



Matheus Almeida Macêdo Bezerra Karounis

**Consumo de etanol nas linhagens de
ratos Cariocas com alto e baixo
congelamento**

Dissertação de Mestrado

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

Orientador: Prof. Jesus Landeira Fernandez

Rio de Janeiro
Fevereiro de 2020



Matheus Almeida Macêdo Bezerra Karounis

**Consumo de etanol nas linhagens de
ratos Cariocas com alto e baixo
congelamento**

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

Prof. Jesus Landeira-Fernandez

Orientador

Departamento de Psicologia - PUC-Rio

Prof. Thomas Eichenberg Krahe

Departamento de Psicologia - PUC-Rio

Prof. Claudio Carneiro Filgueiras

Departamento de Ciências Fisiológicas - UERJ

Rio de Janeiro, 20 de fevereiro de 2020.

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

Matheus Almeida Macêdo Bezerra-Karounis

Autor graduou-se em Psicologia pela Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro em 2017, e obteve o grau de Mestre em Psicologia Clínica em 2019 pela PUC-Rio, e atualmente é doutorando e representante discente do Programa de Pós-Graduação em Psicologia Clínica da PUC-Rio. Interesses acadêmicos envolvem investigar processos de aprendizagem, memória, motivacionais e atentos, em modelos animais e humanos.

Ficha Catalográfica

Bezerra-Karounis, Matheus Almeida Macêdo

Consumo de etanol nas linhagens de ratos Cariocas com alto e baixo congelamento / Matheus Almeida Macêdo Bezerra-Karounis ; orientador: Jesus Landeira-Fernandez. – 2020.

51 f. : il. color. ; 30 cm

Dissertação (mestrado)–Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Departamento de Psicologia, 2020.

Inclui bibliografia

1. Psicologia – Teses. 2. Linhagens. 3. Fenótipos contrastantes. 4. Condicionamento contextual ao medo. 5. Comportamento de congelamento. 6. Ansiedade. I. Landeira-Fernandez, Jesus. II. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Departamento de Psicologia. III. Título.

CDD: 150

Era 28 de fevereiro de 2013- um dia antes de começar a minha graduação em Psicologia, que o maior aprendizado de minha vida começou. Aprender a amar, a respeitar, a sonhar. Reaprender o ensino médio, passar pelo TCC uma segunda vez. Comemorar as glórias. Tudo em dobro. Tudo com a outra metade, com aquela que me completa. A cada vez que passa, tenho certeza de que nossas unmei no akai ito (Corda vermelha do destino) estão ligadas. Ontem era uma jovem, e hoje, é a minha Assistente Social favorita, minha melhor amiga, minha esposa, meu tudo (junto, é claro, de Pandora, Aurora e Gregório, nossos filhos de 4 patas, e Rex, o filhote agregado). Quero que saiba que eu tenho um orgulho enorme de ti, e que esse mestrado, sem dúvidas, não é minha conquista, mas nossa. E por isso, dedico este trabalho a ti, Bl. A. S. Vitória Katherine Karounis Borba. Te amo mil milhões.

Agradecimentos

À Deus, sobre todas as coisas, sobre todos os sentidos e permissões. Sem sua tortuosa escrita, nada haveria sido feito, oportunidades não seriam abertas e vitórias, jamais alcançadas.

À minha mãe, D. Carmem Almeida, que a quem devo toda e completa educação, desde os mais difíceis ensinamentos que a vida pode dar, até a empurrar-me o conhecimento dos homens, a tal da matemática e do português, “goela abaixo”, e me dando colo quando as coisas apertavam. Mãe é mãe né?

Ao meu pai, SO-MB Glaydson Alves, que observou e apoiou o meu sonho de tornar-me psicólogo mestre, em todos os momentos de sua vida, em seu leito, e agora, na certeza de que ele torce e intercede lá de cima.

Agradecimento à minha nova família, que me permitiram, não só conceder a mão de sua jóia rara, mas também por todo o carinho, abraços e apoio que deram durante todo esse período, em especial, meus sogros, Carmem Lúcia e Fabiano, minha cunhadinha, Nicole, os dindinhos, Bl. Helena, e os especialmente meus avós, D. Nicolas Karounis e D. Carmem Karounis.

Ao Professor Doutor J. Landeira-Fernandez, a quem, a cada aperto de mão, me ofereceu uma oportunidade dê crescer, aprender e desenvolver. Um grande orientador, não somente de meus graus acadêmicos, mas um grande professor e espelho para a minha vida profissional, e a quem fico fortemente agradecido por suas contribuições em meu desenvolvimento.

Ao professor Doutor Thomas E. Krahe. Lembro a primeira vez que falei com entrei em sua sala, sentei em sua cadeira, assustado com o novo co-orientador (mesmo que falassem bem dele, vai que...) e eis que recebo uma pergunta que me guiou durante toda a pós: “qual o seu objetivo?”. Claro que era o objetivo da pesquisa, mas, porque não para toda a vida. Hoje, um grande parceiro, Co-Orientador e Orientador de Auxílio à Docência.

Lembro em 2014, quando ainda era IC do laboratório, e a PHDeusa mor do laboratório Dr^a Silvia Maisonette me falou: “você vai entrar no mestrado”. Quando lhe contei sobre ter passado na seleção entre os 10 primeiros colocados, ela comemorou comigo ao telefone. E ao quanto me ajudou, merecia uma página inteira de agradecimentos. Muito obrigado a ti Silvia, nossa segunda mãe. Agradecimento também a rainha da organização e da fenotipagem, Flávia, sempre nos salvando do café de certas pessoas.

Agradecimento forte à Bacharel em Engenharia Civil, Luiza Assunção, melhor amiga, confidente, fofqueira e agora, minha madrinha. Obrigado pelos 21 anos de irmandade. E virão muito mais.

Para aqueles meus familiares de consideração, primas que encontrei que me ajudaram de forma intensa, a minha “primadrinha” Prof. Msc. Carolina Macêdo-Souza, que tanto me escutou e me permitiu escutar, mesmo longe, me permite ver que a família Macêdo está bem representada. E para minha prima Prof. Msc. Paloma Almeida, que me ajudou de uma forma tão incrível a perseguir meu sonho de ser professor, que só de me lembrar, me emociono. Vocês têm um lugar especial em meu Hipotálamo!

Agradecimento especial para o Prof. Msc. André Machado, dupla dinâmica dos cursos de extensão, pós, docência e vida profissional. Um grande irmão que tenho desde as épocas de cirurgia estereotáxica em 2013, até a neuroimagem nos dias de hoje.

Agradecimento aos pesquisadores de Iniciação Científica, em especial a agora mestranda, Psicóloga Ariadne Fantasia., e ao prof. Msc. Yury Lages, o cara do estresse. Também aos companheiros de mestrado, em especial a Millena Cardoso e André Rocha. Não esqueço também dos secretários Fernando, Jhonny, Marcelina e Verinha, que tanto me ajudam, nas melhores situações e piores enrascadas. E agradecimento a todas as alunas, alunos e orientandos que me permitiram que minha didática os alcance, além de me proporcionar aprendizado ímpar.

Por fim, agradeço a um grupo singular, O Bloco, com membros que me ajudaram a construir quem sou, e, de quebra, encontrar grandes amigos, que mesmo a quilômetros distantes, me sinto abraçado por cada um. E assim agradeço ao Sd. Hewandro D. Entringer, ao Bl. Alisson Pereira e ao Luís Sobotyk.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

E a todos que contribuíram de forma direta e indireta, de forma construtiva para que eu pudesse estar aqui, muito obrigado!

Resumo

Bezerra-Karounis, Matheus Almeida Macêdo; Landeira-Fernandez, Jesus. **Consumo de etanol nas linhagens de ratos Cariocas com alto e baixo congelamento.** Rio de Janeiro, 2020. 51p. Dissertação de Mestrado – Departamento de Psicologia, Pontifícia Universidade católica do Rio de Janeiro

Os ratos Carioca com alto condicionamento (CAC) e Carioca com baixo condicionamento (CBC) são duas linhagens que são criadas seletivamente para altos e baixos níveis de congelamento, em resposta a sugestões contextuais previamente associadas ao estímulos elétricos nos membros. Essas duas linhas têm traços significativamente diferentes de respostas semelhantes à ansiedade, em diferentes protocolos comportamentais. O presente estudo utilizou ratos machos e fêmeas de CAC e CBC para investigar possíveis associações entre comportamento relacionado à ansiedade e ingestão de álcool. Quinina e sacarina foram utilizadas como soluções de controle do paladar. Os resultados indicaram que os ratos CAC tinham um fenótipo "ansioso" mais alto e os animais CBC tinham um fenótipo "ansioso" mais baixo, quando as duas linhagens foram comparadas com uma linhagem, selecionada aleatoriamente, que foi usada como grupo controle (CTR). Os ratos machos exibiram consistentemente maior congelamento condicionado do que as fêmeas. Os ratos CAC consumiram mais concentrações de álcool de 6% e 10% do que os ratos CBC em um teste de livre escolha de consumo e maior consumo na concentração de álcool 10% em um teste de escolha forçada. Ratos fêmeas CAC exibiram a maior quantidade de ingestão de álcool durante essas três condições, em comparação com ratos machos CAC e também consumiram mais quinina que ratos machos. Finalmente, ratos CAC exibiram menor consumo de sacarina em comparação com CBC e animais controle. No total, esses resultados revelaram diferenças entre os sexos no comportamento semelhante ao da ansiedade e no consumo de álcool, corroborando a hipótese de que existe uma relação positiva entre ansiedade e ingestão de álcool.

Palavras-chave

linhagens; Fenótipos contrastantes; Condicionamento contextual ao medo; Comportamento de congelamento; Ansiedade; Consumo de álcool.

Abstract

Bezerra-Karounis, Matheus Almeida Macêdo; Landeira-Fernandez, Jesus (Advisor). **Alcohol Consumption in Carioca rats of high and low freezing.** Rio de Janeiro, 2020. 51p. Dissertação de Mestrado – Departamento de Psicologia, Pontifícia Universidade católica do Rio de Janeiro

Carioca High-conditioned Freezing (CHF) and Carioca Low-conditioned Freezing (CLF) rats are two lines that are selectively bred for high and low levels of freezing in response to contextual cues that are previously associated with footshock. These two lines have significantly different traces of anxiety-like responses in different behavioral protocols. The present study used male and female CHF and CLF rats to investigate possible associations between anxiety-related behavior and alcohol intake. Quinine and saccharin were used as taste control solutions. The results indicated that CHF rats had a higher “anxious” phenotype and CLF animals had a lower “anxious” phenotype when both breeding lines were compared with a randomly selected line that was used as a control group. Male rats consistently exhibited more conditioned freezing than females. CHF rats consumed more 6% and 10% alcohol concentrations than CLF rats in a free-choice test and more of a 10% alcohol concentration in a forced-choice test. Female CHF rats exhibited the highest amount of alcohol intake during these three conditions compared with male CHF rats. Female rats also consumed more quinine than male rats. Finally, CHF rats exhibited lower saccharin consumption compared with CLF and control animals. Altogether, these results revealed sex differences in anxiety-like behavior and alcohol consumption, supporting the hypothesis that there is a positive relationship between anxiety and alcohol intake. The Carioca breeding lines were developed for high and low defensive behavior in response to diffuse contextual cues that are associated with footshock but not to well-defined danger-related stimuli, corroborating the view that anxiety but not fear is associated with alcohol consumption.

Keywords

Breeding lines; Contrasting phenotypes; Contextual fear conditioning; Freezing behavior; Anxiety; Alcohol consumption.

Sumário

1. Introdução	13
1.1 Transtornos de Ansiedade	15
1.2 Ansiedade e Consumo Alcoólico	19
1.3 Modelos animais de ansiedade e etologia	23
1.4 Ratos Cariocas de Alto e Baixo Congelamento	26
2. Objetivo Geral	30
3. Métodos	31
3.1 Animais	31
3.2 Condicionamento contextual ao medo	31
3.3 Procedimentos de consumo de sacarina, quinino e álcool	32
4. Resultados	34
5. Discussão	38
6. Conclusão	43
7. Bibliografia	45

Lista de Figuras

Figura 1: O congelamento (Gomes & Landeira-Fernandez, 2008), é uma das reações comportamentais de alerta sinalizadoras de ansiedade, a um perigo potencial, onde o animal permanece em estado imóvel, a espera da reação do contexto (Fonte: A.F.A., 2013) 15

Figura 2 O experimento de Pavlov consistia em emparelhar o estímulo neutro sonoro (sino) com o estímulo condicionado visual (alimento). Ao fim do condicionamento, o cachorro teria o mesmo comportamento de resposta (salivação) ao estímulo neutro (sino), sem a apresentação do estímulo condicionado (apresentação de comida). (Reprodução: adaptado de Santos, 2012) 24

Figura 3: Arte reproduzindo o teste “campo aberto” de Hall (2000) A Caixa do Campo Aberto desenvolvido por Hall (2000) é utilizada por vários outros teóricos na área da ansiedade. Composta por uma arena quadrada, demarcada por vários quadrados no solo, a fim de visualizar a locomoção do animal, e a fuga do centro da arena (Reprodução Adaptada de Hall, 2000) 25

Figura 4. Média \pm SE porcentagem de tempo gasto com congelamento entre ratos machos e fêmeas das linhagens de alto congelamento (CHF), controle (CTL) e baixo congelamento (CLF) durante o a) período pré-choque (gráfico “Pre-Shock”), b) período pós-choque (gráfico “Post-Shock”) e c) sessão de teste (gráfico “test session”). 35

Figura 5. Média \pm SE consumo de SEM de sacarina 7,5 mM (gráfico superior), quinino 2,0 μ M (gráfico central) e 10% de etanol forçado (gráfico

inferior) entre ratos machos e fêmeas de alto congelamento (CAC), controle (CTR) e baixo congelamento CBC)

37

Figura 6. Média \pm SE consumo de etanol em concentrações de 2%, 4%, 6% e 10% entre ratos machos (gráfico superior) e fêmeas (gráfico inferior) dos ratos alto (CHF), controle (CTL) e baixo (CLF).

