na linhagem Wistar, o efeito do estresse foi mais evidente do que na linhagem S-D. O mesmo deve ser levado em consideração em todos os presentes estudos, na medida em que utilizados diferentes linhagens de ratos, algumas possivelmente mais suscetíveis aos efeitos do estresse do laboratório. Klenerová e colaboradores (Trnecková *et al.*, 2004) demonstraram que a imobilização sozinha ou decorrente da combinação com o frio reduziu a locomoção espontânea e a investigação do ambiente de ratos Wistar testados logo após uma sessão curta com estes estressores. Os ratos Lewis, por sua vez, quando expostas a estes mesmos estressores exibiram uma redução inicial do comportamento exploratório. Este pode ser um bom modelo comportamental para o estudo das bases do estresse pós-traumático. Uma das medidas para aliviar os efeitos de prováveis estressores foi a redução da intensidade luminosa durante os testes comportamentais deste trabalho.

O presente estudo mostrou que o teste do corredor linear foi capaz de detectar diferenças significativas nos comportamentos agressivo e exploratório tanto em relação às linhagens quanto às gerações.

## REFERÊNCIAS

- Baum AE, Solberg LC, Churchill GA, Ahmadiyah N, Takahashi JS, Redei EE (2006). Test- and behavior-specific genetic factors affect WKY hypoactivity in tests of emotionality. *Behav Brain Res* 169: 220-230.
- Beda X, Márquez C, Armario A (2004). Long-term effects of a single exposure to stress in adult rats on behavior and hypothalamic-pituitary-adrenal responsiveness: comparison of two outbred rat strains. *Behavior Brain Research*, 154: 399-408.
- Berrettini WH, Harris N, Ferraro TN, Vogel WH (1994). Maudsley reactive and non-reactive rats differ in exploratory behavior but not in learning. *Psychiatr Genet* 4: 91-94.
- Blanchard DC e Blanchard RJ (1984). Affect and aggression: An animal model applied to human behavior. Em: *Advances in the study of aggression*, ed. por Blanchard, R. J.; Blanchard, D. C., vol. 1. Orlando: Academic Press.
- Blanchard RJ, Flannelly KJ, Blanchard DC (1986). Defensive behaviors of laboratory and wild *Rattus norvegicus*. *J. Comp. Psychol.* 100:101–107.
- Blanchard R e Blanchard C (1989). Antipredator defensive behaviors in a visible burrow system. *J. Comp. Psychol.*, 103: 70-82.
- Blanchard DC (1997). Stimulus and environmental control of defensive behaviors. In: Bouton, M.; Fanselow, M., eds. *The functional behaviorism of Robert C. Bolles: Learning, motivation and cognition*. Washington, DC: American Psychological Association, 283–305.
- Blanchard RJ, Hebert MA, Ferrari P, Palanza P, Figueira, R, Blanchard DC, Parmigiani S (1998). Defensive Behaviors in Wild and Laboratory (Swiss) Mice: The Mouse Defense Test Battery. *Physiology & Behavior*, 65: 201–209.

- Blanchard RJ, Yang M, Li CI, Gervacio A, Blanchard DC (2001). Cue and context conditioning of defensive behaviors to cat odor stimuli. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 25: 587-595.
- Braw Y, Malkesman O, Dagan M, Bercovich A, Lavi-Avnon Y, Schroeder M, Overstreet DH, Weller A (2006). Anxiety-like behaviors in pre-pubertal rats of the Flinders Sensitive Line (FSL) and Wistar-Kyoto (WKY) animal models of depression. *Behav. Brain Res.*, 167: 261-269.
- Corda MG, Piras G, Lecca D, Fernandez-Teruel A, Driscoll P, Giorgi O (2005). The psychogenetically selected Roman rat lines differ in the susceptibility to develop amphetamine sensitization. *Behav Brain Res.*, 157: 147-156.
- Dal-Zotto S, Marti O, Armario A (2003). Glucocorticoides are involved in the long-term effects of a single immobilization stress on hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Psychoendocrinology*, 15: 411-18.
- de Boer SF e Koolhaas JM (2003). Defensive burying in rodents: ethology, neurobiology and psychopharmacology. *Eur J Pharmacol.*, 28:145-61
- Ferguson SA e Cada AM (2003). Spontaneously hypertensive rats (SHR) as a putative animal model of childhood hyperkinesis: SHR behavior compared to four other rat strains. *Physiol Behav.*, 54: 1047-1055.
- Ferreira A, Pereira M, Agrati D, Uriarte N e Fernández-Guasti A (2002). Role of maternal behavior on aggression, fear and anxiety. *Physiology and Behavior*, 77: 197-204.
- File SE (1992). Behavioural detection of anxiolytic action. Em 'Experimental Approaches to Anxiety and Depression', ed. por J.M. Elliott, D.J. Heal, e C.A. Mardsen. New York: John Wiley & Sons, 25-44.
- File SE (2003). Seth P. A review of 25 years of social interaction test. *Eur J Pharmacol.*, 463: 35-53.
- Guillot PV e Chapouthier G (1996). Intermale aggression and dark/light preference in ten inbred mouse strains. *Behavioural Brain Research*, 77: 211-13.
- Guitart-Masip M, Johansson B, Fernandez-Teruel A, Canete T, Tobena A, Terenius L et al (2006). Divergent anatomical pattern of D1 and D3 binding and dopamine- and cyclic AMP-regulated phosphoprotein of 32 kDa mRNA expression in the Roman rat strains: Implications for drug addiction. *Neuroscience*, 142: 1231-1243.

- Harro J (1993). Measurement of exploratory behaviour in rodents. In: Conn RA, editor. *Methods in neurosciences*, vol. 14. San Diego: Academic Press, Inc., 359–77.
- Krauchi K, Wirz-Justice A, Willener R, Campbell IC, Feer H (1983). Spontaneous hypertensive rats: behavioral and corticosterone response depend on circadian phase. *Physiol Behav.*, 30: 35-40.
- Kulikov, AV, Kozlachkova EY, Popova NK (1992). Activity of tryptophan hydroxylase in brain of hereditary predisposed to catalepsy rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 43: 999–1003.
- Malkesman O, Braw Y, Zagoory-Sharon O, Golan O, Lavi-Avnon Y, Schroeder M (2005). Reward and anxiety in genetic animal models of childhood DEPRESSION. *Behav Brain Res.*, 164: 1-10.
- Miczek KA, Weerts E, Haney M, Tidy J (1994). Neurobiological mechanisms controlling aggression: preclinical developments for pharmacotherapeutic interventions, *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 18: 97-110.
- Mitchell D (1976): Experiments on neophobia in wild and laboratory rats: a reevaluation. *J Comp Physiol Psychol.*, 90: 190-97.
- Onuki Y, Kato K e Makino J (2005). Influence of food type on food-carrying behavior in rats (*Rattus norvegicus*). *Behavioural Processes*, 70: 182-85.
- Panksepp J (1998). *Affective neuroscience*. New York: Oxford University Press, Inc., , 466.
- Popova NK, Avgustinovich DF, Kolpakov VG e Plyusnina IZ (1998). Specific [H]8-OH-DPAT Binding in Brain Regions of Rats Genetically Predisposed to Various Defense Behavior Strategies. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 59: 793–797.
- Rebouças RC, Schmidek WR (1997). Handling and isolation in three strains of rats affect open-field, exploration, hoarding and predation. *Physiol Behav.*, 62: 1159-1164.
- Sagvolden T, Pettersen MB, Larsen MC (1993). Spontaneously hypertensive rats (SHR) as a putative animal model of childhood hyperkinesis: SHR behavior compared to four other rat strains. *Physiol Behav.*, 54: 1047-1055.

- Stam R, van Laar TJ, Akkermans LM e Wiegant VW (2002). Variability factors in the expression of stress-induced behavioural sensitisation. *Behav Brain Res.*, 132: 69-76.
- Stohr T, Schulte WD, Weiner I, Feldon J (1998). Rat strain differences in open-field behavior and the locomotor stimulating and rewarding effects of amphetamine. *Pharmacol Biochem Behav.*, 59: 813-818.
- Trnecková L, Klenerová V, Krejci I, Sida P, Hlinak Z, Hynie S (2004). Effects of two types of restraint stress on the spontaneous behaviour in rats, *Acta Medica*, 47: 177-180.
- Viggiano D, Vallone D, Ruocco LA, Sadile AG (2003). Behavioural, pharmacological, morpho-functional molecular studies reveal a hyperfunctioning mesocortical dopamine system in an animal model of attention deficit and hyperactivity disorder. *Neurosci.Biobehav.Rev.*, 27: 683-89.
- Whishaw IQ, Gharbawie OA, Clark BJ, Lehmann H (2006). The exploratory behavior of rats in an open environment optimizes security. *Behavioural Brain Research*, 171: 230–239.
- Zamudio S, Fregoso T, Miranda A, De La CF, Flores G (2005). Strain differences of dopamine receptor levels and dopamine related behaviors in rats. *Brain Res Bull.*, 65: 339-347.

**ESTUDO V****COMPORTAMENTOS AGRESSIVOS DE RATOS SELVAGENS****(*Rattus norvegicus sp*), WISTAR E HÍBRIDOS NO TESTE****RESIDENTE-INTRUSO**

## RESUMO

**Introdução:** Os comportamentos de agressão e defesa têm uma função crucial na sobrevivência da espécie, tanto no que diz respeito à defesa dos membros quanto à conquista de um território e estabelecimento de hierarquias sociais. Contudo, os comportamentos agressivos foram grandemente atenuados, ou quase abolidos, nas linhagens domesticadas para fins de pesquisa. **Objetivo:** O presente estudo utilizou o paradigma residente-intruso para examinar as diferenças nos comportamentos de agressão territorial dos ratos selvagens (SEL), Wistar (WIS) e respectivos híbridos (HBR). **Método:** Os ratos das linhagens acima eram alojados individualmente (residentes) numa caixa de madeira (100 x 40 x 40 cm) com teto e frente de vidro e assoalho coberto com maravalha. Após um período de 5 dias, introduzia-se outro rato (intruso), das linhagens acima, e registrava-se os comportamentos por um período de 2 minutos por meio de câmeras situadas dentro e fora da caixa. Os filmes foram analisados em câmera lenta, registrando-se a frequência dos comportamentos ofensivos e defensivos de ambos os ratos. As frequências foram comparadas por meio de análise de variância de 2 vias (linhagem e status). A correlação entre os comportamentos foi examinada por análise de fator. **Resultados:** Os comportamentos de aproximar, ameaça lateral, perseguir e salto de ataque foram única ou majoritariamente emitidos pelos ratos residentes SEL. Em contraste, submissão, fuga de galope, fuga de trote e ataque supino foram única ou predominantemente exibidos pelos intrusos SEL. Embora mais frequentes nos ratos SEL residentes, os comportamentos de gritar, morder, boxear, chiar e expor presas foram apresentados tanto pelos residentes quanto intrusos. O repertório do intruso SEL diferiu marcadamente dos repertórios WIS e HBR. Contudo, os últimos foram similares. Os 4 fatores principais dos ratos residentes SEL foram responsáveis por 66,4% da variância. O Fator-I carregou forte e positivamente em ameaça lateral, salto de ataque, fuga de trote e boxear, representando o repertório fundamental do rato residente SEL. Contudo, o Fator-II carregou positivamente em aproximar e expor presas (ítems ofensivos), mas negativamente em boxear e fuga de trote (ítems defensivos), sugerindo que os últimos sejam os ítems de defesa do residente SEL aos contra-ataques dos intrusos da mesma linhagem. O Fator-III mostrou que chiar correlaciona-se tanto com os ítems ofensivos (salto de ataque) quanto

defensivos (boxear) do rato SEL residente. Por fim, o Fator IV carregou fortemente em morder e perseguição ao rato intruso, mostrando que a perseguição ao intruso freqüentemente resulta em danos físicos. O Fator-I dos ratos SEL intrusos carregou forte e positivamente nos comportamentos de fuga de trote e morder, sugerindo que as mordidas são o recurso final à perseguição do residente. O Fator-II carregou positivamente em submissão, mas forte e negativamente em ataque supino e fuga de galope, indicando que a tendência à submissão inibe as últimas respostas. O Fator-III mostrou uma correlação inversa das respostas de morder com chiar, boxear e submissão, sugerindo que estas desempenham funções 'apaziguadoras' e protetoras contra danos físicos. Os fatores principais dos ratos WIS carregaram forte e positivamente nas variáveis de defesa ou agressão defensiva. O Fator-I representou repertório central de defesa dos ratos WIS no modelo residente-intruso (fuga de trote, boxear e ataque supino) O Fator-II revelou uma correlação inversa de aproximar (ofensa) e submissão (defesa). Como a aproximação não ocorreu no intruso SEL, o rato WIS é menos ansioso, tem dificuldades em reconhecer o rato hostil ou ambas as coisas. Por fim, o Fator-III associou fuga de galope à resposta de morder, sugerindo que a mordida é um recurso do rato WIS encurralado pelo residente. Nos intrusos HBR, a fuga de trote correlacionou-se positivamente com gritar e morder (F-I) mas, diferentemente dos SEL e WIS, negativamente com boxear e submissão (F-II). Portanto, enquanto o fator I corresponde à defesa ativa do intruso, o fator II representa a tática apaziguadora, na qual a fuga de trote é substituída por boxear e submissão. Os intrusos HBR também apresentaram freqüências significativas de aproximação ao residente (F-IV). Contudo, ao contrário dos ratos WIS, a aproximação correlacionou-se com gritar, indicando o reconhecimento manifesto da hostilidade do rato residente. Curiosamente, enquanto gritar não carregou em nenhum fator dos intrusos WIS e SEL, chiar carregou no Fator-III dos intrusos SEL. Portanto, gritar pode ser um produto da hibridização mediante a modificação da resposta de chiar dos ancestrais SEL.

**Palavras-chaves: Agressão, Defesa, Modelo Residente-Intruso, Ratos Selvagens, Ratos Domesticados.**



## INTRODUÇÃO

O comportamento agressivo tem uma função crucial na aquisição e defesa de um território, do status social e das fontes vitais para a sobrevivência, tais como, alimento, abrigo ou parceiros sexuais (Alcock, 2005, Adams e Boice, 1983, Brown, 1986, Clarck e Price, 1981). Contudo, os contatos agressivos podem resultar em ferimentos severos e mesmo morte dos indivíduos (Siegel *et al.*, 1999). Assim, principalmente nos mamíferos, Parece existir poderosos mecanismos inibitórios para reconciliação e apaziguamento, que mantêm o repertório agressivo sobre intenso controle, prevenindo resultados fatais (Alcock, 2005, Adams e Boice, 1983, Brown, 1986, Clarck e Price, 1981). Isto pode ser comprovado pelo fato dos animais selvagens raramente morrerem num embate intraespecífico (Blanchard e Blanchard, 1984).

Em contrapartida, formas inapropriadas de agressão (violência), tanto intrapessoal quanto interpessoal são altamente prevalentes nos seres humanos. A cada ano estima-se que 1,6 milhões de pessoas morrem em decorrência de ferimentos resultantes de relações violentas da vida cotidiana. A violência é a principal causa de morte entre pessoas de 14 a 44 anos de idade em todo o mundo - 14% nos homens e 7% mulheres (Filley *et al.*, 2001). Clinicamente, a agressão patológica aparece como sintoma de vários distúrbios psiquiátricos, quais sejam, traumatismos cranianos, retardo mental, doença de Huntington, demência, transtorno bipolar, esquizofrenia e quadros de dependência química (Filley *et al.*, 2001).

O interesse científico pela agressão investiga os mecanismos de

controle sociais, neurais e moleculares da agressão. Os recentes avanços da biologia molecular e da genética aumentaram dramaticamente a lista de neurotransmissores, hormônios e outros sinais biológicos envolvidos nos circuitos neurais que influenciam a agressão (Dorine *et al.*, 2003, van der Staay, 2006). Portanto, o desenvolvimento de modelos animais adequados para o estudo dos comportamentos agressivos normais e patológicos tornou-se uma necessidade inquestionável para os avanços ulteriores da biologia molecular. Presumivelmente, o modelo ideal seria aquele que expressasse uma agressão intensa e impulsiva que excederia os padrões ou níveis normais da espécie (Dorine *et al.*, 2003).

O comportamento agressivo pode ser um ataque real, ou simplesmente envolver comportamentos de ameaça, quais sejam, posturas e gestos (Huntingford e Turner, 1987, Blanchard *et al.*, 1977). O animal ameaçado pode apresentar comportamentos de agressão defensiva ou de submissão, qual seja, uma postura indicativa do reconhecimento da derrota (de Boer *et al.*, 2003). No ambiente natural, a maioria dos animais apresenta mais ameaças do que ataques verdadeiros (Huntingford e Turner, 1987, Blanchard e Blanchard, 1977). As ameaças são úteis para reforçar as hierarquias sociais, em grupos organizados de animais, ou para avisar aos intrusos para ficar longe de um território. Eles têm a vantagem de não envolver lutas verdadeiras que poderiam ferir um ou ambos os combatentes (McFarland, 1986).

