



André Sena Machado

**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

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

Orientador: Prof. Jesus Landeira Fernandez

Co-orientador: Prof. Vitor de Castro Gomes

Rio de Janeiro
Fevereiro de 2017



André Sena Machado

**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 apresentada como requisito parcial
para obtenção do grau de Mestre pelo Programa de
Pós-Graduação em Psicologia (Psicologia Clínica)
do Departamento de Psicologia do Centro de
Teologia e Ciências Humanas da PUC-Rio.
Aprovada pela Comissão Examinadora abaixo
assinada.

Prof. Jesus Landeira Fernandez

Orientador

Departamento de Psicologia - PUC-Rio

Prof. Jean Carlos Natividade

Departamento de Psicologia - PUC-Rio

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, 17 de fevereiro de 2017.

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

André Sena Machado

Autor graduou-se em Psicologia na Universidade Estácio de Sá em 2015 e obteve o grau de Mestre em Psicologia Clínica no Departamento de Psicologia da PUC-Rio através do CNPq em 2017. Atuou de forma ampla na melhora do biotério da PUC-Rio. Interesses acadêmicos envolvem investigar processos atencionais, motivacionais, emocionais e de aprendizagem.

Ficha Catalográfica

Machado, André Sena

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 / André Sena Machado ; orientador: Jesus Landeira Fernandez. – 2017.

89 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado)–Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Departamento de Psicologia, 2017.

Inclui bibliografia

1. Psicologia – Teses. 2. Seleção genética. 3. Modelos animais de ansiedade. 4. Condicionamento. 5. Congelamento. 6. Medo contextual. I. Landeira-Fernandez, Jesus. II. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Departamento de Psicologia. III. Título.

CDD: 150

Dedico esse trabalho a meus pais, Rogério e Ivanise, que me apoiaram em cada etapa dessa jornada e sem os quais nada disso seria possível, e a Deus, que me guiou até este momento.

Agradecimentos

Agradeço ao meu Orientador e amigo, Professor J. Landeira-Fernandez, que mudou minha vida para sempre de diversas maneiras. Sua confiança e seu apoio constantes me permitiram ir mais longe do que eu havia sonhado e, sem dúvida, foi a pessoa com maior impacto para minha formação e amadurecimento acadêmico. A oportunidade de estagiar no laboratório de neurociências da PUC-Rio foi um divisor de águas na minha vida, e, se hoje eu acho a psicologia experimental apaixonante, é a você quem devo isso.

Agradeço a meu co-orientador e amigo, Vitor de Castro Gomes, o Carioca original (apesar de ser mineiro). Sua ajuda e apoio foram indispensáveis nesse processo, e palavras não são capazes de expressar minha gratidão.

Agradeço ao CNPq e à FAPERJ, que possibilitam essa e tantas outras pesquisas científicas no nosso país.

Agradeço a todos os funcionários do departamento de Psicologia, em especial, Verinha, Marcelina e Fernando, que sempre me ofereceram todo apoio necessário a cada passo da jornada.

Agradeço à PUC-Rio, que superou todas as minhas expectativas e se mostrou um ambiente ímpar para a condução de experimentos científicos. E ao departamento de informática que sempre mostrou celeridade em nos ajudar a consertar os defeitos das máquinas. Em especial, agradeço aos funcionários de segurança e de limpeza, que sempre estavam atentos a nossas necessidades e com uma postura amistosa e colaborativa.

Sou muito grato a toda equipe do laboratório de Neurociências, tanto os que interagi diretamente, quanto os me precederam. Em especial, agradeço a meus colegas e amigos, Danilo, Michele, Thais, Bia e Matheus que tanto me ajudaram no dia a dia desse processo.

Agradeço a nossa bióloga, Flavia Rosseti, que me ajudou em tudo que foi preciso. Nós temos sorte de poder contar com uma profissional tão dedicada e competente.

Um agradecimento em especial para Dra. Silvia Maisonetti, que chefia nosso laboratório. Sua sagacidade e bom humor me mostraram que é possível fazer a pesquisa mais assertiva e mais divertida ao mesmo tempo.

Agradeço ao Carlos e ao departamento de engenharia elétrica por toda a ajuda na montagem e manutenção do novo laboratório.

Um agradecimento especial a Professora Helenice Charchat, suas aulas foram de grande valor e contribuíram em muito para meu crescimento acadêmico e pessoal.

Agradeço a minha irmã Anelisa, que sempre foi uma grande inspiração e exemplo para mim. Assim como outras pessoas da minha família que sempre me apoiaram, que seriam muitos para citar, mas um agradecimento especial vai para meu falecido tio Álvaro, cuja paixão pela ciência sempre me inspirou.

Obrigado a Dra. Elizabete Possidente que sempre se colocou à disposição e ajudou na revisão das minhas tabelas.

Um agradecimento especial a todos que me apoiaram, muitos para citar, mas vocês sabem quem são.

Resumo

Machado, André Sena; Landeira, Jesus Fernandez (Orientador). **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.** Rio de Janeiro, 2017. 89p. Dissertação de Mestrado – Departamento de Psicologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

No presente estudo, foi investigada a ocorrência da resposta de congelamento de defesa durante o período pré- e pós-choque empregado no protocolo para a criação seletiva das linhagens de ratos Cariocas alto- e baixo-congelamento condicionado na PUC-Rio. Além disso, para obter uma maior clareza da estrutura deste comportamento defensivo e sua relação com as duas linhagens, foi realizada uma extração de componentes. Foram detectadas diferenças significativas entre as linhagens nos períodos pré- e pós-choque, com a diferença no período pré-choque sendo proporcional à encontrada no fenótipo. A análise fatorial revelou 4 componentes, o primeiro relacionado ao fenótipo, o segundo à parcela final do período pré-choque, o terceiro ao período pós-choque e o quarto à parcela inicial do período pré-choque. Estes resultados demonstram que o protocolo empregado foi capaz de produzir diferenças significativas nas linhagens selecionadas para alto e baixo congelamento condicionado em paradigmas de ansiedade incondicionada, indicando um mutualismo genético por trás destes mecanismos, observado pela primeira vez com ratos selecionados apenas pelo medo contextual condicionado. O componente que carregou a parcela final do período de habituação (pré-choque) mostrou-se mais responsável por explicar a variação individual do que a parcela inicial ou o pós-choque, indicando que este período dos minutos 5 a 8 é um intervalo ideal para obter de forma mais eficaz o traço comportamental do animal.

Palavras-Chave

Seleção genética; Modelos animais de Ansiedade; Condicionamento; Congelamento; Medo contextual.

Abstract

Machado, André Sena; Landeira, Jesus Fernandez (Advisor). **Evaluation of the freezing response and factor structure of the selective breeding protocol used for the selective breeding of Cariocas high and low conditioned freezing rats.** Rio de Janeiro, 2017. 89p. Dissertação de Mestrado – Departamento de Psicologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

The present study investigated freezing behavior patterns during the selective breeding protocol employed in the creation of the Cariocas High- and Low-Conditioned Freezing in PUC-Rio's Neuroscience Laboratory. There were significant differences found in the baseline, post-shock and retrieval (phenotype) freezing means of the High-, Low- and Control lines over the generations of selective breeding. A Principal Component Analysis of the freezing means in each minute of the contextual fear conditioning protocol revealed four components, the First loading the freezing in the retrieval period, the Second the final half of the baseline period, the Third loads the 3 minutes of freezing measured after foot shocks are received and the Fourth loads the first half of the baseline period. The analysis of the means shows that the selective breeding protocol employed successfully produced differences in anxiety in the selected lines. It's the first time this baseline difference in freezing is observed in Rats. Indicates that there's a genetic pleiotropy behind the underlying mechanisms that allow for a stronger or smaller fear response in response to contextual cues, conditioned or unconditioned. We hypothesize that this might be related to genetic differences in fear related spatial learning modulated by the selection process. Finally, the Second component loading the final half of the baseline period shows that this period (between 5 and 8 minutes) is better at producing a stable behavior pattern which more aptly reproduces the rat's individual identity.

Keywords

Animal models of anxiety; Selected Lines; Conditioning; Freezing; Contextual fear.

Sumário

1. Introdução	16
1.1. Transtornos de ansiedade	18
1.1.1. Condicionamento Pavloviano	23
1.1.1.1. Modelos de Medo Condicionado	23
1.1.2. Resposta de Congelamento condicionado	25
1.1.3. Habituação	28
1.1.4. Sensibilização	30
1.2. Modelos animais de diferenças individuais	31
1.2.1. Seleção artificial	33
1.2.2. Linhagens selecionadas	35
1.2.3. Os Cariocas Alto e Baixo congelamento condicionado	36
1.3. A natureza multidimensional da ansiedade	42
1.4. Pleiotropia	44
2. Objetivos Gerais	46
3. Estudo I – Generalização da resposta de congelamento condicionada ao contexto ao longo do processo de seleção genética	47
3.1. Objetivos	47
3.2. Métodos	47
3.2.1. Fenotipagem das linhagens “Cariocas”	47
3.2.2. Sujeitos	48
3.2.3. Equipamentos	50
3.2.4. Procedimentos	50
3.3. Resultados	53
3.3.1. Análise do congelamento pré-choque (habituação)	53
3.3.2. Análise do congelamento pós-choque	57
3.3.3. Análise do congelamento na sessão teste	61

4.	Estudo II – Estrutura fatorial do protocolo de seleção genética das linhagens “Cariocas”	65
4.1.	Objetivos	65
4.2.	Métodos	65
4.3.	Resultados	66
5.	Estudo III – Segregação da resposta de congelamento no período pré-choque	68
5.1.	Objetivos	68
5.2.	Métodos	68
5.3.	Resultados	68
6.	Discussão geral	75
7.	Conclusões	82
8.	Referências bibliográficas	83

Lista de figuras

Figura 1 – Esquema do procedimento de condicionamento de medo contextual utilizado na fenotipagem dos Cariocas 52

Figura 2 – Porcentagem média (+/- Erro Padrão da Média ou EPM) de tempo dispendido na resposta de congelamento durante a sessão de aquisição, no período de habituação, de 27 gerações (S₁-S₂₇) de ratos machos (A) e fêmeas (B) selecionados para níveis altos (CAC), baixos (CBC) ou médios (CTL) da resposta de congelamento condicionada. 56

Figura 3 – Porcentagem média (+EPM) de tempo dispendido na resposta de congelamento durante a sessão de aquisição, no período do pós-choque, de 27 gerações (S₁-S₂₇) de ratos machos (A) e fêmeas (B) das linhagens CAC, CBC e CTL. 60

Figura 4 – Porcentagem média (+EPM) de tempo dispendido na resposta de congelamento durante a sessão teste (congelamento contextual) de 27 gerações (S₁-S₂₇) de ratos machos (A) e fêmeas (B) das linhagens CAC, CBC e CTL. 64

Figura 5 – Porcentagem média (+EPM) de tempo dispendido na resposta de congelamento durante a sessão de aquisição, nos componentes 4 e 2, de 25 gerações (S₅-S₂₇) de ratos machos (A) e fêmeas (B) das linhagens CAC, CBC e CTL. 70

Figura 6 – Porcentagem média (+EPM) de tempo de congelamento durante a sessão de aquisição, nas variáveis de congelamento contidas nos componentes 4 (Pré I) e 2 (Pré II), de 22 gerações (S₅-S₂₇) de ratos machos (A) e fêmeas (B) das linhagens CAC, CBC e CTL. 72

Figura 7 – Porcentagem média (+EPM) de tempo dispendido na resposta de congelamento ao longo dos oito minutos pré-choque (habituação), de 22 gerações (S₅-S₂₇) de ratos machos (A) e fêmeas (B) das linhagens CAC, CBC e CTL.

73

Lista de tabelas

Tabela 1 – Transtornos de ansiedade, seus sintomas diagnósticos e tratamentos de acordo com DSM-V e National Institute of Mental Health	22
Tabela 2 – Sintomas e características usadas pelo DSM-V para diagnosticar transtornos de ansiedade e como eles podem ser modelados. Adaptada de Jacobson & Cryan (2009)	33
Tabela 3 – Resultados publicados de testes de ansiedade realizados em ratos das linhagens Cariocas	38
Tabela 4 – Resultados publicados de investigações de biomarcadores associados a estresse, ansiedade e diferenças endocrinológicas realizados ratos das linhagens Cariocas	39
Tabela 5 – População. Tabela descreve características demográficas de cada geração das linhagens cariocas a partir da S ₀ . É informado o ano em que a geração foi fenotipada, a quantidade de ratos da geração (N), a quantidade de animais em cada linhagem, cada sexo, e a intensidade do choque utilizada em cada geração	49
Tabela 6 - Efeitos principais do sexo, linhagem e interação entre sexo e linhagem obtidos em uma ANOVA de duas vias realizadas em cada geração no congelamento durante o período pré-choque	54
Tabela 7 – Análises post-hoc para investigar diferenças entre as linhagens e entre os sexos para o período pré-choque	55
Tabela 8 - Efeitos principais do sexo, linhagem e interação entre sexo e linhagem obtidos em ANOVAs realizadas no congelamento de cada geração apenas no período pós-choque	58

Tabela 9 - Análises post-hoc para investigar diferenças entre as linhagens e entre os sexos para o período pós-choque	59
---	----

Tabela 10 – Efeitos principais do sexo, linhagem e interação entre sexo e linhagem obtidos em ANOVAs realizadas em cada geração para o congelamento no período de retorno ao contexto (sessão teste)	62
--	----

Tabela 11 – Análises post-hoc para investigar diferenças entre as linhagens e entre os sexos para o período de retorno ao contexto (sessão teste)	63
---	----

Tabela 12 – Distribuição das 19 variáveis de congelamento (8 mins pré-choque, 3 mins pós-choque e 8 mins na sessão teste) ao longo dos componentes extraídos para cada amostra	67
--	----

Algumas frases do meu autor favorito, William James

“Uma grande quantidade de pessoas acredita estar pensando quando estão apenas rearranjando seus preconceitos. ”

- William James (atribuído a James por Clifton Fadiman, *American Treasury*, 1455-1955, p.719 (1955).

“Um carpinteiro conhecido meu, que nunca recebeu educação formal, uma vez disse: ‘Existe pouca diferença entre um homem e outro; porem a pouca que há, é muito importante. ’ ”

- William James, 1890, *Princípios da Psicologia*

“Toda nossa vida, na medida que tem uma forma definida, é, se não, uma amalgama de hábitos – práticos, emocionais, e intelectuais, – sistematicamente organizados para nossa alegria ou aflição, e nos levam irresistivelmente em direção a nosso destino, seja esse qual for. ”

- William James, *Talks to Teachers*

Introdução

Medo e ansiedade são emoções comuns a diversos seres vivos e vitais para a sobrevivência do organismo. Estes estados emocionais representam parte da nossa capacidade de aprendizagem aversiva, que modela o comportamento para obter o resultado mais adaptativo diante de circunstâncias adversas. Se este processo estiver desregulado em algum ponto, pode ocorrer uma resposta insuficiente ou exagerada ao estímulo, e as consequências podem resultar em sofrimento para o indivíduo (QUINN & FANSELOW, 2006).

Um dos maiores desafios da psicologia e psiquiatria modernas, ambas inseridas no campo da neurociência comportamental, é entender a razão pela qual alguns indivíduos apresentam uma reação emocional ansiosa de forma coerente com o meio, enquanto outros transitam rapidamente para um estado patológico e exagerado (GROSS & HEN, 2004; LEDOUX, 2000; STEIMER, 2002).

Apesar de medo e ansiedade serem estados de apreensão adaptativa, eles agem através de circuitarias neurais diferentes que preparam o corpo para ações distintas. O medo é ativado por um perigo real e iminente e é caracterizado por respostas de defesa ativa que começam de forma célere e cessam rapidamente, uma vez que a ameaça é removida, como as reações de luta ou fuga. Já a ansiedade é caracterizada por uma apreensão adaptativa orientada para o futuro, sendo ativada por ameaças menos específicas e mais distantes, tanto fisicamente quanto psicologicamente. As respostas que a ansiedade causa normalmente estão associadas com aumento da vigilância, da excitação fisiológica e da esquiva de um possível ambiente ou evento aversivo (STEIMER, 2002).

O meio, a genética, a história pessoal e suas interações são todos fatores no desenvolvimento da ansiedade patológica (MINEKA & ZINBARG, 2006). Devido a sua natureza temporal, utilizando elementos do passado para criar expectativas sobre o futuro, é possível que a ansiedade seja uma extensão do circuito de medo, que, a partir do acesso a estruturas de memória e aprendizagem mais sofisticadas, foi capaz de considerar perigos futuros e se adaptar a eles (STEIMER, 2002). Onde e quanto a genética influencia nessas diferenças é uma

pergunta que a neurociência comportamental ainda está buscando responder de forma definitiva (GORDON & HEN, 2004; STEIMER, 2002).

Das psicopatologias associadas a essas emoções, os transtornos de ansiedade (TA) têm a mais elevada taxa de prevalência em populações adultas, chegando a afetar cerca de 7,3% da população mundial (BAXTER et al., 2013). Alguns estudos reportam taxas de prevalências ainda mais elevadas, indicando que um quinto da população apresentará os sintomas necessários para o diagnóstico de um dos TA em algum período da vida (DOS SANTOS & DE SIQUEIRA, 2010).

Há também um elevado custo para sociedade. Uma parcela grande dos investimentos em saúde mental é destinada ao tratamento destes transtornos, chegando a ser 30% dos investimentos totais em saúde mental nos Estados Unidos. Além disso, indivíduos que sofrem com TA perdem produtividade no trabalho, com perdas indiretas para a sociedade (DUPONT et al., 1996).

A literatura mostra que, apesar de existir um conhecimento aprofundado sobre as principais estruturas cerebrais e circuitos neuronais envolvidos no processamento de informação e na expressão do comportamento, a ontogênese dos diferentes transtornos de ansiedade ainda não é bem compreendida (STEIMER, 2002). Consequentemente, os tratamentos disponíveis muitas vezes não são capazes de lidar efetivamente com os TA's (MILLAN, 2003).

De acordo com a teoria evolutiva, estes transtornos representam um mau funcionamento de um sistema adaptativo de organização de respostas defensivas (JACOBSON & CRYAN, 2009), e esse sistema de defesa emotivo possui grande homologia em homens e animais, tanto nas suas bases moleculares quanto comportamentais. Em ambos casos, os circuitos neurais detectam, julgam e reagem a um determinado estímulo, e padrões desregulados de funcionamento nessas tarefas podem ser desadaptativos (JACOBSON & CRYAN, 2009). Dessa forma, situações onde animais apresentam comportamentos de medo e ansiedade são ferramentas incrivelmente úteis para investigar aspectos comportamentais, neurais e genéticos associados à ontogênese dos transtornos de ansiedade (JACOBSON & CRYAN, 2010; MILLAN, 2003; STEIMER, 2002).

Antes de abordar das diferenças individuais nas respostas ansiosas e como isso pode ser estudado em modelos animais, é importante descrever o atual sistema de classificação dos transtornos psiquiátricos para esclarecer os objetivos

por trás de muitas decisões de pesquisa relacionadas a essa área, assim como apontar as dificuldades envolvidas em extrapolar dados obtidos com estudos com animais para seres humanos.

1.1

Transtornos de ansiedade

O próprio conceito de Transtorno de Ansiedade mudou dramaticamente ao longo dos anos, na medida em que evidências clínicas e experimentais, que mudaram a forma como se enxergava o fenômeno da ansiedade patológica, foram sendo apresentadas. A princípio, acreditava-se que a ansiedade poderia ser apropriadamente modelada por um único construto que variava apenas em sua intensidade, indo do normal ao patológico. Isso mudou após Donald Klein demonstrar que a imipramina, um antidepressivo tricíclico, que atua inibindo a recaptura tanto da noradrenalina quanto da serotonina, tinha o poder de atenuar a intensidade da manifestação de um ataque de pânico, mas era ineficaz no tratamento do Transtorno de Ansiedade Generalizada (TAG) (CASTRO-GOMES & LANDEIRA-FERNANDEZ, 2012; KLEIN, 1964). Estudos subsequentes confirmaram essas observações e demonstraram que certos ansiolíticos benzodiazepínicos eram eficazes no tratamento de TAG, mas ineficazes, sendo considerados até mesmo precipitantes, do ataque de pânico (LANDEIRA-FERNANDEZ et al, 2006).

Após considerável investigação, a noção de Transtornos de Ansiedade discriminados entre si pela especificidade da ameaça, assim como sua relação temporal com a mesma, foi estabelecida na literatura (STEIMER, 2002). A partir da terceira edição do Manual Estatístico de Doenças Mentais (DSM-III, *American Psychiatric Association*, 1980), foi introduzido o atual sistema de diagnóstico de transtornos mentais, com critérios explícitos e bem definidos. Essa nova classificação incorporou entidades nosológicas distintas, como transtorno do pânico, fobias específicas e sociais, transtorno de ansiedade generalizada (TAG), transtorno de estresse pós-traumático (TEPT) e transtorno obsessivo compulsivo (TOC) (LANDEIRA-FERNANDEZ et al, 2006; MYERS e DAVIS, 2007).

Em 2013, na sua quinta edição, o DSM-V moveu o transtorno obsessivo compulsivo e o transtorno de estresse pós-traumático para categorias distintas, transtornos obsessivos compulsivos e transtornos relacionados a trauma e estresse,

respectivamente. Foi incluído, sob a égide de transtornos de ansiedade, o mutismo seletivo (e seu nome foi mudado de eletivo para seletivo), e o transtorno de ansiedade de separação. A fobia social se tornou transtorno de ansiedade social e o ataque do pânico, um sintoma capaz de ser aplicado a uma ampla gama diagnósticos (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013).

O TAG é o transtorno de ansiedade mais comum em adultos, caracterizado por um excessivo, persistente e infundado estado de ansiedade, assim como uma resposta excessiva a situações ansiogênicas. Além disso, para ser diagnosticado, costuma ser necessário que ele esteja acompanhado de três ou mais sintomas, como inquietude, fadiga, problemas de concentração, irritabilidade, tensão muscular e problemas de sono. Em crianças, o TAG pode estar associado a dores de cabeça ou abdominais, assim como palpitações cardíacas. Para um diagnóstico, espera-se que a preocupação excessiva sobre algo mundano seja relativamente persistente, durando pelo menos seis meses (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013).

As fobias consistem em casos nos quais estímulos ou situações específicas são responsáveis por ativar reações defensivas desproporcionais à ameaça do objeto. A possibilidade de encontrar o elemento fóbico sempre irá resultar em reações de ansiedade, motivando tentativas de esquiva. Encontros com o objeto fóbico irão causar medo, podendo eliciar reações desproporcionais de fuga. Essas associações fóbicas podem ser desenvolvidas após um evento traumático. Além disso, no DSM-V foi removida a necessidade de que o indivíduo possua mais do que 18 anos para ser diagnosticado com uma fobia específica ou ansiedade social (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013).

O ataque de pânico deixou de ser classificado como um transtorno mental no DSM-V, tornando-se um sintoma a mais para diagnosticar diferentes transtornos de ansiedade. Ele é caracterizado por um intenso e súbito pavor e apreensão, comumente associado a um medo da morte ou da perda de controle, reações de tontura, náusea, dificuldade de respirar, dores no peito e tremores. O episódio apenas se torna um transtorno de pânico quando o indivíduo cria uma ansiedade antecipatória exagerada relacionada à possibilidade de sofrer novos ataques. Vale notar que não é necessário que todos ataques sejam inesperados para a caracterização do transtorno de pânico (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013).

Agorafobia é a ansiedade específica relacionada a estar em um local ou situação no qual a fuga é difícil ou embaraçosa ou a ajuda não está disponível. Ela é associada a ataques de pânico e outras situações ansiogênicas, mas foi dissociada do transtorno do pânico em uma nosologia totalmente distinta, de forma que um indivíduo não mais é diagnosticado com transtorno de pânico com Agorafobia, e sim com duas nosologias distintas. Esta condição acaba sendo caracterizada pela esquiva de certos locais, onde se pressupõe experimentar episódios aversivos dos quais o escape é difícil (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013).