38

Lista de Tabelas

Tabela 1. Tabela 1 Transtornos de Ansiedade e seus sintomas diagnósticos, de acordo com o DSM-V, adaptado de Machado et al. (2017)

16

1

Introdução

O ser humano é emocional. Composto por sentimentos e sensações, interpreta a vida por meio desses mecanismos. Ao se deparar com uma situação de nojo, como um banheiro sujo, um ninho de baratas, sente-se vertigem, necessidade de fuga; em um caso de surpresa, como em um espetáculo de mágica, uma festa de aniversário surpresa ou uma notícia impactante, o sentimento repentino, mesmo negativo ou positivo invade o indivíduo, uma vez que os sentimentos correspondem a uma forma de comunicação animal, sobretudo, humana. (Ekman, 2004).

O mesmo ocorre em situações de perigo, como ao se ver um raio, enquanto se está em um banho de piscina, ou em uma situação de visualização de um assalto. A reação de medo é irradiada de forma mental na pessoa, concomitantemente ao corpo (Cruz & Landeira-Fernandez, 2012). Taquicardia, sudorese e sequeidão na boca, junto a diminuição de sensação de dor (analgesia), são alguns dos fenômenos a nível comportamental e físico (Taylor, 1999). Entretanto, esta circunstância possui papel regulador de nosso comportamento, uma vez que, caso não o fosse, poderíamos embarcar em problemas físicos ou mentais de forma mais rápida.

No entanto, a ideia de ser exposto a algum desses cenários, pode levar, a posteriori, a sensações de apreensão, inquietude, que geralmente são vivenciadas durante o cenário real e perigoso, mas que agora é apercebido fora deste contexto. Em outras palavras, vivencia-se um perigo vago e potencial, preparando-nos para uma possível situação real de afrontamento. (Cruz & Landeira-Fernandez, 2012). A este sentimento, chamamos de ansiedade.

A literatura é ampla quando se trata sobre o tema, ainda mais quando o enfoque pode ser dado a partir de diferentes áreas de pesquisa, épocas diversas e situação social em voga (Maisonette, 1997); Segundo Schultz & Schultz (2012), Freud aponta, que a ansiedade é provinda do medo, provocando tensão e motivando o ansioso a agir. Karen Horney, sobre a Ansiedade Básica, a define como “o sentimento de isolamento e de desamparo da criança em um mundo potencialmente hostil” (Horney, 1945).

Ainda dentro deste diálogo, Carpenito(1997) discorre sobre a ansiedade ser um estado que se forma a partir do subjetivo de cada paciente, e classifica hierarquicamente em três níveis, de acordo com o comportamento do paciente. Andrade e Gorenstein(1998) afirmam ser este, um estado temporário, e que, assim como Keedwell&Snaith(1996) e Batista &Sisto(2005), e Beck et. al(1988), entre outros, formularam escalas para a mensuração e avaliação da ansiedade.

Nota-se que este agente regulador não se encontra apenas no ser humano, mas em todo Reino *Animalia*(DeGrazia & Rowan, 1991). A espera de um perigo eminente faz parte da evolução, bem como suas reações físicas externas, como a peloereção (arrepio), congelamento, o mecanismo conhecido como “3Fs”: *Fight, Fought, Freezing* (ou “sistema de luta-e-fuga”); Reações mentais, como, estresse e pânico e Reações Psicossomáticas, como Úlceras (Landeira-fernandez, 2004).

Essenciais a sobrevivência, o medo e a ansiedade podem ter sido as primeiras emoções inerentes aos seres vivos, uma vez que ambos se relacionam como respostas a situações de perigo. Isto chega de forma adaptativa à vida cotidiana do ser humano, em que a situação perigosa pode não ser, somente, a presença de um predador, mas também a possibilidade de ser demitido, perder um ente querido, ou até mesmo um evento radical, como um salto de paraquedas(Peregrino, 1996).

Pensando nesta associação, vários pesquisadores travaram o diálogo com este dilema, à luz de diversas áreas do conhecimento, como o casal Blanchard(1990), o qual desenvolveu vários experimentos envolvendo animais, cujo resultados inferiram que haveria uma sequência de comportamentos, que varia de um estado de alerta a um estado de luta e fuga, e isto seria correspondente a intensidade que a situação de perigo lhe oferecesse (Maisonette, 1997).



Figura 1: O *congelamento* (Gomes & Landeira-Fernandez, 2008), é uma das reações comportamentais de alerta sinalizadoras de ansiedade, a um perigo potencial, onde o animal permanece em estado imóvel, a espera da reação do contexto (Fonte: A.F.A., 2013)

Assim como a nível solo de ansiedade, a correlação de tal com o medo também foi estudada para possível mensuração, como Turner et al. (1989), Clark et al. (1994), Cavalieri et al. (2017), Machado et al. (2017) entre outros, bem como bases farmacológicas desta associação, como discutido por Armonia et al. (2001), onde se infere o uso de ansiolíticos no contexto médico e odontológico.

1.1 Transtornos de Ansiedade

Decerto, a ansiedade é uma experiência emocional, mas é uma função indispensável a nossa sobrevivência (Fendt & Fanselow, 1999). Distúrbios de ansiedade podem ser altamente prejudiciais, sendo a classe dos transtornos de ansiedade o mais comum tipo de psicopatologia em diferentes populações étnicas (Anagnostaras & Craske, 1999).

O conceito Transtorno de Ansiedade sofreu inúmeras mudanças ao longo dos anos, acompanhando a evolução clínica e experimental de evidências dentro dos quadros (Machado, Castro-Gomes, & Landeira-Fernandez, 2017). A partir de referências históricas, observamos que os quadros psicopatológicos em geral eram tratadas como apenas um único quadro, que por vezes era condicionado a fenômenos religiosos, sendo tratados com rituais e formas primitivas de cirurgia, denominado trepanação (Straub, 2005).

Avançando assim à medicina Greco-romana, e a medicina oriental, com descobertas iniciais neurofisiológicas, mas a visualização dos quadros psicológicos como

Segundo o DSM-V, pacientes afetados com transtornos de ansiedade experimentam sintomas como taquicardia, sudorese, problemas gastrointestinais, distúrbios de sono, entre outros, afetando não só a saúde do indivíduo, mas também o aspecto social, uma vez que fatores emocionais e cognitivos são influenciados (Rapee & Heimberg, 1997). Tal fato é corroborado segundo Woddy(1996), pois o fator atencional dado ao social em quadros relacionados a fobia, como por exemplo, a aracnofobia, faz com que o foco se torne o elemento fóbico (aranha), e não mais a interação social.

Devido à crescente prevalência de transtornos de ansiedade e ao aumento de seus custos sociais, é de grande importância elucidar os mecanismos psicológicos e fisiológicos subjacentes à sensibilidade na busca de tratamentos farmacológicos e psicofarmacológicos(Machado et al., 2017). Uma forma é a criação um modelo animal fidedigno para explorar as bases neurais da insensibilidade(Cruz & Landeira-Fernandez, 2012).

Convexo a isto, apresenta-se a evolução, a nível de categorização dos transtornos de ansiedade, uma vez que estes se apresentam, cada vez mais, especificados sintomas comportamentais, cognitivos, fisiológicos e estruturais(Teixeira & Kummer, 2012).

Tabela 1. Tabela 1 Transtornos de Ansiedade e seus sintomas diagnósticos, de acordo com o DSM-V, adaptado de Machado et al. (2017).

Transtorno	Sintomas
Pânico, Ataque de Pânico	Ataques de pânico (caracterizados por intenso medo da morte ou pela perda de controle, parestesias, náusea, palpitações, sudorese, calafrios, tremores e falta de ar) e preocupação persistente de sofrer novos ataques.
Fobias	Ansiedade quando existe o confronto com o objeto da fobia, medo incapacitante, tentativas ativas de evitar o objeto fóbico.

Mutismo Seletivo	Apesar da fala ser possível em situações específicas, há a falha quando há a expectativa de emissão da voz. Prejuízos associados à falta de fala na performance educacional, ocupacional ou social. Não pode ser explicada isoladamente por falta de conhecimento, desconforto ou não proficiência na língua.
Estresse Pós-Traumático	Ansiedade severa após evento estressor extremo que causou sentimentos de medo, sensações de impotência ou horror. Aumento na irritabilidade, problemas de sono, ser facilmente assustável, flashbacks, ansiedade.
Transtorno de Ansiedade Generalizada	Preocupação excessiva, inquietude, sensação de tensão, ficar facilmente fadigado, dificuldade de se concentrar ou ficar com a mente em branco, irritabilidade, tensão muscular, dificuldade para controlar a apreensão, problemas para dormir.
Ansiedade Social	Preocupação excessiva sobre experiências negativas de interação social, intenso medo de ser criticado, esquiva relacionada a locais com pessoas, náusea ou dor de estômago quando outras pessoas estão em volta
Transtorno Obsessivo-Compulsivo	Presença de pensamentos intrusivos, compulsões ou obsessões, que se não consumadas causam estresse e ansiedade.
Agoraphobia	Medo ou ansiedade relacionados a espaços cheios de gente, dificuldade em estar em um local com pressuposta dificuldade de saída, além de sintomas clássicos de estresse e ansiedade fisiológicos, como problemas gástricos, falta de ar, dores abdominais ou no peito etc.
Ansiedade de Separação	Persistente ansiedade sobre separação de alguma pessoa ou local e reverberações fisiológicas.

Aspectos comportamentais e cognitivos observados esses são ligados e consequentes a circunstâncias específicas de futuro potencialmente perigoso (Cruz & Landeira-Fernandez, 2012). Ao se tratar do Transtorno de Ansiedade Social (ou, fobia social), o medo de um futuro no qual, o paciente pode ser julgado pela sociedade de forma negativa. Já no Transtorno de Ansiedade Generalizada, o futuro pode ser ameaçador em amplas perspectivas,

sendo a simples expectativa do tempo vindouro, um gatilho constante(Machado, Castro-Gomes, & Landeira-Fernandez, 2017).

Os aspectos fisiológicos aparecem em formato similar nos Transtornos de Ansiedade. Processos de taquicardia, suor intensa (sudorese), tremor, pupilo dilatação, Constrição, incontinência urinária, insônia, sensação de desmaio eminente, encefalites (dor de cabeça), gases, entre outros, aparecem como sintomatologia correlata aos distúrbios, de forma direta ou somatológica(Machado, Castro-Gomes, & Landeira-Fernandez, 2017). O aparecimento destes sintomas podem ser em grande número ou, com apenas dois ou três sintomas, cabendo ao profissional especializado, detectar se há relação patológica do paciente com as respostas fisiológicas apresentadas.

