

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA
DO RIO DE JANEIRO



Daniele Rodrigues Cavaliere

**Efeitos do benzodiazepínico midazolam
no labirinto em cruz elevado em
linhagens de ratos com traços altos ou
baixos de ansiedade**

Dissertação apresentada como requisito parcial
para obtenção do grau de Mestre pelo Programa
de Pós-Graduação em Psicologia (Psicologia
Clínica) da PUC-Rio.

Orientador: Prof. Jesus Landeira-Fernandez

Rio de Janeiro
Março de 2018



Daniele Rodrigues Cavaliere

**Efeitos do benzodiazepínico midazolam
no labirinto em cruz elevado em
linhagens de ratos com traços altos ou
baixos de ansiedade**

Dissertação de Mestrado

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Psicologia do (Psicologia Clínica) da PUC-Rio. Aprovada pela Comissão Examinadora abaixo assinada.

Professor Jesus Landeira-Fernandez
Orientador
Departamento de Psicologia - PUC-Rio

Antônio Pedro de Mello Cruz
UnB/DF

Prof. Vitor de Castro Gomes
UFSJ/MG

Profa. Monah Winograd
Coordenadora Setorial de Pós-Graduação e
Pesquisa do Centro de Teologia e Ciências
Humanas - PUC-Rio

Rio de Janeiro, 21 de março de 2018

Todos os direitos reservados. É proibida a reprodução total ou parcial do trabalho sem autorização do autor, do orientador e da universidade.

Daniele Rodrigues Cavaliere

Graduou-se em Psicologia na Faculdade Veiga de Almeida, em 2015. Obteve, em 2017, grau de Especialista em Sexologia em pela FMABC - Faculdade de Medicina do ABC/Santo André (SP) e em Neuropsicologia, pela Santa Casa de Misericórdia do Rio de Janeiro. Obteve grau de Mestre em Psicologia Clínica no Departamento de Psicologia da PUC-Rio, por meio do CNPq, em 2017.

Ficha catalográfica

Cavaliere, Daniele Rodrigues.

Efeitos do benzodiazepínico midazolam no labirinto em cruz elevado em linhagens de ratos com traços altos ou baixos de ansiedade / Daniele Rodrigues Cavaliere; orientador Jesus Landeira-Fernandez. – Rio de Janeiro: PUC, Departamento de Psicologia, 2018.

52 f. : il. ; 29,7 cm

1. Dissertação (mestrado) - Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Departamento de Psicologia.

Inclui referências bibliográficas

1. Psicologia – Teses. 2. Estado e traço de ansiedade. 3. modelos animais. 4. Seleção genética. 5. Cariocas de Alto Congelamento. 6. Cariocas de Baixo Congelamento. I. Landeira-Fernandez, Jesus (Landeira-Fernandez). II. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Departamento de Psicologia. III. Título.

Dedico este trabalho aos meus pais, aos meus filhos Daniel e Natália, e ao meu marido Carlos, que me apoiaram durante este momento e entenderam cada ausência minha. Sem isso nada teria sido possível.

Agradecimentos

Agradeço ao meu orientador e amigo, Professor Dr. J. Landeira-Fernandez, por todo o apoio durante o processo. Por acreditar em mim, por acreditar ser possível. Pela oportunidade de estagiar no Laboratório de Neurociências da PUC-Rio e por todo aprendizado adquirido, o qual foi um ganho enorme para a minha vida pessoal e profissional.

Agradeço ao amigo e Professor Dr. Antônio Pedro de Mello Cruz, por toda a paciência, e persistência em me ensinar cada detalhe, cada especificidade que um trabalho de pesquisa precisa ter. Por não desistir em me ensinar quando tudo estava muito difícil. Me sinto muito grata.

Agradeço de forma especial à querida Professora Dra. Silvia S. Maisonnete, que comanda nosso laboratório. Por todo carinho em me ensinar o mais básico dos básicos em genética e modelos animais. Por me fazer acreditar que eu seria capaz de trabalhar com eles e permitir aprender com cada “puxão de orelha”. Por nossas conversas no caminho da Barra da Tijuca à PUC, diariamente, quando falávamos sobre as questões filosóficas da vida. Por seu humor e sua inteligência. Por me ensinar que aceitar que dói menos.

Agradeço ao CNPq, que possibilitou financeiramente toda esta pesquisa e à PUC-Rio, por tornar possível o estudo em Neurociências, uma área de grande significância para a Psicologia.

Agradeço à minha querida amiga Carolina Irurita, que foi a minha maior incentivadora dos últimos tempos. Por confiar em mim e me ensinar coisas que talvez eu levasse uma vida inteira para aprender. Por me fazer entender que a ingenuidade precisa ser substituída pela responsabilidade das nossas escolhas.

Agradeço de forma muito carinhosa a minha querida amiga Norma Franco, por me ensinar tanto e dividir o maior bem que um indivíduo pode ter: seu tempo comigo. Por cada *feedback* de aula dada, por cada prova feita, por todas as questões da vida.

Agradeço a todos os funcionários do Departamento de Psicologia, em especial Verinha, Marcelina, Fernando e ao John John (apelido carinhoso que o

dei), que sempre me ofereceram apoio necessário durante toda a minha jornada na PUC-Rio.

Agradeço à nossa bióloga, Flavia Rosseti, por seu apoio e suporte em todos os momentos. Principalmente nos mais difíceis dentro do biotério.

Agradeço a toda a equipe do Laboratório de Neurociências, Thaís, Bia, Matheus, Fabiola, Carolina, Thales pelo apoio, por todas as gargalhadas e conversas que tanto me ajudaram no dia a dia dessa jornada.

Agradeço em especial ao André Sena, por me ensinar tantas coisas, principalmente quando cheguei ao laboratório.

Ao meu amigo e fiel escudeiro Jorge Vitor. Por ser meu parceiro nessa jornada. Por todo almoço comprado, por toda ligação para saber se eu precisava de reforços dos universitários. Por toda amizade.

Agradeço à minha querida amiga Carol Gonzales, por toda as nossas conversas e amizade. Por estar comigo em quase todos os momentos. Por fazer parte da minha vida.

Agradeço a minha amiga Kadma por todo o seu apoio.

Agradeço ao meus pais, Evio e Maria, que sempre me apoiaram, e me fizeram entender o valor do conhecimento.

Agradeço ao meu irmão Junior, por toda sua amizade. Por todo o seu amor.

Agradeço a minha irmã de alma Rita por toda a sua amizade. Por toda as conversas que me faziam persistir na minha escolha. Por todo seu amor.

Agradeço aos meus filhos Daniel e Natália por toda admiração. Por todo amor. Por toda a paciência e resiliência para administrar as minhas ausências.

Agradeço ao meu marido, a incansável disponibilidade em cuidar dos nossos filhos com muita dedicação e amor. Por toda a paciência nas minhas ausências. Por todo investimento emocional e financeiro que me possibilitou chegar até o fim.

Agradeço a Deus sem ele nada seria possível. Por me enviar os anjos chamados amigos para me apoiarem e cuidaram de mim. Anjos como Sibebe Aquino, Ana Spiler.

Agradeço a todos que me apoiaram, que não teria como citar.

Resumo

Cavaliere, Daniele Rodrigues; Landeira-Fernandez; Jesus (Orientador). **Efeitos do benzodiazepínico midazolam no labirinto em cruz elevado em linhagens de ratos com traços altos ou baixos de ansiedade.** Rio de Janeiro, 2017. 51 p. Dissertação de Mestrado – Departamento de Psicologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

Embora diversos modelos animais sejam utilizados para testar e selecionar efeitos de drogas ansiolíticas e ansiogênicas, relativamente poucos estudos têm examinado os efeitos de manipulações farmacológicas em animais geneticamente selecionados para fenótipos comportamentais mais diretamente relacionados a transtornos específicos de ansiedade em humanos. O presente estudo investigou os efeitos de um benzodiazepínico (midazolam) no labirinto em cruz elevado (LCE) em duas linhagens de ratos que vêm sendo selecionadas em nosso laboratório para traços altos (Cariocas Alto-Congelamento, CAC) ou baixos (Cariocas Baixo-Congelamento, CBC) relacionados à ansiedade. Após terem suas respostas de congelamento ao contexto registradas e comparadas, animais da 24^a, 25^a e 26^a gerações dessas duas linhagens de ratos foram expostos ao labirinto em cruz elevado (LCE) sob os efeitos de injeções intraperitoneais (1,0 ml/kg) de veículo-salina (0,9%) ou midazolam nas doses de 0,25, 0,5, 0,75 e 1,0 mg/kg. Quando injetados com salina, animais CAC e CBC apresentaram parâmetros maiores e menores de ansiedade, respectivamente, em comparação a animais-controle selecionados randomicamente. O midazolam aumentou de maneira semelhante a exploração dos braços abertos em todos os grupos, embora esse efeito ansiolítico nos animais CBC tenha ocorrido apenas na dose mais baixa da droga (0,25 mg/kg). Esses resultados indicam que os traços relacionados à ansiedade previamente selecionados para respostas altas ou baixas de congelamento ao contexto também se expressam fenotipicamente em padrões comportamentais de exploração no LCE. A utilidade dessas duas linhas de ratos para modelar

transtorno de ansiedade generalizada e selecionar efeitos potencialmente ansiolíticos de novas drogas é explorada.

Palavras-chave

Estado e traço de ansiedade; modelos animais; seleção genética; Cariocas de Alto Congelamento; Cariocas de Baixo Congelamento.

Abstract

Cavaliere, Daniele Rodrigues; Landeira-Fernandez, Jesus (Advisor). **Effects of a benzodiazepine midazolam in the elevated plus maze strains of rats with high and low levels of anxiety**. Rio de Janeiro, 2017. 52 p. Dissertação de Mestrado – Departamento de Psicologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

Although several animal models are used to test and screen anxiolytic and anxiogenic-like drug effects, relatively few studies have examined the effects of pharmacological manipulations in genetically selected animals for behavioral phenotypic traits more directly related to specific anxiety disorders in humans. The present study investigated the effects of a benzodiazepine midazolam in the elevated plus-maze (EPM) in two rat lines which have been selectively bred in our laboratory for high (Cariocas High-Freezing, CHF) or low (Cariocas Low-Freezing, CLF) anxiety-like traits. After being their contextual freezing response registered and compared, animals from the 24th, 25th and 26th generations of these two rat lines were exposed to the EPM under the effects of intraperitoneal injections (1.0 ml/kg) of either vehicle-saline (0.9%) or midazolam in the doses of 0.25, 0.5 and 0.75. When injected with saline, CHF and CLF animals showed higher and lower anxiety-like parameters, respectively, as compared to control-animals randomly selected. Midazolam similarly increased open-arm exploration in all groups, although this anxiolytic-like effect in CLF animals only occurred at the lowest drug dose (0.25 mg/kg). These results indicate that the anxiety-like traits previously selected for high or low contextual freezing responses are also phenotypically expressed in behavioral patterns of exploration in the EPM. The usefulness of these two rat lines to model generalized anxiety disorder and screen new putative anxiolytic drug effects is explored.

Keywords

State and trait anxiety; animal models; genetic selection; Cariocas High-Freezing; Cariocas Low-Freezing.

Sumário

1	Introdução	14
1.1	Ansiedade	14
1.2	Classificação e validação dos modelos animais de ansiedade	15
1.3	Resposta de congelamento ao contexto	17
1.4	O teste do labirinto em cruz elevado (LCE)	18
1.5	Ansiedade enquanto estado e traço	19
1.6	Cariocas de alto (CAC) ou baixo (CBC) congelamento	20
2	Objetivos	25
3	Experimento	26
3.1	Sujeitos	26
3.2	Equipamentos	26
3.3	Drogas	27
3.4	Procedimento	27
3.4.1	Condicionamento da resposta de congelamento ao contexto	27
3.4.2	Exposição ao LCE	28
3.5	Resultados	29
3.5.1	Análises do congelamento durante a fenotipagem	29
3.5.2	Exposição ao LCE	32
4	Discussão	35
5	Conclusão	38
6	Referências bibliográficas	40

Lista de figuras

Figura 1 - Porcentagem da resposta de congelamento ao contexto nos períodos pré-choque (acima), imediatamente pós-choque (meio) e teste (abaixo) nas linhagens com traços alto (CAC) ou baixo (CBC) de congelamento, e em animais-controle derivados de cruzamentos não-seletivos (CTL). Barras indicam as médias (n = 10 por grupo) e as linhas verticais representam o erro padrão da média. 31

Figura 2 - Porcentagem de entradas nos braços abertos (superior), porcentagem de tempo gatos nos braços abertos (meio) e total de entradas (inferior) nas diferentes linhagens expostas ao LCE sobre o efeito de injeções (1,0 mg/kg, IP) de veículo-salina ou midazolam nas doses de 0,25, 0,5, 0,75 e 1,0 mg/kg. Barras indicam as médias (n = 10 por grupo) e as linhas verticais representam o erro padrão da média (+). 34

Lista de abreviaturas e siglas

ANOVA	Análise de variância
CAC	Cariocas com Alto Congelamento
CBC	Cariocas com Baixo Congelamento
CTL	Animais-controle derivados de cruzamentos aleatórios ou não-seletivos
GABA	Ácido gama-aminobutírico
LCE	Labirinto em cruz elevado
MDZ	Midazolam
SBNeC	Sociedade Brasileira de Neurociência e Comportamento

1

Introdução

1.1 Ansiedade

Ao longo da evolução filogenética, diferentes habilidades passaram a ser incorporadas ao repertório comportamental de diferentes filos e espécies animais. Dentre os mamíferos, a enorme complexidade de comportamento emocional constituiu-se importante salto evolutivo (Giddens & Turner, 1999). Conforme já apontava Darwin (1872) em seu livro *A expressão das emoções no homem e animais*, a capacidade de os mamíferos expressarem e reconhecerem diferentes formas de emoção, com suas respectivas bases neuroanatômicas e fisiológicas, desempenhou papel adaptativo muito importante para diversas espécies, incluindo o homem.