Transtorno de ansiedade social (TAS) está relacionado a um intenso medo de sofrer julgamento e críticas. Esse medo pode ser particular (como medo de falar em público), ou, mais tipicamente, ocorrer em todas interações sociais. Envolve a manifestação de diversos sintomas físicos, como sudorese, ruborização e dificuldade de falar. Como em todos os transtornos fóbicos, o indivíduo tenta evitar interagir com o objeto fóbico, o que resulta no prejuízo de sua interação social (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013).

O transtorno de ansiedade de separação é caracterizado por um nível excessivo de ansiedade causado pela separação de uma pessoa ou local. Essa ansiedade é normal durante o desenvolvimento humano, mas quando aparece de forma excessiva e desadaptativa torna-se um transtorno. Sintomas utilizados para diagnóstico envolvem estresse excessivo em situações de separação. Quando uma separação ocorre ou é antecipada, podem haver reclamações constantes de sintomas físicos, como dores de cabeça ou de estômago, náusea e vômito (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013).

O Transtorno Obsessivo Compulsivo (TOC) deixou de ser classificado como transtorno de ansiedade no DSM-V. Ele é caracterizado por obsessões persistentes e perturbadoras acompanhadas de imagens ou pensamentos intrusivos, ou por compulsões em realizar atos ou rituais específicos que não são causadas por nenhuma droga ou necessidade real, e que geram estresse e disfunção social. Os rituais compulsivos muitas vezes servem como formas de aliviar a ansiedade oriunda de preocupações reais, porém exageradas (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013).

O mutismo seletivo é um transtorno em que a pessoa, normalmente capaz de falar, não o faz em determinadas situações ou com pessoas específicas. Para ser

caracterizado como transtorno, é necessário que o mutismo persista por pelo menos um mês e que cause prejuízos em alguma esfera da vida do indivíduo, seja social, acadêmica ou profissional. Um exemplo de mutismo seletivo seria manter-se em silêncio mesmo quando as consequências de o fazer incluem vergonha, ostracismo ou até uma punição mais direta (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013).

Finalmente, existem os picos de ansiedade situacional, causada por situações novas ou transições de vida assim como eventos fora do controle do indivíduo de forma mais geral. Sua ocorrência é muito comum e frequentemente o que causará ansiedade em um indivíduo não causará nada no outro (MINEKA e ZINBARG, 2006).

Os transtornos descritos, seus sintomas e principais tratamentos de acordo com DSM-V estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 Transtornos de ansiedade, seus sintomas diagnósticos e tratamentos de acordo com DSM-V e NIMH

Transtorno	Sintoma	Tratamento
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	Benzodiazepínicos (situações agudas) ISRS, TCAs, Respiração relaxante
Fobias	Ansiedade quando existe o confronto com o objeto da fobia, medo incapacitante, tentativas ativas de evitar o objeto fóbico.	Treinamento de assertividade, Dessensibilização sistêmica, Antidepressivos, Benzodiazepínicos
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.	Terapia comportamental ISRSs
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.	Terapia de grupo Acompanhamento contínuo Antidepressivos como ISRSs Benzodiazepínicos
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.	Terapia comportamental focada em relaxamento e propriocepção ISRSs, ISRSN, Bloqueadores Beta Buspirona, Benzodiazepínicos
Ansiedade Social	Preocupação excessiva sobre experiências negativas de interação social, intenso medo de ser criticado, esquivas relacionadas a locais com pessoas, náusea ou dor de estômago quando outras pessoas estão em volta.	Terapia Cognitivo Comportamental, ISRS
Obsessivo Compulsivo	Presença de pensamentos intrusivos, compulsões ou obsessões, que se não consumadas causam estresse e ansiedade.	ISRS ISRSN
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.	ISRS Benzodiazepínicos
Ansiedade de Separação	Persistente ansiedade sobre separação de alguma pessoa ou local e reverberações fisiológicas.	ISRSs TCAs

Antidepressivos dizem respeito a uma ampla classe de drogas, entre as quais se incluem ISRSs, ISRSNs e ATCs. ISRSs são inibidores seletivos de recaptação de serotonina, como Citalopram, Escitalopram, Fluoxetina, Fluvoxamina, Paroxetina, Sertralina; ISRSNs são inibidores seletivos de recaptação de serotonina e noradrenalina, como Clomipramina, Venlafaxina, Milnaciprano; ACT são antidepressivos tricíclicos, como Clomipramina, Imipramina, Trimipamina; Benzodiazepínicos se referem a drogas como Clonazepam, Diazepam, Midazolam, Lorazepam; Bloqueadores beta se referem a drogas como Propanolol.

1.1.1

O Condicionamento Pavloviano

O condicionamento clássico ou Pavloviano se refere ao processo envolvido em um tipo de aprendizagem que ocorre quando um estímulo biologicamente significativo (como a comida) é pareado com um estímulo biologicamente neutro (como o soar de um sino) (LANDEIRA-FERNANDEZ, 1996). Com o tempo, o estímulo neutro (ou discreto) torna-se um sinal para ocorrência do estímulo significativo e começa a evocar as mesmas respostas que este evocaria. No caso de Pavlov, o sino se tornou capaz de provocar a salivação nos cães mesmo em situações onde a comida não era apresentada (PAVLOV, 1927).

Uma vez que essa aprendizagem é realizada, o estímulo neutro é denominado de estímulo condicionado, pois seu efeito depende da associação com o alimento (PAVLOV, 1927). O estímulo biologicamente significativo foi denominado de estímulo incondicionado pois não depende de uma aprendizagem para ativar a resposta biológica ou incondicionada (PAVLOV, 1927). Dessa forma, um estímulo neutro pareado com um estímulo incondicionado (mas significativo) adquire a capacidade de prever e, conseqüentemente, evocar a resposta incondicionada, que dentro desse contexto se torna a resposta condicionada (PAVLOV, 1927).

Acredita-se que não é a qualidade do estímulo em si que é relevante para o condicionamento, mas sim sua capacidade de prever o comportamento biologicamente adaptativo (GALLISTEL & GIBBON, 2000).

1.1.1.1

Modelos de medo condicionado

Enquanto os paradigmas de medo inato observam como o sujeito age em uma dada situação naturalmente estressante ou ansiogênica, os de medo condicionado consistem em expor o sujeito previamente à manipulações ou treinamentos que modulem sua resposta, permitindo a investigação da aprendizagem e memória subjacente as respostas emocionais de medo (JACOBS & CUSHMAN; FANSELOW, 2010).

A aprendizagem envolvida no condicionamento Pavloviano está presente na formação e manutenção do medo, entre outras variadas respostas emocionais (LANDEIRA-FERNANDEZ, 1996). A literatura é repleta de exemplos nos quais uma experiência traumática em um determinado ambiente ou envolvendo um certo objeto resulta na formação de reações de esquiva e fuga em futuros encontros com o objeto (MAREN et al, 2013).

Utilizando os princípios por trás condicionamento Pavloviano, é possível condicionar respostas emocionais, como as envolvidas nas reações de medo e ansiedade a certos estímulos e, dessa forma, investigar em uma situação laboratorial os mecanismos de criação de memórias aversivas, assim como de sua evocação, manutenção e extinção (LANDEIRA-FERNANDEZ, 1996).

Ratos e camundongos são os principais animais utilizados para estudo da ansiedade (STEIMER, 2011). Em um experimento típico de condicionamento de medo a um estímulo em ratos, um estímulo discreto como uma luz ou um tom é pareado com um estímulo incondicionado aversivo (como um choque nas patas), de forma que este seja capaz de sinalizar confiavelmente a ocorrência do evento aversivo, e eventualmente o estímulo inofensivo se torna um poderoso estímulo condicionado e adquire a habilidade de evocar um estado de medo, caracterizado por reações defensivas como redução da motricidade, reações autonômicas (aumento na pressão sanguínea e batimento cardíaco) e respostas endócrinas (liberações hormonais), assim como mudanças na sensibilidade a dor (analgesia) e nos reflexos (resposta de piscar olhos, ou sobressalto produzido pelo medo) (LANDEIRA-FERNANDEZ, 1996; LANDEIRA-FERNANDEZ et al, 2006).

Para poder estudar a ansiedade patológica utilizando estes organismos como modelo é necessário distinguir etologicamente suas respostas defensivas, para identificar aquelas que melhor modelam a que se deseja estudar (CASTRO-GOMES & LANDEIRA-FERNANDEZ, 2012).

Nesse sentido, dois tipos de resposta distintas foram identificadas associadas a três distâncias que o animal pode se encontrar em relação a ameaça. Quando a ameaça se encontra na zona proximal de perigo, que é o mais perto e iminente que ela pode ser, isso ativa respostas fásicas de medo, que são caracterizadas por respostas vigorosas de luta ou fuga (DAVIS et al., 2009; CASTRO-GOMES & LANDEIRA-FERNANDEZ, 2012).

Mais estudadas como modelo de ansiedade são as respostas associadas ao medo sustentado, que se ativam quando a ameaça está distante, podendo ser divididas entre duas categorias relativas a distância da ameaça. Há, por exemplo, o estado de perigo potencial caracterizado por uma redução de motricidade exploratória e aumento da vigilância, que representam aumento de cautela perante a possibilidade de perigo (como por exemplo, cair de um local alto) (DAVIS et al., 2009). Esse é o modelo comumente empregado nos modelos de medo inato em roedores, que costumam testar tendências de aproximação e evasão em situações inatamente ansiogênicas (SIMON et al, 1994).

Finalmente, há o estágio distal, caracterizado por uma reação a um perigo que está presente porém distante, seja fisicamente ou psicologicamente (DAVIS et al., 2009). No caso dos roedores, quando a presença de um gato no ambiente é detectada, sua reação defensiva é um cessar completo de todo movimento exceto aquele necessário para respiração numa reação denominada congelamento que faz parte do repertório de diversos mamíferos (DE OLIVEIRA CRISANTO et al., 2015; CASTRO-GOMES & LANDEIRA-FERNANDEZ, 2012; KOUTSIKOU et al., 2014).

Experimentos têm demonstrado que os modelos de medo sustentado (como os baseados em motricidade exploratória ou congelamento) têm sido mais sensíveis que os modelos de medo fásico para detectar compostos ansiolíticos já estabelecidos, sendo potencialmente mais úteis no estudo de mecanismos ansiogênicos (MYERS & DAVIS, 2007).

1.1.2

Resposta de congelamento condicionada

Ao conduzir um experimento de condicionamento de medo, é necessária uma resposta comportamental que represente o medo de forma inequívoca (ENNACEUR, 2014). Essa reação inata é a resposta de congelamento, que ocorre em resposta a uma situação de estresse elevado a diversas formas de perigo potencial (predador, a possibilidade de receber um choque) e, dessa forma, possui um caráter antecipatório (BOLLES & COLLIER, 1976; BOUTON & BOLLES, 1980; BRANDÃO et al., 2008; COLLIER & BOLLES, 1980; FANSELOW, 2000; FANSELOW & HELMSTETTER, 1988; INOUE et al, 1994).

É possível através de um choque nas patas eliciar a reação de congelamento em ratos e camundongos e, nesse momento, o animal se utiliza dos estímulos disponíveis no meio para tentar identificar preditores capazes de sinalizar um novo choque. Se algum som ou objeto sinalizar confiavelmente o choque, ele será associado e o congelamento irá emergir em relação aquele objeto, porém se nenhum objeto for capaz de prever o choque, é feito um condicionamento de medo a todo o contexto experimental (FANSELOW, 1994; GALLISTEL & GIBBON, 2000; CASTRO-GOMES & LANDEIRA-FERNANDEZ, 2012; PAVLOV, 1927). Esse índice de aversividade é mensurável através da quantidade de tempo que o rato passa congelado dentro de um determinado intervalo, e a resposta é gradualmente extinta na medida que o elemento fóbico é repetidamente apresentado sem nenhuma capacidade de prever o evento aversivo (JACOBS et al, 2010; LANDEIRA-FERNANDEZ, 1996).

O congelamento é interessante como medida, pois pode ser mensurado diretamente, sem nenhuma forma de privação de água ou comida ou qualquer forma de resposta operante que o rato deve adquirir (CASTRO-GOMES, 2011). Esse estado representaria um aumento no estresse e vigilância orientados para o futuro característicos da ativação dos circuitos relacionados a ansiedade, podendo ser observado em resposta estímulos discretos ou difusos, sendo uma resposta inata ideal para verificar a natureza do condicionamento Pavloviano de medo (BOLLES, 1970; FENDT & FANSELOW, 1999).

A resposta de congelamento satisfaz os critérios de validade de face e de construto, além da validade farmacológica, tendo sido validada como um modelo adequado de transtorno de ansiedade na medida em que ansiolíticos reduziram a quantidade de congelamento condicionado e ansiogênicos produziram comportamentos de congelamento similar ao eliciado pelo condicionamento de medo (FANSELOW, 1991; INOUE et al., 1996).

Do ponto de vista da modelagem da ansiedade patológica, pode-se considerar o congelamento exagerado em resposta a um objeto como um modelo de fobia, enquanto o congelamento em resposta a vários objetos (ou um contexto) seria um modelo de um TAG pela sua natureza difusa (CASTRO-GOMES, 2011).

O condicionamento de uma resposta emocional de medo pode impor certos problemas de mensuração com respeito a quantidade de aversividade associada ao estímulo condicionado, para prevenir isso, é importante que se registre a linha de

base comportamental (momento pré-choque) antes da associação (momento pós-choque), e que seja dado tempo suficiente para que o animal realize a extinção da resposta de defesa condicionada (CASTRO-GOMES & LANDEIRA-FERNANDEZ, 2012; LANDEIRA-FERNANDEZ et al., 2006; LANDEIRA-FERNANDEZ et al, 2006).

Na ausência de um estímulo discreto sinalizador do choque, o próprio contexto se torna o mais confiável sinalizador do evento aversivo (LANDEIRA-FERNANDEZ, 1996). Essa associação é denominada de condicionamento de medo ao contexto e consiste em fazer com que o estímulo aversivo não seja sinalizado por nenhum estímulo neutro, sobrando apenas o contexto em que ocorreu o estímulo aversivo para ser associado a resposta defensiva (LANDEIRA-FERNANDEZ, 1996). Neste caso, o rato é exposto à câmara experimental onde, após alguns minutos, um choque nas patas não sinalizado será aplicado e, no dia seguinte, quando ele retornar a câmara, mesmo com ausência do choque, o animal apresenta uma reação de medo condicionada ao contexto associado ao choque (LANDEIRA-FERNANDEZ, 1996).

Este tipo de aprendizagem é especialmente interessante para o estudo da ansiedade patológica, pois as variáveis contextuais são de extrema importância para o desenvolvimento de medo e ansiedade (MAREN et al, 2013). Mineka, Cook e Miller demonstraram que muito menos congelamento condicionado ocorre em situações onde existe a possibilidade de se escapar comparado a uma situação inescapável (MINEKA et al, 1984). De fato, são muitas as variáveis ambientais que afetam o comportamento e as respostas de medo do rato, incluindo luminosidade, condições onde os ratos são guardados previamente ao experimento, familiaridade com os pesquisadores, cheiros, sons, espaços abertos ou fechados, ou o próprio confinamento (CHOLERIS et al., 2001; CRAWLEY, 1985; GRAEFF et al, 1998; VICENS-COSTA et al., 2011).

Estas observações levaram a conclusão de que há um relacionamento entre o circuito afetivo que atribui o valor para os objetos como dignos ou não de uma resposta de medo e a apreensão e compreensão das características do ambiente que representam vulnerabilidade ecológica para o organismo (ANAGNOSTARAS et al, 2001; MCHUGH & TONEGAWA, 2007).

Apesar de não ser possível modelar toda essa complexidade do condicionamento Pavloviano de medo em uma só resposta ou um só modelo, o

congelamento condicionado ao contexto engloba uma quantidade bem significativa desses aspectos de forma relativamente barata e simples (DAVIS et al., 2010; LANDEIRA-FERNANDEZ et al., 2006; LISSEK et al., 2005).

1.1.3

Habituação

O termo Habituação é utilizado para definir o fenômeno observado quando uma apresentação repetida de um dado estímulo diminui a resposta que ele elícita. Também é necessário para se caracterizar habituação que a diminuição da resposta não envolva uma adaptação sensorial, ou uma fadiga sensorial ou motora. Ela representa uma das formas mais elementares da plasticidade comportamental, e pode ser observada com quase qualquer tipo de produto final comportamental em resposta a um estímulo (GROVES & THOMPSON, 1970). Experimentos investigando a habituação demonstraram que ela possui especificidade de resposta, e que as respostas relacionadas ao estímulo podiam ser recuperadas de uma forma frequência-dependente (a velocidade em que a resposta volta depende da frequência em que um estímulo relevante para a mesma é apresentado) (RANKIN et al., 2009). A literatura demonstra que um estímulo precisa ter valor preditivo para eventos relevantes ao organismo para manutenção de sua resposta. Na medida em que ocorre interação prolongada a ele sem nenhum evento relevante contingenciado ao mesmo, ele deixa de ser relevante para o sistema que orchestra as respostas adaptativas, e sofre habituação (GALLISTEL & GIBBON, 2000).

Uma revisão sobre o tema feita pelo grupo de Catherine Rankin, em 2009, atualizou as premissas de Groves e Thompson descritas em 1970 sobre as principais características do processo de habituação. Abaixo estão listadas estas premissas na forma que foram colocadas pelos autores (GROVES & THOMPSON, 1970; RANKIN et al., 2009).

#1 Exposição repetida a um estímulo resulta em uma diminuição progressiva da resposta de algum parâmetro associado ao mesmo até um nível assintomático. Isto pode envolver mudanças na magnitude ou na frequência da resposta. Em alguns casos, essa diminuição pode ser exponencial, mas pode também ser linear; além disso, a resposta pode mostrar um aumento prévio ao seu declínio devido um processo simultâneo de sensibilização. Essa curva que reflete

tanto o processo de habituação quanto o de sensibilização é complexa, e o reconhecimento de ambos processos fez com que Groves e Thompson desenvolvessem a teoria de processo dual da habituação da resposta.

#2 Se, após a diminuição da resposta, o estímulo for removido, há uma recuperação, mesmo que parcial, da mesma ao longo do período de observação (recuperação espontânea).

#3 Após diversas séries de exposições ao estímulo e recuperações espontâneas, a diminuição da resposta se torna sucessivamente mais rápida e mais pronunciada (potenciação da habituação).

#4 Tudo mais sendo igual, estimulações mais frequentes resultam em uma diminuição da resposta mais célere e/ou mais pronunciada, assim como uma recuperação espontânea mais rápida (se a diminuição tiver atingido níveis assintomáticos).

#5 Dentro de uma modalidade de estímulo, quanto menos intenso ele for, mais rápida e/ou pronunciada será a diminuição da resposta. Estímulos muito intensos podem não oferecer nenhuma diminuição observável da resposta.

#6 Os efeitos de exposição repetida ao estímulo podem se acumular mesmo após a resposta ter atingido um nível assintomático (que pode ou não ser zero, ou ausência de resposta). Esse efeito além do assintomático pode alterar o comportamento subsequente, por exemplo, atrasando a latência da recuperação espontânea

#7 Dentro de uma modalidade de estímulo, a diminuição de respostas apresenta especificidade de estímulo. Isto pode ser testado apresentando-se um novo estímulo e comparando-se as respostas entre o estímulo habituado e o estímulo novo. Em muitos paradigmas esse teste foi impropriamente chamado de desabituação em vez de um teste de generalização de resposta a estímulo, seu nome mais apropriado. Essa característica é um aspecto crítico da habituação que pode ser usada para distingui-la de uma adaptação sensorial geral (como adaptar-se a intensidade luminosa) ou fadiga motora (ambos os quais devem ser generalizados ao longo de uma ampla gama de modalidades sensoriais de estímulos).

#8 A apresentação de um estímulo diferente resulta em um aumento da resposta habituada ao estímulo original. Esse fenômeno é chamado de “desabituação”. Para testar esse fenômeno é necessário que ocorra um aumento da

resposta ao estímulo original, e não do estímulo novo. De fato, o estímulo desabilitador não precisa ser capaz de evocar a resposta para poder funcionar. Tradicionalmente estímulos intensos foram usados para produzir essa desabilitação mas há casos na literatura que indicam que estímulos mais sutis são melhores em provocar a desabilitação do que os mais intensos.

#9 Exposição repetida ao estímulo desabilitador diminuirá a quantidade de desabilitação provocada (habituação da desabilitação).

#10 Alguns protocolos de exposição repetida a estímulo podem apresentar padrões de diminuição de resposta (reabilitação mais rápida que a resposta de linha de base, respostas menos que a linha de base, respostas menos frequentes do que a linha de base) que duram horas, dias ou semanas. Essa persistência da habituação é denominada de habituação de longo prazo. Assim, a habituação ocorre de duas formas, curto prazo e longo prazo. A distinção é a duração dos efeitos do treinamento (RANKIN et al., 2009).

1.1.4

Sensibilização

A sensibilização funciona de forma contrária à habituação, envolvendo um aumento progressivo da resposta a um determinado estímulo, na medida que outro estímulo sensibilizador (muitas vezes nocivo, como um choque nas patas) é pareado com o mesmo (GROVES & THOMPSON, 1970). Um exemplo desse sistema em ação envolve aumentar a intensidade de uma resposta incondicionada (como a reação de sobressalto que ocorre quando um tom é tocado) através de repetidas apresentações do estímulo acústico pareado com um estímulo aversivo, como um choque nas patas (GROVES & THOMPSON, 1970). O tom não é capaz de prever com confiança o choque, mas, devido a seu pareamento ocasional, a resposta ao mesmo fica mais intensa, ocorrendo um aumento dessa resposta inata em ratos sujeitos choques nas patas, mesmo sem nenhum pareamento, o que mostra que a ativação traumática dos circuitos de aprendizagem aversiva tem reverberações na linha de base dessa resposta (GROVES & THOMPSON, 1970).

A sensibilização também pode ocorrer através de estímulos não aversivos, o que é necessário é que ela seja capaz de aumentar a frequência de respostas ao estímulo na medida que interage com o estímulo relevante (GROVES & THOMPSON, 1970; RANKIN et al., 2009).

Foi observado que em interações com um contexto que não apresenta rotas de fuga há uma sensibilização de respostas ansiosas, mostrando que essa qualidade contextual tem um efeito ansiogênico (MINEKA et al, 1984). Há uma relação temporal na resposta sensibilizada, enquanto a sensibilização de curto prazo pode ser produzida por um breve pareamento (como um único choque ou uma curta série de choques), a indução de uma sensibilização de longo prazo parece requerer um período mais longo de treino, funcionar de forma lateralizada e perdurar por cerca de 24 horas (VANDERSCHUREN & KALIVAS, 2000).

O completo espectro dos fenômenos subjacentes a sensibilização é vasto demais para ser incluído neste trabalho, mas uma característica relevante para esse estudo é que há um mutualismo entre o processo de sensibilização e de habituação (RANKIN et al., 2009). Ratos necessitam de um tempo mínimo de exploração para serem capazes de associar um evento aversivo com o local onde este ocorre (MCHUGH & TONEGAWA, 2007). Acredita-se que essa necessidade de pré-exposição contextual indica que, diante de um novo contexto, há uma latência mínima para a formação (e/ou evocação) de uma representação do ambiente, a qual, uma vez formada, é a princípio sensível aos menores sinais de perigo, e apenas após prolongada interação que é habituado o contexto ou objeto como não preditor de eventos significantes (FANSELOW, 2000). Esse padrão pode ser quebrado pelos processos sensibilizatórios, e esse relacionamento dual consiste na base para Teoria de Processo Duplo de Habituação de Sensibilização de Groves e Thompson (1970) (FANSELOW, 1990; GIRARDI et al., 2013; GROVES & THOMPSON, 1970; RANKIN et al., 2009).

1.2

Modelos animais de diferenças individuais

Modelos de patologia não psiquiátricos (como câncer e diabetes) em animais são comuns em muitos estudos, porém, apesar de seu apelo conceitual, existem poucos estudos utilizando modelos animais para modelar diferenças individuais na vulnerabilidade a transtornos ansiosos (LAMPIS et al, 2011).