Em se tratando dos quadros ansiosos, várias são os tipos de diagnósticos previstos nos manuais e guias de saúde, dentre os quais alguns aqui serão citados. Contudo, pode-se elencar diversas comorbidades dentro dos transtornos de Ansiedade:

- a) Distúrbios do Sono: A característica primária de alterações do sono e Transtornos de Ansiedade consistem em insônia inicial a intermediária, por conta das preocupações excessivas, pensamentos ruminativos e medos potenciais.(Teixeira & Kummer, 2012).Resultados de estudos polissonográficos apontam que pessoas dentro do quadro de TAG, por exemplo, mostram aumento da latência para o sono, redução de eficiência do sono, redução do sono em totalidade e redução da camada superficial (sono leve) e camada 2 do sono (Papadimitriou & Linkowski, 2005).
- b) Dores de cabeça (Cefaléias): Estresses psicossociais correntes nos Transtornos de Ansiedade pode se fator fundamental para o desencadeamento de cefaleias do tipo Migrânea (Enxaqueca), cefaléia crônica e em alguns casos, de salva. (Teixeira & Kummer, 2012)

Além disso, pacientes migranosos parecem apresentar respostas quanto a estresse mental de forma diferente dos que não se apresentam no quadro,sugerindo que essas respostas ocorram de alterações focais em circuitarias variadas, como o cortex pré-frontal e a MC Periaquedutal. Convexo a isso, a Classificação Internacional de Cefaleas incluiu em seu apêndice “A12”, sobre cefaléias decorrentes

de transtornos psiquiátricos de ansiedade: Cefaleias atribuídas a Fobia Social, Cefaleia atribuída a Ansiedade de Separação, Cefaleia atribuída a Transtorno de Ansiedade Generalizada, Cefaleia atribuída a Transtorno de Estresse Pós-Traumático(Headache Classification Subcommittee of the International Headache Society, 2004) – o que no entanto, na grande maioria, não há uma relação de causalidade entre as cefaléias, mas como comorbidade, sugerindo uma conexão biológica comum a ambos.(Teixeira & Kummer, 2012)

- c) Fadiga: Um estudo prospectivo, aproximadamente 25% de uma amostra de 571 pacientes, demonstraram fadiga correlacionada a transtornos psiquiátricos ou somatológicos específicos. Segundo Teixeira e Kummer (2012), Antidepressivos, ansiolíticos, sedativos, anti-histamínicos, além de condições psiquiátricas correlatas a ansiedade (como transtornos de ansiedade, depressão, compulsão e transtornos alimentares) e comorbidades, como distúrbios de sono e cefaléias são possíveis causadores de fadiga – causa esta bilateral a casos psiquiátricos, ou seja, pode a fadiga levar a transtornos psiquiátricos conseqüentemente.

Por fim, aspectos estruturais no Sistema Nervoso, especificamente, na área cerebral. Análises de neuroimagens realizadas por Tomografia Computadorizada, apresentam redução volumétrica no córtex pré-frontal, no giro cingulado anterior e no hipocampo em casos de Transtorno de Estresse Pós-Traumático(Nutt & Malizia, 2004), e Sinais hiperintensos de substância branca, além de redução de volume no córtex pré-frontal e no hipocampo, em casos de transtornos afetivos(Videbech, 1997).

1.2

Ansiedade e Consumo Alcoólico

De grande importância para a clínica(Schuckit M. A., 1996), a relação entre álcool e desordens psiquiátricas, como a ansiedade, é extremamente complexa e de grande importância para o âmbito científico(Brady & Lydiard, 1993). Portanto, existe significativa produção na literatura entre a associação do Consumo Alcoólico com Ansiedade (Ferro, Bezerra-Karounis, & Landeira-Fernandez, 2018);(Izídio & Ramos, 2007).

Acredita-se que os produtos alcoólicos sejam um dos produtos de maior consumo no mundo, em diversas culturas e faixas etárias, sendo identificado seu grande valor social (Laranjeira, Pinsky, Zaleski, & Caetano, 2007). A partir do último Levantamento Nacional de Padrões de Consumo de Álcool realizado, concluiu-se que o brasileiro está bebendo mais e de forma mais nociva, indicando que 20% dos adultos que mais ingerem substâncias, são responsáveis por 56% de todo o consumo, indicando um crescimento de 20% de consumo freqüente de alcoólicos do que o levantamento anterior, apontando um salto de 56% para 64% de consumo entre homens e de 29% para 39% para mulheres. (Pimentel, 2013)

Em muitos artigos e trabalhos acadêmicos, há correlação positivamente observada, levando a resultados como a hipótese de redução de tensão (ou Teoria do Reforçamento Alcoólico), proposto por Conger (1956), a qual sugere que indivíduos com grande presença de traços de ansiedade, apresentam maior predisposição ao uso de bebidas alcoólicas (Cappell & Herman, 1972), uma vez que podem possuir, conscientemente, expectativas de redução de tensão a partir do uso de alcoólicos, principalmente a indivíduos do sexo masculino (Kushner, Sher, Wood, & Wood, 1994), jovens e de meia-idade (Welte, 1985).

A existência de variados artigos não sugere consonância no entanto. Estudos apontam que a relação entre ambas pode ser, de forma geral, fraca (Welte, 1985); reversa, ou seja, o uso de alcoólicos, não como consequência de traços de ansiedade, mas como causadores do mesmo (Allan, 1995), bem como inferências pela abstinência do uso abusivo (Brown & Schuckit, 1988); e até negativa ou nula, aferindo não haver relação direta entre traços de ansiedade com alcoolismo (Kendler, Walters, Neale, Kessler, Heath, & Eaves, 1995); (Schuckit & Hesselbrock, 1994); Assim apontando certa limitação e inconclusão quanto a associação entre estas duas características (Izídio & Ramos, 2007).

Observa-se contudo, influencia do consumo a nível neurobiológico, a partir da influencia da substância alcoólica em diversos neurotransmissores, dentre eles, o ácido Gama-Amino-Butírico (GABA). Presume-se que, portanto, que o álcool provoque um efeito ansiolítico, uma vez que estimula o receptor GABA-A, resultando em um efeito de inibitório de maior potencia, conduzindo a um efeito de sedação e relaxamento corporal – O que, no entanto, afeta também

diversas áreas de Funções Executivas e Cognitivas, como o movimento, respiração, memória, fala e juízo.(Allan, 1995)

O álcool é uma substância que é absorvido de forma rápida e fácil pelo sistema digestivo, a partir do estômago, intestino delgado e cólon, sendo 90 a 98% da substância a ser metabolizado no fígado, por oxidação, em uma média aproximada de 10 gramas de álcool por hora, em humanos adultos, inferindo no sistema orgânico concentrações máximas em 30 a 90 minutos.(Teixeira & Kummer, 2012)

A ação de metabolismo interno do álcool é traduzido pela oxidação por ADH (álcool desidrogenase), transformando o composto em um acetil-aldeído, o qual é processado por um processo de aldeído desidrogenase (ALDH), convertendo a substancia em um acetato.(Schuckit M. A., 1996)

Por ser hidrófilo, o álcool leva a um processo mais rápido de alcoolemia em mulheres, devido a menor composição corporal. Ainda, o processo de absorção do composto pode ser acelerado por bebidas com concentrações maiores de EtOH, rápida ingestão, e bebidas alcoólicas efervescentes, com compostos advindos de substancias carbônicas (como o C2NA e o CO2).(Shuckit, 2009) A alcoolemia, no entanto, pode ser atrasada com o acréscimo de substancias alimentares, conduzidas por açucarinas, além de exercício físico de baixo impacto, bem como uma composição corporal maior, ou uma mais baixa temperatura corporal.(Teixeira & Kummer, 2012)

Como observado acima, a ação do álcool no sistema GABA produz um efeito depressor do SNC, afetando diversos níveis de recursos fisiológicos, como processos cognitivos e executivos, dentre outros déficits globais ou focais, e em casos mais graves de alcoolemia, o estado vegetativo (“coma alcoólico”), e até conduzindo a letalidade.(Garbutt, 2009)

Apoiado na literatura, contudo, aponta-se que a abstinência alcoólica é uma das mais intensas, em caso de dependência, em qualquer nível. Neste fenômeno, há um efeito de retorno, ou rebote, ao efeito alcoolímico: produz-se um estado de extrema excitatório. (Teixeira & Kummer, 2012) Sintomas fisiológicos de hipertensão muscular e sanguínea, taquicardia, taquipneia, sudorese, irritabilidade, tontura, vômitos, cefaléas (dor de cabeça), photumphobia (sensibilidade a estímulos luminosos), dentre outras postulações fisiológicas.(Shuckit, 2009)

Dentro da associação de abstinência e ansiedade, o fenômeno de Irritabilidade e Insônia são decorrentes do processo, e podem persistir por até seis meses desde a última ingestão. O processo hiperexcitatório ainda pode transladar a sintomas mais intensos, como crises epiléticas, e até mesmo, a contração de caso de *Delirium tremens*, São crises que ocorrem no período de a partir de 2 a 3 dias após o fim do estímulo alcoólico em adultos saudáveis. (Teixeira & Kummer, 2012)

O *delirium tremens* é um quadro conectado à processos de comportamentos ansiosos, consistindo em uma sintomatologia simbiótica: Confusão mental, desorientação, delírios, alucinações vívidas e visuais (como observação de animas, comumente um elefante rosa), insônia, Excitação severa, agitação psicomotoras, acompanhado de processos de pupilo dilatação, taquicardia, sudorese (Teixeira & Kummer, 2012). O pico deste fenômeno pode ocorrer no 3º ao 5º dia, com perpretação até 7 dias. (Garbutt, 2009)

Além disso, outro ponto de intoxicação por álcool é a encefalopatia de Wernicke, que se trata de uma deficiência de Tiamina, decorrente da má absorção e disfunção hepática. A Tiamina é uma enzima importante para o metabolismo, necessária e liberada no organismo em momentos de grande demanda metabólica – como no consumo de substancias alcoólicas, no qual há uma reposição aguda de glicose em dependentes. (Teixeira & Kummer, 2012)

A sintomatologia tripla mais comum, junto a “dor de cabeça”, seria ataxia e disfunção oculomotora. A encefalopatia de Wernicke se apresenta como um transtorno confusional agudo (*delirium*), denotando déficit de atenção e memória, agitação e desorientação visual, motora e espacial. No entanto, os pacientes neste quadro podem ter quadro evolutivo a Demência de Korsakoff. (Schuckit M. A., 1996)

Caracterizada por amnésia retroanterógrada, dificuldade de aprendizado, apatia, e até mesmo, confabulação, o Mal de Korsakoff possui uma taxa de recuperação de 30% a 50% dos casos. (Teixeira & Kummer, 2012) Ainda, o paciente dependente alcoólico pode apresentar o quadro de alucionose alcoólica, delírios de ciúme ou até mesmo, delírios persecutórios, apontando para possibilidade de potencialização de quadros ansiosos. (Shuckit, 2009)

1.3

Modelos animais de ansiedade e etologia

No âmbito experimental, a necessidade de reproduzir e representar de forma mais simplificada, trouxe a oportunidade da simulação de diversos aspectos humanos em animais (Patton, 1993). Em rápida comparação, seria como se o ser humano fosse o Planeta terra, e o modelo animal, um globo terrestre – o qual, assim como no modelo experimental, apresenta limitações de representação, se comparado ao que está sendo simulado, mas possui grande valor de experimento e manipulação (Cruz & Landeira-Fernandez, 2012).

Tal representatividade é aludida ao método indutivo, onde, segundo Copi & Cohen (1990) uma instância mínima é representativa de uma maior. Logo, a compreensão de algo de maior fenomenologia é simulada por uma forma menor, mais simples, porém bem detalhada e explicativa, defendendo-se assim o uso de modelos animais para vários fins experimentais científicos. A *American Medical Association* (AMA) fala sobre o assunto:

“Na verdade, praticamente todos os avanços na ciência médica no século 20, desde antibióticos e vacinas até fármacos antidepressivos e transplantes de órgãos, foram alcançados direta ou indiretamente através do uso de animais em experimentos laboratoriais” (American Medical Association, 1988)

Durante o século XIX, Claude Bernard (1949) foi o primeiro no uso de modelos animais, na área biológica e biomédica, sendo até hoje citado por estudar reações fisiológicas humanas em detrimento do método referido (LaFollette & Shanks, 1994).

Em Psicologia, a necessidade da análise do comportamento humano a partir de modelos animais tem forte conexão com o Behaviorismo de Watson, pois segundo suas próprias palavras, esta linha psicológica “é o resultado direto dos estudos do comportamento animal realizados durante a primeira década do século XX” (Watson & McDougall, 1929). Assim sendo, mais tarde, o estudo com animais se expandiu a diversas áreas do conhecimento, a fim de experimentar e conhecer diversos aspectos do comportamento humano (LaFollette & Shanks, 1993).

Por conseguinte, os modelos animais de ansiedade tentam simular situações aversivas, que lembrem perigo ou desconforto. De forma geral, segundo Cruz & Landeira-Fernandez (2012), isto é feito: Apresentando o animal a contextos novos ou potencialmente perigosos visto em Carvalho et al. (2012); estímulos psicossomáticos, como em Landeira-Fernandez (2004) ou contextos que remetam a momentos nocivos e de medo como o protocolo de fenotipagem a partir do medo condicionado, descrito em Gomes et al. (2008); confrontos com animais de mesma ou diferente espécie, como em Gehres & Almeida (2013).

Assim, observa-se os padrões de comportamento do animal, em detrimento das situações apresentadas, e tão logo, deve se equivaler ao comportamento humano a partir das reações comportamentais e fisiológicas apresentadas (Treit, 1985). Neste sentido, os primeiros modelos animais de ansiedade surgiram a partir de procedimentos simples de condicionamento e aprendizagem, como o cão de Pavlov (Pavlov, 1927) os ratos de Skinner (Skinner, 1953) entre outros, como forma de observação do comportamento. Posteriormente, passaram a ser usados para verificar o potencial curativo de ansiolíticos. Consecutivamente, à luz da etologia, animais expostos a situações de estímulo aversivo também se tornaram foco das pesquisas em ansiedade.

