



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E  
BIOLOGIA MOLECULAR**

Bruno Gabriel Oliveira do Monte

**QTLs ASSOCIADOS COM EMOCIONALIDADE EM FÊMEAS PÓS-PARTO DE  
CAMUNDONGOS LG/J x SM/J**

São Carlos

2011



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E  
BIOLOGIA MOLECULAR  
LABORATÓRIO DE GENÉTICA DE POPULAÇÕES E EVOLUÇÃO**

**QTLs ASSOCIADOS COM EMOCIONALIDADE EM FÊMEAS PÓS-PARTO DE  
CAMUNDONGOS LG/J x SM/J**

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Genética Evolutiva e Biologia  
Molecular para obtenção do título  
de mestre em genética e evolução

Aluno: Bruno Gabriel Oliveira do Monte  
Orientadora: Profa. Dra. Andréa Cristina Peripato

São Carlos  
2011

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

M772qa

Monte, Bruno Gabriel Oliveira do.

QTLs associados com emocionalidade em fêmeas pós-parto de camundongos LG/J x SM/J / Bruno Gabriel Oliveira do Monte. -- São Carlos : UFSCar, 2012.  
85 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2011.

1. Genética. 2. Ansiedade. 3. Emocionalidade. 4. Teste de campo aberto. 5. Camundongo. I. Título.

CDD: 575.1 (20ª)

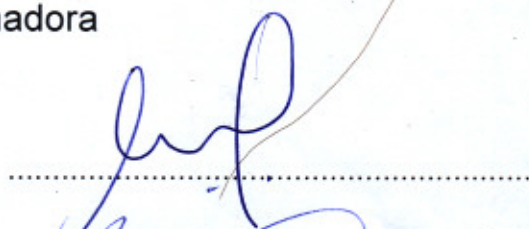
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA MOLECULAR

## QTLs Associados com Emocionalidade em Fêmeas Pós-Parto de Camundongos LG/J X SM/J

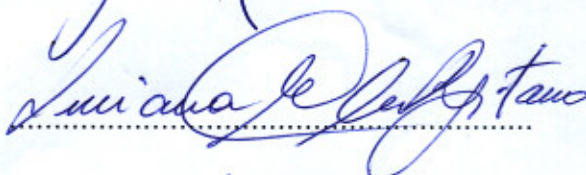
Dissertação de Mestrado de **BRUNO GABRIEL OLIVEIRA DO MONTE**

### Banca Examinadora


Profa. Dra. Andrea Cristina Peripato



Profa. Dra. Luciana Correa de Almeida Regitano



Profa. Dra. Ana Lúcia Brunialti Godard



*Dedico esse trabalho aos meus pais, pelo amor e carinho.*

## AGRADECIMENTOS

Ao meu pai, José Bezerra do Monte, minha mãe, Sirlene Oliveira do Monte, meu irmão, Fernando Oliveira do Monte, minha irmã, Larissa Oliveira do Monte. Essas pessoas foram e sempre serão imprescindíveis em todos os momentos da minha vida.

Ao meu tio, Jaime Bezerra do Monte, que é também um grande amigo, está presente em todos os momentos, participado inclusive da minha formação acadêmica.

À minha orientadora Prof. Dra. Andrea Cristina Peripato pela a atenção e tempo dedicado durante a realização desse trabalho.

Aos meus amigos conquistados aqui, em especial aos amigos de Laboratório, “Labevil”, pelos momentos de conversas, risadas, diversão e às vezes loucura! Agradeço especialmente ao João Paulo Cunha, “Jopa”, que fez uma parte importante da análise dos vídeos para a realização do seu TCC, essas análises foram utilizadas nesse trabalho.

À Maíra pela atenção e apoio oferecido e principalmente pelo carinho confortante em vários momentos durante o período de realização desse trabalho.

À CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro.

Faço um agradecimento à uma das formas de expressão humana, que em toda minha vida, mas principalmente durante esse período, foi muito importante, pois, me proporcionou relaxamento mental em momentos de estresse e ansiedade. ROCK 'N ROLL SEMPRE!!!

## RESUMO

Em mamíferos, filhotes recém-nascidos necessitam de cuidados para que tenham sucesso em seu desenvolvimento. Esse sucesso está diretamente relacionado ao cuidado materno, cujas alterações na emocionalidade da mãe podem afetar o desenvolvimento dos filhotes nos estágios iniciais ou mesmo a própria emocionalidade dos filhotes na idade adulta. No presente estudo investigamos a emocionalidade no período materno, utilizando o teste de campo aberto, em fêmeas de camundongos SM/J, LG/J e gerações F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub> deste intercruzamento, sendo a última também testada para fase não materna. Também averiguamos se a emocionalidade em fêmeas F<sub>2</sub> estava associada com a variação do ganho em peso nestas fêmeas e com a viabilidade de sua progênie. Finalmente, utilizamos a análise de QTLs (*Quantitative Trait Loci*) com o intuito de estudar a arquitetura genética da emocionalidade na fase pós-parto. A análise etológica revela indícios de que fêmeas LG/J apresentam um maior nível de ansiedade quando comparadas com fêmeas SM/J. As gerações F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub> não apresentaram diferenças significativas na maioria dos fenótipos analisados e no contraste entre fase materna e não materna para fêmeas F<sub>2</sub>, as últimas parecem ser menos ansiosa que as primeiras. Na relação entre ansiedade e ganho em peso entre as fêmeas F<sub>2</sub>, verificamos que vários dados etológicos estão significativamente associados com o ganho em peso em algum período da vida destas fêmeas. No entanto, as variações etológicas parecem não interferir na sobrevivência da progênie. A análise de QTL revelou 11 QTLs individuais associados aos fenótipos *grooming*, imobilidade, atividade no centro e atividade motora, que respondem entre 5 a 9% da variação de emocionalidade. Além dos QTLs individuais, encontramos um total de 76 QTLs epistáticos envolvendo os cinco fenótipos avaliados, que juntamente com os QTLs individuais explicam de 24 a 53 % da variação de emocionalidade em fêmeas pós-parto. Este estudo permitiu a identificação de potenciais genes candidato, bem como o tamanho relativo dos efeitos do gene e os padrões de ação gênica afetando emocionalidade em camundongos. Esses resultados revelam que a arquitetura genética da emocionalidade de mães LG/J x SM/J é complexa, pois indica a existência de muitos genes, incluindo as interações entre eles em uma complexa rede de epistasia. Além da base genética, vale ressaltar que o ambiente também pode apresentar um grande impacto nas emoções por meio de mecanismos epigenéticos.

**Palavras-Chave:** Ansiedade. Emocionalidade. Teste de Campo aberto. Camundongo.

## ABSTRACT

In mammals, newborns need parental care, mostly maternal care, to succeed in development. Mother emotionality may affect development at initial stages or even emotionality of the offspring in adulthood. In the present study we investigate emotionality, in maternal period, by performing the open field test in mice females from SM/J, LG/J inbred lines and generations F<sub>1</sub> and F<sub>2</sub> from this intercross. F<sub>2</sub> females were also tested in non-maternal phase. We investigate if F<sub>2</sub> females' emotionality was associated with variation in weight gain and offspring viability. Finally, we perform QTLs analysis (*Quantitative Trait Loci*) aiming to study genetic architecture of emotionality at postpartum phase. Ethological analysis indicates that LG/J females seem to have higher level of anxiety when compared to SM/J females. F<sub>1</sub> and F<sub>2</sub> generations did not show significant differences in most of the phenotypes analyzed. In the contrast between maternal and non-maternal phases of F<sub>2</sub> females, it seems females were less anxious in non-maternal phase. In the relationship between anxiety and weight gain among F<sub>2</sub> females we observed that several ethological data show significant association with weight gain in some period of life of these females. However, the ethological variations do not seem to interfere in the offspring survival. QTL analysis revealed 11 individual QTLs associated to the phenotypes grooming, immobility, activity at center, and motor activity, that accounts between 5 and 9% of emotionality variation. Beside individual QTLs, we found a total of 88 epistatic QTLs involving the five evaluated phenotypes that together with the individual QTLs explain 24 to 53% of emotionality variation in postpartum females. The present study allowed the identification of putative candidate genes, as well as their relative size effects and patterns of gene action affecting mice emotionality. These results reveal that genetic architecture of emotionality of LG/J x SM/J dams is complex, since indicate the existence of many genes, including the interaction among them in a complex network of epistasis. Besides the genetic basis, is worth noted that environment also have a important impact in emotions through epigenetic mechanisms.

**Keywords:** Anxiety. Emotionality. Open Field Test. Mice



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	8
1.1 Emocionalidade e ansiedade.....	8
1.2 Teste de Campo aberto.....	10
1.3 Bases genética da ansiedade.....	13
1.4 Ansiedade e Comportamento Materno.....	15
2.OBJETIVOS.....	19
3. MATERIAL e MÉTODOS .....	19
3.1 Animais.....	19
3.2 Fenótipos avaliados.....	21
3.2.1 Crescimento.....	21
3.2.2 Emocionalidade.....	21
3.2.3 Procedimentos laboratoriais .....	24
3.3 Análise dos Resultados.....	25
3.3.1 Análise de crescimento.....	25
3.3.2 Análise emocionalidade.....	26
3.3.3 Análise da relação entre peso/crescimento e emocionalidade/sobrevivência e entre sobrevivência e emocionalidade.....	26
3.3.4 Análise QTL.....	26
3.3.4.1 QTLs individuais.....	27
3.3.4.2 QTLs epistáticos.....	28
4. RESULTADOS .....	28
4.1 Crescimento.....	28
4.2 Emocionalidade.....	32
4.3.Relação entre crescimento e emocionalidade/sobrevivência e entre sobrevivência e emocionalidade.....	39
4.4 Análise de QTLs.....	40
4.4.1 QTLs individuais.....	41
4.4.2 QTLs epistáticos.....	44
5. DISCUSSÃO.....	52

	7
5.1 <i>Crescimento</i> .....	52
5.2 <i>Emocionalidade</i> .....	54
5.3 <i>QTLs individuais e epistáticos</i> .....	63
6. CONCLUSÕES.....	70
7. BIBLIOGRAFIA .....	72

# 1. INTRODUÇÃO

## *1.1 Emocionalidade e ansiedade*

Emocionalidade ou emotividade é o estado de ser emocional, que consiste em um grupo de reações orgânicas, experienciais e expressivas e denota um aumento geral ou uma condição excitada do animal (HALL, 1934). Esse termo é utilizado para descrever uma série de fatores complexos, como por exemplo, medo provocado por ameaças percebidas como predador e outros perigos ambientais (WALLACE; ROSEN, 2000), e sensibilidade ao estresse (GOSLING; JOHN, 2005). Um dos componentes mais importantes das emoções é a ansiedade, porém frequentemente são usadas como sinônimos. Ela é formada pela combinação de componentes somáticos e cognitivos e aparece mediante estímulos potencialmente ameaçadores, normalmente acompanhada do aumento do tônus muscular, da frequência cardíaca e respiratória, da pressão arterial e da dilatação de pupila. Tais respostas ocorrem em animais em geral (BLANCHARD; BLANCHARD, 1972).

A ansiedade é considerada um fenômeno complexo, no qual envolve várias estruturas do encéfalo, dentre elas, a amígdala. Dela partem sinais que são direcionados a outros núcleos responsáveis por gerarem respostas fisiológicas, comportamentais, autonômicas e hormonais relacionadas à ansiedade (BRANDÃO, 2008). A fisiologia da ansiedade, de maneira geral, é dada por condições estressantes que acarretam alterações hormonais desencadeadas por um desequilíbrio do eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal, e mediada pela ação de uma série de neurotransmissores (KANDEL et al, 1995). Portanto, estímulos são detectados pelo córtex, tálamo e hipocampo e as informações chegam até a amígdala. Impulsos nervosos partem do núcleo central da amígdala e chegam ao córtex, hipotálamo e tronco encefálico, iniciando as respostas comportamentais relacionadas à ansiedade (BRANDÃO, 2008).

Ansiedade e medo são comportamentos que estão relacionados, pois ambos aparecem mediante à presença de ameaça. Isso têm gerado dificuldades em definir e entender as diferenças entre eles (GRAEFF, 2007). Porém, segundo Blanchard e Blanchard (1988), ansiedade é a emoção relacionada ao comportamento de avaliação de risco, em situações que o perigo é incerto (ameaça potencial), seja porque o contexto é novo ou porque o estímulo do perigo (por exemplo, um predador) esteve presente no passado, mas não está mais no ambiente. Ao contrário, o medo está relacionado a estratégias defensivas que ocorrem em resposta ao perigo real que está a certa distância da vítima (ameaça presente). Neste caso, o animal pode evitar a situação sempre que existir uma rota de fuga disponível ou pode se tornar imobilizado (congelamento) quando não há nenhuma saída. Assim, ansiedade e medo parecem ser estados emocionais qualitativamente diferentes, que estão relacionados a dois tipos de reações de defesa, o primeiro à ameaça potencial e o segundo a ameaça próxima (GRAEFF, 2007).

Vários fatores ambientais, em humanos, podem estar associados à ansiedade, sendo eles o tabagismo, consumo de álcool, e ingestão de alimentos, desencadeando a obesidade (STRINE et al, 2008). Em camundongos, o ganho em peso também pode estar diretamente associado à alteração da emocionalidade. O *mGluR8* (*Metabotropic glutamate receptor 8*) é um dos oito receptores de glutamato, o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central de vertebrados. Quando ativado inibe a liberação de glutamato (TONG et al, 2002). Esse receptor está localizado em terminais pré-sinápticos no hipocampo no tubérculo olfatório e córtex (WADA et al, 1998). Além disso, análises histológicas e farmacológicas em ratos localizaram o *mGluR8* em células de ilhotas pancreáticas (TONG et al, 2002). Camundongos com o gene *mGluR8* inativo são em média 8% mais pesados que camundongos tipo selvagem. Ainda, os animais que não expressam o gene em questão apresentaram uma maior ansiedade quando testados no campo aberto e o labirinto em cruz

elevado (DUVOISIN et al, 2005). Assim, obesidade e ansiedade podem estar correlacionadas em roedores, assim como em humanos, incluindo associação com depressão (SARWER et al, 2005; STRINE et al, 2008). Obesidade e depressão são condições multifatoriais que são influenciadas por bases genéticas e pelo contexto ambiental, como por exemplo, o ambiente familiar (WHITAKER, 2004).

### ***1.2 Teste de Campo aberto***

Pelo seu caráter subjetivo, a emocionalidade não pode ser diretamente medida. Por isso, foram desenvolvidos ao longo da história vários testes para avaliar o comportamento e emocionalidade/ansiedade em animais não humanos, entre eles caixa claro e escuro (COSTALL et al, 1989), labirinto em cruz elevado (LISTER, 1987; PELOW et al, 1985) e campo aberto (HALL, 1934). Estes testes baseiam-se no confronto do animal com um ambiente novo, vivenciando o conflito entre o impulso de explorar a área/objeto desconhecidos, curiosidade, e a motivação para evitar potenciais perigos (CRUSIO, 2001; STEIMER; DRISCOLL, 2003).

O teste de campo aberto ou arena foi criado pelo psicólogo Calvin Hall, na década de 1930. O aparato desenvolvido por ele tinha o formato circular com 1,2 m de diâmetro e paredes com 0,45 m de altura. Atualmente foram desenvolvidas variações nesse teste conforme o interesse da pesquisa. São encontradas variações no tamanho e forma da arena (ELIAM, 2003), e na intensidade e cor da iluminação (WALKER; DAVIS, 1997). Originalmente o teste de campo aberto foi desenvolvido para avaliar comportamento em roedores. Entretanto, ele tem sido utilizado para estudo de comportamento em outros modelos animais, tais como galinhas (WEBSTER; HURNIK, 1990), porcos (MORMEDE et al, 1994; DONALD et al, 2011), (VILLALBA et al, 2011), coelhos (JOZWIK et al, 2009) entre outros (FORKAMAN, 2007).

O processo de avaliação do campo aberto geralmente envolve o confronto forçado do animal, ao ambiente novo a partir do qual o escape é impedido por paredes circundantes (WALSH; CUMMINS, 1976). O animal é colocado no centro ou próximo às paredes do aparelho e vários itens comportamentais são registrados por um período que pode variar de dois a 20 minutos, sendo que o período mais utilizado é o de cinco minutos (PRUT; BELZUNG, 2003). No passado, o estudo do comportamento utilizando o teste de campo aberto era feito por observação direta do animal submetido ao teste, ou seja, o pesquisador avaliava o animal enquanto o teste acontecia. Atualmente utilizam-se câmeras filmadoras para gravação dos testes e análise posterior dos vídeos. Uma forma talvez mais precisa de análise é a utilização de programas de computadores que analisam os movimentos e comportamentos etológicos dos animais de forma automática (DRAI; GOLANI, 2001). A grande vantagem é a economia de tempo e a precisão dos resultados, entretanto, o empecilho principal é o alto custo desses programas.

Os dados etológicos geralmente observados, e que podem informar a respeito da emocionalidade e ansiedade são: defecação, *grooming*, imobilidade, levantamento, distância percorrida no centro e periferia do campo aberto e tempo de permanência nessas regiões (CAROLA et al, 2002).

Roedores quando expostos a um ambiente novo podem apresentar um alto grau de defecação causado por ativação do sistema nervoso autônomo (HALL, 1934). No entanto, inicialmente se propunha que um baixo grau de ambulação também parecia uma resposta de medo dos animais expostos a esse novo ambiente (BROADHURST, 1969; HALL, 1934; GENTSCH et al, 1987; GRAY, 1979). Portanto, de acordo com essa visão, o nível de emocionalidade de um roedor seria positivamente relacionada com a defecação e negativamente relacionada com a quantidade de ambulação durante o teste de campo aberto.

Outros autores, entretanto, discordam, já que vários estudos mostraram decréscimo tanto na ambulação quanto na defecação e não uma correlação inversa (RAMOS et al, 1997).

Um importante componente do repertório comportamental de vários animais, mas principalmente roedores, é o *grooming*. Animais, em geral, realizam essa ação principalmente para higienização da superfície corporal. Entretanto, o *grooming*, também possui um papel na termorregulação, estimulação da pele, comunicação química, interação social e redução do estresse (SMOLINKSY et al, 2009). Estudos vêm demonstrando que esse comportamento se mostra sensível a ação de ansiolíticos (CRAWLEY et al, 1983; MOODY et al, 1988) e ansiogênicos (FERRÉ et al, 2008; NOSEK et al, 2008). O *grooming*, em roedores, possui uma microestrutura que segue um padrão complexo seguindo a direção cefalocaudal, é composta por quatro fases sequenciais e complexas que podem ser distinguidas (BERRIDGE et al, 2005; KALLUEFF et al, 2007). Há indícios de que, em roedores, essa microestrutura se mostra sensível à fatores estressores. Portanto utilizar o *grooming* como ferramenta para detecção de ansiedade implica em fazer, além de uma análise quantitativa, uma análise qualitativa, utilizando a análise da microestrutura desse comportamento (KALUEFF; TUOHIMAA, 2005).

Roedores, em geral, evitam locais abertos e iluminados, essa aversão é natural e também é apresentada frente a novidades, como objetos desconhecidos ou mesmo a ambientes novos (STEIMER; DRISCOLL, 2003). Essa situação pode gerar no animal, além do comportamento ansioso, o medo e o estresse. Uma medida que vem sendo usada para detectar esses comportamentos no campo aberto é a imobilidade (ARCHER, 1979; ROOZENDAAL et al, 1992). Assim a imobilidade está associada com a medida de reação de medo a espaços abertos, sendo correlacionada negativamente com medidas de atividade no centro (FILE, 2001; HOLMES et al, 1998).

O teste de campo aberto também é utilizado para avaliar atividade locomotora e exploratória em camundongos e ratos, pois esses dados podem ser um indicativo de ansiedade nesses animais (CRAWLEY; GOODWIN, 1980). Desta forma, a emocionalidade pode ser avaliada através da exploração do ambiente, verificada pela distância percorrida no campo aberto e levantamento, ou seja, quando o roedor fica apoiado somente nas patas traseiras. Valores de distância e levantamento são importantes, pois, são indicativos indiretos de emocionalidade/ansiedade (CHOLERIS et al, 2001). Assim, animais que percorrem uma maior distância e levantam mais frequentemente, durante o período de teste, são considerados menos ansiosos, logo, animais mais ansiosos tendem a explorar menos o campo aberto.

Roedores espontaneamente preferem a periferia do aparelho e evitam a atividade na parte central do campo aberto, sendo que uma maior atividade na região central indica uma menor ansiedade. De fato, camundongos e ratos andam perto das paredes, um comportamento chamado tigmotatismo ( PRUT; BELZUNG, 2003). Esses parâmetros comportamentais são sensíveis aos efeitos de ansiolíticos, portanto, o teste do campo aberto tornou-se uma forma padrão de medição de comportamentos relacionados à ansiedade em roedores (PRUT; BELZUNG, 2003).

### ***1.3 Bases genética da ansiedade***

A variação do comportamento, assim como a maioria das características individuais, incluindo diferenças na ansiedade, humor, inteligência e na sensibilidade as drogas de abuso, são quantitativas, ou seja, a distribuição do fenótipo é contínua, resultante da variação genética e ambiental (FALCONER; MACKAY, 1996; STEARNS; HOEKSTRA 2005). Por isso, para elucidar as bases genéticas de comportamentos em geral, faz-se necessário uma abordagem completa, utilizando o cruzamento de animais modelos aliado ao conhecimento proveniente de técnicas moleculares, o que possibilita identificar regiões ou até mesmo genes



relacionados a um comportamento específico (SHIMOMURA et al, 2001; PERIPATO et al, 2002; LIM et al, 2004). O uso de animais modelos, principalmente o camundongo, é importante, pois há uma congruência entre a base neural das emoções e ansiedade entre camundongos e humanos (FLINT; CORLEY, 1996), isso porque há uma manutenção na ordem dos genes nos cromossomos entre essas duas espécies.

Para uma melhor análise e compreensão da base genética de características comportamentais em animais modelo, podem ser utilizadas duas estratégias de investigação, a genética reversa (*reverse genetics*) e genética direta (*forward genetics*) (BOAKE, 2002). A abordagem de genética reversa utiliza a análise do gene até o comportamento, em que o efeito de um produto gênico no fenótipo é explorado através de sua alteração, que pode ser realizada por tecnologias de nocaute (inativação do gene) (KNAUBER; MULLER, 2000), transgênese (transferência de gene) (BOLIVAR et al, 2000), *gene trap* (mutações aleatórias criadas em células-tronco embrionárias) (LEIGHTON et al, 2001), entre outras. A outra abordagem, genética direta, parte da análise da variação do fenótipo com intuito de identificar genes responsáveis pela variação. Esta abordagem irá nos fornecer informações acerca da arquitetura genética, ou seja, o número de genes envolvidos na produção dos caracteres em questão, como os alelos presentes em um locus interagem entre si (dominância, aditividade), como os alelos em diferentes loci interagem entre si (epistasia), ou se um determinado gene está envolvido na determinação de diversas características (pleiotropia) (FLINT; MACKAY, 2009). Uma das formas de se estudar a variação do fenótipo, com intuito de identificar genes responsáveis pela variação, é utilizando a análise de QTL (*Quantitative trait locus*). Esta metodologia utiliza a correlação entre vários marcadores polimórficos dispersos nos cromossomos e o fenótipo, sendo realizada a varredura por todo o genoma por regiões que contenham genes que afetam o caráter em questão (FALCONER; MACKAY, 1996). A utilização de ambas estratégias, de genética direta e reversa, e se possível a integração entre

elas, possibilita um estudo mais detalhado e eficaz, permitindo desvendar os mecanismos genéticos envolvidos no comportamento (BOAKE et al, 2002).

Muitos estudos de genética do comportamento têm obtido resultados favoráveis, demonstrando que variações em fenótipos de comportamento estão relacionadas a variações genéticas (FLINT, 2003). Vários QTLs em diferentes cromossomos têm sido associados ao comportamento em roedores (BAUM et al, 2006; CRAWLEY et al, 1997; PARK et al, 2011; SINGER et al, 2005; TURRI et al, 2004; WEHNER et al, 1997), tais como o medo (WEHNER et al, 1997; CALDARONE et al, 1997; VALENTINUZZI et al, 1998), ansiedade medida no campo aberto (GERSHENFELD et al, 1997; RAMOS et al, 1999; TURRI et al, 2001) e no labirinto em cruz elevado (COHEN et al, 2001; RAMOS et al, 1999), depressão medida no teste de nado forçado (COHEN et al, 2001; WATANABE, 2010; YOSHIKAWA et al, 2002), entre outros. A identificação dessas regiões possibilita e facilita a busca por genes candidatos que possam ser responsáveis pela variação do comportamento em diversos animais, mas principalmente em camundongos e ratos (FRISCH et al, 2000; FRODL et al, 2007; HORINOUCI et al, 2004; KALSCHUEUR et al, 2008; MACKAY, 2001; PAPADOPOULOS et al, 2007; ROTZINGER et al, 2010; SAIPOUR et al, 2010).