Esses estudos tem elucidado como variáveis genéticas contribuem para padrões comportamentais distintos (STEIMER, 2011). Nas palavras de Gottesman *“O desenvolvimento de modelos animais na psiquiatria depende de identificar componentes críticos do comportamento (ou outros traços neurobiológicos) que*

são representativos de um fenômeno mais complexo. Animais nunca terão as ruminações culposas, os pensamentos suicidas ou discurso acelerado. Então, modelos animais baseados em endofenótipos que representam traços selecionados pela evolução que são quantificáveis são melhores para investigação de fenômenos psiquiátricos do que modelos baseados em fenótipos baseados na validade de face de diagnósticos específicos” (GOTTESMAN & GOULD, 2003).

A Tabela 2, adaptada de Jacobson & Cryan (2009), mostra comportamentos etologicamente relevantes de roedores para modelar sintomas tipicamente associados a transtornos de ansiedades.

Tabela 2 Sintomas e características usados pelo DSM-V para diagnosticar transtornos de ansiedade e como eles podem ser modelados em ratos. Adaptados de Jacobson & Cryan (2009)

Sintoma	Como pode ser modelado
Evitar lugares dos quais seja difícil escapar (Agoraphobia)	Aumento na evasão de áreas expostas e bem iluminadas
Sensação súbita de medo intenso, costuma acompanhar falta de ar ou medo de ficar insano (Ataque de pânico)	Aumento na fuga de um predador
Ansiedade social, levando a um comportamento de esquiva (Fobia social)	Baixa interação social com um rato desconhecido
Ansiedade provocada por um medo de um objeto específico (Fobia específica)	Resposta de esquiva exagerada de um determinado estímulo
Re-experienciar um evento traumático, levando a um aumento na excitação e na esquiva eliciada por um estímulo associado ao evento (Transtorno de estresse pós-traumático)	Maior resposta de medo condicionado a uma pista ou a um contexto
Obsessões ansiogênicas, compulsões ansiolíticas (Transtorno obsessivo compulsivo)	Maior resposta de enterrar objetos, grooming excessivo
Dificuldade em se concentrar ou sensação de dar um "branco" na mente (TAG)	Atenção sustentada deficiente
Problemas de sono / insônia	Arquitetura anormal do sono (medida via electroencephalografia)
Hiperexcitação autonômica (taquicardia, vermelhidão, suor, ato de urinar frequente)	Medição por telemetria de rádio dos batimentos cardíacos no momento ansioso
Flashbacks de eventos traumáticos	Prejuízo na extinção da memória de medo
Viés cognitivo em relação à tarefa ambígua ou aversiva	Aumento no condicionamento aversivo para uma tarefa específica
Respostas de sobressalto superior especialmente em contextos ameaçadores	Aumento da resposta acústica de sobressalto
Sensação de estar perdendo controle ou ficando louco durante um ataque de pânico	Não pode ser modelado

1.2.1

Seleção artificial

Diversas estratégias foram utilizadas nos últimos 60 anos para analisar as diferenças entre indivíduos e a susceptibilidade a transtornos psiquiátricos (GOTTESMAN & GOULD, 2003). A abordagem genética pode ser utilizada para investigar e dissecar a variabilidade individual entre e intra populações, procurando-se por fenótipos e suas bases genotípicas subjacentes a essa variabilidade (FURGESON-MOREIRA & MONFILS, 2014; GOULD &

GOTTESMAN, 2006). Essas estratégias incluem o uso de linhagens consanguíneas, linhagens selecionadas ou animais obtidos por tecnologias de mapeamento genético (*knock in* e *knock out*), além do mapeamento quantitativo de locus de traços (CLÉMENT et al, 2002; FINN, 2003; LESCH, 2001; RUDOLPH & MÖHLER, 2004; WOOD & TOTH, 2001).

A seleção artificial (ou genética) é uma técnica em que cada indivíduo de uma dada população é mensurado para um (ou vários) traço fenotípico desejado (comportamento, tamanho do corpo, fecundidade, força muscular, dentre outros) e aqueles indivíduos que obtiverem os resultados mais limítrofes no fenótipo sendo avaliado são escolhidos como procriadores para a criação da nova geração (EMLEN, 1996; GIBBS, 1999; CASTRO-GOMES; LANDEIRA-FERNANDEZ, 2012).

O cruzamento dos animais dentro de uma população heterogênea baseado em extremos de uma característica observável irá propagar esse fenótipo em direções opostas ao longo de várias gerações (HILL & CABALLERO, 1992). A seleção agrega mais alelos ou menos alelos nas linhas “alta” e “baixa” respectivamente, levando a duas linhagens separadas e distintas quando comparadas sobre o fenótipo que as selecionou (CASTRO-GOMES et al, 2011).

O pressuposto é que, depois de diversas gerações de seleção artificial, o contraste do fenótipo entre as duas linhas será maximizado baseado nos efeitos causados pelos genes que facilitam a alta ou baixa expressão dos fenótipos e que eram polimórficos dentro da população inicial (GOULD & GOTTESMAN, 2006). Devido ao fato de que qualquer população finita irá sofrer mudanças genéticas causadas por eventos genéticos aleatórios, um experimento que envolva seleção bidirecional deve envolver pelo menos três linhas, uma para alto valor fenotípico, uma para baixo valor fenotípico e uma cruzada aleatoriamente como controle (GARLAND, 2003). Uma vez que as linhagens divergirem, deve-se comparar os traços associados com as diferenças entre as três linhas a nível fenotípico (GOULD & GOTTESMAN, 2006; ROSE, 1984; SCHLAGER et al, 1983).

1.2.2

Linhagens selecionadas

O desenvolvimento de linhagens bidirecionais de roedores (em particular ratos), com altos e baixos níveis de reações emocionais associadas a situações aversivas, começou no início do século XX e, desde então, um número relativamente grande de diferentes modelos genéticos baseados nessa estratégia investigativa foram desenvolvidos (CASTRO-GOMES et al., 2013).

Estes modelos são ferramentas poderosas para estudar os mecanismos comportamentais, neuronais e genéticos que são subjacentes aos diferentes tipos de transtornos de ansiedade (GOULD & GOTTESMAN, 2006; JACOBSON & CRYAN, 2009). Para este fim, avaliar se as diferenças fenotípicas em uma linhagem bidirecional de fato refletem uma emocionalidade diferenciada é importante, já está claro que um modelo genético de ansiedade não compartilha o mesmo sistema motivacional dentro de um construto unitário, mas sim reflete um grupo de dimensões emocionais qualitativamente distintas que irão, por sua vez, recrutar mecanismos neurobiológicos e genéticos distintos (CASTRO-GOMES & LANDEIRA-FERNANDEZ, 2008; FANSELOW & DONG, 2010; GALVÃO et al., 2011; CASTRO-GOMES et al., 2013; HALLADAY & BLAIR, 2015; INDOVINA et al., 2011; ZELIKOWSKY et al., 2014)

Atualmente a ciência se vale extensivamente do uso de ansiolíticos para validar uma resposta comportamental em uma dada situação experimental como modelo de comportamento ansioso (HALLER & ALICKI, 2012). Respostas afetadas pela ação de ansiolíticos sem afetar outras dimensões observadas (como motricidade geral) são consideradas associadas a rede neural responsável pelos comportamentos ansiosos (SESTAKOVA et al., 2013).

Essa dependência excessiva no uso de ansiolíticos para validação dos testes como modelos animais de ansiedade recebe críticas devido ao fato de que a maioria dos estudos utiliza ratos (e as vezes camundongos) saudáveis em situações de ansiedade aguda (ENNACEUR, 2014; FILE, 1992). Diferentes tipos de rato apresentam diferenças de comportamento ansioso e por isso é muito importante selecionar um organismo modelo apropriado, além do teste correto para observar a expressão de seu fenótipo (HALLER & ALICKI, 2012).

A solução para essa crítica vem através das linhagens artificialmente selecionadas para alto e baixo fenótipo associado a ansiedade patológica, onde

esses organismos apresentam um padrão persistente de resposta diferenciada as situações ansiogênicas que modela de forma mais apropriada o fenômeno da ansiedade patológica em humanos, possibilitando investigações a nível anatômico e molecular das diferenças entre indivíduos normais e ansiosos, sendo uma ferramenta ímpar para entender como a genética é capaz de afetar o funcionamento dos circuitos de medo (GOULD & GOTTESMAN, 2006; HALLER & ALICKI, 2012; JACOBSON & CRYAN, 2009).

1.2.3

Os Cariocas High- e Low-Conditioned Freezing

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 (CASTRO-GOMES & LANDEIRA-FERNANDEZ, 2012).

As linhagens foram denominadas de Cariocas, em homenagem a cidade onde foram produzidas, os sujeitos utilizados para o processo foram ratos Wistar obtidos através da fundação Oswaldo Cruz e o fenótipo de ansiedade escolhido foi congelamento condicionado ao contexto (CASTRO-GOMES & LANDEIRA-FERNANDEZ, 2012).

O processo de fenotipagem inclui dois dias de experimentos, onde no primeiro o animal é exposto a câmara experimental por 8 minutos (período de habituação ou pré-choque), e, após, esse intervalo, recebe 3 choques nas patas sem nenhum estímulo sinalizador, de forma que o contexto seja o único sinalizador do evento aversivo, permanecendo na câmara por 3 minutos (período pós-choque) antes de ser devolvido a sua gaiola original (CASTRO-GOMES & LANDEIRA-FERNANDEZ, 2012). No dia seguinte o animal é retornado para câmara experimental previamente associada ao choque por oito minutos (sessão teste) onde nenhum choque é aplicado, e observa-se o congelamento como medida dessa associação aversiva (CASTRO-GOMES & LANDEIRA-FERNANDEZ, 2012).

Os animais com as maiores e menores pontuações de congelamento condicionado ao contexto (congelamento na sessão teste) foram selecionados para cruzamento para produzir duas linhagens denominadas Cariocas de Alto (CAC) e

baixo (CBC) Congelamento e, após apenas três gerações, diferenças significativas entre as linhagens começaram a aparecer. O mesmo processo foi feito dentro de cada linhagem para selecionar quem seriam os progenitores da próxima geração (CASTRO-GOMES & LANDEIRA-FERNANDEZ, 2012). Na quinta geração, uma linhagem de ratos cruzados aleatoriamente foi adicionada denominada Controle (CTL) (CASTRO-GOMES & LANDEIRA-FERNANDEZ, 2012).

Após sete gerações, diferenças começaram a aparecer entre as linhagens no período pós-choque, e na geração S14 foi detectada uma diferença significativa entre as linhagens na linha de base, porém é utilizado o critério de que as diferenças devem aparecer consistentemente dentro de um intervalo de 3 gerações para serem consideradas (CASTRO-GOMES & LANDEIRA-FERNANDEZ, 2012).

Ao longo do processo de cruzamento seletivo, diversos experimentos foram realizados para investigar diferenças no comportamento entre as linhagens, os resultados destes estudos seguem sintetizados na Tabela 3.

Tabela 3 Resultados publicados a respeito das linhagens Cariocas em diversos testes de ansiedade

Teste de ansiedade empregado	Resultados	Referências bibliográficas
Congelamento contextual Fenótipo (sessão teste)	CAC > CTL > CBC; Machos > Fêmeas CAC > CBC; Machos > Fêmeas CAC > CTL > CBC;	CASTRO-GOMES & LANDEIRA-FERNANDEZ (2012) SALVIANO et al. (2014) LÉON et al. (2013)
Re-teste (Extinção) Extinção	CAC > CTL > CBC; CAC > CBC	LÉON et al. (2013) CASTRO-GOMES & LANDEIRA-FERNANDEZ (2012)
Linha de base (Habituação)	CAC = CTL = CBC; Machos = Fêmeas	CASTRO-GOMES & LANDEIRA-FERNANDEZ (2012)
Pós-Choque	CAC = CTL > CBC; Machos > Fêmeas	CASTRO-GOMES & LANDEIRA-FERNANDEZ (2012)
Discriminação contexto-som	CAC = CBC	CASTRO-GOMES & LANDEIRA-FERNANDEZ (2012)
Labirinto em Cruz Elevada (LCE)		
Ansiedade	CAC > CTL CAC > CBC Machos > Fêmeas, CAC > CBC	DIAS et al. (2009) HASSAN et al. (2013) SALVIANO et al. (2014)
Motricidade	CAC = CTL CAC = CBC Machos = Fêmeas, CAC = CBC	DIAS et al. (2009) HASSAN et al. (2013) SALVIANO et al. (2014)
LCE sob efeito de Ketanserina		
Ansiedade	CAC > CTL > CBC	LÉON et al. (2013)
Motricidade	CAC = CTL = CBC	LÉON et al. (2013)
Ansiedade	CAC = CTL = CBC	LÉON et al. (2013)
Pré vs pós	CBC (T) > CBC; CTL (T) = CTL; CAC (T) < CAC	LÉON et al. (2013)
Motricidade	CAC = CTL = CBC	LÉON et al. (2013)
Pré vs pós	CBC (T) > CBC; CTL (T) = CTL; CAC (T) < CAC	LÉON et al. (2013)
Teste de Nado Forçado	CAC = CTL CAC = CBC	DIAS et al. (2009) SALVIANO et al. (2014)
Interação Social	CAC > CTL	DIAS et al. (2009)
Reconhecimento de Objetos	CAC = CTL	DIAS et al. (2009)
Morris Water Maze	CAC = CTL	DIAS et al. (2014)
Esquiva passiva	CAC > CTL	DIAS et al. (2014)
Lesão na Amígdala	CAC = CBC	CASTRO-GOMES & LANDEIRA-FERNANDEZ (2012)
Estimulação MCPD	CAC > CBC	GALVÃO et al. (2011)

Diferenças significativas em índices de ansiedade entre as linhagens testadas foram denotadas por > ou <.

Estes resultados demonstram que as linhagens diferem no seu comportamento ansioso, com CAC's apresentando consistentemente um nível elevado de ansiedade e memória aversiva em diversos paradigmas comparado a CBC's e CTL's, como seria de se esperar para um modelo animal de ansiedade exagerada (DIAS et al., 2009).

Também foram investigados aspectos biológicos e moleculares associados ao funcionamento de estruturas neurológicas que participam nos processos envolvidos no medo e na ansiedade, apresentados na Tabela 4. Diferente da tabela anterior, os resultados não foram dispostos conforme seu escore relativo a ansiedade, e sim conforme o índice do biomarcador em questão.

Tabela 4 Resultados publicados sobre investigações de biomarcadores nas linhagens Cariocas

Biomarcadores associados a ansiedade	Resultados	Referências bibliográficas
Estresse oxidativo no hipocampo	CAC > CBC	HASSAN et al. (2013)
Dano no DNA do circuito de medo	CAC > CBC	RÉUS et al. (2015)
Corticoesterona basal (Pré-Choque)	CAC > CBC > CTL	LÉON et al. (2013)
Corticoesterona Pós-Choque	CAC > CTL > CBC	LÉON et al. (2013)
Corticoesterona, Leptina e T3	CAC > CTL	NETO et al. (2015)
T4 e TSH	CAC = CTL	NETO et al. (2015)
Triglicerídeos, Colesterol	CAC > CTL	NETO et al. (2015)
Glicemia induzida por privação	CAC > CTL	NETO et al. (2015)
Tolerância a Glicose	CAC = CTL	NETO et al. (2015)
Insulina	CAC = CTL	NETO et al. (2015)
Consumo de Oxigênio	CAC > CTL	NETO et al. (2015)
Giro dentado do hipocampo		
Proliferação celular	CAC < CTL = CBC	LÉON et al. (2013)
	CAC = CTL	DIAS et al. (2014)
Neuroblastos (DCX)	CAC < CTL	DIAS et al. (2014)
Pós-estresse (além do fenótipo, S)	CAC(S) < CAC ; CBC(S) = CBC; CTL(S) = CTL	LÉON et al. (2013)
Expressão de C-Fos		
Córtex pré-límbico	CBC < CAC < CTL	LÉON et al. (2013)
Córtex cingulado 1, Córtex Peririnal	CBC > CAC = CTL	LÉON et al. (2013)
Septum Lateral Dorsal, Locus Coeruleus	CAC > CBC = CTL	LÉON et al. (2013)
Núcleo Paraventricular	CAC > CTL > CBC	LÉON et al. (2013)
Hipocampo Dorsal, Septum Medial	CAC < CBC = CTL	LÉON et al. (2013)
Amígdala Basolateral	CBC < CAC = CTL	LÉON et al. (2013)
EC, EnC, SMM, CeA, VMH, SH, M2, Cg2, IL, MO, MCPD, MCPV	Sem diferença significativa	LÉON et al. (2013)
Morfologia dendritica	CAC < CTL	DIAS et al. (2014)
Fatores Neurotróficos	CAC > CTL	DIAS et al. (2014)
GABA em resposta a um íon de potássio	CAC < CTL	DIAS et al. (2014)
Corticoesterona basal	CAC > CTL	DIAS et al. (2014)
Receptores de corticosteroides	CAC < CTL	DIAS et al. (2014)

Diferenças significativas nos índices dos biomarcadores foram denotadas por > ou < dependendo da natureza da diferença. EC, Córtex ecto-ri- nal; EnC, Córtex entorinal; SMM, Núcleo supramamilar; CeA, Núcleo central da amígdala; VMH, Hipotálamo ventro medial; SH, Septum hipocampal; M2, Córtex motor secundário; Cg2, Córtex Cingulado 2; IL, Córtex Infralímbico; MO, Córtex orbito medial; MCP, Matéria cinzenta periaqueductal (D)orsal e (V)entral.

Os resultados demonstram que a linhagem CAC apresenta um índice elevado de ansiedade em diversas situações distintas, tanto em paradigmas de medo condicionado como incondicionado, sendo um modelo válido de TAG na medida que apresenta uma elevada e persistente ansiedade, principal característica da patologia.

Os resultados dos biomarcadores mostram que existem diversos fatores associados as diferenças entre as linhagens como, dano genético, estresse oxidativo no hipocampo e alterações na expressão de neurônios novos, morfologia dendritica, assim como nível de corticoesterona. Uma das regiões mais estudadas nessas linhagens foi o giro dentado do hipocampo, uma região importante para memória e para o medo devido a sua conexão com a amígdala, com dois grandes estudos publicados.

Léon investigou a diferença na expressão de C-Fos, uma proteína que normalmente se encontra em níveis baixos no sistema nervoso central, porem cuja expressão aumenta de forma rápida e transitória quando há atividade neuronal. As diferenças observadas entre os grupos indicam um padrão complexo de ativação neuronal subjacente as diferenças presentes nas linhagens (ANDREA & ANHUAMÁN, 2013).

Dias também investigou diferenças no giro dentado do hipocampo, avaliando fatores de proliferação celular, nível de corticoesterona e seus receptores, além da morfologia dendrítica e resposta a GABA (DIAS et al., 2009, 2014).

Em 2015, Neto publicou uma investigação das características endocrinológicas de CAC's e CTL's, analisando nível de corticoesterona basal, leptina, hormônios da tireoide, triglicerídeos, colesterol, glicemia, tolerância a glicose, insulina e consumo de oxigênio (MOUSOVICH-NETO et al., 2015). Nos três estudos CAC's apresentaram nível de corticoesterona elevado comparado as outras duas linhagens, um forte marcador de estresse.

Estes dados indicam que o protocolo utilizado para seleção afetou uma ampla gama de variáveis biológicas, indicando que há grande comorbidade de fatores relacionados a essas respostas diferenciadas a ansiedade.

A partir deste corpo de resultados é possível afirmar que ratos CAC são um modelo animal de ansiedade, especificamente para o Transtorno de Ansiedade

Generalizada, pois diferem das outras linhagens consistentemente em diversos testes de ansiedade sem apresentar diferenças puramente motoras que poderiam explicar os resultados (DIAS et al., 2009).

Nesse sentido o experimento de seleção foi um sucesso, pois foi capaz de criar um organismo com traço de ansiedade elevada que permite o estudo da fisiologia do medo (DIAS et al., 2014).

O presente estudo pretende investigar os dados mais atuais gerados pelo contínuo processo de cruzamento seletivo de forma a estender a análise de diferenças entre grupos feita anteriormente até a geração S14 para a geração S27 (CASTRO-GOMES & LANDEIRA-FERNANDEZ, 2012).

1.3

A natureza multidimensional da ansiedade

A visão de que a ansiedade não reflete um processo unitário reforça a importância de se desenvolver diferentes modelos genéticos de ansiedade, com critérios fenotípicos distintos, como foi mostrado na introdução do presente estudo. Investigações empregando modelos estatísticos multivariados vêm mostrando de forma consistente que diferentes testes animais podem na verdade acessar diferentes formas de ansiedade (CASTRO-GOMES et al., 2013). Por exemplo, File e colaboradores mostraram que índices de ansiedade provenientes do labirinto em cruz elevado (número de entradas e tempo dispendido nos braços abertos), no teste de interação social (tempo dispendido na interação social com outro animal) e no teste Vogel (frequência de comportamento de beber punido), carregaram em 3 fatores independentes, sugerindo a existência de diferentes formas de ansiedade geradas em cada um destes paradigmas (FILE, 1992). De forma similar, Belzung e Le Pape, encontraram uma correlação fraca entre medidas de ansiedade da caixa de transição claro-escuro e labirinto em cruz elevado (BELZUNG & LE PAPE, 1994).

Este quadro complexo encontrado em modelos animais de ansiedade pode na verdade refletir a diversidade de diagnósticos clínicos habitualmente encontrada em pacientes psiquiátricos, nos quais a ansiedade patológica pode ser classificada em diversas categorias (ver introdução). Neste sentido, paradigmas experimentais que produzem inibição comportamental através de um conflito de

aproximação/esquiva são sensíveis a drogas como compostos benzodiazepínicos (CRAWLEY & GOODWIN, 1980; CRAWLEY, 1985; GRIEBEL et al., 1993; MILLAN, 2003). Outros estudos indicam que substâncias que diminuem a atividade serotoninérgica podem aumentar a ansiedade, enquanto aqueles compostos que aumentam a mesma transmissão possuem ação ansiolítica (FUKUMOTO & CHAKI, 2015). Mais ainda, outros modelos animais que requerem uma escapatória vigorosa de estímulos aversivos muito próximos parecem ser resistentes a drogas benzodiazepínicas, enquanto substâncias que aumentam a atividade serotoninérgica produzem um efeito ansiolítico (DAVIS et al., 2009).

Diferentes circuitarias neurais também parecem estar recrutadas de forma distinta pelas várias dimensões da ansiedade. Por exemplo, Gray e McNaughton sustentam que o sistema septo-hipocampal contribui para o componente cognitivo da ansiedade, denominado “preocupação”; por outro lado, o complexo amigdalóide e suas projeções para a porção ventral da substância cinzenta periaqueductal estão criticamente envolvidas na regulação de comportamento de congelamento defensivo em resposta a estímulos aversivos condicionados ou incondicionados enquanto respostas defensivas ativadas por estímulos dolorosos, como um choque nas patas, parecem ser regulados pela porção dorsal da matéria cinzenta periaqueductal e suas projeções ascendentes para estruturas mesoencefálicas relacionadas ao processamento sensorial (MCNAUGHTON & GRAY, 2000).

Finalmente, diversos estudos revelaram diferenças sutis entre respostas comportamentais de ansiedade x medo. Por exemplo, lesões na amígdala central diminuíram a resposta de sobressalto em modelos animais de medo condicionado, mas não tiveram efeito em um paradigma de aumento de luminosidade. Por outro lado, lesões no núcleo basal da estria terminalis mostraram efeitos opostos. Tais estudos sugerem uma circuitaria independente para o medo e para a ansiedade, pelo menos no paradigma da resposta de sobressalto (BRANDÃO et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2004).

Essa constelação de fatores afetando as respostas de medo e ansiedade torna interessante uma análise fatorial do protocolo empregado para criação/seleção das linhagens Cariocas para identificar quais as principais dimensões que estão sendo mensuradas pelas variáveis de congelamento dos

diferentes momentos (8 minutos de habituação, 3 minutos pós-choque e 8 minutos da Sessão Teste) e assim, aumentar a compreensão sobre os fenômenos sendo observados.