Medo e ansiedade estão entre as emoções mais elementares e parecem ter evoluído como suporte motivacional às reações de defesa diante das ameaças ambientais. A ansiedade humana tem suas raízes nas reações de defesa dos animais (Graeff, 2003). Subjetivamente, tais emoções compartilham semelhanças, mas os termos não são intercambiáveis. Enquanto o medo é definido como o estado emocional decorrente do contato direto do organismo com alguma fonte de perigo real e bem definida em seu ambiente, a exemplo do contato direto de uma presa com seu predador, a ansiedade se refere às sensações de apreensão e insegurança diante de estímulos sinalizadores de alguma ameaça em potencial, as quais se apresentam de maneira vaga e inespecífica (Steimer, 2002; Graeff, 2004; Perkins et al., 2007; Shuhama et al., 2007; Blanchard et al., 2008; Davis et al., 2010; Graeff & Zangrossi Jr., 2010; Perkins et al., 2012; Perusini & Fanselow, 2015; Tovote et al., 2015).

A ansiedade tem sido estudada experimentalmente em diversos modelos animais (para revisões ver Cruz et al., 1997; File et al., 2004; Belzung & Lemoine, 2011; Cruz & Landeira-Fernandez, 2012; Campos

et al., 2013; Bourin, 2015).

Tais modelos são úteis e, de certa forma quase indispensáveis, na seleção de novas drogas ansiolíticas e no estudo das bases comportamentais e neurobiológicas da ansiedade. Mas como outros modelos em ciência, justamente por serem representações simplificadas de sistemas mais complexos e não o fenômeno em si, os modelos animais de ansiedade também têm limitações. Uma das principais limitações é a que animais não “falam”, tornando impossível assegurar, por meio de relatos verbais diretos, que eles tenham a mesma percepção subjetiva de ansiedade dos humanos. A despeito dessa limitação, existe grande correspondência entre as diferentes espécies de mamíferos em relação aos circuitos neurais envolvidos tanto na detecção dos sinais de perigo em potencial quanto na deflagração das reações de defesa. De fato, a possibilidade de se reproduzir experimentalmente essas variáveis vem sendo a base da utilização da maioria dos modelos animais de ansiedade.

1.2 Classificação e validação dos modelos animais de ansiedade

Genericamente, os diversos modelos animais utilizados no estudo experimental da ansiedade podem ser agrupados em duas grandes categorias: modelos baseados em formas de aprendizagem associativa e modelos etologicamente fundamentados.

Os modelos animais de ansiedade baseados em formas de aprendizagem associativa, conforme o próprio nome sugere, incluem diversos testes nos quais o estado de ansiedade é induzido experimentalmente por processos de aprendizagem associativa, sejam estes mediados pelo condicionamento clássico, pelo condicionamento operante, ou mesmo por essas duas formas de condicionamento combinadas em um único teste. Destacam-se dentre os modelos de ansiedade baseados em processos associativos os testes de conflito (Geller et al., 1962; Vogel et al., 1971), a supressão condicionada (Estes & Skinner, 1941; Allcoat et al., 2015), os testes de esquiva (Mowrer & Lamoreaux, 1946; Fernández-Teruel et al., 1991), a resposta de sobressalto intensificada pelo medo (Davis et al., 2010) e a resposta condicionada de congelamento “*freezing*” (Bolles & Riley, 1973; Bolles & Collier, 1976; Bouton & Bolles, 1980).

Ao contrário dos modelos animais de ansiedade baseados em processos de aprendizagem associativa, os modelos animais de ansiedade etologicamente fundamentados manipulam experimentalmente reações de defesa de uma determinada espécie animal diante de situações ambientais naturalmente aversivas, as quais sinalizam, de maneira inata e independente de qualquer forma de aprendizagem prévia, alguma forma de perigo em potencial (Lister, 1990; Rodgers & Cole, 1994). Dentre estes modelos estão o teste do campo aberto (Hall, 1934; Christmas & Maxwell, 1970), a transição claro-escuro (Crawley & Goodwin, 1980), a interação social (File & Hyde, 1978; File, 2003), a vocalização ultrassônica em ratos, a interação presa-predador, o labirinto em “T” elevado (Graeff et al., 1993; Zangrossi-Jr & Graeff, 1997; Graeff et al., 1998) e o labirinto em cruz elevado (Handley & Mithani, 1984; Pellow et al., 1985).

Finalmente, embora não se enquadrando nessas duas categorias anteriores de modelos animais de ansiedade, existem ainda alguns modelos animais cujas reações de defesa são deflagradas por meio da estimulação (elétrica e/ou química) direta de estruturas e circuitos encefálicos subjacentes às reações de defesa e ansiedade. O exemplo mais conhecido desse tipo de modelo é o de pânico derivado da estimulação da matéria cinzenta periaquedutal dorsal (Brandão et al., 1982; Deakin & Graeff, 1991).

O conjunto desses modelos animais vem sendo utilizado na seleção de novos compostos ansiolíticos, no teste de agentes ansiogênicos, bem como em investigações sobre os mecanismos neurobiológicos e comportamentais subjacentes à ansiedade. Eles são validados à medida que atendem satisfatoriamente um ou mais dos seguintes critérios: previsibilidade da resposta farmacológica, semelhança e homologia (Treit, 1985).

Previsibilidade da resposta farmacológica é o critério alvo da seleção de novos compostos ansiolíticos e ansiogênicos. Nele são comparados os efeitos clínicos de uma droga em seres humanos e seus efeitos no modelo animal, e vice-versa. Por exemplo, uma droga comprovadamente ansiolítica na clínica em humanos deve promover, nas mesmas doses, efeitos ansiolíticos no modelo animal de ansiedade. Da mesma forma, uma droga que induz efeitos ansiogênicos em humanos, deve promover efeitos ansiogênicos no modelo animal de ansiedade. Têm-se, assim, um caminho da clínica para o modelo

animal, e um caminho do modelo animal para a clínica. Se um modelo animal detecta um efeito ansiolítico ou ansiogênico de uma dada substância, estes efeitos devem ser reproduzidos nas mesmas doses e relação de potência quando testados em humanos. Muitas vezes ocorrem problemas de falso negativo e de falso positivo. O falso negativo é configurado quando uma droga reconhecidamente ansiolítica na clínica falha ao promover efeito ansiolítico no modelo animal. O falso positivo ocorre quando o modelo detecta um efeito ansiolítico em potencial e o mesmo não se confirma em estudos clínicos de validação em humanos.

O critério de semelhança, como o próprio nome sugere, se refere à semelhança compartilhada entre a ansiedade e seus sintomas e as características comportamentais definidas como ansiedade no modelo animal. Finalmente, o critério de homologia ou validade teórica pressupõe que as mesmas funções e organização de sistemas comportamentais e neurobiológicos presentes na etiologia e fisiopatologia dos sintomas clínicos integrem o mesmo conjunto teórico de explicações utilizado no modelo animal.

Considerando que o presente estudo utilizou a resposta condicionada de congelamento ao contexto no processo de cruzamento seletivo das linhagens com alto ou baixo traço de ansiedade, bem como o labirinto em cruz elevado para o teste dos efeitos comportamentais do midazolam nessas linhagens, é feita a seguir uma descrição mais detalhada desses dois modelos animais de ansiedade.

1.3 Resposta de congelamento ao contexto

A capacidade de aprender e formar relações entre eventos aversivos ou nocivos e estímulos ambientes que predizem esses eventos é essencial para a sobrevivência e tem sido estudada experimentalmente em laboratório (LeDoux, 1998; Maren, 2001).

Em 1872, Darwin já dizia “[...] *The frightened man at first stands like a statue motionless and breathless* [...]”, ou seja, “[...] O homem amedrontado primeiro fica como uma estátua imóvel e sem fôlego [...]”. (p. 290). Em roedores, a resposta de congelamento (*freezing*) é uma das principais reações

de medo, sendo estudada há décadas (Bolles & Riley, 1973; Bolles & Fanselow, 1980; Fanselow, 1980, 1999).

A resposta de congelamento pode ser uma reação inata de defesa diante de situações ameaçadoras, mas também pode ser desencadeada por processos de aprendizagem associativa, mediados pelo condicionamento clássico. Em laboratório, um dos procedimentos mais utilizados para se estudar a resposta condicionada decorrente de processos de aprendizagem é a resposta condicionada de congelamento ao contexto em ratos (Fanselow, 1990; Fanselow & Kim, 1994; Fanselow et al., 1994). O procedimento envolve a exposição do animal a um determinado contexto, em que, após alguns instantes, ele toma contato com um estímulo aversivo, usualmente choques elétricos de baixa intensidade e duração. Após um intervalo, o animal retorna ao biotério. Vinte e quatro horas após é reexposto ao mesmo contexto na ausência de choque. Observa-se então que o animal apresenta um padrão típico de reação de congelamento, o qual é quantificado como índice de medo/ansiedade condicionado. O padrão típico de congelamento é definido operacionalmente pela ausência total de movimentos do corpo e vibrissas, exceto os necessários para respiração.

Sua validação como modelo animal de ansiedade encontra respaldo no fato de que diversos fármacos com propriedades ansiolíticas reduzem a porcentagem de congelamento ao contexto nas mesmas doses que reduzem estados de ansiedade em humanos (Hashimoto et al., 1999; Maki et al., 2000; Pain et al., 2002).

1.4 O teste do labirinto em cruz elevado (LCE)

Um dos modelos animais mais utilizados nas últimas décadas, o labirinto em cruz elevado (LCE) está baseado nos estudos de Handley, McBlane, Critchley e Njung'e (1993), já tendo sido amplamente validado como modelo animal de ansiedade por meio de estudos comportamentais, farmacológicos, fisiológicos e neurobiológicos (Pellow et al., 1985; Pellow & File, 1986; Lister, 1987; para revisões ver também Hogg, 1996; Carobrez & Bertoglio, 2005; Pinheiro et al., 2007; Pawlak et al., 2012).

Neste teste, ratos ou camundongos são colocados na plataforma central de quatro braços que formam uma cruz, elevados 50 centímetros em relação ao solo. Dois desses braços são abertos e os outros dois braços são envolvidos por paredes laterais. Nestas condições, os animais têm a tendência natural de explorar os quatro braços, mas exploram menos os braços abertos. Tradicionalmente, a porcentagem de entradas nos braços abertos $[\text{número de entradas nos braços abertos} / (\text{número de entradas nos braços abertos} + \text{número de entradas nos braços fechados}) \times 100]$ e a porcentagem de tempo gasto nos braços abertos $[\text{tempo gasto nos braços abertos} / (\text{tempo gasto nos braços abertos} + \text{tempo gasto nos braços fechados}) \times 100]$ são utilizadas como índices de ansiedade, enquanto o total de entradas (número de entradas nos braços abertos + número de entradas nos braços fechados) reflete atividade locomotora.

Ansiolíticos aumentam seletivamente a exploração dos braços abertos, enquanto agentes ansiogênicos diminuem essa exploração (Pellow & File, 1986; Lister, 1987; File & Aranko, 1988; Costall et al., 1989; Almeida et al., 1991; Gibson et al., 1994; Hasenöhrle et al., 1996; Mora et al., 1997; Braun et al., 2011; Doukkali et al., 2016). Um efeito seletivo sobre estados de ansiedade neste teste é interpretado quando este aumento (efeito ansiolítico) ou diminuição (efeito ansiogênico) é observado na ausência de efeitos significativos sobre a atividade locomotora, a qual é identificada tradicionalmente pela soma das entradas nos braços abertos e fechados (Handley et al. 1984; Pellow et al., 1985), ou ainda pelo número absoluto de entradas nos braços fechados (Cruz et al., 1994; Rodgers & Dalvi, 1997).

Além das medidas convencionais de entradas e de tempo gasto nos braços abertos e fechados, alguns autores (p.ex., Cruz et al., 1994; Rodgers, & Cole, 1994; Silva & Brandão, 2000) têm incorporado outras medidas de exploração no LCE. Tais medidas permitiram uma visão mais complexa do padrão de exploração de ratos e camundongos nesse teste, bem como têm-se mostrado especialmente úteis na detecção de efeitos ansiolíticos e ansiogênicos não identificados pelas medidas convencionais (Setem et al., 1999).