#### ***1.4 Ansiedade e Comportamento Materno***

Nosso grupo vem trabalhando com camundongos do inter cruzamento de duas linhagens endogâmicas, SM/J e LG/J. Temos investigado a arquitetura genética do cuidado materno em vários aspectos desde a ausência total de cuidado com a prole que afeta a viabilidade da mesma (PERIPATO; CHEVERUD, 2002; PERIPATO et al, 2002), à aspectos mais específicos como tamanho de ninhada (PERIPATO et al, 2004), construção de ninho (SAUCE, 2010) e ejeção de leite (GÓES, 2010). Assim, o inter cruzamento entre as linhagens

SM/J e LG/J é de grande importância para investigar aspectos que podem interferir o cuidado materno, entre eles a emocionalidade da mãe.

O comportamento materno em mamíferos é entendido como todo o cuidado provido pela mãe aos seus filhotes, possibilitando o desenvolvimento de características e habilidades que sejam suficientes para assegurar a sobrevivência da prole até que se torne independente do alimento provido, o leite, e de seus cuidados (CROWELL-DAVIS; HOUPPT 1986). Esse comportamento é complexo e flexível, exerce efeito direto no desempenho da progênie (CHEVERUD; MOORE 1994; PERIPATO et al, 2002), possui bases genéticas complexas e sofre influência do ambiente (PERIPATO; CHEVERUD 2002; PERIPATO et al, 2002). O ambiente proporcionado pela mãe também pode influenciar o desenvolvimento emocional de seus filhos (FRANCIS et al, 1999; MOFFITT et al, 2006) através da modulação no desenvolvimento de circuitos neurais dos filhotes (CALDJI et al, 1998). A emocionalidade da própria fêmea também desponta como fator importante que pode influenciar a viabilidade da progênie (MAYER; ROSENBLATT, 1987; HANSEN; FERREIRA 1986; BRUNNER et al, 1999).

O desempenho de uma mãe em manter seus filhotes vivos está relacionado a componentes gerais como: reconhecimento dos filhotes (NOIROT, 1972); aprendizagem e memorização (DWYER; LAWRENCE, 2000); e mecanismos de depressão, medo e ansiedade (MAYER; ROSENBLATT, 1987; HANSEN; FERREIRA, 1986; BRUNNER et al, 1999). Nesse estudo, pretendemos investigar se o estado emocional da mãe exerce influência no cuidado com a prole e conseqüentemente na sobrevivência. Portanto, devido à importância que existe no ambiente fornecido pela mãe para o sucesso da prole, essa característica possui um alto valor adaptativo (FALCONER; MACKAY, 1996).

Em mamíferos, os primeiros dias de vida, principalmente a fase de amamentação, são extremamente importantes para o desenvolvimento fisiológico e neurocomportamental da

prole, como demonstrado em um estudo feito com cães, em que o desmame precoce afetou a capacidade de interação social dos indivíduos quando adultos (SCOTT; FULLE, 1965). O mesmo é observado em gatos e também em roedores, em que o desmame precoce, ou seja, a diminuição da interação mãe-filhote no início da vida, afeta comportamentos sociais futuros (JANUS, 1987). Vários estudos têm demonstrado que a variação de cuidado materno em roedores pode apresentar consequências relacionadas à ansiedade em sua progênie (CALDJI et al, 2000). Ainda, o desempenho de uma mãe para manter seus filhotes vivos está relacionado a vários componentes, dentre eles destaca-se, depressão, medo e ansiedade (MAYER; ROSENBLATT 1987; HANSEN; FERREIRA 1986; BRUNNER et al, 1999). Filhotes de ninhadas cuja mãe não apresentava o cuidado materno de *grooming* (limpeza) e acariciamento apresentaram alto nível de ansiedade quando comparados com filhotes de fêmeas que apresentavam tal comportamento (CALDJI et al, 1998). O comportamento de limpeza e acariciamento dos filhotes pode ser transferido de uma geração para outra, de forma que filhas que foram limpas e acariciadas tornarão mães com o mesmo comportamento (FRANCIS et al, 2003). Em ratos, a separação precoce da mãe e seus filhotes e o desmame antecipado geram um aumento na ansiedade e agressividade e prejudica o desenvolvimento de respostas neuroendócrinas ao estresse (KIKUSUI et al, 2006). Além disso, essa precocidade do desmame da prole gera um aumento na agressividade e ansiedade desses animais quando testados no Labirinto em Cruz Elevado (NAKAMURA et al, 2003). O efeito da separação da mãe e do filhote pode modular a emocionalidade em ratos adultos, sendo que esse efeito depende do sexo dos filhotes (ROMEO et al, 2003). Esse efeito do cuidado materno no desenvolvimento é observado inclusive em humanos, em que a falta de cuidado materno no início da vida pode ser um fator de risco para transtornos psiquiátricos tais como, ansiedade e depressão (PHILLIPS et al, 2005). Essas variações nesse comportamento são naturais e podem estar relacionadas a níveis de ansiedade e estresse durante a vida, mas

principalmente, durante o período de prenhez da mãe. O período da lactação é um período importante para a ansiedade, ele tem sido associado como modulador de ansiedade, em que mães em fases iniciais de lactação apresentam um comportamento menos ansioso em relação ao progresso do estágio da maternidade (BYRNES; BRIDGES, 2006).

Os mecanismos apontados como responsáveis pela variação do comportamento materno com a alteração da emocionalidade dos filhos envolvem modificações epigenéticas. Essas modificações envolvem “silenciamento” de regiões do DNA que estão ligadas a expressão de genes que podem afetar o comportamento materno. Este “silenciamento” pode ocorrer através do mecanismo de metilação do DNA ou de modificações de histonas, entre outros (JABLONKA; RAZ, 2009). Por exemplo, foi encontrada uma associação entre a metilação de uma citosina do promotor de *ER- $\alpha$*  (receptor de estrógeno) e variação no comportamento materno em ratos (CHAMPAGNE et al, 2006). Ainda, demonstrou-se em camundongos que filhas de mães que possuíam altas taxas de *liking-grooming*, mas eram criadas por mães com baixas taxas desses comportamentos, se tornavam adultos com baixa ansiedade. Entretanto, filhas de mães com baixas taxas de *liking-grooming* criadas por mães com altas taxas desses comportamentos, apresentavam baixa ansiedade (FRANCIS et al, 1999). Isso indica que o comportamento de *liking-grooming* atua regulando, epigeneticamente, a expressão da ansiedade em fêmeas adultas (FRANCIS et al, 2003).

O presente trabalho contribuirá para o entendimento da ansiedade em fêmeas no período materno, utilizando o teste de campo aberto como ferramenta, nas duas linhagens de camundongos SM/J e LG/J e seu inter cruzamento. Ainda enriquecerá a investigação da base genética associada a esse comportamento, pois permitirá verificar se existem regiões (QTLs) associadas com a emocionalidade de fêmeas em estado materno, e ainda verificar se o estado emocional influencia a sobrevivência dos filhotes através da análise da viabilidade da prole.

Além disso, serão testadas as possíveis associações fenotípicas desse comportamento com características de ganho em peso e taxa de crescimento nestes animais.

## 2. OBJETIVOS

O objetivo geral do presente trabalho foi investigar a arquitetura genética para a emocionalidade de fêmeas SM/JxLG/J em fase pós-parto.

Os objetivos específicos foram:

- Verificar variação na emocionalidade, através do teste de campo aberto, entre fêmeas das linhagens parentais (SM/J e LG/J), e das gerações F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub> na fase pós-parto, e de fêmeas F<sub>2</sub> que não estavam em fase materna;
- Verificar associação entre ganho em peso e crescimento durante todas as fases de vida da fêmea até a maturidade e a sua emocionalidade na fase pós-parto;
- Verificar associação entre a emocionalidade na mãe e viabilidade de sua progênie;
- Realizar a busca por QTLs individuais e epistáticos associados a emocionalidade em fêmeas pós-parto;
- Apontar potenciais genes candidatos aos QTLs identificados.

## 3. MATERIAL e MÉTODOS

### 3.1 Animais

Os animais utilizados nesse estudo são provenientes de duas linhagens endogâmicas, SM/J (*Small*) e LG/J (*Large*), provenientes do *The Jackson Laboratory*, EUA. Por meio de diferentes experimentos essas linhagens foram selecionadas para tamanho corporal até 60 dias, e diferem em 24 gramas nesse período (CHAI, 1956a, 1956b). De uma seleção em sete diferentes linhagens puras para tamanho pequeno do corpo até 60 dias originou-se a linhagem

SM/J (MACARTHUR, 1944). A linhagem LG/J é proveniente de uma população albina selecionada para tamanho grande do corpo aos 60 dias (GOODALE, 1938). Ambas são homozigotas entre si para todos os locos (isogênicas), com exceção do loco *Agouti* na linhagem SM/J devido a problemas de viabilidade (HRBEK et al, 2006).

Inicialmente foram cruzados 10 machos SM/J com 10 fêmeas LG/J e 10 machos LG/J com 10 fêmeas SM/J. Os 68 animais  $F_1$ , todos heterozigotos e autossomicamente idênticos entre si, foram classificados de acordo com sua origem parental: tipo A, quando resultantes do primeiro cruzamento, e tipo B, quando resultantes do cruzamento entre machos LG/J e fêmeas SM/J. Para compor o cruzamento  $F_1 \times F_1$ , todas as combinações de cruzamentos entre os indivíduos dos grupos A e B foram realizados. Os animais  $F_2$  foram cruzados aleatoriamente entre famílias, evitando cruzamento entre irmãos, sendo realizados 258 cruzamentos. Assim, na décima semana os cruzamentos foram realizados em caixas individualizadas por casais e os animais foram pesados uma vez por semana para a detecção da prenhez. Uma vez detectada a prenhez, retirava-se o macho e vários aspectos relacionados ao cuidado materno eram observados durante o período pré parto e durante sete dias após o parto. Na terceira semana foi realizado o desmame, separando os animais em caixas com até cinco animais/caixa do mesmo sexo. Os animais foram pesados semanalmente da primeira até a décima semana, período que foram encaminhados para a reprodução. Após realizados os procedimentos descritos anteriormente os animais eram sacrificados e necropsiados. Nesse procedimento retiramos e pesamos os órgãos como: coração, rins, fígado e baço. O mesmo procedimento foi feito com as gorduras renais, mesentérica, inguinal e reprodutiva, além disso, retiramos e medimos o comprimento do tubo digestório. Todos os animais foram mantidos no Biotério Central da Universidade Federal de São Carlos (São Carlos, SP) em caixas com isoladores para a purificação de ar (rack ventilada Alesco - ALERKD-112), com temperatura de aproximadamente 22°C, fotoperíodo de 12 horas claro/escuro (luzes acesas as

6 horas da manhã), com ração Nuvilab CR1/Nuvital (Colombo, PR) e água *ad libitum*. Todos os procedimentos envolvendo os animais passaram pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos (Anexo).

## **3.2 Fenótipos avaliados**

### **3.2.1 Crescimento**

Utilizamos fêmeas das linhagens SM/J (n=14) e LG/J (n=9), e das gerações F<sub>1</sub> (n=28) e F<sub>2</sub> (n=163) para analisar o fenótipo em questão, que compreende registro de peso e mensuração da cauda. Tais fêmeas eram colocadas em recipiente plástico e pesadas usando balança digital (Bioprecisa-JH2102). A cauda foi mensurada utilizando uma régua, posicionada na base da mesma seguindo o comprimento até a região distal da estrutura. Os registros de peso e mensuração da cauda foram feitos semanalmente, da primeira até a sétima semana de vida para as fêmeas SM/J, LG/J e F<sub>1</sub>, e da primeira até a décima semana para as fêmeas F<sub>2</sub>. Após este período as fêmeas eram encaminhadas para a reprodução.

### **3.2.2 Emocionalidade**

Para análise de emocionalidade nas fêmeas, utilizamos o teste de campo aberto, de acordo com o procedimento descrito por Hall (1934), com algumas modificações. Esse aparato consistiu em um círculo de acrílico de 30 cm de diâmetro e 30 cm de altura. A base é de acrílico de 0,50 cm x 0,50 cm pintada com demarcações (Figura 1).



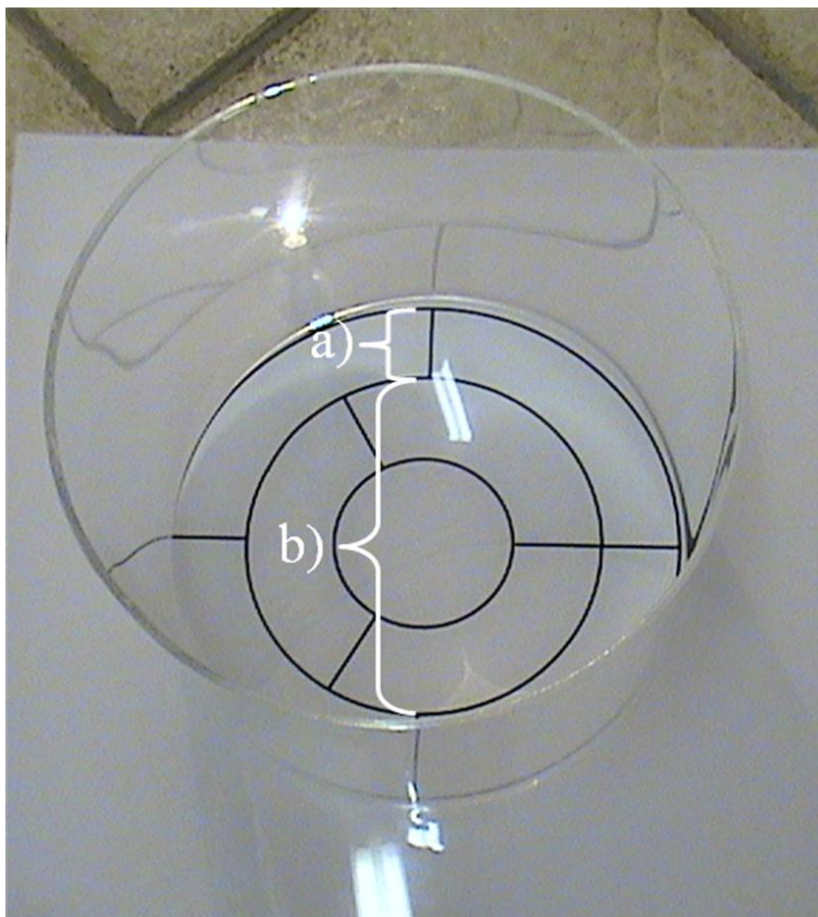


Figura1. Aparato de Campo Aberto. a) região periférica; b) região central do aparato.

Conforme identificado na Figura 1, a região periférica ou de tigmotaxia (a) é a que o roedor utiliza as vibrissas para a percepção tátil da parede que delimita o campo. Uma maior atividade ou permanência nessa região relaciona-se positivamente com a ansiedade do animal em teste e conseqüentemente seria um animal mais “emotivo”. Esta postura é a tendência natural de roedores, como camundongos e ratos, pois em geral possuem preferência para esta região (PRUT; BELZUNG, 2003). A região central (b) é a mais procurada por animais mais ativos e sua maior exploração indica uma menor ansiedade ou emocionalidade.

Foram testadas fêmeas em fase materna (idade= $\sim$ 12 semanas) das linhagens SM/J (n=13, 65 minutos) e LG/J (n=6, 30 minutos), pertencentes a geração parental, e gerações F<sub>1</sub> (n=26, 130 minutos) e F<sub>2</sub> (n=181, 920 minutos) deste intercruzamento. Os testes foram realizados no segundo dia após o parto, no período da manhã, de 8:00 as 12:00. Também

testamos fêmeas  $F_2$  ( $n=117$ , 585 minutos), fora da fase materna (idade= $\sim 16$  semanas), para verificarmos se o período materno exercia influência em fenótipos de emocionalidade. Cada fêmea foi colocada no centro do campo e registrado em vídeo por cinco minutos, através de uma câmera posicionada sobre o campo aberto. Ao final de cada teste foi feita a limpeza da base e parede do campo aberto com Vancid 10/Vansil (Descalvado, SP) e álcool 70%.

A análise dos vídeos foi feita utilizando o programa *X-Plo-Rat 2005*, versão 1.1.0 (<http://scotty.ffclrp.usp.br/download.php?view.1>). Tal análise consistiu em avaliar os parâmetros etológicos de defecação, frequência de levantamento, tempo e frequência de *grooming* e tempo e frequência de imobilidade. Defecação equivale ao número de bolos fecais expelidos pela fêmea e o levantamento é dado pelo número de vezes em que o animal fica apoiado nas patas traseiras durante o período de teste. Para o *grooming*, observamos o número de vezes e o tempo em que a fêmea realiza o ato de limpeza do corpo durante o período de teste. Finalmente, a imobilidade é dada pela frequência e tempo em que a fêmea permanece imóvel no campo aberto. Também verificamos a emocionalidade utilizando os parâmetros distância, que é o número de quadrados percorridos pela fêmea na região periférica e na região central do campo durante o período de teste, e tempo de permanência da fêmea na região periférica e na região central do campo. Estas duas regiões estão mostradas na Figura 1, parte (a) e (b), respectivamente. Para utilizar estas informações como indicativo de emocionalidade, dividimos a distância, quadrados cruzados, no centro e o tempo no centro pelos seus respectivos valores totais (quadrados cruzados no centro + quadrados cruzados na periferia e tempo no centro + tempo na periferia, respectivamente) (KOPP, 1997). Assim temos a distância relativa percorrida no centro e tempo relativo no centro. A atividade locomotora foi avaliada pela distância total percorrida, dada pelo número de quadrados totais cruzados durante o período de teste.

### **3.2.3 Procedimentos laboratoriais**

O DNA total foi extraído do fígado de 234 fêmeas F<sub>2</sub> pelo protocolo de tiocianato de guanidina (NELSON; KRAWETZ, 1992). Foram utilizados 101 marcadores microssatélites dispersos pelo genoma para a tipagem em cada uma das 234 fêmeas. Esses marcadores abrangem todos os 19 cromossomos autossômicos e o cromossomo sexual X de maneira relativamente uniforme distando, em média, 20 cM (Figura 2). Foram realizadas aproximadamente 25.000 genotipagens e essa etapa demandou esforço de toda a nossa equipe, sendo que cinco, aproximadamente 8.000 genotipagens, dos 20 cromossomos de responsabilidade do autor deste trabalho.

Os marcadores microssatélites utilizados foram selecionados por serem polimórficos nas linhagens estudadas e apresentarem alelos com tamanho suficientemente distinto para permitir separação em gel de agarose. Os marcadores moleculares foram amplificados utilizando a técnica de PCR com auxílio de um aparelho termociclador PTC 200 (BIORAD). Esse procedimento foi realizado usando o protocolo para microssatélites descrito por Dietrich e colaboradores (1992) e modificado por Routman e Cheverud (1994). Tais modificações envolvem além da solução contendo Tris-HCl pH 9.0 (200 mM), KCl (0,5M), MgCl<sub>2</sub> (23mM), BSA, dNTP e *Taq polimerase* (5 u/μL), a adição de corante Vermelho de Cresol (10mM) e sacarose que não alteram seu produto, e facilita a pipetagem, uma vez que o corante é adicionado ao coquetel reagente e depois distribuído entre os tubos individuais. Este procedimento permite a tipagem de grande número de indivíduos rapidamente, pois o material amplificado é aplicado diretamente no gel de corrida. O produto da PCR foi aplicado para corrida em gel de agarose 3 ou 5% acrescido de Brometo de Etídeo com tampão de TBE (Tris-Cl a 90mM, ácido bórico a 90mM, EDTA 20mM e água destilada) a 200mA. Após a separação do material no gel, o material de genotipagem das fêmeas F<sub>2</sub> foi fotografado e utilizado para a genotipagem dos indivíduos.

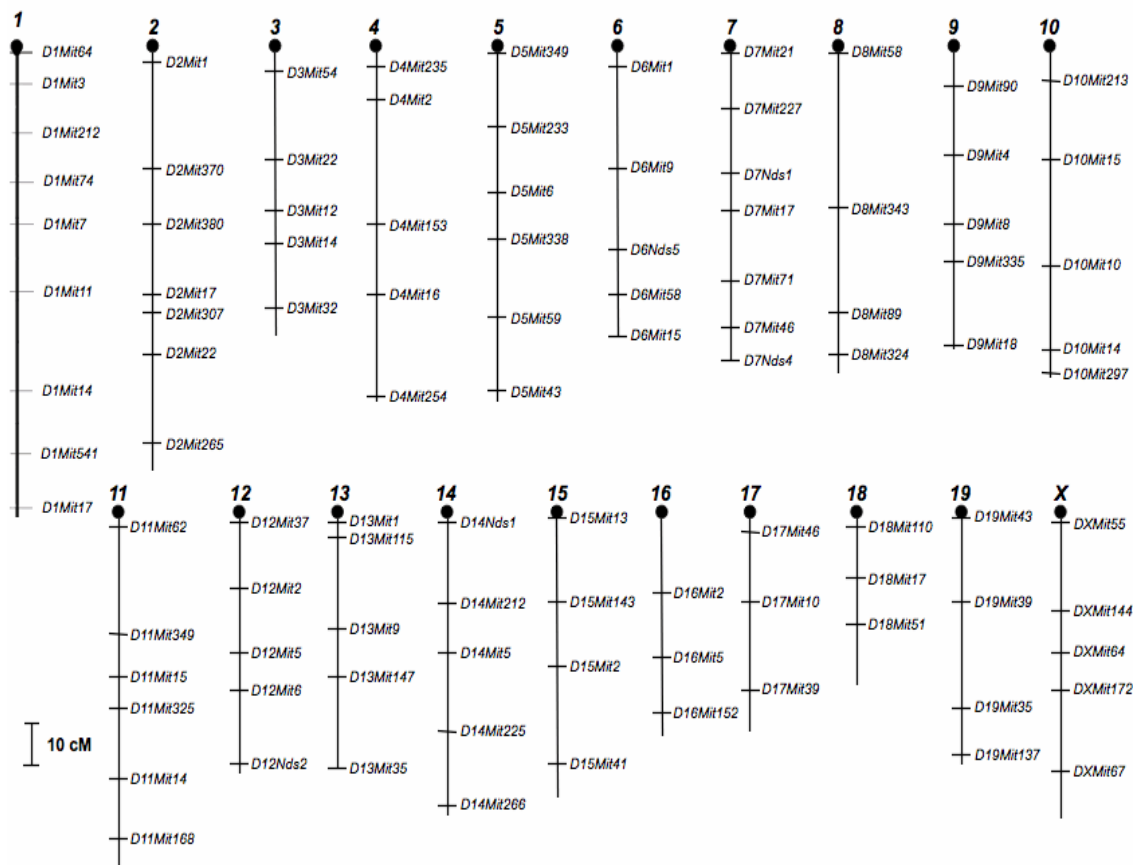


Figura 2-Marcadores moleculares utilizados e sua localização nos cromossomos

### 3.3 Análise dos Resultados

#### 3.3.1 Análise de crescimento

Para a realização da análise de crescimento, composto pelo peso e comprimento de cauda, agrupamos os dados em duas categorias, inicial (I) e posterior (P). A primeira corresponde ao desenvolvimento inicial que vai da primeira a terceira semana (fase que os animais ainda estão sendo amamentados), e a categoria P corresponde ao desenvolvimento da terceira a sétima semana de vida. Utilizamos ainda uma terceira fase, com medidas de peso e comprimento da cauda somente para a geração F<sub>2</sub>. Esse período corresponde ao crescimento da sexta até a décima semanas de vida, e foi chamada de fase U (última fase), que foi somente utilizado no teste de associação entre crescimento e emocionalidade/sobrevivência dos filhotes descrito abaixo. Para cada uma dessas fases, fizemos a diferença entre os

períodos, por exemplo, no período I subtraímos a primeira da terceira semana. Esse procedimento foi feito para peso e comprimento da cauda, assim obtivemos o ganho em peso, dado em gramas, e o crescimento da cauda, dado em centímetros.