1.4

Pleiotropia

A susceptibilidade para um comportamento do tipo ansioso necessariamente significa susceptibilidade para outras situações geradoras de medo ou ansiedade? A literatura indica que sim, e a própria linhagem Carioca apresenta comportamento diferenciado em testes de medo contextual inato como o labirinto em cruz elevado (DIAS et al., 2009, 2014).

De fato, espera-se que um modelo animal de TAG apresente ansiedade elevada de forma persistente e a situações diversas (JACOBSON & CRYAN, 2009). Nesse sentido, é importante determinar que outros componentes se relacionam com o fenótipo e de que forma. Já foi observado que episódios mais longos de *rearing* (quando o roedor se eleva ficando apoiado apenas nas patas traseiras) durante a habituação foram capazes de prever menor congelamento condicionado, mostrando uma correlação entre certos comportamentos durante o período de habituação e o congelamento durante a sessão teste em outros estudos (FURGESON-MOREIRA & MONFILS, 2014).

Durante o período de habituação, o animal não tem nenhuma associação aversiva condicionada à câmara experimental e está realizando um movimento exploratório, Murawski e Asok comentam que o congelamento observado no início do período pré-choque em ratos representa uma medida indireta de motricidade exploratória, enquanto que o aumento de congelamento observado ao longo do período representaria uma medida indireta de aprendizagem contextual (MURAWSKI & ASOK, 2016).

Graeff demonstrou com o ETM que confinar o rato a um braço era capaz de aumentar sua esquiva inibitória, diminuindo a latência para escapar daquele compartimento criando uma espécie de resposta de medo condicionada. É possível então que a resposta de congelamento encontrada no período de habituação represente uma forma de medo condicionado ao contexto formado pela exposição prolongada ao confinamento (ZANGROSSI & GRAEFF, 1997).

Apesar da pleiotropia entre paradigmas ser bem estudada, os efeitos da pleiotropia intra-paradigma são menos analisados e pouco compreendidos. McGuire observou que selecionar camundongos para o congelamento condicionado a um contexto pareado a um tom produzia alterações no congelamento de linha de base após a quarta geração, indicando um construto comum subjacente essas duas dimensões da ansiedade (memória e exploração) (MCGUIRE et al., 2013).

No caso de McGuire, havia um tom antes de ocorrer o choque, e as diferenças encontradas na linha de base foram em resposta ao tom pré-choque. Isto levanta a questão se esse relacionamento não seria observável após uma seleção suficientemente longa, e sem um estímulo estranho, como no caso dos Cariocas que são expostos ao contexto apenas (MCGUIRE et al., 2013).

No extenso estudo publicado por Gomes (2012) com os resultados das linhagens Cariocas das gerações S1 até S14, foi observada uma diferença significativa entre as linhagens na linha de base na geração S14, última geração a ter seus dados publicados (CASTRO-GOMES & LANDEIRA-FERNANDEZ, 2012).

É possível que essas diferenças na linha de base sejam um efeito pleiotrópico da seleção pelo congelamento condicionado e apareçam de forma consistente com o fenótipo. Se de fato estiverem presentes ao analisar gerações subsequentes a S14, isso indicaria que os fatores genéticos subjacentes a susceptibilidade a aquisição da resposta de congelamento condicionada também afetam o nível de ansiedade basal, hipótese que é parcialmente confirmada pela performance dos Cariocas em diferentes testes de ansiedade inata, mas que não foi ainda relatada de forma consistente na linha de base do seu fenótipo.

Isso levanta o seguinte questionamento, seriam as diferenças encontradas no congelamento condicionado a um contexto das linhagens Cariocas também encontradas no seu comportamento exploratório? De que maneira a seleção genética para um determinado fenótipo está afetando o outro?

2

Objetivos gerais

Nesse sentido o objetivo principal do presente estudo foi o de determinar a extensão em que a seleção bidirecional de medo condicionado ao contexto, empregada na fenotipagem das linhagens Cariocas, afeta o congelamento observado durante o período pré- e pós-choque. Para este fim, ele continua o trabalho de Vitor de Castro Gomes, estendendo a investigação das diferenças de congelamento entre os grupos até a geração S₂₇. Além disso, também objetivou-se identificar quais são os constructos subjacentes ao protocolo de seleção Carioca através de uma análise fatorial para melhor compreender as dimensões que estão sendo modeladas por esse processo.

Os objetivos específicos deste trabalho são:

1. Investigar diferenças no perfil comportamental das linhagens Cariocas da S14 até a S27
2. Investigar se a seleção pelo fenótipo de congelamento condicionado afetou o comportamento no período pré- e pós-choque.
3. Identificar e interpretar os fatores subjacentes ao protocolo utilizado na fenotipagem dos Cariocas.

3

Estudo I

Generalização da resposta de congelamento condicionada ao contexto ao longo do processo de seleção genética das linhagens “Cariocas”

3.1

Objetivos

O objetivo do estudo I foi dual. Primeiramente continuar o trabalho com a linhagem dos ratos, investigando o perfil comportamental das linhagens Cariocas durante o protocolo de fenotipagem. Adicionalmente investigar se, ao longo das gerações de criação seletiva, a seleção do fenótipo provocou alterações em outros comportamentos registrados no protocolo de seleção destas linhagens, como o congelamento registrado no período pré- e pós-choque. Para realizar tal investigação, os procedimentos e os resultados de 27 gerações de criação seletiva das linhagens “Cariocas”, feitos de forma contínua no Laboratório de Neurociência Comportamental da PUC-Rio são apresentados.

3.2

Métodos

3.2.1

Fenotipagem das linhagens “Cariocas”

O fenótipo selecionado para seleção continua das linhagens Cariocas são as médias limítrofes da resposta de congelamento a pistas contextuais associadas a choques elétricos obtidas ao longo de oito minutos do momento experimental definido aqui como “Sessão teste”.

Durante o processo de fenotipagem (isto é, todo protocolo de condicionamento) também são registrados outros dois momentos, o congelamento nos oito minutos precedentes aos choques elétricos (definido como “habituação” ou “pré-choque”) e o congelamento registrado nos 3 minutos que se seguem de forma imediata ao último choque nas patas (definido aqui como “Pós-choque”).

3.2.2

Sujeitos

Ratos Wistar Albinos de ambos sexos foram utilizados como sujeitos. Os animais foram obtidos em 1995 da Fundação Oswaldo Cruz, e desde então tem sido mantidos no biotério do Departamento de Psicologia da PUC-Rio, onde a temperatura ambiente é controlada ($24 \pm 1^\circ\text{C}$) e um a iluminação segue um ciclo diurno de 12h, sendo o período iluminado das 07:00 às 19:00 h pelo horário de Brasília (GMT-3). Em março de 2006 iniciou-se o processo de cruzamento seletivo, os experimentos ocorreram na parte diária do ciclo, conforme o padrão da literatura. Entre seis e oito semanas após o nascimento, animais eram dados uma identificação individual através da amputação de dedos e uma identidade grupal a partir de um talho em uma das orelhas. Ao desmamarem, cerca de 21 dias de idade, os animais foram separados por sexo e agrupados em grupos de cinco a sete de acordo com suas respectivas linhagens em jaulas de policarbonato com dimensões de 18x31x38 cm, com comida e água à vontade. Os animais costumam ter entre 75 e 85 dias de idade ao início do experimento. Por cinco dias antes do início do experimento, os animais são manipulados de forma a simular sua retirada da gaiola nativa, esse procedimento é realizado por dois minutos em cada animal. Todos os protocolos utilizados foram aprovados pelo comitê de ética do Departamento de Psicologia da PUC-Rio e estão em conformidade com as Diretrizes para Uso e Cuidado de Animais da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC), que é baseada nas diretrizes utilizadas pelo US National Institutes of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals (1996).

Como este estudo é uma continuação do estudo anterior por outro pesquisador, os resultados obtidos no estudo anterior até a geração S_{14} foram reportados em conjunto com novas análises que se estenderam até a geração S_{27} . A Tabela 5 apresenta os dados demográficos das linhagens cariocas, incluindo N de sujeitos de cada grupo em cada geração, ano em que ocorreu a fenotipagem e intensidade do choque utilizada.

Tabela 5. Características demográficas de cada geração das linhagens cariocas a partir da S₀. É informado o ano em que a geração foi sujeita a fenotipagem, a quantidade de ratos da geração (*N*), a quantidade de animais em cada linhagem, cada sexo, e a intensidade do choque utilizada em cada geração.

Ano	Geração	<i>N</i>	Machos			Fêmeas			Machos + Fêmeas			Choque
			CAC	CBC	CTL	CAC	CBC	CTL	CAC	CBC	CTL	
2006	S0	120										1
	S1	147	37	34		39	37		76	71	0	1
2007	S2	143	37	37		35	34		72	71	0	1
	S3	158	34	42		45	37		79	79	0	1
	S4	151	46	33		31	41		77	74	0	1
2008	S5	217	29	49	40	37	46	16	66	95	56	1
	S6	175	29	39	26	23	34	24	52	73	50	1
2009	S7	308	64	73	17	61	68	25	125	141	42	0,7
	S8	184	28	32	30	35	25	34	63	57	64	0,6
2010	S9	279	70	51	22	56	42	38	126	93	60	0,6
	S10	250	44	37	42	37	50	40	81	87	82	0,6
	S11	353	60	62	60	56	69	46	116	131	106	0,6
2011	S12	345	67	49	54	55	50	70	122	99	124	0,6
	S13	356	59	67	57	60	62	51	119	129	108	0,6
2012	S14	425	56	86	69	69	73	72	125	159	141	0,6
	S15	326	59	40	55	60	51	61	119	91	116	0,6
	S16	460	80	99	75	68	72	66	148	171	141	0,6
2013	S17	384	65	73	49	60	77	60	125	150	109	0,6
	S18	450	62	89	79	70	80	70	132	169	149	0,6
2014	S19	427	75	68	74	66	75	69	141	143	143	0,6
	S20	356	75	58	47	73	56	47	148	114	94	0,6
	S21	375	49	85	60	62	66	53	111	151	113	0,6
2015	S22	416	67	80	65	68	77	59	135	157	124	0,6
	S23	350	55	59	66	64	58	48	119	117	114	0,6
2016	S24	389	71	67	64	77	52	58	148	119	122	0,6
	S25	371	74	62	64	59	54	58	133	116	122	0,6
	S26	311	62	46	57	62	32	52	124	78	109	0,6
	S27	347	57	59	65	67	53	46	124	112	111	0,6
Total		8573	1511	1576	1237	1495	1471	1163	3006	3047	2400	

[*] A geração S0 consistiu de 60 machos e 60 fêmeas que foram selecionados por seus escores no medo condicionado ao contexto para serem os progenitores da geração S1. Nenhum congelamento pré- e pós-choque foi registrado nessa geração.

3.2.3

Equipamentos

O condicionamento de medo ocorreu em quatro câmaras experimentais de Plexiglas ($25 \times 20 \times 20$ cm), um chão composto de 15 bastões de aço inoxidável de 4 mm de diâmetro com 1.5 cm entre elas conectadas a geradores de choque (Insight, São Paulo, Brasil), posicionadas dentro de caixas de isolamento acústico. Uma lâmpa vermelha (25 W) posicionada na parede traseira da caixa prove iluminação e uma câmara de vídeo posicionada de forma a obter uma imagem clara do animal permite que o comportamento seja observado em um monitor fora da sala experimental. O programa utilizado para coletar, mostrar e registrar as imagens coletadas foi o sistema de vigilância GeoVision (GeoVision GV800, PCI Systems). Um ventilador acoplado a parte interna da caixa prove um ruído de fundo de 78 dB (escala A). Uma vez a câmara iluminada, monitorada e ventilada, é posicionada a câmara experimental com paredes transparentes que permite que a imagem do animal seja visualizada por um experimentador na sala adjacente. Um multímetro foi utilizado para verificar as intensidades do choque antes de cada experimento. Ao fim do experimento, todos resíduos eram removidos e a câmara era limpa com uma solução de hidróxido de amônia 10%.

3.2.4

Procedimentos

Para desenvolver duas linhagens de ratos caracterizadas pelo alto e baixo medo condicionado denominadas Cariocas de Alto e Baixo Congelamento (CAC e CBC, respectivamente), foram selecionados 120 animais (60 machos e 60 fêmeas) aleatoriamente cruzados de nosso biotério. Esses animais constituem a geração inicial (S_0). Eles foram sujeitos ao protocolo de condicionamento de medo ao contexto que envolve dois dias de experimentos e cinco dias de manipulação prévia para habituar o animal ao pesquisador.

No primeiro dia de experimento o animal é colocado dentro da caixa de choque na câmara experimental, lhe é dado oito minutos para habituar-se ao ambiente onde é registrado seu nível de congelamento, provendo uma linha de base comportamental. Ao final desse período três choques elétricos sem nenhum

estímulo sinalizador são aplicados durando 1s cada um com uma latência de 20s entre eles, após o último choque inicia-se o registro do congelamento no período pós-choque que dura por mais três minutos na câmara experimental, em seguida os animais são retornados a suas gaiolas. Cerca de 24 horas depois, os animais são retornados a câmara experimental e são observados por oito minutos sem a aplicação de nenhum choque e seu congelamento condicionado é registrado.

Uma pontuação de congelamento do animal em cada minuto é produzida por observadores bem treinados com auxílio de um metrônomo e diante das imagens das quatro gaiolas experimentais. A cada 2s um metrônomo sinaliza a observação do próximo animal, se naquele instante o animal observado estiver o congelando (total ausência de movimento exceto os necessários a respiração) é marcado um ponto na folha de registro, se houver ausência de congelamento, é feito um risco.

Isso significa que a cada oito segundos, quatro ratos são observados. Esse ciclo de observação de cada animal ocorre 8 vezes em um minuto experimental, de forma que cada 'minuto' consiste de 64 segundos de observações (32 marcações representando, 8 por rato sendo 4 ratos).

Essa pontuação bruta é convertida então em uma porcentagem de tempo passado apresentando comportamento de congelamento dentro de cada minuto multiplicando-se a quantidade de pontos registrados para cada animal em cada minuto por uma constante, um escore de 8 equivale a 100% de congelamento naquele minuto, logo dividindo 100 por 8 obtém-se o valor de 12,5, a constante que é utilizada para obter a % através da multiplicação dos escores.

Ao todo existem 19 minutos experimentais onde o congelamento está sendo registrado. No primeiro dia, oito minutos onde o animal é exposto a câmara experimental (pré-choque) e três minutos após o último choque (pós-choque) e no segundo dia oito minutos no retorno a câmara (sessão teste).

O critério de fenotipagem escolhido para seleção foi a média de congelamento nos oito minutos da sessão teste. Os animais que apresentaram as maiores e menores médias de congelamento nos oito minutos da sessão teste foram escolhidos para serem os progenitores das linhagens Cariocas, e a partir da geração S₁, os maiores escores dentro dos CAC's os menores escores dentro dos CBC's foram utilizados para selecionar os progenitores da próxima geração

dentro dessas linhagens. Os CTL adicionados na geração S_5 são cruzados aleatoriamente.

Entre a geração S_0 à S_{13} o observador foi VCG; da S_{14} - S_{18} foi CEB; da S_{18} em diante a observadora foi a FR. O observador não está ciente das condições experimentais e todos experimentos são gravados para poderem ser comparados posteriormente. Pelas primeiras cinco gerações a intensidade do choque era 1.0 mA, de forma a evitar um efeito teto na resposta de congelamento ao choque e aumentar a variabilidade de respostas individuais, essa intensidade foi sendo ajustada, tendo sido reduzida para 0.7 mA na geração S_6 e para 0.6 mA na geração S_8 , intensidade que se mantém até hoje.

Nas gerações S_1 à S_4 era observado apenas um rato de cada vez. Na geração S_5 a S_8 ratos foram observados em pares e a partir da S_9 ratos começaram a ser observados em grupos de quarto.

A Figura 1 apresenta o procedimento de condicionamento utilizado, a observação é dividida em três períodos experimentais, pré-choque, pós-choque e sessão teste (ou teste) sendo o congelamento da sessão teste o utilizado para realizar a fenotipagem.

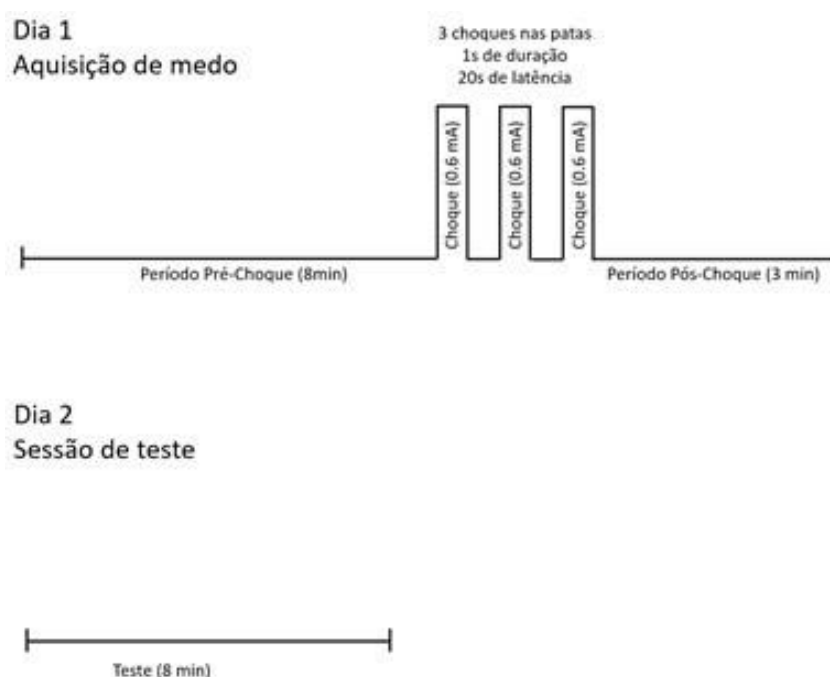


Figura 1. Esquema do procedimento de condicionamento de medo contextual utilizado na fenotipagem dos Cariocas. O escore de congelamento observado na sessão de teste é utilizado como critério para escolha dos progenitores da próxima geração.

3.3

Resultados

3.3.1

Análise do congelamento pré-choque (Habituação)

Os dados da resposta de congelamento no período do pré-choque obtidos das gerações S_1 à S_{27} foram analisados com uma ANOVA de duas vias, sendo a primeira via “linhagem”, com três níveis (CAC, CBC e CTL) e a segunda sendo “sexo”, com dois níveis (macho e fêmea). As análises *post-hoc* foram feitas com o teste da diferença estatisticamente menos significativa de Fisher (*Fisher's Least Significant Differences*, ou LSD) ou *Independent Samples T-Test*. Essas análises foram realizadas para cada geração e seus resultados foram dispostos nas Tabelas 6 e 7.

Tabela 6. Efeitos principais do sexo, linhagem e interação entre esses fatores para cada geração no congelamento durante o período pré-choque (habituação). Resultados considerados estatisticamente significativos ($p < 0,05$) foram realçados em cinza.

Efeitos Principais						
Geração (S)	Linhagem		Sexo		Interação	
	F	P	F	P	F	P
S1	F1,142=0.043	p=0.835	F1,142=0.114	p=0.735	F1,142=0.077	p=0.781
S2	F1,139=0.109	p=0.741	F1,139=0.043	p=0.835	F1,139=0.9	p=0.344
S3	F1,155=1.463	p=0.228	F1,155=3.104	p=0.08	F1,155=1.613	p=0.205
S4	F1,147=0.179	p=0.672	F1,147=0.388	p=0.534	F1,147=0.762	p=0.383
S5	F2,211=0.48182	p=0.618	F1,211=0.505	p=0.477	F2,211=0.38249	p=0.682
S6	F2,169=1.042	p=0.354	F1,169=0.033	p=0.854	F2,169= 0.898	p=0.409
S7	F2,302=1.307	p=0.272)	F1,302=0.048	p=0.826	F2,302=1.025	p=0.359
S8	F2,178=0.613	p=0.542	F1,178=1.159	p=0.283	F2,178=2.007	p=0.127
S9	F2,273=0.243	p=0.784	F1,273=1.316	p=0.252	F2,273=0.265	p=0.766
S10	F2,244=0.542	p=0.582	F1,244=0.000	p=1.000	F2,244=1.796	p=0.168
S11	F2,347=2.727	p=0.066	F1,347=2.498	p=0.114	F2,347=0.462	p=0.629
S12	F2,339=2.621	p=0.074	F1,339=0.075	p=0.783	F2,339=2.875	p=0.057
S13	F2,332=0.393	p=0.531	F2,332=1.309	p=0.271	F2,332=0.279	p=0.756
S14	F2,419=17.76	p<0.001	F1,419=1.53	p=0.21	F2,419=1.99	p=0.14
S15	F2,320=4.028	p=0.019	F1,320=0.026	p=0.873	F2,320=1.541	p=0.216
S16	F2,454=14.76	p<0.0005	F1,454=1.333	p=0.249	F2,454=2.482	p=0.085
S17	F2,378=3.672	p=0.026	F1,378=2.493	p=0.115	F2,378=2.024	p=0.134
S18	F2,444=15.854	p<0.0005	F1,444=0.022	p=0.883	F2,444=0.822	p=0.44
S19	F2,421=2.516	p=0.082	F1,421=6.476	p=0.011	F2,421=1.048	p=0.351
S20	F2,350=3.495	p=0.031	F1,350=2.563	p=0.11	F2,350=2.993	p=0.051
S21	F2,369=6.69	p=0.001	F1,369=1.134	p=0.288	F2,369=1.614	p=0.2
S22	F2,410=9.595	p<0.0005	F1,410=1.589	p=0.208	F2,410=2.138	p=0.119
S23	F2,344=4.295	p=0.014	F1,344=0.533	p=0.466	F2,344=1.651	p=0.193
S24	F2,383=13.199	p<0.0005	F1,383=1.931	p=0.165	F2,383=0.441	p=0.644
S25	F2,365=8.785	p<0.0005	F1,365=0.680	p=0.410	F2,365=0.059	p=0.942
S26	F2,305=2.112	p=0.123	F1,305=0.014	p=0.907	F2,305=0.999	p=0.369
S27	F2,341=7.075	p=0.001	F1,341=0.461	p=0.498	F2,341=0.034	p=0.967

Tabela 7. Análises Post-Hoc para detectar diferenças entre as linhagens durante o período pré-choque (habituação) foram feitas com Fisher's Least Significant Differences (LSD) a partir da quinta geração e com Independent Samples T-Test antes disso (T-Test). Finalmente os resultados de T-Test utilizado para verificar diferenças entre os sexos dentro das mesmas linhagens. Resultados considerados estatisticamente significativos ($p < 0,05$) foram realçados em cinza.