1.5 Ansiedade enquanto estado e traço

Existem duas formas de a ansiedade se manifestar. Uma se refere ao estado de ansiedade no qual o conjunto de reações comportamentais, cognitivas e neurobiológicas é ativado de maneira momentânea e transitória. Sua intensidade e duração variam bastante ao longo do tempo e mantêm uma relação direta com o evento ansiogênico desencadeador. Por outro lado, o traço de ansiedade refere-se às características ou peculiaridades de um indivíduo para lidar com maior ou menor ansiedade diante de mudanças ambientais que sinalizam perigo em potencial.

Enquanto o estado de ansiedade é transitório, o traço de ansiedade é bem mais estável e se mantém praticamente inalterado por toda a vida (Endler et al., 1976; Spielberger, 1989; Barlow, 2004; Chambers et al., 2004).

O componente genético do traço de ansiedade está claramente demonstrado e parece influenciar o estado de ansiedade quando um indivíduo com maior ou menor traço de ansiedade se encontra diante de uma situação ansiogênica que lhe sinaliza algum perigo em potencial (Gordon & Hen, 2004; Hettema et al., 2005; McGrath et al., 2012; Domschke & Maron, 2013; Sharma et al., 2016; Gottschalk & Domschke, 2017).

Aqui então se coloca uma questão importante. Apesar da inquestionável utilidade dos modelos animais de ansiedade para a seleção de novos compostos ansiolíticos e para o estudo das bases comportamentais e neurobiológicas dos transtornos de ansiedade, maioria dos estudos deriva da utilização de amostras de animais derivadas de populações com diferentes traços de ansiedade.

1.6 Cariocas de alto (CAC) ou baixo (CBC) congelamento

Desde 1995, o Laboratório de Neuropsicologia Clínica e Experimental do Departamento de Psicologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro vem desenvolvendo um processo sequencial de cruzamento seletivo de linhagens de ratos (*Rattus norvegicus*) visando a seleção fenotípica de traços comportamentais de alta ou baixa ansiedade. A matriz dessas linhagens derivou de amostra inicial de 120 ratos *Wistar* albinos adultos (60 machos e 60

fêmeas), obtidos do Biotério Central da Fundação Oswaldo Cruz, no Rio de Janeiro, Brasil.

Resumidamente, o protocolo envolve o cruzamento sequencial e seletivo de gerações de animais que apresentam porcentagens maiores (Cariocas de Alto Congelamento – CAC) ou menores (Cariocas de Baixo Congelamento – CBC) da resposta condicionada de congelamento (*freezing*) ao contexto, caracterizada pela imobilidade tensa (congelamento), na qual ocorre a redução total da atividade geral motora (Landeira-Fernandez, 1996). Em ratos, esse comportamento de defesa é altamente específico, retido pela evolução pela sua utilidade em dificultar sua localização pelo predador em situações em que a fuga não é possível - e tem sido usado como um indicador de ansiedade condicionada (Small, 1899; Rescorla, 1988; Landeira-Fernandez, 1996).

Uma vez testados no procedimento de condicionamento clássico da resposta de congelamento ao contexto e sendo obtidas as porcentagens de congelamento de cada animal, machos e fêmeas CAC ou CBC são separados em grupos correspondentes de animais e passam a ser acasalados entre si. As gerações de filhotes derivadas desses dois grupos são submetidas, quando adultas, ao condicionamento clássico da resposta de congelamento ao contexto, identificando-se e agrupando-se novamente os animais com alto (CAC) ou baixo (CBC) congelamento. Novas gerações provenientes desses animais são então submetidas ao mesmo procedimento. Pares de cruzamentos irmãos-irmãs são evitados com o objetivo de reduzir graus elevados de endogamias.

Ao longo dos últimos 10 anos dentro do processo de cruzamento seletivo neste laboratório, foram realizados diversos estudos, nos quais foi possível observar a consistência do fenótipo relacionado à ansiedade, utilizando paradigmas tanto de medo incondicionado como condicionado.

O processo de cruzamento seletivo deste laboratório teve seu primeiro estudo publicado em 2008, quando foram apresentados os resultados das três primeiras gerações dos traços comportamentais, incluindo as reações de defesa associadas à emocionalidade, nesse caso, o fenótipo congelamento (Castro-Gomes & Landeira-Fernandez, 2008). O resultado apresentando mostrou uma forte diferença entre as linhagens CAC, CBC um forte componente hereditário (Gomes, 2012), conforme descrito na literatura (Ponder et al 2007, 2008, Radcliffe et al 2000).

Uma vez que as gerações apresentaram ganho fenotípico, foi introduzida uma linhagem controle, cruzada aleatoriamente. Em 2009, Dias et al. publicaram resultados demonstrando diferenças entre as três linhagens no fenótipo e maiores índices de ansiedade em CACs no LCE quando comparados aos animais-controle derivados de cruzamentos aleatórios ou não-seletivos (CTL). Também investigou diferenças entre CACs e CTLs na interação social, teste de nado forçado e reconhecimento de objetos. No teste de interação social CACs apresentaram maiores escores de ansiedade que CTLs, Já, no teste de reconhecimento de objetos e no teste de nado forçado CACs tiveram performance similar a CTLs (Dias et al., 2009).

Uma extensa revisão sob as linhagens mostrou a performance de cada geração até a S14 em estudo no qual foram apresentados dados do fenótipo, que revelou CACs com níveis mais altos de ansiedade, CTLs com níveis intermediários e CBCs com níveis inferiores de ansiedade. Machos apresentaram maior ansiedade que fêmeas em todas linhagens. Também foi investigada a extinção de memória aversiva em CACs e CBCs, na qual CACs apresentaram uma piora na extinção comparados a CBCs (Gomes, 2012).

Em outro estudo, foi realizado um teste das três linhagens no seu fenótipo sob condições normais e no LCE sob o efeito de Ketanserina, um agonista serotoninérgico inespecífico, os resultados demonstraram diferenças proporcionais ao fenótipo sob condições controle, isto é, CACs com maior ansiedade, CTLs com valores intermediários e CBC com menor ansiedade. Não houve diferenças significativas na motricidade entre as três linhagens. Quando testados sob o efeito da Ketanserina, CBCs e CTLs aumentaram em ansiedade, mas CACs diminuíram, comparados à própria linhagem. Sob condições normais as três linhagens não apresentaram diferenças significativas na motricidade, mas diferenças foram encontradas sob o efeito da Ketanserina: comparando animais da mesma linhagem sob efeito de tratamento e salina, CBCs aumentaram sua motricidade, CACs tiveram redução, enquanto CTLs permaneceram com níveis inalterados. Neste mesmo estudo foram investigados vários biomarcadores associados à ansiedade, como nível de corticoesterona basal antes (CAC > CBC > CTL) e depois do choque (CAC > CTL > CBC), proliferação celular no hipocampo (CAC < CTL = CBC) após procedimento normal de fenotipagem e após uma sessão extra de choque. Neste caso, CACs

que sofreram choques extras mostraram menos neuroblastos que os sujeitos à fenotipagem normal. Já em CBCs e CTLs a contagem não mostrou diferença (Léon A. et al., 2013).

Ainda no mesmo estudo, foi investigada a expressão de C-Fos, um biomarcador associado à ansiedade, em diversas áreas do cérebro. No córtex pré-límbico, CBCs tiveram a menor contagem, seguidos por CACs; CTLs tiveram a maior contagem. No córtex cingulado e no perirrinal, CBCs tiveram a maior contagem, enquanto CACs e CTLs foram similares. No septum lateral dorsal e locus coeruleus CACs tiveram a maior contagem, e CBCs e CTLs não diferiram significativamente. No núcleo paraventricular, CACs tiveram a maior contagem, seguidos por CTLs; CBCs obtiveram a menor contagem. No hipocampo dorsal e no septum medial, CACs tiveram a menor contagem enquanto CBCs e CTLs não diferiram. Finalmente, na amígdala basolateral CBCs obtiveram a menor contagem, enquanto CACs e CTLs não diferiram. Não houve diferença significativa em outras regiões investigadas (Léon A. et al., 2013).

Outro teste com CACs e CBCs no LCE, observou maiores escores de ansiedade em CACs sem diferença na motricidade, um sinal claro de diferenças no comportamento ansioso que não são explicadas por diferenças na motivação motora, sonolência etc. Nesse mesmo experimento foi investigada a presença de estresse oxidativo no hipocampo, tendo sido observado que CACs apresentaram mais estresse oxidativo que CBCs (Hassan et al., 2013).

Em 2014, Dias e colaboradores investigaram diferenças entre CACs e CTLs no Morris Water Maze (um paradigma tipicamente usado para investigar depressão). CACs não mostraram diferenças significativas comparados a CTLs. Já no paradigma da esQUIVA passiva, CACs mostraram mais ansiedade que CTLs. Neste mesmo estudo foi investigada a proliferação celular no giro denteado do hipocampo destas duas linhagens, não sendo encontradas diferenças significativas entre CACs e CTLs. Também se investigou a quantidade de neuroblastos nesta região tendo-se observada quantidade menor em CACs do que em CTLs. Outros biomarcadores associados a estresse e ansiedade foram investigados no giro denteado do hipocampo. Morfologia dendrítica, com CACs apresentando mais fatores associados a alterações típicas de estresse e ansiedade que CTLs, fatores Neurotróficos, com CACs

apresentando mais marcadores deste do que CTLs, concentrações do ácido gama-aminobutírico (GABA) em resposta a íons de potássio (CAC < CTL), concentrações de corticoesterona basal (CAC > CTL), e finalmente, receptores de corticoesteroides, com CACs apresentando menos receptores que CTLs (Dias et al., 2014).

Ainda em 2014, Salviano e colaboradores publicaram um artigo que investigou CACs e CBCs sob seu fenótipo, revelando maior ansiedade em CACs comparados a CBCs, e em machos. Também investigou essas duas linhagens no LCE, em que evidenciou maior ansiedade em CACs, e em machos. Também testou essas duas linhagens no teste de nado forçado, mas não foram encontradas diferenças significativas neste paradigma (Salviano et al., 2014).

No ano seguinte, Mousovich-Neto e outros realizaram uma investigação sob as características endocrinológicas das linhagens CAC e CTL. Quando comparados a CTLs, CACs apresentaram níveis elevados de corticoesterona, leptina, T3, triglicerídeos e colesterol. Não houve diferença significativa entre essas duas linhagens em T4, TSH, tolerância a glicose ou nível de insulina. CACs apresentaram maior consumo de oxigênio (Mousovich-Neto et al., 2015).

Também em 2015, foi feito por Réus e colaboradores uma investigação sob dano no DNA em regiões cerebrais associadas ao circuito de medo, foram comparados CACs e CBCs e os resultados revelaram maior dano no DNA regional em CACs (Réus et al., 2015).

Em 2017, Machado et al. publicaram uma revisão de todas as gerações produzidas pelo processo seletivo até aquele momento, na qual foi revelado pela primeira vez que as diferenças produzidas pelo fenótipo estavam ocorrendo de forma proporcional, mesmo em momentos pré-choque. Também realizou uma análise fatorial sob todo protocolo em que demonstrou que uma solução de quatro fatores emergia do protocolo de fenotipagem. O primeiro fator carregando os oito minutos de retorno ao contexto, associados à evocação da memória aversiva. O segundo fator carregando os quatro minutos finais do período de habituação, associados à transição entre um período de criação inicial da representação contextual do meio para manutenção dinâmica deste mapa. O terceiro fator carregou os três minutos pós-choque, sendo associados à

aquisição da memória aversiva. E o quarto fator carregando os primeiros quatro minutos da habituação, associados à aprendizagem inicial das características do contexto (Machado et al., 2017).

A possibilidade dessas linhagens de ratos responderem de maneira distinta aos efeitos de ansiolíticos é investigada no presente trabalho.

2

Objetivos

Inserido em um projeto mais amplo que visa dar continuidade ao desenvolvimento de linhagens de ratos com traços altos ou baixos de comportamentos relacionados à ansiedade, o presente estudo investigou o efeito do tratamento farmacológico agudo com um benzodiazepínico (midazolam) no labirinto em cruz elevado nas duas linhagens de ratos com traços alto (CAC) ou baixo (CBC) da resposta condicionada de congelamento ao contexto.

Para este fim, esse experimento tem dois objetivos, (1) dar continuidade ao desenvolvimento de linhagens de ratos com traços altos ou baixos de comportamentos relacionados à ansiedade, investigando a performance das gerações 24^a, 25^a e 26^a no processo seletivo utilizado para criar seu fenótipo e (2), investigar o efeito do tratamento farmacológico agudo com um benzodiazepínico (midazolam) no labirinto em cruz elevado, considerado o padrão-ouro para validar a ação de ansiolíticos já estabelecidos e, conseqüentemente, um experimento necessário para demonstrar que as diferenças de ansiedade observadas refletem alterações neurológicas suficientemente similares às contidas em transtornos de ansiedade. À medida que estas são tipicamente aliviadas pela ação do midazolam, demonstrar este efeito nas linhagens CACs mais recentes elevará a validade preditiva do modelo, servindo para solidificar seu status como um robusto modelo animal de ansiedade.