Do ponto de vista etológico, o confronto pode ser dividido em duas categorias de acordo com a intensidade do combate (Blanchard e Blanchard, 1990). Os encontros pouco intensos e de curta duração caracterizam-se por perseguições curtas. Quando os combates são mais

intensos, os contatos físicos aparecem com mais vigor, destacando-se o comportamento de boxear, saltos, mordidas e vocalizações (Pellis e Pellis, 1987). O objetivo do agressor é infligir uma mordida na anca, enquanto o objetivo do defensor é se prevenir da mesma (Blanchard *et al.*, 1975, Takahashi e Blanchard, 1982).

O comportamento agonístico de ratos albinos ou selvagens consiste em ameaças e ataques desferidos contra o oponente (Blanchard e Blanchard, 1981). Foi demonstrado, ainda, que o tipo de ataque, assim como os alvos corporais, diferem entre o atacante e o atacado (Blanchard *et al.*, 1987 ab). Resumidamente, os ratos atacados tendem a concentrar suas mordidas na região da cabeça do adversário, enquanto os atacantes têm como alvo a região do dorso do oponente.

Quando lidamos com quantidades maiores de ratos, por exemplo, uma colônia, a observação de outros padrões comportamentais é comum (Lore *et al.*, 1984). Em seus estudos clássicos com colônias de ratos, Barnett (1958, 1975) detectou duas estratégias empregadas por machos subordinados contra o macho dominante. Os machos subordinados, denominados 'ômega', esquivavam-se ao máximo do rato dominante. Quando ocorria um encontro entre ambos, a luta era muito provável, vitimando o macho subordinado na maior parte das vezes (Blanchard e Blanchard, 1990). Assim, quando têm oportunidade, os machos ômega preferem emigrar para outras colônias. Quando os encontros são inevitáveis, as lutas acumulam-se, resultando, geralmente, na morte do macho ômega (Adams e Boice, 1983). Contudo, se o rato dominante for retirado da colônia, um dos ratos ômega torna-se dominante (Meaney e Stewart, 1981, Pellis e Pellis, 1987). Ao contrário, os machos 'beta'

são totalmente submissos ao rato dominante que, conseqüentemente, demonstra grande tolerância com a presença dos primeiros (Meaney e Stewart, 1981, Pellis e Pellis, 1987).

Estas estratégias têm diferentes custos e benefícios. Para os subordinados beta, a vida torna-se mais pacífica, tendo maiores oportunidades de acesso tanto à comida quanto às fêmeas (Switzer *et al.*, 2001, Johnson *et al.*, 2003). Os machos ômega, em contrapartida, tendem a ser os principais alvos da agressão do macho dominante (Meaney e Stewart, 1981, Pellis e Pellis, 1987). Contudo, o macho ômega tem melhores possibilidades de ascender ao status de dominante (Pellis *et al.*, 1993). A adoção de uma ou outra estratégia por parte dos machos subordinados depende de fatores genéticos que manifestam-se no temperamento individual destes ratos (Meaney e Stewart, 1981, Pellis e Pellis, 1987). Fatores físicos tais como, por exemplo, idade, peso e tamanho, também desempenham um papel importante nestes comportamentos (Stewart e Palfai, 1967).

Os comportamentos agressivos decorrentes do encontro entre um rato residente e um intruso parecem ter uma função de proteção dos eventuais recursos alimentícios, de abrigo ou acesso às fêmeas. Os ratos residentes tendem a atacar os ratos intrusos de mesmo sexo (DeBold e Miczek, 1984). Os machos residentes tendem a se aproximar e reconhecer as ratas residentes com o intuito de reprodução. Quando ocorre, o comportamento agressivo de machos residentes contra fêmeas é bastante fugaz (Flannelly e Lore, 1977). No caso de ratos selvagens, Telle (1986) demonstrou que estes também desferem ataques violentos contra ratos domésticos intrusos. Contudo, estes ataques não duram por muito tempo e não são graves, com a predominância de

perseguições curtas.

Por outro lado, os ratos intrusos raramente atacam os ratos residentes. Quando confrontados, estes utilizam todo o seu tempo na defesa contra o macho residente (Takahashi e Blanchard, 1982). A agressão do macho residente depende da idade. Machos com idade entre 5 e 6 meses demonstram um nível moderado de agressão contra o intruso. Este comportamento agressivo aumenta acentuadamente após este período, tornando-se estável até 20 meses de idade. Em idades posteriores, os machos residentes atacam os intrusos de maneira mais rápida e ríspida (Blanchard *et al.*, 1988). Aparentemente, a agressão entre fêmeas não apresenta o aumento progressivo dos níveis de agressividade.

No que se refere às localizações das mordidas desferidas pelos ratos residentes, cerca de 61% delas concentram-se na parte da anca, cauda e região anal; 24% nos membros posteriores e 15% no dorso e cabeça (Robitaille e Bovet, 1976, Pellis e Pellis, 1987).

Contudo, quase todos os modelos experimentais de agressão envolvendo roedores foram realizados com ratos e camundongos domesticados oriundos de biotérios e, portanto, dóceis. As linhagens de ratos de todos os laboratórios, tanto provenientes de cruzamentos endogâmicos (*inbred*) quanto não-endogâmicos (*outbred*), foram severamente alteradas em virtude do processo de seleção artificial (Castle, 1947, Galef, 1971, Boice, 1972, 1977, Sgoifo *et al.*, 2001). Assim, os experimentadores freqüentemente submetem estes animais às mais variadas formas de estresse para a obtenção de níveis maiores de agressão, quais sejam, isolamento social, procedimentos de provocação com estímulos mecânicos ou choques, estimulação

intracraniana elétrica ou química, administração de agentes farmacológicos ou inativação de genes específicos (*knockout*) (Kruk *et al.*, 1984). Por exemplo, Mos e colaboradores (1984) demonstraram que a proporção das mordidas desferidas pelo rato residente na parte inferior do dorso do intruso (57%) podia ser modificada pela vibrissectomia ou administração de anfetamina no rato residente. Adicionalmente, estas manipulações aumentavam o número de ataques, deslocando os alvos para as regiões mais caudais do oponente.

Todavia, estas metodologias resultam de variáveis que não são, necessariamente, características da espécie (Baker *et al.*, 1979, Bhatnagar e Vining, 2003). A abordagem alternativa consiste no desenvolvimento de modelos comportamentais com populações de roedores naturalmente agressivos (Baker *et al.*, 1979). Esta abordagem, baseada em linhagens endogâmicas, fornece a matéria-prima para o estudo de genes de traços quantificáveis (*QTL, quantitative trait loci*) (Ramos e Mormède, 2007).

Uma luta entre dois machos no modelo residente-intruso é formada de atos e posturas (Everts *et al.*, 1997, Koolhaas *et al.*, 1997, de Boer e Koolhaas, 2003, van der Vegt *et al.*, 2003). A primeira atitude tomada pelo agressor é a exposição e tilitar, ou ranger, de dentes (*teeth-chattering*). Este comportamento ocorre concomitantemente à postura imóvel eliciada pela detecção do intruso. Presumivelmente, serve de advertência, visual e sonora, para manter o rato intruso à distância. Em alguns casos, este comportamento ocorre quando os machos desistem da luta, mantendo apenas as ameaças (Everts *et al.*, 1997, Koolhaas *et al.*, 1997, de Boer e Koolhaas, 2003, van der Vegt *et al.*, 2003). No estágio seguinte, o residente apresenta o comportamento de ameaça lateral (*lateral threat*) (Thor e Flannelly, 1976), qual seja, ele arqueia

o dorso acentuadamente e estende os membros, dirigindo o flanco contra o oponente. Mantendo esta postura, ele aproxima-se lateralmente e com passos curtos do intruso (Koolhaas *et al.*, 1997). Trata-se de um comportamento bastante elaborado e presente também no *Rattus rattus* e no *Mus musculus* (Nikoletseas e Lore, 1981). Assim como outros comportamentos, ele tem uma clara função de ameaça, evitando a luta propriamente dita (Lore *et al.*, 1984).

Caso contrário, iniciam-se os ataques e mordidas. O atacante salta sobre o rato intruso, chocando-se com este numa sucessão de rápidas investidas (Koolhaas *et al.*, 1997). As mordidas geralmente direcionam-se para os membros e regiões laterais e dorsais do intruso, mas raramente para a face. Uma mordida típica de um rato é bastante rápida, tão logo a mandíbula se fecha, ela abre-se para uma nova investida. Quando o atacante é, adicionalmente, um rato muito agressivo, as mordidas ocorrem em seqüência, sem intervalos. Às mordidas, seguem-se movimentos corporais ferozes de ambos os ratos (Everts *et al.*, 1997, Koolhaas *et al.*, 1997).

Após o momento de ataque, os ratos podem distanciar-se por um instante, e rerepresentar as posturas de ataque e defesa (Geisler *et al.*, 1993, Switzer *et al.*, 2001). Caso reiniciem o combate, exibem o comportamento de boxear, no qual ambos os ratos se levantam sobre os membros traseiros, emitindo vocalizações, rápidas mordidas e patadas com os membros dianteiros. Esta seqüência pode, no entanto, sofrer variações (Everts *et al.*, 1997, Koolhaas *et al.*, 1997).

Com o intuito de desenvolvimento de linhagens isogênicas de derivação selvagem, realizamos um estudo preliminar dos comportamentos agressivos e defensivos de ratos Wistar (WIS), selvagens (SEL) e híbridos

destas linhagens (HBR), utilizando o paradigma residente-intruso de defesa territorial.

## **MÉTODOS**

### *Animais.*

Os experimentos foram realizados com ratos machos, adultos, sendo 15 residentes e 15 intrusos da linhagem selvagem (SEL, *Rattus norvegicus sp*), 15 residentes e 10 intrusos da linhagem Wistar (WIS, *Rattus norvegicus albinus*) e 25 residentes e 10 intrusos da linhagem híbrida (HBR) resultante do cruzamento dos ratos SEL e WIS. Os ratos WIS foram fornecidos pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo. Os ratos SEL foram os descendentes de ratos noruegueses capturados numa granja avícola das cercanias de Vitória, porém, nascidos no biotério do Laboratório de Neurobiologia. Todos os procedimentos do presente estudo respeitaram as normas estabelecidas pelo International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals (CIOMS) - Genebra (1985), e atualmente está sendo analisada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA), da Faculdade de Medicina EMESCAM, Vitória, ES.

### *Registros Comportamentais*

Foi utilizada uma caixa de madeira (100 x 40 x 40 cm) com paredes frontais e superiores de vidro para permitir a observação dos comportamentos. O rato residente foi alojado nesta caixa por um período de 5



dias, no qual teve livre acesso à água e comida e demarcou o seu território. No dia do experimento, a caixa era dividida em compartimentos iguais por meio de uma divisória removível. Em seguida, o rato intruso era inserido no compartimento vazio, no qual permanecia por 10 minutos. Passado este período, a divisória era removida por 2 minutos, possibilitando o confronto dos animais. As sessões foram filmadas por uma câmera VHS (JVC®, GR-SX887UM, JAPAN), posicionada externamente à caixa e por uma webcam (Elgin CVC-2300, 300k pixels, 640 x 480, sensor CMOS colorido, USB 1.1) posicionada no seu interior. As sessões foram analisadas e quantificadas *a posteriori*. A frequência de comportamentos previamente descritos num etograma (Tab.1) foi registrada em planilha específica (Anexo). Todos os experimentos foram realizados entre o período de 14:00 e 17:00 hs, e a iluminação foi mantida em 14 lux.

Tabela 1. Etograma dos comportamentos no teste de agressão residente-intruso.

Comportamento	Descrição
Aproximação	Marcha lenta do animal em direção frontal, ou ortogonal, ao oponente.
Ameaça Lateral	Aproximação lateral ao oponente, em passos curtos, com membros estendidos, dorso arqueado e, frequentemente, piloereção.
Perseguição	Locomoção de velocidade moderada ou rápida em direção ao oponente, podendo conservar o padrão de projeção contralateral dos membros típico da marcha dos quadrúpedes, ou alternando movimentos de apoio e projeção dos membros anteriores e posteriores, em forma de galope.
Fuga de trote	Fuga em velocidade moderada e padrão do trote.
Fuga de galope	Fuga em velocidade moderada e padrão do galope.
Salto de ataque	Projeção oblíqua em direção ao oponente.
Morder	Contato ou penetração dos dentes no oponente.

Ataque Supino	O animal apoia o dorso na parede ou assoalho da caixa e rechaça o oponente com as patas traseiras, projetando-o para longe.
Boxear	Postura ereta de oposição frontal ao oponente, na qual o rato apóia-se sobre as patas traseiras estendidas e atinge o oponente com uma série patadas com os membros dianteiros.
Submissão	O animal apoia o dorso na parede ou assoalho da caixa, permanecendo imóvel, sem rechaçar o oponente.

Com relação ao comportamento de morder, ele se refere ao número de mordidas desferidas pelos ratos sob análise (por ex., SEL residentes). Contudo, esta distinção não existe na análise da população total de ratos SEL. Foram utilizados ratos residentes e intrusos das 3 linhagens.

### *Análise Estatística*

A frequência dos comportamentos foi examinada por análise de variância de 2 vias (linhagem e status) seguida de testes-t de Bonferroni. As diferenças foram consideradas significantes para o nível de 5%.

As correlações entre os comportamentos agressivos foram examinadas por análise de fator. Como esta análise é mais adequada para amostras grandes, ela foi conduzida tanto para a população total ( $n=45$ ), quanto para as linhagens individuais, descritas acima. Contudo, devido ao número pequeno de ratos residentes WIS e HBR ( $n=10$ ), a análise de fator não foi realizada para estes grupos. Os dados foram submetidos à análise de componente principal, excluindo-se os comportamentos com variância condicional zero do respectivo grupo. Em seguida, procedeu-se à análise de fator, fixando-se o número de fatores com base no número de componentes principais com autovalores (*eigenvalues*) maiores que 1 (método mineigen) e

com auxílio de 'gráficos de sopé' (*scree plots*). Os fatores principais foram submetidos à rotação ortogonal (método varimax), para a determinação das contribuições independentes de cada fator à variância, e estes à rotação oblíqua (método promax). Os fatores foram interpretados com base na estrutura de fator da rotação ortogonal e/ou estrutura de referência da rotação oblíqua. As tabelas só apresentam os coeficientes com valores absolutos maiores que 0,35. Os gráficos representam a estrutura de referência da rotação oblíqua. Portanto, variáveis cujos coeficientes foram inferiores a 0,35 (valor absoluto) em todos os fatores da estrutura de referência não foram representadas nas figuras.

Os procedimentos estatísticos (análises de variância e fator) foram realizados com o programa SAS (Statistical Analysis Systems, Cary, EUA).

## **RESULTADOS**

### *Influência da Linhagem nos Comportamentos de Agressão Territorial*

As freqüências de resposta dos ratos SEL residentes foram bastante distintas dos outros grupos, incluindo aquelas dos ratos intrusos da mesma linhagem (Fig.1, Tab.2). Os comportamentos de aproximar, ameaça lateral, perseguir e salto de ataque foram única ou majoritariamente emitidos pelos ratos residentes (Fig.1, Tab.2). Em contraste, submissão, fuga de galope, fuga de trote e ataque supino foram única ou predominantemente exibidos pelos ratos intrusos. De fato, nos ratos residentes, os primeiros

comportamentos não ocorreram e os últimos apresentaram freqüências negligenciáveis. Embora mais freqüentes nos ratos SEL residentes, os comportamentos de gritar, morder, boxear, chiar e expor presas foram apresentados tanto pelos residentes quanto intrusos.

O repertório dos ratos WIS e HBR foi bastante similar (Fig.1). Contudo, os HBR intrusos apresentaram freqüências maiores de fuga de trote, morder, boxear e ataque supino. Com poucas exceções, as freqüências dos comportamentos dos ratos SEL, WIS e HBR diferiram de forma acentuada e significativa tanto em relação à linhagem quanto ao status do animal, ou à interação destes fatores (Fig.2, Tab.2). Os comportamentos de aproximar, gritar, perseguir, salto de ataque, boxear, fuga de trote e morder diferiram significativamente quanto à linhagem, status e interação destes fatores ( $P < 0,0001$ ). Em contraste, o ataque supino só diferiu quanto ao status ( $P < 0,0001$ ) e interação de status e linhagem ( $P < 0,0001$ ). Por outro lado, galope e submissão diferiram significativamente quanto à linhagem e status ( $P < 0,0001$ ), mas não quanto à interação destes fatores. Por fim, embora exposição de presas e chiar tenham sido mais freqüentes nos ratos residentes (SEL), a primeira diferiu apenas marginalmente quanto ao status ( $P < 0,05$ ) e nenhuma diferiu quanto à linhagem ou apresentou interações significativas.