Post-Hoc									
T-Test para verificar diferenças entre os sexos para cada grupo							T-test entre CAC's e CBC's (S1 à S4) e LSD (S5 à S27) para investigar diferenças entre as três linhagens		
S	CAC		CBC		CTL		CAC-CBC	CAC-CTL	CBC-CTL
	T	P	T	P	T	P			
S1	t(73)=1.705	p=0.648	t(69)=0.063	p=0.968					t(144)=0.058 p=0.843
S2	t(70)=1.021	p=0.550	t(69)=1.393	p=0.466					t(141)=0.252 p=0.714
S3	t(78)=7.921	p=0.058	t(77)=0.82	p=0.691					t(157)=1.935 p=0.318
S4	t(64)=0.366	p=0.812	t(93)=23.912	p=0.029					t(159)=4.017 p=0.323
S5	t(48)=8.961	p=0.103	t(39)=4.109	p=0.171	t(58)=9	p=0.095	p=0.048	p=0.004	p=0.503
S6	t(51)=2.616	p=0.525	t(68)=0.002	p=0.925	t(48)=2.273	p=0.515	p=0.279	p=0.693	p=0.135
S7	t(123)=1.023	p=0.786	t(131)=5.692	p=0.131	t(40)=5.141	p=0.132	p=0.230	p=0.203	p=0.650
S8	t(58)=1.703	p=0.375	t(54)=4.555	p=0.168	t(62)=1.70	p=0.165	p=0.917	p=0.459	p=0.409
S9	t(124)=7.515	p=0.188	t(91)=0.155	p=0.819	t(58)=0.258	p=0.630	p=0.573	p=0.935	p=0.587
S10	t(79)=3.542	p=0.288	t(85)=4.183	p=0.254	t(80)=2	p=0.307	p=0.432	p=0.281	p=0.756
S11	t(114)=1.847	p=0.440	t(129)=10.48	p=0.065	t(104)=0.226	p=0.783	p=0.059	p=0.028	p=0.677
S12	t(120)=7.849	p=0.125	t(93)=6.379	p=0.209	t(122)=3.585	p=0.298	p=0.026	p=0.057	p=0.662
S13	t(98)=0.022	p=0.895	t(123)=3.935	p=0.297	t(103)=1.923	p=0.517	p=0.122	p=0.440	p=0.452
S14	t(123)=1.233	p=0.314	t(157)=4.721	p=0.190	t(139)=4.115	p=0.096	p<0.0005	p=0.012	p=0.001
S15	t(117)=0.058	p=0.931	t(89)=15.138	p=0.01	t(114)=1.691	p=0.317	p=0.004	p=0.604	p=0.019
S16	t(146)=2.245	p=0.120	t(169)=3.731	p=0.192	t(139)=0.767	p=0.520	p<0.0005	p<0.0005	p=0.563
S17	t(123)=5.509	p=0.080	t(148)=1.241	p=0.535	t(107)=4.997	p=0.297	p=0.007	p=0.055	p=0.539
S18	t(130)=0.005	p=0.891	t(167)=7.058	p=0.062	t(147)=0.376	p=0.387	p<0.0005	p=0.038	p=0.001
S19	t(139)=2.992	p=0.308	t(141)=2.324	p=0.387	t(141)=14.768	p=0.016	p=0.224	p=0.265	p=0.020
S20	t(146)=12.115	p=0.033	t(112)=10.053	p=0.131	t(92)=0.921	p=0.695	p=0.008	p=0.343	p=0.137
S21	t(109)=0.037	p=0.904	t(149)=0.609	p=0.706	t(111)=15.277	p=0.026	p<0.0005	p=0.076	p=0.071
S22	t(133)=8.079	p=0.118	t(155)=6.113	p=0.194	t(122)=0.175	p=0.927	p<0.0005	p=0.335	p=0.003
S23	t(117)=12.509	p=0.043	t(115)=1.199	p=0.598	t(112)=0.21	p=0.728	p=0.071	p=0.229	p=0.002
S24	t(146)=1.859	p=0.297	t(117)=16.328	p=0.021	t(120)=0.052	p=0.729	p<0.0005	p<0.0005	p=0.506
S25	t(131)=2.478	p=0.600	t(114)=2.28	p=0.205	t(120)=0.651	p=0.618	p<0.0005	p=0.002	p=0.350
S26	t(122)=1.534	p=0.403	t(76)=3.59	p=0.311	t(107)=5.261	p=0.376	p=0.046	p=0.404	p=0.225
S27	t(122)=0.735	p=0.661	t(110)=6.14	p=0.215	t(109)=0.474	p=0.708	p<0.0005	p=0.052	p=0.087

As médias de congelamento de cada linhagem ao longo das gerações no período de habituação (pré-choque) foram dispostas para machos (A) e fêmeas (B) na Figura 2.

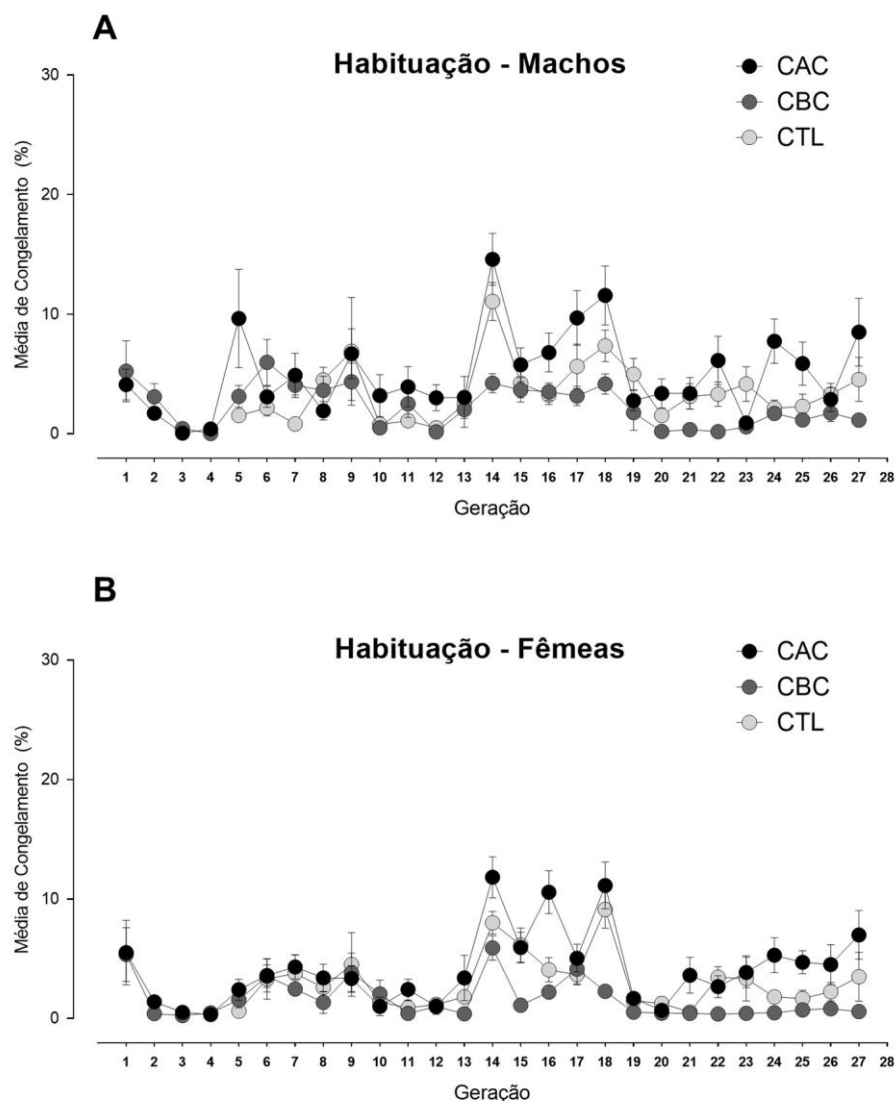


Figura 2. Porcentagem média (+EPM) de tempo dispendido na resposta de congelamento durante a sessão de aquisição, no período de habituação, de 27 gerações (S_1 - S_{27}) de ratos machos (A) e fêmeas (B) selecionados para níveis altos (CAC), baixos (CBC) ou médios da resposta de congelamento condicionada.

Uma análise dos resultados revelou que uma diferença significativa entre as linhagens no congelamento no período pré-choque foi observada pela primeira vez na geração S_{14} . Usamos como um critério empírico de considerar tais diferenças consistentes se o mesmo padrão de resultados se repetisse por pelo menos 3 gerações seguidas. Neste sentido, observamos que as diferenças entre as

linhagens se tornou estável da geração S_{14} até a geração S_{27} ; mostrando que ratos CAC diferem consistentemente dos CBC's, CTL's diferem de forma mais e menos intermitente com CBC's e CAC's respectivamente.

3.3.2

Análise do congelamento pós-choque

Os dados da resposta de congelamento no período do pós-choque obtidos das gerações S_1 à S_{27} foram analisados com uma ANOVA de duas vias, sendo a primeira via “linhagem”, com três níveis (CAC, CBC e CTL) e a segunda sendo “sexo”, com dois níveis (macho e fêmea). As análises *post-hoc* foram feitas com o teste da diferença estatisticamente menos significativa de Fisher (*Fisher's Least Significant Differences*, ou LSD) ou *Independent Samples T-Test*. Essas análises foram realizadas para cada geração e seus resultados foram dispostos nas Tabelas 8 e 9.

As médias de congelamento de cada linhagem no período de aquisição da resposta de congelamento (pós-choque) foram dispostas para machos (A) e fêmeas (B) na Figura 3.

Tabela 8. Efeitos principais do sexo, linhagem e interação entre esses fatores para cada geração no congelamento durante o período pós-choque. Resultados considerados estatisticamente significativos ($p < 0,05$) foram realçados em cinza.

Efeitos Principais						
S	Linhagem		Sexo		Interação	
	F	P	F	P	F	P
S1	F1,142=0.588	p=0.444	F1,142=0.218	p=0.641	F1,142=0.107	p=0.743
S2	F1,139=1.418	p=0.235	F1,139=0.602	p=0.439	F1,139=1.66	p=0.199
S3	F1,155=0.157	p=0.692	F1,155=1.200	p=0.275	F1,155=0.52	p=0.471
S4	F1,147=6.2	p<0.0005	F1,147=3.516	p=0.063	F1,147=0.066	p=0.797
S5	F2,211=13.101	p<0.0005	F2,211=1.24	p=0.266	F2,11=1.824	p=0.163
S6	F2,169=1.042	p=0.354	F1,169=0.033	p=0.854	F2,169=0.898	p=0.409
S7	F2,302=12.123	p<0.0005	F1,302=4.508	p<0.05	F2,302=0.522	p=0.593
S8	F2,178=4.581	p=0.011	F1,178=0.416	p=0.519	F2,178=0.997	p=0.371
S9	F2,273=5.550	p<0.05	F1,273=0.920	p=0.338	F2,273=1.956	p=0.143
S10	F2,244=13.927	p<0.0005	F1,244=3.197	p=0.075	F2,244=0.391	p=0.676
S11	F2,347=10.399;	p<0.0005	F1,347=5.383	p<0.05	F2,347=6.763	p<0.0005
S12	F2,339=20.269	p<0.0005	F1,339=14.023	p<0.0005	F2,339=0.43	p=0.65
S13	F2,332=5.257	p<0.05	F1,332=0.525	p=0.469	F2,332=0.322	p=0.724
S14	F2,419=17.12	p<0.001	F1,419=0.28	p<0.6	F2,419=2.84	p=0.06
S15	F2,320=17.365	p<0.0005	F1,320=9.962	p=0.002	F2,320=1.480	p=0.229
S16	F2,454=60.901	p<0.0005	F1,454=0.26	p=0.611	F2,454=4.160	p=0.016
S17	F2,378=104.87	p<0.0005	F1,378=0.001	p=0.977	F2,378=1.226	p=0.295
S18	F2,444=132.658	p<0.0005	F1,444=2.564	p=0.11	F2,444=0.65	p=0.522
S19	F2,421=139.706	p<0.0005	F1,421=0.938	p=0.333	F2,421=0.797	p=0.451
S20	F2,350=137.576	p<0.0005	F1,350=14.28	p<0.0005	F2,350=1.395	p=0.249
S21	F2,369=163.618	p<0.0005	F1,369=4.064	p=0.045	F2,369=0.138	p=0.871
S22	F2,410=256.233	p<0.0005	F1,410=12.493	p<0.0005	F2,410=3.041	p=0.049
S23	F2,344=151.370	p<0.0005	F1,344=0.023	p=0.880	F2,344=0.009	p=0.991
S24	F2,383=230,173	p<0.0005	F1,383=3.9	p=0.049	F2,383=3.371	p=0.035
S25	F2,365=151.876	p<0.0005	F1,365=0.419	p=0.518	F2,365=0.564	p=0.570
S26	F2,305=119.608	p<0.0005	F1,305=2.839	p=0.09	F2,305=0.417	p=0.659
S27	F2,341=142.869	p<0.0005	F1,341=2.920	p=0.088	F2,341=4.824	p=0.009

Tabela 9. Análises Post-Hoc para detectar diferenças entre as linhagens durante o período pós-choque foram feitas com *Fisher's Least Significant Differences (LSD)* a partir da quinta geração e com *Independent Samples T-Test* antes disso (T-Test). Finalmente os resultados de T-Test utilizado para verificar diferenças entre os sexos dentro das mesmas linhagens. Resultados considerados estatisticamente significativos ($p < 0,05$) foram realçados em cinza

Post-Hoc									
T-Test para verificar diferenças entre os sexos para cada grupo						T-test entre CAC's e CBC's (S1 à S4) e LSD (S5 à S27) para investigar diferenças entre as três linhagens			
S	CAC		CBC		CTL		CAC-CBC	CAC-CTL	CBC-CTL
	T	P	T	P	T	P			
S1	t(73)=0.474	p=0.930	t(69)=0.294	p=0.514				t(144)=4.615	p=0.433
S2	t(70)=0.152	p=0.161	t(69)=0.126	p=0.709				t(141)=0.522	p=0.221
S3	t(78)=1.397	p=0.783	t(77)=4.986	p=0.222				t(157)=0.033	p=0.752
S4	t(64)=2.662	p=0.356	t(93)=0.027	p=0.026				t(159)=10.213	p<0.0005
S5	t(48)=1.382	p=0.476	t(39)=0.967	p=0.505	t(58)=0.439	p=0.918	p<0.0005	p=0.008	p<0.060
S6	t(51)=0.524	p=0.442	t(68)=1.940	p=0.274	t(48)=0.472	p=0.942	p=0.49	p=0.07	p=0.993
S7	t(123)=3.183	p=0.118	t(134)=4.174	p=0.027	t(40)=0.129	p=0.598	p<0.0005	p=0.199	p<0.0005
S8	t(58)=0.746	p=0.764	t(54)=0.186	p=0.437	t(62)=0.093	p=0.557	p=0.032	p=0.512	p=0.006
S9	t(124)=2.142	p=0.053	t(91)=10.09	p=0.210	t(58)=0.512	p=0.236	p=0.002	p=0.9	p=0.016
S10	t(79)=5.634	p=0.055	t(85)=4.391	p=0.357	t(80)=2.099	p=0.687	p<0.0005	p=0.008	p=0.005
S11	t(114)=0.067	p=0.906	t(129)=10.879	p<0.0005	t(104)=0.157	p=0.892	p<0.0005	p=0.286	p=0.001
S12	t(120)=18.344	p=0.003	t(97)=1.896	p=0.04	t(122)=4.348	p=0.145	p<0.0005	p=0.407	p<0.0005
S13	t(98)=0.536	p=0.508	t(123)=0.691	p=0.666	t(103)=0.060	p=0.450	p<0.0005	p=0.418	p=0.005
S14	t(123)=8.662	p=0.022	t(157)=0.706	p=0.924	t(139)=1.671	p=0.072	p<0.0005	p=0.837	p=0.001
S15	t(117)=2.494	p=0.024	t(89)=2.512	p=0.044	t(114)=2.344	p=0.474	p<0.0005	p=0.740	p<0.0005
S16	t(146)=2.736	p=0.693	t(169)=6.126	p=0.062	t(139)=10.42	p=0.045	p<0.0005	p=0.534	p<0.0005
S17	t(123)=3.648	p=0.323	t(148)=0.051	p=0.552	t(107)=3.104	p=0.069	p<0.0005	p=0.326	p<0.0005
S18	t(130)=7.693	p=0.007	t(167)=0.005	p=0.268	t(147)=0.758	p=0.986	p<0.0005	p=0.459	p<0.0005
S19	t(139)=1.648	p=0.681	t(141)=4.873	p=0.731	t(141)=4.207	p=0.051	p<0.0005	p=0.636	p<0.0005
S20	t(146)=9.928	p=0.064	t(112)=1.03	p=0.004	t(92)=3.029	p=0.096	p<0.0005	p=0.312	p<0.0005
S21	t(109)=10.280	p=0.079	t(149)=0.732	p=0.47	t(111)=3.382	p=0.195	p<0.0005	p=0.050	p<0.0005
S22	t(133)=1.195	p=0.256	t(155)=2.512	p=0.002	t(122)=5.420	p=0.073	p<0.0005	p=0.951	p<0.0005
S23	t(117)=0.002	p=0.977	t(115)=0.036	p=0.925	t(112)=0.179	p=0.840	p<0.0005	p=0.875	p<0.0005
S24	t(146)=2.459	p=0.851	t(117)=10.264	p=0.029	t(120)=0.124	p=0.778	p<0.0005	p=0.09	p<0.0005
S25	t(131)=0.755	p=0.468	t(114)=10.776	p=0.377	t(120)=0.651	p=0.819	p<0.0005	p<0.0005	p<0.0005
S26	t(122)=0.752	p=0.677	t(76)=0.851	p=0.327	t(120)=0.652	p=0.820	p<0.0005	p=0.431	p<0.0005
S27	t(122)=3.030	p=0.337	t(114)=12.163	p=0.009	t(109)=0.064	p=0.751	p<0.0005	p=0.210	p<0.0005

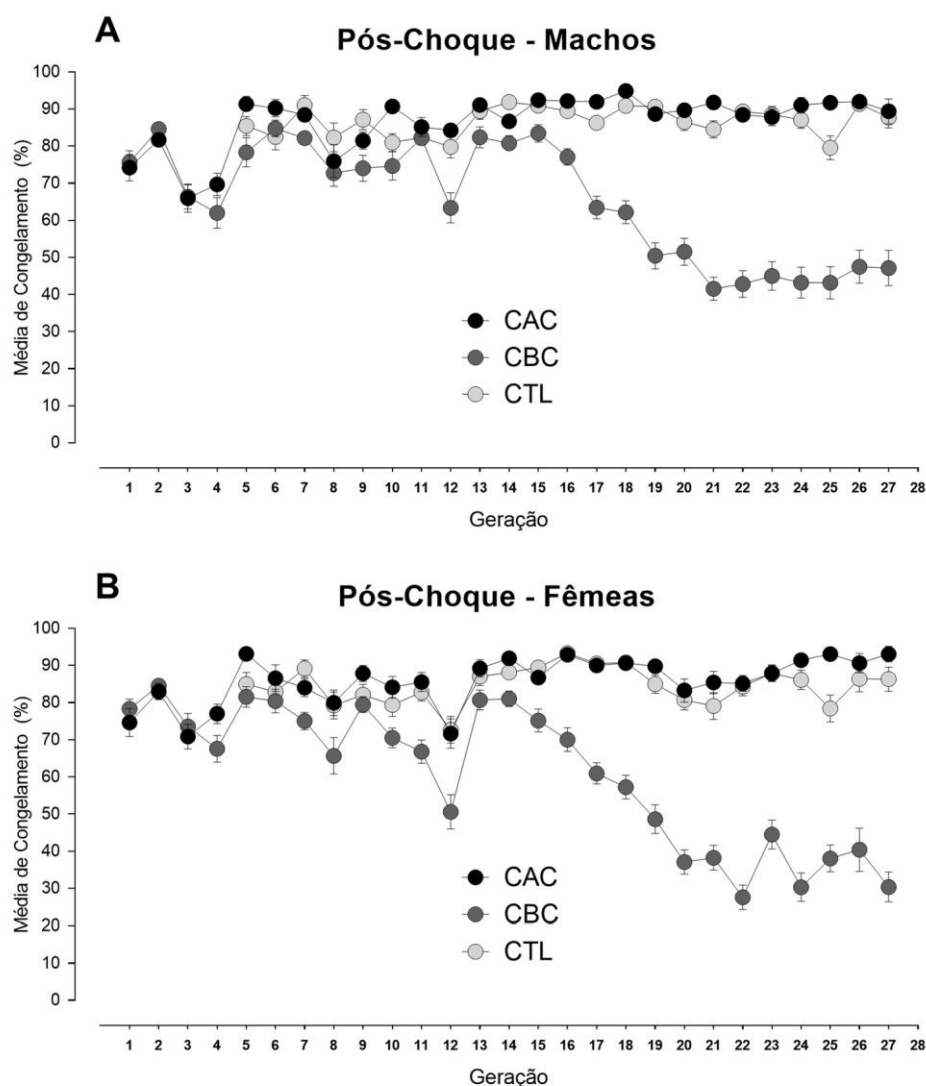


Figura 3. Porcentagem média (+EPM) de tempo dispendido na resposta de congelamento durante a sessão de aquisição, no período do pós-choque, de 27 gerações (S₁-S₂₇) de ratos machos (A) e fêmeas (B) selecionados para níveis altos (CAC), baixos (CBC) ou médios da resposta de congelamento condicionada.

Uma análise dos resultados revelou que uma diferença significativa entre as linhagens no congelamento no período pós-choque foi observada pela primeira vez na geração S₄. Usamos como um critério empírico de considerar tais diferenças consistentes se o mesmo padrão de resultados se repetisse por pelo menos 3 gerações seguidas. Neste sentido, observamos que as diferenças entre as linhagens se tornou estável da geração S₇ até a geração S₂₇; mostrando que o grupo CBC tem significativamente menos congelamento nesta fase do protocolo do que os grupos CAC e CTL, que não diferiram entre si.

3.3.3

Análise do congelamento na sessão teste

Os dados da resposta de congelamento no período da sessão teste obtidos das gerações S_1 à S_{27} foram analisados com uma ANOVA de duas vias, sendo a primeira via “linhagem”, com três níveis (CAC, CBC e CTL) e a segunda sendo “sexo”, com dois níveis (macho e fêmea), também foi realizada uma ANCOVA utilizando as médias pré- e pós-choque de cada geração como covariáveis para verificar se diferenças no primeiro dia de experimentos afetaram a performance na sessão teste. As análises *post-hoc* foram feitas com o teste da diferença estatisticamente menos significativa de Fisher (*Fisher's Least Significant Differences*, ou LSD) ou *Independent Samples T-Test*. Essas análises foram realizadas para cada geração e seus resultados foram dispostos nas Tabelas 10 e 11.

Tabela 10. Efeitos principais dos fatores sexo, linhagem e interação entre esses fatores para cada geração para o congelamento na sessão de teste. A ANCOVA mostra esses mesmos efeitos quando controlados para as médias de pré e pós-choque.