3

Experimento

3.1 Sujeitos

Foram utilizados 120 ratos *Wistar* machos, pesando entre 250 e 300 gramas, oriundos das 24^a, 25^a e 26^a gerações de cruzamentos seletivos de linhagens com traços alto (CAC) ou baixo (CBC) da resposta de congelamento de acordo com protocolo previamente padronizado para essa situação experimental (Gomes, 2012). Os cruzamentos foram realizados no biotério do Laboratório de Neuropsicologia Clínica e Experimental da Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Animais selecionados randomicamente no mesmo biotério serviram de controle. O protocolo de cruzamentos das linhagens e todos os procedimentos experimentais estiveram de acordo com as normas do Guia de Uso de Animais Experimentais estabelecido pela Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC), e foram aprovados pelo Comitê de Ética.

Os animais foram mantidos em grupos de quatro indivíduos por gaiola-viveiro (18 x 31 x 38 cm), tendo livre acesso à água e comida, sob um ciclo claro-escuro (início às 6h30), em uma temperatura ambiente mantida em torno de 22 °C. Os experimentos foram realizados na fase clara do ciclo. Água e comida foram fornecidas *ad libitum* para todos os animais durante todo o estudo.

3.2 Equipamentos

Para o condicionamento contextual da resposta de congelamento foram utilizadas caixas (25 x 20 x 20 cm), com paredes laterais de alumínio, tampas de acrílico transparente e assoalhos formados por 15 hastes metálicas equidistantes 1,5 centímetro umas das outras. As hastes eram conectadas a um

estimulador de choques elétricos em corrente alternada (AVS Projetos®, Brasil).

As caixas de condicionamento foram encerradas em câmaras de isolamento acústico parcial, iluminadas por uma lâmpada vermelha (25 W). No teto de cada caixa de condicionamento foi posicionada uma câmera de vídeo CCD, possibilitando o acompanhamento visual e registro das sessões com o auxílio de um programa de leitura de imagens (Winfast). Uma ventoinha instalada na câmara de isolamento acústico servia de refrigeração e de ruído-branco (78 dB). (Gomes, 2012).

Para a avaliação dos efeitos do tratamento farmacológico com o midazolam utilizou-se um labirinto em cruz elevado, construído de acordo as especificações de Pellow, Chopin, File e Briley (1985). Este consistia em dois braços abertos (50 x 10 cm cada) e dois braços fechados (50 x 10 x 40 cm cada), dispostos perpendicularmente uns aos outros formando uma cruz. Os braços eram unidos por uma arena central (10 cm) e suspensos 50 cm em relação ao solo do cubículo experimental. O cubículo era iluminado (80 lux aproximadamente) e as sessões filmadas e gravadas para registro posterior.

3.3 Drogas

Foi utilizado midazolam (Roche®, Brasil), diluído em solução salina (NaCl 0,9%) que serviu de veículo-controle. As doses utilizadas foram 0,25, 0,5, 0,75 e 1,0 mg/kg. Droga e veículo foram administradas por via intraperitoneal em um volume de 1,0 ml/kg.

3.4 Procedimento

3.4.1 Condicionamento da resposta de congelamento ao contexto

Inicialmente, cada animal foi gentilmente manuseado (*handling*) diariamente por dois minutos pelo experimentador. Cinco dias após o manuseio, os animais foram submetidos a uma sessão de treino na caixa de condicionamento. Durante esse treino, foram expostos à caixa de condicionamento, podendo explorá-la por oito minutos. Esse período foi

chamado de pré-choque. Imediatamente após esse período, três choques elétricos (1,0 mA, 1s) foram liberados no assoalho da caixa, em intervalos de 20 segundos entre cada choque. Ao término do terceiro choque elétrico, os animais permaneceram na caixa de condicionamento por dois minutos adicionais, período denominado de pós-choque. Ao término desses dois minutos, foram retirados da caixa e levados às suas gaiolas-viveiro no biotério. Vinte e quatro horas após, foram então reexpostos à mesma caixa de condicionamento por 8 minutos, porém sem a apresentação de qualquer choque elétrico. Essa sessão foi denominada de teste.

A resposta de congelamento, definida operacionalmente pela ausência total de movimentos, exceto os de respiração (Darwin, 1859; Small, 1899; Griffith, 1920; Bolles & Collier, 1976), foi registrada por amostragem de tempo. Nela, um observador treinado avaliava e anotava em uma folha de registro, a cada dois segundos, se o animal apresentava o comportamento de congelamento. A porcentagem de congelamento foi calculada para cada animal nas três fases do experimento: pré-choque, pós-choque e teste. Todo o procedimento seguiu parâmetros previamente descritos para essa situação experimental (Fanselow, 1990; Fanselow & Kim, 1994; Fanselow et al., 1994).

3.4.2 Exposição ao LCE

Representantes de cada uma das duas linhagens, CAC e CBC, bem como animais-controle derivados de cruzamentos aleatórios ou não-seletivos (CTL) foram unidos em grupos correspondentes para serem expostos ao LCE sob o efeito de injeções intraperitoneais de salina ou midazolam nas doses de 0,25, 0,5, 0,75 e 1,0 mg/kg. Formaram-se, assim, os seguintes grupos correspondentes: animais CAC injetados com salina (n = 10) ou midazolam nas dose de 0,25 (n = 10), 0,5 (n = 10), 0,75 (n = 10) e 1,0 mg/kg (n = 10); animais CBC injetados com salina (n = 10) ou midazolam nas dose de 0,25 (n = 10), 0,5 (n = 10), 0,75 (n = 10) e 1,0 mg/kg (n = 10); animais-controle derivados de cruzamentos não seletivos injetados com salina (n = 10) ou midazolam nas dose de 0,25 (n = 10), 0,5 (n = 10), 0,75 (n = 10) e 1,0 mg/kg (n = 10).

Vinte minutos após a injeção de salina ou midazolam, cada animal foi colocado na plataforma central do LCE, com a cabeça voltada para um dos

braços fechados. Durante 5 minutos, o animal explorava o aparato e a sessão filmada para análise posterior. Ao término de cada exposição, o aparato era higienizado com uma solução de etanol a 20% antes de o próximo animal ser colocado.

O número de entrada e o tempo de permanência em cada um dos braços foram registrados. A partir dessas medidas, foram calculadas como índices de ansiedade a porcentagem de entradas nos braços abertos [número de entradas nos braços abertos / (número de entradas nos braços abertos + número de entradas nos braços fechados) x 100] e a porcentagem de tempo gasto nos braços abertos [tempo gasto nos braços abertos / (tempo gasto nos braços abertos + tempo gasto nos braços fechados) x 100]. O total de entradas (número de entradas nos braços abertos + número de entradas nos braços fechados) foi calculado como índice de atividade locomotora.

3.5 Resultados

3.5.1 Análises do congelamento durante a fenotipagem

As Figura 1 ilustra o padrão da resposta de congelamento ao contexto das diferentes linhagens durante os oito minutos que antecederam os choques ou fase pré-choque (acima), nos dois minutos imediatamente após a sequência de choques (meio) e na sessão de teste quando foram reexpostas, 24 horas após, ao mesmo contexto na ausência de choques (abaixo). Conforme sugerido pela figura, as linhagens apresentaram padrões diferentes de congelamento ao contexto. Uma análise de variância (ANOVA) confirmou essa impressão, revelando diferenças estatisticamente significantes entre os grupos na fase pré-choque [$(F(2, 149) = 6,15, p < 0,01]$, no período pós-choque [$(F(2, 149) = 111,74; p < 0,001]$ e na sessão de teste [$(F(2, 149) = 221,98; p < 0,001]$.

Comparações *post hoc* entre pares investigaram essas diferenças. Na fase pré-choque, os animais da linhagem CAC apresentaram uma porcentagem maior de congelamento em relação aos animais CTL e CBC ($p < 0,05$). Animais da linhagem CBC não apresentaram diferença estaticamente significativa ($p > 0,3$) em relação aos animais-controle, apesar de uma tendência

para menor porcentagem de congelamento. No período pós-choque, os três grupos apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre eles ($p < 0,05$). Animais da linhagem CAC apresentaram maior porcentagem da resposta de congelamento tanto em relação aos animais-controle quanto aos animais da linhagem CBC. No polo oposto, animais da linhagem CBC apresentaram menor porcentagem da resposta de congelamento em tanto em relação aos animais-controle quanto aos animais da linhagem CAC ($p < 0,05$). Esse mesmo padrão de diferença estatisticamente significativa entre os três grupos se repetiu na sessão de teste ($p < 0,05$).

Com objetivo de investigar se as diferenças entre os três grupos durante na sessão de teste estavam ou não associadas a diferenças encontradas durante os períodos pré-choque imediatamente pós-choque, essas duas variáveis foram empregadas subsequentemente como fatores de covariação uma ANOVA. O resultado dessa análise indicou que a diferença entre os grupos permaneceu estatisticamente significativa [$F(2, 149) = 82,74, p < 0,001$], revelando que as diferenças entre os três grupos na sessão de teste não decorreram das diferenças apresentadas pelas linhagens durante os períodos pré-choque e pós-choque.

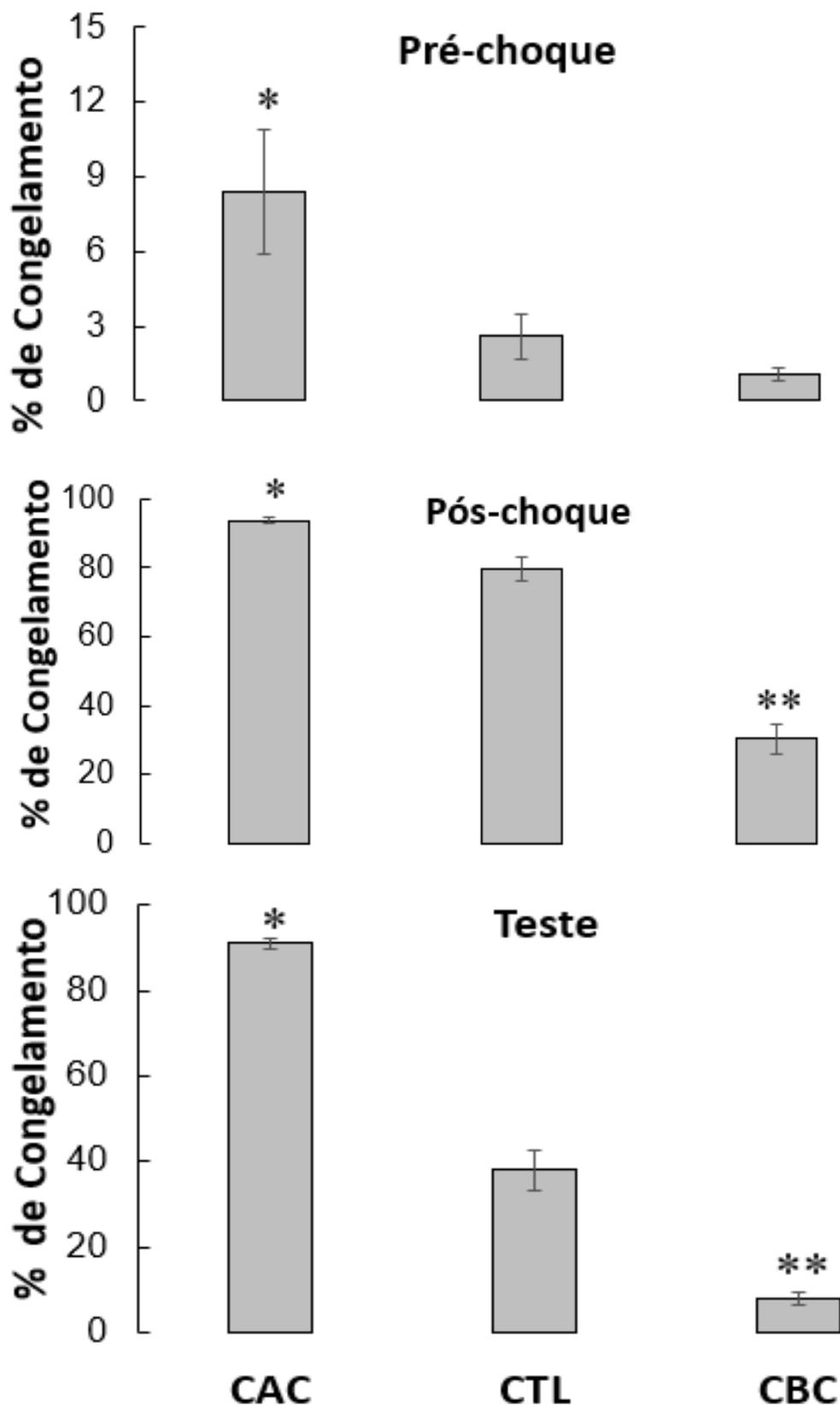


Figura 1 - Porcentagem da resposta de congelamento ao contexto nos períodos pré-choque (acima), imediatamente pós-choque (meio) e teste (abaixo) nas linhagens com traços alto (CAC) ou baixo (CBC) de congelamento, e em animais-controle derivados de cruzamentos não-seletivos (CTL). Barras indicam as médias ($n = 10$ por grupo) e as linhas verticais representam o erro padrão da média.