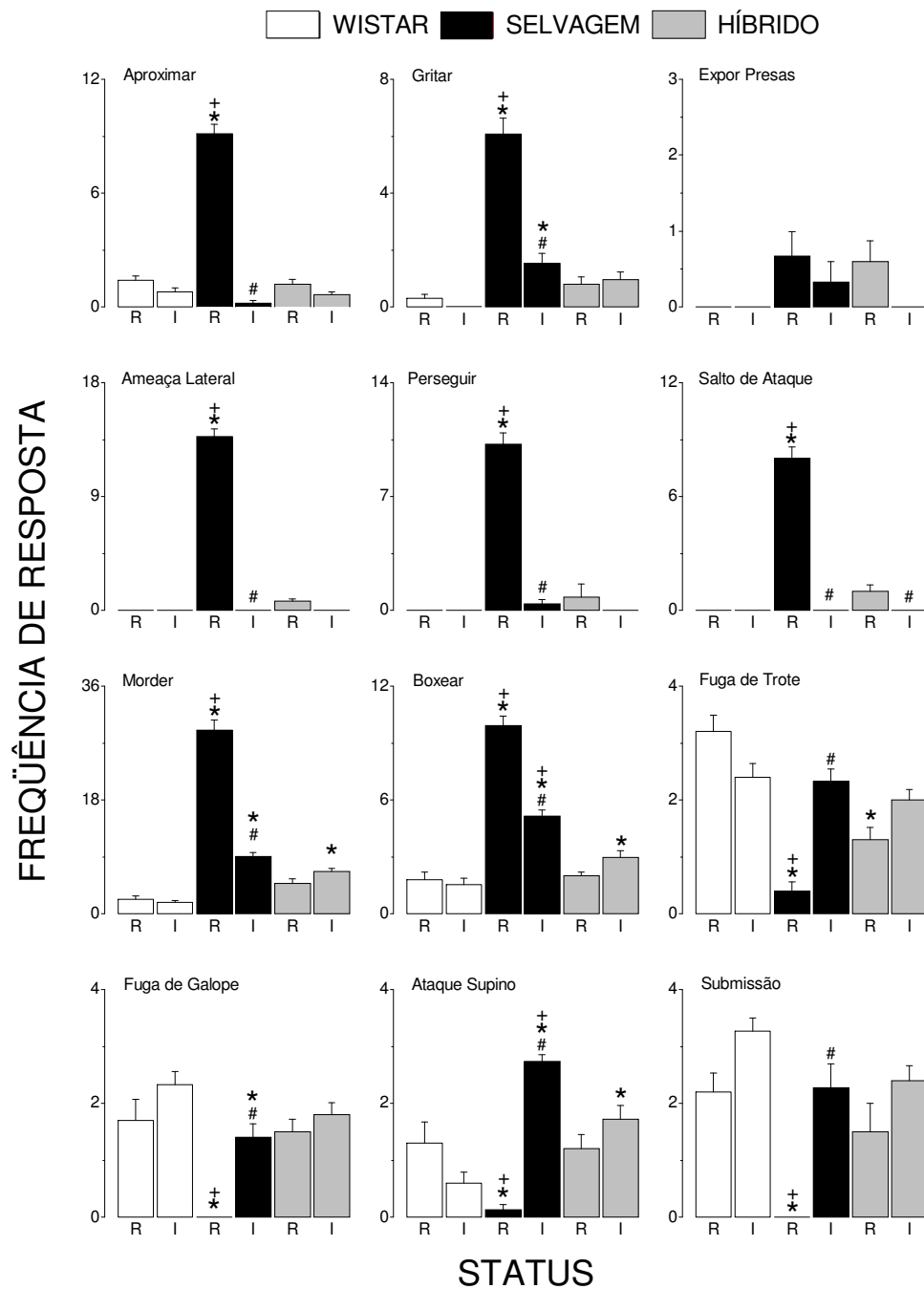


Fig. 1. Frequências médias das respostas agressivas ( $\pm$ EPM) de ratos WIS, SEL e HBR, residentes ou intrusos, confrontados a oponentes de várias linhagens. \*  $P < 0,05$ , significativamente diferente dos ratos Wistar do mesmo status, + significativamente diferente dos ratos híbridos do mesmo status, # significativamente diferente dos ratos residentes da mesma linhagem (ANOVA seguida por testes *post hoc* de Bonferroni).

Tabela 2. Frequências absolutas e porcentagens dos comportamentos de agressão territorial dos ratos SEL no teste residente-intruso. R – residente, I – intruso.

Comportamentos		Frequência (número)		Proporção (%)	
		R	I	R	I
Repertório Típicamente 'Residente'	Ameaça Lateral	206	0	100	0
	Salto de Ataque	120	0	100	0
	Aproximar	137	3	97,9	2,1
	Perseguir	153	6	96,2	3,8
Repertório Misto	Gritar	91	23	79,8	20,2
	Morder	436	136	76,2	23,8
	Boxear	149	77	65,9	34,1
	Chiar	14	8	63,6	36,4
	Expor presas	10	5	66,7	33,3
Repertório Típicamente 'Intruso'	Fuga de Trote	6	35	14,6	85,4
	Ataque supino	2	41	4,6	95,4
	Fuga de Galope	0	21	0	100
	Submissão	0	34	0	100

#### *Análise de Fator dos Comportamentos de Agressão Territorial*

Os fatores principais da rotação ortogonal da população total de ratos SEL (residentes e intrusos) foram responsáveis por 77,1% da variância dos comportamentos agonísticos (Tab.3). Respectivamente, os fatores I, II e III contribuíram individualmente com 53,5%, 14,2% e 9,4% da variância. A rotação oblíqua simplificou a estrutura de fator de forma considerável. Adicionalmente, 3 fatores principais foram responsáveis por 100% da variância. De fato, o Fator-I da estrutura de referência carregou forte e positivamente na maioria dos itens ofensivos, mas negativamente nos itens defensivos de ataque supino, fuga de galope e submissão, virtualmente ausentes nos ratos SEL residentes. Por sua vez, os Fatores II e III revelaram correlações positivas da ameaça lateral com expor presas (Fator-II), mas negativa com chiar (Fator-III).

Tabela 3. Fatores principais do comportamento de agressão territorial da população total de ratos SEL (residentes e intrusos,  $n=30$ ) confrontados a várias linhagens. Os coeficientes da rotação ortogonal (varimax) são as correlações com os fatores da estrutura de fator (*factor structure*). Os coeficientes da rotação oblíqua (promax) são as correlações semiparciais com os eixos da estrutura de referência (*reference structure*). Coeficientes com valores absolutos maiores que 0,35 foram excluídos. Os comportamentos estão ordenados de acordo com coeficientes decrescentes do Fator-I da rotação ortogonal. VR – variância residual devida aos fatores específicos.

	Rotação Ortogonal				Rotação Oblíqua			
	I	II	III	VR	I	II	III	VR
Aproximar	0,90				0,76			
Fuga de Trote	0,89	0,37			0,74			
Perseguir	0,84				0,68			
Salto de Ataque	0,83	0,35	0,39		0,64			
Boxear	0,80		0,38		0,70			
Gritar	0,63	0,51	0,46		0,41			
Ameaça Lateral		0,69				0,68	-0,36	
Chiar			-0,64				0,60	
Expôr Presas		0,75				0,69		
Fuga de Galope	-0,73				-0,65			
Morder	-0,86				-0,82			
Submissão	-0,86				-0,85			
Ataque Supino	-0,92				-0,83			
Variância (%)	53,5	14,2	9,4		60,0	24,2	21,9	
Var.Acumulada (%)	53,5	67,7	77,1	22,9	60,0	84,2	106,1	---

A análise de fator dos ratos SEL segundo a condição de residente ou intruso mostrou uma segregação muito clara dos comportamentos ofensivos do residente e os defensivos do rato intruso (Tabs.4-5), corroborando a correlação inversa destes comportamentos no Fator-I da população total de ratos. Os fatores ortogonais principais dos ratos SEL residentes foram responsáveis por 66,4% da variância (Tab.4), dos quais os fatores I e II foram responsáveis por 28,6 e 14,9% da variância, representando o comportamento predominante deste grupo, e os fatores III e IV por 14,6% e 8,4% da variância. Com base na estrutura de referência, o Fator-I carregou fortemente em ameaça lateral, salto de ataque, gritar e fuga de trote. Em contraste, o Fator-II carregou

fortemente em aproximar e expor presas mas, negativamente, em fuga de trote e boxear. Por fim, enquanto o Fator-III correlacionou salto de ataque com boxear e chiar, o Fator-IV carregou fortemente em morder e perseguição ao rato intruso.

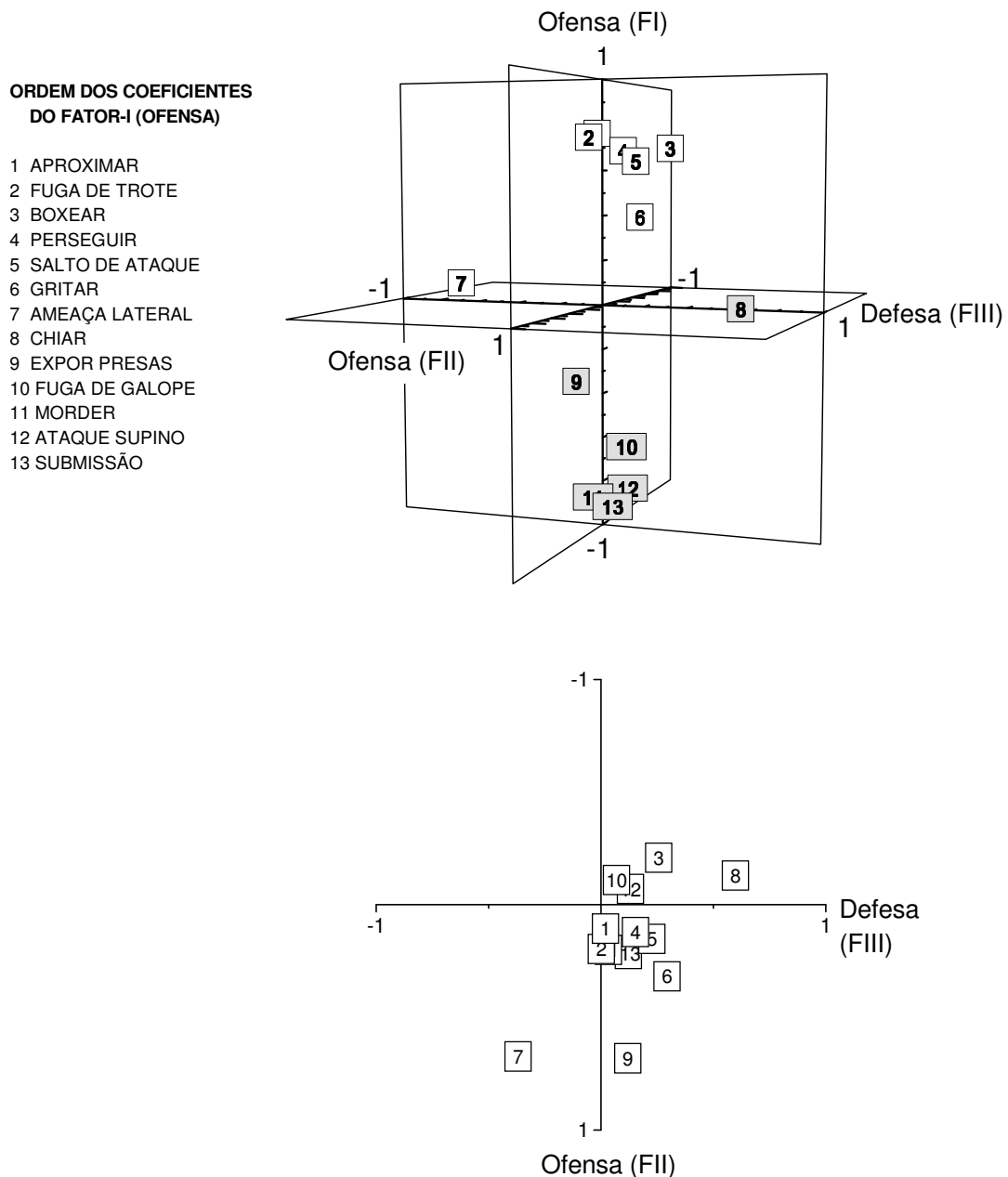


Figura 2. Fatores dos comportamentos agressivos do teste residente-intruso da população total de ratos selvagens. Os símbolos de cores branca e cinza da figura superior representam as correlações positivas e negativas com o Fator-I, respectivamente. A figura inferior mostra a projeção plana dos coeficientes. A ordem dos coeficientes na legenda corresponde à ordem dos valores numéricos no Fator-I.



A Tabela 5 mostra os fatores principais dos ratos intrusos SEL, WIS e HBR. Os fatores ortogonais principais do comportamento agressivo dos intrusos SEL contribuíram 55,9% da variância, contribuindo individualmente com 22,5% (F-I), 16,9% (F-II) e 16,5% (F-III). Portanto, ao contrário dos ratos SEL residentes, nos quais os fatores específicos contribuíram com apenas 12,9% da variância, estes foram responsáveis por 44,1% da variância nos ratos intrusos da mesma linhagem (Tab.5). As respostas tipicamente ofensivas não foram apresentadas por estes ratos. Particularmente, o Fator-I carregou, forte e positivamente nos comportamentos defensivos de fuga de trote e morder, o Fator-II carregou positivamente em submissão, mas forte e negativamente em

Tabela 4. Comparação dos fatores principais do comportamento de agressão territorial dos ratos SEL residentes ( $n=15$ ). Os comportamentos foram agrupados segundo a Tabela 2. (-) comportamentos excluídos da análise de fator (variância condicionada zero). Demais detalhes como na Tabela 3.

	Rotação Ortogonal					Rotação Oblíqua				
	I	II	III	IV	VR	I	II	III	IV	VR
Ameaça Lateral	0,84					0,72				
Salto de Ataque	0,67		0,57			0,48		0,42		
Aproximar		0,69					0,67			
Perseguir	0,50		0,40	0,51					0,47	
Gritar	0,79					0,62				
Morder				0,72					0,72	
Boxear		-0,58	0,47				-0,55	0,47		
Chiar			0,77					0,72		
Expor Presas	0,56	0,60					0,49			
Fuga de Trote	0,69					0,68	-0,39			
Ataque Supino	-	-	-	-		-	-	-	-	
Fuga de Galope	-	-	-	-		-	-	-	-	
Submissão	-	-	-	-		-	-	-	-	
Variância	28,6	14,9	14,6	8,4		35,5	22,0	20,2	9,4	
Var.Acumulada	28,6	43,5	58,1	66,4	35,6	35,5	57,5	77,7	87,1	12,9

ataque supino e fuga de galope. Por fim, o Fator-III mostrou uma correlação inversa das respostas de morder com chiar, boxear e submissão. Neste sentido, é interessante notar que chiar correlacionou-se positivamente com boxear tanto no residente (Fator-II) quanto no intruso (Fator-III). Por sua vez,

morder correlacionou-se positivamente com a resposta de perseguir no rato residente (Fator-IV) e de fuga de trote no rato intruso (Fator-I). Em contraste, morder correlacionou-se negativamente com a resposta de submissão do rato intruso (Fator-III).

Os fatores ortogonais principais dos ratos WIS foram responsáveis por 49,9% da variância. Portanto, tal como os SEL intrusos, os fatores específicos contribuíram com uma parcela considerável da variância (50,1%). Exceto pela resposta de fuga de trote, que ocorre tanto em residentes quanto intrusos, os fatores I e III dos intrusos WIS carregaram forte e positivamente em ataque supino, boxear, fuga de galope e submissão. Contudo, o Fator-II revelou uma correlação negativa de submissão com a resposta de aproximar.

Os fatores ortogonais principais dos intrusos HBR foram responsáveis por 55,8% da variância, dos quais 46,2% foram devidos aos fatores I, II e III e 9,6% ao Fator-IV. Tal como os intrusos SEL, o Fator-I carregou em fuga de trote e morder. Contudo, o Fator-I também correlacionou-se com gritar, uma variável que não carregou em fator algum dos ratos intrusos das linhagens WIS e SEL. Tal como nos intrusos WIS, os intrusos HBR também aproximaram-se com certa frequência do rato residente. Contudo, diferentemente daqueles, nos quais a aproximação correlacionou-se de forma inversa com a submissão (F-II), nos intrusos HBR ela se correlacionou com gritar.

Tabela 5. Comparação dos fatores principais dos ratos intrusos SEL ( $n=15$ ), WIS ( $n=15$ ) e HBR ( $n=25$ ). Demais detalhes como na Tabela 3. As correlações marginais de morder e submissão dos fatores ortogonais dos intrusos SEL foram mantidas em consideração aos valores análogos da estrutura de referência.