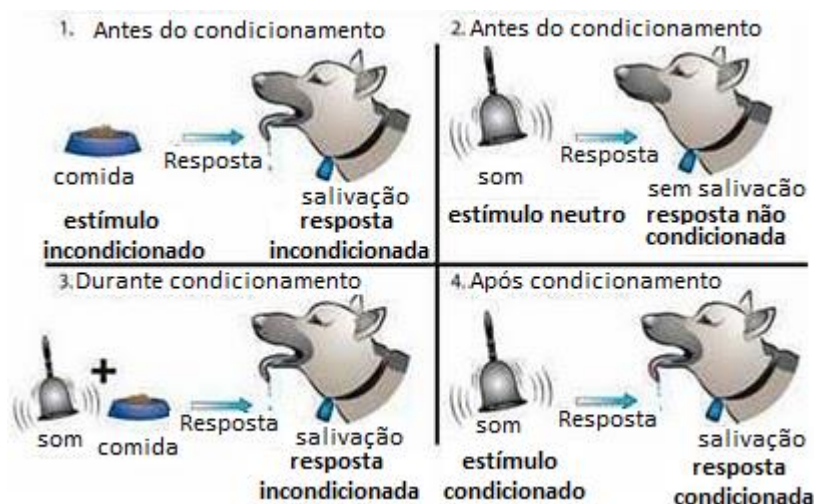


Figura 2. O experimento de Pavlov consistia em emparelhar o estímulo neutro sonoro (sino) com o estímulo condicionado visual (alimento). Ao fim do condicionamento, o cachorro teria o mesmo comportamento de resposta (salivação) ao estímulo neutro (sino), sem a apresentação do estímulo condicionado (apresentação de comida). (Reprodução: adaptado de Santos, 2012)

A partir do que Cruz (Cavaliere, Landeira-Fernandez, & Cruz, 2017) nominou de “modelos etológicos de ansiedade” estudos a partir de abordagens farmacológicas começaram a surgir, avaliando comportamentos e reações sob

uso de diversas drogas em situações diversas, testando esquiva ativa, congelamento, movimento exploratório, entre outros (Bezerra, 2017); Tal modo de pesquisa ficou conhecido dentre os pesquisadores como “análise etoexperimental” (ou análise experimental etológica) da ansiedade. (Blanchard & Blanchard, 1990).

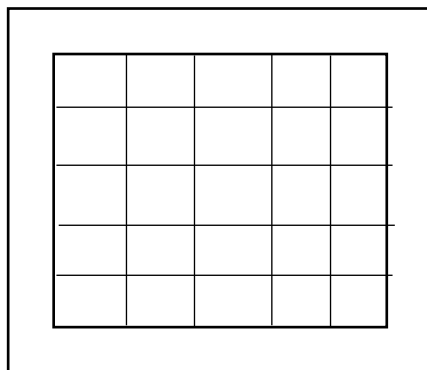


Figura 3. Arte reproduzindo o teste “campo aberto” de Hall (2000) A Caixa do Campo Aberto desenvolvido por Hall (2000) é utilizada por vários outros teóricos na área da ansiedade. Composta por uma arena quadrada, demarcada por vários quadrados no solo, a fim de visualizar a locomoção do animal, e a fuga do centro da arena (Reprodução Adaptada de Hall, 2000)

Ainda dentro do contexto farmacológico, o comportamento tange a substâncias correlatas ao uso cotidiano do ser humano, como açúcares, adoçantes e reforçadores de sabor, como a Sacarina e a Quinina (Terena-Rigaldie et al., 2003); e bebidas alcoólicas puras (Izídio & Ramos, 2007); e baseadas, como a cerveja (Gallate et al., 2003).

Assim como em humanos, estudos com animais no setor comportamental do consumo deve ser fortemente estudado, uma vez que se trata de um comportamento que possui causalidades e consequências inferenciáveis ao ser humano (Gallate, Morley, Ambermoon, & McGregor, 2003), como a associação do consumo de álcool com a agressividade e ansiedade em ratos (Almeida et al., 2001); (Almeida et al., 2004) e entre humanos (Almeida et al., 2009). Entende-se também que, normalmente, os modelos empregados nesses protocolos são compostos por duas linhagens contrastantes, selecionadas pela resposta dada a algum estímulo, a fim de simular padrões humanos (Izídio & Ramos, 2007).

Mesmo sendo em modelos animais, a significativa evidência literária quanto a associação entre consumo de alcoólicos e outras substâncias não se liga a aspectos conclusivos, apontando para resultados distintos através de diversos vieses: Apontamentos de relação positiva (Möller et al., 1997); (Izídio & Ramos, 2007); e negativa ou nula (Fernandez-Teruel, Driscoll, Gil, Aguilar, Tobeña, & Escorihuela, 2002); (G.E. Da Silva, 2004).

Neste contexto, enumera-se o grande número de constructos, a partir de modelos animais, sobretudo ratos e camundongos pela proximidade comportamental e cerebral destes com humanos na área correlata a ansiedade (Cruz & Landeira-Fernandez, 2012); (Gomes & Landeira-Fernandez, 2008); (Galvão, 2012); (Bezerra, 2017).

1.4

Ratos Cariocas de Alto e Baixo Congelamento

Como dito anteriormente, modelos animais são empregados para, de forma resumida, escalar e manipulável, simular variáveis do comportamento e fisiologia compatíveis a humanos. Com esta idéia, pesquisadores do Laboratório de Neuropsicologia Clínica e Experimental (LANEC) do Departamento de Psicologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-Rio), sob coordenação do Prof. Dr. J. Landeira-Fernandez desenvolvem, desde 1995, duas linhagens de ratos albinos WISTAR (*Rattus norvegicus*): os ratos “Cariocas”, como descreve Machado et al. (2017):

Com objetivo de criar um modelo animal de ansiedade que permitisse o estudo da patofisiologia da aprendizagem de medo, de forma a esclarecer os mecanismos por trás das diferenças individuais nas respostas de medo sustentado, foi criado, no laboratório de Neurociências da PUC-Rio, em 2006, um programa de seleção artificial bidirecional em ratos Wistar para criar uma linhagem mais e menos ansiosa. (Machado, Castro-Gomes, & Landeira-Fernandez, 2017)

A partir de uma matriz inicial ($S=0$) de 120 ratos Wistar, sendo 60 machos e 60 fêmeas, advindas do Biotério Central da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), iniciou-se um cruzamento sequencial e seletivo dos animais, seguindo os resultados da fenotipagem, a qual considera o congelamento, ou seja, o comportamento de imobilidade tensa de todo o movimento do animal, em atitude antecipatória a um perigo potencial, similar ao do ser humano, e que podemos denominar Resposta de Ansiedade.

O congelamento é um comportamento de defesa, que, nos ratos, foi um comportamento selecionado, segundo a teoria da evolução darwiniana, pela sua utilidade em dificultar sua localização frente a um predador, no qual a fuga ou luta não é viável, além de possivelmente apontar para uma melhor resposta a

algum estímulo – aliás, estes comportamentos compõem o mecanismo de defesa denominado de *3Fs*: *Fight, Fought, Freezing* (Luta, Fuga e Congelamento). – sendo analisado portanto, como mecanismo de ansiedade, uma vez que indica a espera de um perigo futuro.

Assim, houve o cruzamento entre aqueles que possuíam maiores índices de Resposta de Ansiedade, criando a linhagem Carioca de Alto Congelamento (CAC), e os de menores índices deste mesmo comportamento, gerando a linhagem Carioca de Baixo Congelamento (CBC) da geração 1 (S=1). Este método de cruzamento se repete desde então.

A fenotipagem, método científico para a seleção do fenótipo comportamental congelamento se dá pelo seguinte procedimento: Após o cruzamento entre ratos machos e fêmeas com o mesmo nível de resposta de ansiedade na caixa contexto, as ratas grávidas são separadas dos machos. Após o nascimento, os ratos filhotes são deixados em período de amamentação com suas mães, sendo evitado ao máximo a manipulação das gaiolas, a fim de evitar variáveis estressoras aos neo-natos. Os filhotes então são, na primeira a segunda semana, marcados com seu número de registro nas patas, cingindo-lhes os dedos correspondente ao número serial, bem como a qual linhagem o mesmo pertence, com uma marcação na orelha (CAC na direita e CBC na esquerda). São separados para desmame em 3 a 4 semanas de vida, sendo colocados em gaiolas de ... contendo de 5 a 7 animais por gaiola, constituindo uma primeira sociedade, ao qual podemos denominar de população da gaiola. Durante todo o tempo, com exceção do momento dos procedimentos etológicos de preparação e de fato, os ratos possuem água e comida disponível a vontade.

Na 4ª a 5ª semana de vida, o processo de Cepa em si se inicia. Durante 5 dias, os animais são manipulados, ou seja, um pesquisador do biotério coloca cada rato em sua mão, fazendo-lhes movimentos suaves, por 2 minutos cada animal, para que a variável de manipulação humana seja considerada menos estressora possível, e por isso, o procedimento é realizado sem o uso de luvas, para que o rato se acostume com o cheiro humano.

Do 6º dia, os manipulados são iniciados no modelo etológico de medo condicionado ao contexto, que consiste em uma caixa de acrílico transparente, com piso de gradeado metálico, dentro de outra caixa, acústica, para evitar estímulos externos, como sonoros, visuais e olfativos. A caixa de acrílico é visualizada através de uma câmera instalada dentro da caixa acústica. Antes de

cada sessão de testes, a caixa é limpa com uma solução de amônia, a fim de retirar odores sociais dos animais que estimulem comportamentos prévios.

Durante todo o experimento, um pesquisador treinado mede o comportamento de congelamento utilizando de uma folha de registro padrão. Assim, neste dia, o animal é colocado por 8 minutos nesta caixa, para comportamento de exploração do ambiente, sendo medido o congelamento durante o período pré-choque. Após este tempo, é emitido, a partir do piso gradeado em metal, 3 choques aleatórios durante o espaço de 1 minuto.

É de interesse e necessidade que este estímulo não cause dores ou sequelas, sendo portanto, um choque de intensidade 0,5 μ A, causando apenas um susto momentâneo e uma sensação de perigo. Em seguida, mede-se por mais 3 minutos o congelamento dos animais. Ao fim disto, o animal retorna para a sua caixa viveiro, com água e comida a vontade.

Vinte e quatro horas após o primeiro dia, ao qual se denomina de condicionamento ao contexto, os animais retornam a caixa por mais 8 minutos. Neste momento, nenhum estímulo elétrico é aplicado. Durante todo o tempo, o pesquisador treinado registra o congelamento do rato, o qual está associado ao medo à lembrança perigosa que ali teve, e portanto, a partir do nível de ansiedade do animal, este irá congelar mais ou menos, na expectativa de um perigo iminente, que seria, o choque.

Ao final deste tempo, os animais são demovidos novamente as suas caixas viveiro. Os dados coletados pela observação da resposta de ansiedade de cada rato no teste são quantificados e analisados quantitativamente, o que fornece ao pesquisador o desempenho total de cada animal com relação ao congelamento. A partir deste resultado, os animais com menor índice de congelamento dentro da linhagem CBC, são selecionados para o próximo cruzamento, bem como os de maior índice de cruzamento dentro da linhagem CAC são selecionados para o próximo cruzamento.

4 anos depois do estabelecimento das linhagens, surgiu a necessidade da criação de uma terceira linhagem que estabelecesse uma “não seleção” focal no congelamento, para que se formasse um padrão híbrido e equilibrado. Cria-se assim a linhagem Controle (CTR), a qual, no procedimento de Cepa, escolhem-se animais com padrão de congelamento variado e equilibrado. Assim, em diversos testes comportamentais etológicos, o desempenho da linhagem CTR

deve tender ao meio das outras duas linhagens, verificando e combatendo diversos vieses possíveis na manipulação dos Cariocas.

Atualmente, em 2019, os animais se encontram na geração S=33. Na geração s=14, Castro-Gomes e Landeira-Fernandez (2008) reproduziram a primeira linha temporal do desempenho das linhagens ao longo daqueles anos, mostrando o potencial afastamento da resposta demonstrada entre as linhagens. Já em 2017, os pesquisadores André Machado, Vitor Castro-Gomes e J. Landeira-Fernandez reproduziram a média mais atualizada de desempenho universal das três linhagens de ratos Cariocas de Ansiedade, na geração S=25, corroborando com a idéia de que a ansiedade é um comportamento ligado à genética hereditária do indivíduo.

Desde então, inúmeros estudos foram reproduzidos com a linhagem de ratos, obtendo diversas publicações e prêmios, uma vez que os Cariocas se apresentam como o único modelo animal de ansiedade do mundo pautado no método etológico de medo ao contexto, o qual alcançou seu objetivo principal de servir ao estudo da patofisiologia, dentre circuitarias neurais envolvidas da aprendizagem e respostas de medo (Machado, Castro-Gomes, & Landeira-Fernandez, 2017).