S	ANOVA						ANCOVA					
	Linhagem		Sexo		Interação		Linhagem		Sexo		Interação	
	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P
S1	F1,142=0.283	p=0.595	F1,142=5.197	p<0.05	F1,142=0.032	p=0.857	F1,141=0.263	p=0.609	F1,141=5.2	p<0.05	F1,141=0.3	p=0.864
S2	F1,139=3.298	p=0.071	F1,139=4.044	p=0.046	F1,139=0.274	p=0.6	F1,138=3.232	p=0.74	F1,138=3.991	p<0.05	F1,138=0.273	p=0.602
S3	F1,155=43.758	p<0.001	F1,155=4.072	p<0.05	F1,155=0.207	p=0.65	F1,154=43.541	p<0.001	F1,154=4.09	p<0.05	F1,154=0.217	p=0.642
S4	F1,147=60.160	p<0.001	F1,147=10.393	p<0.001	F1,147=0.093	p=0.76	F1,146=51.426	p<0.001	F1,146=15.913	p<0.001	F1,146=0.55	p=0.815
S5	F2,211=26.400	p<0.001	F1,211=28.259	p<0.001	F2,211=0.821	p=0.441	F1,210=17.771	p<0.001	F1,210=32.418	p<0.001	F2,210=1.252	p=0.288
S6	F2,169=7.422	p<0.001	F1,169=14.321	p<0.001	F2,169=0.153	p=0.858	F2,168=5.882	p<0.001	F1,168=13.165	p<0.001	F2,168=173.703	p=0.71
S7	F2,302=14.152	p<0.001	F1,302=14.233	p<0.001	F2,302=2.850	p=0.594	F2,301=10.632	p<0.001	F2,301=10.526	p<0.001	F2,301=2.409	p=0.92
S8	F2,178=3.371	p<0.05	F1,178=8.003	p<0.05	F2,178=0.620	p=0.538	F2,177=1.362	p=0.259	F1,177=7.643	p<0.05	F2,177=0.617	p=0.541
S9	F2,273=28.206	p<0.001	F1,273=6.463	p<0.05	F2,273=0.597	p=0.551	F2,272=26.042	p<0.001	F1,272=9.152	p<0.001	F2,272=0.437	p=0.646
S10	F2,244=18.902	p<0.001	F1,244=13.516	p<0.001	F2,244=5.552	p<0.05	F2,243=10.88	p<0.001	F1,243=10.856	p<0.001	F2,243=6.301	p<0.05
S11	F2,347=23.121	p<0.001	F1,347=33.379	p<0.001	F2,347=0.474	p=0.622	F2,346=15.761	p<0.001	F1,346=27.801	p<0.001	F2,346=1.724	p=0.18
S12	F2,339=18.128	p<0.001	F1,339=41.856	p<0.001	F2,339=0.071	p=0.931	F2,338=10.297	p<0.001	F1,338=31.055	p<0.001	F2,338=0.195	p=0.823
S13	F2,332=36.372	p<0.001	F2,332=20.8	p=0.001	F2,332=3.207	p<0.05	F2,331=5.154	p<0.05	F1,331=0.514	p=474	F2,331=0.324	p=0.723
S14	F2,419=67.23	p<0.001	F1,419=25.65	p<0.001	F2,419=3.994	p<0.05	F2,418=54.065	p<0.001	F1,418=30.06	p<0.001	F2,418=2.577	p=0.77
S15	F2,320=53.057	p<0.0005	F1,320=48.557	p<0.0005	F2,320=1.188	p=0.306	F2,318=41.774	p<0.0005	F1,318=41.820	p<0.0005	F2,318=0.611	p=0.544
S16	F2,454=147.080	p<0.0005	F,454=66.772	p<0.0005	F2,454=5.272	p=0.005	F2,452=88.417	p<0.0005	F1,452=77.671	p<0.0005	F2,452=8.636	p<0.0005
S17	F2,378=177.678	p<0.0005	F1,378=25.573	p<0.0005	F2,378=2.362	p=0.096	F2,376=86.320	p<0.0005	F1,376=25.814	p<0.0005	F2,376=1.540	p=0.216
S18	F2,444=181.835	p<0.0005	F1,444=52.768	p<0.0005	F2,444=3.363	p=0.036	F2,419=81.565	p<0.0005	F1,419=55.597	p<0.0005	F2,419=6.121	p=0.002
S19	F2,421=214.927	p<0.0005	F1,421=2.024	p<0.0005	F2,421=4.848	p=0.008	F2,419=124.031	p<0.0005	F1,419=0.591	p=0.443	F2,419=4.304	p=0.014
S20	F2,350=206.682	p<0.0005	F1,350=35.599	p<0.0005	F2,350=3.017	p=0.050	F2,348=99.814	p<0.0005	F1,348=24.120	p<0.0005	F2,348=3.535	p=0.030
S21	F2,369=216.656	p<0.0005	F1,369=20.196	p<0.0005	F2,369=4.866	p=0.008	F2,367=98.134	p<0.0005	F1,367=15.319	p<0.0005	F2,367=4.419	p=0.013
S22	F2,410=190.518	p<0.0005	F1,410=29.355	p<0.0005	F2,410=4.874	p=0.008	F2,408=46.794	p<0.0005	F1,408=19.795	p<0.0005	F2,408=7.092	p=0.001
S23	F2,344=257.821	p<0.0005	F1,344=31.342	p<0.0005	F2,344=6.451	p=0.002	F2,342=129.730	p<0.0005	F1,342=36.739	p<0.0005	F2,342=7.293	p=0.001
S24	F2,383=178.324	p<0.0005	F1,383=18.418	p<0.0005	F2,383=0.129	p=0.879	F2,381=61.383	p<0.0005	F1,381=13.515	p<0.0005	F2,381=0.865	p=0.422
S25	F2,365=139.369	p<0.0005	F1,365=10.059	p=0.002	F2,365=1.041	p=0.354	F2,363=47.579	p<0.0005	F1,363=9.530	p=0.002	F2,363=0.668	p=0.513
S26	F2,305=103.630	p<0.0005	F1,305=14.753	p<0.0005	F2,305=0.05	p=0.951	F2,303=50.141	p<0.0005	F1,303=35.168	p<0.0005	F2,303=0.39	p=0.667
S27	F2,341=208.113	p<0.0005	F1,341=15.723	p<0.0005	F2,341=0.207	p=0.024	F2,339=46.031	p<0.0005	F1,339=12.739	p<0.0005	F2,339=6.089	p=0.003

Tabela 11. Análises Post-Hoc para detectar diferenças entre as linhagens foram feitas com o método LSD a partir da quinta geração e T-Test antes disso. Finalmente os resultados de T-Test utilizado para verificar diferenças entre os sexos dentro das mesmas linhagens.

	Post-Hoc								
S	T-Test para verificar diferenças entre os sexos para cada grupo						T-test entre CAC's e CBC's (S1 à S4) e LSD (S5 à S27) para investigar diferenças entre as três linhagens		
	CAC		CBC		CTL		CAC-CBC	CAC-CTL	CBC-CTL
	T	P	T	P	T	P			
S1	t(73)=10.923	p=0.123	t(69)=0.045	p=0.085			t(141)=22.506 p=0.596		
S2	t(70)=1.161	p=0.223	t(69)=0.099	p=0.117			t(141)=32.475 p=0.079		
S3	t(78)=0.115	p=0.277	t(77)=0.490	p=0.081			t(157)=0.944 p<0.0005		
S4	t(64)=7.863	p=0.013	t(93)=10.071	p=0.001			t(159)=13.152 p<0.0005		
S5	t(48)=0.587	p=0.048	t(39)=4.702	p=0.003	t(58)=0.001	p=0.037	p=0.001	p<0.0005	p=0.546
S6	t(51)=0.695	p=0.111	t(68)=1.227	p=0.024	t(48)=0.595	p=0.008	p=0.019	p<0.0005	p=0.122
S7	t(123)=0.677	p=0.051	t(134)=2.695	p<0.0005	t(40)=0.183	p=0.416	p<0.0005	p=0.003	p=0.569
S8	t(58)=2.786	p=0.007	t(54)=0.850	p=0.095	t(62)=1.233	p=0.014	p=0.048	p=0.889	p=0.034
S9	t(124)=0.346	p=0.480	t(91)=1.673	p=0.025	t(58)=2.838	p=0.099	p<0.0005	p<0.0005	p=0.497
S10	t(79)=1.225	p=0.039	t(85)=0.162	p=0.650	t(80)=13.049	p<0.0005	p<0.0005	p=0.003	p=0.001
S11	t(114)=7.080	p<0.0005	t(129)=7.610	p<0.0005	t(104)=7.677	p=0.009	p<0.0005	p=0.001	p=0.001
S12	t(120)=7.369	p=0.002	t(93)=30.762	p<0.0005	t(122)=8.035	p<0.0005	p<0.0005	p=0.001	p=0.001
S13	t(98)=0.133	p=0.160	t(123)=18.792	p<0.0005	t(103)=0.957	p=0.139	p<0.0005	p<0.0005	p<0.0005
S14	t(123)=1.773	p=0.170	t(157)=2.193	p=0.022	t(139)=0.185	p<0.0005	p<0.0005	p<0.0005	p<0.0005
S15	t(117)=4.360	p=0.001	t(89)=1.784	p<0.0005	t(114)=9.327	p=0.001	p<0.0005	p<0.0005	p<0.0005
S16	t(146)=1.869	p=0.002	t(169)=8.576	p<0.0005	t(139)=16.506	p<0.0005	p<0.0005	p<0.0005	p<0.0005
S17	t(123)=7.539	p<0.0005	t(148)=13.032	p=0.021	t(107)=1.415	p=0.095	p<0.0005	p<0.0005	p<0.0005
S18	t(130)=4.072	p<0.0005	t(167)=8.692	p=0.008	t(147)=0.395	p<0.0005	p<0.0005	p<0.0005	p<0.0005
S19	t(139)=0.846	p=0.393	t(141)=11.961	p=0.020	t(141)=12.186	p=0.007	p<0.0005	p<0.0005	p<0.0005
S20	t(146)=1.345	p<0.0005	t(112)=16.194	p=0.004	t(92)=0.704	p=0.008	p<0.0005	p<0.0005	p<0.0005
S21	t(109)=0.003	p=0.062	t(149)=3.720	p=0.282	t(111)=22.094	p<0.0005	p<0.0005	p<0.0005	p<0.0005
S22	t(133)=1.499	p=0.001	t(155)=6.688	p=0.074	t(122)=1.998	p=0.001	p<0.0005	p<0.0005	p<0.0005
S23	t(117)=9.409	p=0.003	t(115)=4.845	p=0.215	t(112)=2.751	p<0.0005	p<0.0005	p<0.0005	p<0.0005
S24	t(146)=0.418	p=0.011	t(117)=19.749	p=0.002	t(120)=4.608	p=0.021	p<0.0005	p<0.0005	p<0.0005
S25	t(131)=0.334	p=0.368	t(114)=43.901	p<0.0005	t(120)=2.938	p=0.150	p<0.0005	p<0.0005	p<0.0005
S26	t(122)=0.191	p=0.016	t(76)=9.325	p=0.005	t(107)=0.038	p=0.030	p<0.0005	p<0.0005	p<0.0005
S27	t(122)=0.505	p=0.185	t(110)=5.539	p=0.115	t(109)=5.772	p<0.0005	p<0.0005	p<0.0005	p<0.0005

As médias de congelamento de cada linhagem no período de retorno ao contexto aversivo (sessão teste) foram dispostas para machos (A) e fêmeas (B) na Figura 4.

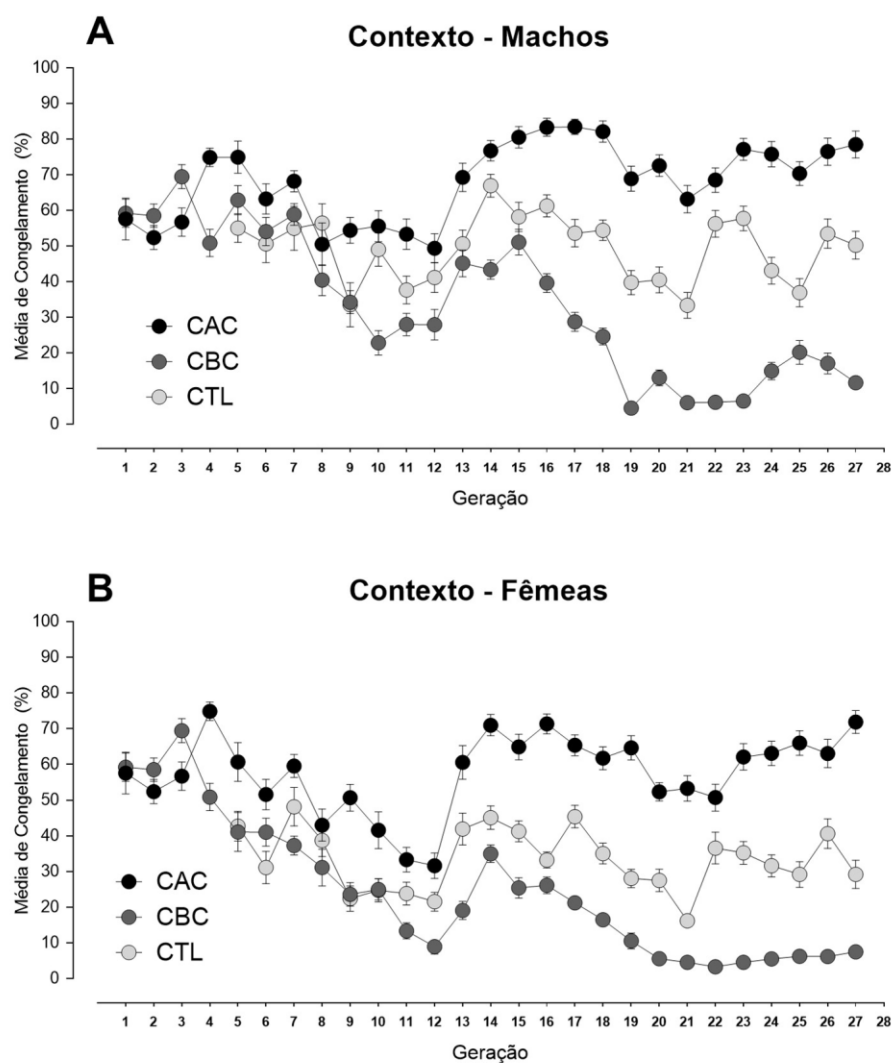


Figura 4. Porcentagem média (+EPM) de tempo dispendido na resposta de congelamento durante a sessão teste (congelamento contextual) de 27 gerações (S₁-S₂₇) de ratos machos (A) e fêmeas (B) selecionados para níveis altos (CAC), baixos (CBC) ou médios da resposta de congelamento condicionada.

4

Estudo II

Estrutura fatorial do protocolo de seleção genética das linhagens “Cariocas”

4.1

Objetivos

O objetivo do estudo II foi o de investigar a estrutura fatorial do protocolo de seleção genética para melhor compreender quais construtos estão sendo representados pelas variáveis. Para isso, foi considerado cada minuto registrado durante os dois dias do protocolo (totalizando 19 variáveis) de ratos da geração S_5 à S_{27} (7854 animais) como sendo uma variável distinta; foi empregado um método de redução de variáveis para delinear as dimensões a que cada comportamento pertence e a carga única que cada variável possui para aquela dimensão.

4.2

Método

O método utilizado para explorar a estrutura fatorial subjacente ao protocolo de condicionamento de medo ao contexto empregado na fenotipagem das linhagens cariocas foi a análise de componentes principais (*Principal Component Analysis*, ou PCA/ACP), uma técnica de redução de variáveis que possui similaridades com a análise fatorial exploratória. Os dados selecionados foram as 19 variáveis de congelamento coletadas entre as gerações S_5 à S_{27} (8 minutos pré-choque, 3 minutos pós-choque e 8 minutos de retorno ao contexto). Como a partir da geração S_5 foram introduzidos os ratos CTL e se estabeleceu um protocolo de coleta de dados que se manteve uniforme desde então, ela foi escolhida como ponto de partida para o ACP.

O método de Kaiser foi escolhido para determinar quantos componentes seriam retidos, ele é o mais recomendado para amostras grandes com menos que 30 variáveis e consiste de adotar os componentes com valor superior a 1 em seu Eigenvalue. Feita essa decisão, foi necessário decidir no método de rotação dos fatores. Quando acredita-se haver correlações entre os construtos subjacentes uma

rotação oblíqua é recomendada (FIELD, 2013). O método utilizado foi o Direct Oblimin com delta de 0.

4.3

Resultados

A análise dos componentes principais foi então realizada utilizando as 19 variáveis de congelamento de 7854 ratos das gerações S_5 à S_{27} . A viabilidade do PCA foi investigada anterior a análise. A inspeção da matriz de correlação mostrou que todas as variáveis possuíam pelo menos um coeficiente de correlação acima de 0.3. O escore do teste KMO para toda amostra foi 0.897 e os escores de KMO para todas variáveis foi superior a 0.8, o que é considerado excelente segundo Kaiser (1974). O teste de esfericidade Bartlett foi estatisticamente significativo ($p < 0.0005$), indicando que os dados eram capazes de serem transformados em fatores. Uma rotação oblíqua Direct Oblimin foi utilizada para aumentar a interpretabilidade dos dados (KAISER, 1974).

O PCA revelou quatro componentes que tinham Eigenvalues maior que um e que explicavam respectivamente 37.7%, 19.7%, 8.1% e 6.3% da variância total. Os quatro componentes em conjunto explicam 72.077% da variância total da amostra. As cargas dos componentes da matriz de padrão rotacionada, assim como comunalidades, valor de KMO e alpha de cronbach se o item for excluído de cada variável são apresentados na Tabela 12.

A interpretação dos componentes 1 e 3 foi consistente com os parâmetros psicológicos que o paradigma se propõe a investigar, com fortes cargas nas oito variáveis que representam a memória aversiva criada pelo condicionamento de medo ao contexto no componente 1 e as três variáveis relacionadas a aquisição da resposta de congelamento no componente 3.

Já as variáveis relacionadas ao período de habituação foram dispersas em dois componentes, os quatro minutos finais do período de habituação carregaram no componente 2 enquanto os minutos iniciais carregaram no componente 4. Esses dois componentes mostram há dois constructos distintos sendo medidos durante esse período de habituação. Possivelmente os minutos iniciais que carregam no componente 4 representam uma avaliação inicial do meio enquanto que os minutos finais que carregam no componente 2 representam uma transição

entre essa avaliação inicial para uma manutenção dessa memória contextual dinâmica

Tabela 12. Distribuição das 19 variáveis de congelamento (8 mins pré-choque, 3 mins pós-choque e 8 mins na sessão teste) ao longo dos componentes extraídos. Valores considerados extremamente significativos (>.5) foram realçados, porem segundo Andy Field (2013) com uma amostra tão grande, cargas ainda menores (>.162) podem ser consideradas significativas.

Item	Fator 1	Fator 2	Fator 3	Fator 4	Comunalidades	Alfa de Cronbach se o item for excluído	KMO de cada variável
Teste_7	,896	-,006	-,087	,011	,734	,897	,906 ^a
Teste_6	,892	-,005	-,046	-,003	,754	,896	,928 ^a
Teste_5	,884	,011	-,008	-,019	,772	,895	,932 ^a
Teste_8	,858	-,004	-,087	,022	,675	,898	,930 ^a
Teste_4	,849	,020	,046	-,037	,755	,895	,935 ^a
Teste_3	,821	,013	,088	-,018	,752	,895	,932 ^a
Teste_2	,789	,009	,107	-,001	,720	,896	,921 ^a
Teste_1	,716	-,014	,115	,054	,624	,898	,945 ^a
Pré_7	,013	,891	,011	-,064	,750	,908	,830 ^a
Pré_8	,012	,832	,004	-,077	,642	,909	,884 ^a
Pré_6	,015	,815	,004	,078	,735	,908	,866 ^a
Pré_5	,011	,598	-,007	,314	,633	,908	,883 ^a
Pós_2	-,024	,013	,949	-,005	,879	,903	,800 ^a
Pós_3	-,004	,030	,917	-,012	,840	,903	,829 ^a
Pós_1	,063	-,041	,810	,028	,712	,904	,937 ^a
Pré_2	,003	-,040	,004	,890	,761	,908	,822 ^a
Pré_1	,029	-,108	,009	,825	,621	,909	,854 ^a
Pré_3	,000	,157	,016	,753	,704	,908	,863 ^a
Pré_4	,004	,365	-,005	,556	,630	,908	,869 ^a
Eigenvalue			7,178	3,756	1,555	1,206	
Variância (%)			37,779	19,769	8,183	6,346	
Alpha de Cronbach			,944	,842	,879	,825	
Kaiser-Meyer-Olkin			,897				
Variância (%) total			72,077				
Bartlett			0,000				
Approx. Chi-Square			104300,651				
df			171				

5

Estudo III

Segregação da resposta de congelamento no período pré-choque

5.1

Objetivos

No estudo II o período pré-choque apresentou dois componentes; o componente 2 representado pelos *últimos* quatro minutos do congelamento pré-choque e o componente 4 representando os *primeiros* quatro minutos de congelamento pré-choque. Os minutos finais do pré-choque explicando mais variância que os iniciais ou o pós-choque, motivaram investigar a segregação do padrão de congelamento ao longo de cada minuto no período de habituação de forma a melhor compreender esses dois componentes. O objetivo é dual, (1) observar as diferenças entre os grupos ao longo do período de habituação e (2) investigar visualmente diferenças nos padrões de congelamento entre o período inicial e final da habituação que ajudem compreender os dois componentes extraídos.

5.2

Método

No estudo II observa-se que o congelamento no retorno ao contexto e o pós-choque são modelados por componentes distintos e bem representativos de seus resultados enquanto no período pré-choque dois componentes, um representando os primeiros quatro minutos que o rato se encontra na câmara experimental e outro que representa os últimos quatro minutos. Esses resultados, em especial a parcela final do Pré-Choque explicar mais variância do que a inicial e que o período pós-choque, motivaram uma análise mais profunda do período pré-choque, em busca de confirmação visual da existência desses componentes. Para este fim denominados as variáveis contidas no componente 4 de Pré I e as contidas no componente 2 de Pré II.

Neste sentido, foram analisadas as médias de congelamento de cada variável contida nas duas dimensões segregadas (componente 4 ou Pré I –

primeiros quatro minutos na caixa de choque; componente 2 ou Pré II – últimos quatro minutos na caixa de choque), de todos os grupos, das gerações S_5 à S_{27} (mesma amostra utilizada no PCA), foi analisada com uma ANOVA de medidas repetidas utilizando componente como fator ‘*within*’ sujeitos e linhagem como fator ‘*between*’ sujeitos.

Para possibilitar a visualização dos componentes e esclarecer as diferenças entre grupos construímos três gráficos, todos eles mostram no eixo Y a média de tempo dispendido congelando (em %). O primeiro (Figura 5) mostra em colunas as médias totais de congelamento de cada linhagem para os componentes 2 e 4.

O segundo gráfico mostra a mesma informação que o anterior desta vez segregada por sexo (Figura 6). O terceiro é um gráfico de linha que mostra a média de congelamento para cada grupo em cada minuto do período de habituação.

5.3

Resultados

Uma ANOVA mista usando os escores de regressão dos componente 4 e 2 (Pré I e Pré II) como dois momentos de medição para criar o fator intra sujeitos e “linhagem” como fator entre sujeitos revelou a existência de uma interação significativa entre estes fatores, assim como efeitos principais para componente e linhagem (todos $p < 0.0001$). Uma comparação post-hoc com um teste t pareado revelou diferenças entre os componentes 4 e 2 nas linhagens CBC e CTL, com um aumento de congelamento com o passar do tempo na caixa de choque ($p < 0.0001$). Não houve diferença significativa entre os componentes no grupo CAC ($p = 0,616$). O teste t pareado revelou correlações significativas entre as variáveis contidas no Pré I e no Pré II para as três linhagens, CAC’s ($r = .63$, $p < 0.0005$), CBC’s ($r = .495$, $p < 0.0005$) e CTL ($r = .568$, $p < 0.0005$).

A Figura 5 apresenta as médias de congelamento das linhagens ao longo dos minutos contidos nos componentes 2 e 4 (ver tabela 9), intitulados de pré II e pré I, respectivamente.

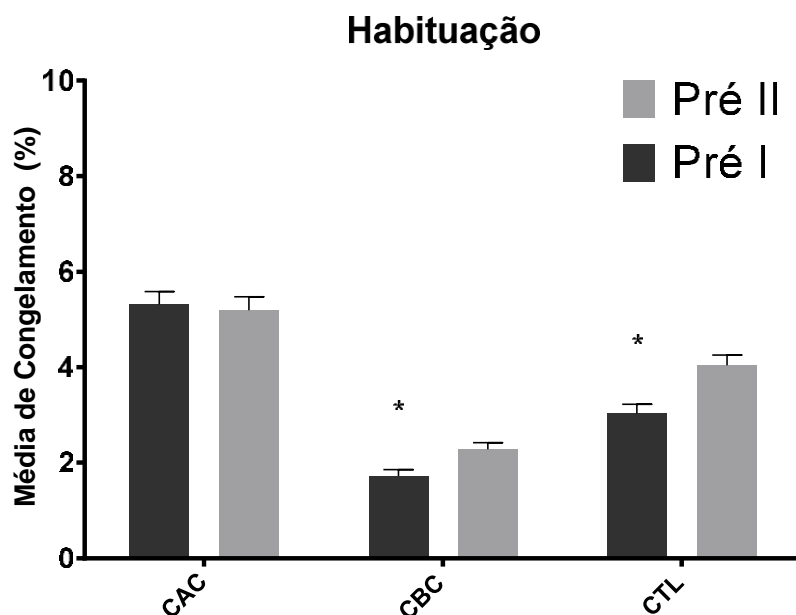


Figura 5. Porcentagem média (+EPM) de tempo dispendido na resposta de congelamento durante a sessão de aquisição, nos componentes 4 e 2, de 25 gerações (S_5 - S_{27}) de ratos machos e fêmeas selecionados para níveis altos (CAC), baixos (CBC) ou médios da resposta de congelamento condicionada. Os resultados indicam que animais CTL e CBC demonstraram uma maior taxa de congelamento no Pré I e II, relacionado aos últimos 4 minutos de habituação na caixa de choque (todos $p < 0.001$), [*] representam diferença significativa entre o Pré I e II.