Rotação Ortogonal	Selvagem				Wistar				Híbrido				
	I	II	III	VR	I	II	III	VR	I	II	III	IV	VR
Ameaça Lateral	-	-	-		-	-	-		-	-	-	-	
Salto de Ataque	-	-	-		-	-	-		-	-	-	-	
Aproximar	-	-	-			-0,61						0,57	
Perseguir	-	-	-		-	-	-		-	-	-	-	
Gritar					-	-	-		0,64				0,44
Morder	0,79		-0,33				0,53		0,78				
Boxear			0,60		0,43					-0,60			
Chiar			0,61		-	-	-		-	-	-	-	
Expor Presas	-	-	-		-	-	-		-	-	-	-	
Fuga de Trote	0,85				0,75		0,37		0,39	0,44			
Ataque Supino		-0,67			0,82						0,60		
Fuga de Galope		-0,65					0,48				0,61		
Submissão		0,32	0,52			0,54				-0,78			
Variância	21,7	16,5	16,5		21,2	11,1	10,8		15,7	15,4	11,1	9,1	
Var.Acumulada	21,7	38,2	54,7	45,3	21,2	32,3	43,1	56,9	15,7	31,1	42,2	51,3	48,7
Rotação Oblíqua	Selvagem				Wistar				Híbrido				
	I	II	III	V.R.	I	II	III	V.R.	I	II	III	IV	V.R.
Ameaça Lateral	-	-	-		-	-	-		-	-	-	-	
Salto de Ataque	-	-	-		-	-	-		-	-	-	-	
Aproximar	-	-	-			-0,60						0,57	
Perseguir	-	-	-		-	-	-		-	-	-	-	
Gritar					-	-	-		0,64				0,43
Morder	0,80		-0,35				0,47		0,74				
Boxear			0,61		0,43					-0,60			
Chiar			0,59		-	-	-		-	-	-	-	
Expor Presas	-	-	-		-	-	-		-	-	-	-	
Fuga de Trote	0,83				0,63				0,37	0,35			
Ataque Supino		-0,66			0,75						0,55		
Fuga de Galope		-0,63					0,47				0,59		
Submissão		0,35	0,53			0,55				-0,78			
Variância	22,5	16,9	16,5		23,6	11,2	15,0		17,6	15,7	12,9	9,6	
Var.Acumulada	22,5	39,4	55,9	44,1	23,6	34,9	49,9	50,1	17,6	33,3	46,2	55,8	44,2

## DISCUSSÃO

Os comportamentos de aproximação, ameaça lateral, perseguição e salto de ataque foram única ou majoritariamente apresentados pelos ratos SEL residentes, constituindo-se nos comportamentos típicos de agressão ofensiva. Em contraste, submissão, fuga de galope, fuga de trote e ataque supino foram única ou majoritariamente exibidos pelos ratos SEL intrusos, constituindo-se nos comportamentos típicos da agressão defensiva. De fato, nos ratos SEL residentes os primeiros não ocorreram e os últimos apresentaram freqüências negligenciáveis. Por outro lado, embora predominantes nos ratos SEL residentes, os comportamentos de gritar, morder, boxear, chiar e expor presas também foram apresentados pelos intrusos.

A análise de fator mostrou como os comportamentos de agressão ofensiva e defensiva se correlacionam. O Fator-I da população total de ratos SEL (residentes e intrusos) carregou forte e positivamente na maioria dos itens ofensivos, mas negativamente nos itens defensivos de ataque supino, fuga de galope e submissão que não foram apresentados pelos ratos residentes. Desta forma, o Fator-I representa a agressão ofensiva. Contudo, este fator também se correlacionou, forte e positivamente, com fuga de trote e boxear, itens comumente classificados como defensivos. Portanto, enquanto a fuga de galope, o ataque supino e a submissão correspondem às respostas estritamente defensivas do rato intruso, fuga de trote e boxear parecem ser os comportamentos de defesa do rato SEL residente aos contra-ataques dos intrusos agressivos da mesma linhagem. Por sua vez, a ameaça lateral correlacionou-se forte e positivamente com o Fator-II, mas fraca e

negativamente com o Fator-III. Como esta resposta é tipicamente ofensiva, os fatores II e III foram caracterizados como ofensa e defesa, respectivamente (note-se, no entanto, que os sinais dos coeficientes podem ser invertidos, alterando o significado dos fatores sem prejuízo da análise). Estes fatores também mostraram que ameaça lateral correlaciona-se positivamente com expor presas, mas negativamente com chiar, caracterizando esta vocalização como defensiva.

Os fatores ortogonais da população residente de ratos SEL foram responsáveis por 66,4% da variância. Segundo a descrição mais parcimoniosa da estrutura de referência, o fator I, responsável pela maior parcela da variância (35,5%), carregou fortemente nos comportamentos de ameaça lateral, salto de ataque, fuga de trote e boxear, representando a agressividade geral do rato residente desta linhagem. Por sua vez, o Fator-II carregou positivamente em aproximar e expor presas, que são comportamentos ofensivos, mas negativamente em boxear e fuga de trote, que são itens defensivos, corroborando a análise anterior (população total) de que estes itens correspondem à defesa do rato residente aos contra-ataques do intruso. Por sua vez, o Fator-III carregou fortemente em chiar e, em menor grau, salto de ataque e boxear, sugerindo que chiar correlaciona-se tanto com os itens ofensivos (salto de ataque) quanto defensivos (boxear) do rato SEL residente (estas correlações não foram observadas na análise da população total dos ratos SEL). Por fim, o Fator-IV carregou fortemente em morder e perseguição ao rato intruso, mostrando que a perseguição, muito freqüentemente, resulta em danos físicos. Embora responsável por uma parcela pequena da variância, esta correlação é notável uma vez que morder correlacionou-se negativamente com os itens ofensivos da população total. Por outro lado, correlacionou-se

positivamente com fuga de trote, mas negativamente com boxear, chiar e submissão da população de ratos intrusos. Estes resultados mostram como o comportamento de morder varia segundo a condição do rato SEL.

Como os itens ofensivos foram praticamente ausentes nos ratos SEL intrusos, inviabilizando a análise de fator dos mesmos, os fatores principais destes ratos representam facetas distintas do comportamento defensivo. O Fator-I carregou, forte e positivamente nos comportamentos defensivos de fuga de trote e morder, sugerindo que as mordidas são o recurso final à perseguição do SEL residente. Conforme mencionamos, o Fator-II carregou positivamente em submissão, mas forte e negativamente em ataque supino e fuga de galope, sugerindo que a tendência à submissão inibe as últimas respostas. Por fim, o Fator-III mostrou uma correlação inversa das respostas de morder com chiar, boxear e submissão, corroborando as funções 'apaziguadora' e protetora contra danos físicos destes comportamentos. Neste sentido, é interessante notar que chiar e boxear correlacionaram-se positivamente com o Fator-III do rato SEL residente e Fator-III do intruso, mostrando que sua correlação é independente do status.

Os fatores principais dos ratos WIS carregaram forte e positivamente nas variáveis típicas de defesa ou agressão defensiva. Portanto, os fatores principais destes ratos também podem ser interpretados como facetas distintas do comportamento defensivo. Sob este ponto de vista, o Fator-I, responsável pela maior parcela da variância (23,6%), representa os elementos centrais da defesa da linhagem WIS no modelo residente-intruso (fuga de trote, boxear e ataque supino). O Fator-II mostrou uma correlação inversa de aproximar e submissão, itens associados, respectivamente, à ofensa e defesa. Curiosamente, a resposta de aproximação não ocorreu no

intruso SEL. Portanto, aparentemente, o rato WIS tem dificuldade no reconhecimento dos sinais emitidos pelo rato residente. Contudo, a correlação inversa da aproximação e submissão sugere que os ratos com níveis menores de ansiedade aproximem-se com mais frequência do rato residente. Uma hipótese reconciliadora consideraria que os ratos que têm mais dificuldade no reconhecimento do potencial agressor, têm menos ansiedade, aproximando-se, inadvertidamente, do residente hostil. Por fim, o Fator-III associou fuga de galope à resposta de morder, sugerindo que a mordida é um recurso do rato WIS que foi encurralado pelo residente.

A fuga de trote dos intrusos HBR correlacionou-se positivamente com gritar e morder (F-I), mas, diferentemente dos intrusos SEL e WIS, correlacionou-se negativamente com boxear e submissão (F-II). Portanto, enquanto o fator I corresponde à defesa, propriamente dita, o fator II indica uma sinalização apaziguadora, na qual a fuga de trote (e os comportamentos a ela associados) são substituídos por boxear e submissão. Tal como os intrusos WIS, os intrusos HBR também apresentaram frequências significativas de aproximação ao residente (F-IV). Contudo, ao contrário dos WIS, aproximação correlacionou-se com gritar, indicando que esta ocorre a despeito do reconhecimento manifesto da hostilidade do rato residente. É interessante notar que gritar não carregou em fator algum dos ratos intrusos WIS e SEL. Entretanto, chiar carregou no Fator-III dos intrusos SEL. Portanto, gritar pode ser um produto da hibridização mediante a modificação da resposta de chiar dos ancestrais SEL.

De fato, de Boer e colaboradores (2003), por meio de uma revisão dos resultados obtidos desde 1993, demonstraram uma distribuição bimodal e trimodal no que diz respeito a ofensividade individual de ratos selvagens

agressivos, remetendo-nos a uma estratégia específica para melhor adaptação ambiental. As variações extremas neste sentido poderiam ser consideradas como o desenvolvimento de formas patológicas de agressão decorrentes dos estudos comportamentais e fisiológicos em uma linhagem de ratos agressivos. De maneira geral, os resultados obtidos também no teste residente-intruso sugerem que os ratos residentes diferenciam-se bastante, no que se refere aos seus níveis de agressão ofensiva típica da espécie, dirigida a outro rato intruso. Os perfis dos grupos de baixa e moderada agressividade entre ambas as linhagens são praticamente iguais. Este resultado apóia a concepção de que o padrão do comportamento agressivo nos ratos domesticados não é diferente dos ratos selvagens (Blanchard *et al.*, 1977). As distribuições bimodal e trimodal observadas dos fenótipos agressivos dos ratos selvagens deste estudo é similar à distribuição bimodal de várias populações selvagens de camundongos e pássaros. Estes fenótipos podem ser menos distinguíveis ou mesmo ausentes nos animais de laboratório, possivelmente pela ausência da pressão exercida pela seleção natural, seleção artificial, domesticação ou *ibbreeding*.

Os resultados do presente sugerem a importância e especificidade da influência genética nos comportamentos de agressão ofensiva territorial e agressão defensiva em diferentes linhagens de ratos. Tal fato pode ser demonstrado pela segregação comportamental em três categorias, que são: 1) comportamentos típicos de agressão ofensiva: comportamentos de aproximação, ameaça lateral, perseguição e salto de ataque apresentados pelos ratos SEL residentes; 2) comportamentos típicos da agressão defensiva: submissão, fuga de galope, fuga de trote e ataque supino foram única ou majoritariamente exibidos pelos ratos SEL intrusos; e, 3) Comportamentos



mistos: comportamentos de gritar, morder, boxear, chiar e expor presas apresentados pelos residentes e intrusos. A análise de fator permitiu analisar como os diferentes comportamentos, ofensivos e defensivos estão correlacionados. Assim, enquanto o Fator-I representou a agressão ofensiva, os fatores II e III caracterizaram ofensa e defesa, respectivamente. No conjunto, todas estas diferenças comportamentais podem se dever, em parte, aos elevados níveis de agressão dos ratos SEL, principalmente quando se leva em consideração o status de residente. Trata-se, então, de uma demonstração de fatores genéticos e comportamentais influenciando um determinado tipo de comportamento.

## REFERÊNCIAS

- Adams N e Boice R (1983). A longitudinal study of dominance in an outdoor colony of domestic rats. *J. Comp. Psychol.*, 97: 24-33.
- Alcock J (2005). *Animal behavior*. 8<sup>th</sup> ed. Massachusetts : Sinauer.
- Barnett SA (1975). *The Rat: A Study in Behavior*. Chicago: University of Chicago Press.
- Barnett SA (1958). An analysis of social behaviour in wild rats. *Proc. Zool. Soc. Lond.* 130: 107-152.
- Baker HJ, Lindsey JR e Weisbroth SH (1979). *The Laboratory Rat. Vol. 1. Biology and Diseases*. Academic Press, NY.
- Bhatnagar S e Vining C (2003). Facilitation of hypothalamic–pituitary–adrenal responses to novel stress following repeated social stress using the resident/intruder paradigm. *Hormones and Behavior*, 43: 158–165.
- Blanchard RJ e Blanchard DC (1981). The organization and modeling of animal aggression. In: Brain, PF e Denton D. *The Biology of Agression*. Alphen and Rijn : Sythoff and Noordhoff, 529-561.
- Blanchard RJ, Takahashi T, Blanchard DC (1977). The development of intruder attack in the colonies of laboratory rats. *Anim Learn Behav*, 5: 365-369.
- Blanchard RJ e Blanchard DC (1977). Aggressive behavior in the rat. *Behav. Biol.*, 21: 197-224.
- Blanchard DC e Blanchard RJ (1989). Antipredator defensive behaviors in a visible burrow system. *J. Comp. Psychol.*, 103: 70-82.
- Blanchard RJ, Hori K, Blanchard DC, Hall J.B (1987). Ethanol effects on aggression of rats selected for different levels of aggressiveness. *Pharmacol Biochem Behav.*, 27: 641-4. a
- Blanchard DC, Flannelly K, Hori K, Blanchard RJ, Hall JA (1987). Ethanol effects on female aggression vary with opponent size and time within session. *Pharmacol Biochem Behav.*, 27: 645-8. b
- Blanchard DC, Fukunaga-Stinson C, Takahashi LK, Flannelly KJ, Blanchard RJ (1984). Dominance and aggression in social groups of male and female rats. *Behav. Proc.*, 9: 31-48.

- Blanchard DC e RJ Blanchard (1990). Behavioral correlates of chronic dominance-subordinance relationships of male rats in a seminatural situation. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews.*, 14: 455-462.
- Boice R (1972). Some behavioral tests of domestication in Norway rats. *Behavior*, 42: 198-231.
- Boice R (1977). Burrows of wild and albino rats: effects of domestication, outdoor raising, age, experience, and maternal state. *J Comp Physiol Psychol.*, 91: 649-61.
- Brown RE (1986). Paternal behavior in the male Long-Evans rat (*Rattus norvegicus*). *Journal of Comparative Psychology*. 100: 162-172. b
- Carlson NR (2002). *Fisiologia do comportamento*. 7.ed. São Paulo : Manole.
- Castle WE (1947). The domestication of the rat. *Genetics*. 33: 109-117
- de Boer SF, Koolhaas JM. (2003). Defensive burying in rodents: ethology, neurobiology and psychopharmacology. *Eur J Pharmacol.*, 28:145-61.
- de Boer SF, van der Vegt BJ, Koolhaas JM (2003). Individual Variation in Aggression of Feral Rodent Strains: A Standard for the Genetics of Aggression and Violence? *Behavior Genetics*, 33: 485-501.
- Dorine EM, Feldker E, Kloet R, Kruk MR, Datson NA (2003). Large-Scale Gene Expression Profiling of Discrete Brain Regions: Potential, Limitations, and Application in Genetics of Aggressive Behavior. *Behavior Genetics*, 33: 537-48.
- Everts HG, de Ruiter AJ, Koolhaas JM (1997). Differential lateral septal vasopressin in wild-type rats: correlation with aggression. *Horm Behav.*, 32: 136-44.
- Filley CM, Bruce HP, Victor N, Terri RNC, Morgan AS, Bresnahan JF, Jonathan H. Pincus JH, Gelbort MM, Weissberg M and Kelly JP (2001). Toward an Understanding of Violence: Neurobehavioral Aspects of Unwarranted Physical Aggression: Aspen Neurobehavioral Conference Consensus Statement. *Neuropsychiatry, Neuropsychology, and Behavioral Neurology*, 14: 1–14
- Galef BG e MM Clark (1971). Social factors in the poison avoidance and feeding behavior of wild and domesticated rat pups. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*. 78: 213-219.