3.5.2 Exposição ao LCE

A Figura 2 apresenta o padrão exploração no LCE, indicado pelas porcentagens de entradas nos braços abertos (acima), porcentagem de tempo nos braços abertos (meio) e total de entradas (abaixo), das diferentes linhagens vinte minutos terem sido injetadas com salina ou midazolam nas doses 0,25, 0,5, 0,75 ou 1,0 mg/kg. Os resultados foram analisados com base em uma ANOVA de duas vias, composta de três níveis, relacionados às linhagens CAC, CTL ou CBC, e de cinco níveis relacionados ao tratamento farmacológico com veículo-salina ou midazolam nas quatro doses (0,25, 0,5, 0,75 ou 1,0 mg/kg).

Em relação às porcentagens de entrada nos braços abertos, ANOVA revelou efeito principal de linhagens [$F(2,149)= 20,21$; $p<0,001$] e do tratamento farmacológico [$F(4,149)= 5,61$; $p< 0,01$], e ausência de interação entre estes dois fatores [$F(8,149)= 1,06$; $p>0,8$]. Comparações *post hoc* entre pares indicaram que, quando injetadas com salina, as linhagens CAC, CTL e CBC apresentaram diferenças entre cada um destes três grupos ($ps<0,05$). Animais da linhagem CAC injetados com salina apresentaram uma menor porcentagem de entradas nos braços abertos quando comparados com animais desta mesma linhagem injetados com midazolam nas doses de 0,25 e 0,5 mg/kg ($ps< ,05$). Animais-controle injetados com salina apresentaram uma menor porcentagem de entradas nos braços abertos quando a estes mesmos animais injetados com midazolam nas doses de 0,25, 0,5 e 0,75 mg/kg ($ps< 0,05$). Finalmente, animais da linhagem CBC injetados com salina apresentaram menor porcentagem de entradas nos braços abertos quando comparados com animais desta mesma linhagem injetados com midazolam na dose de 0,25 mg/kg ($p< 0,05$).

ANOVA aplicada às porcentagens de tempo gasto nos braços abertos também indicou efeito principal de linhagens [$F(2,149)= 13,48$; $p<0,001$] e tratamento farmacológico [$F(4,149) = 5,96$; $p< 0,001$], sem qualquer interação entre estes dois fatores [$F(8,149)= 0,56$; $p>0,7$]. Da mesma forma que a porcentagem de entradas no braço aberto, comparações *post hoc* entre pares indicaram que as linhagens CAC, CTL e CBC injetadas com salina apresentaram diferenças entre cada um destes três grupos ($ps< 0,05$). Animais da linhagem CAC injetados com salina apresentaram uma menor porcentagem

de tempo nos braços abertos quando comparados com animais desta mesma linhagem injetados com as doses de 0,25 ou 0,5 mg/kg de midazolam ($p < 0,05$).

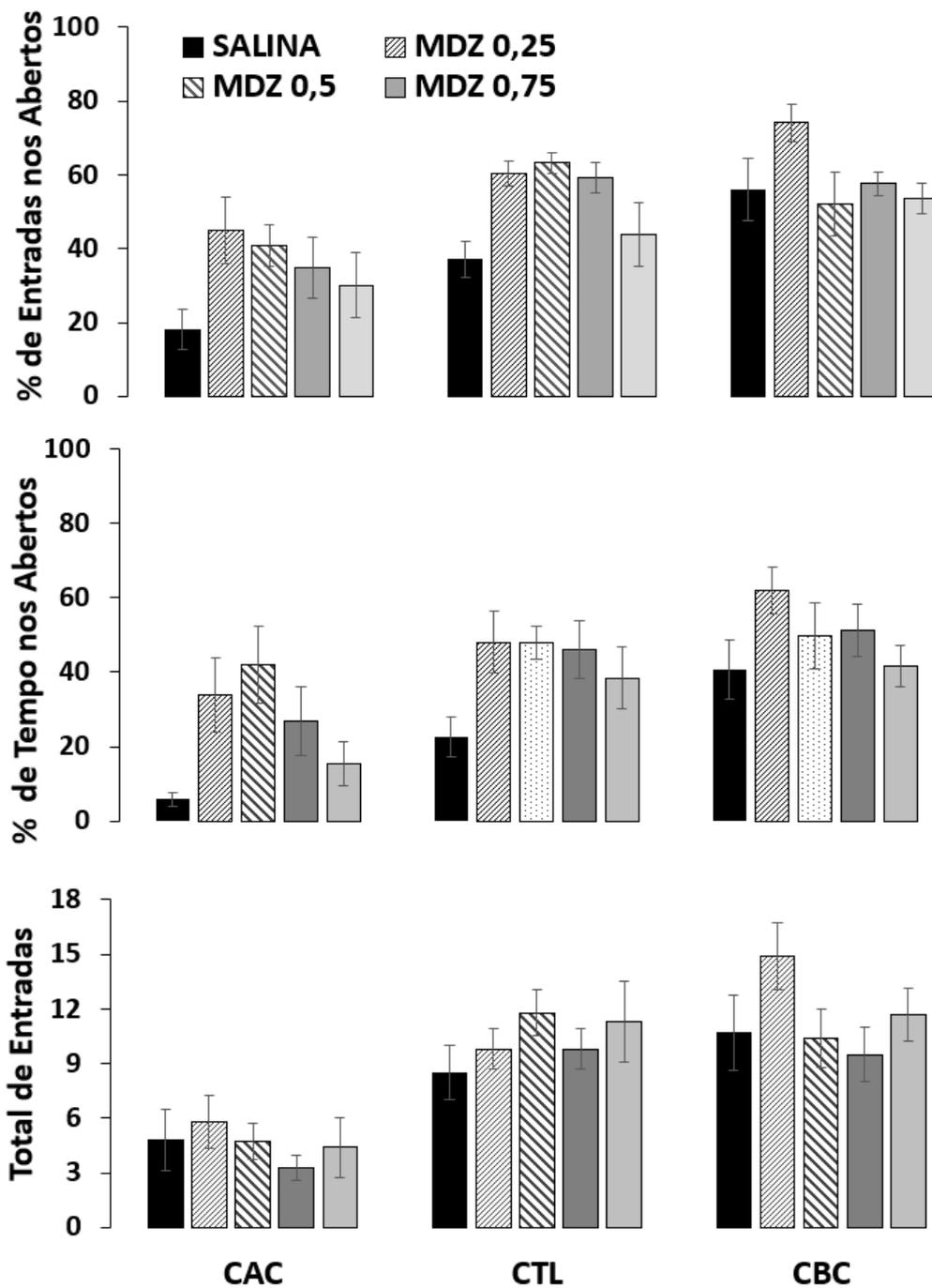


Figura 2 - Porcentagem de entradas nos braços abertos (superior), porcentagem de tempo gatos nos braços abertos (meio) e total de entradas (inferior) nas diferentes linhagens expostas ao LCE sobre o efeito de injeções (1,0 mg/kg, IP) de veículo-salina ou midazolam nas doses de 0,25, 0,5, 0,75 e 1,0 mg/kg. Barras indicam as médias ($n = 10$ por grupo) e as linhas verticais representam o erro padrão da média (\pm).

4

Discussão

O objetivo principal deste estudo foi a investigação do efeito da variação biológica decorrente da seleção para alta e baixa ansiedade na curva dose-efeito do fármaco midazolam. O LCE foi escolhido como paradigma por ser considerado bem mais poderoso para detectar a ação de ansiolíticos estabelecidos do que outras opções disponíveis (como o próprio procedimento de medo condicionado ao contexto usado para criar o fenótipo) (Dawson & Tricklebank, 1995; Hogg, 1996; Rodgers et al., 1997; Haller & Alicki, 2012).

As linhagens Cariocas fazem parte de um longo e abrangente experimento que busca, por meio da seleção artificial bidirecional, criar fenótipos de alta e baixa ansiedade (Gomes, 2012). Os resultados demonstrados pelas gerações S24 à S26 refletem o sucesso dessa empreitada. No paradigma utilizado para criação do fenótipo, a linhagem CAC apresenta maiores escores de congelamento em todos os momentos, até mesmo no período que precede o choque; em contrapartida, os escores da linhagem CBC são consistentemente os menores. Isso corrobora achados anteriores nessas linhagens e indica a presença de diferenças psicológicas relacionadas a comportamentos defensivos decorrentes da seleção empregada (Machado, 2017).

Os resultados obtidos pelas três linhagens sob o efeito de salina no LCE estão de acordo com resultados obtidos anteriormente quando CACs foram expostos ao LCE (Dias et al., 2009; Hassan et al., 2013). Estes novos resultados demonstrando CBCs com resultados de baixa ansiedade no LCE refletem os padrões do fenótipo com animais selecionados para alta ansiedade obtendo os maiores escores de ansiedade, e vice-versa. Isso revela que o processo de criação seletiva produziu animais que não só apresentam ansiedade diferenciada em seu fenótipo, mas também em outros paradigmas, indicando que o traço selecionado que resulta em ansiedade elevada ou reduzida foi

inespecífico ao contexto e que foi selecionado, refletindo tendências mais sistêmicas e abrangentes do comportamento, que modelam de forma apropriada a ansiedade patológica típica de um quadro de transtorno de ansiedade generalizado.

Experimentos envolvendo índices de motricidade para inferir a presença de ansiedade precisam controlar a possibilidade de que variações motoras (e não afetivas) estão causando os resultados (Sestakova et al., 2013). Caso contrário, seria possível inferir que os baixos escores da linhagem CAC não são decorrentes de seu elevado medo (nesse caso, da altura), mas sim de uma baixa motivação exploratória, sonolência etc.

Para controlar isso foi investigado o total de entradas que, sob o efeito de salina, também revelou diferenças proporcionais ao fenótipo entre as três linhagens. Ao investigar os efeitos das diferentes dosagens de midazolam (MDZ) na performance no LCE, controlar diferenças de motricidade se torna ainda mais importante, pois é possível que certas dosagens causem efeitos sedativos (Olkola & Ahonen, 2008). A ANOVA revelou diferenças no fator linhagem, mas não no fator tratamento, indicando que o MDZ não causou diferença significativa no total de entradas quando comparado a performance sob salina, indicando ausência de alterações significativas na motricidade. Esse resultado corrobora a hipótese de que as alterações de motricidade exploratória, especialmente sob a dosagem de 0.25 mg/kg, são decorrentes de um efeito ansiolítico e não de um efeito sedativo.

Nesse sentido, o baixo escore da linhagem CAC sob salina é condizente com seu padrão comportamental exageradamente ansioso. Uma hipótese para explicar sua performance é que, à medida que a interação com o elemento ansiogênico do LCE (altura) necessita de exploração, possivelmente CACs realizam uma aprendizagem mais rápida dos elementos aversivos contidos no labirinto, e, conseqüentemente, realizam menos movimento no mesmo.

A investigação da curva dose-efeito revelou que sob a dosagem de 0.25 mg/kg todas as três linhagens apresentam redução na ansiedade, inferida por meio do aumento nas entradas e no tempo gasto nos braços abertos. Este efeito persiste nas linhagens CAC e CTL sob a dosagem de 0.5 mg/kg, mas não em CBCs. Finalmente, apenas a linhagem CTL apresentou menor ansiedade sob a dosagem de 0.75 mg/kg. Nenhuma redução significativa foi observada sob a

dosagem de 1.0 mg/kg. Neste sentido, a dosagem de 0.25 mg/kg se mostrou ideal para futura investigação do midazolam neste *setting* experimental, pois foi capaz de promover efeitos ansiolíticos esperados sem comprometer outras variáveis em todos os grupos.

É interessante que para cada linhagem houve uma dosagem distinta para se atingir um limite no efeito. CBCs são afetados pela dose de 0.25 mg/kg mas dosagens maiores não surtiram efeito significativo, enquanto que em CACs esse ponto de corte foi 0.5 mg/kg e em CTLs, 0.75 mg/kg. Uma hipótese para explicar estes resultados é que uma vez que o midazolam atinge concentração suficiente em regiões envolvidas com a exploração, avaliação de risco e esquiva, como a amígdala e o hipocampo, as alterações promovidas pela droga possivelmente ficam tão intensas comparadas ao normal do animal que são reconhecidas como aversivas, causando alterações no estado afetivo que aumentam respostas ansiosas apesar da ação do ansiolítico.

Outra hipótese é que as diferentes dosagens param de causar diminuição na ansiedade porque estão causando sedação. Seguindo esta lógica, isso indicaria que as diferentes linhagens possuem diferentes limiares para sedação. Porém, o índice de atividade de CBCs é elevado mesmo sob altas doses, o que indica que algo mais complexo está ocorrendo.