Uma ANOVA mista, com “Pré I e Pré II” como o fator within e “sexo” como fator between revelou a existência de uma interação significativa entre estes fatores, assim como efeitos principais para ‘componente’ e sexo (todos $p < 0.0001$, exceto efeito between sujeitos do sexo, cujo $p = 0.002$).

Uma comparação post-hoc com um teste t pareado realizado para cada grupo (2 sexos x 3 linhagens) revelou diferenças entre os componentes 4 e 2 nas linhagens CBC e CTL, com um aumento de congelamento com o passar do tempo na caixa de choque ($p < 0.0001$). Não houve diferença significativa entre os componentes no grupo CAC ($p = 0,616$).

Uma comparação post-hoc com um teste t pareado revelou diferenças entre o Pré I e Pré II em fêmeas das linhagens CBC e CTL, sendo observado um aumento de congelamento com o passar do tempo na caixa de choque ($p < 0.0001$). Não houve diferença significativa entre o período Pré I e II no grupo CAC, ($p = 0.127$ para machos e $p = 0.326$ para fêmeas). CBC’s e CTL’s machos não

apresentaram diferença significativa entre os dois componentes ($p=0.136$ e $p=0.109$, respectivamente).

Em todos os casos foi observada uma correlação significativa entre o Pré I e II ($p<0.0005$). A taxa de correlação para CAC's, CTL's e CBC's machos foi ($r=0.664$, $r=0.588$ e $r=0.533$, respectivamente), enquanto que nas fêmeas foi ($r=0.575$, $r=0.549$ e $r=0.442$, respectivamente). Segue abaixo gráfico de colunas das médias Pré I e II segregadas por sexo.

Esses dados mostram que há diferença entre significativa entre as três linhagens no congelamento no período pré-choque com CAC's congelando mais, CBC's menos e CTL's obtendo um nível intermediário. Também foi observado que em CBC's e CTL's há uma diferença mais pronunciada entre o congelamento no início e no final da habituação em fêmeas do que em machos. Machos CAC foram o único grupo que apresentou uma média maior de congelamento no início da habituação do que no final.

Esses resultados podem ser visualmente observados na Figura 6 que mostra as médias colapsadas dos escores de congelamento nos quatro primeiros minutos do período pré-choque e nos quatro minutos finais segregados por sexo.

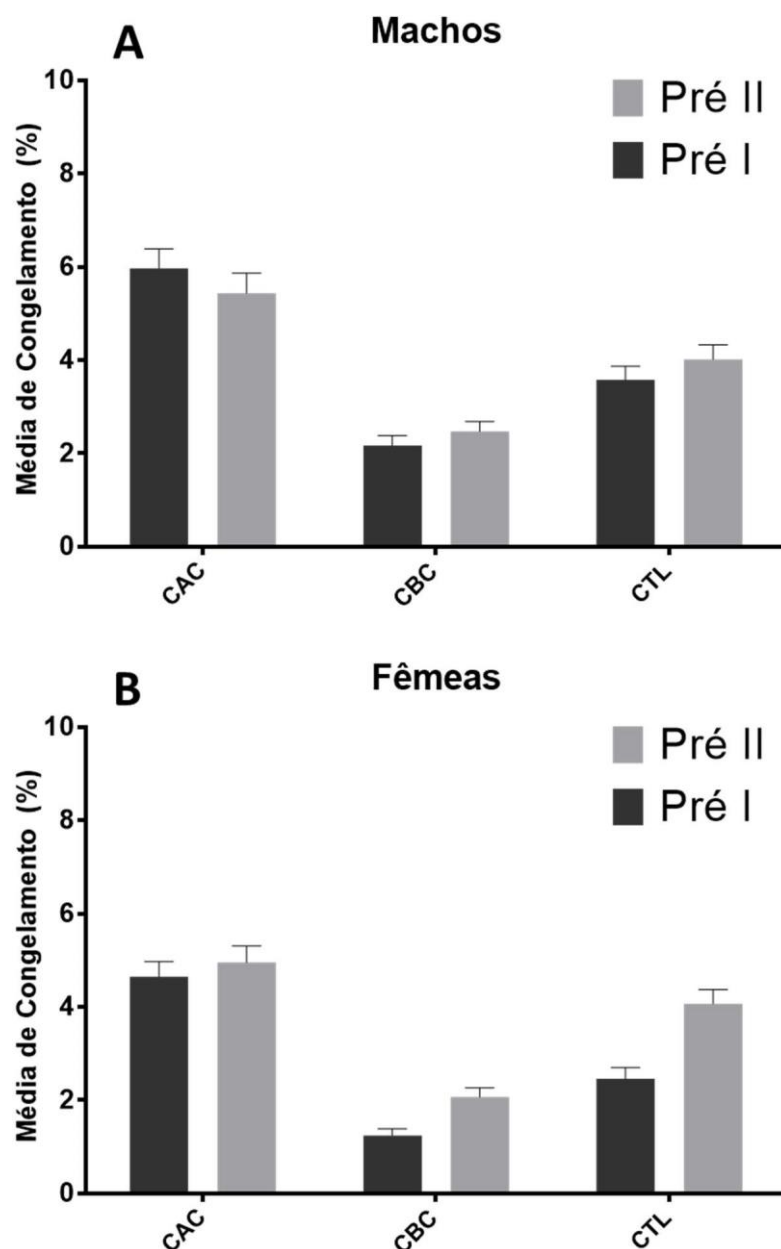


Figura 6. Porcentagem média (+EPM) de tempo dispendido na resposta de congelamento durante a sessão de aquisição, nas variáveis de congelamento contidas nos componentes 4 (Pré I) e 2 (Pré II), de 22 gerações (S₅-S₂₇) de ratos machos (A) e fêmeas (B) selecionados para níveis altos (CAC), baixos (CBC) ou médios (CTL) da resposta de congelamento condicionada. Os resultados indicam que animais CTL e CBC demonstraram uma maior taxa de congelamento no componente 2, relacionado aos últimos 4 minutos de habituação na caixa de choque (todos $p < 0.001$)

Para entender melhor a diferença nos padrões comportamentais ao longo do período pré-choque foi feito um gráfico (Figura 7) com as médias de congelamento pré-choque de cada sexo x linhagem em cada minuto do período de

habituação que permite visualizar as diferenças entre os grupos na distribuição do congelamento ao longo desse intervalo experimental.

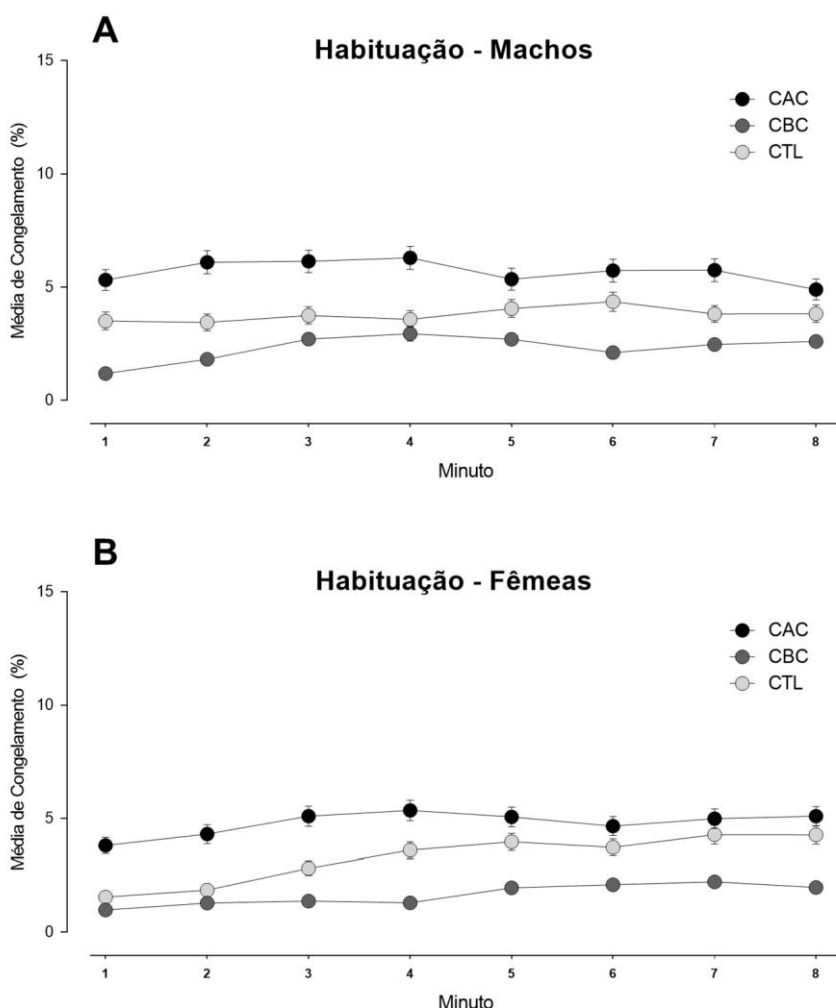


Figura 7. Porcentagem média (+EPM) de tempo dispendido na resposta de congelamento ao longo dos oito minutos pré-choque (habituação), de 22 gerações (S₅-S₂₇) de ratos machos (A) e fêmeas (B) selecionados para níveis altos (CAC), baixos (CBC) ou médios (CTL) de congelamento condicionado.

Observa-se que há um aumento gradativo da quantidade de congelamento ao longo da permanência do animal na caixa durante o período inicial até que se atinge um platô, após o qual a média de congelamento sofre uma leve queda e depois eleva-se novamente. Esse efeito provavelmente explica porque foram encontrados dois componentes, uma vez que existe uma diferença clara entre o padrão de congelamento nos minutos iniciais (aumenta até atingir um platô) e o dos minutos finais (queda, seguida de elevação e manutenção desse platô).

Isso apoia a hipótese de que o componente 4 (minutos iniciais) representariam a exploração, identificação e construção de uma representação contextual que envolve a uma sensibilização inicial as características ansiogênicas da câmara (como confinamento) enquanto o componente 2 (minutos finais) representaria uma transição para um estado de manutenção da representação inicial, mais característico da habituação em si. A Figura 7 apresenta a média de congelamento das linhagens ao longo dos 8 minutos de habituação para machos (A) e fêmeas (B). Os resultados indicam que as três linhagens apresentam um padrão exploratório distinto durante a habituação

As linhagens diferem no padrão comportamental observado nesse período assim como os sexos. Esses dados indicam que esses dois fatores estão relacionados a natureza da distribuição do congelamento ao longo dos oito minutos de habituação (uma medida indireta de aprendizagem contextual) e foram afetados pela da seleção para o medo condicionado ao contexto (MURAWSKI & ASOK, 2016; STOTE & FANSELOW, 2004).

6

Discussão Geral

Esse estudo tem como objetivo principal continuar o trabalho anterior e apresentar dados referentes ao padrão comportamental das gerações mais recentes das linhagens Cariocas (CASTRO-GOMES & LANDEIRA-FERNANDEZ, 2012). Adicionalmente teve como objetivo testar a hipótese de que o paradigma de medo condicionado ao contexto utilizado pelo Laboratório de Neurociências da PUC-Rio, foi capaz de alterar outros comportamentos observados durante o protocolo de condicionamento. Finalmente também teve como objetivo avaliar a estrutura fatorial subjacente ao protocolo empregado para seleção das linhagens Cariocas.

Os resultados demonstram que a seleção bidirecional para o medo condicionado a um contexto utilizada foi capaz de criar linhagens de ratos com grandes diferenças na expressão das reações de medo contextual tanto inatas quando apreendidas. Houve efeito da linhagem no congelamento na sessão teste a partir da S_4 , no período pós-choque a partir da S_7 e no período de habituação a partir da S_{14} (definido como, diferenças significativas consistentes dentro de intervalos de três gerações).

Acabando com a hipótese nociceptiva; uma crítica que toda linhagem selecionada neste paradigma é passível de receber é se não está selecionando mecanismos diferenciados de interação com o estímulo nociceptivo do choque que explicariam melhor as diferenças de congelamento. Analisando as diferenças encontradas entre as linhagens no período pós-choque é possível observar que CAC's apresentam escores similares aos CTL's enquanto CBC's obtém escores bem inferiores, diferente do que é visto no fenótipo.

As diferenças entre CAC's e CBC's no período pós-choque, nesse sentido, merecem investigação, pois podem estar sendo moduladas por sensibilidade diferenciada pela dor do choque. Essa hipótese é parcialmente derrubada pelo fato de que, apesar de CAC's e CTL's serem similares no período pós-choque, eles diferem no retorno ao contexto, poderia se argumentar que isso ocorre devido a um efeito teto, pois os ratos CAC e CTL costumam congelar quase no limite do escore e o período de mensuração pós-choque é curto. Mas as diferenças encontradas no congelamento pré-choque derrubam totalmente essa hipótese, ela

ocorre de forma proporcional ao fenótipo, com CAC's apresentando em média maior congelamento, CTL's apresentando escore intermediário e CBC's apresentando escore inferior ao longo do período de habituação, conforme demonstrado no estudo III. Uma ANCOVA controlando para médias pré- e pós-choque para avaliar a influência das variáveis de congelamento do dia 1 no dia 2 de experimento mostrou que diferenças na sessão teste não são atribuíveis a diferenças pré- e pós-choque.

Investigando diferenças na habituação; a detecção de diferenças consistentes nos índices de imobilidade entre CAC's e CBC's durante o período de habituação indica que a seleção pelo congelamento ao contexto tem um relacionamento pleiotrópico com esse comportamento de avaliação de risco contextual que ocorre na exploração inicial. Uma hipótese para isso é a de que os mecanismos subjacentes à vulnerabilidade e à resistência da aquisição da resposta de congelamento condicionado ao contexto afetam tanto o medo contextual apreendido quanto o inato por haver algum nível de mutualismo entre os dois.

A natureza desse mutualismo ainda é algo a ser determinado. Mas essa hipótese se confirma a partir da proporcionalidade apresentada entre os resultados da sessão teste e os do período de habituação, assim como resultados de testes de medo contextual incondicionado, como labirinto em cruz elevada, que apresentaram CAC's como mais ansiosos em diversos paradigmas, indicando que a seleção bidirecional aplicada na criação da linhagem Cariocas está afetando o medo contextual como um todo, produzindo um potente traço comportamental de vulnerabilidade (CAC) e resistência (CBC) ao medo contextual, inato ou condicionado (DIAS et al., 2009, 2014; RÉUS et al., 2015; SALVIANO et al., 2014). Além disso, camundongos selecionados para medo contextual pareado a um tom apresentaram diferenças significativas e proporcionais ao fenótipo em seu congelamento de linha de base em resposta ao primeiro tom, após quatro gerações de seleção bidirecional, corroborando essa hipótese (MCGUIRE et al., 2013).

A análise fatorial das 19 variáveis de congelamento revelou 4 componentes subjacentes ao protocolo. O componente 1 representa de forma esperada os oito minutos de congelamento na sessão teste, de acordo com a teoria subjacente a esse paradigma esse componente estaria representando os substratos neuronais subjacentes a memória aversiva envolvida no condicionamento Pavloviano de medo, ou seja, é uma medida da associação entre o estímulo

condicionado (a câmara) e o incondicionado (o choque) através da resposta incondicionada de congelamento, medindo de forma indireta a força da associação de medo (CASTRO-GOMES & LANDEIRA-FERNANDEZ, 2012).

Como é dependente da memória aversiva, acredita-se que os mecanismos neurológicos envolvidos no componente 1 são principalmente redes neurais ligadas a amígdala e ao hipocampo (FANSELOW & DONG, 2010).

Os três minutos de congelamento pós-choque também apresentaram uma distribuição conforme o esperado sendo carregados no componente 3. O período pós-choque representa o momento em que ocorre a aquisição da memória aversiva de forma que o congelamento nesse período representa uma mudança de valor afetivo do contexto, é nesse momento que ocorre a aprendizagem subjacente ao condicionamento Pavloviano, refletindo uma mudança de comportamento do rato perante o contexto, a partir dali o contexto que antes era relativamente inócuo começa a gerar reações distais de perigo devido ao recém descoberto potencial aversivo (CASTRO-GOMES & LANDEIRA-FERNANDEZ, 2012; LANDEIRA-FERNANDEZ, 1996). A literatura indica que essa mudança comportamental perante o contexto está fortemente associada a ativação da amígdala, ao analisar a literatura acreditamos que enquanto o componente 1 modela a memória associativa aversiva, o 3 modela a aprendizagem associativa aversiva (BERGSTROM et al., 2013; SHIN & LIBERZON, 2010).

Enquanto os componentes 1 e 3 se mostraram claros e facilmente interpretáveis, o período de habituação apresentou um padrão mais complexo de distribuição, sendo complexo e multifacetado. O componente 2 representou os quatro minutos finais desse período e o componente 4 os quatro iniciais. Segundo Murawski e Asok o congelamento observado no início do período pré-choque em ratos representa uma medida indireta de motricidade exploratória, enquanto que o aumento de congelamento observado ao longo do período representaria uma medida indireta de aprendizagem contextual (MURAWSKI & ASOK, 2016).

De acordo com essa hipótese, o componente 2 modelaria a aprendizagem contextual e o 4 a motricidade exploratória. Fanselow argumenta que os minutos iniciais de exposição a câmara eram necessários para criação ou evocação da memória contextual de forma a permitir a associação entre o choque e a caixa, indicando que o congelamento nesse período é um índice de aprendizagem (FANSELOW, 1990). De fato, acredita-se que todo congelamento reflete alguma

forma de aprendizagem, sendo a transição entre maior e menor motricidade exploratória uma medida indireta de aprendizagem contextual, o que indica que o congelamento medido no período pré-choque pode servir como um índice de aprendizagem contextual (MURAWSKI & ASOK, 2016).

Nesse sentido, a elevada variância do componente 2 indica que a parcela final do comportamento dos ratos no período de habituação explica melhor a variação individual encontrada na amostra do que diferenças no início da habituação, ou no período pós-choque. Isso é consistente com o achado de Sandra File que mostrou que a fidedignidade do teste da tabua perfurada era muito maior quando o intervalo experimental era estendido de 5 para 10 minutos, em conjunto esses dados indicam que um período superior a 5 minutos é necessário para melhor capturar o padrão comportamental que melhor expressa um traço duradouro e persistente de ansiedade, e que 8 minutos pode já ser tempo suficiente para isso (FILE & WARDILL, 1975).

É possível que os componentes 2 e 4 representem uma forma mais sutil de medo condicionado. Experimentos demonstram que o confinamento e a impossibilidade de fuga são eventos estressores e ansiogênicos (GIRARDI et al., 2013). Graeff demonstrou com o labirinto em T elevado que confinar o rato a um braço era capaz de aumentar sua esquivas inibitória, diminuindo a latência para escapar daquele compartimento criando uma espécie de resposta de medo condicionada (ZANGROSSI & GRAEFF, 1997).

Para ser possível interpretar melhor os componentes 2 e 4 decidiu-se realizar o estudo III, uma análise focada no período pré-choque para investigar o padrão comportamental observado nesse período e verificar a natureza das diferenças entre as linhagens e entre os sexos no início e no final do período de habituação. O estudo III demonstrou que de fato há diferenças consistentes e observáveis entre as linhagens e sexos no congelamento no período de habituação.

Não houve uma tendência de queda ao longo dos oito minutos, pelo contrário, o congelamento costuma ser maior na parcela final da habituação do que na inicial. Os achados mostram que os escores de congelamento tendem a aumentar ao longo do período pré-choque até que encontram uma leve queda, e tornam a aumentar de novo. Isso mostra que existe um processo mais complexo ocorrendo que uma simples habituação.

Essas diferenças entre as linhagens em suas curvas de resposta de congelamento no período de habituação possivelmente refletem diferenças em padrões de aprendizagem (GALLISTEL & GIBBON, 2000). Uma hipótese acerca da elevada variância contida no componente 2 é de que a latência da transição da apreensão inicial do contexto (aumento inicial de congelamento) para manutenção (platô) capaz de capturar com melhor acurácia o traço comportamental de um rato individual. Na mesma linha, isso levanta a questão de que o aumento de congelamento inicial representado pelo componente 4 e o congelamento pós-choque representado pelo componente 3 talvez não expliquem tanta variância porque as diferenças individuais aparecem de forma pronunciada não em incidentes traumáticos, mas sim nos mecanismos de gerenciamento da memória afetiva.

Pode-se observar que enquanto os componentes 1 e 3 modelam a evocação e aquisição da memória de medo contextual condicionada, respectivamente, enquanto os componentes 2 e 4 modelam a manutenção e criação da memória contextual aversiva de forma exploratória ou incidental.

Considerando que em todos os momentos ocorre alguma espécie de aprendizagem, é possível ver o componente 1 como o medo contextual em conjunto com a aprendizagem contextual representada pela queda progressiva da quantidade de congelamento entre o início e final da sessão teste (CASTRO-GOMES & LANDEIRA-FERNANDEZ, 2012). Neste caso, já existe uma memória contextual pré-existente a qual é evocada e utilizada para guiar o comportamento do animal, e a qual sofre novas aprendizagens dentro deste contexto. É possível que o componente 2 esteja modelando um mecanismo similar, se utilizando de uma memória recém criada para guiar o comportamento do animal. Os componentes 3 e 4 representariam uma aprendizagem inicial que serve para alterar ou criar a representação contextual inicial.

Possíveis causas por trás das diferenças comportamentais dos cariocas podem ser subjacentes a diferenças na transmissão da serotonina e dopamina que tem grande influência no perfil comportamental (DÍAZ-VÉLIZ et al, 1997; INOUE et al., 1996; PAGE & TERRY, 1997). Dentre estes, acredita-se que ocorra um forte envolvimento de transmissões dopaminérgicas no processo de formação, expressão, evocação e extinção das memórias afetivas (PREVIC, 2009). Elas estão fortemente envolvidas em modular representações espaciais e

temporais, assim como as proposições e expressões motoras e sua relevância biológica (PREVIC, 2009).

A anfetamina, um agonista dopaminérgico indireto, potencializa a expressão de respostas de medo condicionado e retarda sua extinção, sugerindo que uma ativação excessiva da transmissão dopaminérgica em momentos específicos faz parte do processo de medo condicionado (CALZAVARA et al., 2009).

É possível que machos congelem mais porque o medo contextual seria altamente dopaminérgico devido a seu componente espacial, e como machos costumam ser mais dopaminérgicos (entendido por, terem mais receptores e logo, mais transmissão de dopamina comparados as fêmeas) isso estaria modulando também maior resposta de medo contextual (ANDERSEN & TEICHER, 2000; BARKER & GALEA, 2010; INOUE et al, 1994; PREVIC, 2009).

Existem diversos motivos para crer que alterações genéticas em construtos poligênicos associados a expressão de receptores de dopamina estão associadas a aprendizagem contextual aversiva. Investigações realizadas nos receptores de dopamina D1 e D2 da amígdala verificaram que eles possuem ações distintas no processo de inibição latente, que seria um índice da capacidade do organismo de ignorar estímulos irrelevantes e atribuir a saliência apropriada a diferentes estímulos, o receptor D1 foi associado a expressão da resposta de medo e o D2 à capacidade de ignorar estímulos irrelevantes (BEAULIEU & GAINETDINOV, 2011; SIMON et al, 1994).

Como expressões motoras, criação de memórias, ativação de memórias, cognições espaço-temporais e cálculos de valor afetivo-motores são todos modulados pela transmissão de dopamina, é possível que diferenças genéticas que modulam a transmissão dopaminérgica em CAC's e CBC's estejam contribuindo para diferenças encontradas entre as linhagens nessa aprendizagem contextual (PREVIC, 2009; VIGGIANO et al., 2002). Essas alterações são incrivelmente hereditárias, e capazes de alterar significativamente o padrão comportamental (PEZZE & FELDON, 2004; RUDY et al, 2004; SWERDLOW et al., 2004, 2006).