Fizemos comparações entre os valores médios de peso e comprimento da cauda em cada categoria para os quatro grupos (SM/J, LG/J, F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub>) utilizando o teste *t* de *Student*, a significância foi verificada quando  $p < 0,05$ .

### **3.3.2 Análise emocionalidade**

Utilizamos o teste *t* de *Student* para a verificação da significância entre as fêmeas das linhagens parentais, LG/J e SM/J, e das gerações F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub> na fase materna e não materna. Comparações em que  $p < 0.05$  foram consideradas significativas.

### **3.3.3 Análise da relação entre peso/crescimento e emocionalidade/sobrevivência e entre sobrevivência e emocionalidade**

Para investigarmos a relação entre os fenótipos de crescimento (ganho em peso e crescimento da cauda I, P e U) e a emocionalidade ou a sobrevivência de toda a ninhada (indicando cuidado materno satisfatório) nas fêmeas F<sub>2</sub>, utilizamos o Modelo Linear Geral (*General Linear Model* – GLM) do programa *SYSTAT* v. 10 (WILKINSON; COWARD, 2000).

### **3.3.4 Análise QTL**

Os mapas de ligação de cada cromossomo foram construídos utilizando a função Kosambi do software *MapManager QTX* (MANLY et al, 2001).

Para a análise de QTL as variáveis fenotípicas foram submetidas à análise de componente principal (PCA - *Principal Component Analysis*) e somente fatores com *eigenvalues* superior a 1 foram mantidos. Para essa análise utilizamos o programa *SYSTAT* v.

10 (WILKINSON; COWARD, 2000). A análise consiste em procedimentos matemáticos cujo objetivo principal é encontrar uma transformação mais representativa e geralmente mais compacta das observações, pois geralmente grande parte da variância dos dados é explicada por um número reduzido de componentes (JOLLIFFE, 1986). Foram escolhidos os vetores que juntos respondiam por mais de 70% da variação (CAROLA et al, 2002). Para essa análise utilizamos os fenótipos, defecação, levantamento, *grooming* (tempo e frequência), imobilidade (tempo e frequência), tempo relativo no centro e na periferia, distância percorrida no centro e na periferia. Depois de realizado esse procedimento obtivemos os fenótipos usados para a busca por QTLs, individuais e epistáticos.

#### 3.3.4.1 QTLs individuais

A presença de potenciais QTLs e suas posições relativas foram estimadas por mapeamento por intervalo (LANDER; BOLSTEIN, 1989) usando análise de regressão múltipla (HALEY; KNOTT, 1992). Essa análise consiste na regressão do fenótipo (dados de emocionalidade) pelos registros de genótipo a cada 2 *cM* ao longo de cada cromossomo. Esses coeficientes de regressão são as estimativas dos valores genotípicos aditivos (*a*) e de dominância (*d*) de um QTL ocorre na posição testada (FALCONER; MACKAY, 1996). A probabilidade de um gene afetar o caráter naquela posição específica foi obtida usando o procedimento MIXED no programa SAS 9.0 (SAS Institute 2004). A significância estatística do modelo foi avaliada utilizando “LOD (*Likelihood of odds scores*)”, ou seja, o logaritmo da probabilidade de que dois marcadores estejam ligados dividido pela probabilidade de que eles não estejam ligados. Foram calculados dois níveis de significância, sendo um deles no nível do cromossomo (~2) e o outro no nível do genoma (3,27), baseados no modelo multiloco de Li e Ji (2005). Os LOD *scores* acima do valor de significância no nível do cromossomo apenas sugerem associação entre o componente genético e o componente

fenotípico. O valor de significância no nível do genoma é um valor importante, pois os “LOD scores” acima desse valor indicam evidência altamente significativa de ligação enquanto valores excedendo apenas o nível de cromossomo devem ser considerados apenas como sugestivos de ligação, requerendo confirmação por análises adicionais independentes (LANDER; KRUGLYAK, 1995). O intervalo de confiança foi obtido pela regra de um-LOD (LYNCH; WALSH, 1998).

#### 3.3.4.2 QTLs epistáticos

Utilizamos uma procura intercromossômica par a par pelo genoma a cada 2 cM para testarmos a interação entre todos genótipos gerados pelo mapeamento por intervalos usando o modelo F<sub>2</sub> (COCKERHAM, 1954), estendido a dois loci seguindo Cokerham e Zeng (1996). O valor de significância baseado no critério de Bonferroni para as interações genoma-genoma foi estimada utilizando o método Li e Ji (LI; JI 2005). Nesse modelo, os valores genotípicos epistáticos são definidos e as suas contribuições para as variâncias aditivas e de interações são incluídas simultaneamente em um teste de significância para epistasia. Consideramos o intervalo de confiança de  $\pm 10$  cM em cada QTL epistático.

## 4. RESULTADOS

### *4.1 Crescimento*

Com os dados de ganho em peso e comprimento de cauda obtivemos uma relação entre os valores. Conforme a Figura 3, (a) e (b) respectivamente, podemos verificar que peso e comprimento da cauda seguem uma mesma tendência em alguns dos grupos analisados. Há um ganho em peso maior na fase P e um crescimento da cauda maior na fase I.

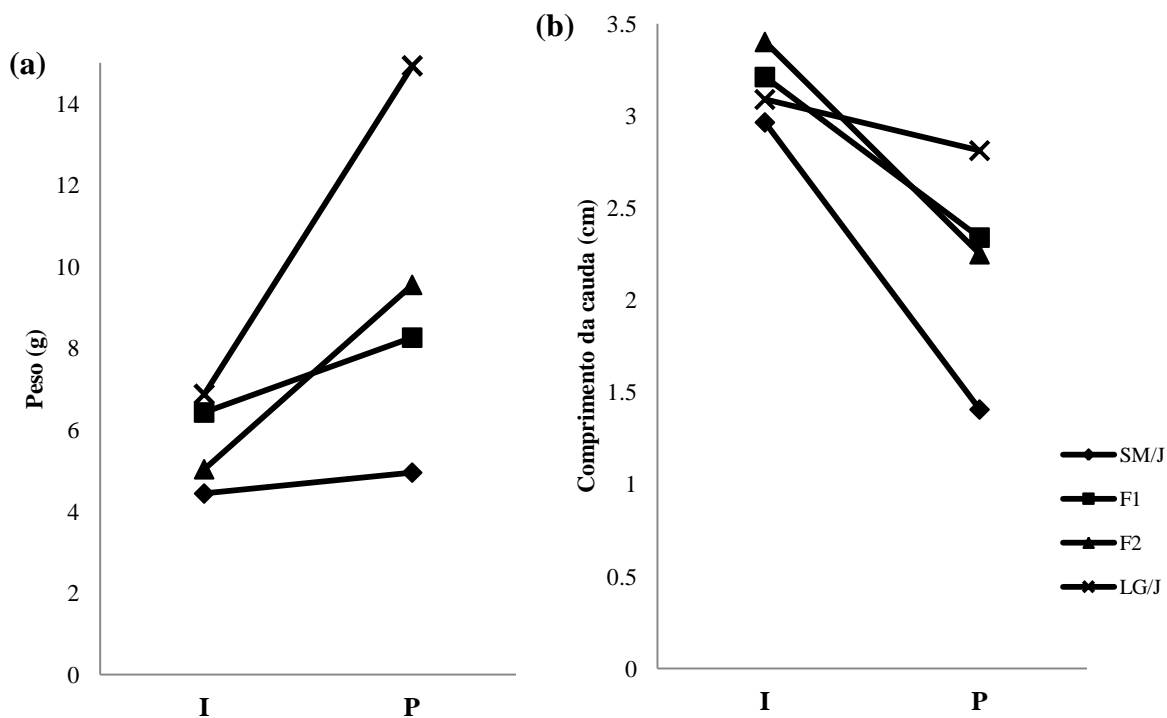


Figura 3. Padrão encontrado para ganho em peso (a) e crescimento da cauda (b) nas linhagens SM/J e LG/J e gerações F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub> nas fases I e P. Foram utilizados valores médios.

Ao compararmos essas duas fases, encontramos que, para o ganho em peso houve diferenças significativas ( $p < 0,01$ ) em todos os grupos, exceto na linhagem SM/J (Figura 4a). De forma semelhante observamos diferenças entre essas fases ( $p < 0,01$ ) para crescimento da cauda para todos os grupos, exceto para a linhagem LG/J (Figura 4b).



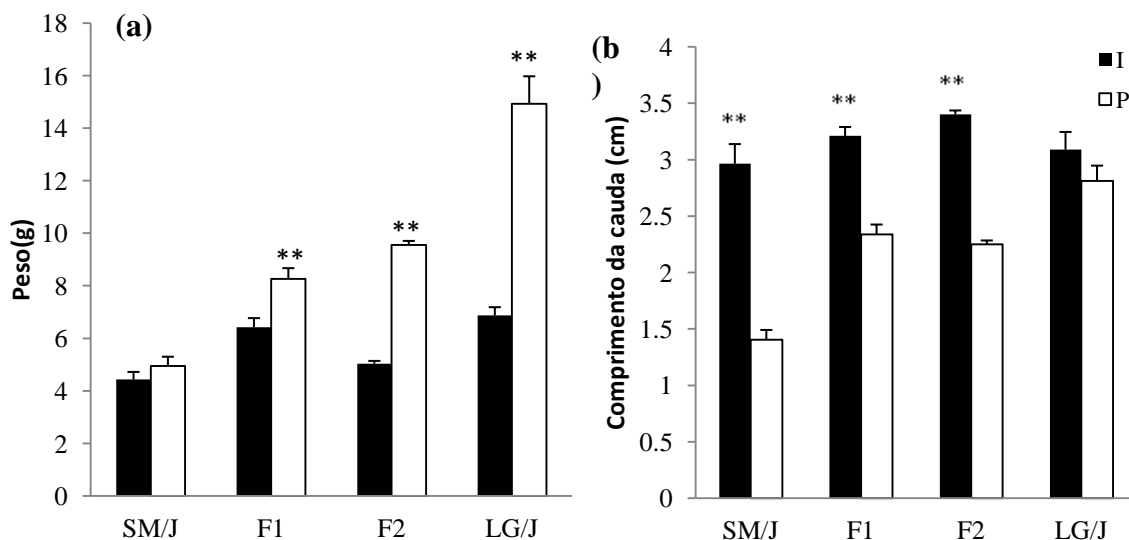


Figura 4. Diferenças entre as médias de ganho em peso (a) e comprimento de cauda (b) nas fases I (1<sup>o</sup>- 3<sup>o</sup>semanas) e P (3<sup>o</sup>- 6<sup>o</sup> semanas) para fêmeas das linhagens parentais SM/J e LG/J e gerações F1 e F2. \*\* =  $p < 0.01$ . Valores médios  $\pm$  Erro padrão médio.

Verificamos diferenças de peso (Tabela 1) e comprimento da cauda (Tabela 2) nas fases I e P. Para o peso na fase I, encontramos diferenças entre F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub> ( $p < 0,01$ ), LG/J e F<sub>2</sub> ( $p < 0,01$ ), F<sub>1</sub> e SM/J ( $p < 0,01$ ), LG/J e SM/J ( $p < 0,01$ ). Encontramos também diferenças significativas de peso na fase I entre F<sub>2</sub> e F<sub>1</sub> ( $p < 0,01$ ), LG/J e SM/J ( $p < 0,01$ ), F<sub>2</sub> e SM/J ( $p < 0,05$ ), LG/J e F<sub>1</sub> ( $p < 0,01$ ), F<sub>1</sub> e SM/J ( $p < 0,01$ ) (Tabela 1).

Tabela 1. Médias dos valores de peso e os respectivos erros padrões para as linhagens SM/J e LG/J e gerações F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub>

	SM/J	F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	LG/J
I	4,43 $\pm$ 0,28 <sup>a,b</sup>	6,42 $\pm$ 0,34 <sup>a,c</sup>	5,03 $\pm$ 0,11 <sup>c,d</sup>	6,87 $\pm$ 0,31 <sup>b,d</sup>
P	4,95 $\pm$ 0,35 <sup>e,f,g</sup>	8,26 $\pm$ 0,41 <sup>e,h,i</sup>	9,55 $\pm$ 0,15 <sup>f,h</sup>	14,92 $\pm$ 1,05 <sup>g,i</sup>

<sup>a,b,c,d,e,f,g,h,i</sup> =  $p < 0,01$ . As letras iguais indicam onde ocorrem diferenças significativas entre os valores médios.

Ao analisarmos o comprimento da cauda na fase I vimos que, F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub> ( $p < 0,01$ ), SM/J e F<sub>2</sub> ( $p < 0,05$ ) e LG/J e F<sub>2</sub> ( $p < 0,01$ ) apresentaram diferenças significativas. Na fase P as diferenças foram entre SM/J e LG/J, SM/J e F<sub>1</sub>, SM/J e F<sub>2</sub>, LG/J e F<sub>1</sub> e LG/J e F<sub>2</sub>, todos com valores de probabilidade menores que 0,01 (Tabela 2).

Tabela 2. Médias dos valores de comprimento da cauda e os respectivos erros padrões para as linhagens SM/J e LG/J e gerações F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub>

	SM/J	F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	LG/J
I	2,96 ±0,17 <sup>a</sup>	3,21 ±0,07 <sup>b</sup>	3,40 ±0,03 <sup>a,b,c</sup>	3,08 ±0,15 <sup>c</sup>
P	1,40 ±0,08 <sup>d,e,f</sup>	2,33 ±0,08 <sup>d,g</sup>	2,24 ±0,03 <sup>e,h</sup>	2,81 ±0,13 <sup>f,g,h</sup>

<sup>a</sup> = p<0.05      <sup>b,c,d,e,f,g,h</sup> = p<0.01. As letras iguais indicam onde ocorrem diferenças significativas entre os valores médios.

As linhagens parentais apresentam peso (Figura 5a) e tamanho corporal (Figura 5b) significativamente diferente (p<0.01), sendo a LG/J com os maiores valores e a SM/J com valores menores para estas características. Ao observamos as gerações F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub> percebemos que elas não possuem diferenças significativas de peso (Figura 5a).

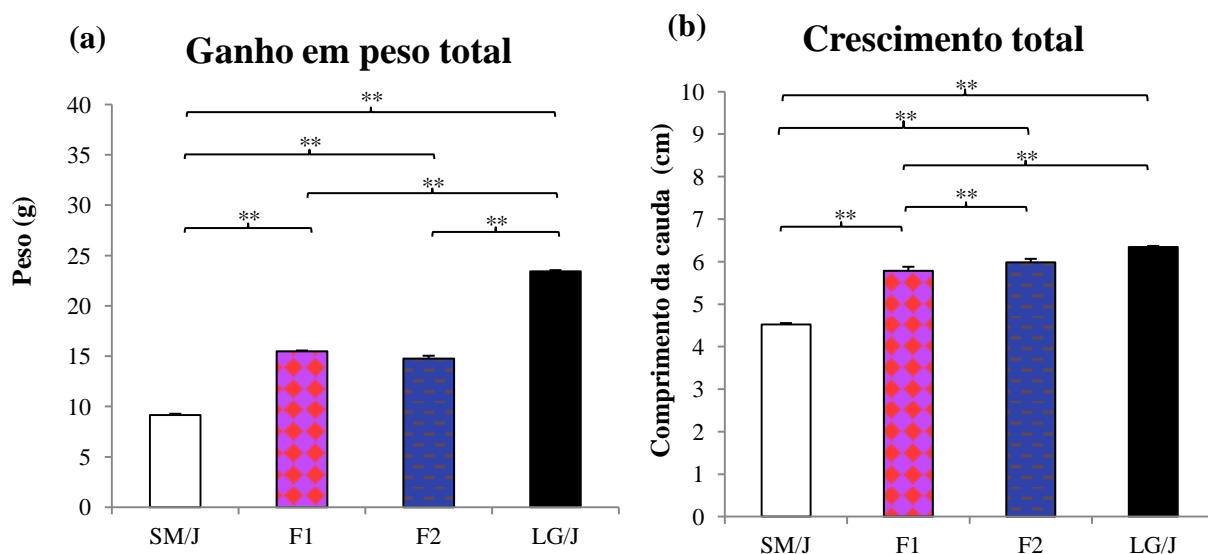


Figura 5. Ganho em peso total (a), o eixo y é o peso em gramas e em (b) crescimento total, o eixo y é o comprimento da cauda em centímetro. As barras horizontais representam diferenças significativas entre as médias de ganho em peso total e crescimento da cauda entre a 1<sup>o</sup> e 6<sup>o</sup> semanas de vida. \*\* = p<0.01. Valores médios ± Erro padrão médio.

No entanto, para comprimento de cauda encontramos o contrário, em que essa diferença acontece com uma probabilidade menor do que 0,01, portanto, as fêmeas da geração F<sub>2</sub> possuem em média um crescimento total maior que as da geração F<sub>1</sub> (Figura 5b).

É interessante observar para o comprimento da cauda que, a geração F<sub>2</sub> não apresenta

diferença significativa com a linhagem LG/J (Figura 5b). Entretanto F<sub>2</sub> e LG/J são significativamente diferentes com relação ao peso corporal ( $p < 0.01$ ) (Figura 5a). As outras comparações possíveis entre os grupos seguem o mesmo padrão, tanto para peso quanto para o comprimento da cauda, e podem ser observadas ao compararmos as Figuras 5a e 5b.

#### 4.2 Emocionalidade

Os dados etológicos (defecação, levantamento, *grooming* e imobilidade), de deslocamento indicando emocionalidade (Tempo relativo no Centro e Distância percorrida no centro) e atividade locomotora (distância total), avaliados nos 346 testes (~1.730 minutos de vídeos analisados), para cada fêmea pós-parto das linhagens parentais e das gerações F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub> e fêmeas F<sub>2</sub> fora da fase materna (F<sub>2</sub>-2º teste), estão apresentados na Tabela 3.

A análise dos dados etológicos de defecação, demonstrados na Figura 6, indicam nenhuma diferença significativa para esse comportamento entre as fêmeas pós-parto das linhagens parentais e gerações F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub> e das fêmeas F<sub>2</sub> em fase não materna (F<sub>2</sub>-2T).

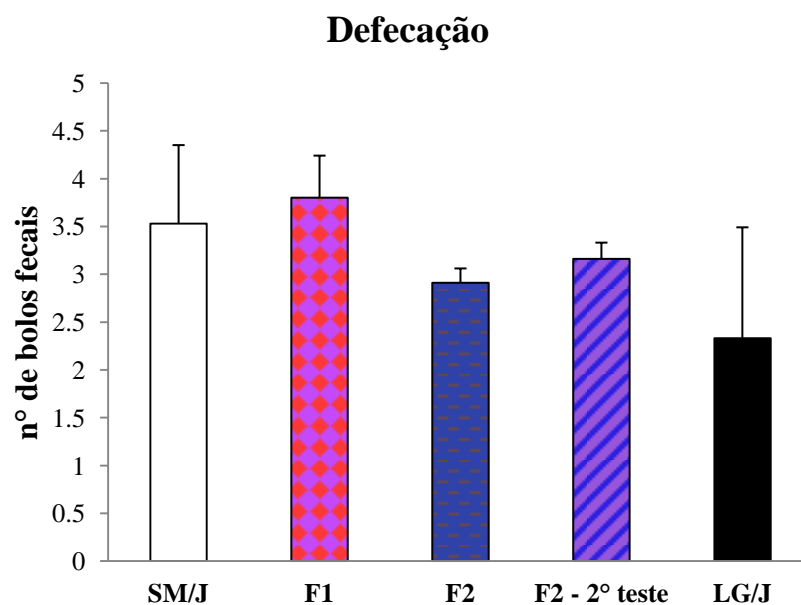


Figura 6. Valores médios de defecação para fêmeas das linhagens parentais SM/J e LG/J e gerações F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub> e geração F<sub>2</sub> fora da fase materna (F<sub>2</sub> - 2º teste). Valores médios ± Erro padrão médio.

Tabela 3. Variação entre os dados etológicos e de locomoção no campo aberto entre as fêmeas pós-parto das linhagens SM/J, LG/J, e gerações F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub> e fêmeas em fase não materna (F<sub>2</sub>- 2° teste).

<b>Fenótipo</b>	<b>SM/J</b>	<b>LG/J</b>	<b>F<sub>1</sub></b>	<b>F<sub>2</sub></b>	<b>F<sub>2</sub> - 2° teste</b>
<b>Defecação (Frequência)</b>	3,53 ±0,82	2,33 ±1,16	3,8 ±0,44	2,91 ±0,15	3,16 ±0,17
<b>Levantamento (Frequência)</b>	23,76 ±3,4	38,76 ±11,4	21 ±2,96	23,26 ±1,14	9,93 ±1,09
<b>Grooming (Frequência)</b>	5,00 ±0,56	2,66 ±0,76	9,42 ±0,78	6,63 ±0,3	3,14 ±0,26
<b>Grooming (Tempo/ms)</b>	18,9 ±2,75	6,75 ±1,72	36,25 ±3,18	18,72 ±0,36	8,41 ±0,37
<b>Imobilidade (Frequência)</b>	0,00	0,00	2,69±0,92	2,33±1,49	2,23±2,16
<b>Imobilidade (Tempo/ms)</b>	0,00	0,00	5,76±2,48	7,43±1,49	9,63±2,16
<b>Tempo relativo no Centro (ms)</b>	0,17±0,016	0,39 ±0,079	0,19±0,02	0,18±0,009	0,13±0,01
<b>Quadrados relativos no Centro</b>	0,2±0,01	0,35±0,056	0,23±0,01	0,22±0,007	0,17±0,009
<b>Distância Total (n° de quadrados)</b>	292,8±33,07	170,5±0,5	161,9 ±11,52	188,16±6,29	140,53±9,44

Valores médios ± Erro padrão médio; Tempo dado em milissegundos.

Para os dados etológicos de levantamento (Figura 7), em que apesar das linhagens parentais não apresentarem diferenças significativas para esse comportamento, observou-se diferenças quando comparamos a geração F<sub>2</sub> em fase materna e F<sub>2</sub> em fase não materna.

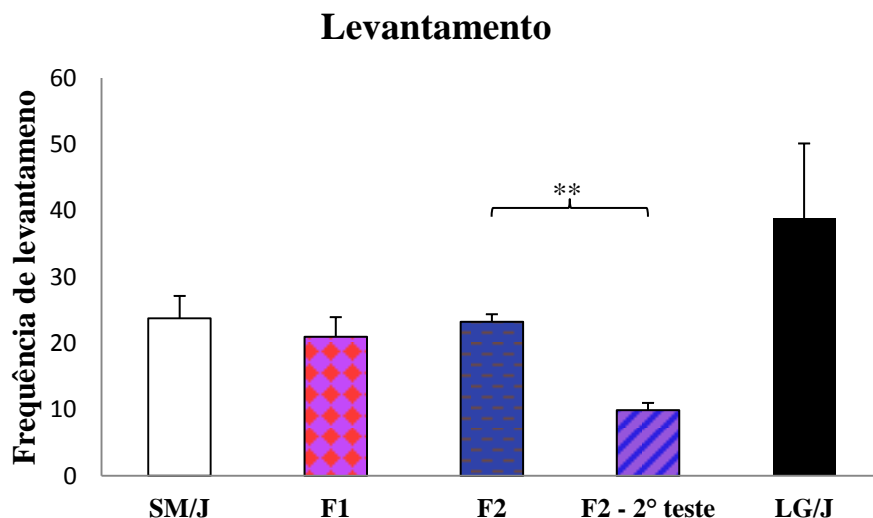


Figura 7. Valores médios para o fenótipo de levantamento para fêmeas das linhagens parentais SM/J e LG/J e gerações F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub> e geração F<sub>2</sub> fora da fase materna ( F<sub>2</sub> – 2º teste). Valores médios ± Erro padrão médio. \*\* diferenças significativas p<0.01

Ao compararmos os dados etológicos de *grooming* (Figura 8a e 8b), verificamos que entre as linhagens parentais SM/J e LG/J, as primeiras realizam o *grooming* significativamente mais frequente e por mais tempo que as fêmeas da linhagem LG/J (p<0,05, p<0,01 respectivamente). Quando comparamos a geração F<sub>1</sub> com qualquer outros grupos na fase materna (F<sub>2</sub>, SM/J e LG/J), vemos que F<sub>1</sub> possui valores maiores de frequência e tempo de *grooming* (Figura 8a e 8b). Tanto para frequência quanto para tempo de *grooming* as fêmeas da linhagem LG/J foram as que apresentaram os menores valores entre os grupos em fase materna. Encontramos ainda diferença significativa entre as fêmeas F<sub>2</sub> em fase materna e não materna, em que as últimas apresentaram menor frequência e tempo de *grooming* (p<0,01) do que as fêmeas F<sub>2</sub> em fase materna.