2 Objetivo Geral

O presente estudo tem como objetivo, a partir de protocolo adaptado de Izídio e Ramos(2007), observar a relação entre traços de Ansiedade a partir do modelo animal de ansiedade “Carioca”, e o consumo de substancias emulsificantes (Quinina e Sacarina) e Etanol (EtOH).

Assim, como objetivos específicos:

1. Observar se há diferença no consumo das substancias Sacarina, Quinina e Álcool Etílico diluído em água (Ethanol), em várias concentrações entre as linhagens Carioca de Alto Congelamento (CAC), Carioca de Baixo Congelamento (CBC) e Ratos Controle (CTR) (Machado, Castro-Gomes e Landeira-Fernandez, 2017);
2. Inferir se há ou não diferenças entre sexo do animal no consumo destas substâncias, considerando as linhagens acima citadas.
3. Comparar o desempenho dos animais na Caixa de Medo ao Contexto entre o antes e o depois do protocolo de consumo de álcool.

3

Métodos

3.1

Animais

O presente estudo incluiu 120 ratos Wistar (60 machos e 60 fêmeas) derivados das 30a e 31a gerações de criação seletiva de CAC (20 machos e 20 fêmeas) e CBC (20 machos e 20 fêmeas) de acordo com os procedimentos descritos anteriormente (Castro -Gomes e Landeira-Fernandez, 2008). Ratos não selecionados foram utilizados como grupo CTR (20 machos e 20 fêmeas) para as linhas de CAC e CBC. Todos os animais nasceram e foram mantidos na sala de colônias do Departamento de Psicologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, sob temperatura ambiente controlada ($24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) e um ciclo claro / escuro de 12 h / 12 h (acende das 7:00 às 19:00). Os ratos foram alojados em grupos de cinco a sete por gaiola de policarbonato (18 cm x 31 cm x 38 cm), de acordo com suas respectivas linhas com comida e água disponíveis *ad libitum*. O experimento foi conduzido durante a fase clara do ciclo claro / escuro. Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as diretrizes para pesquisa com animais experimentais estabelecidas pela Sociedade Brasileira de Neurociência e Comportamento e pelo Guia Nacional de Institutos de Saúde para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório. O manuseio dos animais e os métodos de sacrifício foram revisados e aprovados pelo Comitê de Cuidado e Uso de Animais da Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (protocolo nº 20/2009).

3.2

Condicionamento contextual ao medo

O condicionamento contextual do medo ocorreu simultaneamente em quatro câmaras de condicionamento (25 cm x 20 cm x 20 cm), cada uma dentro de uma caixa de atenuação de som iluminada por uma lâmpada vermelha (25 W) com um gerador de ruído branco de 76 dB. A câmara de condicionamento

possuía um piso de grade (15 hastes de aço inoxidável espaçadas a 1,5 cm) que foram conectadas a um gerador e embaralhador de choque elétrico (AVS SCR04, São Paulo, SP, Brasil). Cada animal foi tratado diariamente por 2 minutos, por cinco dias consecutivos antes do treinamento experimental. O procedimento de condicionamento contextual do medo foi realizado em dois dias consecutivos. No primeiro dia, os animais foram expostos à câmara de condicionamento por um período inicial de 8 minutos (período pré-choque). Imediatamente depois, eles foram expostos em intervalos fixos de 20 s a três passos elétricos inevitáveis (0,6 mA, 1 s), seguidos por um período adicional de 2 minutos (período pós-choque) sem qualquer estimulação aversiva. No final deste período, os animais foram devolvidos às suas gaiolas. No dia seguinte, os animais foram submetidos a 8 minutos (teste de sessão) no mesmo contexto experimental, mas nenhum pedal elétrico foi entregue durante a sessão. O comportamento de congelamento foi observado durante a sessão de teste e definido operacionalmente como a total ausência de movimentos, com exceção dos movimentos respiratórios. Este comportamento foi registrado por um observador treinado de acordo com um cronograma de amostragem temporal, no qual a presença ou ausência dessa postura foi registrada em intervalos de 2 s. Entre 1 e 2 semanas após o procedimento contextual de condicionamento do medo, cada animal foi colocado em uma gaiola individual para avaliar o consumo de álcool.

3.3

Procedimentos de consumo de sacarina, quinino e álcool

O protocolo utilizado no presente estudo para avaliar o consumo de álcool foi baseado em Izídio e Ramos (2007). Uma a duas semanas após o protocolo contextual de condicionamento do medo, cada animal foi colocado em uma gaiola individual e deixado habituar-se a ela por 2 dias, durante os quais apenas água estava disponível. Cada animal teve 2 dias de livre escolha (*Free-Choice*) entre uma solução de sacarina (7,5 mM) e água, seguido de 2 dias de livre escolha entre quinina (2 μ M) e água. Sacarina e quinina foram utilizados como substâncias de controle do sabor. Nos 2 dias seguintes, os animais foram expostos a uma escolha forçada de uma concentração de 10% de álcool que foi projetada para facilitar a aquisição da ingestão de álcool. Finalmente, durante os próximos 8 dias, todos os animais tiveram livre escolha entre álcool em quatro

concentrações (2%, 4%, 6% e 10%) e água. Cada concentração de álcool foi avaliada por 2 dias. Os volumes de sacarina, quinina e álcool foram medidos a cada 2 dias (às 10h). As garrafas que continham o fluido foram recarregadas e colocadas em posições diferentes na gaiola para evitar efeitos de posição. O peso corporal dos animais era registrado a cada dois dias. A água da torneira era usada sozinha ou para diluições de sacarina, quinina e álcool.

3.4

Drogas

As soluções de álcool (vol / vol) foram preparadas diluindo 95% de etanol P.A. (Sigma Aldrich Chemical Co, São Paulo, Brasil). A solução de sacarina (7,5 mM) foi preparada diluindo a sacarina de sódio (Sigma Aldrich Chemical Co, São Paulo, Brasil). A solução de quinino (2 μ M) foi preparada por diluição de sulfato de quinina (Sigma Aldrich Chemical Co, São Paulo, Brasil).

3.5

Análise estatística

Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média (SE). A análise de variância bidirecional (ANOVA) foi usada para analisar a porcentagem de tempo de congelamento durante a sessão de teste de condicionamento de medo contextual e para analisar a ingestão de sacarina, quinina e álcool de escolha forçada, com sexo (masculino e feminino) como um fator e linhagem de reprodução (CAC, CBC e CTR) como o outro fator. A ingestão de álcool de livre escolha, nas quatro concentrações de álcool, foi analisada por meio de medidas repetidas ANOVA, com sexo (masculino e feminino) e linhagem (CAC, CBC e CTR) como fatores entre os sujeitos, e concentração de álcool (2%, 4%, 6% e 10%) como o fator dentro dos sujeitos. Os efeitos significativos na ANOVA foram seguidos pelo teste *post hoc* de Diferença Menos Significativa de Fisher (LSD) para avaliar diferenças específicas de grupo. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

4 Resultados

A Figura 1 apresenta a porcentagem de congelamento durante o período de pré-choque (painel superior - a), período pós-choque (painel do meio - b) e sessão de teste (painel inferior - c). A ANOVA bidirecional entre os grupos no período pré-choque indicou ausência de interação bidirecional ($F(2,114) = 1,22$; $p > 0,3$). Foi observado efeito principal do sexo ($F(1,114) = 3,98$; $p < 0,05$) e linhagem ($F(2,114) = 3,37$; $p < 0,05$). Comparações *post hoc* pareadas indicaram que ratos machos CAC e CBC expressaram mais comportamento de congelamento do que ratas fêmeas CAC e CBC (todos os valores de $p < 0,05$). Além disso, os animais machos e fêmeas CAC exibiram maior resposta de congelamento quando comparados, respectivamente, aos animais machos e fêmeas CBC (todos os valores de $p < 0,05$). A ANOVA de duas vias entre os grupos durante o pós-choque não encontrou interação em análise de duas vias ($F(2,114) = 0,24$; $p > 0,7$) ou um efeito principal do sexo ($F(1,114) = 1,22$; $p > 0,3$). Houve porém um efeito confiável a partir da variável linhagem ($F(2,114) = 35,1$; $p < 0,05$). As comparações pareadas indicaram que os animais machos e fêmeas CAC e CTR apresentaram maior comportamento de congelamento quando comparados aos ratos machos e fêmeas CBC (todos os valores de $p < 0,05$).

Por fim, a ANOVA bidirecional da resposta defensiva ao congelamento durante a sessão de teste não mostrou interação sexo / linha de reprodução ($F(2,114) = 0,41$, $p > 0,6$), mas efeitos principais significativos do sexo ($F(1,114) = 20,10$, $p < 0,001$) e linhagem ($F(2,114) = 63,49$, $p < 0,001$). As análises *post hoc* indicaram que ratos machos congelaram mais do que fêmeas em todos os três níveis do fator de linhagem (todos os valores de $p < 0,05$). A linhagem CAC expressou a maior quantidade de congelamento condicionado, e a linhagem CBC expressou a menor quantidade de congelamento. A linhagem CTL expressou uma quantidade intermediária de congelamento (todos os valores de $p < 0,05$).

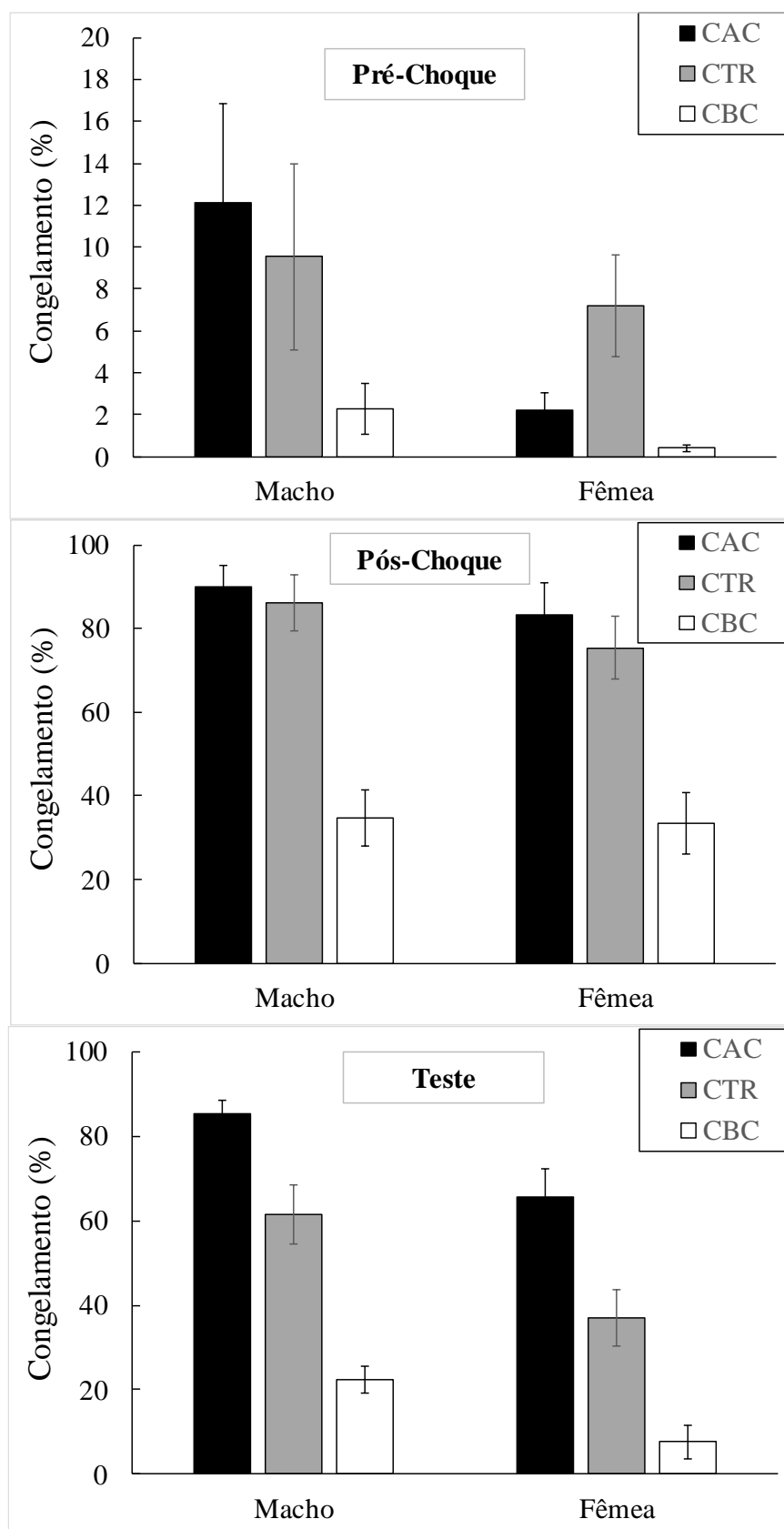


Figura 4. Média \pm SE porcentagem de tempo gasto com congelamento entre ratos machos e fêmeas das linhagens de alto congelamento (CAC), controle (CTR) e baixo (CBC congelamento durante as sessões de pré choque, pós choque e teste.