À medida que o midazolam modula a transmissão de GABA, estes dados revelam três biologies distintas, cada uma com uma sensibilidade diferenciada. Uma hipótese é que a seleção artificial causou em CACs uma deficiência localizada na transmissão de GABA em regiões da amígdala que causam uma aprendizagem aversiva, dificultando a inibição destas aprendizagens. Em CBCs, possivelmente veríamos um quadro inverso, com transmissão excessiva de GABA inibindo a aprendizagem aversiva. É necessária uma investigação mais profunda em relação às bases neuroquímicas presentes nas regiões cerebrais responsáveis por comportamentos defensivos para esclarecer de que forma essas biologies distintas estão interagindo com os diferentes neurotransmissores (Olkola & Ahonen, 2008).

5

Conclusão

Os dados revelados neste estudo corroboram observações feitas em estudos anteriores que demonstram nas linhagens Cariocas traços distintos de alta e baixa ansiedade. Esses traços têm-se mostrado presentes em mais de um paradigma, indicando que este é um excelente modelo animal para investigação da ansiedade patológica (Machado, 2017).

Foi demonstrado que a dosagem de 0.25 mg/kg foi capaz de provocar um potente efeito ansiolítico que elevou os níveis exploratórios em todas as linhagens, especialmente CACs na qual o escore médio foi mais que o dobro comparado à salina, enquanto que dosagens superiores tiveram um efeito linhagem-dependente, que deve ser melhor investigado.

Combinados, estes dados demonstram validade preditiva das linhagens Cariocas, pois, quando sujeitas ao LCE, um dos mais bem estabelecidos testes de detecção da ação de ansiolíticos, as três linhagens Cariocas apresentam validade preditiva adequada para modelar transtornos de ansiedade generalizada, à medida que animais selecionados para alta e baixa ansiedade estão apresentando esses padrões comportamentais em vários contextos, e reagindo aos ansiolíticos de forma esperada (Dawson & Tricklebank, 1995).

No caso, animais selecionados para alta ansiedade apresentam grande diferença entre seu comportamento normal e seu comportamento sob efeito do fármaco, enquanto animais controle e selecionados para baixa ansiedade apresentaram uma diferença proporcionalmente menor à ação do midazolam. Essa sensibilidade distinta à ação do midazolam serve de indicador de que as três linhagens contêm alterações neurobiológicas significativas que, a princípio, indicam causar em CACs um quadro de ansiedade exagerada, a qual parece ser restaurada no LCE pela ação de midazolam, enquanto as outras linhagens diminuem seus escores de ansiedade, mas não de forma tão significativa. Essa alteração intensa no padrão comportamental CAC é um

indicador de que o fármaco está aliviando o quadro de ansiedade sistêmica de acordo com o que se esperaria de um modelo de ansiedade patológica (Jacobson & Cryan, 2010).

Em conjunto, essas observações revelam nas linhagens Cariocas uma alternativa sólida para servir de modelo à investigação das bases neurobiológicas e neuroquímicas por trás de traços hereditários de alta e baixa ansiedade.

Referências bibliográficas

ALLCOAT, D.; GREVILLE, W. J.; NEWTON, P. M.; DYMOND, S. Frozen with fear: Conditioned suppression in a virtual reality model of human anxiety. **Behav Processes**. 2015 Sep;118:98-101. doi: 10.1016/j.beproc.2015.06.011. Epub 2015 Jun 23.

ALMEIDA, S. S.; DE OLIVEIRA, L. M.; GRAEFF, F. G. Early protein malnutrition changes exploration of the elevated plus-maze and reactivity of anxiolytics. **Psychopharmacology** (Berl). 1991;103(4):513-8.

ARMÁRIO, A.; RESTREPO, C.; CASTELLANOS, J. M.; BALASCH, J. Dissociation between adrenocorticotropin and corticosterone responses to restraint after previous chronic exposure to stress. **Life Sci**. 1985 Jun 3;36(22):2085-92.

BARLOW, D. H. Psychological treatments. **Am Psychol**. 2004 Dec.; v. 59 (9). pp.: 869-878.

BELZUNG, C.; LEMOINE, M. Criteria of validity for animal models of psychiatric disorders: focus on anxiety disorders and depression. **Biol Mood Anxiety Disord**. 2011 Nov 7;1(1):9. doi: 10.1186/2045-5380-1-9.

BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. **Annu Rev Psychol**. 1988. 39:43-68. (Volume publication date February 1988).

BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C.; WEISS, S. M.; MEYER, S. The effects of ethanol and diazepam on reactions to predatory odors. **Pharmacol Biochem Behav**. April 1990 Apr;35(4):775-80.

BLANCHARD, R. J.; YANG, M. L.; GARVACIO, C-I.; BLANCHARD, D. C. Cue and context conditioning of defensive behaviors to cat odor stimuli. **Neurosci Biobehav Rev**. 2001 Dec;25(7-8):587-95.

BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C.; GRIEBEL, G.; NUTT, D. (Eds.) **Handbook of Anxiety and Fear**. Elsevier Science. 2008; 450 pages. (Handbook of Behavioral Neuroscience. v. 17).

BOLLES, R. C.; RILEY, A. L. Freezing as an avoidance response: Another look at the operant-respondent distinction. **Learning & Motivation**. v. 4.(3). Aug. 1973. p.: 268-275.

BOLLES, R. C.; COLLIER, A. C. The effect of predictive cues on freezing in rats. **Animal Learning & Behavior**. (1976) 4: 6. <https://doi.org/10.3758/BF03211975>.

BOLLES, R. C.; FANSELOW, M. A perceptual-recuperative model of fear and pain. **Behav Brain Sci.** v. 3 (2) June 1980, pp. 291-301.

BOURIN, M. Animal models for screening anxiolytic-like drugs: a perspective. **Dialogues Clin Neurosci.** 2015 Sep; 17(3): 295-303.

BOUTON, M. E.; BOLLES, Robert C. Conditioned fear assessed by freezing and by suppression of three different baselines. **Animal Learning & Behavior.** (1980) 8: 429.
<https://doi.org/10.3758/BF03199629>

BRANDÃO, M. L.; AGUIAR, J. C. de; GRAEFF, F. G. (1982). GABA mediation of the anti-aversive action of minor tranquilizers. **Pharmacol Biochem Behav.** 1982 Mar;16(3):397-402.

BRANDÃO, M. L.; ZANOVELI, J. M.; RUIZ-MARTINEZ, R. C.; OLIVEIRA, L. C.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Different patterns of freezing behavior organized in the periaqueductal gray of rats: association with different types of anxiety. **Behav Brain Sci.** 2008 Mar 17;188(1):1-13. Epub 2007 Oct 25.

BRAUN, A. A.; SKELTON, M. R.; VORHEES, C. V.; WILLIAMS, M. T. Comparison of the elevated plus and elevated zero mazes in treated and untreated male Sprague-Dawley rats: effects of anxiolytic and anxiogenic agents. **Pharmacol Biochem Behav.** 2011 Jan;97(3):406-15. doi: 10.1016/j.pbb.2010.09.013. Epub 2010 Sep 24.

BRODKIN, E. S.; NESTLER, E. J. Quantitative Trait Locus Analysis: A New Tool for Psychiatric Genetics. **Neuroscientist.** 4. 317-323. 10.1177/107385849800400511.

CALDERONI, B.; SAAVEDRA, C.; TARTARGLIA, K.; WEHNER, J. M.; DUDEK, B. C.; FLAHERTY, L. Quantitative trait loci analysis affecting contextual conditioning in mice. **Nat Genet.** 1997 Nov;17(3):335-7.

CAMPOS, A. C.; FOGAÇA, M. V.; AGUIAR, D. C.; GUIMARÃES, F. S. Animal models of anxiety disorders and stress. **Rev. Bras. Psiquiatr.** v. 35 Supl. 2: S101-11. São Paulo, 2013

CAROBREZ, A. P.; BERTOGLIO, L. J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. **Neurosci Biobehav Rev.** 2005;29(8):1193-205. Epub 2005 Aug 9.

CASTRO-GOMES, V. de; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Amygdaloid lesions produced similar contextual fear conditioning disruption in the Carioca high- and low-conditioned freezing rats. **Brain Res.** 2008 Oct 3;1.233:137-45. doi: 10.1016/j.brainres.2008.07.044. Epub 2008 Jul 21.

CHAMBERS, J. A.; POWER, K. G.; DURHAM, R. C. The relationship between trait vulnerability and anxiety and depressive diagnoses at long-term follow-up of Generalized Anxiety Disorder. **J Anxiety Disord.** 2004;18(5):587-607.

CHRISTMAS, A. J; MAXWELL, D. R. A comparison of the effects of some benzodiazepines and other drugs on aggressive and exploratory

behaviour in mice and rats. **Neuropharmacology**. v. 9 (1). Jan. 1970; pp.: 17-29.

CLÉMENT, Y.; CALATAYUD, F.; BELZUNG, C. Genetic basis of anxiety-like behavior: a critical review. **Brain Res Bull**. 2002 Jan 1;57(1):57-71.

CONTI, L. H.; MACIVER, C. R.; FERKANY, J. W.; ABREU, M. E. Footshock-induced freezing behavior in rats as a model for assessing anxiolytics. **Psychopharmacology** (Berl). 1990;102(4):492-7.

COSTALL, B.; JONES, B. J.; KELLY, M. E.; NAYLOR, R. J.; TOMKINS, D. M. Exploration of mice in the black and white test box: validation as a model of anxiety. **Pharmacol Biochem Behav**. 1989 Mar;32(3):777-85.

CRAWLEY, J. N.; DAVIS, L. G. Baseline exploratory activity predicts anxiolytic responsiveness to diazepam in five mouse strains. **Brain Res Bull**. 1982 Jun;8(6):609-12.

CRAWLEY, J. N.; GOODWIN, F. K. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. **Pharmacol Biochem Behav**. 1980 Aug;13(2):167-70.

CRUZ, A. P. de M.; ZANGROSSI JR., H.; GRAEFF, F. G.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Modelos animais de ansiedade: implicações para a seleção de drogas ansiolíticas. Brasília: UNB, 1997. **Psicol. teor. pesqui**. 13(3): 269-78, set.-dez. 1997. tab

CRUZ, A. P. de M.; FREI, F.; GRAEFF, F. G. Ethopharmacological analysis of the rat behavior on the elevated plus-maze. **Pharmacol Biochem Behav**. 1994 Sep;49(1):171-6.

Cruz, A. P. de M.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. (2007). Por uma psicologia baseada em um cérebro em transformação. In J. Landeira-Fernandez & M. T. S. Silva (Orgs.), **Intersecções entre psicologia e neurociências** (pp. 1-15). Rio de Janeiro: MedBook.

CRUZ, A. P. de M.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Modelos animais de ansiedade e o estudo experimental de drogas serotoninérgicas. Em: J. Landeira-Fernandez e Sérgio Fukusima (org). **Métodos em Neurociência**. São Paulo: Manole, 2012. pp.: 192 - 217.

DARWIN, C. **The origin of species**. London: John Murray. (1859).

DARWIN, C. **The expression of the emotions in man and animals**. London: John Murray. (1872.)

DAVIS, M.; WALKER, D.L.; MILES, L.; GRILLON, C. Phasic vs sustained fear in rats and humans: role of the extended amygdala in fear vs anxiety. **Neuropsychopharmacology**. 2010 Jan;35(1):105-35. doi: 10.1038/npp.2009.109.

DAWSON, G. R.; TRICKLEBANK, M. D. Use of the elevated plus maze in the search for novel anxiolytic agents. **Trends Pharmacol Sci**. 1995 Feb;16(2):33-6.

DEAKIN, J. F. W.; GRAEFF, F. G. 5-HT and mechanisms of defense. **J Psychopharmacol.** 1991 Jan;5(4):305-15. doi: 10.1177/026988119100500414.

DIAS, G. P.; BEVILAQUA, M. C.; SILVEIRA, A. C.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J.; GARDINO, P. F. Behavioral profile and dorsal hippocampal cells in carioca high-conditioned freezing rats. **Behav Brain Res.** 2009 Dec 28;205(2):342-8. doi: 10.1016/j.bbr.2009.06.038. Epub 2009 Jul 5.

DIAS, G. P. et al. Hippocampal biomarkers of fear memory in an animal model of generalized anxiety disorder. **Behav Brain Res.** 2014 Apr 15;263:34-45. doi: 10.1016/j.bbr.2014.01.012. Epub 2014 Jan 23.

DOMSCHKE, K.; MARON, E. Genetic factors in anxiety disorders. **Mod Trends Pharmacopsychiatry.** 2013;29:24-46. doi: 10.1159/000351932. Epub 2013 Sep 20.

DOUKKALI, Z.; KAMAL, R.; EL JEMELI, M.; NADJMOUDDINE, M.; ZELLOU, A.; CHERRAH, Y.; ALAOUI, K.; TAGHZOUTI, K. Anti-Anxiety Effects of *Mercurialis annua* Aqueous Extract in the Elevated Plus Maze Test. **J Pharma Reports.** 2016;1 (104) :2.

ENDLER, N. S; MAGNUSSON, D.; EKEHAMMER, B; OKADA, M. (1976) The multidimensionality of state and trait anxiety. **Scandinavian Journal of Psychology**, 17: 81–96. doi:10.1111/j.1467-9450.1976.tb00215.x

ESTES, W. K.; SKINNER, B. F. Some quantitative properties of anxiety. **Journal of Experimental Psychology**, Vol 29(5), Nov 1941, 390-400.