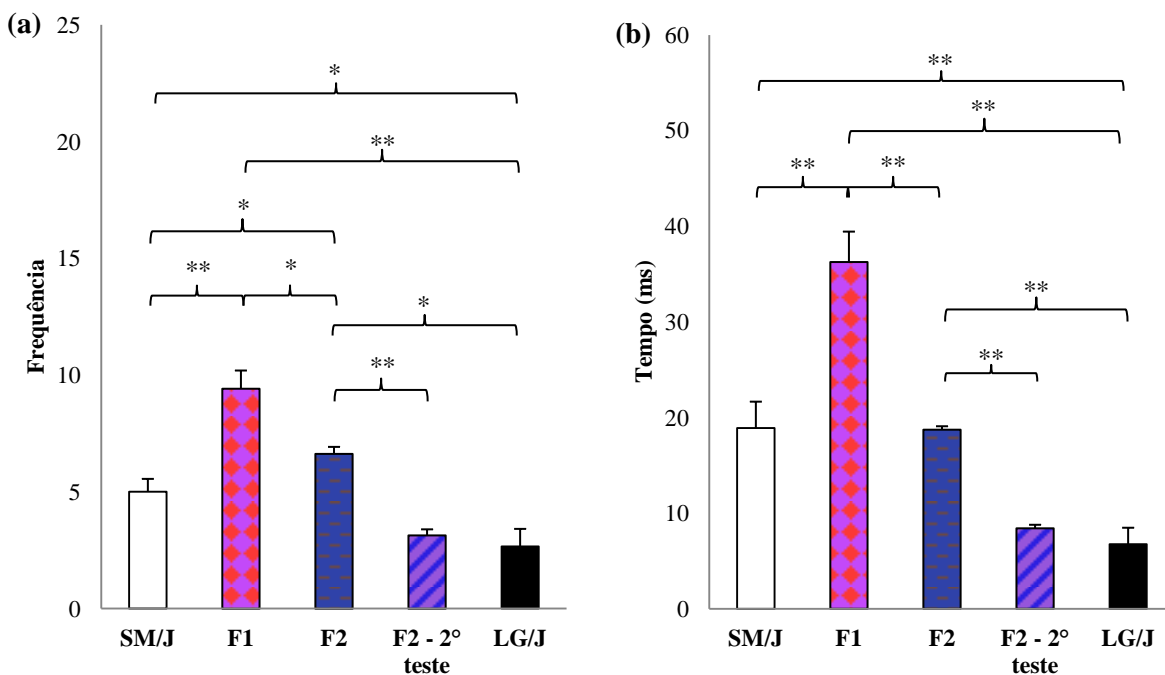
*Grooming*

Figura 8. Valores médios para os fenótipos *grooming* frequência (a) e tempo (b) para fêmeas das linhagens parentais SM/J e LG/J e gerações F1 e F2, e geração F2 fora da fase materna (F2 – 2° teste). Valores médios  $\pm$  Erro padrão médio. \*\*diferenças significativas  $p < 0.01$  \*diferenças significativas  $p < 0.05$

Os dados de imobilidade estão apresentados na Figura 9a e 9b. As linhagens parentais não apresentaram este comportamento. As gerações F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> em fase materna e o contraste entre imobilidade entre mães e não mães F<sub>2</sub>, apesar de apresentarem este comportamento, não apresentaram diferença significativa (Figura 9).

### Imobilidade

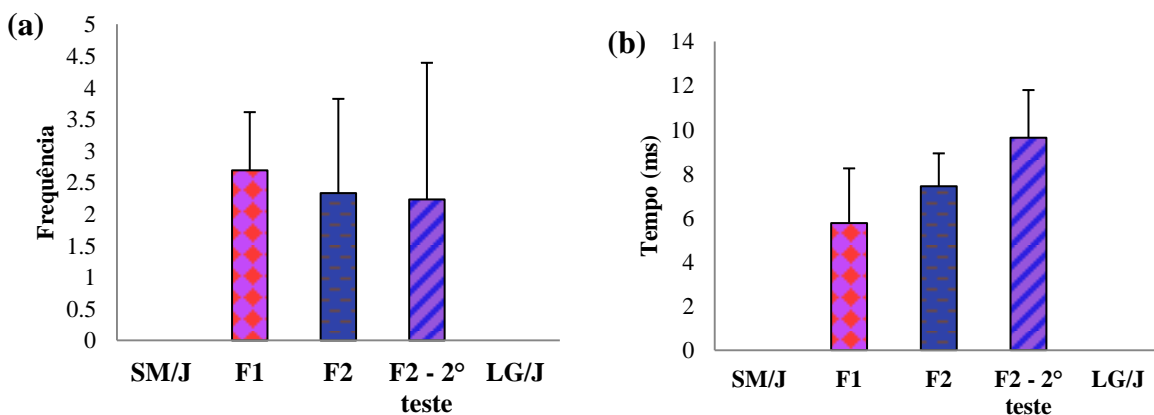


Figura 9. Valores médios para imobilidade frequência (a) e tempo (b) fêmeas das linhagens parentais SM/J e LG/J e gerações F1 e F2, e geração F2 fora da fase materna (F2 – 2° teste). Valores médios  $\pm$  Erro padrão médio.

Os valores de ambulação no campo aberto indicativos de nível de ansiedade (tempo relativo no centro e distância percorrida no centro) podem ser visualizados na Figura 10a e 10b.

### Atividade no centro

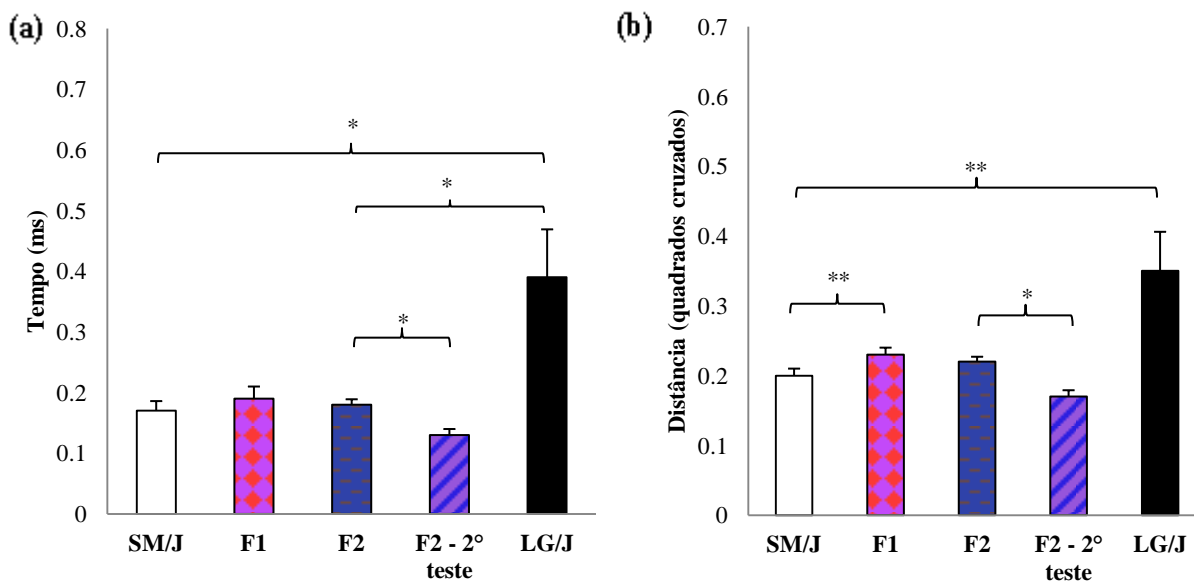


Figura 10. Valores médios para o tempo relativo no centro (a) e quadrados relativos cruzados no centro (b). \*\*diferenças significativas  $p < 0.01$ ; \*diferenças significativas  $p < 0.05$ . Valores médios  $\pm$  Erro padrão médio.

Verificamos que para esses dois fenótipos, que indicam pouca ansiedade, a linhagem LG/J possui as maiores médias, ou seja, ela passa mais tempo nessa região central (Figura 10a) e caminha uma distância maior no centro do campo (Figura 10b) quando comparada com a linhagem SM/J ( $p < 0,05$  e  $p < 0,01$  respectivamente). Ao compararmos o tempo no centro destas fêmeas LG/J com as fêmeas da geração  $F_1$ , não encontramos diferenças significativas. No entanto, com a geração  $F_2$  essa diferença ocorre com valores de  $p < 0,05$  para ambas (Figura 10a). Ainda é possível verificar que as fêmeas  $F_2$  em fase não materna ( $F_2$ -2T) passam significativamente menos tempo no centro do campo do que as  $F_2$  em fase não materna ( $p < 0,05$ ).

Para verificarmos se nossos testes seguem o padrão esperado, ou seja, roedores são ansiosos e preferem permanecer em regiões próximas a paredes verticais, quando utilizam as vibrissas como órgão tátil (tigmotatismo), comparamos os valores de tempo no centro e na periferia absoluto para cada um dos grupos. Os resultados estão apresentados na Figura 11. Dentre todos os grupos avaliados, há significativa preferência pela periferia para todos, exceto para as fêmeas LG/J, que não apresentaram diferença significativa entre o tempo gasto no centro e o tempo gasto na periferia do campo aberto.



### Relação entre tempo no centro e na periferia

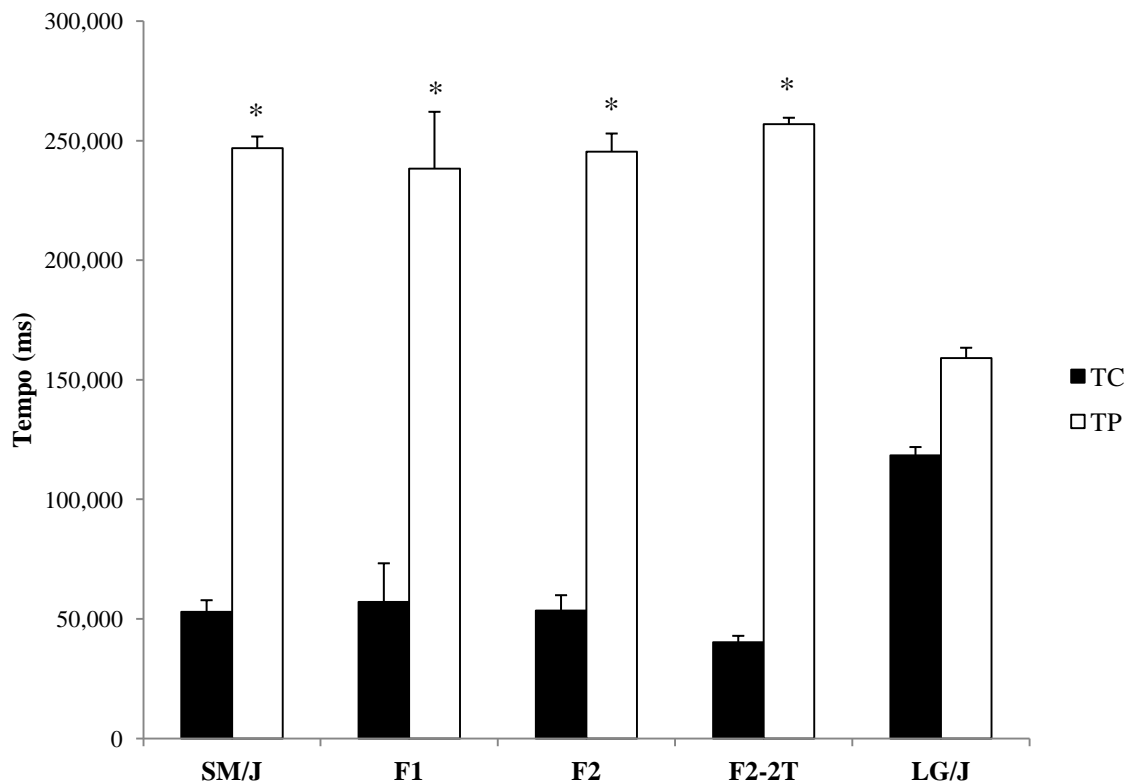


Figura 11. Valores médios do tempo, em milissegundos, gasto no centro ( TC) e periferia (TP) do campo aberto para as linhagens parentais SM/J, LG/J e para as gerações F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> na fase materna e F<sub>2</sub> fora da fase materna (F<sub>2</sub> -2° teste). \* diferenças significativas p<0,01. Valores médios ± Erro padrão médio.

Como o teste de campo aberto também é utilizado para avaliar atividade locomotora, na Figura 12 verificamos que as fêmeas SM/J percorrem uma distância total maior quando comparadas com as LG/J (p<0,01). Considerando ainda a distância total percorrida, constatamos diferenças significativas entre SM/J e F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub> (p< 0.01).

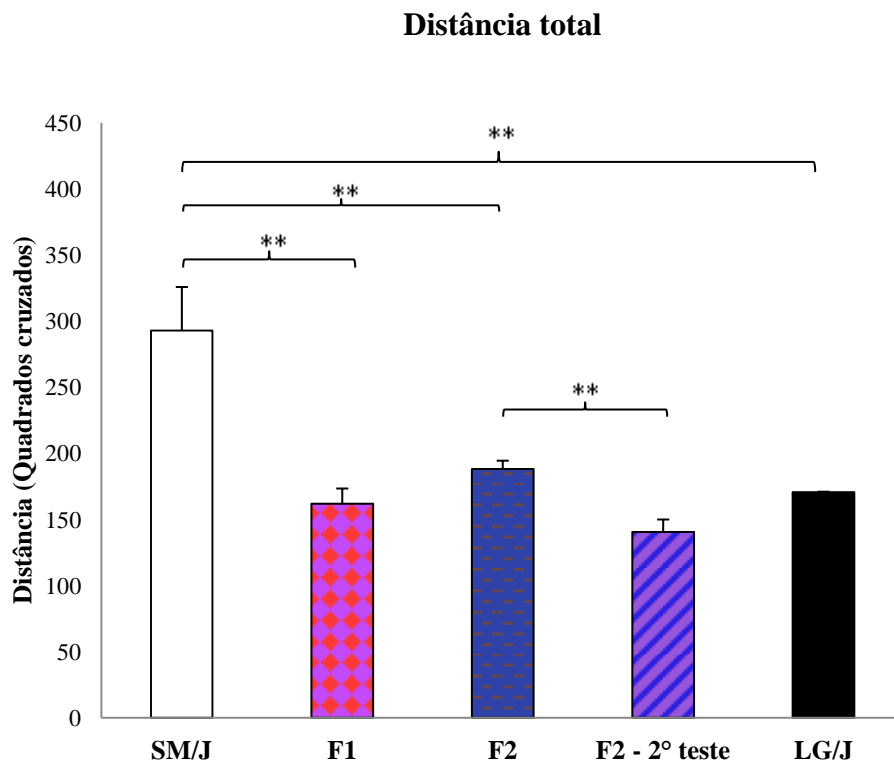


Figura 12. Valores médios para distância total para fêmeas das linhagens parentais SM/J e LG/J e gerações F1 e F2, e F2 fora da fase materna (F2 – 2º teste). \*\*diferenças significativas  $p < 0.01$ ; \*diferenças significativas  $p < 0.05$ . Valores médios  $\pm$  Erro médio padrão.

#### ***4.3. Relação entre crescimento e emocionalidade/sobrevivência e entre sobrevivência e emocionalidade***

Nas comparações entre a variação do crescimento (ganho em peso e comprimento da cauda) para as fases I, P e U, medidas na geração F<sub>2</sub>, com fenótipos de ansiedade encontramos, uma relação entre o ganho em peso na fase I (da primeira à terceira semana) e a fase P (da terceira à sexta semana) e fenótipos de ansiedade. O fenótipo associado ao ganho em peso na fase I foi a imobilidade ( $p < 0,01$ ). Para a fase P, os fenótipos com associação significativa foram o *grooming* ( $p < 0,05$ ), imobilidade ( $p < 0,05$ ), atividade no centro ( $p < 0,01$ ) e atividade motora ( $p < 0,001$ ). Entretanto não encontramos associação entre o crescimento da cauda e os fenótipos

de ansiedade. Da mesma forma, não foi encontrada associação entre sobrevivência dos filhotes e os fenótipos de ansiedade.

#### ***4.4 Análise de QTLs***

A análise de componente principal (PCA) resultou cinco vetores com *eigenvalues* acima de 1. Através de uma análise prévia, utilizando este procedimento estatístico, conseguimos detectar interferências que diminuem a precisão de nossos vetores. Por isso decidimos dividir as análises de PCA em três partes, conforme as maiores correlações que observamos nessa primeira análise.

O primeiro PCA foi feito com as seguintes variáveis: tempo e frequência de imobilidade, tempo e frequência de *grooming*, defecação e frequência de levantar. Foram obtidos três vetores que conjuntamente explicavam 81,6% da variação:

Vetor 1: explicou 39,64% da variância e teve uma maior correlação com o tempo e frequência de imobilidade. Esse fator foi chamado de imobilidade;

Vetor 2: explicou 28,11% da variância, e a maior correlação foi com o tempo e frequência do *grooming* e foi chamado de *grooming*;

Vetor 3: explicou 16,85% da variância e estava mais correlacionado com a defecação;

O segundo PCA foi feito para verificar a correlação entre tempo relativo e quadrados relativos cruzados no centro. Foi encontrado um fator que explicou 90,97% da variância e foi chamado de atividade no centro.

O terceiro PCA buscou verificar se havia relação entre frequência de levantar e distância total percorrida, um fator explicou 69,78% da variância, assim foi chamado de atividade motora. Portanto os fenótipos para análise de QTL são: *grooming*, imobilidade, defecação, atividade no centro e atividade motora.

#### 4.4.1 QTLs individuais

A varredura por todo o genoma, em busca de QTLs individuais associados com emocionalidade em fêmeas pós-parto resultou em 11 regiões significativas apresentadas na Tabela 4. Dos cinco fenótipos investigados (*grooming*, imobilidade, defecação, atividade no centro e atividade motora) apenas para defecação não foi encontrado QTL (Figura 13c).

Tabela 4. QTLs individuais associados com a variação dos fenótipos, *grooming*, imobilidade, atividade no centro e atividade motora.

<b>Fenótipo</b>	<b>QTL</b>	<b>M</b>	<b>PM</b>	<b>PC</b>	<b>IC</b>	<b>PV</b>	<b>a</b>	<b>d</b>	<b>LOD</b>
<i>Grooming</i>	<i>Gr10</i>	<i>D10Mit15</i>	18 cM	42 cM	30-54	5	-0,33	-0,36	2,35
	<i>Im2</i>	<i>D2Mit17</i>	2 cM	78 cM	68-84	4	-0,0096	0,51	2,01
Imobilidade	<i>Im5</i>	<i>D5Mit349</i>	16 cM	18 cM	0-38	5	0,31	0,24	2,15
	<i>Im7</i>	<i>D7Nds1</i>	14 cM	66 cM	56-72	9	0,43	0,25	3,93
Atividade no centro	<i>AC7</i>	<i>D7Nds1</i>	8 cM	60 cM	50-76	6	0,35	-0,23	2,63
	<i>AC8</i>	<i>D8Mit343</i>	8 cM	48 cM	20-62	5	0,05	0,64	2,25
	<i>ACX</i>	<i>DXMit172</i>	2 cM	46 cM	30-58	8	0,44	-0,05	3,51
Atividade motora	<i>AM4</i>	<i>D4Mit2</i>	22 cM	38 cM	18-42	5	0,40	-0,14	2,1
	<i>AM6</i>	<i>D6Mit1</i>	0	0	0-12	7	0,42	0,11	2,66
	<i>AM10</i>	<i>D10Mit15</i>	22 cM	46 cM	28-50	5	0,34	0,15	2,17
	<i>AM11</i>	<i>D11Mit62</i>	34 cM	36 cM	22-40	8	0,38	-0,27	3,74

**QTL** corresponde ao nome do QTL, formado pela inicial do fenótipo seguido do cromossomo onde essa região foi encontrada; **M** é a região do marcador associada ao QTL; **PM** é a distância em *cM downstream* do marcador; **PC** é a distância em *cM* do QTL em relação ao centrômero; **IC** intervalo de confiança em *cM*; **PV** é % variação explicada pelos locus; **a** valores genotípicos aditivo; **d** valores genotípicos de dominância e o LOD score associado ao locus.

Para *grooming* encontramos um QTL (*Gr10*) a 42 *cM* do centrômero com um LOD score de 2,35. Esse QTL (*Gr10*) posiciona-se 18 *cM downstream* do marcador *D10Mit15*, é aditivo e responsável por 5 % da variação de *grooming* (Figura 13a). Encontramos três QTLs para o fenótipo imobilidade, sendo *Im2*, *Im5* e *Im7* (Figura 13b). Essas regiões estão nos cromossomos 2, 5 e 7 nas posições *D2Mit17 + 2 cM*, *D5Mit349 +16 cM* e *D7Nds1 + 14 cM*,

respectivamente. No cromossomo 2, o QTL encontra-se à 78 *cM* do centrômero. O QTL do cromossomo 5 à 18 *cM* e o QTL no cromossomo 7 está à uma distância de 66 *cM* do centrômero. Todas essas regiões juntas respondem por 15% da variação do fenótipo, sendo que as regiões dos cromossomos 5 e 7 possuem um efeito aditivo e, diferentemente, a região do cromossomo 2 possui um efeito sobredominante (Tabela 4).

Para atividade no centro, encontramos também três regiões associadas, sendo elas *AC7*, *AC8* e *ACX* (Figura 13d). Essas regiões estão nas posições *D7Nds1 + 8cM*, no cromossomo 7, *D8Mit343 + 8 cM*, no cromossomo 8 e *DXMit172 + 2 cM* no cromossomo X, e à 60 *cM*, 48 *cM* e 46 *cM* de distância do centrômero, respectivamente (Tabela 4). Essas regiões juntas são responsáveis por 14% da variação do fenótipo atividade no centro, e possuem um efeito aditivo para os cromossomos 7 e X e é sobredominante no cromossomo 8.

A busca por QTLs para o fenótipo atividade motora nos revelou quatro regiões de associação, *AM4*, *AM6*, *AM10* e *AM11* (Tabela 4). Essas regiões estão nos cromossomos, 4, 6, 10 e 11, nas seguintes posições, *D4Mit2 + 22 cM*, *D6Mit1*, *D10Mit15 +22 cM* e *D11Mit62 + 34 cM* (Figura 13e). Elas juntas respondem por 16% da variação total, e possuem um efeito aditivo.