Para avaliar se as diferenças na resposta de congelamento defensivo, durante a sessão de teste, foram associadas a diferenças nos períodos pré e pós-choque, realizamos uma ANCOVA adicional usando esses parâmetros como co-variáveis. Os resultados desta análise confirmaram a ausência de interação ($F(2,114) = 0,21$, $p > 0,8$) e os principais efeitos do sexo ($F(1,114) = 18,43$; $p < 0,001$) e linhagem ($F(2,114) = 25,48$; $p < 0,001$).

Já na figura 2 retrata o consumo de sacarina e quinina, oferecido de forma livre com água, e de etanol forçado entre ratos machos e fêmeas das linhas CAC, CTR e CBC. A ANOVA de duas vias do consumo de sacarina indicaram uma interação bidirecional ($F(2,114) = 23,85$; $p < 0,001$) e um efeito principal da linhagem ($F(2,114) = 134,45$; $p < 0,001$), mas nenhum efeito principal do sexo ($F(1,114) = 0,22$; $p > 0,6$). A comparação pareada revelou que, entre os ratos machos, a linhagemCAC teve o menor consumo de sacarina, e a linhagemCTR teve o maior consumo, enquanto a linhagemCBC apresentou níveis intermediários de consumo de sacarina (todos os valores de $p < 0,05$). Já as ratas fêmeas chegaram a um perfil ligeiramente diferente: linhagemCAC apresentou o menor consumo e a linhagemCBC a mais alta, enquanto a linhagemCTR apresentou níveis intermediários de consumo de sacarina (todos os valores de $p < 0,05$).

A ANOVA bidirecional do consumo de quinina não encontrou uma interação bidirecional ($F(2,114) = 0,32$; $p > 0,7$) e nenhum efeito principal da linhagem ($F(2,114) = 2,71$; $p > 0,05$), mas detectou um efeito principal estatisticamente significativo do sexo ($F(1,114) = 40,70$; $p < 0,001$). Comparações pareadas indicaram que ratas fêmeas consumiram mais quinina que ratos machos nos três níveis dos fatores da linha de reprodução (todos os valores de $p < 0,05$). Finalmente, a ANOVA bidirecional do consumo forçado de etanol mostrou uma interação bidirecional ($F(2,114) = 12,80$; $p < 0,001$), bem como um efeito principal do sexo ($F(1,114) = 77,10$; $p < 0,001$) e efeito de linhagem ($F(2,114) = 38,45$; $p < 0,001$). Análises *post hoc* indicaram que ratas fêmeas consumiram mais etanol do que ratos machos nos três níveis dos fatores da linha de reprodução (todos os valores de $p < 0,05$). Além disso, ratos machos CAC e CLT consumiram mais etanol que ratos machos CBC. As ratas CAC apresentaram o maior consumo de etanol, e a linhagemCBC apresentou o menor consumo, enquanto a linhagemCTR apresentou níveis intermediários de consumo de etanol (todos os valores de $p < 0,05$).

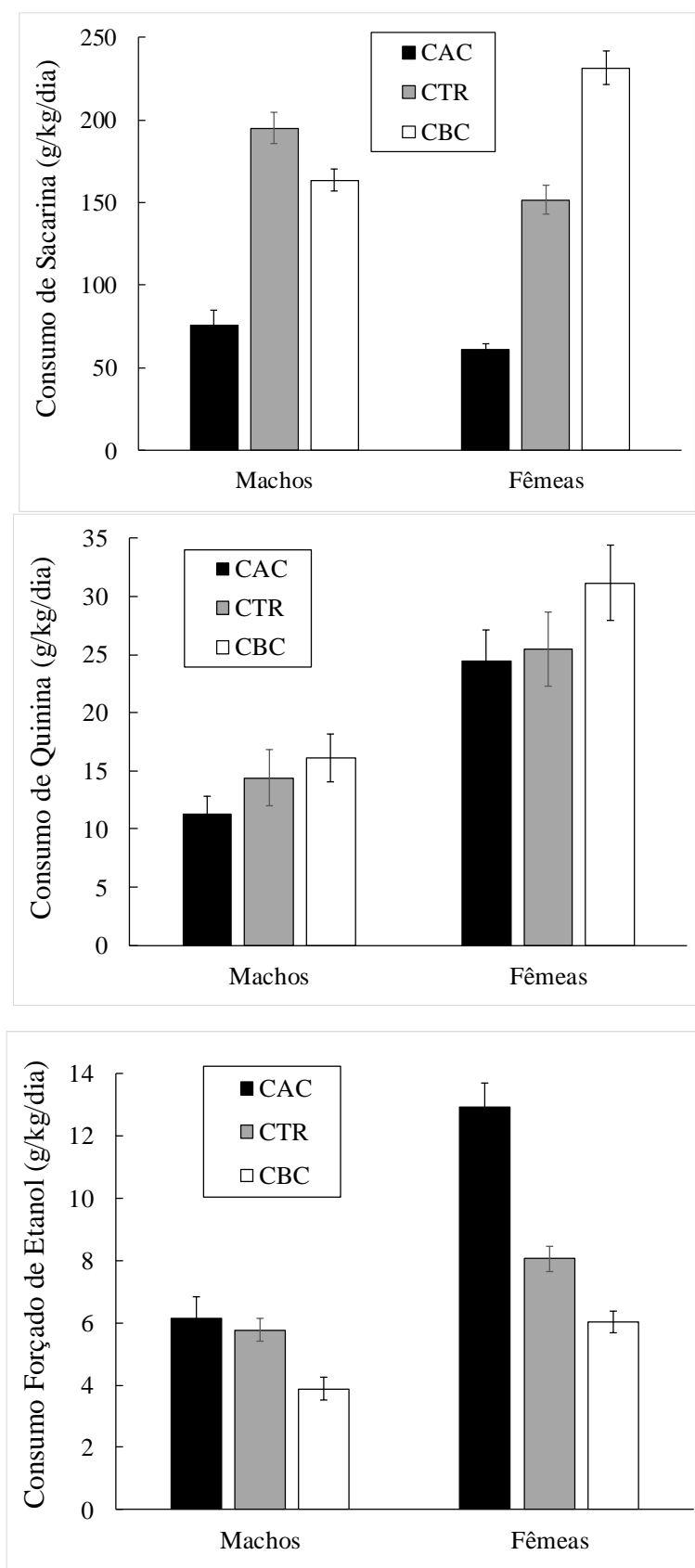


Figura 5. Média \pm SE consumo de SEM de sacarina 7,5 mM (gráfico superior), quinino 2,0 μ M (gráfico central) e 10% de etanol forçado (gráfico inferior) entre ratos machos e fêmeas de alto congelamento (CAC), controle (CTR) e baixo (CBC) congelamento.

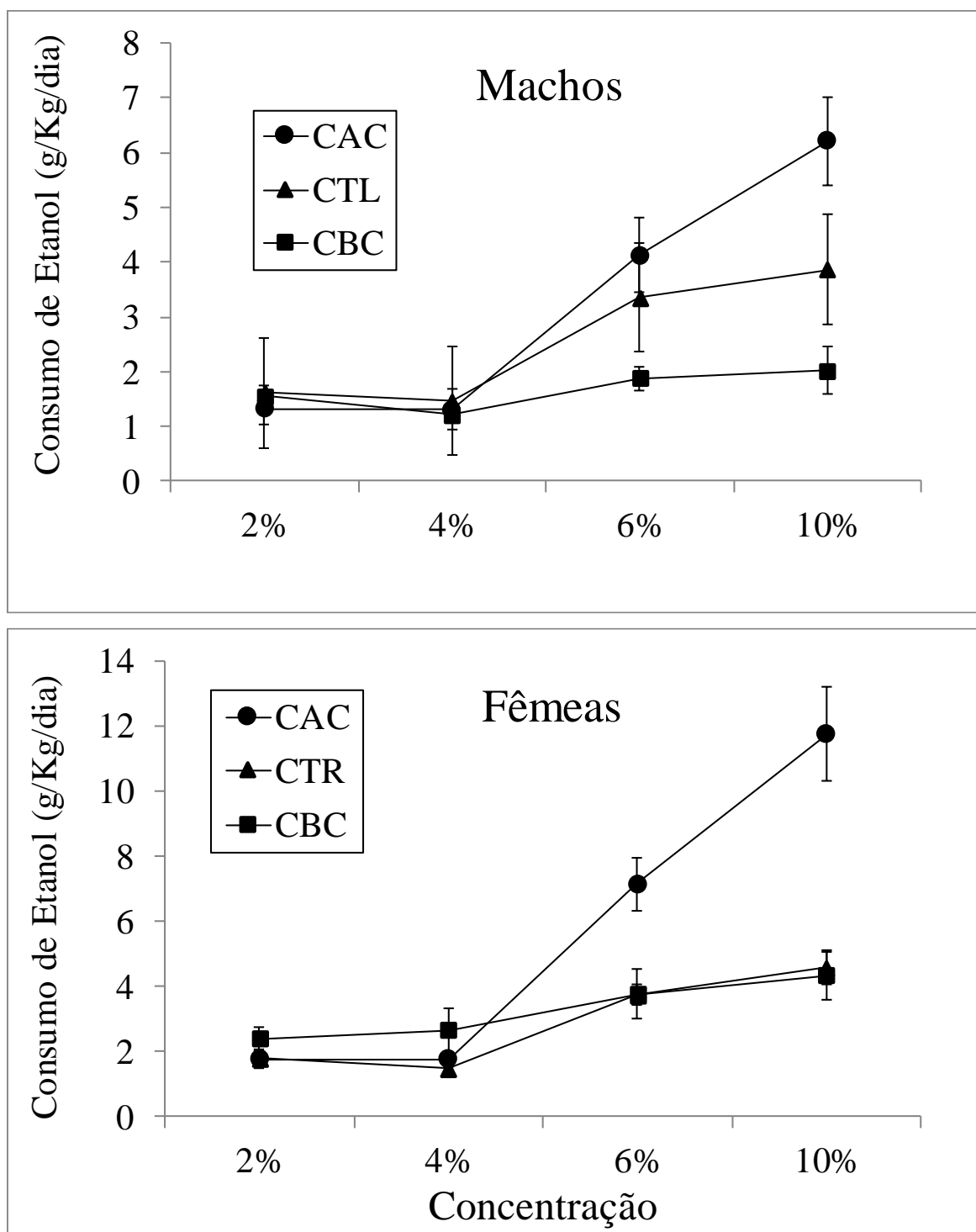


Figura 6. Média \pm SE consumo de etanol em concentrações de 2%, 4%, 6% e 10% entre ratos machos (gráfico superior) e fêmeas (gráfico inferior) dos ratos alto (CAC), controle (CTR) e baixo congelamento (CBC).

O consumo de etanol de escolha livre nas quatro concentrações foi analisado por meio de uma análise repetida a partir de ANOVA de três vias. Essa análise indicou que a interação de três vias foi significativa ($F(2,114) = 6.42$; $p < 0,001$), assim como as três interações de duas vias: concentração de etanol e sexo ($F(2,114) = 18,23$; $p < 0,001$); concentração de etanol e linhagem ($F(2,114) =$

47,23; $p < 0,001$); e sexo e linhagem ($F (2.114) = 3,33$; $p < 0,01$). Finalmente, todos os três efeitos principais também foram estatisticamente significativos; concentração de etanol ($F (2.114) = 197,53$; $p < 0,001$); sexo ($F (2.114) = 19,23$; $p < 0,001$); e linhagem: ($F (2.114) = 13,88$; $p < 0,001$). Assim, a Figura 3 apresenta os resultados do consumo de etanol separadamente para ratos machos (gráfico superior) e fêmeas (gráfico inferior) das três linhagens de reprodução nas concentrações de 2%, 4%, 6% e 10% de etanol.

5 Discussão

Esse estudo tem como principal objetivo entender se há alguma correlação entre os traços de ansiedade, previamente estudados, dos ratos Cariocas de alta e baixa resposta de ansiedade (Machado, Castro-Gomes, & Landeira-Fernandez, 2017), com o protocolo de consumo alcoólico proposto por Izídio e Ramos, em 2007.

Os resultados contextuais do condicionamento ao medo confirmaram que os ratos CAC, CTR e CBC exibiram diferentes níveis de comportamento de congelamento defensivo, induzidos por estímulos contextuais previamente associados ao suporte de pés (Castro-Gomes et al., 2011). Os ratos CAC tiveram um fenótipo "ansioso" mais alto e os ratos CBC tiveram um fenótipo "ansioso" mais baixo em comparação com os ratos CTR. Como esperado, ratos machos exibiram consistentemente mais congelamento condicionado do que fêmeas nas três linhagens (CAC, CBC e CTR; Castro-Gomes e Landeira-Fernandez, 2008; Castro-Gomes et al., 2011).