FANSELOW, M. S. Conditioned and unconditional components of post-shock freezing. **Pav. J. Biol. Sci.** (1980) 15: 177. <https://doi.org/10.1007/BF03001163>

FANSELOW, M. S. Odors released by stressed rats produce opioid analgesia in unstressed rats. **Behav Neurosci.** 1985 Jun;99(3):589-92.

FANSELOW, M. S. Factors governing one trial contextual conditioning. **Animal Learning & Behavior.** (1990) 18: 264. <https://doi.org/10.3758/BF03205285>

FANSELOW, M. S. The Midbrain Periaqueductal Gray as a Coordinator of Action in Response to Fear and Anxiety. In: Depaulis A., Bandler R. (eds). **The Midbrain Periaqueductal Gray Matter.** NATO ASI Series (Series A: Life Sciences), vol 213. Springer, Boston, MA.

FANSELOW, M. S.; LEDOUX, J. E. Why we think plasticity underlying pavlovian fear conditioning occurs in the basolateral amygdala. **Neuron.** 1999 Jun; 23(2): 229-32.

FANSELOW, M. S; KIM, J. J. Acquisition of contextual Pavlovian fear conditioning is blocked by application of an NMDA receptor antagonist D,L-2-amino-5-phosphonovaleric acid to the basolateral amygdala. **Behav Neurosci.** 1994 Feb;108(1):210-2.

FANSELOW, M. S; LANDEIRA-FERNANDEZ, J.; DECOLA, J. P.; KIM, J. J. The immediate shock deficit and postshock analgesia: Implications

for the relationship between the analgesic CR and UR. **Animal Learning & Behavior**. 1994) 22: 72. <https://doi.org/10.3758/BF03199957>

FANSELOW, M. S; GALE, G. D. The amygdala, fear and memory. **Ann N Y Acad Sci**. 2003 Apr;985:125-34.

FERNÁNDEZ-TERUEL, A.; ESCORIHUELA, R. M.; NÚÑEZ, J. F.; ZAPATA, A.; BOIX, F.; SALAZAR, W. et al. The early acquisition of two-way (shuttle-box) avoidance as an anxiety-mediated behavior: psychopharmacological validation. **Brain Res. Bull.** 1991 Jan;26(1):173-6.

FERNÁNDEZ-TERUEL, A.; ESCORIHUELA, R. M.; TOBEÑA, A.; DRISCOLL, P. Stress and putative endogenous ligands for benzodiazepine receptors: the importance of characteristics of the aversive situation and of differential emotionality in experimental animals. **Experientia**. 1991 Oct 15;47(10):1051-6.

FILE, S. E. Behavioural detection of anxiolytic action. In Elliot, J. M., Heal, D. J.; Mardsen, C. A. (Eds.). **Experimental Approaches to Anxiety and Depression**. Chichester (UK): John Wiley, 1992. pp.: 25-44.

FILE, S. E.; SETH, P. A review of 25 years of the social interaction test. **European Journal of Pharmacology**. 2003 Feb 28;463(1-3):35-53.

FILE, S. E.; ARANKO, K. Sodium valproate and chlordiazepoxide in the elevated plus-maze test of anxiety in the rat. **Neuropsychobiology**. 1988;20(2):82-6.

FILE, S. E.; HYDE, J. R. G. Can social interaction be used to measure anxiety. **Br J Pharmacol**. v.62(1); 1978 Jan.

FILE, S. E.; LIPPA, A. S.; BEER, B.; LIPPA, M. T. Animal tests of anxiety. **Curr Protoc Neurosci**. 2004 May;Chapter 8:Unit 8.3. doi: 10.1002/0471142301.ns0803s26.

FUJITA, O.; ANNEN, Y.; KITAOKA, A. Tsukuba high-and low-emotional strain of rats (*Rattus norvegicus*): an overview. **Behav Genet**. (1994) 24: 389. <https://doi.org/10.1007/BF01067540>.

GELLER, I.; KULAK, J. T.; SEIFTER, J. The effects of chlordiazepoxide and chlorpromazine on a punishment discrimination. **Psychopharmacologia**. 1962 Oct 31;3:374-85.

GIBSON, E. L.; BARNFIELD, A. M.; CURZON, G. Evidence that mCPP-induced anxiety in the plus-maze is mediated by postsynaptic 5-HT_{2C} receptors but not by sympathomimetic effects. **Neuropharmacology**. v. 33 (3-4). Mar-Apr. 1994, p.: 457-465.

GIDDENS, A.; TURNER, J. (ORG). **Teoria social hoje**. Tradução Gilson C de Sousa. São Paulo: UNESP, 1999.

GLOWA, J. R.; HANSEN, C. T. Differences in response to an acoustic startle stimulus among forty-six rats strains. **Behav Genet**. (1994) 24: 79. <https://doi.org/10.1007/BF01067931>

GORDON, J. A.; HEN, R. The serotonergic system and anxiety. **Neuromolecular Med.** 2004;5(1):27-40.

GOMES, Vitor de. **Genetic selection of two new rat lines displaying different levels of conditioned freezing behavior.** Rio de Janeiro: PUC, 2012. 160 f. il. (color.) 30 cm. Tese de doutorado. Orientador: Jesus Landeira-Fernandez.

GOTTSCHALK, M. G.; DOMSCHKE, K. Oxytocin and Anxiety Disorders. **Curr Top Behav Neurosci.** 2017 Aug 16. doi: 10.1007/7854_2017_25.

GRAEFF, F. G. Serotonergic systems. **Psychiatr Clin North Am.** 1997 Dec;20(4):723-39.

GRAEFF, F. G. Serotonina, matéria cinzenta periaquedutal e transtorno do pânico. **Revista Brasileira de Psiquiatria.** São Paulo, v. 25, supl. 2, p. 42-45, Dec. 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-44462003000600010&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 15 dez. 2016. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-44462003000600010>.

GRAEFF, F. G. Serotonin, the periaqueductal gray and panic. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews.** 2004 May;28(3):239-59.

GRAEFF, F. G.; NETTO C. F.; ZANGROSSI JR, H. The elevated T-maze as an experimental model of anxiety. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews.** 1998;23(2):237-46.

GRAEFF, F. G.; VIANA, M. B.; TOMAZ, C. The elevated t-maze, a new experimental model of anxiety and memory: Effect of diazepam. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research.** 1993;26(1):67-70.

GRAEFF, F. G.; ZANGROSSI JUNIOR, H. Animal models of anxiety disorders. In: **Biological Psychiatry.** D'Haenen, Hugo; Boer, J. A. den; Willner, P. (Eds). Hoboken: John Wiley & Sons, 2002. Published Online: 26 sep. 2003; pp.: 877-893. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/229942520_Animal_Models_of_Anxiety_Disorders>. Acesso em: 5 dez. 2016.

GRAEFF, F. G.; ZANGROSSI JUNIOR, H. The dual role of serotonin in defense and the mode of action of antidepressants on generalized anxiety and panic disorders. **Cent Nerv Syst Agents Med Chem.** 2010 Sep 1;10(3):207-17.

GRAHAME, N. J. Select lines and inbred strains. **Alcohol Res Health.** 2000;24(3):159-63.

GRAY, J. A. **The neuropsychology of anxiety: an enquiry into the functions of the septo-hippocampal system.** London: University Press, 1982.

GRAY, J. A.; McNAUGHTON N. **The neuropsychology of anxiety: an enquiry into the functions of the sept-hippocampal system.** 2th ed. Oxford University Press: London, 2000.

GRIFFITH, C. R. (1920). The behavior of white rats in the presence of cats. **Psychobiology**, 2(1), 19-28.

GRILLON, C.; DIERKER, L.; MERIAKANGAS, K. R. Fear-Potentiated Startle in adolescent offspring of parents with anxiety disorders. **Biol Psychiatry**. 1998 Nov 15;44(10):990-7.

GUILLOT, P.-V.; CHAPOUTIER, G. Intermale aggression and dark/light preference in ten inbred mouse strains. **Behav Brain Res**. 1996 May;77(1-2):211-3.

HALL, C. S. (1934). Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. **Journal of Comparative Psychology**, 18(3), 385-403.

HALLER, J.; ALICKI, M. Current animal models of anxiety, anxiety disorders, and anxiolytic drugs. **Curr Opin Psychiatry**. 2012 Jan;25(1):59-64. doi: 10.1097/YCO.0b013e32834de34f.

HANDLEY, S. L.; McBLANE, J. W. 5HT drugs in animal models of anxiety. **Psychopharmacology**. (1993) 112: 13. <https://doi.org/10.1007/BF02247358>.

HANDLEY, S. L.; McBLANE, J. W.; CRITCHLEY, M. A. E.; NJUNG'E, K. Multiple serotonin mechanisms in animal models of anxiety: environmental, emotional and cognitive factors. **Behav Brain Res**. 1993 Dec 20;58(1-2):203-10.

HANDLEY, S. L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behavior. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**. 1984 Aug;327(1):1-5.

HASENÖHRL, R. U.; NICHAU, Ch.; FRISCH, Ch; DE SOUZA SILVA; M. A. et al.; HUSTON, J. P.; MATTERN, C. M.; HAECKER, R. Anxiolytic-like effects of combined extracts of Zingiber officinale and Ginko biloba in the elevated plus maze. **Pharmacol Biochem Behav**. 1996 Feb;53(2):271-5.

HASHIMOTO, S.; INOUE, T.; KOYAMA, T. Effects of conditioned fear stress on serotonin neurotransmission and freezing behavior in rats. **Eur J Pharmacol**. 1999 Jul 28;378(1):23-30.

HASSAN, W. et al. Association between oxidative stress and contextual fear conditioning in Carioca high and low- conditioned freezing rats. **Brain Res**. 2013 May 28;1512:60-7. doi: 10.1016/j.brainres.2013.03.039. Epub 2013 Apr 6.

HENNIGER, M. S. H.; OHL, F.; HOLTER, S. M.; WEIENBACHER, P.; TOSCHI, N.; LORSCHER, P.; WIGGER, A.; SPANAGEL, R.; LANDGRAF, R. Unconditioned Anxiety AND Social Behavior In Two rat lines selectively bred for high and low anxiety-related behavior. **Behav Brain Res**. 2000 Jun 15;111(1-2):153-63.

HETTEMA, J. M.; PRESCOTT, C. A.; MYERS, J. M.; NEALE, M. C.; KENDLER, K. S. The structure of genetic and environmental risk factors for anxiety disorders in men and women. **Arch Gen Psychiatry**. 2005 Feb;62(2):182-9.

HOGG, S. A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. **Pharmacol Biochem Behav.** 1996 May;54(1):21-30.

JACOBSON, L. H.; CRYAN, J. F. Genetic approaches to modeling anxiety in animals. **Curr Top Behav Neurosci.** 2010;2:161-201.

LAHMAME, A.; ARMÁRIO, A. 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** (Berl). 1996 Jan;123(2):191-8.

LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Context and Pavlovian Conditioning. **Braz J Med Biol Res.** 1996 Feb;29(2):149-73.

LANDEIRA-FERNANDEZ, J; CRUZ, A. P. de M.; BRANDÃO, M. L. Padrões de respostas defensivas de congelamento associados a diferentes transtornos de ansiedade. **Psicologia USP.** 2006; 17 (4). pp.: 175-192.

LEDOUX, J. Fear and the brain: where have we been, and where are we going? **Biol Psychiatry.** 1998 Dec 15;44(12):1229-38.

LÉON A., L. A. GOMES, V. de C.; BRANDÃO, M. L.; FRANCI, C. R.; CARDENAS, L. F.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Corticosterone plasma concentrations in Carioca High and low-conditioned freezing rats after a fear conditioned task. **Avances en Psicología Latinoamericana** [en línea] 2013, 31 [Fecha de consulta: 15 de abril de 2017] Disponible en: <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=79928610022>>. ISSN 1794-4724

LESTER, L. S.; FANSELOW, M. S. Exposure to a cat produces opioid analgesia in rats. **Behav Neurosci.** 1985 Aug;99(4):756-9.

LIEBSH, G.; LINTHORST, A. C.; NEUMANN, I. D.; REUL, J. M.; HOLSBOER, F.; LANDGRAF, R. Behavioural, physiological, and neuroendocrine stress responses and differential sensitivity to diazepam in two Wistar rats line selectively bred for high and low-anxiety-related behavior. **Neuropsychopharmacology.** 1998 Nov;19(5):381-96.

LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology** (Berl). 1987;92(2):180-5.

LISTER, R. G. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. **Pharmacology Therapeutics.** February 1990; v. 46(3) pp.: 321-340.

MACHADO, A. S. **Avaliação da resposta de congelamento e estrutura fatorial do protocolo empregado para a criação seletiva de linhagens de ratos Cariocas alto e baixo congelamento condicionado. Dissertação de mestrado em Psicologia.** Orientador: Jesus Landeira-Fernandes. Co-orientador: Vitor de Castro Gomes. PUC-Rio. 2017. 89 p.