Dentro dessas considerações, é possível que CBC's modelem alguma dimensão genética similar a presente nos transtornos de déficit de atenção de hiperatividade ou transtorno do espectro autista, duas condições caracterizadas por

dificuldades de aprendizagem, e problemas na transmissão dopaminérgica (PREVIC, 2009).

Para investigar melhor essas hipóteses, é preciso realizar experimentos nas linhagens cariocas que sejam capazes de testar as capacidades espaciais e tácticas de CAC's e CBC's, assim como verificar a influência que formulações que intervêm na transmissão dopaminérgica produzem nesses animais.

O paradigma de medo condicionado ao contexto utilizado nesse experimento se mostrou eficaz em produzir uma situação ansiogênica que modela a memória aversiva, e a seleção bidirecional foi capaz de emular a principal característica patológica do TAG, que é uma elevada e persistente resposta de ansiedade condicionada e incondicionada nos CAC's. Em contrapartida, CBC's servem como um modelo de baixa aquisição e manutenção da memória aversiva, que, possivelmente, modela padrões comportamentais condizentes com déficits de aprendizagem, os quais podem vir a ser modelos para sintomas observados em casos de transtorno do espectro de autismo e transtorno de déficit de atenção e hiperatividade.

7

Conclusões

Ao longo do processo de criação seletiva dos Cariocas, a seleção bidirecional pelo congelamento na sessão teste provocou mudanças nas linhagens no congelamento pré- e pós-choque. Isso sugere que existe um componente genético mutuo subjacente ao medo contextual condicionado e incondicionado.

A capacidade deste modelo de produzir e mostrar diferenças consistentes no período pré-choque mostra que a seleção genética bidirecional para o congelamento condicionado ao contexto no protocolo carioca é capaz de alterar não só o fenótipo, mas outros comportamentos relacionados a ansiedade, e em específico o congelamento observado na habituação, algo que havia sido evidenciado em camundongos, mas não de forma tão clara em ratos, e é a primeira vez que esse efeito é detectado em uma linhagem selecionada para o congelamento puramente a pistas contextuais até onde os autores estão cientes.

As respostas de congelamento condicionadas e incondicionadas a um contexto, foram ambas alteradas, indicando que são modulados por algum mecanismo subjacente comum que é afetado por essa seleção artificial bidirecional. É possível concluir que a seleção empregada resultou em dois perfis comportamentais distintos, e que o protocolo empregado em sua seleção foi capaz de revelar um relacionamento complexo entre a motricidade exploratória e a aprendizagem contextual aversiva.

É a primeira vez que este protocolo é avaliado com uma análise fatorial, os 4 componentes encontrados refletem dimensões distintas da aprendizagem, envolvendo aspectos condicionados e incondicionados do medo contextual.

Foi observado que o intervalo final da habituação, representado pelo componente 2, explica uma variância bem significativa, corroborando a hipótese de que um intervalo superior a 5 minutos permite a emergência do traço mais duradouro de padrão comportamental do indivíduo.

Espera-se que essa descoberta permita que pesquisadores tomem decisões mais assertivas na hora de formular seus desenhos experimentais de forma a permitir intervalos temporais que revelem melhor a variabilidade individual.

8

Referências bibliográficas

- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION et al. DSM-5: Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais. **Artmed Editora**, 2014.
- ANAGNOSTARAS, S. G.; GALE, G. D.; FANSELOW, M. S. Hippocampus and contextual fear conditioning: Recent controversies and advances. **Hippocampus**, v. 11, n. 1, p. 8–17, 2001.
- ANDERSEN, S. L.; TEICHER, M. H. Sex differences in dopamine receptors and their relevance to ADHD Sex differences in dopamine receptors and their relevance to ADHD. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 24, n. 1, p. 137–141, 2000.
- ANHUAMAN, Laura Andrea Leon. **Fatores comportamentais, hormonais e neuroanatômicos associados à vulnerabilidade ao estresse em ratos Carioca High Conditioned-Freezing (CHF) e Carioca Low Conditioned-Freezing (CLF)**. 2014. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- APASESTAKOVA, N. et al. Determination of motor activity and anxiety-related behaviour in rodents: methodological aspects and role of nitric oxide. **Interdisciplinary toxicology**, v. 6, n. 3, p. 126–135, 2013.
- BARKER, J. M.; GALEA, L. A. M. Males show stronger contextual fear conditioning than females after context pre-exposure. **Physiology and Behavior**, v. 99, n. 1, p. 82–90, 2010.
- BAXTER, A. J. et al. Global prevalence of anxiety disorders: a systematic review and meta-regression. **Psychological Medicine**, v. 43, n. 05, p. 897-910, 2013.
- BEAULIEU, J.-M.; GAINETDINOV, R. R. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. **Pharmacological reviews**, v. 63, n. 1, p. 182–217, 2011.
- BELZUNG, C.; LE PAPE, G. Comparison of different behavioral test situations used in psychopharmacology for measurement of anxiety. **Physiology and Behavior**, v. 56, n. 3, p. 623–628, 1994.
- BERGSTROM, H. C. et al. The structure of Pavlovian fear conditioning in the amygdala. **Brain Structure and Function**, v. 218, n. 6, p. 1569–1589, 2013.
- BOLLES, R. C. Species-specific defence reactions and avoidance learning. **Psychological Review**, v. 77, n. 1, p. 32–48, 1970.
- BOLLES, R. C.; COLLIER, A. C. The effect of predictive cues on freezing in rats. **Animal Learning & Behavior**, v. 4, n. 1, p. 6–8, 1976.
- BOUTON, M. E.; BOLLES, R. C. Conditioned fear assessed by freezing and by the suppression of three different baselines. **Animal Learning & Behavior**, v. 8, n. 3, p. 429–434, 1980.
- BRANDÃO, M. L. et al. Different patterns of freezing behavior organized in the periaqueductal gray of rats: Association with different types of anxiety. **Behavioural Brain Research**, v. 188, n. 1, p. 1–13, 2008.
- CALZAVARA, M. B. et al. Neuroleptic Drugs Revert the Contextual Fear Conditioning Deficit Presented by Spontaneously Hypertensive Rats : A Potential Animal Model of Emotional Context Processing in Schizophrenia? **Schizophrenia bulletin**, v. 35, n. 4, p. 748–759, 2009.

- CHOLERIS, E. et al. A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 25, n. 3, p. 235-260, 2001
- CLÉMENT, Y.; CALATAYUD, F.; BELZUNG, C. Genetic basis of anxiety-like behaviour: a critical review. **Brain research bulletin**, v. 57, n. 1, p. 57–71, 2002.
- COLLIER, A C.; BOLLES, R. C. The ontogenesis of defensive reactions to shock in preweanling rats. **Developmental psychobiology**, v. 13, n. 2, p. 141–50, 1980.
- CRAWLEY, J.; GOODWIN, F. K. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 13, n. 2, p. 167–170, 1980.
- CRAWLEY, J. N. Exploratory behavior models of anxiety in mice. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 9, n. 1, p. 37–44, 1985
- DAVIS, Michael et al. Phasic vs sustained fear in rats and humans: role of the extended amygdala in fear vs anxiety. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 1, p. 105-135, 2010.
- CASTRO-GOMES, V; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Amygdaloid lesions produced similar contextual fear conditioning disruption in the Carioca high-and low-conditioned freezing rats. **Brain Research**, v. 1233, p. 137-145, 2008.
- CASTRO-GOMES, V; SILVA, Carlos Eduardo Barroso; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. The Carioca high and low conditioned freezing lines: a new animal model of generalized anxiety disorder. **Edited by Vladimir V. Kalinin**, p. 121, 2011.
- CASTRO-GOMES, V. et al. Behavioral evaluation of eight rat lines selected for high and low anxiety-related responses. **Behavioural brain research**, v. 257, p. 39-48, 2013.
- DE OLIVEIRA CRISANTO, K. et al. The differential mice response to cat and snake odor. **Physiology and Behavior**, v. 152, p. 272–279, 2015.
- DIAS, G. P. et al. Behavioral profile and dorsal hippocampal cells in carioca high-conditioned freezing rats. **Behavioural Brain Research**, v. 205, n. 2, p. 342–348, 2009.
- DIAS, G. P. et al. Hippocampal biomarkers of fear memory in an animal model of generalized anxiety disorder. **Behavioural Brain Research**, v. 263, p. 34–45, 2014.
- DIAS, G. P. et al. Ketanserin effects on rat behavioral responses: modifications by the estrous cycle, ovariectomy and estradiol replacement. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 57, n. 4, p. 687-692, 1997.
- DOS SANTOS, E.´ G.; DE SIQUEIRA, M. M. Prevalência dos transtornos mentais na população adulta brasileira: Uma revisão sistemática de 1997 a 2009. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, v. 59, n. 3, p. 238–246, 2010.
- DUPONT, R. L. et al. Economic costs of anxiety disorders. **Anxiety**, v. 2, n. 4, p. 167–172, 1996.
- EMLÉN, D. Artificial selection on horn length-body size allometry in the horned beetle *Onthophagus acuminatus* (Coleoptera: scarabaeidae). **Evolution**, v. 50, n. 3, p. 1219–1230, 1996.
- ENNACEUR, A. Tests of unconditioned anxiety - Pitfalls and disappointments. **Physiology and Behavior**, v. 135, p. 55–71, 2014.
- FANSELOW, M. S. Factors governing one-trial contextual conditioning. **Animal Learning & Behavior**, v. 18, n. 3, p. 264–270, 1990.

- FANSELOW, M. S. The Midbrain Periaqueductal Gray as a Coordinator of Action in Response to Fear and Anxiety Functional Behavior Systems and Fear. **The Midbrain Periaqueductal Gray Matter**, p. 151–173, 1991.
- FANSELOW, M. S. Neural organization of the defensive behavior system responsible for fear. **Psychonomic Bulletin & Review**, v. 1, n. 4, p. 429–438, 1994.
- FANSELOW, M. S. Contextual fear, gestalt memories, and the hippocampus. **Behavioural Brain Research**, v. 110, n. 1–2, p. 73–81, 2000.
- FANSELOW, M. S.; DONG, H. W. Are the Dorsal and Ventral Hippocampus Functionally Distinct Structures? **Neuron**, v. 65, n. 1, p. 7–19, 2010.
- FANSELOW, M. S.; HELMSTETTER, F. J. Conditional analgesia, defensive freezing, and benzodiazepines. **Behavioral neuroscience**, v. 102, n. 2, p. 233–243, 1988.
- FENDT, M.; FANSELOW, M. S. The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 23, n. 5, p. 743–760, 1999.
- FIELD, Andy. Discovering statistics using IBM SPSS statistics. **Sage**, p. 666-719, 2013.
- FILE, S. Behavioural detection of anxiolytic action. In: JM, E.; DJ, H.; CA, M. (Eds.). . **Experimental approaches to anxiety and depression**. Chichester: Wiley, 1992.
- FILE, S. E.; WARDILL, A. G. The reliability of the hole-board apparatus. **Psychopharmacologia**, v. 44, n. 1, p. 47–51, 1975.
- FINN, P. Evidence-based treatment of stuttering: **Journal of Fluency Disorders**, v. 28, n. 3, p. 209–218, 2003.
- FUKUMOTO, K.; CHAKI, S. Involvement of serotonergic system in the effect of a metabotropic glutamate 5 receptor antagonist in the novelty-suppressed feeding test. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 127, n. 1, p. 57–61, 2015.
- GALLISTEL, C. Randy; GIBBON, John. Time, rate, and conditioning. **Psychological review**, v. 107, n. 2, p. 289, 2000.
- GALVÃO, B. DE O. et al. Panic-like behaviors in carioca high-and low-conditioned freezing rats. **Psychology and Neuroscience**, v. 4, n. 2, p. 205–210, 2011.
- GARLAND, T. Selection experiments: an under-utilized tool in biomechanics and organismal biology. **Vertebrate Biomechanics and Evolution**, p. 23–57, 2003.
- GIBBS, A. G. Laboratory selection for the comparative physiologist. **The Journal of experimental biology**, v. 202, n. Pt 20, p. 2709–2718, 1999.
- GIRARDI, C. E. N. et al. Contextual exploration previous to an aversive event predicts long-term emotional consequences of severe stress. **Frontiers in behavioral neuroscience**, v. 7, n. October, p. 134, 2013.
- GORDON, J. A; HEN, R. Genetic approaches to the study of anxiety. **Annual review of neuroscience**, v. 27, p. 193–222, 2004.
- GOTTESMAN, I. I.; GOULD, T. D. The endophenotype concept in psychiatry: Etymology and strategic intentions. **American Journal of Psychiatry**, v. 160, n. 4, p. 636–645, 2003.
- GOULD, T. D.; GOTTESMAN, I. I. Psychiatric endophenotypes and the development of valid animal models. **Genes, brain, and behavior**, v. 5, n. 2, p. 113–9, 2006.
- GRAEFF, F. G.; FERREIRA NETTO, C.; ZANGROSSI, H. The elevated T-maze as an

- experimental model of anxiety. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 23, n. 2, p. 237–246, 1998.
- GRIEBEL, G. et al. The free-exploratory paradigm: an effective method for measuring neophobic behaviour in mice and testing potential neophobia-reducing drugs. **Behavioural Pharmacology**, 1993.
- GROSS, C.; HEN, R. The developmental origins of anxiety. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 5, n. 7, p. 545–552, 2004.
- GROVES, P. M.; THOMPSON, R. F. Habituation: A dual-process theory. **Psychological Review**, v. 77, n. 5, p. 419–450, 1970.
- HALLADAY, L. R.; BLAIR, H. T. Distinct ensembles of medial prefrontal cortex neurons are activated by threatening stimuli that elicit excitation versus inhibition of movement. **Journal of Neurophysiology**, n. May 2015, p. jn.00656.2014, 2015.
- HALLER, J.; ALICKI, M. Current animal models of anxiety, anxiety disorders, and anxiolytic drugs. **Current Opinion in Psychiatry**, v. 25, n. 1, p. 59–64, 2012.
- HILL, W. G.; CABALLERO, A. Artificial Selection Experiments. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 23, n. 22, p. 287–310, 1992.
- INDOVINA, I. et al. Fear-Conditioning Mechanisms Associated with Trait Vulnerability to Anxiety in Humans. **Neuron**, v. 69, n. 3, p. 563–571, 2011.
- INOUE, T. et al. Effect of citalopram, a selective serotonin reuptake inhibitor, on the acquisition of conditioned freezing. **European journal of pharmacology**, v. 311, n. 1, p. 1–6, 1996.
- INOUE, T.; TSUCHIYA, K.; KOYAMA, T. Regional changes in dopamine and serotonin activation with various intensity of physical and psychological stress in the rat brain. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 49, n. 4, p. 911–920, 1994.
- JACOBS, N. S.; CUSHMAN, J. D.; FANSELOW, M. S. The accurate measurement of fear memory in Pavlovian conditioning: Resolving the baseline issue. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 190, n. 2, p. 235–239, 2010.
- JACOBSON, L. H.; CRYAN, J. F. Genetic approaches to modeling anxiety in animals. **Current Topics in Behavioral Neurosciences**, v. 2010, n. 2, p. 161–201, 2010.
- KAISER, H. F. An index of factorial simplicity. **Psychometrika**, v. 39, n. 1, p. 31–36, 1974.
- KLEIN, D. F. Delineation of two drug-responsive anxiety syndromes. **Psychopharmacologia**, v. 5, n. 6, p. 397–408, 1964.
- KOUTSIKOU, Stella et al. Neural substrates underlying fear-evoked freezing: the periaqueductalgrey–cerebellar link. **The Journal of physiology**, v. 592, n. 10, p. 2197–2213, 2014.
- LAMPIS, V.; MAZIADÉ, M.; BATTAGLIA, M. Animal models of human anxiety disorders: Reappraisal from a developmental psychopathology vantage point. **Pediatric Research**, v. 69, n. 5 PART 2, 2011.
- LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Context and Pavlovian conditioning. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 29, n. 2, p. 149–173, 1996.
- LANDEIRA-FERNANDEZ, J. et al. Immediate shock deficit in fear conditioning: effects of shock manipulations. **Behavioral neuroscience**, v. 120, n. 4, p. 873–879, 2006.
- LANDEIRA-FERNANDEZ, J.; CRUZ, A. P. D. M.; BRANDÃO, M. L. Padrões de respostas

- defensivas de congelamento associados a diferentes transtornos de ansiedade. **Psicologia USP**, v. 17, n. 4, p. 175–192, 2006.
- LEDOUX, Joseph E. Emotion circuits in the brain. **Annual review of neuroscience**, v. 23, n. 1, p. 155-184, 2000.
- LESCH, K. P. Serotonergic gene expression and depression: implications for developing novel antidepressants. **Journal of Affective Disorders**, v. 62, n. 1–2, p. 57–76, 2001.
- LISSEK, S. et al. Classical fear conditioning in the anxiety disorders: A meta-analysis. **Behaviour Research and Therapy**, v. 43, n. 11, p. 1391–1424, 2005.
- MAREN, S.; PHAN, K. L.; LIBERZON, I. The contextual brain: implications for fear conditioning, extinction and psychopathology. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 14, n. June, p. 417–28, 2013.
- MCGUIRE, Jennifer L. et al. Traits of fear resistance and susceptibility in an advanced intercross line. **European Journal of Neuroscience**, v. 38, n. 9, p. 3314-3324, 2013..
- MCHUGH, T. J.; TONEGAWA, S. Spatial exploration is required for the formation of contextual fear memory. **Behavioral neuroscience**, v. 121, n. 2, p. 335–339, 2007.
- MCNAUGHTON, N.; GRAY, J. A. Anxiolytic action on the behavioural inhibition system implies multiple types of arousal contribute to anxiety. **Journal of Affective Disorders**, v. 61, n. 3, p. 161–176, 2000.
- MILLAN, M. J. The neurobiology and control of anxious states. **Progress in Neurobiology**, v. 70, n. 2, p. 83–244, 2003.
- MINEKA, S.; COOK, M.; MILLER, S. Fear conditioned with escapable and inescapable shock: Effects of a feedback stimulus. **Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes**, v. 10, n. 3, p. 307–323, 1984.
- MINEKA, S.; ZINBARG, R. A contemporary learning theory perspective on the etiology of anxiety disorders: it's not what you thought it was. **The American psychologist**, v. 61, n. 1, p. 10–26, 2006.
- MOUSOVICH-NETO, F. et al. Endocrine and metabolic function in male Carioca High-conditioned Freezing rats. **Physiology and Behavior**, v. 142, p. 90–96, 2015.
- MURAWSKI, N. J.; ASOK, A. Understanding the contributions of visual stimuli to contextual fear conditioning : a proof-of-concept study using LCD screens. **Neuroscience Letters**, 2016.
- MYERS, K. M.; DAVIS, M. Mechanisms of fear extinction. **Molecular psychiatry**, v. 12, n. 2, p. 120–150, 2007.
- OLIVEIRA, L. C. et al. Role of amygdala in conditioned and unconditioned fear generated in the periaqueductal gray. **Neuroreport**, v. 15, n. 14, p. 2281–5, 2004.
- PAGE, Sarah J.; TERRY, Philip. Conditioned grooming induced by the dopamine D1-like receptor agonist SKF 38393 in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 57, n. 4, p. 829-833, 1997. PAVLOV, Ivan P. Conditioned reflexes: an investigation of the physiological activity of the cerebral cortex. **Annals of neurosciences**, v. 17, n. 3, 2010.
- PEZZE, Marie A.; FELDON, Joram. Mesolimbic dopaminergic pathways in fear conditioning. **Progress in neurobiology**, v. 74, n. 5, p. 301-320, 2004.
- PREVIC, Fred H. The dopaminergic mind in human evolution and history. **New York, NY:**

Cambridge University Press, 2009.

QUINN, J. J.; FANSELOW, M. S. Defenses and Memories: Functional Neural Circuitry of Fear and Conditional Responding. **Fear and Learning: From basic processes to clinical implications**, p. 55–74, 2006.

RANKIN, C. H. et al. Habituation revisited: An updated and revised description of the behavioral characteristics of habituation. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 92, n. 2, p. 135–138, 2009.

RÉUS, G. Z. et al. Mutation Research / Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis Anxious phenotypes plus environmental stressors are related to brain DNA damage and changes in NMDA receptor subunits and glutamate uptake. **Mutation Research**, v. 772, p. 30–37, 2015.

ROSE, M. R. Laboratory Evolution of Postponed Senescence in *Drosophila melanogaster*. **Evolution**, v. 38, n. 5, p. 1004–1010, 1984.

RUDOLPH, U.; MÖHLER, H. Analysis of GABAA receptor function and dissection of the pharmacology of benzodiazepines and general anesthetics through mouse genetics. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 44, n. 14, p. 475–498, 2004.

RUDY, J. W.; HUFF, N. C.; MATUS-AMAT, P. Understanding contextual fear conditioning: Insights from a two-process model. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 28, n. 7, p. 675–685, 2004.

SALVIANO, M. et al. Behavioral evaluation of male and female carioca high- and low-freezing rats. **Temas em Psicologia**, v. 22, n. 3, p. 663–675, 2014.

SCHLAGER, G.; FREEMAN, R.; EL SEOUDY, A. A. Genetic study of norepinephrine in brains of mice selected for differences in blood pressure. **Journal of Heredity**, v. 74, n. 2, p. 97–100, 1983.

SHIN, L. M.; LIBERZON, I. The neurocircuitry of fear, stress, and anxiety disorders. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 1, p. 169–191, 2010.

SHUMAKE, J.; FURGESON-MOREIRA, S; MONFILS, M. H. Predictability and heritability of individual differences in fear learning. **Animal cognition**, v. 17, n. 5, p. 1207–1221, 2014.

SIMON, P.; DUPUIS, R.; COSTENTIN, J. Thigmotaxis as an index of anxiety in mice. Influence of dopaminergic transmissions. **Behavioural Brain Research**, v. 61, n. 1, p. 59–64, 1994.

STEIMER, T. The biology of fear- and anxiety-related behaviors. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 4, n. 3, p. 231–249, 2002.

STEIMER, T. Animal models of anxiety disorders in rats and mice: Some conceptual issues. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 13, n. 4, p. 495–506, 2011.

STOTE, D. L.; FANSELOW, M. S. NMDA receptor modulation of incidental learning in Pavlovian context conditioning. **Behavioral Neuroscience**, v. 118, n. 1, p. 253–7, 2004.

SWERDLOW, N. R. et al. Heritable differences in the dopaminergic regulation of sensorimotor gating. II. Temporal, pharmacologic and generational analyses of apomorphine effects on prepulse inhibition. **Psychopharmacology**, v. 174, p. 452–462, 2004.

SWERDLOW, N. R. et al. Heritable differences in the dopaminergic regulation of behavior in rats: relationship to D2-like receptor G-protein function. **Neuropsychopharmacology**, v. 31, n. 4, p. 721–9, 2006.

VANDERSCHUREN, L. J. M. L.; KALIVAS, P. W. Alterations in dopaminergic glutamergic transmission in the induction and expression of behavioural sensitisation: a critical review of preclinical studies. **Psychopharmacology**, v. 151, p. 99–120, 2000.

VICENS-COSTA, E. et al. Two-way avoidance acquisition is negatively related to conditioned freezing and positively associated with startle reactions: A dissection of anxiety and fear in genetically heterogeneous rats. **Physiology and Behavior**, v. 103, n. 2, p. 148–156, 2011.

VIGGIANO, Davide et al. The Naples High-and Low-Excitability rats: selective breeding, behavioral profile, morphometry, and molecular biology of the mesocortical dopamine system. **Behavior genetics**, v. 32, n. 5, p. 315–333, 2002.

WOOD, S. J.; TOTH, M. Molecular pathways of anxiety revealed by knockout mice. **Molecular neurobiology**, v. 23, n. 2–3, p. 101–119, 2001.

ZANGROSSI, H.; GRAEFF, F. G. Behavioral validation of the elevated T-maze, a new animal model of anxiety. **Brain Research Bulletin**, v. 44, n. 1, p. 1–5, 1997.

ZELIKOWSKY, M. et al. Neuronal Ensembles in Amygdala, Hippocampus, and Prefrontal Cortex Track Differential Components of Contextual Fear. **Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 25, p. 8462–8466, 2014.