O principal resultado do presente estudo foi que ratos machos e fêmeas CAC consumiram mais álcool do que ratos CBC nas concentrações de 6% e 10% de álcool, no teste de livre escolha, e consumiram mais álcool na concentração de 10% no teste de escolha forçada. Ratos fêmeas CAC exibiram a maior quantidade de ingestão de álcool nessas três condições, em comparação com ratos machos CAC. Esses resultados revelaram uma associação importante entre alto consumo de álcool e alta "ansiedade característica" na linhagem CAC. Esse achado é consistente com estudos anteriores, que também encontraram alta ingestão de álcool em ratos criados para comportamento de alta ansiedade em campo aberto (Izídio e Ramos, 2007; Brewster, 1969; Drewek e Broadhurst, 1979). No entanto, também foram relatados resultados na direção oposta entre os animais criados para aprender uma resposta bidirecional de evasão a um estímulo auditivo discreto (Fernández-Teruel et al., 2002; Manzo et al., 2012; Manzo et al., 2014; Razafimanalina et al., 1996).

Um estudo recente do nosso grupo constatou que, embora os ratos CAC, CTR e CBC tenham diferenças claras no condicionamento aversivo contextual, eles expressaram a mesma quantidade de condicionamento do medo em resposta a um estímulo auditivo discreto (Macêdo-Souza et al., 2020). Esses resultados sugerem que a ansiedade (ou seja, congelamento defensivo em resposta a pistas contextuais associadas ao choque) e o medo (ou seja, um estímulo discreto associado ao choque) podem ser mediados por diferentes processos comportamentais, corroborando a visão de que a ansiedade, a detrimento do medo, tem uma relação positiva com a ingestão de álcool (Moberg e Curtin, 2009).

Os resultados apresentados também são consistentes com estudos anteriores que mostraram que a ingestão de álcool foi maior em ratos fêmeas do que em ratos machos (Almeida et al., 1998; Cailhol e Mormède, 2002; Izídio e Ramos, 2007; Lancaster e Spiegel, 1992; Randall et al., 2017). No entanto, esse achado sugere que a associação positiva entre ansiedade e consumo de álcool pode ser mais complexa, na qual as ratas que consumiram mais álcool também exibiram um fenótipo "ansioso" menor em comparação a ratos do sexo masculino. Os fatores hormonais provavelmente desempenham um papel importante nos mecanismos que subjacente à diferença sexual na ingestão de álcool (Almeida et al., 1998; Cailhol e Mormède, 2002; Priddy et al., 2017). O estrogênio e a progesterona exercem efeitos reguladores no sistema de dopamina mesocorticolímbica (Koob, 1992). Os circuitos dopaminérgicos desempenham um papel importante nos efeitos gratificantes do álcool (Di Chiara e Imperato, 1988; Weiss e Porrino, 2002). A maior ingestão de álcool, em ratos fêmeas, pode ser atribuída a efeitos hormonais nos circuitos neurais relacionados à recompensa, sendo esta uma variável importante nas diferenças entre os sexos no consumo de álcool (Becker e Koob, 2016). As fêmeas são mais sociais e os homens são mais territoriais e assim, a moradia individual utilizada no presente estudo pode ser mais estressante para as fêmeas do que para os machos, o que pode ter contribuído para o maior consumo de álcool em ratos fêmeas.

Além das diferenças entre os sexos na ingestão de álcool, o presente estudo também constatou que as fêmeas consumiram mais quinina que os machos. Os resultados na literatura sobre diferenças de sexo na resposta à quinina têm sido altamente inconsistentes. Estudos anteriores indicaram que as ratas fêmeas são menos diferentes (Clarke e Ossenkopp 1998), mais diferentes

(Nance, 1976) ou não diferentes (Wade e Zucker, 1970) dos ratos machos em relação à ingestão de quinina. O estágio do ciclo estral parece modular a sensibilidade à quinina em ratos fêmeas (Clarke e Ossenkopp, 1998). Embora a fase do ciclo estral feminino não tenha sido monitorada no presente estudo, descobrimos que as fêmeas de CAC exibiram maior consumo de quinina e álcool, o que corrobora a constatação de que o consumo de quinina pode ser um preditor confiável do consumo de álcool (Goodwin e Amit, 2000) .

Os ratos CAC exibiram menor consumo de sacarina em comparação com os ratos CBC e CTR. Os resultados de estudos anteriores que usaram linhagens de ratos selecionados bidirecionalmente, para padrões opostos de comportamento defensivo, também foram inconclusivos. Além disso, alguns trabalhos indicaram que ratos criados com baixo comportamento de esquiva exibiram baixo consumo de sacarina (Fernández-Teruel et al., 2002; Razafimanalina et al., 1996), muito embora, esses resultados dêem suporte a possibilidade de que um comportamento semelhante ao da ansiedade esteja associado à baixa ingestão de sacarina.

6 Conclusão

O Rato Carioca tem sido desenvolvido a partir de uma perspectiva do modelo de medo condicionado ao contexto, o que o faz ser o único modelo animal de ansiedade do tipo em todo o mundo. Com isso, abre-se possibilidade para que diversos protocolos possam ser utilizados, emparelhando variáveis com a Ansiedade.(Bezerra-Karounis & Landeira-Fernandez, 2017)

Este foi o caso do presente estudo, no qual, tentou-se entender se há alguma relação de causalidade, ao se utilizar o método experimental, e, objetivo este que foi alcançado, ao denotar que há influência do traço de ansiedade no consumo, ao verificar que quão maior a resposta de congelamento, maior o consumo de substâncias com maior potencial alcoólico.

O resultado apontado, no qual o personagem mais ansioso procura uma substância de possível alteração comportamental, pode ser emparelhado a uma perspectiva similar a Teoria de Redução de Tensão (TRT)(Conger, 1956), o que, concorrente ao modelo humano, poderia explicar de forma modular, um gatilho comportamental compulsivo de consumo de substância alcoólica.

Assim, este trabalho visa explicitar, de forma básica, tecnologia para entendimento do comportamento ansioso em suas comorbidades, inferindo que há relação positiva entre consumo alcoólico e traços comportamentais de ansiedade, corroborando com a literatura(Izídio & Ramos, 2007).

Ainda, em conjunto a isto, complementa-se a referência bibliográfica quanto ao desempenho dos ratos Cariocas de Alto e Baixo Congelamento, apontando que a referência proposta por Machado e colegas permanece recorrente até a geração S=31, apresentando o desempenho condizente ao efeito demonstrado em suas análises (Machado, Castro-Gomes, & Landeira-Fernandez, 2017)

No total, o presente estudo constatou que os ratos CAC consumiam significativamente mais álcool que os ratosCBC, corroborando assim uma relação positiva entre ansiedade e ingestão de álcool. As linhagens reprodutivas Cariocas foram desenvolvidas para comportamento defensivo, de níveis alto e baixo, de resposta a pistas contextuais difusas associadas a choque nas patas, mas não em resposta a um estímulo de perigo bem definido. Os resultados indicam que a ansiedade, mas não o medo, está associada ao consumo de álcool. O presente estudo também indicou que o sexo é um fator importante nos estudos de comportamento semelhante ao da ansiedade e do consumo de álcool e quinina. Mais estudos são necessários para elucidar a relação entre ansiedade e consumo de sacarina

Dentro do desafio de criar um resultado simbiote ao contexto humano, o uso de substância alcoólica pode não ser totalmente aparelhável, uma vez que não é habitual o uso recreativo de EtOH puro. Portanto, como recomendação a futuros trabalhos, dentro do referido, seria fundamental observar a possibilidade de empregar substâncias alcoólicas de comum uso humano, atentando-se a possíveis vieses calóricos dessas bebidas (Bezerra-Karounis et al., 2019)

Por fim, nossos estudos atuais e anteriores sugerem que as linhagens de criação de CAC e CBC podem ser um modelo animal útil para estudar a ansiedade e a ingestão de álcool.

7

Bibliografia

- A.F.A. (2013). *Advocacy for Animals*. Retrieved jan 06, 2020, from http://advocacy.britannica.com/blog/advocacy/rodent_122723998_shutterstock-2/
- Allan, C. A. (1995, march 1). Alcohol problems and anxiety disorders - A critical Review. **Alcohol and Alcoholism**, 30 (2), pp. 145-151.
- Almeida, R. M., Faccidomo, E. M., Fish, E. W., & Miczek, K. A. (2001). Zolmitriptan – a 5-HT_{1B/D} agonist, alcohol, and aggression in mice. **Psychopharmacology**, 157 (2), pp. 131-141.
- Almeida, R. M., Pasa, G. G., & Scheffer, M. (2009). Álcool e Violência em Homens e Mulheres. **Psicologia: Revisão e Crítica**, 22 (2), pp. 252-260.
- Amaral, V. C., Gomes, K. S., & Nunes-de-Souza, R. L. (2010). Increased corticosterone levels in mice subjected to the rat exposure test. **Hormones and Behavior**, 128-133.
- American Medical Association. (1988). **The use of animals in Biomedical Research: The challenge and the Response**. Washington D.C.: American Medical Association.
- American Psychiatric Association. (2013). **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders:DSM-V** (Vol. 5). Washington DC: American Psychiatric Association.
- Anagnostaras, S. G., & Craske, M. G. (1999). Anxiety: at the intersection of genes and experience. **Nature neuroscience**, 2 (9), 780-782.
- Andrade, L. H., & Gorenstein, C. (1998). Aspectos Gerais das escalas de avaliação de ansiedade. **Revista de Psiquiatria Clínica**, 285-290.
- Andreatini, R., Berngen-Lacerda, R., & Filho, D. Z. (2001). Tratamento farmacológico do transtorno de ansiedade generalizada: Perspectivas futuras. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, 233-242.

- Armonia, P. L., Tortamano, N., Cabral, T. R., & Júnio, G. S. (2001). Ansiedade e medo - terapêutica medicamentosa. **Revista Odontológica da Universidade de Santo Amaro**, 6, 31-31.
- Batista, M. A., & Sisto, F. F. (2005). A Study of an anxiety scale for adolescents. **Estud. Psicol. (campinas)**, 22 (4), 347-354.
- Beck, A. T., Brown, G., Epstein, N., & Steer, R. A. (1988). An Inventory for measuring clinical anxiety: Psychometric properties. **Journal of consulting and Clinical Psychology**, 893-897.
- Bernard, C. (1949). **An Introduction to the Study of Experimental Medicine**. Paris: Henry Schuman, INC.
- Bezerra-Karounis, M. A. (2017). *Modelos Animais de Ansiedade no Método Etológico*. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Psicologia. Rio de Janeiro: Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.
- Bezerra-Karounis, M. A., & Landeira-Fernandez, J. (2017). EFEITOS DO (PhSe)₂ NA RESPOSTA DE CONGELAMENTO EM ANIMAIS DE ALTO E BAIXO NÍVEL DE ANSIEDADE. **Anal do XIX Seminário de Iniciação Científica da PUC-Rio**, 20-22.
- Blanchard, R. J., & Blanchard, D. C. (1990). An ethoexperimental analysis of defense, fear and anxiety. In N. McNaughton, & G. Andrews, **Anxiety** (pp. 124-133). Dunedin: University of Otago Press.
- Blaser, R. e., Chadwick, L., & McGinnis, G. C. (2010). Behavioral measures of anxiety in zebrafish (Danio Rerio). **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 56-62.
- Brady, K. T., & Lydiard, R. B. (1993). The association of alcoholism and anxiety. **Psychiatric Quarterly**, pp. 135-49.
- Brown, S. A., & Schuckit, M. (1988). Changes in depression among abstinent alcoholics. **Journal of Studies on Alcohol**, 49 (5), pp. 412-417.
- Cappell, H., & Herman, C. P. (1972). Alcohol and tension reduction: a Review. **Quarterly Journal of Studies on Alcohol**, pp. 33-64.
- Carpenito, L. J. (1997). **Diagnóstico de Enfermagem: Aplicação à Prática Clínica**. Porto Alegre: Arte Médica.
- Carvalho, M. G., Ferreira, G. F., Saviano, M. d., Silva, F. M., Couto, K. C., Alves, S. H., et al. (2012, abril). Envolvimento de receptores 5-HT_{2C} do hipocampo ventral em comportamentos de defesa de ratos no labirinto em cruz elevado. **Estudos de Psicologia**, 145-151.

Cavaliere, D. R., Cruz, A. P., & Landeira-Fernandez, J. (2017). Efeitos de um benzodiazepínico no labirinto em cruz elevado em linhagens de ratos com traços altos ou baixos de ansiedade,. **Dissertação de Mestrado** .