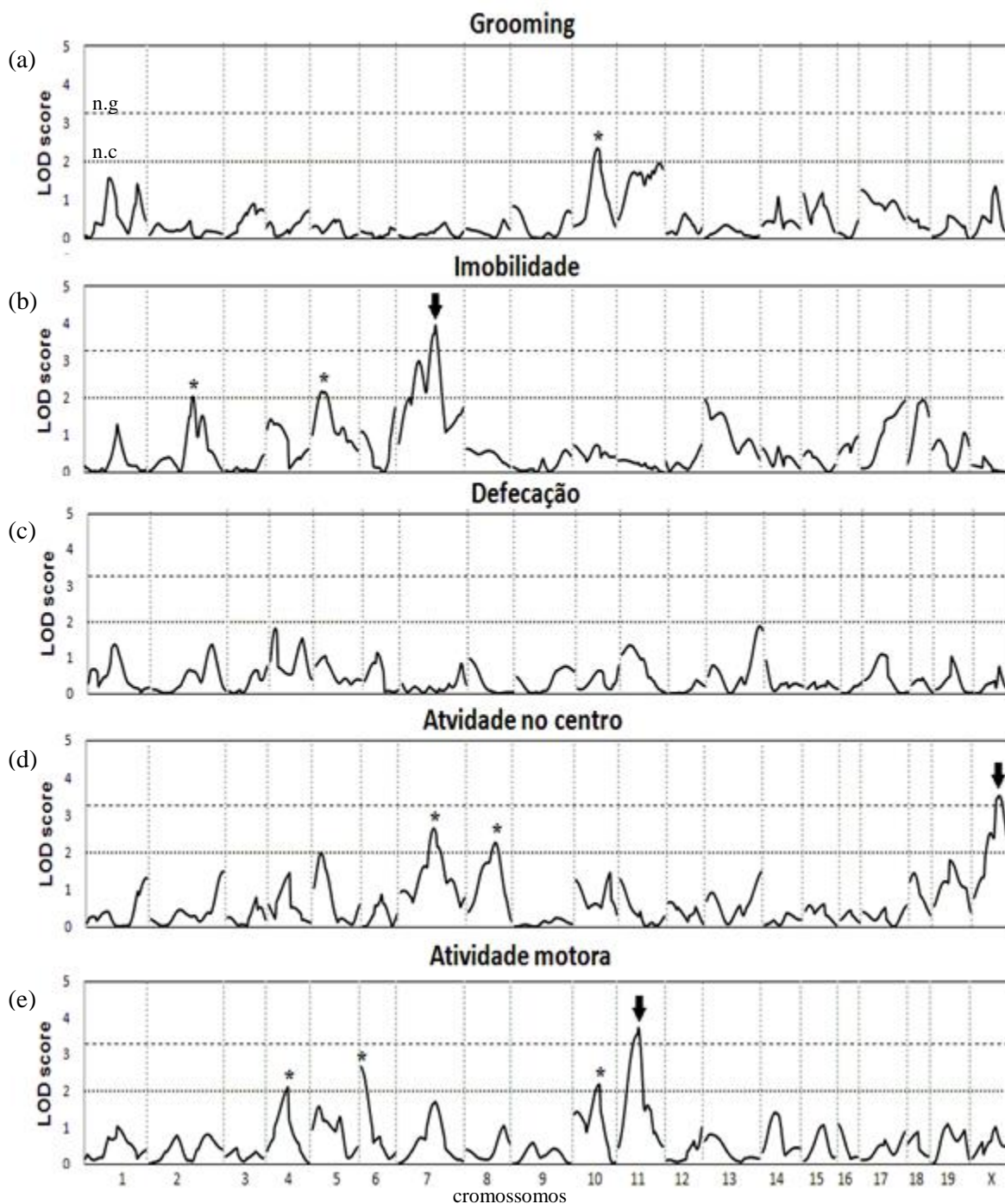


Figura 13. Varredura feita para os fenótipos de defecação, atividade motora, imobilidade, atividade no centro e *grooming*. \* indica QTLs com valores de significância acima do nível cromossômico; ↓ indica os QTLs com valores de significância do nível genômico. n.g. nível de significância genômico, n.c. a média dos níveis de significância cromossômico de todos cromossomos.

#### 4.4.2 QTLs epistáticos

Considerando os fenótipos de *grooming*, imobilidade, defecação, atividade no centro e atividade motora, fizemos uma busca par a par por interações epistáticas, e encontramos 76 regiões envolvidas em 44 interações.

Na Tabela 5 estão apresentados os QTLs epistáticos e as interações para o *grooming*.

Tabela 5. QTLs epistáticos de *Grooming*.

<b>Locus 1</b>	<b>PM</b>	<b>PC</b>	<b>Locus 2</b>	<b>PM</b>	<b>PC</b>	<b>PE</b>	<b>TI</b>	<b>VG</b>	<b>PVG</b>
<b><i>D1Mit3</i></b>	4	10	<b><i>D2Mit22</i></b>	4	114	$3,22 \times 10^{-6}$	AD	0,003	-0,444
							DA	$3,88 \times 10^{-5}$	-0,632
							DD	0,013	-0,632
<b><i>D1Mit3</i></b>	12	18	<b><i>D17Mit46</i></b>	40	42	$4,86 \times 10^{-6}$	DA	0,009	0,593
							DD	$4,64 \times 10^{-6}$	-0,914
<b><i>D2Mit22</i></b>	8	118	<b><i>D5Mit233</i></b>	2	24	$1,15 \times 10^{-5}$	AA	$8,43 \times 10^{-5}$	-0,949
							DA	0,008	0,533
							DD	0,008	0,526
<b><i>D6Mit1</i></b>	14	16	<b><i>D14Nds1</i></b>	6	8	$6,45 \times 10^{-6}$	DA	$1,74 \times 10^{-5}$	-0,903
							DD	0,001	-0,668
<b><i>D9Mit355</i></b>	30	38	<b><i>D17Mit46</i></b>	36	38	$2,99 \times 10^{-7}$	DD	$5,42 \times 10^{-8}$	-1,022

**Locus 1** é o primeiro marcador da associação do QTL epistático; **PM** é a distância em *cM* *downstream* do marcador; **PC** é a distância centromérica do marcador em *cM*; **Locus 2** é o segundo marcador da associação do QTL epistático; **PE** é a probabilidade de epistasia; **TI** representa o tipo de interação (AA, aditiva-aditiva; AD, aditiva-dominante; DA, dominante-aditiva; DD, dominante-dominante); **VG** é o valor genotípico estimado e **PVG** representa a probabilidade do valor genotípico. Os marcadores em **negrito** indicam que foram considerados como uma única região no respectivo cromossomo.

Verificamos que para *grooming* ocorrem cinco interações envolvendo sete regiões. Com isso, encontramos uma rede maior de conexão entre quatro das cinco interações (cromossomos 1, 2, 5, 9 e 17) e uma menor envolvendo somente duas regiões (cromossomo 6 e 14) (Figura 14).

Todas essas regiões juntas, mais os QTLs individuais, respondem por 29,4 % da variação desse fenótipo.

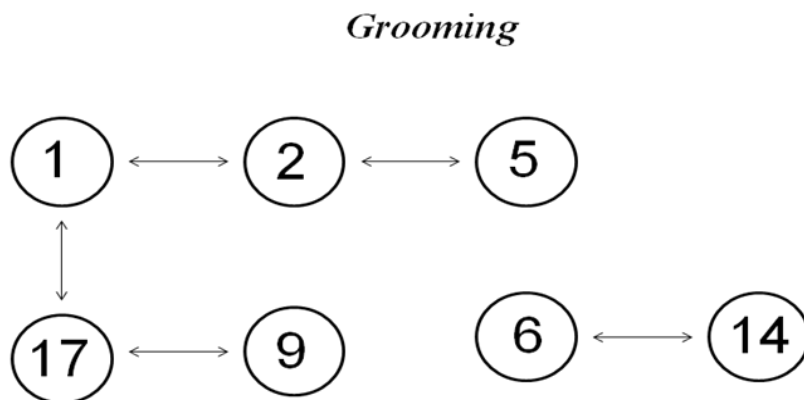


Figura 14. Redes de interações para *grooming*. Os números indicam o cromossomo em que ocorrem os QTLs epistáticos.

Na Tabela 6 estão apresentados os QTLs epistáticos, e suas interações, para o fenótipo imobilidade. Assim como no *grooming*, para a imobilidade também encontramos regiões em comum que foram consideradas como uma região única. Encontramos um total de 29 QTLs epistáticos envolvidos em 10 redes de interações. Os QTLs epistáticos acrescidos dos individuais são responsáveis por 53,4% da variação desse fenótipo. Dois QTLs individuais participam das redes de interação, um no cromossomo 5 e outro no 7 (*Im5* e *Im7*, respectivamente). Todos estão representados em destaque na Figura 15.

Tabela 6. QTLs para Imobilidade

<b>Locus 1</b>	<b>PM</b>	<b>PC</b>	<b>Locus 2</b>	<b>PM</b>	<b>PC</b>	<b>PE</b>	<b>TI</b>	<b>VG</b>	<b>PVG</b>
<i>D1Mit212</i>	2	22	<i>D13Mit1</i>	0	2	$3,22 \times 10^{-7}$	DA	0,003	-0,379
							DD	$4,26 \times 10^{-7}$	0,567
<i>D2Mit380</i>	0	52	<i>D3Mit14</i>	6	62	$4,71 \times 10^{-7}$	AA	0,002	0,649
							AD	$4,74 \times 10^{-5}$	0,713
							DA	0,022	-0,398
							DD	0,011	-0,415



Tabela 6. Continuação

<b>Locus 1</b>	<b>PM</b>	<b>PC</b>	<b>Locus 2</b>	<b>PM</b>	<b>PC</b>	<b>PE</b>	<b>TI</b>	<b>VG</b>	<b>PVG</b>
<i>D2Mit307</i>	16	106	<i>D5Mit349</i>	18	20	$2,03 \times 10^{-11}$	AA	$6,71 \times 10^{-5}$	0,799
							AD	$1,22 \times 10^{-5}$	0,683
							DA	$2,48 \times 10^{-4}$	-0,573
							DD	$1,71 \times 10^{-4}$	-0,531
<i>D3Mit54</i>	8	10	<i>D7Mit17</i>	14	82	$5,86 \times 10^{-7}$	AA	$8,26 \times 10^{-5}$	-0,779
							AD	0,038	-0,364
							DD	$1,12 \times 10^{-4}$	-0,713
<i>D3Mit14</i>	14	70	<i>DXMit55</i>	6	8	$7,91 \times 10^{-6}$	AA	0,002	0,683
							AD	0,001	-0,663
							DA	0,002	0,541
<i>D3Mit14</i>	0	56	<i>DXMit55</i>	6	8	$2,05 \times 10^{-6}$	AA	$3,69 \times 10^{-4}$	0,714
							AD	0,001	-0,578
							DA	0,009	0,422
							DD	0,032	-0,372
<i>D4Mit235</i>	6	8	<i>D5Mit338</i>	4	66	$1,48 \times 10^{-5}$	AD	0,014	-0,372
							DA	0,000351	-0,643
							DD	$3,51 \times 10^{-4}$	-0,468
<i>D4Mit2</i>	16	2	<i>D16Mit2</i>	0	2	$9,06 \times 10^{-7}$	AD	$6,44 \times 10^{-7}$	-0,741
							DA	0,485	-0,102
							DD	0,006	-0,380
<i>D4Mit235</i>	8	10	<i>D6Mit1</i>	0	2	$1,52 \times 10^{-7}$	DD	0,003	-0,794
							AD	$3,48 \times 10^{-7}$	-0,441
<i>D5Mit233</i>	16	38	<i>D6Mit9</i>	0	24	$9,81 \times 10^{-6}$	AD	$1,38 \times 10^{-5}$	0,776
							DA	0,041	-0,379
							DD	0,042	0,363
<i>D5Mit338</i>	4	56	<i>D19Mit35</i>	8	68	$2,52 \times 10^{-6}$	AD	0,006	-0,480
							DA	$1,34 \times 10^{-5}$	-0,803
							DD	0,013	-0,403

Tabela 6. Continuação

<b>Locus1</b>	<b>PM</b>	<b>PC</b>	<b>Locus2</b>	<b>PM</b>	<b>PC</b>	<b>PE</b>	<b>TI</b>	<b>VG</b>	<b>PVG</b>
<i>D7Mit46</i>	0	110	<i>D11Mit349</i>	0	38	$7,39 \times 10^{-6}$	AA AD	0,002 $3,33 \times 10^{-5}$	-0,506 -0,569
<i>D7Mit17</i>	12	80	<i>D17Mit10</i>	36	80	$2,25 \times 10^{-6}$	AA AD DA DD	0,027 0,013 0,004 $1,38 \times 10^{-4}$	-0,423 -0,389 -0,495 -0,590
<i>D7Nds1</i>	14	66	<i>DXMit144</i>	8	30	$2,10 \times 10^{-9}$	AA AD DA DD	0,002 $3,74 \times 10^{-4}$ $1,37 \times 10^{-4}$ $1,18 \times 10^{-4}$	0,575 -0,587 0,642 -0,589
<i>D9Mit4</i>	8	46	<i>D19Mit35</i>	6	66	$1,21 \times 10^{-5}$	AA AD DA	0,021 $1,91 \times 10^{-4}$ 0,004	-0,482 -0,638 -0,511
<i>D10Mit14</i>	0	66	<i>D17Mit46</i>	40	42	$1,22 \times 10^{-7}$	AA AD DD	0,00015 $1,5 \times 10^{-4}$ 0,013 $2,11 \times 10^{-5}$	-0,870 -0,434 -0,672
<i>D11Mit62</i>	28	30	<i>D12Mit2</i>	18	38	$2,04 \times 10^{-9}$	AA AD DA DD	$2,69 \times 10^{-5}$ $5,93 \times 10^{-4}$ $6,68 \times 10^{-4}$ 0,001	-1,184 -0,715 -0,782 -0,615
<i>D11Mit62</i>	22	24	<i>D12Mit5</i>	0	40	$1,68 \times 10^{-6}$	AA AD DA DD	0,000242 $2,42 \times 10^{-4}$ 0,011 0,011 0,004	-0,953 -0,497 -0,611 -0,606
<i>D11Mit15</i>	8	58	<i>DXMit144</i>	10	32	$5,33 \times 10^{-7}$	AA AD DA DD	0,001 0,035 $1,97 \times 10^{-4}$ 0,003	0,785 -0,414 0,697 -0,499

Tabela 6. Continuação

<b>Locus 1</b>	<b>PM</b>	<b>PC</b>	<b>Locus 2</b>	<b>PM</b>	<b>PC</b>	<b>PE</b>	<b>TI</b>	<b>VG</b>	<b>PVG</b>
<i>D12Mit6</i>	8	60	<i>D15Mit2</i>	20	58	$1,83 \times 10^{-4}$	DD	$3,67 \times 10^{-6}$	0,749
<i>D14Mit5</i>	0	30	<i>D18Mit110</i>	0	2	$4,04 \times 10^{-7}$	AA	0,015	-0,490
							AD	$1,3 \times 10^{-4}$	0,633
							DA	0,038	0,356
							DD	$2,68 \times 10^{-4}$	-0,551

**Locus 1** é o primeiro marcador da associação do QTL epistático; **PM** é a distância em *cM* *downstream* do marcador; **PC** é a distância centromérica do marcador em *cM*; **Locus 2** é o segundo marcador da associação do QTL epistático; **PE** é a probabilidade de epistasia; **TI** representa o tipo de interação (AA, aditiva-aditiva; AD, aditiva-dominante; DA, dominante-aditiva; DD, dominante-dominante); **VG** é o valor genotípico estimado e **PVG** representa a probabilidade do valor genotípico. Os marcadores em **negrito** indicam que foram considerados como uma única região no respectivo cromossomo.

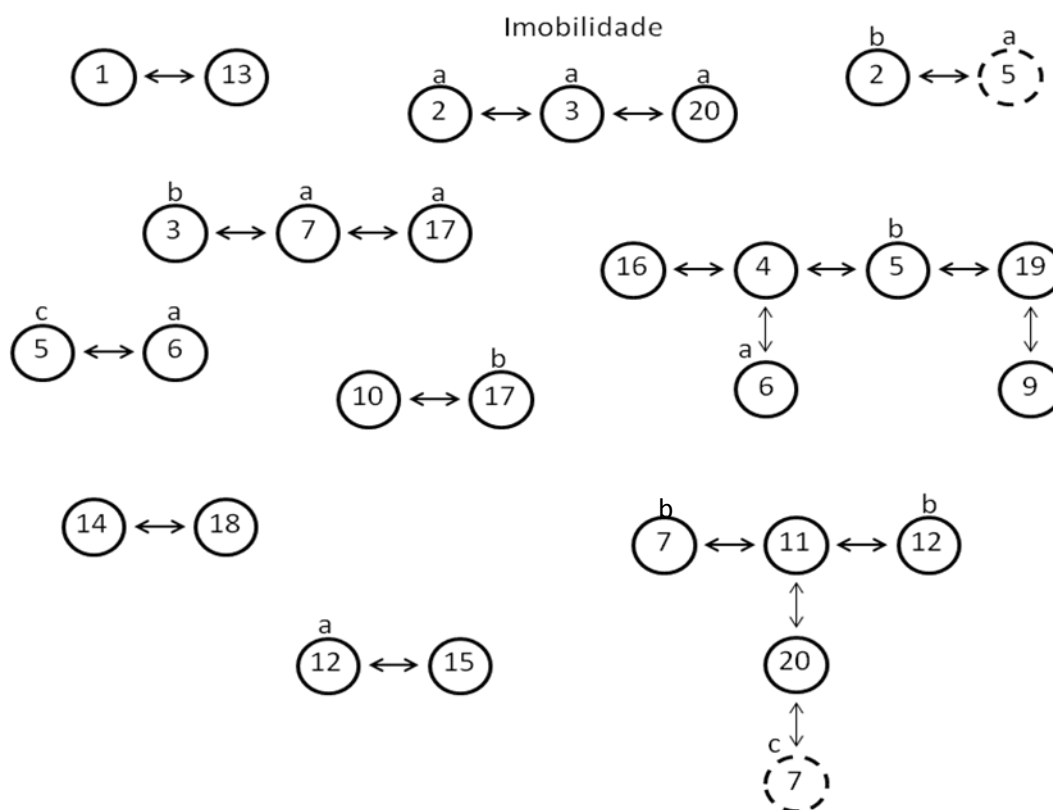


Figura 15. Redes de interações para imobilidade. Os círculos com linhas tracejadas representam os QTLs individuais que participam das redes. Os diferentes QTLs em um mesmo cromossomo estão diferenciados com as letras, b e c.

Para o fenótipo de defecação encontramos oito QTLs epistáticos participando de quatro interações. Estas regiões são responsáveis por 40,5% da variação fenotípica (Tabela 7).

Tabela 7. QTLs epistáticos para defecação

<b>Locus 1</b>	<b>PM</b>	<b>PC</b>	<b>Locus 2</b>	<b>PM</b>	<b>PC</b>	<b>PE</b>	<b>TI</b>	<b>VG</b>	<b>PVG</b>
<i>D3Mit14</i>	14	70	<i>D11Mit14</i>	8	76	$1,98 \times 10^{-5}$	DA	$1,54 \times 10^{-6}$	0,806
<i>D8Mit343</i>	22	62	<i>D12Mit37</i>	16	18	$4,91 \times 10^{-6}$	AA	0,0102	-0,454
							AD	$2,69 \times 10^{-5}$	-0,615
							DA	0,011	0,407
<i>D9Mit355</i>	18	94	<i>D18Mit110</i>	16	18	$4,05 \times 10^{-6}$	AD	0,001	0,606
							DA	$8,99 \times 10^{-6}$	1,130
<i>D15Mit13</i>	4	6	<i>D19Mit35</i>	2	62	$1,21 \times 10^{-5}$	AA	0,039	-0,392
							AD	$8,78 \times 10^{-5}$	0,651
							DA	0,002	0,517

**Locus 1** é o primeiro marcador da associação do QTL epistático; **PM** é a distância em *cM* *downstream* do marcador; **PC** é a distância centromérica do marcador em *cM*; **Locus 2** é o segundo marcador da associação do QTL epistático; **PE** é a probabilidade de epistasia; **TI** representa o tipo de interação (AA, aditiva-aditiva; AD, aditiva-dominante; DA, dominante-aditiva; DD, dominante-dominante); **VG** é o valor genotípico estimado e **PVG** representa a probabilidade do valor genotípico.

A Tabela 8 mostra os resultados encontrados na busca por QTLs epistáticos para o fenótipo atividade no centro. Encontramos um total de 22 QTLs distribuído por 12 cromossomos, sendo que 17 desses encontram-se suficientemente próximos, reduzindo esse número de 22 para 13. Desta forma, estas interações formam cinco redes de conexões (Figura 16). Os QTLs epistáticos acrescidos dos individuais explicam por aproximadamente 24,4% da variação desse fenótipo.

Tabela 8. QTLs epistáticos para atividade no centro

<b>Locus 1</b>	<b>PM</b>	<b>PC</b>	<b>Locus 2</b>	<b>PM</b>	<b>PC</b>	<b>PE</b>	<b>TI</b>	<b>VG</b>	<b>PVG</b>
<i>D2Mit22</i>	10	120	<b><i>D16Mit5</i></b>	0	24	$3,66 \times 10^{-5}$	DD	$3,21 \times 10^{-6}$	0,684
<i>D3Mit54</i>	4	6	<i>D14Nds1</i>	0	2	$1,07 \times 10^{-4}$	DD	$6,91 \times 10^{-6}$	0,666
<i>D3Mit22</i>	6	30	<b><i>D16Mit5</i></b>	2	26	$1,50 \times 10^{-7}$	DD	$2,24 \times 10^{-8}$	0,787
<b><i>D6Nds5</i></b>	14	52	<b><i>D17Mit46</i></b>	24	26		DD	$8,31 \times 10^{-6}$	-1,454
<b><i>D6Mit58</i></b>	8	62	<b><i>D17Mit46</i></b>	22	24	$3,89 \times 10^{-8}$	DD	$1,39 \times 10^{-9}$	-1,639
<i>D13Mit1</i>	0	2	<b><i>D17Mit46</i></b>	20	22	$8,73 \times 10^{-7}$	DD	$9,45 \times 10^{-8}$	1,271
<b><i>D15Mit13</i></b>	0	2	<b><i>D16Mit2</i></b>	10	12	$3,36 \times 10^{-6}$	AA	0,026	0,366
							AD	$7,11 \times 10^{-4}$	0,592
							DA	0,003	0,412
							DD	0,005	-0,441
<b><i>D15Mit13</i></b>	12	14	<b><i>D18Mit17</i></b>	0	22	$1,33 \times 10^{-7}$	AA	$1,37 \times 10^{-6}$	1,162
							AD	0,001	-0,567
							DD	0,043	0,358
<b><i>D15Mit143</i></b>	0	18	<b><i>D18Mit110</i></b>	18	20	$1,81 \times 10^{-6}$	AA	$3,74 \times 10^{-5}$	0,988
							AD	0,005	-0,509
							DD	0,01	0,431
<b><i>D19Mit43</i></b>	0	2	<b><i>D20Mit172</i></b>	6	50	$3,31 \times 10^{-6}$	AA	0,001	-0,574
							AD	$1,76 \times 10^{-5}$	0,756
<b><i>D19Mit43</i></b>	4	6	<b><i>D20Mit172</i></b>	6	50	$2,16 \times 10^{-6}$	AA	0,002	-0,589
							AD	$7,42 \times 10^{-6}$	0,845

**Locus 1** é o primeiro marcador da associação do QTL epistático; **PM** é a distância em *cM* *downstream* do marcador; **PC** é a distância centromérica do marcador em *cM*; **Locus 2** é o segundo marcador da associação do QTL epistático; **PE** é a probabilidade de epistasia; **TI** representa o tipo de interação (AA, aditiva-aditiva; AD, aditiva-dominante; DA, dominante-aditiva; DD, dominante-dominante); **VG** é o valor genotípico estimado e **PVG** representa a probabilidade do valor genotípico. Os marcadores em **negrito** indicam que foram considerados como uma única região no respectivo cromossomo.

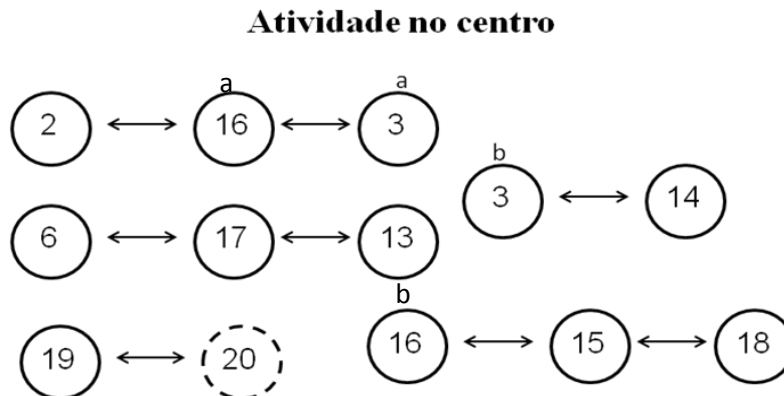


Figura 16. Redes de interações para atividade no centro. O círculo com linhas tracejadas representam os QTLs individuais. Os diferentes QTLs em um mesmo cromossomo estão diferenciados com as letras a e b.

Para a atividade motora encontramos seis QTLs epistáticos, que juntamente com os individuais explicam 23,4% da variação do fenótipo. Eles estão representados na Tabela 9.