- Geisler HC, Westerga J, Gramsbergen A (1993). Development of posture in the rat. *Acta Neurobiol Exp.*, 53: 517-23
- Huntingford F e Turner A (1987). *Animal conflict*. New York: Chapman and Hall.
- Johnson SK, Carlson KM, Lee J, Burr BR e Wagner GC (2003). Effects of nicotine on target biting and resident-intruder attack. *Life Sciences*, 73: 311–17.
- Koolhaas JM, de Boer SF, de Rutter AJ, Meerlo P, Sgoifo A (1997). Social stress in rats and mice. *Acta Physiol Scand Suppl.*, 640: 69-72.
- Kruk MR, van der Laan CE, Meelis W, Phillips RE, Jan Mos e van der Poel AM (1984). Brain-Stimulation induced agonistic behaviour: a novel paradigm in ethopharmacological aggression research. In: K. A. Miczek, M. R. Kruk e B. Olivier (Eds.), *Ethopharmacological Aggression Research*, New York : Alan Liss.
- Lore R, Nikolettseas M, Takahashi L (1984). Colony aggression in laboratory rats: a review and some recommendations. *Aggressive Behavior*. 10: 59-71.
- McFarland D (1986). *Animal Behavior*. Science Technology.
- Meaney MJ e Stewart JA (1981). A descriptive study of social development in rats (*Rattus norvegicus*). *Animal Behaviour.*, 29: 34-45.
- Mos J, Olivier B, van Oorschot, Dukstra H (1984). Different test situations for measuring offensive aggression in male rats do not result in the same wound patterns. *Physiology & Behavior*, 32: 453-56.
- Nikolettseas M e Lore R (1981). Aggression in domesticated rats reared in a burrow-digging environment. *Aggressive behavior*. 7: 245-52.
- Pellis SM, Pellis VC e McKenna MM (1993). Some subordinates are more equal than others: play fighting amongs adult subordinate male rats. *Aggressive behavior*, 19: 385-93.
- Pellis SM e Pellis VC (1987). Play-fighting differs from serious fighting in both target of attack and tactics of fighting in the laboratory rat *Rattus norvegicus*. *Aggressive behavior*, 13: 227-42.
- Ramos A e Mormède P (2007). Genetic analysis of emotional behaviors using animal models. Em: *Neurobehavioral genetics: methods and applications*. Jones BC e Mormède P. Taylor and Francis Group, Boca Raton. 291-306.

- Sgoifo A, Koolhaas J, Alleva E, Musso E, Parmigiani S (2001). Social stress: acute and long-term effects on physiology and behavior. *Physiology and Behavior*, 23: 253-54.
- Siegel A, Roeling TAP, Gregg TR, Kruk MR (1999). Neuropharmacology of brain-stimulation-evoked aggression. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 23: 359-389.
- Stewart J e Palfai T (1967). Castration, androgens and dominance status in the rat. *Psychon. Sci.*, 7: 1-2.
- Switzer PV, Stamps A, Mangel M (2001). When should a territory resident attack? *Anim Behav.*, 62: 749-59.
- Takahashi LK e Blanchard RJ (1982). Attack and defense in laboratory and wild Norway and black rats. *Behavioural Processes*, 7: 49-62
- Thor DH e Flannelly KJ (1976). Age of intruder and territorial-elicited aggression in male Long-Evans rats. *Behavioral Biology*. 17: 237-41.
- van der Staay FJ (2006). Animal models of behavioral dysfunctions: basic concepts and classifications, and an evaluation strategy. *Brain Res Rev.*, 52:131-59.
- van der Vegt BJ, Lieuwes N, van de Wall EH, Kato K, Moya-Albiol L, Martinez-Sanchis S, de Boer SF, Koolhaas JM (2003). Activation of serotonergic neurotransmission during the performance of aggressive behavior in rats. *Behav Neurosci.*, 117: 667-74.

## **ESTUDO VI**

**COMPORTAMENTOS DEFENSIVOS INDUZIDOS POR  
ESTIMULAÇÃO DA MATÉRIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL DE  
RATOS WISTAR, SELVAGENS (*Rattus norvegicus sp*),  
HÍBRIDOS, HIPERTENSOS E WISTAR-KYOTO**

## RESUMO

**Introdução:** A estimulação elétrica da matéria cinzenta periaquedutal dorsal (MCPD) de ratos produz as respostas de defesa de exoftalmia (EXO), imobilidade tensa (IMO), micção (MIC), defecação (DEF) trote (TRT), galope (GLP) e saltos (SLT). O presente estudo avaliou as diferenças destas respostas em ratos WIS, SEL e linhagens derivadas. **Métodos:** Ratos machos (n=20/grupo) WIS, SEL, HBR, SHR e WKY com eletrodos na MCPD foram estimulados com pulsos senoidais de intensidades crescentes (0-70  $\mu$ A, 60 Hz). As intensidades medianas ( $I_{50}$ ) limiaries e a responsividade máxima ( $R_{50}$ , inclinação da curva de limiar em  $I_{50}$ ) foram estimadas mediante a análise logística de limiaries. As curvas foram comparadas por testes de  $\chi^2$  da razão de verossimilhanças para locação e paralelismo. **Resultados:** Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes na localização dos eletrodos das várias linhagens. Notavelmente, os ratos WIS apresentaram os menores limiaries de defesa e os SEL os limiaries mais elevados. De fato, os limiaries dos ratos SEL só foram inferiores aos dos ratos SHR para TRT, GLP e, principalmente, DEF e MIC. Embora a DEF e MIC tenham sido apresentadas por menos da metade dos ratos WIS, SEL e HBR, suas frequências foram tão baixas nos ratos SHR que impossibilitaram o ajuste das curvas de limiar e a obtenção das  $I_{50}$ . No extremo oposto, a DEF foi apresentada por todos os ratos da linhagem WKY. Em geral, a responsividade forneceu resultados opostos àqueles da  $I_{50}$ . Assim, enquanto as linhagens WIS e SHR apresentaram a menor responsividade, os ratos SEL e WKY foram mais responsivos para a maioria dos comportamentos. Em particular, os ratos WKY apresentaram responsabilidades maiores que aquelas dos ratos WIS para IMO, DEF, MIC, GLP e SLT. Esta foi a única linhagem que combinou limiaries reduzidos e responsividade elevada para todas as respostas de defesa. Nossos dados sugerem que os limiaries baixos de detecção de predadores dos ratos SEL devem-se a áreas externas à MCPD. Em contraste, a resposta imediata destes ratos à detecção do predador deve-se às características específicas da MCPD desta linhagem. Os ratos WKY têm sido propostos como um modelo genético de depressão e a estimulação da MCPA como um modelo dos ataques de pânico. Portanto, a linhagem WKY apresenta os elementos para um modelo genético da comorbidade de pânico e depressão.

**Palavras-chaves:** **Matéria Cinzenta Periaquedutal, Comportamentos de Defesa, Ratos Selvagens, Wistar, SHR, WKY.**

A domesticação de animais é praticada há milênios nas mais diversas espécies. De acordo com Immelmann (1983), os animais domesticados apresentam dois tipos de modificações: 1) têm grande variabilidade intraespecífica na estrutura, fisiologia e características comportamentais, 2) apresentam modificações no sistema nervoso central, por exemplo, diminuição do peso do cérebro e da diferenciação das estruturas filogeneticamente mais recentes. Dentre as modificações comportamentais, destaca-se uma redução marcante dos comportamentos agressivos e defensivos, bem como dos comportamentos direcionados aos cuidados da prole. A aprendizagem também parece sofrer prejuízos. Também pode ocorrer o desaparecimento, ou 'atrofia', de outros comportamentos, tal como, o canto estridente em algumas raças de canários. Em contraste, observa-se uma acentuação do comportamento sexual (hiper-sexualidade). Assim, animais domésticos aumentam o número de cópulas e têm perda parcial da sazonalidade, bem como do comportamento de corte.

Dentre as causas principais destas modificações encontra-se a direção e intensidade das forças seletivas do processo de domesticação. A troca da seleção natural pela artificial acentua a pressão seletiva em vista do número relativamente pequeno de animais da população doméstica. Por exemplo, os animais menos agressivos são selecionados devido à facilidade de manuseio e menor periculosidade. O mesmo pode ser verdadeiro para o comportamento sexual, selecionando-se os animais que apresentam maior número de cópulas.

Com relação às modificações do sistema nervoso central, demonstrou-se que os cérebros de ratos Wistar são 8,3% menores que os



dos ratos selvagens de peso similar. Também foi constatada uma redução do volume fresco do bulbo (1,6%), cerebelo (10,3%), estriado (10,9%) telencéfalo (10,6%) e, particularmente, neocórtex (12,5%) (Kruska, 1975a). Adicionalmente, a comparação de áreas allocorticais e arquicorticais revelou uma redução de 10,2% da formação hipocampal (cornus ammonis, fascia dentata) (Kruska, 1975b). As considerações acima demonstram a extrema importância da utilização de linhagens variadas no estudo do comportamento.

A genética comportamental é a área de intersecção entre a genética e as ciências do comportamento (Ramos, 2001). Através da combinação dos métodos de ambas as ciências, ela busca compreender os mecanismos genéticos, neurais e hormonais envolvidos em diversos comportamentos de homens e animais. Atualmente, acredita-se que todo o comportamento depende, em maior ou menor grau, de fatores genéticos e ambientais, interagindo de maneira extremamente complexa. Os genes definem tendências que são moduladas pelas experiências individuais. Embora o homem tenha desenvolvido linhagens de animais desde os tempos mais remotos, para os fins mais diversos, tais como a caça, pastoreio, trabalho rural, lazer e esportes, dentre outros, o desenvolvimento de linhagens de ratos para o estudo do comportamento teve início na década de 60 com o desenvolvimento das linhagens Maudsley-reativa e não-reativa (Broadhurst, 1962, 1963, 1969, 1975) e das linhagens romanas de alto e baixo desempenho de esquiva (apud Roozendaal, 1992).

Atualmente, existe um enorme esforço para o desenvolvimento de linhagens que possam ser utilizadas como modelos genéticos de transtornos psiquiátricos. Por exemplo, a depressão tem sido associada às linhagens

Wistar-Kyoto (WKY) e Flinder sensível (Paré, 2000; Paré *et al.*, 2001; Malkesman *et al.*, 2005; Braw *et al.*, 2006), a ansiedade às linhagens Maudsley reativa, Sprague-Dawley e ratos com resistência ao abrasamento (*kindling*) da amígdala (Berrettini *et al.*, 1994; Mohapel e McIntyre, 1998; Paré *et al.*, 2001; Stead *et al.*, 2006) e o déficit atencional aos ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (Sagvolden *et al.*, 1993, 2005).

Adicionalmente, tem sido dada importância especial às diferenças estruturais das linhagens em relação ao sistema nervoso central. Assim, Nelovkov e colaboradores (2006) demonstraram que ratos de alta e baixa atividade exploratória apresentam padrões de expressão gênica opostos em relação à proteína de membrana associada ao sistema límbico, os receptores para GABA e colecistocinina (CCK) do núcleo amigdalóide e matéria cinzenta periaquedutal (MCPA) e receptores gabaérgicos do córtex pré-frontal. De forma similar, Guitart-Masip e colaboradores (2006) demonstraram diferenças marcantes no sistema dopaminérgico de ratos das linhagens romanas de alto e baixo desempenho de esquiva.

Por outro lado, exceto pelos estudos preliminares de nosso laboratório (Póvoa, 2003), não temos conhecimento de trabalhos que tenham demonstrado diferenças entre linhagens para os comportamentos induzidos por estimulação elétrica ou química de estruturas do sistema nervoso central. Não obstante, Póvoa (2003) comparou os limiares das respostas de defesa induzidas pela estimulação elétrica da MCPA das linhagens WIS, SEL e SHR. Contudo, além do estresse da captura, aprisionamento e cirurgia, os ratos SEL daquele estudo foram sedados com éter etílico, 30 min antes da estimulação intracraniana, para possibilitar a conexão do cabo de estimulação. O presente estudo deu continuidade e

ampliou aqueles experimentos utilizando ratos WIS (*Rattus norvegicus albinus*), SEL (*Rattus norvegicus sp*) e linhagens derivadas WKY, SHR e HBR. No entanto, além de terem nascido no biotério, os ratos SEL deste estudo não foram manuseados sob efeito do éter.

## MÉTODOS

### *Animais*

Foram utilizados ratos adultos, machos ( $n=20$ ), pesando entre 240 e 280 g, das linhagens isogênicas Wistar (WIS, *Rattus norvegicus albinus*), espontaneamente hipertensa (SHR) e Wistar-Kyoto (WKY), descendentes de matrizes provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo – USP e fornecidos pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, da Universidade Federal do Espírito Santo. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais com paredes e teto de vidro (25 x 15 x 30 cm) e assoalho coberto com maravalha e tiveram livre acesso à água e comida. As gaiolas estavam num ambiente com ciclo de iluminação de 12 h (luzes acesas às 7:00 h) e temperatura controlada (20-25°C).

Foram utilizados ratos Selvagens (SEL) machos ( $n=35$ ), adultos (*Rattus norvegicus sp.*), pesando cerca de 240 a 280g, descendentes de matrizes provenientes do meio urbano e procriados em sala apropriada do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, da Universidade Federal do Espírito Santo. Os animais eram mantidos em gaiolas individuais com paredes e teto de vidro (25 x 15 x 30 cm) montadas sobre uma bandeija de alumínio coberta com maravalha. As gaiolas tinham uma tampa feita de tela de arame que impedia as fugas. Os ratos tiveram livre acesso à água e comida

e foram mantidos em ambiente com fotoperíodismo natural e iluminação atenuada (2 a 5 lux). A temperatura da sala era controlada por um aparelho de ar condicionado (20° C) e um sistema de exaustão que era ativado automaticamente a cada 45 minutos. A sala permanecia fechada para evitar o contato entre os ratos selvagens e os demais ratos.

Por fim, foram utilizados ratos híbridos (HBR) adultos, machos (n=41), provenientes do cruzamento dos ratos WIS e SEL. Estes ratos foram mantidos nas mesmas condições dos ratos selvagens.

Todos os procedimentos do presente estudo respeitaram as normas estabelecidas pelo *International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals* (CIOMS) - Genebra (1985), e atualmente está sendo analisada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA), da Faculdade de Medicina EMESCAM, Vitória, ES.

### *Eletrodo*

Os eletrodos monopolares foram confeccionados com um fio de aço inoxidável, de 250 µm de diâmetro, isolado em toda extensão, exceto na seção transversal de sua extremidade. O eletrodo será soldado a um dos pinos de um soquete bipolar de circuito integrado (Cellis, BCPT, SP, Brasil) permitindo a fixação do mesmo à prótese de acrílico e posterior conexão ao cabo de estimulação elétrica. Um fio de aço inoxidável não isolado foi soldado ao outro pino do soquete e a dois parafusos fixados na calota craniana, servindo de pólo indiferente.

## *Cirurgia Estereotáxica*

Os animais foram anestesiados com hidrato de cloral (400 mg/kg, IP) e fixados ao aparelho estereotáxico (David Koff, USA). A perda de temperatura corporal durante a cirurgia foi evitada envolvendo-se o animal com uma manta térmica. Em seguida uma pequena área oval de pele e tecidos subcutâneos foi removida, expondo-se a calota craniana na altura da fissura longitudinal. Após a limpeza e secagem desta área, quatro orifícios foram feitos com o auxílio de uma broca micro-retificadora (Dremel, USA), sendo dois na região posterior dos ossos parietais e dois na parte posterior do osso frontal. Foram, então, afixados quatro pequenos parafusos de aço inoxidável que serviam de âncora para a prótese cirúrgica.

Em seguida foi realizada a craniotomia ao nível da fissura sagital com exposição do córtex cerebral que serviu de referência para a implantação do eletrodo em área pré-determinada, de acordo com as seguintes coordenadas estereotáxicas (Paxinos & Watson, 1986): antero-posterior = 7.2 no sentido rostral a partir do plano interaural, lateral = 0.4 a partir do plano mediano e vertical a partir da superfície do seio venoso.

Tomou-se o cuidado de afastar o seio venoso durante a implantação, evitando a ruptura do mesmo durante a introdução do eletrodo. Para minimizar a resistência à penetração, fizemos uma pequena abertura na dura-máter, com o auxílio de uma agulha hipodérmica. Em seguida à implantação, preenchemos o campo cirúrgico com resina acrílica autopolimerizável (JET, São Paulo, Brasil), soldando o eletrodo e os parafusos numa prótese sólida. Um tubo plástico de 1 cm de altura de diâmetro foi afixado sobre a prótese para proteção do eletrodo. Ao término da cirurgia os

animais receberão 24.000 UI de penicilina-G benzatina (IM). Em seguida, os animais foram alojados em gaiolas individuais aquecidas por placa térmica até se recuperarem da anestesia.

Para manipulação dos ratos selvagens e híbridos, a gaiola do rato eram colocada numa caixa de plástico ligeiramente maior (34 x 22 x 33 cm), juntamente com um algodão embebido em éter etílico. A caixa era tampada e aguardava-se a anestesia do animal que podia ser observado através do plástico translúcido. Uma vez superficialmente sedado, o rato foi retirado da gaiola e profundamente anestesiado com ketamina (Dopalen®) (0,1 ml/100g, IM) e xilazina (Anasedan®) (0,05ml/100g). Posteriormente, foi afixado ao aparelho estereotáxico (David Koff, USA), repetindo-se os procedimentos cirúrgicos descritos para o rato Wistar.