Cavaliere, D. R., Landeira-Fernandez, J., & Cruz, A. P. (2017). **Efeitos de um benzodiazepínico no labirinto em cruz elevado em linhagens de ratos com traços altos ou baixos de ansiedade**,. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Departamento de Psicologia. Rio de Janeiro: Puc-Rio.

Chang, J.-S., You, Y.-H., Park, S.-Y., Kim, J.-W., Kim, H.-S., Yoon, K.-H., et al. (2013). Pattern of Stress-Induced Hyperglycemia according to Type of Diabetes: A Predator Stress Model. **Diabetes & Metabolism Journal** , 475-483.

Clark, D. B., Turner, S. M., Beidel, D., Donovan, J. E., Kirisci, L., & Jacob, R. G. (1994). Reliability and validity of the Social Phobia and Anxiety Inventory in adolescents. **Psychological Assessment**, 135-140.

Conger, J. J. (1956). Reinforcement theory and the dynamics of alcoholism. **Quarterly Journal of Studies on Alcohol** , pp. 296-305.

Cook, M. N., Williams, R. W., & Flaherty, L. (2001). Anxiety-related behaviors in the elevated zero-maze are affected by genetic factors and retinal degeneration. **Behavioural Neuroscience** , 468.

Copi, I., & Cohen, C. (1990). **Introduction to logic**(8 ed.). Nova York: Macmillan Publishing Company.

Cruz, A. P., & Landeira-Fernandez, J. (2012). Modelos animais de ansiedade e o estudo experimental de drogas serotoninérgicas. **Métodos em Neurociência** , 192-217.

DeGrazia, D., & Rowan, A. (1991). Pain, suffering, and anxiety in animals and humans. **Theor Med Bioeth**, 12, 193-211.

Ekman, P. (2004). Emotional and Conversational Nonverbal Signals. **Philosophical Studies Series**, 99, 39-50.

Fendt, M., & Fanselow, M. (1999). The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. **Neuroscience Biobehavior**, 23, 743-60.

Fernandez-Teruel, A., Driscoll, P., Gil, L., Aguilar, R., Tobeña, A., & Escorihuela, R. (2002). **Enduring effects of environmental enrichment on novelty seeking saccharin and ethanol intake in two rat lines (RHA/Verh and RLA/Verh) Differing in incentive-seeking behavior**. 73 (1), 225-231.

Ferro, T. M., Bezerra-Karounis, M. A., & Landeira-Fernandez, J. (2018). Ansiedade, Memória e Alcool:Modelo de Beer-Drinking em Ratos Cariocas de Alta e Baixa Resposta de Ansiedade. **XXVI Seminário de Iniciação Científica e Tecnológica da Puc-Rio**. Rio de Janeiro: PIBIC/PUC-Rio.

- Freud, S. (1933). New Lectures on psychoanalysis. Em S. Freud, **Standard Edition** (Vol. 22, pp. 3-182). Londres: Hogart Press.
- G.E. Da Silva, A. R. (2004, october). Comparison of voluntary ethanol intake by two pairs of rat lines used as genetic models of anxiety. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 37 (10), pp. 1511-1517.
- Gallate, J. E., Morley, K. C., Ambermoon, P., & McGregor, I. S. (2003). The consequences of beer consumption in rats: acute anxiolytic and ataxic effects and withdrawal-induced anxiety. **psychopharmacology**, 166, pp. 51-60.
- Galvão, B. d. (2012). **Efeito da Estimulação Elétrica da MCPD em comportamento de Defesa: Participação do Córtex Cingulado Anterior Rostral e nas linhagens Carioca Alto e Baixo Congelamento**. Centro de Teologia e Ciencias Humanas da PUC-Rio, Departamento de Psicologia. Rio de Janeiro: Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.
- Garbutt, J. C. (2009). The state of pharmacotherapy for the treatment of alcohol dependence. **J. substance Abuse Treatment** , pp. s15-s23.
- Gehres, S. W., & Almeida, R. M. (2013, Outubro). O desenvolvimento de agressividade em ratos Wistar machos: um estudo de caso. **Anal do XXV Salão de Iniciação Científica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, 25.
- Gehres, S. W., & Almeida, R. M. (2013). O desenvolvimento de agressividade em ratos Wistar machos: um estudo de caso. **Resumo para XXV salão de Iniciação Científica UFRGS**, 21-25.
- Gomes, V. d., & Landeira-Fernandez, J. (2008, outubro). Amygdaloid lesions produced similar contextual fear conditioning disruption in the Carioca high- and low-conditioned freezing rats. **Brain Research** , 137-145.
- Greist, J. H. (2013). Trantorno de Ansiedade Generalizado. **Manual MSD - Merck & Co Inc**, 1-3.
- Griebel, G. (1995, mairço). 5-Hydroxytryptamine-interacting drugs in animal models of anxiety disorders: More than 30 years of research. **Pharmacology and Therapeutics** , 319-395.
- Hall, F. S., Huang, S., Fong, G. W., Sundstorm, J. M., & Pert, A. (2000). Differential basis of strain and rearing effects on open-field behavior in Fawn Hooded and Wistar rats. **Physiology & Behavior**, 71 (5), 525-32.
- Headache Classification Subcomitte of the International Headeache Society. (2004). **The International Classification of Headache Disorders**. Cephalagia.
- Hogg, S. (1996, maio 1996). A review of the validity and variability of the Elevated Plus-Maze as -an animal model of anxiety. **Pharmacology Biochemistry and Behavior** , 21-30.

- Horney, K. (1945). *Our Inner Conflicts*. Nova York: Norton.
- Izídio, G. S., & Ramos, A. (2007). Positive association between ethanol consumption and anxiety-related behaviors in two selected rat lines. **Alcohol** , pp. 517-524.
- J.Bickerdike, M., A.Marsden, C., T.Dourish, C., & AllanFletcher. (1994). The influence of 5-hydroxytryptamine re-uptake blockade on CCK receptor antagonist effects in the rat elevated zero-maze. **European Journal of Pharmacology** , 403-411.
- Júnio, A. P., Graef, F. G., & Landeira-Fernandez, J. (1997, Setembro). Modelos de Animais de Ansiedade: implicações para a seleção de drogas ansiolíticas. **Psicologia: Teoria e Pesquisa** , 269-278.
- Keedwell, P., & Snaith, R. (1996, Março). What do anxiety scales measure. **Acta Pshychiatra Scandinavica** , 177-180.
- Kendler, K. S., Walters, E. E., Neale, M., Kessler, R. C., Heath, A., & Eaves, L. J. (1995, may). The structure of the genetic and environmental risk factors for six major psychiatric disorders in women. Phobia, generalized anxiety disorder, panic disorder, bulimia, major depression, and alcoholism. **Arch Gen Psychiatry** , pp. 374-83.
- Kushner, M. G., Sher, K. J., Wood, M., & Wood, P. K. (1994, august). Anxiety and Drinking Behavior: Moderating Effects of Tension-Reduction Alcohol Outcome Expectancies. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, 18 (4).
- LaFollette, H., & Shanks, N. (1994). Animal Experimentation: The Legacy of Claude Bernard. **International Studies in the Philosophy of Science**, 195-210.
- LaFollette, H., & Shanks, N. (1993). Animal Models in Biomedical Research: Some Epistemologica Worries. **Public Affairs Quarterly**, 7, 113-130.
- Landeira-fernandez, J. (2004, outubro). Analisis of the cold-water restraint procedure in gastric ulceration and body temperature. **Physiology and Behavior** , 827-833.
- Laranjeira, R. (2001). Abuso e dependência de álcool: diagnóstico e tratamento farmacológico. In G. Focchi, M. Leite, R. Laranjeira, & A. G. Andrade, **Dependência Química: novos modelos de tratamento** (1 ed., pp. 1-18). São Paulo: Roca.
- Laranjeira, R., Pinsky, I., Zaleski, M., & Caetano, R. (2007). **I Levantamento nacional sobre os padrões de consumo de álcool na população brasileira**. SENAD, Brasília.

M. A. M. Bezerra-Karounis, T. E.-F. (2019). MODELO DE CONSUMO DE CERVEJA EM RATOS CARIOCAS DE ALTA E BAIXA RESPOSTA DE ANSIEDADE. **III Reunião Anual do INCog/ PUC-Rio** .

Machado, A. S., Castro-Gomes, V., & Landeira-Fernandez, J. (2017). Avaliação da resposta de congelamento e estrutura fatorial do protocolo empregado para a criação seletiva das linhagens de ratos Cariocas alto e baixo congelamento condicionado. **Dissertação de Mestrado - Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro** , pp. 4-82.

Maisonette, S. S. (1997). *Conexões Anatomo-Funcionais Relevantes no Comportamento Defensivo Induzido por Estimulação Elétrica do Colículo Inferior de Ratos*. **Tese de Doutorado**. USP, Riberão Preto.

Möller, C., Wiklund, L., Sommer, W., A, T., & M.Heilig. (1997). Decreased experimental anxiety and voluntary ethanol consumption in rats following central but not basolateral amygdala lesions. *760* (1-2), pp. 94-101.

Nutt, D. J., & Malizia, A. L. (2004). Structural and functional brain changes in posttraumatic stress disorder. **J Clin Psychiatry** , 11-17.

Papadimitriou, G., & Linkowski, P. (2005). Sleep disturbance in anxiety disorders. **Int Rev. Psychiatry** , 229-236.

Patton, W. (1993). **Mouse and Man**. Oxford: The University Press.

Pavlov, I. P. (1927). *COnditioned reflexes: an investigation of the psychological activity of the cerebral cortex*. nova york: Dover Publications.

Peregrino, A. (1996). A Ansiedade Normal e Patológica. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, 45, 129-134.

Pimentel, J. (2013). *II Levantamento Nacional de Álcool e Drogas mostra o consumo de álcool crescente e desigual pela população brasileira*. **LENAD**, Brasília.

Pinel, J., & Treit, D. (1978). Burying as a defensive response in rats. **Physiology and Psychology**, 708-712.

Ramiro, J. C. (2017). *Modelos Animais de Ansiedade - Resumo*. São Carlos: Passei Direto.

Rapee, R. M., & Heimberg, R. G. (1997). A cognitive-behavioral model of anxiety in social phobia. **Behavior Research and Therapy**, 35 (8), 741-756.

Russell, W., & Burch, R. (1958). **The Principles of Humane Experimental Technique**. Bloomberg: Bloomberg Schol of Public Health.

Santos, L. (2012). *Aula sobre behaviorismo*. acesso em 06/jan/2020, visto em **Leilesantos:leilesantos.wordpress.com**

- Schuckit, M. A. (1996). Alcohol, Anxiety and Depressive Disorders. **Alcohol, Health & Research World** , pp. 81-85.
- Schuckit, M., & Hesselbrock, V. (1994). Alcohol dependence and anxiety disorders: What is the relationship. **American Journal of Psychiatry**, 151 (52), pp. 1723-1734.
- Schultz, D. P., & Schultz, S. E. (2012). **História da Psicologia Moderna: Tradução da 9ª edição** (9 ed.). São Paulo: Cengage Learning.
- Shuckit, M. (2009). Alcohol-related disorders. Em **Kaplan & Sadock's comprehensive textbook of psychiatry** (9 ed., pp. 1268-1288). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Singh, K., Bishnoi, M., & Kulkarni, S. K. (2007). Elevated Zero-maze: A paradigm to evaluate anti-anxiety effects of drugs. **Methods and Findings** , 343.
- Skinner, B. F. (1953). **Science and human behavior**. Nova York: Free Press.
- Straub, O. (2005). **Psicologia da Saúde**. Porto Alegre: Atrmed.
- Taylor, S. (1999). **Anxiety Sensivity**. (S. Taylor, Ed.) Abingdon: Routledge.
- Teixeira, A. L., & Kummer, A. (2012). **Neuropsiquiatria Clínica**. Rio de Janeiro: Rúbio.
- Terenina-Rigaldie, E., Jonas, B., & Mormede, P. (2003). Pleiotropic effect of a locus on chromosome 4 influencing alcohol drinking and emotional reactivity in rats. **genes Brain Behavior**, 2 (3), pp. 125-131.
- Treit, D. (1985). Models for the study of anti-anxiety agents: a review. **Biobehav**, 203-222.
- Turner, S. M., D. C. Beidel, C. V., & Stanley, M. A. (1989). An empirically derived inventory to measure social fears and anxiety: The Social Phobia and Anxiety Inventory. **Psychological Assessment**, 35-40.
- Videbech, P. (1997). MRI Findings in patients with affective disorder: a meta-analysis. **Acta Psychiatric Scand** , 157-168.
- Watson, J. B., & McDougall, W. (1929). **The Battle of behaviorism**. Nova York: Norton.
- Welte, J. W. (1985, may). Alcohol use and trait anxiety in the general population. **Drug and Alcohol Dependence**, 15, pp. 105-109.
- Woody, S. R. (1996). Effects of focus of attention on anxiety levels and social performance of individuals with social phobia. **Journal of Abnormal Psychology**, 105 (1), 61-69.