Tabela 9. QTLs epistáticos para atividade motora

<b>Locus 1</b>	<b>PM</b>	<b>PC</b>	<b>Locus 2</b>	<b>PM</b>	<b>PC</b>	<b>PE</b>	<b>TI</b>	<b>VG</b>	<b>PVG</b>
<i>D1Mit3</i>	8	14	<i>D14Mit225</i>	18	60	$1.28 \times 10^{-6}$	DD	$2.58 \times 10^{-6}$	0.887
							AD	0.002	0.637
<i>D6Mit9</i>	12	68	<i>D7Mit17</i>	0	36	$9.11 \times 10^{-9}$	AA	$2.68 \times 10^{-5}$	-1.136
							AD	0.019	-0.499
							DA	$2,62 \times 10^{-4}$	0.767
							DD	$9,39 \times 10^{-4}$	0.611
<i>D7Mit21</i>	2	22	<i>D17Mit10</i>	8	52	9.97E-06	DD	$1.07 \times 10^{-6}$	-1.270

**Locus 1** é o primeiro marcador da associação do QTL epistático; **PM** é a distância em *cM downstream* do marcador; **PC** é a distância centromérica do marcador em *cM*; **Locus 2** é o segundo marcador da associação do QTL epistático; **PE** é a probabilidade de epistasia; **TI** representa o tipo de interação (AA, aditiva-aditiva; AD, aditiva-dominante; DA, dominante-aditiva; DD, dominante-dominante); **VG** é o valor genotípico estimado e **PVG** representa a probabilidade do valor genotípico

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 *Crescimento*

Nossos resultados mostram que peso e comprimento da cauda seguem um padrão semelhante nos grupos analisados (SM/J, LG/J, F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub>). No período I (1-3 semanas), há um maior crescimento da cauda, e no período P (3-6 semanas) um maior ganho em peso, e ainda na fase U (6-10 semanas), medida somente na geração F<sub>2</sub>, verificamos uma queda no crescimento tanto no valor do comprimento da cauda quanto no valor de ganho em peso. Esse padrão que encontramos mostra que existem diferenças entre esses períodos. Isso provavelmente deve-se ao fato de que grupos de genes diferentes afetem o desenvolvimento nessas duas fases nas linhagens SM/J e LG/J (CHEVERUD et al, 1996). Verificamos que na primeira fase a prole recebe o leite da mãe, esse alimento tem o papel de fornecer aminoácidos, carboidratos, lipídios e minerais, além de oferecer proteção contra possíveis infecções (HANSON et al, 1975). Sendo assim, o leite é essencial para o desenvolvimento do filhote, tanto em peso quanto em tamanho, tornando a lactação um período crítico no metabolismo, pois a concentração de proteína do leite pode ser um fator decisivo na determinação do peso corporal do adulto (KOLB et al, 2011). Talvez a diferença aqui encontrada entre as fases I e P reflita a influência do período de amamentação sobre o desenvolvimento.

Para as linhagens parentais observamos que a diferença entre o peso pouco mudou do período I para P na SM/J, e pouca variação houve no comprimento da cauda nesses períodos para as fêmeas LG/J. Portanto, houve uma diferença significativa no tamanho da cauda para as SM/J entre os períodos I e P, sendo que a taxa de crescimento maior ocorreu no primeiro período, da mesma maneira com as gerações F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub>. Já para a linhagem LG/J o oposto é observado, houve uma variação significativa de peso entre I e P, sendo que o ganho em peso

maior ocorreu no período P, isso também é observado em F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub>. Outros estudos utilizando essas mesmas linhagens de camundongos, e as gerações provenientes de inter cruzamentos, revelaram que animais da linhagem LG/J apresentam maior peso, decorrente principalmente da deposição de gordura corpórea (CHEVERUD, 2001). Os animais da geração F<sub>3</sub> deste inter cruzamento, também tiveram maior ganho em peso devido ao maior acúmulo de gorduras (GÓES, 2010). Ao olharmos para o ganho em peso total e o crescimento da cauda total, observamos que as fêmeas LG/J possuem maior média de peso e também a maior média de comprimento de cauda.

Estudos vêm demonstrando uma associação entre ganho em peso e ansiedade em roedores (DUVOISIN et al, 2005). Porém, pouco se sabe se há algum período específico da vida onde esse ganho é maior, e ainda, se a variação do peso nessa fase possui alguma relação com ansiedade. Segundo os resultados encontrados aqui, alguns fenótipos de ansiedade estão correlacionados ao ganho em peso em uma fase específica, a fase I e principalmente a fase P, correspondentes a fase de amamentação e pós-amamentação, respectivamente. A imobilidade está associada ao ganho em peso na fase I, de forma que as fêmeas que apresentam uma maior imobilidade tiveram um maior ganho em peso no período que estavam sendo amamentadas. Os fenótipos: atividade no centro, imobilidade, e atividade motora, apresentaram associação com o ganho em peso na fase P e revelaram que as fêmeas com maior atividade nestes comportamentos foram as que apresentavam o maior ganho em peso entre a terceira e sexta semana. Já o *grooming* possui relação oposta, pois fêmeas que realizaram o *grooming* mais frequentemente tiveram um menor ganho em peso durante este período. Nossos resultados sugerem que a fase P é a que mais influencia a ansiedade em camundongos adultos, ou seja, o ganho em peso nesse período pode ser um indicativo de comportamento ansioso. Interessante notar que é na fase P que os hormônios sexuais começam a agir culminando na fase da puberdade por volta dos 42



dias, sexta semana de vida. Já a fase I, que corresponde da primeira à terceira semana, é marcada pelo intenso contato entre mãe e filhote devido a este período ser o de amamentação. É nesta fase que as capacidades auditiva e visual aparecem (WEBER; OLSSON, 2008).

Nossos resultados indicam que talvez, a análise do peso durante esse período (3-6 semanas) seja um indicativo de ansiedade em camundongos. Em ratos, foi mostrado que um aumento de peso provocado por uma dieta rica em gordura durante o início da vida provoca um impacto no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal gerando um aumento da suscetibilidade ao estresse na adolescência, fase da puberdade (BOUKOUVALAS et al, 2008). Interessante observar que o aumento de peso e obesidade gera ansiedade por uma alteração no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (KITRAKI et al, 2004). Assim, qualquer desequilíbrio desse eixo, decorrente de alguma forma de estresse, pode gerar ansiedade (KANDEL et al, 1995). Esse estresse pode ser provocado por um encontro com um predador (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988), ambiente novo (PRUT; BELZUNG, 2003) ou ainda por obesidade causada por uma dieta rica em gordura (KAMARA et al, 1998; KITRAKI et al, 2004). Essas informações ligam o ganho em peso, alterações no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e ansiedade ao período puberal. Talvez os resultados encontrados aqui sejam um indicativo dessa relação, pois, em nossas fêmeas, a fase P, fase de maior ganho em peso e período de puberdade, foi a que mais teve correlação com fenótipos de ansiedade.

## ***5.2 Emocionalidade***

O teste de campo aberto avalia emocionalidade em roedores através de uma combinação de aspectos de ansiedade (defecação, levantamento, *grooming*, atividade no centro), medo (imobilidade) ou medidas da atividade locomotora em resposta a um novo ambiente (PRUT; BELZUNG, 2003). O comportamento de defecação avaliado no campo aberto vem sendo usado

como medida de emocionalidade (RAMOS; MORMÈDE, 1998; HALL, 1934). A visão proposta por Hall (1934), criador do campo aberto, é a de que ao ser exposto ao ambiente novo, potencialmente ameaçador, o animal vivencia a situação de medo ocorrendo um aumento na taxa de defecação, devido à ativação do sistema nervoso autônomo. Desse modo, a defecação seria uma resposta relacionada ao aumento da ansiedade/emocionalidade em roedores quando expostos ao ambiente novo. Este comportamento foi apresentado por todas as fêmeas dos grupos analisados, apesar de não revelar diferenças significativas entre nenhum grupo. Isso nos mostra que esse ambiente novo pode ser ansiogênico ou ainda pode provocar medo nos animais testados (BROADHURST; LEVINE, 1963; CASTILLA-ORTEGA et al, 2010; OSSENKOPP et al, 1994).

O levantamento ou exploração vertical é um componente da exploração de um novo ambiente que se relaciona a emocionalidade e que foi medido em nossos testes. Exploração horizontal e vertical são utilizados pelos animais para avaliar novos ambientes e representa uma parte importante do comportamento natural de roedores (AUGUSTSSON; MEYERSON, 2004). O levantamento relaciona-se de forma oposta à ansiedade, pois a diminuição dessa variável está relacionada a efeitos ansiogênicos (PRUT; BELZUNG, 2003). Apesar das fêmeas da linhagem LG/J terem realizado mais frequentemente o levantamento do que as fêmeas SM/J, não houve diferença significativa entre elas, possivelmente devido ao baixo tamanho amostral de fêmeas LG/J e alto erro padrão médio das mesmas. Entre os demais grupos avaliados verificamos que não ocorreu diferença significativa. Entretanto observamos diferenças significativas entre F<sub>2</sub> em fase materna e em fase não materna, mostrando que as mães praticam o levantamento mais frequentemente. Considerando o levantamento como uma ação exploratória e que se relaciona de forma oposta à ansiedade, podemos dizer então que talvez esse dado isoladamente nos indique uma menor ansiedade da fase materna. A lactação tem sido associada como moduladora de

ansiedade, em que as mães em fases iniciais de lactação apresentam um comportamento menos ansioso em relação ao progresso do estágio da maternidade (BYRNES; BRIDGES, 2006). Este fato está de acordo com nossos resultados, pois as fêmeas em fase materna foram submetidas ao teste de campo aberto no segundo dia após o parto, período em que já estavam amamentando seus filhotes.

*Grooming* é outro dado etológico importante na emocionalidade, porém é um comportamento complexo. Sua microestrutura é formada por uma série de ações sequenciais estereotipadas, e devem ser consideradas em estudos comportamentais, pois alterações nesse padrão podem informar sobre os graus de ansiedade, estresse ou depressão. Para um melhor entendimento desse comportamento, é necessária uma análise com componentes quantitativos e qualitativos (KALUEFF; TUOHIMAA, 2004). Nossos resultados quantitativos de frequência e tempo de *grooming* em fêmeas pós-parto demonstram que entre as duas linhagens parentais, as mães SM/J possuem significativamente maiores valores desse comportamento do que as LG/J, tanto para frequência como para tempo. A geração F<sub>1</sub> foi o grupo com maiores valores para as duas medidas de *grooming*, seguida pelas mães F<sub>2</sub>. Ao contrastarmos as fêmeas F<sub>2</sub> em fase materna com as fêmeas F<sub>2</sub> em fase não materna (F<sub>2</sub>. 2º teste), vemos que, as primeiras realizam menos *grooming* que as últimas. Essa variação encontrada para esse fenótipo pode ser um indicativo de que há uma resposta de *grooming* sensível ao ambiente novo, campo aberto, nos diferentes grupos testados. Porém os resultados obtidos ainda não nos ajudam a esclarecer a respeito da emocionalidade de cada grupo. Isso se deve ao fato de que um grande número de trabalhos, em farmacogenética e comportamento, demonstrem que esse comportamento etológico se mostra sensível a tratamentos com ansiolíticos e ansiogênicos, tornando difícil a associação do *grooming* com um maior ou menor grau de ansiedade (PRUT; BELZUNG, 2003; KALUEFF; TUOHIMAA, 2005). Tradicionalmente, a análise do comportamento de *grooming* é

feita apenas com medidas quantitativas, como foi o nosso caso. Entretanto as medidas de *grooming*, individualmente, não são insuficientes para informar a respeito de alterações de ansiedade ou estresse, desde que a análise utilize não só medidas quantitativas, mas também, e principalmente, de medidas qualitativas, ou seja, utilize uma análise da microestrutura complexa do *grooming* (SMOLINKSY et al, 2009). Mesmo assim estes dados são utilizados com sucesso em vários estudos quando combinados com outros dados etológicos.

O comportamento de imobilidade no campo aberto vem sendo utilizado tanto em estudos de emocionalidade e ansiedade como em trabalhos com estresse (ARCHER, 1973; ROOZENDAAL et al, 1992). Essa imobilidade está associada com a medida de reação de medo a espaços abertos, sendo correlacionada negativamente com medidas de atividade no centro (FILE, 2001; HOLMES; RODGERS, 1998). As linhagens parentais SM/J e LG/J não apresentaram períodos de imobilidade durante o teste. Entretanto esse comportamento foi observado nas gerações F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub>. Os dados etológicos de imobilidade, individualmente, parecem a princípio não serem conclusivos com relação a ansiedade dos grupos estudados. Em outro estudo realizado pelo nosso grupo (WATANABE et al, 2010), encontramos que fêmeas LG/J passam mais tempo imóvel durante o teste de nado forçado do que as fêmeas SM/J, isso pode ser um indício de maior depressão. Magalhaes e colaboradores (2010) encontraram, em estudo feito com camundongos, componentes metabólicos que ligam as vias neurofisiológicas de ansiedade e depressão, com isso, podemos dizer que talvez o resultado de nado forçado seja também um indicativo de maior ansiedade das fêmeas LG/J. Além disso, essa maior imobilidade apresentada pelas fêmeas LG/J pode ser também um indicativo de menor atividade locomotora, pois essa relação foi encontrada em estudo feito com ratos testados no teste de nado forçado (VIEIRA et al, 2008).

Roedores, ansiosos por natureza, espontaneamente preferem a periferia do campo aberto à atividade na parte central. Essa preferência pela periferia está associada ao tigmotatismo, que é o uso das vibrissas para a percepção tátil de superfícies verticais (PRUT; BELZUNG, 2003). Estudos em que animais foram tratados com ansiolíticos, drogas que agem diminuindo a ansiedade/emocionalidade, demonstraram um aumento na atividade na região central do campo aberto (SIMON et al, 1994; TURRI et al, 2001). Nossos dados de tempo e distância no centro mostram que fêmeas da linhagem SM/J visitam menos a região aversiva do campo aberto, quando comparadas com fêmeas da linhagem LG/J. Portanto, fêmeas SM/J apresentaram mais frequentemente o comportamento de tigmotatismo, sugerindo serem mais ansiosas. Maior tempo gasto na região central das fêmeas LG/J pode indicar uma menor ansiedade. Porém, ao investigarmos o tempo gasto na periferia em relação à área central, para cada um dos grupos, verificamos que todos apresentaram o padrão esperado para roedores, de maior ambulação na periferia (Figura 11), exceto as fêmeas LG/J. Esse resultado encontrado não permite tirar conclusões sobre ansiedade das fêmeas SM/J quando comparadas com as LG/J, uma vez que as fêmeas LG/J parecem não discriminar as regiões do campo aberto. Ao contrastarmos esses resultados com os obtidos com as mesmas fêmeas no teste de labirinto em cruz elevado (LCE), verificamos que as fêmeas SM/J se apresentaram menos ansiosas do que as LG/J, ocupando a região aversiva (braços abertos) do LCE por mais tempo relativo (SAUCE, 2010). Assim, como verificamos que as fêmeas LG/J não discriminam as regiões do campo aberto, os valores de tempo na região central isoladamente não permite concluir que as fêmeas LG/J sejam menos ansiosas que as SM/J. Quando comparamos as fêmeas F<sub>2</sub> em fase materna com as F<sub>2</sub> em fase não materna encontramos a seguinte relação: fêmeas F<sub>2</sub> na fase materna possuem uma maior atividade no centro (tempo e distância relativa), e fêmeas F<sub>2</sub> que não estão na fase materna passam um maior tempo na região periférica do campo aberto. Este foi o mesmo padrão

encontrado utilizando o LCE com as mesmas fêmeas (SAUCE, 2010), em que as fêmeas F<sub>2</sub> em fase materna apresentam uma maior frequência relativa de entrada nos braços aberto do que as fêmeas F<sub>2</sub> em fase não materna. Com os resultados encontrados no campo aberto e LCE, observamos que em geral houve diferenças na exploração da região aversiva, centro do campo aberto e braços abertos do LCE, e da região não aversiva, periferia do campo aberto e braços fechados do LCE, na comparação entre F<sub>2</sub> em fase materna e F<sub>2</sub> em fase não materna. Assim, podemos dizer que talvez a fase materna tenha um efeito ansiolítico em fêmeas F<sub>2</sub>. Conforme discutido acima, a lactação, em seu estágio inicial, pode reduzir ansiedade (BYRNES; BRIDGES, 2006), possivelmente pela ação de hormônios como oxitocina e vasopressina (BOSCH, 2008; KESSLER et al, 2011). Como ambos os testes foram aplicados em fêmeas na fase inicial pós-parto, no período da lactação, esse padrão encontrado para as F<sub>2</sub> na fase materna pode ser devido a influência dessa fase.

Em todo o período de teste, observamos também a distância total percorrida, dada pelo número de quadrados cruzados pelo animal. Tal valor nos informa a respeito da exploração do ambiente novo e atividade motora. Além disso, a medição desse valor é também um importante indicativo de emocionalidade (CHOLERIS et al, 2001). Roedores, como ratos e camundongos, possuem uma aversão natural à novidades, neste caso ao teste campo aberto, assim como para locais iluminados e abertos (STEIMER; DRISCOLL, 2003). Ao ser confrontado com um ambiente novo, roedores em geral, vivenciam o conflito entre o impulso de explorar a área/objeto desconhecida, e a motivação para evitar potenciais perigos (CRUSIO, 2001; STEIMER; DRISCOLL, 2003). Essa relação é um indicativo indireto de ansiedade, em que a exploração é inibida gradualmente pela ansiedade (CRAWLEY; GOODWIN, 1980; PELLOW et al, 1985). Levando isso em conta, nossos dados de distância total percorrida mostram que as fêmeas da linhagem SM/J exploram mais o campo aberto do que as LG/J, sugerindo então que

para esta característica as mães SM/J sejam menos ansiosas. Este dado contrasta com os dados obtidos pela atividade no centro, em que as fêmeas SM/J possuem menor atividade na região central do que as fêmeas da linhagem LG/J, nos levando a pensar serem as últimas menos ansiosas que as primeiras. Mas, devido a não discriminação da área visitada pelas fêmeas LG/J, conforme discutido acima, e os dados obtidos no LCE e distância total percorrida, é possível postular que as SM/J sejam menos ansiosas de fato. Assim, os resultados de distância total percorrida no campo aberto sugerem menor ansiedade das fêmeas SM/J e concordam com Sauce (2010) que em testes realizados utilizando o LCE, demonstrou serem as fêmeas dessa linhagem menos ansiosas que as fêmeas LG/J. É importante salientar que, essa maior distância percorrida pelas SM/J também é um indicativo de uma atividade motora mais acentuada que as fêmeas LG/J. Novamente, essa informação concorda com os resultados encontrados no LCE (SAUCE, 2010). Vale ressaltar que fêmeas da linhagem LG/J, quando submetidas ao teste de nado forçado, passam significativamente mais tempo imóveis (WATANABE et al, 2010). Essa relação parece relacionar uma maior ansiedade com maior depressão, indicando que as fêmeas da linhagem LG/J parecem ser a mais ansiosa acompanhada de um padrão depressivo. Isso pode ser de fato verdadeiro, pois um recente estudo realizado em camundongos mostrou que há uma ligação nas vias metabólicas que modulam depressão, ansiedade e estresse, ou seja, são comportamentos modulados pelos mesmos compostos (MAGALHAES et al, 2010). Mas também não podemos descartar a diferença na atividade motora, pois a locomoção também está associada a esta atividade, e assim as fêmeas LG/J desempenham uma menor locomoção no campo aberto e também no teste do nado forçado (WATANABE et al, 2010). Vale ressaltar ainda que essas fêmeas são maiores e apresentam maior deposição de gordura que as fêmeas SM/J, este fator pode limitar a atividade locomotora. Nossos resultados contrastando a distância total percorrida pelas fêmeas F<sub>2</sub> em fase materna e não materna mostram que, as fêmeas F<sub>2</sub> em fase materna

exploram mais o campo aberto do que fêmeas  $F_2$  em fase não materna. Talvez isso indique uma menor ansiedade das  $F_2$  em estado materno, assim como nos sugeriu os dados de atividade no centro no campo aberto e entrada nos braços abertos do LCE, demonstrado em trabalho realizado por Sauce (2010) e discutido acima.

Com os dados de distância e tempo, calculamos a velocidade média dos grupos em estudo, utilizamos valores totais para o cálculo da velocidade total, valores de distância e tempo na periferia para o cálculo da velocidade nessas regiões e assim por diante (Tabela 10). Esse cálculo nos forneceu valores de distância (dist.) percorrida em determinado período de tempo. Assim, ele se relaciona negativamente com a ansiedade, pois quanto maior a distância percorrida em determinado período de tempo (velocidade média), maior a exploração e menor a ansiedade (CHOLERIS et al, 2001). Ao analisarmos a velocidade (dist./tempo) de cada uma das linhagens parentais (Tabela 10), encontramos que as fêmeas SM/J são mais rápidas que as LG/J, independente da região em que se encontram. Outra importante informação é que, fêmeas SM/J e LG/J andam a mesma distância no centro do campo aberto. Entretanto as fêmeas SM/J possuem uma velocidade maior nessa região, isso explica talvez o menor tempo gasto por elas no centro quando comparadas as fêmeas LG/J. Isso mostra que as fêmeas de ambos os grupos exploram de maneira semelhante o centro do campo aberto. Ao observarmos a velocidade total, fica claro que, fêmeas SM/J são mais rápidas, percorrendo uma distância maior durante o período de teste. Portanto esses dados nos mostram que as fêmeas pertencentes à linhagem SM/J exploraram mais o campo aberto do que as fêmeas da linhagem LG/J, sugerindo ser menos ansiosas e mais ativas que as estas últimas.



Tabela 10. Velocidade média (quadrados cruzados/s) para as linhagens parental SM/J e LG/J e gerações F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub>, em fase materna e não materna

	<b>Dist. total</b>	<b>Vt</b>	<b>Vc</b>	<b>Vp</b>
SM/J	292,8	0,97 <sup>a,b,c</sup>	0,92	1,19
LG/J	170,5	0,56 <sup>a</sup>	0,54	0,58
F <sub>1</sub>	161,9	0,54 <sup>b</sup>	0,72	0,50
F <sub>2</sub> _mãe	188,16	0,62 <sup>c,d</sup>	0,83	0,58
F <sub>2</sub> _não mãe	140,53	0,46 <sup>d</sup>	1,48	0,44

**Dist. Total** é a distância total percorrida pela a fêmea durante o período de teste; **Vt** é a velocidade total (Dist. Total/ tempo total (s)) durante o teste; **Vc** velocidade apresentada pelo animal no centro do campo aberto (Dist. Centro/tempo no centro) durante o período de teste; **Vp** velocidade na periferia do campo aberto (Dist.periferia/tempo na periferia).

**a,b,c,d** = diferenças significativas ( Teste *t* de *Student* -  $p < 0,001$ )

Com o intuito de investigar a variação da emocionalidade em mães das linhagens parentais (SM/J e LG/J) e gerações F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub> (em fase materna e não materna) deste inter cruzamento, observamos no teste de campo aberto os fenótipos de defecação, levantamento, *grooming*, atividade no centro (distância e tempo), imobilidade e distância total. A união dos dados etológicos de defecação, levantamento, *grooming* e imobilidade não são conclusivos com relação a emocionalidade. Entretanto, os resultados de atividade no centro (distância e tempo) e distância total nos sugerem que, fêmeas pertencentes a linhagem parental LG/J parecem ser mais ansiosas que as pertencentes a linhagem SM/J. Apesar de possuírem um maior tempo relativo no centro, indicativo de menor ansiedade, as fêmeas LG/J apresentaram uma menor atividade exploratória, demonstrada principalmente pela menor distância total percorrida e pelo menor valor de velocidade total. Isso significa que durante os cinco minutos de teste elas exploram significativamente menos o campo aberto quando comparadas as fêmeas SM/J, sendo, portanto mais ansiosas que as fêmeas SM/J. Além disso, a validade da medida de tempo relativo no centro das fêmeas LG/J é questionável, pois ao compararmos os valores médios de tempo no centro e periferia encontramos que esse grupo possui tempos parecidos gastos nessas regiões, ao contrário do que é observado nos outros grupos. Apesar de os indícios apontarem para a

linhagem LG/J como sendo mais ansiosa que a SM/J, os teste aqui realizados, utilizando o campo aberto, não são conclusivos com relação a emocionalidade nas fêmeas dessa linhagem, No entanto, vale destacar que foi constado um padrão comportamental diferente das fêmeas LG/J e SM/J (Peripato, AC, comunicação pessoal). No geral, o manuseio das fêmeas LG/J era mais difícil, pois elas pareciam ter respostas mais sensíveis ao estresse provocado, como por exemplo, no manuseio dos animais para procedimentos de pesagem, limpeza de caixa ou execução de testes. Se a fêmea estivesse em fase materna, ocasionava, frequentemente, na diminuição dos cuidados dados aos filhotes, resultando a perda da prole. Esse fato pode ser comprovado pelo baixo tamanho amostral das fêmeas LG/J que aqui utilizamos (n=6).