MAKI, Y., INOUE, T., IZUMI, T., MURAKI, I., ITO, K., KITAICHI, Y., LI, X., KOYAMA, T. Monoamine Oxidase Inhibitors Reduce Conditioned

Fear Stress-induced Freezing Behavior in Rats. **Eur J Pharmacol.** 2000 Oct 20;406(3):411-8.

MAREN, S. Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. **Annu Rev Neurosci.** 2001;24:897-931.

MATHIS, C.; PAUL, S. M.; CRAWLEY, J. N. (1994) Characterization of benzodiazepine-sensitive behavior in the A/J and C57BL/6J inbred strains of mice. **Behav Genet.** 1994 Mar;24(2):171-80.

MCGRATH, L. M.; WEILL, S.; ROBINSON, E. B.; MACRAE, R.; SMOLLER, J. W. Bringing a developmental perspective to anxiety genetics. **Dev Psychopathol.** 2012 Nov;24(4):1179-93. doi: 10.1017/S0954579412000636.

MONTGOMERY, K. C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. **J Comp Physiol Psychol.** 1955 Aug;48(4):254-60.

MORA, P. O.; NETTO, C. F.; GRAEFF, F. G. Role of 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptor subtypes in the two types of fear generated by the elevated T-maze. **Pharmacol Biochem Behav.** 1997 Dec;58(4):1051-7.

MOUSOVICH-NETO, F. et al. Endocrine and metabolic function in male Carioca High-conditioned Freezing rats. **Physiol Behav.** 2015 Apr 1;142:90-6. doi: 10.1016/j.physbeh.2015.01.028. Epub 2015 Jan 23. MOWRER, O. H.; LAMOREAUX, R. R. Fear as an intervening variable in avoidance conditioning. **J Comp Psychol.** 1946 Feb;39:29-50.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. Office of Laboratory Animal Welfare. Policies and Laws. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 8. ed. Washington (DC): National Academies Press, 2011. 246 p. Disponível em: <<https://grants.nih.gov/grants/olaw/Guide-for-the-Care-and-Use-of-Laboratory-Animals.pdf>>. Acesso em: 25 nov. 2016.

OKAMOTO, K., AOKI, K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. **Japanese Circulation Journal.** [Department of Pathology, School of Medicine, Kyoto University, Japan]. 1963 Mar; v. 27. pp.: 282-293. Publicado em This Week's Citation Classic. CC/N. 48. nov. 26 1990. Disponível em: <<http://garfield.library.upenn.edu/classics1990/A1990EH31200002.pdf>>. Acesso em: 25 jan. 2017.

OLKKOLA, K. T.; AHONEN, J. Midazolam and Other Benzodiazepines. In: **Modern Anesthetics.** Jürgen Schüttler; Helmut Schwilden (Eds). 2008. pp.: 335-360 (Handbook of Experimental Pharmacology, v. 182).

PAIN, L.; LAUNOY, A.; FOUQUET, N.; OBERLING, P. Mechanisms of action of midazolam on expression of contextual fear in rats. **Br J Anaesth.** 2002 Oct;89(4):614-21.

PAWLAK, Cornelius R.; KARRENBAUER, Britta D.; SCHNEIDER, Peggy; HO. Ying-Jui. The Elevated Plus-Maze Test: Differential Psychopharmacology of Anxiety-Related Behavior. **Emotion Review.**

Vol 4, Issue 1, pp. 98 – 115. First Published January 24, 2012.
<https://doi.org/10.1177/1754073911421374>.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M. Validation of open:closed arm entries in the elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **J Neurosci Methods**. 1985 Aug;14(3):149-67.

PELLOW, S; FILE, S. E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: A novel test of anxiety in the rat. **Pharmacol Biochem Behav**. 1986 Mar;24(3):525-9.

PERKINS, A. M.; KEMP, S. E.; CORR, P. J. Fear and anxiety as separable emotions: an investigation of the revised reinforcement sensitivity theory of personality. **Emotion**. 2007 May;7(2):252-61.

PERKINS, A. M.; INCHLEY-MORT, S. L.; PICKERING, A. D.; CORR, P. J.; BURGESS, A. P. A Facial Expression for Anxiety. **J Pers Soc Psychol**. 2012 May;102(5):910-24. doi: 10.1037/a0026825. Epub 2012 Jan 9.

PERUSINI, J. N.; FANSELOW, M. S. Neurobehavioral perspectives on the distinction between fear and anxiety. **Learn Mem**. 2015 Aug 18;22(9):417-25. doi: 10.1101/lm.039180.115. Print 2015 Sep.

PINHEIRO, Simone H.; ZANGROSSI-JR., Hélio; DEL-BEN, Cristina M. and GRAEFF, Frederico G. Elevated mazes as animal models of anxiety: effects of serotonergic agents. **An. Acad. Bras. Ciênc.** [online]. 2007, vol.79, n.1 [cited 2017-04-16], pp.71-85. Available from: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-37652007000100010&lng=en&nrm=iso>. ISSN 0001-3765. <http://dx.doi.org/10.1590/S0001-37652007000100010>.

PONDER, C. A.; KLIETHERMES, C. L.; DREW, M. R.; MULLER, J.; DAS, K.; RISBROUGH, V. B.; CRABBE, J. C.; GILLIAM, T. C.; PALMER, A. A. Selection for contextual fear conditioning affects anxiety-like behaviors and gene expression. **Genes Brain Behav**. 2007 Nov;6(8):736-49. Epub 2007 Feb 16.

PONDER, C. A.; HUDED, C. P., et al. Rapid selection response for contextual fear conditioning in a cross between C57BL/6J and A/J: behavioral, QTL, and gene expression analysis. **Behav Genet**. 2008 May;38(3):277-91. doi: 10.1007/s10519-008-9203-6. Epub 2008 Mar 25.

RADCLIFFE, R. A. LOWE, M. V., WEHNER, J. M. Confirmation of contextual fear conditioning QTLs by short-term selection. **Behav Genet**. 2000 May;30(3):183-91.

RAMOS, A.; MORMÈDE, P. Stress and emotionality: a multidimensional and genetic approach. **Neurosci Biobehav Rev**. 1998;22(1):33-57.

RAMOS, A.; MOISAN, M. P.; CHAOULOFF, F.; MORMÈDE, C.; MORMÈDE, F. Identification of female-Specific QTLs Affecting An Emotionality Related Behavior in Rats. **Mol Psychiatry**. 1999 Sep;4(5):453-62.

RESCORLA, R. A. Behavioural Studies of Pavlovian Conditioning. **Annu Rev Neurosci**. 1988;11:329-52.

RÉUS, G. Z. et al. Anxious phenotypes plus environmental stressors are related to brain DNA damage and changes in NMDA receptor subunits and glutamate uptake. **Mutation Research**. 772 (2015) 30-37.

REX, A.; SONDERN, U.; VOIGT, J. P.; FRANCK, S.; FINK, H. Strain differences in fear-motivated behavior of rats. **Pharmacol Biochem Behav**. 1996 May;54(1):107-11.

RODGERS, R. J., & COLE, J. C. Influence of social isolation, gender, strain, and prior novelty on plus-maze behavior in mice. **Physiol Behav**. 1993 Oct;54(4):729-36.

RODGERS, R. J.; COLE, J. C. The elevated plus-maze: Pharmacology, methodology and ethology. In Cooper, S. J.; Hendrie, C. A. (Eds.). **Ethology and psychopharmacology**. New York: John Wiley and Sons, 1994. pp.: 9-43.

RODGERS, R. J.; COLE, J. C. Effects of scopolamine and its quaternary analogue in the murine elevated plus-maze test of anxiety. **Behav Pharmacol**. 1995 Apr;6(3):283-289

RODGERS, R. J.; COLE, J. C.; COBAIN, M. R.; DALY, P.; DORAN, P. J.; EELLS, J. R.; WALLIS, P. Anxiogenic-like effects of fluprazine and eltoprazine in the mouse elevated plus-maze: profile comparisons with 8-OH-DPAT, CGS 12066B, TFMPP and MCPP. **Behav Pharmacol**. 1992 Dec;3(6):621-634.

RODGERS, R. J.; DALVI, A. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. **Neurosci Biobehav Rev**. 1997 Nov;21(6):801-10.

RODGERS, R. J. et al. Animal models of anxiety: an ethological perspective. **Braz J Med Biol Res**, Ribeirão Preto, v. 30, n. 3, p. 289-304, Mar. 1997. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-879X1997000300002&lng=en&nrm=iso>. access on 20 Jan. 2017. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-879X1997000300002>.

SALVIANO, M. et al. Behavioral evaluation of male and female carioca high –and low-freezing rats **Temas psicol**. [online]. 2014, vol.22, n.3, pp. 663-675. ISSN 1413-389X. <http://dx.doi.org/10.9788/TP2014.3-11>.

SESTAKOVA, N.; PUZSEROVA, A.; KLUKNAVSKY, M.; BERNATOVA, I. Determination of motor activity and anxiety-related behaviour in rodents: methodological aspects and role of nitric oxide. **Interdisciplinary Toxicology**. 2013;6(3):126-135. doi:10.2478/intox-2013-0020.

SETEM, J.; PINHEIRO, A. P.; MOTTA, V. A.; MORATO, S.; CRUZ, A. P. M. Ethopharmacological analysis of 5-HT ligands on the rat elevated plus-maze. **Pharmacol Biochem Behav**. 1999 Mar;62(3):515-21.

SHARMA, S.; POWERS, A.; BRADLEY, B.; RESSLER, K. J. Gene × Environment Determinants of Stress- and Anxiety-Related Disorders.

Annu Rev Psychol. 2016;67:239-61. doi: 10.1146/annurev-psych-122414-033408. Epub 2015 Oct 6.

SHUHAMA, Rosana et al. Animal defense strategies and anxiety disorders. **An. Acad. Bras. Ciênc.**, Rio de Janeiro, v. 79, n. 1, p. 97-109, Mar. 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-37652007000100012&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 20 out. 2017. <http://dx.doi.org/10.1590/S0001-37652007000100012>.

SILVA, R. C. B.; BRANDÃO, M. L. Acute and chronic effects of gespiron and fluoxetine in rats tested in the elevated plus-maze: an ethological analysis. **Pharmacol Biochem Behav.** 2000 Feb;65(2):209-16.

SMALL, Willard S. Notes on the Psychic Development of the Young White Rat. **The American Journal of Psychology**, vol. 11, no. 1, 1899, pp. 80-100. JSTOR, JSTOR, www.jstor.org/stable/1412730. Acesso em: 4 jan 2017

SPIELBERGER, C. D. **State-Trait Anxiety Inventory**: Bibliography (2. ed.). Palo Alto, CA: Consulting Psychologists Press, 1989.

SPIELBERGER, C. D.; GORSUCH, R. L.; LUSHENE, R. E. **Manual for the state-trait anxiety inventory** ("self-evaluation questionnaire"). California: Consulting-Psychologists, 1970.

STEIMER, T. The biology of fear- and anxiety-related behaviors. **Dialogues Clin Neurosci.** 2002 Sep; 4(3): 231–249.

STEIMER, T.; DRISCOLL, P. Inter-individual vs lines/strain differences in psychogenetically selected roman high- (RHA) and low- (RLA) avoidance rats. Neuroendocrine and aspects. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews.** 2005; v. 29. pp. 99-112.

TOVOTE, P.; FADOK, J. P.; LÜTHI, A. Neuronal circuits for fear and anxiety. **Nat Rev Neurosci.** 2015 Jun;16(6):317-31. doi: 10.1038/nrn3945.

TOYE, A. A.; COX, R. Behavioral genetics: anxiety under interrogation. **Curr Biol.** 2001 Jun 26;11(12):R473-6.

TREIT, D. Animal model for the study of anti-anxiety agents: a review. **Neurosci Biobehav Rev.** 1985 Summer;9(2):203-22.

TRULLAS, R.; SKOLNICK, P. Differences in fear motivated behaviors among inbred mouse strains. **Psychopharmacology** (Berl). 1993;111(3):323-31

TRYON, R. C. (1930). Studies in individual differences in maze ability. I. The measurement of the reliability of individual differences. **Journal of Comparative Psychology**, 11(2), 145-170. <http://dx.doi.org/10.1037/h0071525>.

TURRI, M. G.; DATTA, S. R.; DEFRIES, J.; HENDERSON, N. D.; FLINT, J. QTL analysis identifies multiple behavioral dimensions in ethological tests of anxiety in laboratory mice. **Curr Biol.** 2001 May 15;11(10):725-34.

VOGEL, J. R.; BEER, B.; CLODY, D. E. A simple and reliable conflict procedure for testing anti-anxiety agents. **Psychopharmacologia**. 1971;21(1):1-7.

WOOD, S.; TOTH, M. Molecular pathways of anxiety revealed by knockout mice. **Mol Neurobiol**. 2001 Apr-Jun;23(2-3):101-19.

ZANGROSSI JR., H.; GRAEFF, F. G. Behavioral validation of the elevated T-maze, a new animal model of anxiety. **Brain Res Bull**. 1997;44(1):1-5.