Tomamos o cuidado de usar luvas e máscaras cirúrgicas durante todo o procedimento. Ao término da cirurgia os animais receberam 0,2 ml de penicilina-G benzatina (24.000 UI, IM) e foram polvilhados com veneno anti-pulga (Baygon, Bayer). Em seguida, os animais foram alojados em gaiolas individuais, sobre uma placa térmica, até se recuperarem da anestesia, sendo transferidos ao biotério do próprio laboratório.

### *Estimulação Intracraniana*

Cinco dias após a cirurgia estereotáxica, os ratos foram colocados numa arena cilíndrica de acrílico transparente, com 60 cm de altura e diâmetro e iluminação regular (240 lux) para serem estimulados. As sessões de estimulação com pulso senoidal (60 Hz, 1 min) utilizavam intensidades crescentes, em passos de 5  $\mu$ A, até a obtenção da resposta de galope. Após a primeira resposta de defesa (exoftalmia e/ou imobilidade), adotaremos

intervalos de 5 minutos, permitindo o retorno dos ratos à status de repouso, ou similar. Os ratos que não exibiram a resposta de corrida (trote e/ou galope) com intensidades inferiores a 70  $\mu$ A foram excluídos do experimento. Devido o elevado nível de agressividade e reatividade apresentados pelas linhagens de ratos selvagens e híbridos, o experimentador utilizou um saco especialmente projetado para manipulação do animal, a fim de dispensar o uso de éter etílico. Este novo método evitou mais um fator que poderia influenciar o comportamento do rato na arena. Após a conexão do mesmo ao sistema de estimulação, aguardamos 30 minutos para que ele se habituasse ao novo ambiente. Durante a estimulação, os comportamentos foram registrados conforme o protocolo descrito acima para os ratos Wistar.

### *Registros Comportamentais*

Após sua conexão ao sistema de estimulação, o rato foi colocado na arena, aguardando-se 10 minutos para que ele se habituasse ao novo ambiente. Durante a estimulação, os comportamentos foram registrados de forma binária - emitidos ou não-, independentemente de sua frequência ou duração ao longo de um único estímulo. O registro dos comportamentos foi realizado por meio de da planilha (Anexo), com os itens individuais do etograma do rato (Tabela 1). Este procedimento permitiu a decomposição dos comportamentos de defesa em itens elementares e seu reagrupamento em comportamentos mais complexos. Assim, a reação de alerta foi caracterizada pela imobilidade do tronco e membros, podendo ser acompanhada de esquadrinhamento e olfação. Todos os experimentos foram realizados entre o período de 14:00 e 18:00 hs.

Tabela1. Etograma do rato na ausência ou presença da estimulação elétrica da matéria cinzenta periaqueductal dorsal.

Dormir	Postura horizontal com olhos fechados, cabeça e pescoço e pela flexão dos membros.
Repouso	Postura horizontal com olhos abertos ou semi-abertos, atividade olfativa reduzida e relaxamento muscular indicado pelo rebaixamento do tronco e pela flexão dos membros, e/ou rebaixamento da cabeça e pescoço. Com a cabeça erguida o rato assume uma 'postura de esfinge'.
Olfacção	Jorros de atividade olfativa indicada pelo movimento do focinho e vibrissas. Pode ser acompanhada por movimentos de pequena amplitude do tronco, membros anteriores e cabeça.
Mistacioplegia	Paralisia das vibrissas ao início da estimulação Portanto, a resposta só pode ser observada na presença de atividade basal das vibrissas.
Esquadrinhar	Exploração visuo-motora do ambiente com movimentos laterais da cabeça, geralmente, em postura ereta, acompanhados de olfacção.
Autolimpeza	Postura ereta sobre as patas posteriores flexionadas ('rato sentado'), acompanhada da manipulação repetitiva e seqüencial dos pêlos da cabeça, tronco e genitálias, usando as patas dianteiras ou a boca.
Levantar	Postura ereta com extensão das patas posteriores.
Marcha	Locomoção lenta do animal com movimentos de apoio e balanço em oposição de fase das patas contralaterais.
Imobilidade Tensa	Cessar brusco de todos os movimentos, exceto da respiração, freqüentemente acompanhado, da extensão dos membros, elevação do tronco, orelhas e pescoço, mistacioplegia e, às vezes, da cauda, indicando o aumento do tônus muscular.
Trote	Locomoção rápida do animal, mantendo o padrão contalateral da marcha.
Galope	Locomoção muito rápida ao longo do perímetro da arena, alternando movimentos de apoio e projeção dos membros anteriores e posteriores.
Saltos	Impulso vertical ou oblíquo em direção à borda da arena.
Exoftalmia	Abertura máxima das pálpebras, e protrusão do globo ocular que assume a forma esférica e cor brilhante, presumivelmente, devida a uma maior entrada de luz. Acompanha de imobilidade tensa, trote e galope .
Defecação	Eliminação de fezes durante vários comportamentos.
Micção	Eliminação de urina durante vários comportamentos.



### *Análise Histológica*

Ao término dos experimentos, os animais foram perfundidos por método gravimétrico para análise histológica dos cérebros. Após a exposição do coração e a ligadura da aorta descendente, introduzia-se uma agulha no ventrículo esquerdo do rato. A agulha estava conectada a 2 frascos, contendo salina (NaCl 0,9%) ou solução de formaldeído (10%), situados 1,5 m acima do rato. O átrio direito será então cortado e a preparação será seqüencialmente perfundida com 100 ml salina e solução de formaldeído. Os ratos foram decapitados e suas cabeças mantidas em formaldeído (10%) por, pelo menos, 3 dias. Em seguida, os cérebros foram retirados da caixa craniana e colocados em solução de formaldeído 10% (pH 7,6) por um período de, pelo menos, 4 dias. Para a marcação da área estimulada nas microinjeções injetou-se azul de Evans em volume equivalente ao utilizado na estimulação química, imediatamente antes da perfusão.

Em seguida, os cérebros foram preparados em blocos da região mesencefálica. Os blocos foram posicionados em um micrótomo de congelamento (Ernst Leitz, Wetzlar, Germany) e seccionados em cortes de 60  $\mu$ m de espessura que foram montados em lâminas previamente gelatinizadas e submetidos à secagem em estufa de baixa temperatura (38°C). Em seguida, os cortes foram corados com vermelho neutro (Sigma, EUA) e as lâminas montadas com DPX (Aldrich Chemical Company, EUA). Os sítios estimulados foram identificados com o auxílio de uma câmsará lúcida de projeção e registrados em diagramas coronais do atlas do cérebro de rato de Paxinos e Watson (1998).

### *Análise Estatística*

A comparação das linhagens quanto à localização dos eletrodos foi feita pelo teste exato de Fisher.

As respostas das linhagens foram comparadas por análise logística de limiares. Somente ratos cujos eletrodos localizaram-se na MCPA ou camada profunda do colículo superior foram submetidos à análise estatística. As curvas de probabilidade de resposta foram obtidas por ajuste logístico das frequências acumuladas em função do logaritmo das intensidades de corrente, de acordo com o modelo,

$$P(y_{ij}|x_{ij}) = [1 + \exp(-(\alpha_j + \beta_j x_{ij}))]^{-1}$$

onde  $P$  é a probabilidade esperada da resposta  $y_{ij}$  para um dado estímulo  $x_{ij}$ ,  $\alpha_j$  é o intercepto e  $\beta_j$  a inclinação da  $j$ ésima curva intensidade-resposta (várias linhagens).

Efeitos intensidade-dependentes significantes foram avaliados pelo chi-quadrado de Wald ( $\chi^2_w = [\beta_j/\text{e.p.}]^2$ ), onde e.p. é o erro padrão de  $\beta_j$ . As curvas intensidade-resposta foram parametrizadas por meio de variáveis indicadoras e comparadas através de testes de coincidência de razão de verossimilhanças, para locação ou paralelismo das regressões. As regressões foram comparadas pela diferença dos desvios de verossimilhança ( $-2\text{LogLikelihood deviance}$  ou  $-2\text{LogLD}$ ) do modelo completo ( $k$  parâmetros) e respectivos modelos reduzidos ( $k-r$  parâmetros), proporcionando valores de  $\chi^2$  com  $r$  graus de liberdade ( $\chi^2_r$ ). Os  $\chi^2_r$  dos testes gerais de locação e paralelismo, assim como o  $\chi^2_w$ , foram considerados significantes ao nível de 5%. Os  $\chi^2_r$  dos testes pareados para locação e

paralelismo ( $r = 1$  g.l.) foram considerados significantes ao nível de 5% de Bonferroni. O ajuste por máxima verossimilhança foi realizado pelo procedimento 'Logistic' do programa SAS. A intensidade mediana ( $I_{50}$ ) assim como seu erro padrão (E.P.) e o respectivo intervalo de confiança (I.C. 95%) foram computados pelas fórmulas que se seguem,

$$\text{Log } I_{50} = -\alpha/\beta$$

$$I_{50} = 10^{-\alpha/\beta}$$

$$\text{E.P.}(\text{Log } I_{50}) = \{[\text{Var}(\alpha) - 2(\alpha/\beta)\text{Cov}(\alpha, \beta) + (\alpha/\beta)^2 \text{Var}(\beta)] / \beta^2\}^{1/2}$$

$$\text{E.P.}(I_{50}) = I_{50} [\text{E.P.}(\text{Log } I_{50})]$$

$$\text{I.C.95\%}(I_{50}) = \pm 1,96 \text{ E.P.}(I_{50})$$

onde as variâncias (Var) e covariâncias (Cov) dos parâmetros foram obtidas pela matriz estimada de covariância do procedimento Logistic.

Por fim, a responsividade máxima ( $R_{50}$ ), qual seja, a inclinação da curva em  $I_{50}$ , bem como seu erro padrão e intervalo de confiança foram calculados como,

$$R_{50} = \beta/4$$

$$\text{E.P.}(R_{50}) = \text{E.P.}(\beta)/4$$

$$\text{I.C.95\%}(R_{50}) = \pm 1,96 \text{ E.P.}(R_{50})$$

## RESULTADOS

*Histologia.*

As linhagens foram similares quanto à localização dos eletrodos nas camadas profundas do colículo superior ( $P < 0,26$ ) e colunas dorsomedial ( $P < 0,99$ ), dorsolateral ( $P < 0,57$ ), lateral ( $P < 0,92$ ) e ventrolateral ( $P < 0,74$ ) da MCPA (teste exato de Fisher). A localização similar dos eletrodos e a baixa resolução espacial da estimulação senoidal legitimam, portanto, a comparação das linhagens quanto às respostas de defesa.

#### *Limiares de Defesa.*

As linhagens diferiram marcadamente quanto aos limiares da reação de defesa (Figs.2-3). A partição do  $\chi^2$  mostrou que as diferenças das curvas de limiar e das  $I_{50}$  foram devidas tanto às diferenças de locação quanto

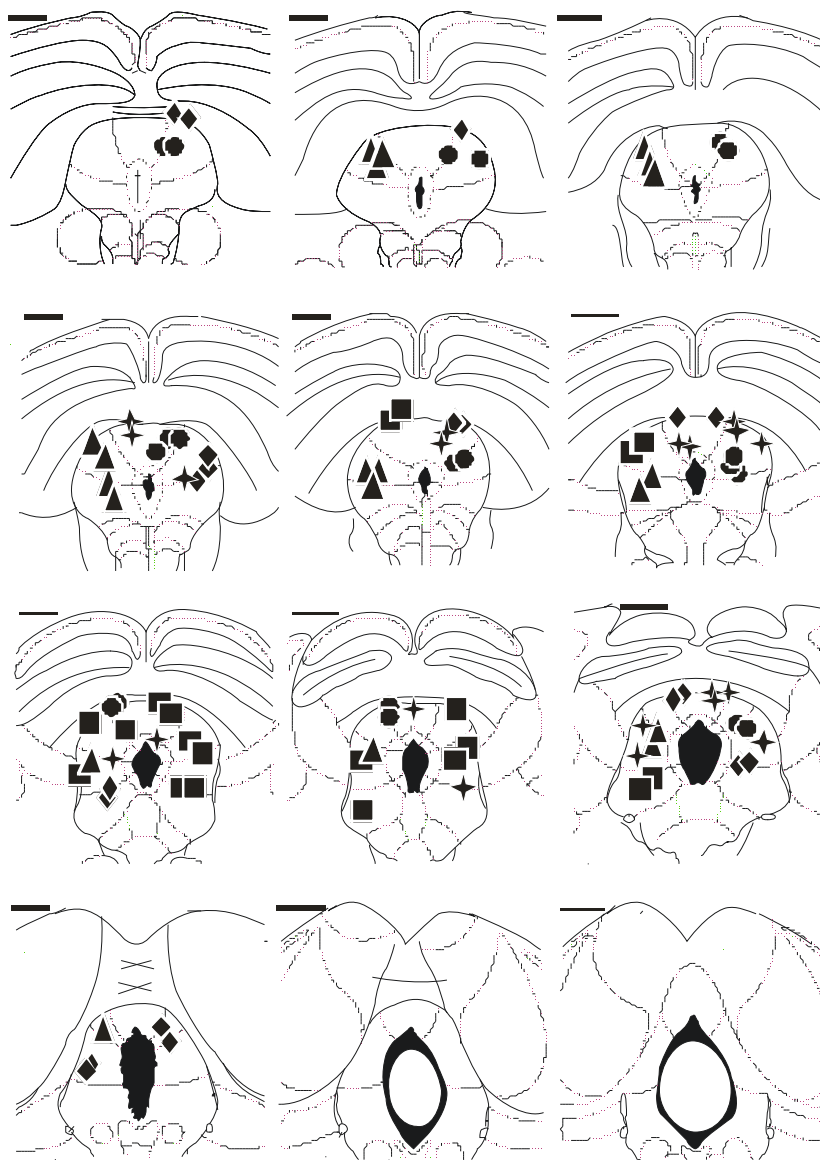


Figura 1. Localização dos eletrodos para as linhagens WIS (●), SEL (■), HBR (▲), SHR (◆) e WKY (✦).

de paralelismo. Diferenças altamente significantes para a locação das curvas de limiar foram observadas para imobilidade ( $\chi^2 = 41,5$ ; 4 g.l.,  $P < 0,0001$ ), exoftalmia ( $\chi^2 = 19,7$ ; 4 g.l.,  $P < 0,001$ ), defecação ( $\chi^2 = 166,1$ ; 4 g.l.,  $P < 0,0001$ ), micção ( $\chi^2 =$

Tabela 2. Localização dos eletrodos das linhagens individuais nas estruturas do teto do mesencéfalo.

	CPCS	MCPAdm	MCPAdl	MCPAlat	MCPAvl
WIS	0	3	10	6	1

SEL	2	3	5	6	4
HBR	0	2	8	8	2
SHR	3	3	6	6	2
WKY	2	4	7	5	2
Total	7	18	36	31	11

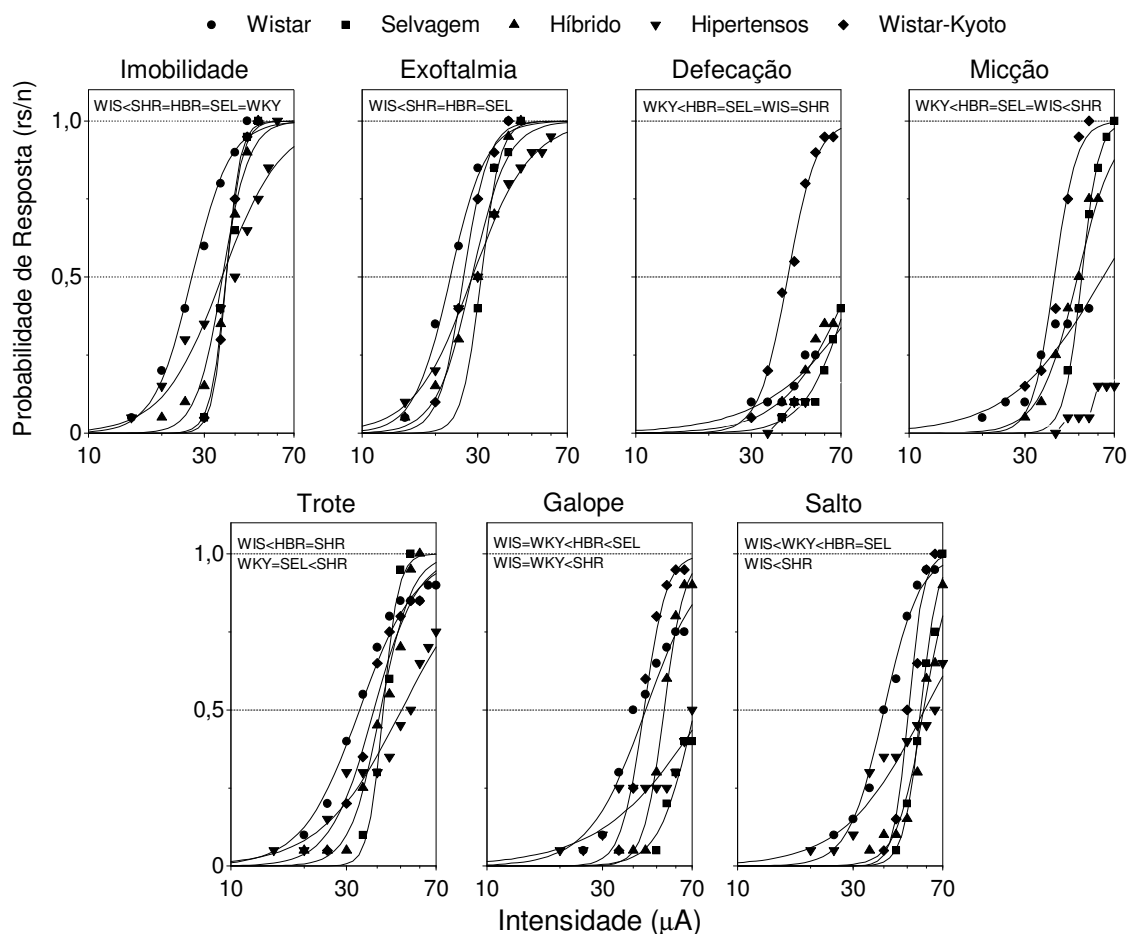


Figura 2. Curvas de limiar das respostas de defesa induzidas por estimulação elétrica (0-70  $\mu$ A, 60 Hz, 30 s, c.a.) do teto do mesencéfalo de ratos Wistar, selvagens e linhagens derivadas. As desigualdades da parte superior dos gráficos indicam as diferenças significantes na locação das curvas de limiar das linhagens estudadas ( $P < 0,05$ , critério de Bonferroni, teste do  $\chi^2$  da razão de verossimilhanças).

174,8; 4 g.l.,  $P < 0,0001$ ), trote ( $\chi^2 = 39,4$ ; 4 g.l.,  $P < 0,0001$ ), galope ( $\chi^2 = 118,7$ ; 4 g.l.,

$P < 0,0001$ ) e salto ( $\chi^2 = 79,7$ ; 4 g.l.,  $P < 0,0001$ ) (Fig.3). Contudo, os testes pareados

também indicaram similaridades entre as linhagens. Assim, exceto pela linhagem

WIS, cujos limiares de IMO foram significativamente inferiores, não foram

observadas diferenças dos mesmos para as demais linhagens estudadas (Fig.2). Os limiares de EXO dos ratos WIS também foram inferiores aos das linhagens SHR, HBR e SEL. Não obstante, foram similares aos da linhagem WKY. Com pequenas diferenças, a comparação de IMO e EXO por probabilidades de confiança produziu resultados semelhantes (Fig.3). Contudo, estes testes detectaram diferenças de pequena magnitude que não foram observadas nos testes de verossimilhança das curvas de limiar. Os menores limiares de DEF e MIC foram observados para a linhagem WKY, e os maiores para a linhagem SHR. Em realidade, a virtual ausência destas respostas nos ratos SHR impediu a obtenção de ajustes significantes das curvas de limiar e de estimativas consistentes das  $I_{50}$ . Em contraste aos ratos SHR e demais linhagens, nas quais a DEF ocorreu em menos da metade dos animais, esta resposta foi apresentada por todos os ratos da linhagem WKY. Os ratos WIS e WKY apresentaram os menores limiares de TRT, GLP e SLT, enquanto os maiores foram apresentados pelos ratos SEL e SHR (Figs.2-3). Cabe ressaltar, no entanto, os limiares bastante reduzidos da resposta de SLT dos ratos WIS.

Ao contrário do observado em estudos anteriores da linhagem WIS, nos quais as curvas logísticas foram quase sempre paralelas para uma mesma resposta, mesmo para tratamentos farmacológicos distintos, as linhagens diferiram marcadamente quanto à inclinação das curvas, vale dizer, quanto à responsividade ao estímulo elétrico. Diferenças altamente significantes de paralelismo das curvas de limiar também foram observadas para imobilidade ( $\chi^2= 50,5$ ; 4 g.l.,  $P<0,0001$ ), exoftalmia ( $\chi^2= 21,6$ ; 4 g.l.,  $P<0,005$ ), defecação ( $\chi^2= 15,8$ ;

4 g.l.,  $P < 0,05$ ), micção ( $\chi^2 = 42,7$ ; 4 g.l.,  $P < 0,0001$ ), trote ( $\chi^2 = 46,9$ ; 4 g.l.,  $P < 0,0001$ ), galope ( $\chi^2 = 57,9$ ; 4 g.l.,  $P < 0,0001$ ) e salto ( $\chi^2 = 65,3$ ; 4 g.l.,  $P < 0,0001$ ) (Figs.2 e 4). Em realidade, as diferenças na  $R_{50}$  foram ainda mais acentuadas que aquelas das  $I_{50}$  (Fig.4). Em particular, enquanto a  $R_{50}$  dos ratos SEL foi maior que aquela dos ratos WIS para todas as respostas, os ratos WIS apresentaram  $I_{50}$  menores que as dos ratos SEL (Fig.4).

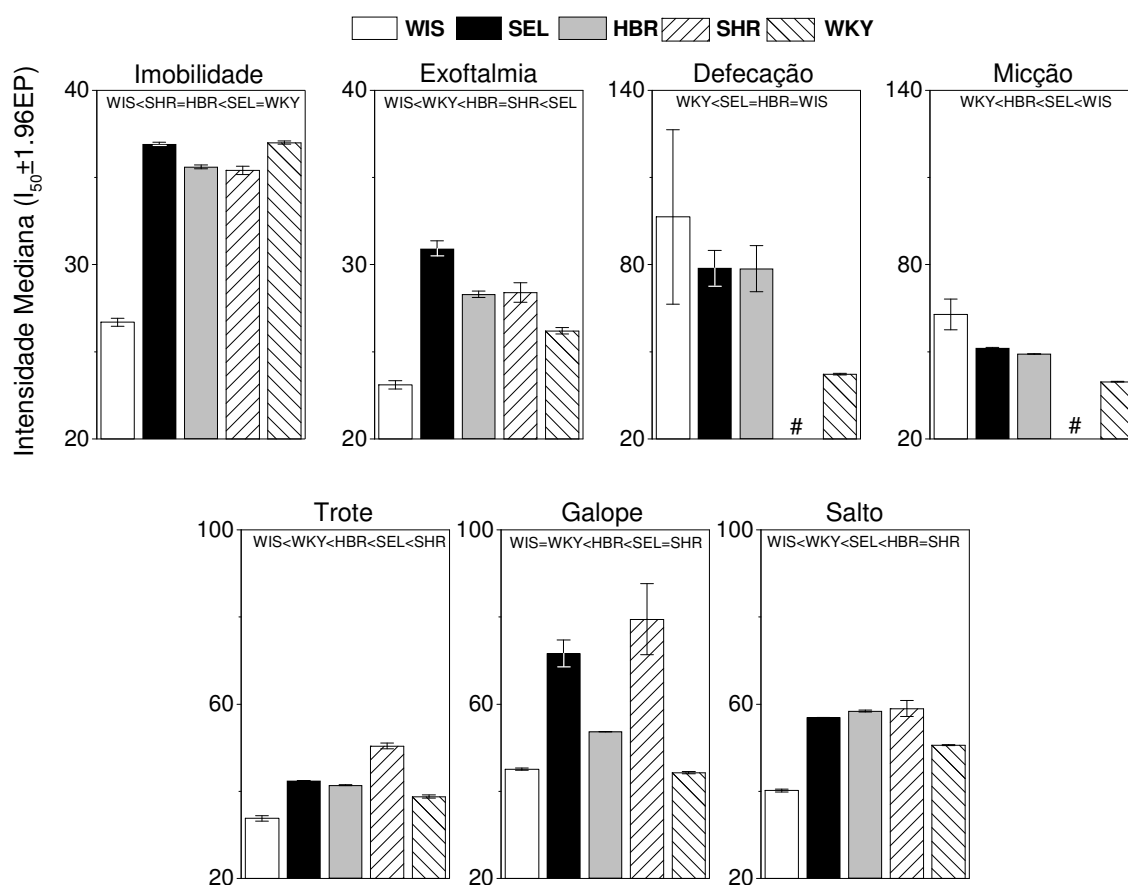


Figura 3. Intensidades medianas e respectivos intervalos de confiança ( $I_{50} \pm 1,96EP$ ) das respostas de defesa induzidas por estimulação do teto do mesencéfalo de ratos Wistar, selvagens e linhagens derivadas. #  $I_{50}$  não-estimáveis devido à frequência extremamente reduzida de resposta. As desigualdades da parte superior dos gráficos indicam as diferenças significantes entre linhagens ( $P < 0,05$ ; probabilidades de confiança).



Em contraste, as  $I_{50}$  elevadas dos ratos SHR foram, em grande medida, devidas à sua baixa responsividade à estimulação intracraniana. De forma similar aos ratos SEL, os ratos WKY também apresentaram  $R_{50}$  elevada para todas as respostas, exceto o TRT.

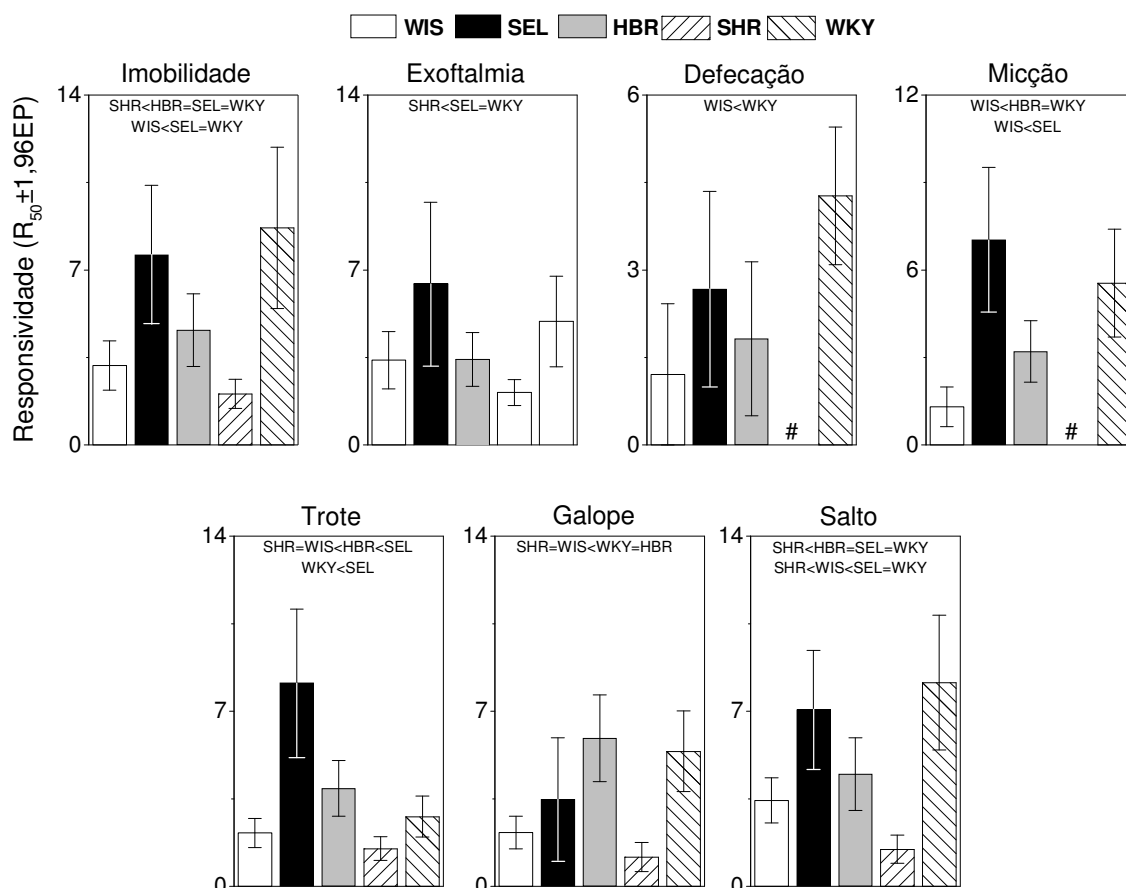


Figura 4. Responsividade máxima e respectivos intervalos de confiança ( $R_{50} \pm 1,96EP$ ) das respostas de defesa induzidas por estimulação do teto do mesencéfalo de ratos Wistar, selvagens e linhagens derivadas. As desigualdades da parte superior dos gráficos indicam as diferenças significantes entre linhagens ( $P < 0,05$ ; probabilidades de confiança).

#### *Hierarquia do Repertório Defensivo.*

A EXO foi a resposta de menor limiar para todas linhagens, variando entre 23,1  $\mu A$  (WIS) e 28,3  $\mu A$  (SHR), tendo sido utilizada como referência no

cálculo do limiar relativo (LR). O repertório defensivo dos ratos WIS apresentou hierarquia similar à observada em estudos anteriores (Bittencourt *et al.*, 2004), qual seja, EXO (1,0) < IMO (1,2) < TRT (1,5) < SLT (1,7) < GLP (2,0) < MIC (2,7) < DEF (4,0). Os LR das respostas de IMO e TRT foram bastante similares para todas as linhagens, sendo, no máximo, 1,4 (IMO) e 2,1 (TRT) vezes o limiar da EXO. Diferenças maiores foram apresentadas para SLT, GLP e MIC, cujos LR máximos foram 1,9; 2,8 e 4,1 vezes os limiares de EXO, respectivamente. Contudo, os LR de MIC da linhagem SHR sequer puderam ser estimados devido à virtual ausência desta resposta nesta linhagem. Em contraste, os LR de DEF apresentaram diferenças acentuadas. Assim, as  $I_{50}$  da DEF foram 1,6 (WKY), 2,6 (SEL), 2,8 (HBR) e 4,0 (WIS) vezes maiores que a  $I_{50}$  da EXO (2,4 unidades de variação). De forma similar à MIC, os LR da DEF da linhagem SHR também não puderam ser estimados em vista da frequência extremamente reduzida destas respostas. No extremo oposto, os WKY limiares extremamente baixos de DEF e MIC. Em ordem crescente para respostas e linhagens, os LR do GLP foram 1,7 (WKY), 2,0 (WIS), 2,1 (HBR), 2,3 (SEL) e 2,8 (SHR) (1,1 unidades de variação) e do SLT, 1,7 (WIS), 1,8 (SEL), 1,9 (HBR), 1,9 (WKY) e 2,8 (SHR) (1,1 unidades de variação).

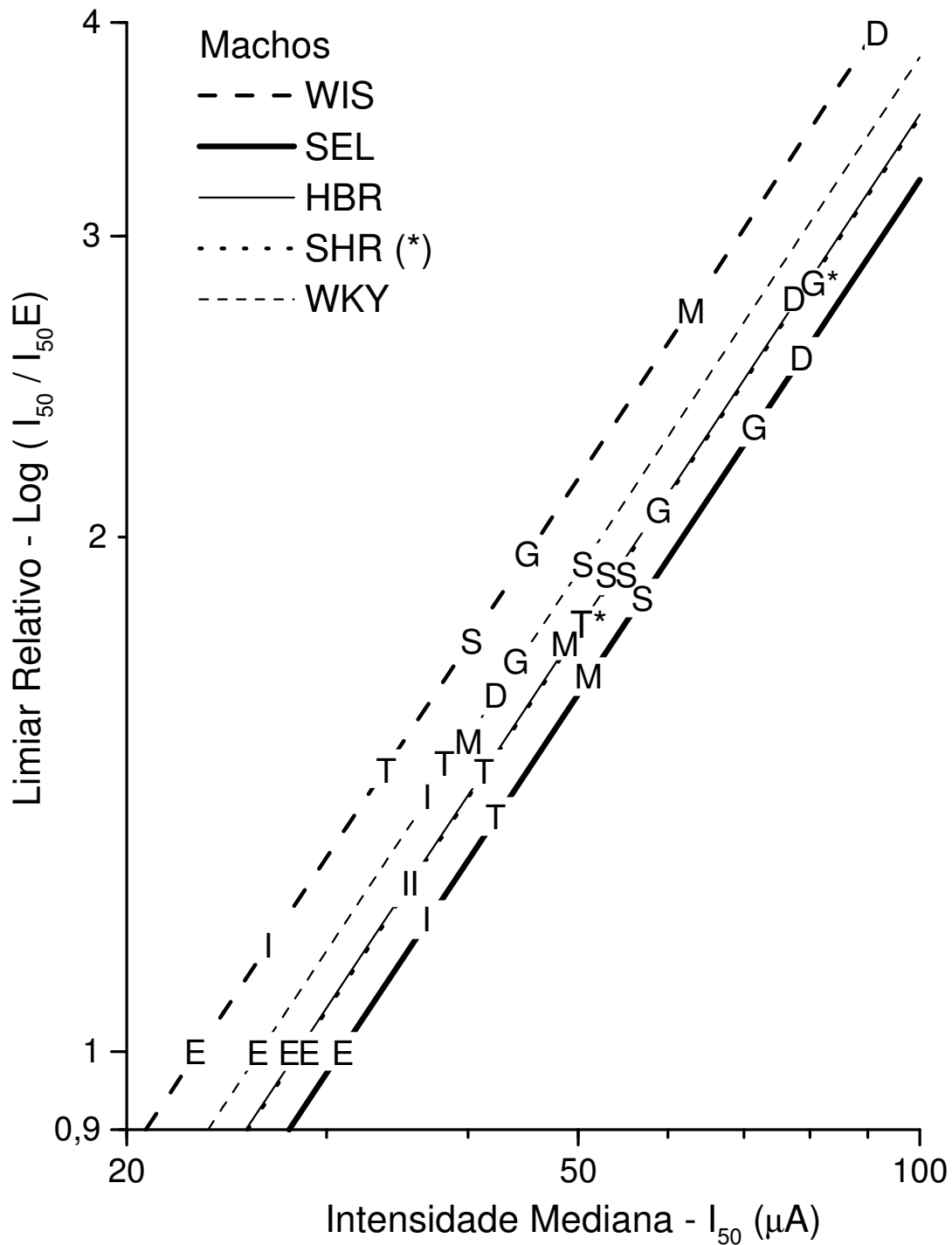


Figura 5. Etográfico das respostas de defesa produzidas por estimulação elétrica com intensidades crescentes da MCPD das linhagens Wistar (WIS), selvagem (SEL), hipertensa (SHR), Wistar-Kyoto (WKY) e híbrida resultante do cruzamento dos ratos SEL e WIS (HBR). As letras representam o limiar relativo, isto é, a razão do limiar mediano ( $I_{50}$ ) de cada resposta com o menor limiar mediano, vale dizer, exoftalmia ( $I_{50E}$ ). A abscissa representa os valores absolutos dos limiares medianos. E, exoftalmia, I, imobilidade, T, trote, G, galope, S, salto, M, micção, D,

defecação. Nos casos de superposição de respostas distintas das linhagens HBR e SHR, o asterisco representa a resposta da última linhagem.

## **DISCUSSÃO**

A análise logística de limiares (Schenberg *et al.*, 1990; Sudré *et al.*, 1993; Bittencourt *et al.*, 2004) detectou diferenças altamente significantes tanto na magnitude dos limiares quanto na responsividade das linhagens à variação da intensidade de estimulação. As diferenças de magnitude foram avaliadas por testes de razão de verossimilhanças, que comparam a locação das curvas de limiares, ou pela inspeção direta dos IC95% das estimativas populacionais das  $I_{50}$  (probabilidades de confiança). Em geral, os testes forneceram resultados consistentes. Contudo, quando os ajustes logísticos foram altamente significantes, os intervalos de confiança das  $I_{50}$  foram extremamente pequenos. Nestes casos, os testes de probabilidades de confiança acusaram como estatisticamente significantes diferenças biologicamente irrelevantes entre 1,5 e 3,0  $\mu\text{A}$ . Como estas diferenças não foram detectadas pelos testes de verossimilhança, a utilização dos mesmos para o nível descritivo de Bonferroni parece ser mais consistente que o uso das probabilidades de confiança. Adicionalmente, o  $\chi^2$  da razão de verossimilhanças pode ser fracionado para a análise das contribuições individuais de variância devidas à locação ou paralelismo das curvas de limiar. Como a inclinação da curva representa a taxa de variação da probabilidade de resposta em função da intensidade de estimulação ( $dP/dI$ ), ela é um índice adequado da responsividade da estrutura à variação do estímulo. No caso da sigmóide logística, o parâmetro mais conveniente é a inclinação da curva para  $I_{50}$ ,

isto é, a responsividade máxima ( $R_{\max}$ ) ao estímulo. De fato, o presente estudo mostrou que linhagens com  $I_{50}$  similares para uma dada resposta podem apresentar  $R_{\max}$  bastante distintas.

Até onde sabemos, este estudo é a primeira comparação de linhagens quanto aos comportamentos produzidos pela estimulação elétrica de uma estrutura específica do cérebro. A ausência de diferenças significativas quanto à localização dos eletrodos nas estruturas do teto do mesencéfalo legitimou o agrupamento de todos os ratos da mesma linhagem, independentemente do sítio estimulado. No mesmo sentido, é importante frisar que os eletrodos localizaram-se majoritariamente nas colunas dorsomedial, dorsolateral e lateral da MCPA (83%) e, em menor número, nas camadas profundas do colículo superior (7%), estruturas que apresentam respostas e limiares praticamente idênticos à estimulação com pulsos senoidais (Bittencourt *et al.*, 2005). Por outro lado, cerca de 10% dos eletrodos localizaram-se na coluna ventrolateral da MCPA, cujos limiares de defesa são ligeiramente superiores para a estimulação senoidal. Não obstante, estes eletrodos distribuíram-se de forma homogênea entre as linhagens analisadas.

Exceto pelas respostas de DEF e MIC da linhagem WKY, não houve diferenças importantes na hierarquia dos repertórios de defesa. Contudo, as linhagens diferiram acentuadamente quanto à magnitude dos limiares e responsividade. Notavelmente, os ratos WIS apresentaram os menores limiares de defesa e os ratos SEL os limiares mais elevados para a maioria das respostas. Estes achados corroboram os experimentos anteriores nos quais os ratos SEL foram sedados com éter etílico para adaptação do cabo de estimulação (Póvoa,

2003; Schenberg *et al.*, 2005, ver Anexo 1). Em realidade, os limiares dos ratos SEL só foram inferiores àqueles dos ratos SHR para as respostas de TRT, GLP e, principalmente, DEF e MIC.

Em particular, embora a DEF e MIC tenham sido apresentadas por menos da metade dos ratos WIS, SEL e HBR, a frequência desta resposta nos ratos SHR foi tão baixa que impossibilitou o ajuste das curvas de limiar e a obtenção de estimativas consistentes das  $I_{50}$ . No extremo oposto, a DEF foi apresentada por todos os ratos da linhagem WKY. Curiosamente, o comportamento de DEF das linhagens SHR e WKY na exploração da arena foram opostos aos observados para a estimulação da MCPD, vale dizer, os ratos SHR apresentaram as frequências maiores de DEF e os WKY frequências iguais ou mesmo menores que as outras linhagens (ver Estudo II, Fig.1). É igualmente notável que a DEF da exploração da arena somente tenha carregado no fator ansiedade para os híbridos SHB. Entretanto, este resultado deve ser interpretado com cautela devido à pequena amostra desta linhagem ( $n=7$ ). Nos machos das outras linhagens, a DEF correlacionou-se com atividade (SHR e HBR), sedação (WKY), ansiólise (SEL) ou não carregou em fator algum (WIS) (ver Estudo III, Tabs.5-6). No conjunto, nossos dados sugerem que os comportamentos de DEF da arena (demarcação territorial) e MCPD (medo) sejam controlados por mecanismos distintos.

Como a IMO e EXO parecem estar envolvidas em mecanismos atencionais (Schenberg *et al.*, 2001), os limiares elevados destas respostas nos ratos SEL causam estranheza em vista da alta reatividade destes animais às ameaças naturais. Portanto, os limiares reduzidos dos ratos SEL para detecção de

predadores (alta reatividade) devem ser atribuídos a áreas outras que não a MCPD. Esta possibilidade é apoiada por evidências indiretas provenientes de estudos de abrasamento (*kindling*) da amígdala (Tannure, 2005). Ratos WIS submetidos a este procedimento assemelham-se aos ratos SEL, apresentando enorme resistência à captura e acentuada agressividade. Contudo, tal como os ratos SEL, as respostas de defesa à estimulação da MCPD apresentam limiares significativamente maiores que os ratos controles (Tannure, 2005).

Ao contrário do observado em estudos anteriores da linhagem WIS, nos quais as curvas logísticas foram quase sempre paralelas para uma mesma resposta, mesmo quando representativas de tratamentos farmacológicos distintos (Vargas e Schenberg, 2001; Schenberg *et al.*, 2000, 2002), as linhagens diferiram marcadamente quanto à inclinação das curvas, vale dizer, quanto à responsividade ao estímulo elétrico. Em geral, a análise da responsividade forneceu resultados opostos àqueles das  $I_{50}$ . Assim, enquanto as linhagens WIS e SHR foram menos responsivas, os ratos SEL e WKY apresentaram a maior responsividade para a maioria dos comportamentos. Portanto, a resposta imediata e vigorosa dos ratos SEL à detecção de um predador é, muito provavelmente, devida às características intrínsecas da MCPA desta linhagem.

Os ratos WIS e WKY apresentaram os menores limiares de EXO, TRT, GLP e SLT. Adicionalmente, os ratos WKY apresentaram limiares extremamente baixos de DEF e MIC e responsividades iguais às dos ratos WIS para EXO e TRT e maiores para IMO, DEF, MIC, GLP e SLT. Portanto, os ratos WKY foram os únicos que combinaram limiares baixos e alta responsividade para todas as respostas de defesa. Estes ratos têm sido propostos como um modelo

genético de depressão (Paré, 2000; Paré *et al.*, 2001; Malkesman *et al.*, 2005; Braw *et al.*, 2006). Por outro lado, a estimulação da MCPA tem sido aventada como um modelo consistente dos ataques de pânico (Gentil, 1988; Deakin e Graeff, 1991; Schenberg *et al.*, 2001). Como pânico e depressão apresentam uma alta comorbidade, a linhagem WKY parece reunir os elementos para um modelo genético da comorbidade destes transtornos.



## REFERÊNCIAS

- Berrettini WH, Harris N, Ferraro TN, Vogel WH (1994) Maudsley reactive and non-reactive rats differ in exploratory behavior but not in learning. *Psychiatr Genet* 4: 91-94.
- Bittencourt AS, Carobrez AP, Zamprogno LP, Tufik S, Schenberg LC (2004) Organization of single components of defensive behaviors within distinct columns of periaqueductal gray matter of the rat: role of N-methyl-D-aspartic acid glutamate receptors. *Neuroscience* 125: 71-89
- Bittencourt AS, Nakamura-Palacios EM, Mauad H, Tufik S, and Schenberg LC (2005). Organization of electrically and chemically evoked defensive behaviors within the deeper collicular layers as compared to the periaqueductal gray matter of the rat. *Neuroscience* 133: 873-892.
- Braw Y, Malkesman O, Dagan M, Bercovich A, Lavi-Avnon Y, Schroeder M, Overstreet DH, Weller A (2006) Anxiety-like behaviors in pre-pubertal rats of the Flinders Sensitive Line (FSL) and Wistar-Kyoto (WKY) animal models of depression. *Behav Brain Res* 167: 261-269.
- Broadhurst PL (1962). A note on further progress in a psychogenetic selection experiment. *Psychol. Rep.*, 10: 65-66.
- Broadhurst PL (1969). Psychogenetics of emotionality in the rat. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 159: 806-824.
- Broadhurst PL (1975). The Maudsley Reactive and Nonreactive strains of rats, a survey. *Behav. Genet.*, 5: 299-319.
- Broadhurst PL e Levine S (1963). Behavioural consistency in strains of rats selectively bred for emotional elimination. *Br. J. Psychol.*, 54: 121-125.
- Deakin, J.F.W. e Graeff, F.G. (1991). 5-HT and mechanisms of defence. *J. Psychopharmacol.* 5: 305-315.
- Gentil, V. (1988). The aversive system, 5-HT and panic attacks. Em '*Animal Models of Psychiatric Disorders*', editado por Simon, P., Soubrié, P. e Wildlocher, D.; Karger, Basel, pp.142-145.

- Guitart-Masip M, Johansson B, Fernandez-Teruel A, Canete T, Tobena A, Terenius L, Gimenez-Llort L (2006) Divergent anatomical pattern of D1 and D3 binding and dopamine- and cyclic AMP-regulated phosphoprotein of 32 kDa mRNA expression in the Roman rat strains: Implications for drug addiction. *Neuroscience* 142: 1231-1243.
- Immelmann K (1983). *Introduction to ethology*. New York : Plenum.
- Kruska D (1975a). Comparative quantitative study on brains of wild and laboratory rats. Comparison of size of allocortical brain centers. I. *J. Hirnforsch*, 16: 469-483.
- Kruska D (1975b). Comparative quantitative study on brains of wild and laboratory rats. Comparison of size of allocortical brain centers. II. *J. Hirnforsch*, 16: 485-496.
- Malkesman O, Braw Y, Zagoory-Sharon O, Golan O, Lavi-Avnon Y, Schroeder M, Overstreet DH, Yadid G, Weller A (2005) Reward and anxiety in genetic animal models of childhood depression. *Behav Brain Res* 164: 1-10.
- Mohapel P, McIntyre DC (1998) Amygdala kindling-resistant (SLOW) or -prone (FAST) rat strains show differential fear responses. *Behav Neurosci* 112: 1402-1413.
- Nelovkov A, Areda T, Innos J, Koks S e Vasar E (2006). Rats displaying distinct exploratory activity also have different expression patterns of  $\gamma$ -aminobutyric acid- and cholecystokinin-related genes in brain regions. *Brain Research*, 21 – 31.
- Pare WP (2000) Investigatory behavior of a novel conspecific by Wistar Kyoto, Wistar and Sprague-Dawley rats. *Brain Res Bull* 53: 759-765.
- Pare WP, Tejani-Butt S, Kluczynski J (2001) The emergence test: effects of psychotropic drugs on neophobic disposition in Wistar Kyoto (WKY) and Sprague Dawley rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 25: 1615-1628.
- Póvoa RM (2003) Influências do sexo e linhagem nos limiares da reação de defesa induzida pela estimulação elétrica da matéria cinzenta periaquedutal

- de ratos. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES.
- Ramos A (2001). Genética do comportamento. <http://www.epub.org.br/cm/indexge.htm>
- Rooszendaal B, Wiersma A, Driscoll P, Koolhaas JM e Bohus B (1992). Vasopressinergic modulation of stress response in the central amygdala of the Roman high-avoidance and low-avoidance rat. *Brain Res.*, 596: 35-40.
- Sagvolden T, Pettersen MB, Larsen MC (1993) Spontaneously hypertensive rats (SHR) as a putative animal model of childhood hyperkinesia: SHR behavior compared to four other rat strains. *Physiol Behav* 54: 1047-1055.
- Sagvolden T, Russell VA, Aase H, Johansen EB, Farshbaf M (2005) Rodent models of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry* 57: 1239-1247.
- Schenberg LC, Costa MB, Borges PCL, Castro MFS (1990) Logistic analysis of the defense reaction induced by electrical stimulation of the rat mesencephalic tectum. *Neurosci Biobehav Rev* 14: 473-479.
- Schenberg LC, Marcal LPA, Seeberger F, Barros MR, Sudré ECM (2000) L-type calcium channels selectively control the defensive behaviors induced by electrical stimulation of dorsal periaqueductal gray and overlying collicular layers. *Behav Brain Res* 111: 175-185.
- Schenberg LC, Bittencourt AS, Sudre EC, Vargas LC (2001) Modeling panic attacks. *Neurosci Biobehav Rev* 25: 647-659.
- Schenberg LC, Capucho LB, Vatanabe RO, Vargas LC (2002) Acute effects of clomipramine and fluoxetine on dorsal periaqueductal grey-evoked unconditioned defensive behaviours of the rat. *Psychopharmacology* 159: 138-144
- Schenberg LC, Povaia RM, Costa AL, Caldellas AV, Tufik S, Bittencourt AS (2005) Functional specializations within the tectum defense systems of the rat. *Neurosci Biobehav Rev* 29: 1279-1298.
- Stead JD, Clinton S, Neal C, Schneider J, Jama A, Miller S, Vazquez DM, Watson SJ, Akil H (2006) Selective breeding for divergence in novelty-seeking traits:

heritability and enrichment in spontaneous anxiety-related behaviors. *Behav Genet* 36: 697-712.

Sudré ECM, Barros MR, Sudré GN, Schenberg LC (1993) Thresholds of electrically induced defence reaction of the rat: short- and long-term adaptation mechanisms. *Behav Brain Res* 58: 141-154.

Tannure, R.M. (2005). Efeitos do abrasamento (*kindling*) da amígdala sobre os limiares da reação de defesa induzida por estimulação da matéria cinzenta periaquedutal de ratos, Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, UFES, Vitória, ES, Brasil.

Vargas LC, Schenberg LC (2001) Long-term effects of clomipramine and fluoxetine on dorsal periaqueductal grey-evoked innate defensive behaviours of the rat. *Psychopharmacology (Berl)* 155: 260-268.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)