### ***5.3 QTLs individuais e epistáticos***

Utilizando 234 fêmeas F<sub>2</sub>, no período pós-parto, investigamos a arquitetura genética da emocionalidade no teste de campo aberto. Através da análise de QTL, fizemos uma busca por QTLs individuais e epistáticos. Encontramos 11 regiões individuais significativas para os fenótipos *grooming*, imobilidade, atividade no centro e atividade motora e 76 regiões epistáticas, envolvidas em 44 interações para todos os fenótipos, (*grooming*, imobilidade, defecação, atividade no centro e atividade motora),

O *grooming* é um importante comportamento do repertório de roedores (SACHS, 1988), sendo sensível a fatores endógenos, como variação hormonal (BRESSERS et al, 1998; CROMWELL; BERRIDGE, 1996), e fatores exógenos, como eventos estressores (KALUEFF, 2003). Porém já vem sendo demonstrado que mutações, injeção de drogas, alterações hormonais, novidade e estresse causado pela presença de predador, alteram o comportamento de *grooming* (GREER; CAPECCHI, 2002; MOODY et al, 1988; WELCH et al, 2007). Por exemplo,

camundongos com deleção do gene *Sapap-3*, gene localizado no cromossomo 4, apresentam um aumento na ansiedade, e apresentam o comportamento de *grooming* de forma compulsiva, levando a perda de pelos na face e lesões na pele (WELCH et al,2007). Encontramos uma região associada a variação desse fenótipo. O QTL *Gr10* é responsável, individualmente, por 5% da variação desse fenótipo, é aditivo, sendo o alelo SM/J associado ao maior valor de *grooming*. De acordo com isso, esperaríamos encontrar os maiores valores de *grooming* em fêmeas SM/J. Foi exatamente o encontrado nos dados etológicos, em que vemos que essas fêmeas possuem maiores valores que as fêmeas LG/J. Devido ao seu valor de *LOD score* exceder apenas ao nível de significância do cromossomo ele é considerado como QTL sugestivo de associação. Ainda para esse fenótipo, encontramos sete QTLs epistáticos, nos cromossomos 1, 2, 5, 6, 9, 14 e 17. Baum e colaboradores (2006) encontraram QTLs para *grooming* nos cromossomos 3, 4 e 19 de rato, utilizando o teste de campo aberto, entretanto nesse mesmo estudo, utilizando *defensive-burying test*, encontraram QTLs nos cromossomos 2, 9 e 10. Esses resultados talvez indiquem a complexidade genética do *grooming*, que além da função de higiene e cuidados com a superfície corporal, também tem o papel na termorregulação, redução do estresse, quimio-comunicação e interação social (SMOLINSKY et al, 2009). Para as linhagens que utilizamos, pouco ainda se sabe sobre o fenótipo de *grooming*. Entretanto, nossos resultados indicam uma única região respondendo individualmente pela variação de *grooming*, mas conta com cinco interações envolvendo sete regiões do genoma associadas com este comportamento em fêmeas pós-parto. A variação genética total explicada pelo QTL individual e QTLs epistáticos é de 29,4%. Não conseguimos encontrar potenciais genes candidatos às regiões aqui apontadas.

Imobilidade é um parâmetro que se correlaciona negativamente com ansiedade e é utilizada para avaliar medo a espaços abertos. Os QTLs individuais encontrados para imobilidade apresentam efeito sobredominante em *Im2*, e aditivo em *Im5* e *Im7*. Desta forma,

fêmeas heterozigotas na região do cromossomo 2 apresentam maior imobilidade do que fêmeas homozigotas para os alelos LG/J ou SM/J. Já as fêmeas que apresentam o alelo LG/J nas regiões de *Im5* e *Im7* apresentam maior imobilidade. Entretanto, ao analisarmos a imobilidade de cada um dos grupos, percebemos que as fêmeas das linhagens parentais SM/J e LG/J não apresentaram imobilidade, mas mesmo assim essa característica esteve presente nas gerações F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub>. Esses QTLs juntos respondem por 15% da variação do fenótipo. Destaca-se aqui, *Im7*, pois possui um valor de *LOD score* acima do nível de significância genômico, ou seja, esse QTL possui uma alta associação com a variação do fenótipo imobilidade, quando avaliado no teste de campo aberto. A busca por QTLs epistáticos revelou 29 QTLs para imobilidade, essas regiões estão envolvidas em 10 interações. Os QTLs individuais mais os epistáticos respondem por 53,4% da variação do fenótipo. Em trabalhos anteriores realizados por outros grupos, a imobilidade (*freezing*) medida em camundongos no campo aberto foi utilizada como indicativa de medo/ansiedade e revelou regiões com associação nos cromossomos 1, 2, 3, 10 e 16 (WEHNER et al, 1997). Na procura por potenciais genes candidatos encontramos um gene no cromossomo 2, próximo ao QTL *Im2*, que tem sido associado a imobilidade avaliada no teste de nado forçado. O gene *Bdnf* (*Brain-derived neurotrophic factor*) está localizado na posição 56,63 *cM* e codifica a proteína BDNF. Uma substituição de uma valina por uma metionina no códon 66 está associada com uma maior depressão (FRODL et al, 2007). Assim sugerimos que esse gene pode atuar na variação da imobilidade medida no campo aberto. O gene *Nos 3* (*Nitric oxide synthase 3*) é o candidato para *Im5*, pois localiza-se no cromossomo 5, dentro do intervalo de confiança deste QTL, mais precisamente na posição 11,32 *cM*. Camundongos com o gene *Nos 3* inativo apresentaram menor atividade no campo aberto quando comparados com camundongos tipo selvagem, devido a uma capacidade maior de aprendizagem (FRISCH et al, 2000). Essa informação pode ser um indicativo de que esse gene atue na variação da imobilidade das fêmeas

F<sub>2</sub>, em fase materna, testadas no campo aberto. Park e colaboradores (2011) encontraram um QTL individual para imobilidade em camundongos no cromossomo 7, coincidente com a região de *Im7*. Os dois genes sugeridos pelos autores, *Tyr* e *Grm5* (*Tyrosinase* e *Glutamate receptor, metabotropic 5* respectivamente), também são potenciais genes candidatos para *Im7*. Tais genes estão relacionados ao déficit de aprendizagem e aprendizagem espacial, respectivamente.

Desde a criação do teste de campo aberto, a defecação vem sendo utilizada como medida de emocionalidade (HALL, 1934). Animais altamente emotivos, ou ansiosos, apresentam uma alta taxa de defecação (ANGRINI et al, 1998). A busca por QTLs individuais para o fenótipo defecação não revelou regiões com associação significativa a variação desse fenótipo, Entretanto, encontramos QTLs epistáticos associados à defecação, sendo oito regiões envolvidas em quatro interações epistáticas. Somente os QTLs epistáticos respondem por uma grande parcela (40,5%) da variação de defecação em fêmeas na fase materna.

Atividade no centro é um indicativo de baixa ansiedade em roedores, pois, estes naturalmente preferem estar em contato com superfícies verticais, onde utilizam as vibrissas para percepção tátil. Essa preferência é devido à característica naturalmente ansiosa de roedores, como camundongos e ratos (PRUT; BELZUNG, 2003). Para atividade no centro, encontramos três QTLs individuais, *AC7*, *AC8* e *ACX*. Esses QTLs são responsáveis por 14% da variação desse fenótipo, e possuem um efeito aditivo para os cromossomos 7 e X, e sobredominante no cromossomo 8. Em ambos os casos de efeito aditivo, o alelo LG/J está associado com a maior atividade no centro. As análises desse fenótipo mostram que, de fato as fêmeas LG/J exploram mais essa região do os outros grupos. A região *ACX*, encontrada no cromossomo X, é a que possui a maior associação de ligação com atividade no centro, pois seu *LOD score*, 3,51, está acima do nível de significância do genoma, os outros QTLs são sugestivos. A busca por QTLs

epistáticos nos revelou 22 regiões envolvidas em 5 redes de interações. Os QTLs epistáticos mais os individuais respondem por 24,4% da variação de fenótipo. Para cada um dos QTLs individuais encontramos potenciais genes candidatos. Para *AC7* e *ACX* encontram-se os genes *CCK2* (*Cholecystokinin B receptor*) (HORINOUCI et al, 2004) e *Arhge9* (*Collybistin*) (KALSCHEUER et al., 2008; PAPADOPOULOS et al, 2007; SAIPOUR et al, 2010), respectivamente, ambos relacionam-se à ansiedade. O gene que codifica a *Cholecystokinin* (*CCK*), neuropeptídeo mais abundante no cérebro, tem sido relacionado a uma série de funções como, termorregulação, comportamento sexual, saciedade, desordens de pânico, medo e ansiedade (ROTZINGER et al, 2010). *CCK2*, um subtipo do gene que codifica esse neuropeptídeo está no intervalo de confiança de *AC7*. Resultados utilizando os testes comportamentais LCE e caixa claro e escuro sugerem que camundongos com gene *CCK2* inativado são menos ansiosos que camundongos tipo selvagem (HORINOUCI et al, 2004). Apesar do *AC7* não estar envolvido em nenhuma interação epistática para esse fenótipo, o *Im7*, que possui um intervalo de confiança bastante parecido com *AC7*, faz parte de uma rede de interações epistáticas para o fenótipo imobilidade. Isso pode ser um indicativo de pleiotropia. Sendo assim, sugerimos que o gene *CCK2* pode estar envolvido na variação desses dois fenótipos. Isso abre possibilidades para futuras investigações. Dentro do intervalo de confiança do *ACX* encontra-se o gene *Arhge9* (*Collybistin*), 41,85 *cM*. O produto deste gene atua na regulação pós-sináptica glicenérgica e GABAenérgica. Camundongos com o gene *Arhge9* inativo, testados no campo aberto, não apresentaram diferenças significativas no comportamento locomotor quando comparados com camundongos tipo selvagem. Entretanto, esses animais sem a expressão da *Collybistin*, gastaram menos tempo no centro do campo aberto do que animais com esse gene ativo. Isso sugere uma maior ansiedade dos camundongos mutantes quando comparados aos tipos selvagens (PAPADOPOULOS et al, 2007).

O teste de campo aberto também é utilizado para avaliar atividade motora. Essa atividade é avaliada a partir de dados de distância percorrida. Resultados de estudo feito com ratos encontraram uma correlação com medo e ansiedade (REDINA et al, 2009). A busca por QTLs para o fenótipo atividade motora nos revelou quatro regiões de associação, *AM4*, *AM6*, *AM10* e *AM11*. Elas juntas respondem por 16% da variação total, e possuem um efeito aditivo. É importante lembrar que o fenótipo atividade motora é composto pelos fenótipos de distância total percorrida e levantamento, esse dois fenótipos nos informam sobre a atividade exploratória no campo aberto. O QTL *AM11* possui um maior valor de *LOD score*, 3,74, superando o nível de significância genômico, ou seja, essa região está altamente associada com a variação do fenótipo atividade motora. Alguns estudos de atividade locomotora têm encontrado QTLs associados no cromossomo *11*. Camundongos quando tratados com drogas, como nicotina, psicoestimulantes e opióides tem um aumento na atividade locomotora (GILL; BOYLE, 2005). O QTL associado com a variação da locomoção em animais tratados encontra-se no cromossomo *11* e *AM11* está em região próxima a este QTL. Encontramos seis QTLs epistáticos que juntos com os individuais explicam 23,4% da variação da atividade no centro. Para cada um dos QTLs individuais buscamos genes candidatos. Os genes *GABAB (2)* (*gamma-aminobutyric acid receptor, 2*), *mGlu8* (*metabotropic glutamate receptor 8*) e *Adra1b* ( *$\alpha_{1b}$ -Adrenergic receptors*) são os potenciais genes candidatos para *AM4*, *AM6* e *AM11*, respectivamente. Destacaremos aqui o gene *Adra1b*, pois se localiza dentro do intervalo de confiança do QTL com maior associação com a variação do fenótipo (*AM11*). Esse gene possui três subtipos ( $\alpha_{1a}$ ,  $\alpha_{1b}$  e  $\alpha_{1d}$ ) (BYLUND; TRENDELENBURG, 1994) localizados em cromossomos diferentes (cromossomos *14*, *11* e *2* respectivamente), o subtipo  $\alpha_{1b}$  está na posição de 28,81 *cM*. Knauber e Muller (2000) demonstraram que camundongos  $\alpha_{1b}^{-/-}$  apresentam baixo nível de atividade no

campo aberto quando comparado com  $\alpha_{1b} +/+$ , mostrado pela baixa atividade exploratória inicial e menor frequência de levantamento. Eles ainda interagiram menos com o objeto novo e os seus movimentos ficaram restritos à área relativamente protegida, ao longo das paredes do campo. Houve também uma diminuição da latência nos camundongos  $\alpha_{1b} -/-$ . Os resultados apresentados mostram que a mutação de um único gene membro da família dos receptores adrenérgicos  $\alpha_1$  cria um fenótipo distinto e fornece evidências de que esse receptor está envolvido na modulação da memória e atividade exploratória.

Por fim, a análise genética da emocionalidade em camundongos fêmeas, em fase materna, revelou uma arquitetura genética complexa. Encontramos QTLs individuais distribuídos em diferentes cromossomos, com efeitos de aditividade e dominância. Além disso, encontramos QTLs epistáticos que são responsáveis por grande parte da variação genética de fenótipos relacionados à ansiedade. Algumas dessas regiões são coincidentes com regiões encontradas por outros grupos de estudo. Entretanto, inúmeros QTLs diferentes dos encontrados aqui tem sido associados a fenótipos que indiquem emocionalidade e ansiedade. Sugerimos alguns genes candidatos que podem estar envolvidos na variação da emocionalidade, devido aos QTLs individuais aqui encontrados. Isso talvez crie possibilidades para futuros estudos dessa natureza. Além disso, outro fator importante, não investigado nesse trabalho, que modula a expressão de características comportamentais é o ambiente, pois ele pode agir alterando a expressão de determinados compostos que atuem na variação de fenótipos ligados ao comportamento. Assim, a epigenética vem despontando como um potencial campo de pesquisa para o entendimento de características comportamentais e deverá ser incorporada em nossos próximos passos.



## 6. CONCLUSÕES

A investigação da emocionalidade, medida no teste de campo aberto, em camundongos fêmeas em fase materna, não foi de fato conclusiva com relação as linhagens parentais SM/J e LG/J. Entretanto, alguma diferença entre elas foi observada. Os indícios apontam as fêmeas da linhagem LG/J como sendo mais ansiosas que as fêmeas SM/J, talvez devido a maior atividade evidente das últimas frente as fêmeas do primeiro grupo. Os resultados do campo aberto não revelaram diferenças significativa entre a emocionalidade da geração F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub>. Entretanto, fêmeas F<sub>2</sub> em fase materna parecem ser menos ansiosas que fêmeas F<sub>2</sub> fora dessa fase, provavelmente devido ao estado lactante das mães.

A análise do crescimento revelou um padrão entre as fases aqui estudadas, a fase I (primeira a terceira semana de vida) e a fase P (terceira a sexta semana). Em I, o crescimento da cauda foi significativamente maior do que em P, exceto para as fêmeas LG/J. Já para o peso ocorreu o contrário, em que o maior ganho em peso aconteceu na fase P e não em I, porém nas fêmeas SM/J esse peso se manteve relativamente constante em P.

Nas fêmeas da geração F<sub>2</sub> encontramos associação entre fenótipos de emocionalidade e ganho em peso. Nestes casos, fêmeas com maior imobilidade apresentaram um maior ganho em peso na fase I enquanto que fêmeas com maior atividade no centro, imobilidade, e atividade motora tiveram um maior ganho em peso na fase P. O comportamento de maior frequência de *grooming* estava associado com um menor ganho em peso na fase P.

Nas fêmeas F<sub>2</sub> do inter cruzamento entre as duas linhagens endogâmicas LG/J e SM/J não encontramos nenhuma associação entre o crescimento, ganho em peso e fenótipos de ansiedade dos animais com a viabilidade da prole, indicando que independente do ganho em peso ou dos níveis de ansiedade, as fêmeas não apresentaram variação no cuidado materno.

A busca por QTLs resultou em muitas regiões envolvidas na variação da emocionalidade em fêmeas pós-parto. Encontramos 11 QTLs individuais e 88 QTLs epistáticos distribuídos por diferentes cromossomos. Assim, os QTLs individuais explicam 5 a 9% da variação de emocionalidade para os fenótipos (*grooming*, imobilidade, atividade no centro, atividade motora) e juntamente com os QTLs epistáticos conseguimos explicar de 24 a 53% da variação genética para todos os fenótipos avaliados.

Apontamos potenciais genes candidatos que podem ter um efeito em fenótipos de emocionalidade. Essas regiões aqui encontradas e os genes sugeridos poderão contribuir para o entendimento da emocionalidade em fêmeas pós-parto de camundongos, pois, esperamos que QTLs e genes candidatos aqui sugeridos possam corroborar estudos anteriores e auxiliar pesquisa futuras.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- ANGRINI, Manar; LESLIE, Julian C; SHEPHARD, Robert A. Effects of propranolol, buspirone, pCPA, reserpine, and chlorodiazepoxide on open field behavior. **Pharmacol Biochem Behavior**, v59, p387–397, 1998
- Archer, J. (1979). Behavioural aspects of fear. In W. Sluckin (Ed.). Fear in animals and man (pp. 56-85). New York: Van Nostrand Reinhold.
- AUGUSTSSON, Hanna; MEYERSON, Bengt. J. Exploration and risk assessment: a comparative study of male house mice (*Mus musculus musculus*) and two laboratory strains. *Physiology and Behavior*, v.81, p.685- 698, (2004).
- BAUM, Amber E, et al. Test and behavior-specific genetic factors affect WKY hypoactivity in tests of emotionality. **Behav Brain Res**. n.169, p.220–30, 2006.
- BERRIDGE, Kent C et al. Sequential super-stereotypy of an instinctive fixed action pattern in hyper-dopaminergic mutant mice: a model of obsessive compulsive disorder and Tourette's. **BMC Biol**. 3, 4, 2005.
- BLANCHARD Carolina D, BLANCHARD Robert J. Innate and conditioned reactions to threat in rats with amygdaloid lesions. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v 81(2), p.281-290. Nov 1972.
- BLANCHARD Carolina D, BLANCHARD Robert J. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. **Annu Rev Psychol**; v.39(1), p. 43-68. 1988
- BLANCHARD Carolina D; BLANCHARD Robert J. Attack and defense in rodents as ethoexperimental models for the study of emotion. **Prog Neuro- Psycopharmacol Biol Psychiatry**; v.13, p.3–14. 1989.
- BOAKE, Christine R B; et al. Genetic Tools for Studying Adaptation and the Evolution of Behavior. **Am Nat**. v.160, p.143-159, 2002.
- BOLIVAR, Valerie, COOK; Melloni; FLAHERTY, Lorraine. List of transgenic and knockout mice: behavioral profiles. **Mamm. Genome**, 11, 260–274. 2000.
- BOSCH, Oliber J; NEUMANN, Inga D. Brain vasopressin is an important regulator of maternal behavior independent of dams' trait anxiety. **Proc Natl Acad Sci USA**; v,105; p17139–17144. 2008.

- BOUKOUVALAS G, ANTONIOU K, PAPALEXI E & KITRAKI E. Post weaning high fat feeding affects rats' behavior and hypothalamic–pituitary–adrenal axis at the onset of puberty in a sexually dimorphic manner. **Neuroscience** 153 373–382.2008
- BRANDÃO, Marcelo L. (2008). *As Bases Biológicas do Comportamento: Introdução à neurociência*. Livro eletrônico, acesso na homepage do CNPq: [www.cnpq.br](http://www.cnpq.br).
- Bressers WM, Kruk MR, Van Erp AM, Willekens-Bramer DC, Haccou P, Meelis E. The hypothalamus: cross-roads of endocrine and behavioural regulation in grooming and aggression. **Neurosci Biobehav Rev**, v23, p.163–7, 1998.
- BROADHURST, P. L. and LEVINE, Seymour. Behavioural consistency in strains of rats selectively bred for emotional elimination. **Br. J. Psychol.** V. 54, p. 121–125. 1963.
- BROADHUNT, P. L. (1969). Psychogenetics of emotionality in the rat. **Annals of New York Academy of Science**, v. 159, p. 806-824. 1969.
- BRUNNER D; et al. Anxiety, motor activation, and maternal- infant interactions in 5HT1B knockout mice. **Behav Neurosci** v.113, n3, p. 587-601. 1999.
- BYLUND, David B; TRENDELENBURG, Ullrich. International union of pharmacology nomenclature of adrenoceptors. **Pharmacol. Rev.** n.46, p.121–134, 1994
- CALDARONE, Barbara, et al. Quantitative trait loci analysis affecting contextual conditioning in mice. **Nat Genet.** n.17, p.335–337. 1997.
- CALDJI, Christian; DIORIO, Josie; MEANEY, Michael. J. 2000. Variations in maternal care in infancy regulate the development of stress reactivity. *Biological psychiatry*, 48(12), 1164-74. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11137058>.
- CALDJI, Christian, et al. Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of behavioral fearfulness in adulthood in the rat. *Proc Natl Acad Sci*, v.95, p.5335–5340. 1998.
- CAROLA, Valeria, et al. Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice. **Behavioural brain research**, v.134, n.1-2, p.49-57, 2002.
- CASTILLA-ORTEGA, Estela, et al. Exploratory, anxiety and spatial memory impairments are dissociated in mice lacking the LPA1 receptor. **Neurobiol Learn Mem**, v.94, p.73–82. 2010.
- CHAI, C. Analysis of quantitative inheritance of body size in mice. I. Hybridization and maternal influence. **Genetics**, v.41, p.157-164, 1956a.

- CHAI, C. Analysis of quantitative inheritance of body size in mice. II. Hybridization and maternal influence. **Genetics**, n.41, p.167-178, 1956b.
- CHAMPAGNE, Frances, A; et al. Maternal care associated with methylation of the estrogen receptor-alpha1b promoter and estrogen receptor-alpha expression in the medial preoptic area of female offspring. **Endocrinology**, v.147, p.2909–2915. 2006
- CHEVERUD, James; Moore A.J. Quantitative genetics and the role of the environment provided by relatives in behavioral evolution. **Quant Genetic Studies of Behav Evo**, p.67–100. 1994.
- CHEVERUD, James; et al. (1996). Quantitative trait loci for murine growth. **Genetics**, n.142, p.1305–1319. 1996.
- CHEVERUD, James, Vaughn TT, Pletscher LS, Peripato AC, Adams ES, et al. Genetic architecture of adiposity in the cross of LG/J and SM/J inbred mice. **Mamm Genome** 12, 3-12. 2001.
- Choleris, E., Thomas, A.W., Kavaliers, M. & Prato, F.S. (2001) A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. *Neurosci Biobehav Rev* 25, 235–260.
- Cockerham, C., Clark (1954). An extension of the concept of partitioning hereditary variance for the analysis of covariances among relatives when epistasis is present. *Genetics* 39: 859-882.
- Cokerham C.C. and Zeng Z-B (1996). Design II1 With Marker Loci. *Genetics*. 143, 1437-1456.
- Cohen R.M., Kang A., Gulick C. (2001). Quantitative trait loci affecting the behavior of A/J and CBA/J intercross mice in the elevated plus maze. *Mamm Genome* 12:501–507.
- Costall, B.J. Jones, B.J. Kelly, M.E. Naylor, R.J. Tomkins, D.M. (1989). Exploration of a mice a black and white box: validation as a model of anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* v. 32, p. 777-785.
- Crawley, J., and Goodwin, F. K. (1980). Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 13:167-170.
- Crawley, J.N. & Moody, T.W. (1983). Anxiolytics block excessive grooming behavior induced by ACTH1-24 and bombesin. *Brain Res. Bull.* 10, 399–401
- Crawley, J.N., J. K. Belknap, A. Collins, J. C. Crabbe, W. Frankel *et al.* (1997). Behavioral phenotypes of inbred mouse strains: implications and recommendations for molecular studies. *pharmacology* 132: 107–124.

- Crowell-Davis, S.L.; Houpt, K.A. (1986). Maternal behavior. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 2(3): 557-571.
- Crusio, W. E. (2001). Genetic dissection of mouse exploratory behaviour. *Behavioural Brain Research* 125, 127–132.
- Dietrich W., Katz H., Shin H-S., Friedman J. Dracopoli N., Lander E.S. (1992). A genetic map of the mouse suitable for typing intraspecific crosses. *Genetics* 131: 423-447.
- Donald R.D, D. Healy S. D, Lawrence A. B, Rutherford M. D. K (2011). Emotionality in growing pigs: Is the open field a valid test? *Physiology & Behavior* Volume 104, Issue 5, 24 October 2011, Pages 906-913
- Drai D., Golani I. (2001). SEE: a tool for the visualization and analysis of rodent exploratory behavior. *Neurosci Biobehav Rev* 25:409 – 426
- Duvoisin R.M., Zhang C. P., Fankuch T.F., et al. (2005). Increased measures of anxiety and weight gain in mice lacking the group III metabotropic glutamate receptor mGluR8. *Eur J Neurosci.*; 22:425–36.
- Dwyer C.M., Lawrence A.B. (2000). Maternal behaviour in domestic sheep (*Ovis aries*): constancy and change with maternal experience. *Behaviour* 137(10): 1391-1413.
- Eliam, D. (2003). Open-field behaviour withstands drastic changes in arena size. *Behavioural Brain Research*, 142, 53 e 62.
- Falconer DS, Mackay TFC (1996) *Introduction to Quantitative Genetics*. Longman Press, New York.
- Ferré S, Quiroz C, Woods AS, Cunha R, Popoli P, Ciruela F et al. (2008). An update on adenosine A2A-dopamine D2 receptor interactions: implications for the function of G protein-coupled receptors. *Curr Pharm Des* 14: 1468–1474.
- File, S. E. (2001). Factors controlling measures of anxiety and response to novelty in the mouse. *Behavioural Brain Research* 125, 151–157.
- Flint, J., Corley, R., (1996). Do animal models have a place in the genetic analysis of quantitative human behavioural traits? *J. Mol. Med.* 74, 515–521.
- Flint, J. (2003). Analysis of quantitative trait loci that influence animal behavior. *Journal of Neurobiology* 54, 46–77.
- Flint, J., and Mackay, T.F. (2009). Genetic architecture of quantitative traits in mice, flies, and humans. *Genome Res.* 19: 723–733.

- Forkman, B., A. Boissy, M. C. Meunier-Salaün, E. Canali, and R. B. Jones. 2007. A critical review of fear tests used on cattle, pigs, sheep, poultry and horses. *Physiol. Behav.* 92:340–374.
- Francis, D., Diorio, J., Liu, D. & Meaney, M. J. (1999). Nongenomic transmission across generations of maternal behavior and stress responses in the rat. *Science* 286, 1155–1158 .
- Francis, D. D., Szegda, K., Campbell, G., Martin, W. D. & Insel, T. R. (2003). Epigenetic sources of behavioral differences in mice. *Nature Neurosci.* 6, 445–446.
- Frisch, A., Michaelovsky, E., Rockah, R., Amir, I., Hermesh, H., Laor, N., Fuchs, C., Zohar, J., Lerer, B., Buniak, S.F., Landa, S., Poyurovsky, M., Shapira, B., Weizman, R., (2000). Association between obsessive–compulsive disorder and polymorphisms of genes encoding components of the serotonergic and dopaminergic pathways. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 10, 205–209.
- Frodl T, Schule C, Schmitt G, Born C, Baghai T, Zill P et al (2007). Association of the brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism with reduced hippocampal volumes in major depression. *Arch Gen Psychiatry* 64: 410–416.
- Gentsch, C., Lichtsteiner, M., and Feer, H. (1987). Open field and elevated plus-maze: A behavioural comparison between spontaneously hypertensive (SHR) and Wistar-Kyoto (WKY) rats and the effects of chlordiazepoxide. *Behav. Brain Res.* 25:101–107.
- Gershenfeld H, Neumann P, Mathis C, Crawley J, Li X, Paul S. (1997). Mapping quantitative trait loci for open-field behavior in mice. *Behav Genet* 27:201–210.
- Gill KJ, Boyle AE (2005). Quantitative trait loci for novelty/stress- induced locomotor activation in recombinant inbred (RI) and recombinant congenic (RC) strains of mice. *Behav Brain Res* 161:113–124.
- Góes, Carolina Purcel. Investigando o genoma de camundongos LG/J x SM/J para provisão de leite. Ciências Biológicas, Universidade Federal de São Carlos., São Carlos, SP. Departamento de Biologia Molecular e Genética Evolutiva. 2010. Trabalho de Conclusão de Curso.
- Goodale H. (1938). A study of the inheritance of body weight in the albino mouse by selection. *J Hered* 29: 101-112.
- Gosling S.D., John O.P. (1999). Personality dimensions in non-human animals: a cross-species review. *Curr Psychol Sci*; 8: 69 – 75.
- Graeff, F.G. (2007). Anxiety, panic and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Rev. Bras. Psiquiatr.*, 29 (1): S3 - S6

- Gray, J. A. (1979). Emotionality in male and female rodents: A reply to Archer. *Br. J. Psychol.* 70:425–440.
- Greer, J. M., & Capecchi, M. R. (2002). *Hoxb8* is required for normal grooming behavior in mice. *Neuron*, 33(1), 23-34
- Haley, CS & Knott, SA (1992). A simple regression method for mapping quantitative trait loci in line crosses using flanking markers. *Heredity* 69:315-324.
- Hall, C.S. (1934). Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in the emotionality. *Journal of Comparative Psychology*, Whashington, v. 18, p. 385-403.
- Hansen S., Ferreira A. (1986) Food intake, aggression, and fear behavior in the mother rat: control by neural systems concerned with milk ejection and maternal behavior. *Behav Neurosci* 100(1): 64-70.
- Hanson, L. A. et al. (1975). Immunodefense factors in human milk. *Modern problems in paediatrics*, 15: 63-72 .
- Holmes, A. & Rodgers, R.J. (1998) Responses of Swiss-Webster mice to repeated plus-maze experience: further evidence for a qualitative shift in emotional state? *Pharmacol Biochem Behav* 60, 473–488.
- Horinouchi Y, Akiyoshi J, Nagata A, Matsushita H, Tsutsumi T, Isogawa K, Noda T, Nagayama H (2004) Reduced anxious behavior in mice lacking the CCK<sub>2</sub> receptor gene. *Eur Neuropsychopharmacol* 14:157–161
- Hrbek T, de Brito RA, Wang B, Pletscher LS, Cheverud JM (2006). Genetic characterization of a new set of recombinant inbred lines (LGXSM) formed from the intercross of SM/J and LG/J inbred mouse strains. *Mammalian Genome* 17: 417-429.
- Jablonka, E. and Raz, G. (2009). Transgenerational epigenetic inheritance: prevalence, mechanisms, and implications for the study of heredity and evolution. *Q. Rev. Biol.* 84, 131–176
- Janus K. (1987). Early separation of young rats from the mother and the development of play fighting. *Physiol Behav*; 39:471– 6.
- Jolliffe, I. T. (1986). *Principal Component Analysis*. Springer-Verlag. pp. 487.
- Jóźwik A., Śliwa-Jóźwik A., Jezierski T., Daniewski W., Górecka A., Kołataj A. (2009). The activity of lysosomal enzymes in blood serum, liver, kidney and skeletal muscle of rabbits divergently selected for locomotor activity in open-field test. *Animal Science Papers and*



Reports vol. 27 no. 3, 249-257 Institute of Genetics and Animal Breeding, Jastrzębiec, Poland

- Kalscheuer, V.M; Musante L., Fang C., Hoffmann K., Fuchs C., Carta E., Deas E., Venkateswarlu K., Menzel C., Ullmann R., Tommerup N., Dalpra L., Tzschach A., Selicorni A., Luscher B., Ropers H., Harvey K., and Harvey R.J. A balanced chromosomal translocation disrupting ARHGEF9 is associated with epilepsy, anxiety, aggression and mental retardation. *Hum. Mutat.* (in press).
- Kalueff A.V., Aldridge J.W., LaPorte J.L., Murphy D.L., Tuohimaa P. (2007). Analyzing grooming microstructure in neurobehavioral experiments. *Nat Protoc* ;2:2538–44.
- Kalueff, A. V., & Tuohimaa, P. (2005). The grooming analysis algorithm discriminates between different levels of anxiety in rats: potential utility for neurobehavioural stress research. *Journal of neuroscience methods*, 143(2), 169-77.
- Kalueff AV, Tuohimaa P. (2004). Grooming analysis algorithm for neurobehavioural stress research. *Brain Res Brain Res Protoc*;13:151–8.
- Kalueff AV (2003) Today and tomorrow of anxiety research. *Stress Behav* 8: 145-147
- Kamara K, Eskay R, Castonguay T (1998) High-fat diets and stress responsivity. *Physiol Behav* 64:1–6.
- Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessel T.M. (1995). *Essentials of Neural Science and Behavior*. USA, Prentice Hall International, Inc.
- Kessler MS, Bosch OJ, Bunck M, Landgraf R, Neumann ID. Maternal care differs in mice bred for high versus. low trait anxiety: Impact of brain vasopressin and cross-fostering. *Soc Neurosci* 2011; 6: 156–168.
- Kikusui T, Nakamura K, Kakuma Y, Yuji M. (2006). Early weaning augments neuro-endocrine stress responses in mice. *Behav Brain Res*; 175: 96–103.
- Kitraki E., Soulis G., Gerozissis K. (2004). Impaired neuroendocrine response to stress following a short-term fat-enriched diet. *Neuroendocrinology* 79:338–345.
- Knauber J, Muller WE. (2000). Decreased exploratory activity and impaired passive avoidance behaviour in mice deficient for the 1b- adrenoceptor. *Eur Neuropsychopharmacol* ;10:423-7.
- Kolb AF, Huber RC, Lillico SG, Carlisle A, Robinson CJ, et al. (2011) Milk Lacking a-Casein Leads to Permanent Reduction in Body Size in Mice. *PLoS ONE* 6(7): e21775. doi:10.1371/journal.pone.0021775.

- Lander, ES e Bolstein, D (1989.) Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121:185-199.
- Lander, E.; kruglyak, L. (1995). Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nature Genet*, v. 11, p. 241- 247, 1995.
- Leighton, PA, Mitchell KJ, Goodrich LV, Lu X, Pinson K, Scherz P, Skarnes WC, Tessier-Lavigne M (2001) Defining brain wiring patterns and mechanisms through gene trapping in mice. *Nature* 410:174–179.
- Li J, Ji L (2005) Adjusting multiple testing in multilocus analyses using the eigenvalues of a correlation matrix. *Heredity* 95(3): 221-227.
- Lim, MM, Wang Z, Olazabal DE, Ren X,. Terwilliger EF & Young LJ (2004) Enhanced partner preference in a promiscuous species by manipulating the expression of a single gene. *Nature* 429: 754-757.
- Lister R.G. (1987). The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology* 92:180–185
- Lynch M. Walsh B. (1998). *Genetics and Analysis of Quantitative Traits*. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- MacArthur J (1944) Genetics of body size and related characters. I. Selection of small and large races of the laboratory mouse. *Am Nat* 78: 42-157.
- Mackay, T. F. C. (2001). The genetic architecture of quantitative traits. *Annu. Rev. Genet.* 35, 303–339.
- Magalhaes, A. C. Holmes K. H., Dale L.B., Comps-Agrar L., Lee D., Yadav P.N., Drysdale L., Poulter M.O., Roth B.L., Pin J-P, Anisman H. & Ferguson S.S.G.(2010). CRF receptor 1 regulates anxiety behavior via sensitization of 5-HT2 receptor signaling. *Nature Neurosci.* 13, 622–629 (2010).
- Manly KF, Cudmore Jr RH, Meer JM (2001). Map Manager QTX, cross-platform software for genetic mapping. *Mammalian Genome* 12: 930-932.
- Mayer A.D., Rosenblatt J.S. (1987). Hormonal factors influence the onset of maternal aggression in laboratory rats. *Horm Behav* 21(2): 253-267.
- Moffit, T.E., A. Caspi e M. Rutter. (2006). Measured gene-environment in interactions in psychopathology: concepts, research strategies, and implications for research, intervention, and public understanding of genetics. *Perspectives on Psychological Science*: 1: 5–27.

- Moody, T.W., Merali, Z. & Crawley, J.N. (1988). The effects of anxiolytics and other agents on rat grooming behavior. *Ann. NY Acad. Sci.* 525, 281–290.
- Morméde, P., Garcí'a-Belenguer, S., Dulluc, J. e Oliver, C. (1994). Independent segregation of a hyperactive hypothalamic–hypo- physo–adrenal axis and a reduced behavioural reactivity in pigs. *Psychoneuroendocrinology*, 19, 305–311.
- Nakamura K, Kikusui T, Takeuchi Y, Mori Y. (2003). The influence of early weaning on aggressive behavior in mice. *J Vet Med Sci* ;65: 1347–9.
- Nelson JE e Krawetz SA (1992) Purification of cloned and genomic DNA by guanidine thiocyanate/isobutyl alcohol fractionation. *Anal Biochem.* 207(1): 197-201.
- Noirot E. (1972). Ultrasounds and maternal behavior in small rodents. *Developmental Psychobiology* 5(4): 371-387.
- Nosek, K., Dennis, K., Andrus, B.M., Ahmadiyah, N., Baum, A.E., Woods, L.C., Redei, E.E., 2008. Context and strain-dependent behavioral response to stress. *Behav. Brain Funct.* 4, 23.
- Ossenkopp, K. P., Sorenson, L. and Mazmanian, D. S. (1994). Factor analysis of open-field behavior in the rat (*Rattus norvegicus*): application of the three-way PARAFAC model to a longitudinal data set. *Behav. Proc.*, 31, 129–144
- Papadopoulos, T., Korte, M., Eulenburg, V., Kubota, H., Retiounskaia, M., Harvey, R.J., Harvey, K., O'Sullivan, G.A., Laube, B., Hulsman, S., Geiger, J.R., Betz, H., 2007. Impaired GABAergic transmission and altered hippocampal synaptic plasticity in collybistin-deficient mice. *EMBO J.* 26, 3888–3899.
- Park C. C., Gale G.D., Jong S., Ghazalpour A., Bennett B. J., Farber C. R., Langfelder P., Lin A., Khan A. H., Eskin E., Horvath S., Lusis A. J., Ophoff R.A., D. J. Smith D. J. (2011). Gene networks associated with conditional fear in mice identified using a systems genetics approach. *BMC Systems Biology*, 5:43
- Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M (1985) Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods* 14:149–167
- Peripato A.C., Cheverud J.M. (2002.) Genetic influences on maternal care. *Am Nat* 160: S173-S185.
- Peripato, A.C., de Brito, R.A., Vaughn, T.T., Pletscher, L.S., Matioli, S.R. & Cheverud, J.M. (2002). Quantitative trait loci for maternal performance for offspring survival in mice. *Genetics* 162:1341-1362.

- Peripato AC, de Brito RA, Matioli SR, Pletscher LS, Vaughn TT, Cheverud JM (2004). Epistasis affecting litter size in mice. *J Evol Biol* 17: 593-602.
- Phillips, N.K., Hammen, C.L., Brennan, P.A., Najman, J.M., Bor, W., (2005). Early adversity and the prospective prediction of depressive and anxiety disorders in adolescents. *J. Abnorm. Child Psychol.* 33, 13–24.
- Prut, L. and Belzung, C. (2003). The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur. J. Pharmacol.* 463, 3–33
- Ramos, A., Berton, O., Mormede, P. e Chaouloff, F. (1997). A multiple-test study of anxiety-related behaviours in six inbred rat strains. *Behav Brain Res*, v.85, n.1, Apr, p.57-69
- Ramos, A. et al. (1997). A multiple-test study of anxiety-related behaviours in six inbred rat strains. *Behav. Brain. Res.* 85, 57–69.
- Ramos, A., Moisan, M.-P., Chaouloff, F., Mormède, C., and Mormède, P. (1999). Identification of female-specific QTLs affecting an emotionality-related behavior in rats. *Mol. Psychiatry* 4:453–462.
- Ramos, A. and Mormede, P. (1998) Stress and emotionality: a multidimensional and genetic approach. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 22, 33–57
- Redina O. E., S. É. Smolenskaya S. É., Maslova L. N., Sakharov D. G, e Markel' A. L. (2009). The Characteristics of Motor Activity in ISIAH Rats in an Open Field Test Are Controlled by Genes on Chromosomes 2 and 16. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, Vol. 39, No. 1. 57-64.
- Romeo, R.D., Mueller, A., Sisti, H.M., Ogawa, S., McEwen, B.S. & Brake, W.G. (2003). Anxiety and fear behaviors in adult male and female C57BL/6 mice are modulated by maternal separation. *Horm. Behav.*, 43, 561–567.
- Rooszendaal, B., Wiersma, A., Driscoll, P., Koolhaas, J. M., and Bohus, B. (1992). Vasopressinergic modulation of stress responses in the central amygdala of the Roman high-avoidance and low-avoidance rat. *Brain Res.* 596:35 – 40.
- Rotzinger, S., Lovejoy, D. A., & Tan, L. A. (2010). Behavioral effects of neuropeptides in rodent models of depression and anxiety. *Peptides*, 31(4), 736 –756.
- Routman E.J., Cheverud J.M. (1994). A rapid method of scoring simple sequence repeat polymorphisms with agarose gel electrophoresis. *Mammal Genome* 5: 187-188.
- Sachs BD. (1988). The development of grooming and its expression in adult. *Ann N Y Acad Sci.* 525: 1-17.

- Saiepour L. et al. (2010) Complex role of collybistin and gephyrin in GABA A receptor clustering. *J Biol Chem* 285:29623–29631.
- Sarwer D.B., Wadden T.A., Fabricatore A.N. (2005). Psychosocial and behavioral aspects of bariatric surgery. *Obes Res.*, 13:639-648.
- Sauce S. B. (2010). Arquitetura genética do comportamento de construção de ninho. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós Graduação em Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos.
- SAS Institute Inc. 1998. *SAS/STAT User's Guide*, Version 6, Fourth ed. Vol. 1. SAS Institute Inc. Cary, NC.
- Scott J, Fuller J. (1965). *Genetics and social behavior in dogs*. Chicago: The University Chicago Press.
- Shimomura, K., Low-Zeddies, S.S., King, DP, Steeves, TDL, Whiteley, A, Kushla, J *et al.* (2001). Genome-wide epistatic interaction analysis reveals complex genetic determinants of circadian behavior in mice. *Genome Research* 11:959-980.
- Simon, P., Dupuis, R. & Costentin, J. (1994). Thigmotaxis as an index of anxiety in mice. Influence of dopaminergic transmissions *Behav. Brain Res.* 61, 59–64.
- Singer J.B., Hill AE, Nadeau J.H., Lander E.S. (2005). Mapping quantitative trait loci for anxiety in chromosome substitution strains of mice. *Genetics*;169(2):855–62.
- Smolinsky A, Bergner C, LaPorte J, Kalueff A. (2009). Analysis of grooming behavior and its utility in studying animal stress, anxiety, and depression. New York, New York.
- Stearns S.C., e Hoekstra R.F., (2005). *Evolution. An introduction*. Oxford Univ. Press (New York), 2<sup>nd</sup> ed., 575 pp.
- Steimer, T., & Driscoll, P. (2003). Divergent stress responses and coping styles in psychogenetically selected Roman high-(RHA) and low-(RLA) avoidance rats: Behavioural, neuroendocrine and developmental aspects. *Stress*, 6, 87–100.
- Strine T.W; Mokdad A.H; Dube S.R; Balluz L.S; Gonzalez O; Berry J.T; Manderscheid R; Kroenke K. (2008). The association of depression and anxiety with obesity and unhealthy behaviors among community-dwelling US adults. *General Hospital Psychiatry*. Volume 30, Issue 2, Pages 127-137.
- Wilkinson L, Coward M. *SYSTAT10 Statistics I*. Chicago, IL: SPSS Inc; 2000.

- Turri, M.G. et al. (2001). QTL analysis identifies multiple behavioral dimensions in ethological tests of anxiety in laboratory mice. *Curr. Biol.* 11, 725–734
- Turri M.G., DeFries J.C., Henderson N.D., Flint J. (2004). Multivariate analysis of quantitative trait loci influencing variation in anxiety-related behavior in laboratory mice. *Mamm.Genome* 15:69–76
- Tong, Q., Ouedraogo, R. e Kirchgessner, A.L. (2002). Localization and function of group III metabotropic glutamate receptors in rat pancreatic islets. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 282, E1324–E1333.
- Valentinuzzi VS, Kolker DE, Vitaterna MH, Shimomura K, Whiteley A, Low-Zeddies S, Turek FW, Ferrari EA, Paylor R, Takahashi JS. (1998). Automated measurement of mouse freezing behavior and its use for quantitative trait locus analysis of contextual fear conditioning in (BALB/cJ x C57BL/6J)F2 mice. *Learn Mem* 5:391–403.
- Vieira C. , Lima T.C.M. , Carobrez A.P. , Lino-de-Oliveira C. (2008). Frequency of climbing behavior as a predictor of altered motor activity in rat forced swimming test. *Neuroscience Letters* 445 170–173
- Villalba J.J , Catanese F, Provenza F.D, Distel R.A. (2011). Relationships between early experience to dietary diversity, acceptance of novel flavors, and open field behavior in sheep. *Physiology & Behavior* 105 181–187
- Wada, E., Shigemoto, R., Kinoshita, A., Ohishi, H. & Mizuno, N. (1998). Metabotropic glutamate receptor subtypes in axon terminals of projection fibers from the main and accessory olfactory bulbs: a light and electron microscopic immunohistochemical study in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 393, 493–504.
- Walker D.L, Davis M. (1997). Anxiogenic effects of high illumination levels assessed with the acoustic startle response in rats. *Biol Psychiatry* 1997;42:461–71
- Wallace K.J, Rosen J.B. (2000). Predator odor as an unconditioned fear stimulus in rats: elicitation of freezing by trimethylthiazo-line, a component of fox feces. *Behav Neurosci* ; 114: 912 – 922.
- Walsh, R.N., Cummins, R.A., (1976). The open field test: a critical review. *Psychol. Bull.* 83, 481–504.
- Watanabe, I.M.; Monte, B.G. & Peripato, A.C. Índícios de depressão pós-parto e suas relações genéticas em camundongos das linhagens SM/J, LG/J e intercrucamento F<sub>2</sub>. (2010) In:XXVIII Encontro Anual de Etologia e II Simpósio Latino-americano de Etologia da

UNIFAL-MG, Alfenas, MG-Brasil. XXVIII Encontro Anual de Etologia, Alfenas: Sociedade Brasileira de Etologia.

- Weber, E. M., and Olsson, I. A. S. (2008). Maternal behaviour in *Mus musculus* sp.: an ethological review. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 114, 1.
- Webster, A. B. and Hurnik, J. F. (1990). An ethogram of white Leghorn-typehens in battery cages. *Can. J. Anim. Sci.*, 70, 751–760.
- Wehner JM, Radcliffe RA, Rosmann ST, Christensen SC, Rasmussen DL, Fulker DW, Wiles M. (1997). Quantitative trait locus analysis of contextual fear conditioning in mice. *Nat Genet* 17:331–334.
- Welch JM, Lu J, Rodriguiz RM, Trotta NC, Peca J, Ding JD, Feliciano C, Chen M, Adams JP, Luo J, Dudek SM, Weinberg RJ, Calakos N, Wetsel WC, Feng G. 2007. Cortico-striatal synaptic defects and OCD-like behavior in SAPAP3 mutant mice. *Nature* 448:894–900
- Whitaker R.C. (2004). Mental health and obesity in pediatric primary care: a gap between importance and action. *Arch Pediatr Adol Med*:158: 826–8.
- Yoshikawa T, Watanabe A, Ishitsuka Y, Nakaya A, Nakatani N. (2002). Identification of multiple genetic loci linked to the propensity for “behavioral despair ” in mice. *Genome Res* 12:357 – 366

## ANEXO I



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
Comissão de Ética em Experimentação Animal  
Via Washington Luís, km. 235 - Caixa Postal 676  
Fones: (016) 3351.8109 / 3351.8110  
Fax: (016) 3361.3176  
CEP 13560-970 - São Carlos - SP - Brasil  
[propp@power.ufscar.br](mailto:propp@power.ufscar.br) - [www.propp.ufscar.br](http://www.propp.ufscar.br)

---

**Parecer N°. 018/2006****Protocolo n° 018/2006**

A Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos – CCEA/UFSCar, durante sua 8ª. Reunião, realizada no dia 19/09/2006, concluiu a apreciação ética do projeto de pesquisa **Bases Genéticas do Cuidado Materno: Uma visão detalhada** elaborado do por Andréa Cristina Peripato.

Conclusão: Projeto Aprovado

São Carlos, 26 de setembro de 2006.

  
Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto  
Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal