



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

**INFLUÊNCIAS DO SEXO E LINHAGEM NOS LIMIARES DA  
REAÇÃO DE DEFESA INDUZIDA PELA ESTIMULAÇÃO  
ELÉTRICA DA MATÉRIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL DE  
RATOS**

*Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas*

**RANER MIGUEL FERREIRA PÓVOA**

*Orientador:*

**PROF. DR. LUIZ CARLOS SCHENBERG**

*Vitória, ES*

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

Povoa, Raner Miguel Ferreira

Título: INFLUÊNCIAS DO SEXO E LINHAGEM NOS LIMIARES DA REAÇÃO DE DEFESA INDUZIDA PELA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DA MATÉRIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL DE RATOS.

Raner Miguel Ferreira Póvoa – Vitória, 2003.

Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Centro Biomédico, Universidade Federal do Espírito Santo.

Orientador: Prof. Dr. Luiz C. Schenberg

1. Reação de defesa, 2. Matéria cinzenta periaquedutal, 3. Genética, 4. Sexo, 5. Rato Wistar, 6. Rato SHR, 7. Rato Selvagem.

**INFLUÊNCIAS DO SEXO E LINHAGEM NOS LIMIARES DA REAÇÃO DE  
DEFESA INDUZIDA PELA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DA MATÉRIA  
CINZENTA PERIAQUEDUTAL DE RATOS.**

**RANER MIGUEL FERREIRA PÓVOA**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro Biomédico da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Fisiológicas.**

---

**Prof. Dr. Luiz Carlos Schenberg – UFES  
Orientador**

---

**Prof. Dr. André de Avila Ramos - UFSC**

---

**Prof. Dr. Henrique de Azevedo Futuro-Neto - UFES**

---

**Profa. Dra. Ester Miyuki Nakamura Palacios – UFES  
Coordenadora do PPGCF**

**Vitória, 17 de Dezembro de 2003**

## AGRADECIMENTOS

Aos Professores Doutores Henrique de Azevedo Futuro-Neto e Luiz Carlos Schenberg pela confiança depositada em mim logo que ingressei no Programa de Pós-Graduação, ainda como Estagiário de Aperfeiçoamento, e que, apesar de meus erros, tiveram paciência e confiança em continuar me orientando.

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

Ao Professor Doutor André de Avila Ramos e à Professora Doutora Rosana Suemi Tokumaru. Suas sugestões foram valiosas.

Ao colega Athelson Stefanon Bittencourt, pela convivência nestes últimos anos, colaborando de forma decisiva em vários momentos do trabalho experimental, bem como em outros momentos.

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

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

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

Ao amigo Edson Dias e o bioterista da EMESCAM Valdez Lopes, que auxiliou-nos na captura de ratos selvagens.

Aos irmãos Walter e Hermes Bresciani, que que abriram as portas de sua granja para a captura da maior parte dos ratos selvagens, e cuja hospitalidade e espírito amigável amenizaram a árdua tarefa do Orientador.



"Ai de mim!", disse o rato, – "o mundo vai ficando dia a dia mais estreito".  
"Outrora, tão grande era que ganhei medo e corri, corri até que finalmente fiquei contente por ver aparecerem muros de ambos os lados do horizonte, mas estes altos muros correm tão rapidamente um ao encontro do outro que eis-me já no fim do percurso, vendo ao fundo a ratoeira em que irei cair". "Mas o que tens a fazer é mudar de direção", disse o gato, devorando-o.

Franz Kafka (Fábula Curta)

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	1
1.1 FUNDAMENTOS ETOLÓGICOS DA HEREDITARIEDADE DO COMPORTAMENTO .....	1
1.2 OS COMPORTAMENTOS DE DEFESA.....	12
1.3 DETERMINANTES SEXUAIS DO COMPORTAMENTO.....	15
1.4 GENÉTICA DO COMPORTAMENTO.....	20
1.5 MATÉRIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL.....	28
1.6 INTEGRAÇÃO FUNCIONAL DA MCPA.....	32
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	39
<b>3. MATERIAIS E MÉTODO.....</b>	40
3.1 ANIMAIS.....	40
3.1.1. <i>Ratos Wistar.....</i>	40
3.1.2. <i>Ratos Espontaneamente hipertensos.....</i>	42
3.1.3 <i>Ratos Selvagens.....</i>	42
3.1.4 <i>Ratos Híbridos.....</i>	44
3.1.5 <i>Ratos Selvagens nascidos no biotério.....</i>	45
3.2 ELETRODO.....	47
3.3 CIRURGIA.....	47
3.3.1. Ratos Wistar Machos, Fêmeas e Espontaneamente hipertensos...	47
3.3.2. Ratos Selvagens.....	49
3.4 ESTIMULAÇÃO INTRACRANIANA.....	51
3.5 REGISTROS COMPORTAMENTAIS.....	52
3.6 TESTE DO CORREDOR.....	54
3.7 LABIRINTO-EM-CRUZ ELEVADO.....	56
3.8 TESTE DA ARENA.....	57
3.9 ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	59
3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	60
3.10.1 <i>Análise das variáveis contínuas (testes da arena, corredor e LCE.....</i>	60
3.10.2 <i>Análise das variáveis binárias (ajustes de curvas de probabilidades e respostas).....</i>	60
<b>4. RESULTADOS.....</b>	63
4.1 LOCALIZAÇÃO DOS SÍTIOS ESTIMULADOS.....	63
4.2 DIFERENÇAS COMPORTAMENTAIS ENTRE RATOS SELVAGENS, CAPTURADOS ADULTOS, E OS RATOS WISTAR, SELVAGENS E HÍBRIDOS, JOVENS E ADULTOS, CRIADOS NO BIOTÉRIO.....	66
4.2.1 <i>Exploração da arena de ratos machos Selvagens, capturados adultos, com ratos machos, jovens e adultos, criados em biotério, das linhagens Wistar, SHR, Selvagens e Híbridos Wistar/selvagens .....</i>	66
4.2.2 <i>Comportamento exploratório e defensivo, no teste do corredor, de ratos Selvagens machos, capturados em idade adulta, e de ratos machos, jovens e adultos, criados em biotério, das linhagens Wistar, SHR, Selvagens e Híbridos Wistar/ selvagens .....</i>	69
4.2.3 <i>4.2.3 Desempenho dos ratos machos, adultos, Wistar e SHR no labirinto-em-cruz elevado.....</i>	70
4.3 EFEITOS DO SEXO E LINHAGEM SOBRE OS LIMIARES DA REAÇÃO DE DEFESA INDUZIDA POR ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DA MCPA.....	72

4.3.1	<i>Comparação dos limiares da reação de defesa dos grupos Wistar Macho, Wistar Fêmea e SHR .....</i>	72
4.3.2	<i>Comparação dos limiares da reação de defesa dos grupos Wistar Macho, Wistar Macho após éter e Selvagem após éte.....</i>	77
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>81</b>
5.1	COMPORTAMENTO DAS LINHAGENS NA ARENA, CORREDOR E LCE..	81
5.2	LIMIARES DAS RESPOSTAS DE DEFESA INDUZIDAS POR ESTIMULAÇÃO DA MCPA NOS RATOS WISTAR MACHOS, WISTAR FÊMEAS E ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS.....	85
5.3	LIMIARES DAS RESPOSTAS DE DEFESA INDUZIDAS POR ESTIMULAÇÃO DA MCPA NOS RATOS WISTAR MACHO, WISTAR MACHO APÓS ÉTER E RATOS SELVAGENS .....	87
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>90</b>
<b>7.</b>	<b>RESUMO.....</b>	<b>92</b>
<b>8.</b>	<b>ABSTRACT.....</b>	<b>96</b>
<b>9.</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>100</b>
<b>10.</b>	<b>APÊNDICES .....</b>	<b>113</b>

## FIGURAS

Figura 1	Construção de um ninho por uma rata Wistar.....	7
Figura 2	Níveis de investigação da variabilidade genética do funcionamento cerebral .....	24
Figura 3	Resposta de imobilidade do rato.....	29
Figura 4	Coluna neuronal dorsolateral da MCPA.....	30
Figura 5	Coluna neuronal dorsomedial da MCPA.....	31
Figura 6	Colunas neuronais lateral e ventrolateral da MCPA.....	32
Figura 7	Comportamentos agressivos induzidos por estimulação química do hipotálamo.....	35
Figura 8	Ratos Wistar em gaiolas de polipropileno do biotério central e em gaiolas de vidro do laboratório.....	40
Figura 9	Gráfico ilustrativo do crescimento dos ratos Wistar e F01. As medidas referem-se a um indivíduo de cada linhagem.....	41
Figura 10	Rato selvagem em idade adulta ( <i>Rattus norvegicus sp</i> ).....	43
Figura 11	Gaiola anti-fuga para os ratos selvagens, com a seta em vermelho indicando as molas de proteção.....	44
Figura 12	Caixa de manutenção dos ratos selvagens, com assoalho forrado por palha e a toca-ninho para acomodação e criação ao fundo. Projeto básico de construção da toca-ninho.....	45
Figura 13	Criadouro de ratos selvagens especialmente projetado para reduzir ao máximo a luminosidade e os ruídos externos, evitando altos níveis de estresse nos animais.....	46
Figura 14	Crânios dos ratos mostrando os pontos de fixação dos parafusos para ancoragem da prótese de acrílico e a prótese e o tubo de proteção.....	48
Figura 15	Anestesia do rato selvagem: indução parcial com éter e indução profunda com hidrato de cloral.....	49
Figura 16	Cirurgia estereotáxica do rato selvagem.....	50
Figura 17	Montagem experimental para ratos Wistar e ratos selvagens. A seta vermelha no canto superior direito da figura direita indica a tampa da arena para a estimulação intracraniana dos ratos selvagens.....	52
Figura 18	Teste do corredor, no qual utilizou-se marcas e numerações no chão e uma barreira de isopor.....	55
Figura 19	Labirinto-em-cruz elevado.....	57
Figura 20	Assoalho da arena, de 50 cm de diâmetro, mostrando as divisões do anel periférico e do círculo interno.....	58
Figura 21	Sítios da MCPA cuja estimulação induziu as respostas defensivas nos ratos Wistar machos, Wistar fêmeas e SHR.....	64
Figura 22	Sítios da MCPA cuja estimulação induziu as respostas defensivas nos ratos Wistar machos, Wistar machos com éter e ratos selvagens.....	65

Figura 23	Exploração da arena de ratos machos selvagens, capturados adultos, com ratos machos, jovens e adultos, criados em biotério, das linhagens Wistar, SHR, selvagens e híbridos Wistar/selvagens.....	68
Figura 24	Comportamento exploratório e defensivo, no teste do corredor, de ratos machos selvagens, capturados em idade adulta, e de ratos machos, jovens e adultos, das linhagens Wistar, SHR, selvagens e híbridos Wistar/selvagens, criados em biotério.....	70
Figura 25	Desempenho dos ratos machos, adultos, Wistar e SHR no labirinto-em-cruz elevado.....	71
Figura 26	Curvas de probabilidade de resposta dos comportamentos de defesa produzidos por pulsos senoidais aplicados à MCPA dos ratos WM, WF e SHR.....	75
Figura 27	Intensidades medianas dos comportamentos de defesa produzidos por pulsos senoidais aplicados à MCPA dos ratos WM, WF e SHR.....	76
Figura 28	Curvas de probabilidade de resposta dos comportamentos de defesa produzidos por pulsos senoidais aplicados à MCPA dos ratos WM, WME e SEL.....	79
Figura 29	Intensidades medianas dos comportamentos de defesa produzidos por pulsos senoidais aplicados à MCPA dos ratos WM, WME e SEL.....	80

**TABELAS**

Tabela 1	Etograma do rato na ausência ou presença da estimulação elétrica da MCPA dorsal.....	53
Tabela 2	Localização dos eletrodos dos distintos grupos segundo as colunas da MCPA.....	63
Tabela 3	Exploração periférica e central da arena com relação à idade e linhagem dos ratos.....	67

**APÊNDICES**

Apêndice 1	PLANILHA DE REGISTRO DOS ITENS COMPORTAMENTAIS OBSERVADOS DURANTE SESSÕES DE ESTIMULAÇÃO COM VARIAÇÃO DA INTENSIDADE DE UM PULSO SENOIDAL NOS DIFERENTES RATOS .....	113
Apêndice 2	PLANILHA DE REGISTRO DAS FREQUÊNCIAS RELATIVAS (FR) E ACUMULADAS (FA) DE UM ÍTEM COMPORTAMENTAL .....	114
Apêndice 3	PLANILHA de registro DO DESEMPENHO DOS RATOS NO LABIRINTO-EM-CRUZ-ELEVADO E NO SETOR CENTRAL DA ARENA .....	115

## ABREVIATURAS

F01 – Primeira geração de ratos híbridos nascidos no biotério

G01 – Primeira geração dos ratos selvagens puros nascidos no biotério

LEW – Ratos Wistar Lewis

MCPA – Matéria cinzenta periaquedutal

MCPAdl - Matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral

MCPAdm - Matéria cinzenta periaquedutal dorsomedial

MCPAltl - Matéria cinzenta periaquedutal lateral

MCPAvl - Matéria cinzenta periaquedutal ventrolateral

NMDA - ácido n-metil-D-aspártico

SEL - Ratos selvagens

SHR – Ratos espontaneamente hipertensos

WISf - Ratos Wistar fêmeas

WKY – Ratos Wistar Kyoto

WISm – Ratos Wistar machos

WISmE - Ratos Wistar machos estimulados 1 h após a anestesia com éter

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. FUNDAMENTOS ETOLÓGICOS DA HEREDITARIEDADE DO COMPORTAMENTO

A teoria de Darwin enfatizou que a evolução resulta da seleção natural que opera sobre as características do organismo – estruturas, coloração, comportamento – que têm significado adaptativo/funcional. Por exemplo, as águias possuem fortes garras e bicos afiados que lhes permitem capturar e comer a presa; as lagartas possuem cor verde que reduz sua visibilidade em seu meio ambiente; as fêmeas de camundongos constroem ninhos para manter as ninhadas aquecidas e protegidas (Carlson, 2001). Assim, além da estrutura característica, as espécies herdam o comportamento que permite a sua adaptação ao meio, dada a constância do meio. Segundo Darwin (1872), os padrões comportamentais são tão confiáveis e conservados nas espécies quanto as formas dos ossos, dentes ou qualquer outra estrutura corporal. Existem semelhanças hereditárias entre comportamentos que unem os membros de uma espécie, gênero e até unidades taxonômicas maiores, da mesma maneira como o fazem as características estruturais. Assim, Darwin mostrou como as alterações corporais de seres humanos na surpresa, espanto, medo e horror, apresentam semelhanças interessantes com respostas comportamentais de outras espécies. Por exemplo, homens e animais assustados por algo inesperado ou desconhecido, abrem mais os olhos possibilitando o aumento o campo visual. Aparentemente, a ampliação do campo visual para melhor avaliação da situação inesperada. A adaptação dos

padrões comportamentais do organismo ao meio ocorre de maneira semelhante à dos seus órgãos, isto é, mediante modificações que a espécie acumulou ao longo de sua evolução, pelos processos de seleção e mutação (Lorenz, 1995).

O desenvolvimento da etologia clássica ao longo da metade do século XX baseou-se nos princípios a cima, enunciados por Darwin. Em particular, os primeiros etologistas se ocuparam com o repertório comportamental que aparenta uma independência praticamente completa de qualquer forma de aprendizado e que foram denominados por eles de “coordenação herdada” (*Erbkoordination*), “padrões de ação fixa” (*fixed action pattern*) ou “movimentos instintivos” (*instinctive movements*) (Lorenz e Tinbergen, 1938 apud; Eibl-Eibesfeldt, 1975). Da mesma forma que as características morfológicas, estes padrões teriam cunho eminentemente hereditário. O principal indicativo deste caráter era a forma destes comportamentos e sua distribuição taxonômica. O presente estudo é uma investigação neurofisiológica sobre as influências da linhagem e sexo em tais padrões de ação dos comportamentos de defesa de ratos, averiguando se realmente tem caráter “fixo” ou não, caso haja diferenças entre linhagens e, portanto, entre indivíduos.

Conforme afirmou Konrad Lorenz, na primeira metade do século XX, o padrão de ação fixa mostra, de espécie para espécie e de gênero para gênero, diferenças e semelhanças que coincidem estritamente com aquelas dos caracteres morfológicos. Estes padrões motores foram exaustivamente estudados no comportamento de corte em pombos (*Columbidae*) e aves aquáticas (*Anatidae*), executados monotonamente e com a mesma intensidade. Tais

observações os levaram à concluir que realmente existe uma “homologia” para padrões de comportamento.

Embora sem se deter sobre os substratos fisiológicos específicos, Lorenz (1995) ressaltou a existência de três funções nos padrões de ação fixa. Primeiro, a “função condutora” que leva o organismo à procura de uma situação-estímulo determinada. Por exemplo, certos mamíferos, desde o nascimento, trabalham incessantemente em busca da mama (Eibl-Eibesfeldt, 1975). Note-se que este comportamento inicia-se na ausência de qualquer estímulo desencadeador, afastando a possibilidade de um mecanismo reflexo. A segunda função consiste no “reconhecimento inato” da situação-estímulo. Citando Heinroth, Lorenz (1995) descreve a “impressão inesquecível” da observação de um gavião inexperiente, criado em cativeiro, capturando um faisão em pleno ar. Por fim, a terceira função relaciona-se à execução de uma atividade motora inata, perfeitamente adaptada à situação, tal como já foi exemplificada nos comportamentos acima.

Sistemas comportamentais integrando estas três funções são bastante comuns na natureza e podem ser identificados nos chamados “atos ou movimentos intencionais” que precedem a execução completa de um padrão de ação fixa. Por exemplo, o início do vôo do gavião é precedido por meneios com a cabeça e pescoço e locomoção com a alternância das patas, presumivelmente, com funções de orientação (função condutora). Segue-se a preparação para o salto levando, inclusive, à abertura parcial das asas (seleção de resposta específica). Segundo Lorenz (1995), a capacidade de reconhecer estas insinuações é indispensável para o prognóstico do comportamento que se segue.

Seitz (apud, 1941) realizou o primeiro estudo detalhado da excitação progressiva que desencadeia as etapas de um padrão de ação fixa complexo. Este autor estudou o comportamento agonístico de um ciclídeo macho do gênero *Haplochromis*. Inicialmente, o peixe responde ao agonista estirando as barbatanas medianas e assumindo sua coloração nupcial. A seguir, aproxima-se do objeto, que pode ser um modelo artificial ou um rival vivo, aumentando o seu contorno pela apresentação do flanco ou abertura das guelras. Estas mudanças posturais podem ser explicadas pelo recrutamento de unidades progressivas do sistema nervoso. Com o aumento da excitação, o peixe muda repentinamente de orientação, abandonando a postura rígida e posicionando-se transversalmente com a finalidade de morder ou golpear. Ato seguido, o peixe abre a boca, projetando os dentes para a frente, e morde o adversário. Estes padrões motores são conectados por transições graduais, presumivelmente, devidas ao recrutamento cada vez maior de unidades do sistema nervoso, principalmente, do sistema motor.

Alguns padrões de ação fixa estão presentes desde o nascimento do animal, possibilitando ao filhote andar, beber água, sugar, sacudir as penas quando estiver molhado, ou se encolher quando sente frio. Outros padrões não estão plenamente desenvolvidos no momento do nascimento, mas assumem formas mais complexas, aparecendo tardiamente no desenvolvimento do animal. Por exemplo, os movimentos de corte dos patos requerem a ação dos hormônios sexuais. Neste caso diz-se que o instinto sofreu uma “maturação” (Immelmann, 1983).

Os padrões de ação fixa podem ocorrer em graus variados de complexidade, compreendendo movimentos simples e transientes, ou ações complexas e ritualizadas. Embora alguns padrões motores estejam correlacionados à intensidade da estimulação, padrões que têm uma função sinalizadora e que, portanto, não podem ser ambíguos, ocorrem segundo a “lei do tudo-ou-nada” (Lorenz, 1995). O mesmo pode ser dito dos padrões defensivos de congelamento, trote, galope, saltos e ataque que são eliciados por distâncias críticas entre predador e presa (Blanchard *et al.*, 1990). Relatos anteriores de nosso laboratório mostraram que a seqüência natural destas respostas também pode ser eliciada por estimulação intracraniana de áreas específicas do cérebro (Sudré *et al.*, 1993, Schenberg *et al.*, 2001).

Por fim, os padrões fixos de ação são independentes do custo ou sucesso de sua execução, não valendo as leis do reforço. Por exemplo, Melchers (1963) demonstrou que quando uma aranha é colocada em uma teia já pronta, ela despreza esta teia e constrói outra, independentemente do esforço que será despendido na nova tarefa. No entanto, experimentos de predação com animais criados em isolamento, ou seja, que nunca tiveram contato algum com suas presas, demonstraram que existe uma interação entre padrões inatos de perseguição e captura da presa, com componentes aprendidos, tais como a mordida fatal (*killing bite*) que vários predadores desferem na nuca ou crânio de suas presas. Nestes casos, Eibl-Eibesfeldt (1961) demonstrou que o aprendizado depende do sucesso da mordida. Assim, enquanto os furões (*Putorius putorius L.*) bem-sucedidos, que desferiram as primeiras mordidas no dorso ou pescoço do rato, aprenderam a mordida fatal em cerca de 20 segundos, os furões mal-

sucedidos, que morderam primeiramente a cauda ou a pata, permitindo que o rato revidasse, demoraram cerca de 15 minutos para aprender a mordida fatal, ou mesmo dias, como foi o caso do fracasso completo de um furão que foi mordido pelo rato na primeira tentativa. Eibl-Eibesfeldt (1961) também relata como os furões mordem em regiões cada vez mais próximas à nuca e pescoço, obtendo sucesso progressivamente maior no domínio da presa, sugerindo um processo de aprendizado por aproximações sucessivas. Temos a nova noção, então, de que o padrão motor, de características basicamente inatas, pode, portanto, ser aperfeiçoado no decorrer da interação entre o indivíduo e o seu meio, por exemplo, por aprendizagem.

A confirmação da existência de comportamentos essencialmente inatos foi demonstrada em experimentos com restrição ambiental, nas quais o animal é criado em isolamento de estímulos específicos, evitando qualquer tipo de forma de aprendizado, baseada em seus semelhantes (imitação). Grohmann (apud, 1939) criou pombos em gaiolas tão pequenas que eles não conseguiam sequer abrir suas asas. Após um tempo em isolamento, ele soltou estes pombos e observou que voavam tão bem quanto os pombos do grupo controle. O mesmo já havia sido observado por Spalding (1873) em seu clássico experimento com andorinhas. Lindauer (apud, 1952) também demonstrou que abelhas de colméias isoladas, após serem soltas, desenvolvem o ritual de dança ao redor da colméia da mesma forma que as abelhas criadas em liberdade. Bentley e Hoy (1974) estudaram o padrão sonoro inato dos grilos, constatando que independentemente das diferentes condições de temperatura, dieta, ciclo de luz, período do ano e densidade populacional, os grilos sempre produziam padrões sonoros

correspondentes ao seu genótipo. Por fim, Lorenz (apud, 1963) observou que ratas Wistar, mesmo criadas em isolamento, construía seus ninhos de forma normal com as matérias-primas oferecidas, desde que as ratas não fossem trocadas de gaiolas cujo território era seu domínio (Figura 1). Tais observações confirmam a existência de um padrão básico de comportamento de cunho inato. Estes comportamentos aperfeiçoam-se durante o desenvolvimento dos indivíduos, da mesma linhagem ou não.

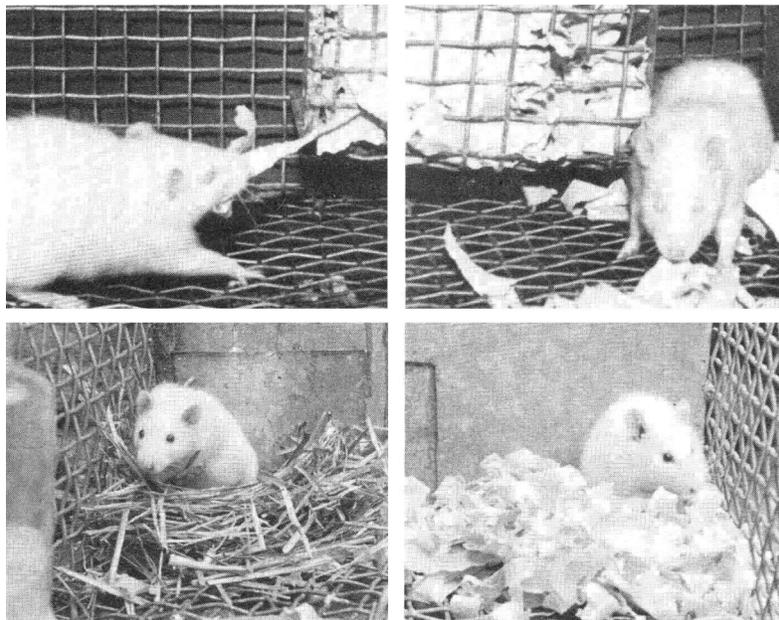


Figura 1. Construção de um ninho por uma rata Wistar (Eibl-Eibesfeldt, 1958).

Contudo, os padrões fixos freqüentemente ocorrem com movimentos superpostos de orientação, chamados “componentes táxicos” ou, simplesmente, “taxias”, que dependem de estímulos ambientais. O exemplo clássico é o comportamento de rolar ovos dos gansos (Lorenz e Tinbergen, 1938). Os gansos arrastam o ovo de costas para o ninho, corrigindo a posição do mesmo com

movimentos laterais do bico. Uma vez iniciado, o comportamento apenas termina quando o ganso chega ao ninho. Entretanto, se o ovo for removido durante a execução do comportamento, o ganso continuará a “arrastá-lo” no vazio, porém, sem os movimentos laterais do bico. Assim, enquanto o movimento de costas em direção ao ninho é um padrão de ação fixa, os movimentos laterais são componentes táxicos que dependem dos estímulos ambientais. Note-se, por outro lado, que as taxias também são inatas. Da mesma forma que diferenciamos os padrões de ação fixa dos movimentos táxicos de orientação, devemos diferenciar os estímulos liberadores (*releasing stimuli*) de padrões de ação fixa dos estímulos de orientação destes padrões. Pela incorporação destes componentes táxicos os padrões de ação fixa adquirem maior flexibilidade e variabilidade, permitindo a adaptação apropriada a cada situação. A unidade dos padrões de ação fixa e das taxias é a base da atividade instintiva (Eibl-Eibesfeldt, 1975).

Segundo Eibl-Eibesfeldt (1975), se a adaptação ocorrer ao nível motor, serão gerados os padrões fixos de comportamento. No entanto, se a adaptação ocorrer no estímulo-chave que elicia um determinado comportamento específico, altera-se o aspecto inato dos mecanismos de aprendizado e motivação.

Pesquisas sobre a genética do comportamento desenvolveram várias formas de testar a hipótese sobre a base genética das diferenças comportamentais entre indivíduos (Alcock, 2001). Os resultados destas pesquisas baseiam-se em comparações entre parentes, particularmente, gêmeos dizigóticos e monozigóticos. Outras evidências estão sendo obtidas graças à manipulação de genes, criando linhagens diferentes de animais de laboratório. Neste caso, a maioria dos experimentos comparou diferentes linhagens de camundongos

modificados geneticamente. Por exemplo, camundongos nos quais anulou-se (*knockout*) o gene que codifica a quinase da calmodulina envolvida no desenvolvimento do hipocampo apresentaram desempenhos inferiores em testes de memória espacial (Silva *et al.*, 1992). Também demonstrou-se que a anulação do gene *fos-B* em camundongos resulta em fêmeas que, embora completamente normais em outros aspectos, são totalmente “indiferentes” à suas crias (Brown *et al.*, 1996). Acredita-se que a modificação deste gene leva a alterações de circuitos neurais, resultando experiências sensoriais diferentes, especialmente no que diz respeito ao estímulo olfativo eliciado pelos filhotes.

Alguns conceitos da etologia clássica, por exemplo, a dicotomia entre ‘inato’ e ‘adquirido’ têm sido recentemente criticados. O cerne da crítica afirma que não existem comportamentos puramente inatos, pois jamais podemos descartar a influência do ambiente, seja durante a gestação (fatores epigenéticos), seja durante o desenvolvimento pós-natal do indivíduo (Broom, 1981, McFarland, 1986). Em realidade, a crítica não faz mais que reviver o velho debate entre etologistas e behavioristas (Kuo 1932, 1967). Parte do problema refere-se aos conceitos mesmos de ‘inato’ e ‘adquirido’. Definir comportamento adquirido (ou aprendido) como as respostas que foram incorporadas nos períodos tardios do desenvolvimento do indivíduo não é suficiente, pois muitos comportamentos requerem maturação corpórea ou hormonal, tal como ocorre na locomoção de humanos ou nos comportamentos sexuais de várias espécies, que só emergem na puberdade. Por outro lado, a questão da influência ambiental também deve ser discutida adequadamente. Apesar do radicalismo que permeou a disputa teórica entre etologistas e behavioristas na primeira metade do século passado, a

maioria dos etologistas contemporâneos não oferece resistência à idéia de que os comportamentos inatos sejam influenciados pelo ambiente. Por exemplo, diferentemente dos mamíferos, no quais o sexo é determinado por um gene específico no braço curto do cromossomo Y, o sexo de alguns répteis é determinado pela temperatura de incubação, um fator inequivocamente ambiental. Aparentemente, a temperatura alteraria a expressão gênica de enzimas e receptores para hormônios esteróides que determinariam o sexo do indivíduo (Crews, 1996). Note-se, no entanto, que mesmo neste caso o estímulo ambiental age sobre uma informação pré-existente do genoma da espécie. Neste sentido, até mesmo a suscetibilidade destes genes à temperatura de incubação já está pré-codificada no genoma da espécie. Note-se, por outro lado, que neste caso o comportamento sexual será o resultado secundário do dimorfismo sexual promovido pela temperatura de incubação durante o desenvolvimento do organismo. Contrariamente, desde os estudos clássicos de Eibl-Eibesfeldt (1961) sobre a influência do ambiente no comportamento de construção de ninhos em roedores, sabe-se que os comportamentos inatos de animais adultos também podem ser modificados por influência direta dos estímulos ambientais. Portanto, enquanto no primeiro caso a temperatura promoveu alterações fenotípicas somáticas e dos circuitos cerebrais (*hardware*) que resultaram em comportamentos sexuais específicos, no segundo caso, a modificação da construção de ninhos sob diferentes situações ambientais foi similar à utilização de '*softwares*' distintos num mesmo computador.

A discussão entre 'inato' e 'adquirido' raramente é colocada quando se trata de comportamentos complexos de espécies inferiores como os insetos. Muitos

insetos levam vidas quase totalmente solitárias. Por exemplo, as vespas Mason (gênero *Manobia*) são incubadas em células construídas em caules ôcos de plantas. Após o estágio pupal, a fêmea emerge de sua célula e tem um breve momento de interação com o macho. Após isto ela viverá por si mesma. Ela selecionará um caule ôco e construirá uma partição com barro misturado com saliva. Então desovará no fundo da célula e, em seguida, caçará larvas que serão levemente paralizadas com seu veneno e transportadas à célula de incubação. Após o armazenamento de 5-8 larvas, a célula será selada. O procedimento será repetido até a construção de 8-10 células contíguas. A fêmea tem poucas semanas de vida solitária para realizar esta elaborada série de padrões comportamentais. Estes comportamentos pré-estabelecidos, que não requerem aprendizado apresentam vantagens óbvias para animais que têm um tempo curto de vida e quase nenhum contato com outros membros de sua espécie. Conforme ressaltam alguns autores, a vespa não poderia executar um plano tão estrito se ela tivesse de adquirir estes comportamentos a partir do zero, por tentativa e erro (Cooper, 1957). O problema inato-aprendido toma vulto quando se trata de vertebrados superiores, particularmente, aves e mamíferos. Em particular, devido à longevidade de várias espécies, o aprendizado possibilita a aquisição de um amplo repertório. Demonstrou-se, no entanto, que vários comportamentos espécie-específicos de vertebrados superiores são expressos na presença de estímulos apropriados, em animais que foram criados em privação total destes estímulos (Eibl-Eibesfeldt, 1975). Estes 'experimentos de isolamento' ainda constituem-se na principal evidência da existência de comportamentos inatos nestas espécies. Portanto, independentemente de eventuais influências

ambientais, os comportamentos inatos constituem o repertório espécie-específico adquirido ao longo da evolução pelos mesmos processos de mutação e seleção que conferem a estabilidade fenotípica. Em suma, sempre existirá uma informação genômica da espécie, portanto, inata, que determinará comportamentos igualmente ‘inatos’, suscetíveis ou não de modificações por estímulos ambientais.

## 1.2. OS COMPORTAMENTOS DE DEFESA

Os animais demonstram formas diversificadas de comportamentos defensivos. O que mantém o animal vivo no meio selvagem é o fato dele apresentar reações de defesa eficazes, em grande parte inatas, que entram em ação quando ele se depara com um fato súbito ou inédito (Bolles, 1970). Por “comportamento defensivo” entende-se o conjunto de atos e posturas que asseguram a sobrevivência do animal contra predadores.

Blanchard e Blanchard (1969a, 1970) estudaram dois principais tipos de reações defensivas em ratos Wistar. A imobilidade gerada por um estímulo doloroso e o comportamento de esquiva espécie-específica ao predador (gato). O rápido desenvolvimento destas reações defensivas demonstra sua importância vital para o indivíduo, representando “reações defensivas espécie-específicas” (Bolles, 1970). Blanchard *et al.* (1969a) demonstraram que um choque nas patas de curta duração produz grandes alterações no comportamento do rato, destacando-se uma postura de “agachamento”, seguida por imobilidade, que era bastante intensa após o choque, diminuindo horas depois do estímulo.

A imobilidade parece ser um componente defensivo comum em diversas espécies, de insetos a antílopes de pequeno porte. Como os predadores têm limiares mais baixos para alvos em movimento, permanecer parado e, talvez, escapar à atenção do predador, parece ser uma tática de defesa apropriada a uma ameaça distante (Gray, 1991). Estas respostas têm grande eficiência como forma de camuflagem no escuro. Nesta situação, a imobilidade reduz a visibilidade da presa, assim como os ruídos que servem de pistas para aves noturnas de rapina que localizam suas presas pelo som, tais como as “corujas de celeiro” (*barn owl*) (Konishi, 1995). Finalmente, a imobilidade também auxilia a manter a presa no abrigo, longe dos predadores (Blanchard *et al.*, 1991). A imobilidade (ou congelamento) é freqüentemente acompanhada pela abertura total das pálpebras e protusão do globo ocular, ampliando o campo visual e facilitando a entrada de luz). As respostas de imobilidade e fuga na dor e no confronto entre rato e gato foram estudadas em detalhe por Blanchard e Blanchard (1969b, 1971). Quando utilizaram o gato como estímulo, a resposta dominante era a fuga. No entanto, quando o estímulo era a dor, ambas as respostas ocorriam com a mesma freqüência.

O rato apresenta vários comportamentos de defesa, tais como, imobilidade tensa (“*freezing behavior*”), trote, galope e saltos, dependendo da situação em que este se encontra (Blanchard, 1991). Por sua vez, o gato defende-se por meio da fuga ou de ataques precedidos de uma postura imóvel, arqueamento do dorso, retração auricular, silvar, exposição de garras e presas, piloereção e midríase (Blanchard e Blanchard, 1977; Adams, 1979).

Blanchard e Blanchard (1989) utilizaram um engenhoso labirinto de tocas de acrílico (*visible burrow*) que possibilitava a observação do comportamento dos ratos no interior das tocas e que comunicava-se com um “pátio” externo. Com este dispositivo estudaram o comportamento de defesa do rato em diferentes situações, por exemplo, contra um macho rival dentro das tocas, ou em resposta a um gato que era periodicamente colocado no pátio do labirinto. Confirmando estudos anteriores sobre a relação entre estímulos específicos e comportamentos eliciados, Blanchard e Blanchard (1989) mostraram a diferença entre os comportamentos defensivos desencadeados por uma ameaça explícita, por exemplo, um gato colocado no pátio externo, e os comportamentos desencadeados por uma ameaça potencial, ou seja, os comportamentos do rato ao penetrar no pátio após a remoção do gato. Estes últimos foram denominados “avaliação de risco” (*risk assessment*) e caracterizam-se pela exploração “cautelosa” do ambiente, caracterizada pelo comportamento de “espreitar” com o rebaixamento do tronco e elevação da cabeça (*stretch attend*), esquadrinhamento e olfação. Na presença do gato, os ratos fogem ou permanecem imóveis dentro das tocas, às vezes por várias horas. Os autores sugerem que a avaliação de risco é um comportamento de obtenção de informações do ambiente que garantam sua exploração de forma segura.

Por outro lado, o padrão da agressão ofensiva entre membros de uma mesma espécie, por exemplo, observado na defesa territorial de gatos e ratos, caracteriza-se por reações de ameaças nas quais o animal assume uma postura lateral em relação ao oponente, piloereção, exposição de presas, mordidas na parte traseira do oponente e perseguições (Mos *et al.*, 1982). Nesta situação, o

padrão defensivo consiste em posturas submissas, acompanhadas de vocalizações audíveis, e ataques nos momentos mais críticos do confronto.

O fenômeno de “maturação” dos comportamentos inatos de defesa foi investigado nos experimentos clássicos de Hinde (1966). Conforme já pudemos observar em todos os ratos selvagens de nossos protocolos, as respostas de defesa ao predador estão ausentes nas primeiras semanas de vida. Após este período, independentemente da manipulação do animal, ele começa a reagir com extrema ferocidade. Presumivelmente, isto ocorre pela ativação de mecanismos neurais que ainda não estavam plenamente desenvolvidos no início da vida do rato, requerendo um período de maturação. Embora o medo de cobras em humanos seja inato, ele somente desenvolve-se após certa idade (Hinde, 1966). O período de maturação do medo de cobras em chimpanzés também não foi estabelecido com precisão. Estima-se, no entanto, que ele esteja plenamente amadurecido seis anos após o nascimento (Hebb, 1946). Dentre outros comportamentos relacionados ao medo, a esquiva dos lugares altos em gatos e homens (Eibl-Eibesfeldt, 1975) e a esquiva de estranhos em chimpanzés (Hebb, 1946), também requerem períodos de maturação. Por fim, o medo da escuridão em bebês começa a se expressar por volta dos dois anos de idade, atingindo maior intensidade aos cinco anos (Valentine, 1930).

### 1.3. DETERMINANTES SEXUAIS DO COMPORTAMENTO

Podemos classificar os comportamentos dos animais como sendo controlados por dois grandes sistemas: o sistema nervoso e o sistema endócrino.

Embora ambos funcionem em conjunto, estuda-se estes sistemas isoladamente para compreender as diferenças comportamentais devidas ao sexo (apud Dörner, 1972).

A remoção dos testículos em vários machos vertebrados investigados resultou numa perda enorme, se não total, dos comportamentos sexuais (Beach, 1961). Estes não desaparecem ao mesmo tempo. A habilidade para cópula é perdida primeiramente, sendo seguida pela redução dos outros comportamentos, como a corte.

A administração artificial de andrógenos também exerce uma influência determinante sobre o comportamento sexual masculino. Estes hormônios têm influências variadas nos comportamentos relacionados ao gênero, desde a alteração do canto em pássaros, até a reativação de comportamentos sexuais que foram abolidos em cães castrados (Beach, 1961). Os efeitos da testosterona são particularmente pronunciados nos animais jovens. Dentre estes, destacam-se o início do canto em aves com alguns dias de vida, e os primeiros comportamentos copulatórios de ratos, que ocorrem por volta de quatorze dias de idade. Imediatamente após a injeção da testosterona, cães machos jovens passam a apresentar o comportamento de urinar com “leve agachamento”, tal como o fazem os adultos. Efeitos similares podem ser obtidos em fêmeas. Por exemplo, canários fêmeas começam a cantar após o tratamento com testosterona (Alcock, 2001).

O aparecimento de padrões sexuais masculinos em fêmeas demonstra que embora os comportamentos masculinos e femininos sejam freqüentemente

expressos em ambos os sexos, somente um predomina, revelando o efeito antagonista de uma classe de hormônios sobre outra.

Em fêmeas, os efeitos das alterações hormonais são menos drásticos e mais confusos que nos ratos machos. Isto é verdade para o comportamento sexual, que surge instantaneamente ao invés do aparecimento gradual ao longo de dias ou meses. Em ratos e porcos, a administração de estradiol estimula apenas a primeira fase do comportamento sexual, sendo requerida a administração da progesterona para o seu completo desenvolvimento (Immelman, 1983). Em muitos casos, o efeito completo somente é assegurado quando estrógenos e andrógenos são administrados em uma ordem temporal específica e em dosagens ajustadas individualmente. Em contraste aos efeitos dos andrógenos, os hormônios sexuais femininos têm ações primariamente restritas a este sexo. Usualmente, não é possível eliciar comportamento sexual em machos pela administração de estrógenos (Immelmann, 1983).

De maneira geral, o sistema hormonal também atua sobre outros comportamentos. Contudo, estes comportamentos estão, de uma ou outra forma, envolvidos com a reprodução. O envolvimento destes hormônios nos comportamentos agressivos relacionados à reprodução, tal como a disputa pela fêmea e a defesa da prole, é especialmente marcante. Outro exemplo é a construção do ninho, que está inteiramente sobre controle hormonal. No entanto, os tipos de hormônios envolvidos dependem do sexo que irá construir o ninho. Se os machos controem o ninho, como é o caso de peixes do gênero *Gasterosteidae*, então o hormônio em ação será a testosterona. Se as fêmeas o constroem, os hormônios responsáveis serão os femininos. Todavia, o envolvimento destes

hormônios é variável. Assim, enquanto nos camundongos a construção do ninho é coordenada pela progesterona, nos papagaios do gênero *Agapornis* é coordenada pelos estrogênios. No hamster siberiano, o comportamento sexual é controlado por ambos os hormônios (Immelman, 1983).

Os estudos de Richter (1959) demonstraram que cães, raposas, martas, ratos, gatos, porcos-espinhos e galos têm grande relutância em copular em ambientes novos ou previamente associados à dor. Também têm relutância em copular na presença de animais hierarquicamente mais elevados.

Experimentos em ratos e galinhas demonstraram que os hormônios sexuais também podem influenciar no aprendizado. A influência dos hormônios adrenais sobre outros comportamentos foi constatada pelos estudos comparativos de ratos selvagens e de laboratório conduzidos por Richter (1959). De acordo com este autor, a domesticação do rato para propósitos científicos iniciou-se em 1959 (trezentas gerações). Dentre as várias pressões seletivas que devem ter operado neste processo (dieta, confinamento, etc.), a seleção pela redução da emocionalidade foi, sem dúvida, a principal. Comparado ao rato selvagem, o animal de laboratório tem menos medo do homem, sendo menos agressivo em relação ao homem e sua própria espécie (Gray, 1991).

Segundo Gray (1991), as observações de Richter são corroboradas pelo decréscimo das glândulas adrenais nos ratos de laboratório que apresentam a metade do peso das glândulas dos ratos selvagens. A menor eficiência das adrenais dos ratos de laboratório pode ser demonstrada de inúmeras maneiras. Como as adrenais são de importância vital para a conservação do sal do organismo, uma dieta com baixo teor de sal produz danos à saúde mais

acentuados nos ratos de laboratório que nos ratos selvagens. A maior dependência dos ratos selvagens com relação às adrenais é demonstrada pela morte destes animais imediatamente após a retirada das glândulas adrenais, enquanto esta parece não afetar os ratos de laboratório.

Ao contrário das fêmeas, os ratos machos da linhagem Maudsley de alta reatividade, são reconhecidos por sua reduzida atividade locomotora na arena, pela frequência maior de defecação, pela demora para se acostumar a um ambiente novo e pela imobilidade mais acentuada aos estímulos sonoros (Gray, 1991). Similarmente, o hamster dourado macho apresenta atividade locomotora mais reduzida. Diferenças sexuais também foram observadas em relação ao comportamento de esquiva na “caixa-de-vaivém” (*shuttlebox*), na qual as fêmeas tiveram um desempenho superior.

Um quadro geral começou a emergir associando o desenvolvimento do animal com as modificações endócrinas e cerebrais que resultam no dimorfismo sexual do comportamento (Gray, 1991). De início, existem os genes que especificam os testículos e a genitália masculina e os genes dos ovários e genitália feminina. Sob influências hormonais específicas, o cérebro do macho se desenvolve diferentemente do cérebro da fêmea. O sistema endócrino continua a agir e se diferenciar entre os sexos, envolvendo não só as gônadas, mas também a tireóide e outras glândulas. Ao longo deste desenvolvimento, surgem mecanismos neurais que controlarão os comportamentos masculino ou feminino, conforme o sexo do animal. Estes mesmos mecanismos talharão os comportamentos de cada sexo, por exemplo, determinando um nível relativamente mais elevado de medo e reatividade a estímulos estressores nos animais machos.

No caso do comportamento agonista, em termos gerais, os machos tendem a se tornar mais agressivos do que as fêmeas (Gray, 1991).

#### 1.4. GENÉTICA DO COMPORTAMENTO

A genética comportamental é a área de intersecção entre a genética e as ciências do comportamento (Ramos, 2001). Através da combinação dos métodos de ambas as ciências, a genética comportamental busca compreender os mecanismos genéticos, neurais e hormonais envolvidos em diversos comportamentos de homens e animais. Atualmente acredita-se que todo o comportamento depende, em maior ou menor grau, de fatores genéticos e ambientais, interagindo de maneira extremamente complexa. Os genes definem tendências que são moduladas pelas experiências individuais. Por outro lado, a expressão de todo o gene depende de certas condições externas (bioquímicas, fisiológicas ou físicas). Portanto, qualquer alteração externa pode influenciar o resultado final da interação gene-comportamento. Por fim, sabe-se que os comportamentos são influenciados por mais de um gene, aumentando a complexidade desta interação.

Embora as capacidades cognitivo-emocionais dos primatas sejam “superiores” às dos demais mamíferos (maior flexibilidade ao meio, maior complexidade neurofisiológica e grande semelhança aos seres humanos), os princípios básicos do sistema nervoso são idênticos. Contudo, o grau de complexidade torna-se muito maior nos humanos (Changeaux, 1985). Por outro lado, enquanto a interação entre gene e nicho ecológico origina as variações de

raça em homens e animais, podemos dizer que a interação entre o “temperamento” (fatores genéticos do comportamento) e ambiente familiar, ou social, determina o que chamamos “personalidade” em humanos. A influência dos fatores ambientais no desenvolvimento ontológico do comportamento também foi demonstrada em animais. Por exemplo, ratos que foram submetidos a um estresse neonatal, tal como a separação temporária da mãe, apresentam atividade exploratória reduzida numa arena (Gilad *et al.*, 2000). Similarmente, demonstrou-se que o isolamento acentua a agressividade entre camundongos machos geneticamente agressivos (Hoffmann *et al.*, 1993). Por outro lado, Fernandez-Teruel *et al.* (1997) observaram que a manipulação de ratos na infância reduz grande parte dos comportamentos relacionados à ansiedade.

O desenvolvimento de linhagens de animais com características comportamentais específicas tem sido utilizado pelo homem desde os tempos mais remotos, para os mais diversos fins, tais como, caça, pastoreio, trabalho rural, lazer, esportes, etc. No entanto, o desenvolvimento de linhagens específicas para o estudo do comportamento é muito mais recente. As linhagens romanas de ratos de alto e baixo desempenho de esquiva foram selecionadas ainda na década de 60 (Roozendaal, 1992). Dentre os estudos iniciais também há aquele de Broadhurst (1962, 1969), que desenvolveu linhagens de ratos com alta e baixa frequência de defecação quando expostos a um ambiente novo. Estas linhagens foram denominadas Maudsley-reativa e não-reativa. Além da resposta mais intensa de defecação, a linhagem reativa apresentou respostas reduzidas de exploração. Com base nestes e noutros índices, os autores concluíram que a linhagem Maudsley-reativa seria mais ‘emocional’, respondendo às situações

aversivas com graus acentuados de imobilidade (*freezing*) e defecação (Broadhurst, 1963, 1975). Estes ratos MAudsley-reativos também permanecem menos tempo nos braços abertos do LCE (Overstreet *et al.*, 1992).

Também foi demonstrado que os ratos reativos apresentam aumentos menores da frequência cardíaca à manipulação e exposição à arena (Harrington e Hanlon, 1966). Estudos análogos em camundongos mostraram que a linhagem ABP/Le é mais reativa a um ambiente novo que a linhagem C57BL/6By (Mathis *et al.*, 1995). Por fim, existem vários estudos que utilizam modelos genéticos de comportamentos relacionados à ansiedade (Peeler e Nowakowsky, 1987, Mathis *et al.*, 1995, Lamberty e Gower, 1996). Por exemplo, Lamberty *et al.* (1996) demonstraram diferenças nos comportamentos de exploração do labirinto em cruz elevado em duas linhagens de camundongos, NMRI e C57/BL10j. A última linhagem não apresentou exploração dos braços abertos. Por sua vez, a exploração dos braços abertos pela linhagem NMRI apresentou uma correlação positiva com a largura dos braços. Finalmente, utilizando um labirinto cujos braços fechados eram brancos e os abertos, cinzentos, demonstraram um aumento da locomoção dos camundongos C57/BL10j nos braços abertos, um comportamento que não é usual nesta linhagem no labirinto padrão.

Os efeitos do estresse também têm sido estudados em diferentes linhagens de ratos (Ramos e Mormède, 1998). Nestes estudos o “estresse” foi definido como a resposta do organismo a um estímulo ambiental (estressor) que produz alterações anormais do equilíbrio interno (homeostase). Os estressores, que são percebidos e avaliados por um sistema cognitivo/emocional, induzem uma variedade de mudanças neuroendócrinas, metabólicas e comportamentais. A

intensidade e a natureza da resposta depende das características individuais. Esta variabilidade individual tem sido demonstrada em várias espécies de animais e humanos, envolvendo diferentes aspectos da resposta do estresse (Benesová e Benes, 1970). Como a variabilidade é causada por fatores genéticos e ambientais, considera-se o estresse, assim como os demais comportamentos, mas em diferentes graus, uma resposta multidimensional.

A agressividade inter-específica também depende de fatores genéticos. Por exemplo, Cianarello (1974) demonstrou que as linhagens de camundongos BALB/cJ e BALB/cN diferem quanto ao comportamento de luta. Enquanto os machos da linhagem BALB/cJ atacam os machos intrusos imediatamente, os machos BALB/cN são pacíficos. Experimentos de criação cruzada mostraram que este tipo de agressividade não era causado por influência materna.

Outro comportamento bastante estudado em ratos e camundongos é a preferência ao álcool e suscetibilidade à dependência alcoólica. Williams *et al.* (1949) mostraram que grande parte da variabilidade subjacente a estes comportamentos tem origem genética. O mesmo estudo revelou diferenças entre linhagens quanto aos efeitos do álcool tanto em relação à duração do sono quanto na atividade locomotora. Particularmente, enquanto a atividade locomotora da linhagem de camundongos C27BI foi significativamente reduzida pelo álcool, a locomoção das linhagens suscetíveis BALB/c e C3H não se alterou ou foi aumentada, respectivamente (McClearn e Rodgers, 1972).

Os fatores genéticos podem influenciar o funcionamento do cérebro, bem como a resposta a hormônios e outros neurotransmissores (Figura 2). Por exemplo, demonstrou-se que os níveis das enzimas envolvidas no metabolismo

das catecolaminas - tirosina hidroxilase, dopamina- $\beta$ -hidroxilase, e feniletanolamina N-metiltransferase - eram duas vezes maior nas supra-renais dos camundongos combativos BALB/cJ quando comparados aos camundongos normais (Cianarello *et al.*, 1974). No mesmo sentido, demonstrou-se que os níveis de colinesterase de algumas áreas do cérebro são maiores em linhagens de ratos “inteligentes” (Krech *et al.*, 1954). A ação dos hormônios também depende dos genes. Assim, a exposição de fêmeas de camundongos BALB/cBY com quatro dias de vida a uma única dose de testosterona induz um comportamento agressivo que não foi observado na linhagem C57BL/6By, demonstrando que o efeito hormonal depende do genótipo (McClearn e Rodgers, 1972).

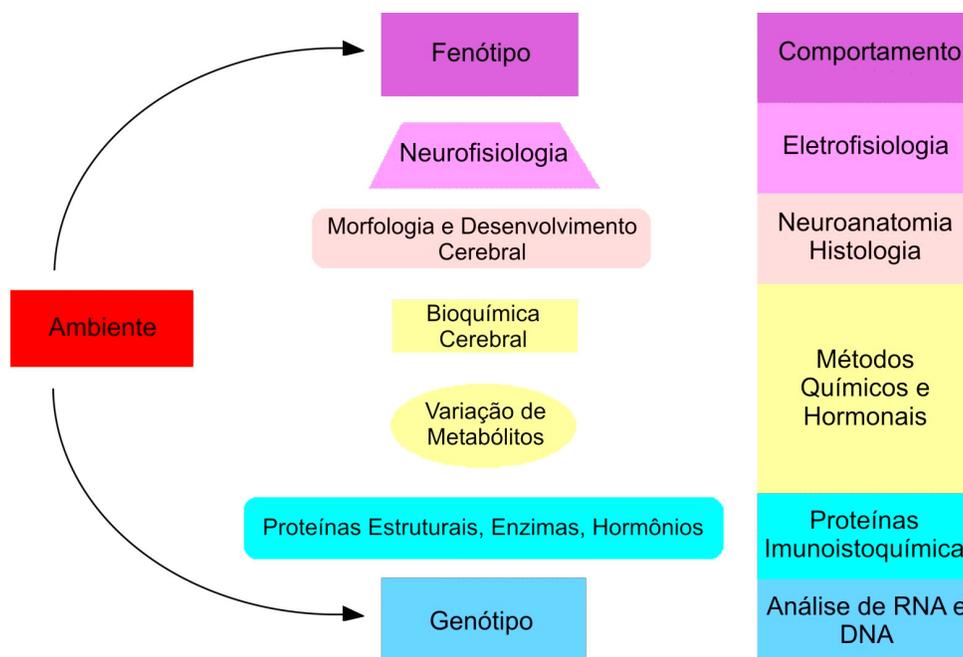


Figura 2. Níveis de investigação da variabilidade genética do funcionamento cerebral (modificado de Vogel e Motulsky, 2000).

Na Universidade de Kyoto, no Japão, foram desenvolvidas linhagens utilizadas no estudo da hipertensão essencial (Okamoto, 1963). Por apresentar

níveis elevados de pressão arterial, uma destas linhagens foi denominada 'ratos espontaneamente hipertensos' (SHR, *spontaneously hypertensive rats*) (McCarty, 1983). De maneira interessante, estes ratos também apresentaram diferenças enormes de comportamento. Assim, os ratos SHR reagem de forma mais ativa a um choque elétrico que os ratos Wistar Kyoto (WKY) da linhagem controle (McCarty *et al.*, 1978). Adicionalmente, quando colocados num ambiente com caixas-viveiro, os ratos SHR saem das caixas mais cedo e permanecem mais tempo explorando o ambiente que os ratos WKY (Knardahl e Sagvolden, 1979). Os SHR também apresentam aumentos maiores e mais duradouros dos níveis plasmáticos de adrenalina e noradrenalina, bem como aumentos maiores da frequência cardíaca e pressão arterial, a vários estressores (McCarty, 1983, Kirby *et al.*, 1989). Também foram observadas diferenças entre estas linhagens com relação à síntese, liberação e recaptação de catecolaminas no hipotálamo (Arita *et al.*, 1991). Oliveira *et al.* (1995) demonstraram um aumento da frequência de entradas nos braços abertos do LCE, bem como do tempo despendido em sua exploração, nos ratos SHR, tanto jovens, quanto adultos. Tais alterações comportamentais não foram alteradas pelo tratamento da hipertensão. Estes resultados sugerem que estes animais demonstram menor aversão ao braço aberto, presumivelmente, por serem menos "ansiosos". Por fim, vários autores demonstraram que, além dos ratos WKY, os ratos SHR também são menos ansiosos que os ratos Lewis (LEW) (Gentsch *et al.*, 1987, Kulikov *et al.*, 1997). No conjunto, os resultados acima sugerem que, embora mais reativos a alguns estressores, os SHR são aparentemente menos ansiosos.

As linhagens SHR e WKY fornecem uma notável ilustração de como um conjunto de traços fenotípicos pode ser geneticamente dissociado seguindo experimentos genéticos adequados. Por exemplo, demonstrou-se por meio de procedimentos seletivos que a hipertensão e a hiperreatividade dos SHR são geneticamente independentes. Mais ainda, demonstrou-se que a atividade locomotora em ambientes novos e os comportamentos relacionados à ansiedade no LCE também podem ser dissociados (Courvoisier *et al.*, 1996).

A natureza multidimensional da emocionalidade sugere que substratos biológicos distintos possam estar envolvidos no controle da “miríade fenotípica”, bem como da variação interindividual na percepção e/ou avaliação cognitiva de diferentes tipos de estímulos ambientais (Ramos e Mormède, 1998). Por exemplo, os ratos da linhagem BN respondem à novidade com respostas intensas de defecação, que são consideradas um índice de alta ‘emocionalidade’, mas apresentam atividade locomotora elevada no centro e periferia na arena, que são considerados índices reduzidos de ansiedade. Ao contrário, os ratos LEW demonstram comportamento acentuado de esquiva à área central da arena, (Ramos *et al.*, 1997). Com base nesses resultados podemos concluir que os indivíduos de uma mesma espécie não expressam sua emocionalidade da mesma forma. Assim, a avaliação multidimensional da emocionalidade requer diversos modelos comportamentais. Por exemplo, os testes de ansiedade podem ser classificados em dois grandes grupos, quais sejam, aqueles baseados em respostas incondicionadas, tal como a aversão aos braços abertos do LCE, e aqueles que envolvem paradigmas de aprendizagem, pavloviano ou operante, no

qual há a incorporação de respostas novas ao repertório do animal, tal como a resposta de medo condicionado.

A domesticação de animais tem sido praticada há milênios nas mais diversas espécies de animais. De acordo com Immelmann (1983), existem dois tipos de modificações nestes animais: 1) apresentam grande variabilidade intraespecífica na estrutura, fisiologia e características comportamentais, 2) apresentam modificações no sistema nervoso central, por exemplo, diminuição do peso do cérebro e diminuição da diferenciação das partes filogeneticamente mais recentes do cérebro.

Dentre as modificações comportamentais, destaca-se uma marcante redução dos comportamentos agressivos e defensivos, bem como dos comportamentos direcionados aos cuidados da prole. A aprendizagem também parece sofrer prejuízos. Também pode ocorrer o desaparecimento, ou “atrofia”, de outros comportamentos, tal como, o canto estridente em algumas raças de canários. Em contraste, observa-se a acentuação do comportamento sexual, ou hiper-sexualidade. Assim, animais domésticos demonstram aumento do número de cópulas e perda parcial da sazonalidade, assim como do comportamento de corte.

Uma das principais causas destas modificações é a direção e intensidade das forças seletivas que afetam os organismos. A troca da seleção natural pela artificial acentua a pressão seletiva dado o número relativamente pequeno de animais da população doméstica. Por exemplo, os animais menos agressivos são selecionados dado o fácil manuseio e menor periculosidade. O mesmo pode ser

verdadeiro para o comportamento sexual, selecionando-se os animais que demonstram maior número de cópulas.

A segunda modificação diz respeito ao cérebro dos animais domesticados. Assim, foi demonstrado que os cérebros de ratos Wistar são 8,3% menores que os dos ratos selvagens de peso similar. Também foi constatada uma redução do volume fresco do bulbo (1,6%), cerebelo (10,3%), estriado (10,9%) telencéfalo (10,6%) e, particularmente, neocórtex (12,5%) (Kruska, 1975a). Adicionalmente, a comparação de áreas allocorticais e arquicorticais revelou uma redução de 10,2% da formação hipocampal (cornus ammonis, fascia dentata) (Kruska, 1975b). As considerações acima demonstram a extrema importância da utilização de diversas linhagens no estudo do comportamento.

### 1.5. MATÉRIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL

Fernandez de Molina e Hunsperger (1962) ampliaram estes estudos demonstrando que as respostas de defesa induzidas por estimulação das áreas telencefálicas (amígdala) e diencefálicas (hipotálamo) de gatos dependiam da integridade das áreas do mesencéfalo, em particular, da matéria cinzenta periaquedutal (MCPA). Em sagüis, a agressão defensiva intraespecífica eliciada por estimulação do hipotálamo é caracterizada por comportamentos de ataque e fuga intercalados com vocalizações específicas dos macacos dominantes e subordinados (Lipp e Hunsperger, 1978). Outros estudos demonstraram que a MCPA também é uma estrutura crucial na integração das respostas defensivas de

ratos (Figura 3)(Bandler e Carrive, 1988, Sudré *et al.*, 1993; Schenberg *et al.*, 2001).



Figura 3. Resposta de imobilidade do rato produzida por estimulação elétrica da matéria cinzenta periaquedutal dorsal.

Aceita-se, atualmente, que a MCPA divide-se em colunas funcionalmente distintas distribuídas ao longo do aqueduto do mesencéfalo. Basicamente, a MCPA subdivide-se em colunas dorsomedial, dorsolateral, lateral e ventrolateral. A MCPA dorsomedial situa-se acima do aqueduto, sendo delimitada lateralmente pelas colunas dorsolaterais. A MCPA lateral, por sua vez, separa as colunas dorsomedial e dorsolateral, situadas na porção dorsal da MCPA, do componente ventral representado pela MCPA ventrolateral.

A coluna dorsolateral (MCPAdl) tem o aspecto de uma cunha na seção coronal da MCPA, atingindo os terços rostral e intermediário da mesma (Figura 4). Esta coluna processa informações de um grupo específico de conexões. As aferências telencefálicas provêm das áreas pré-límbica e infralímbica caudais do córtex pré-frontal medial, córtex perirrinal e, particularmente, das áreas dorsal e

ventral do giro cingulado anterior (Floyd *et al.*, 2000) que processam informações de cunho visual (Vogt e Miller, 1983, Devinsky *et al.*, 1995). Adicionalmente, recebe aferências diencefálicas do núcleo pré-mamilar dorsal do hipotálamo (Canteras e Swanson, 1992). As aferências do tronco cerebral restringem-se às projeções do colículo superior que também processam informações visuais (Graybiel *et al.*, 1984, 1994, Redgrave e Dean, 1991). Exceto por algumas projeções para o núcleo cuneiforme e regiões periabducentes (Zhang *et al.*, 1990), os neurônios desta coluna não apresentam projeções maciças para o tronco cerebral.

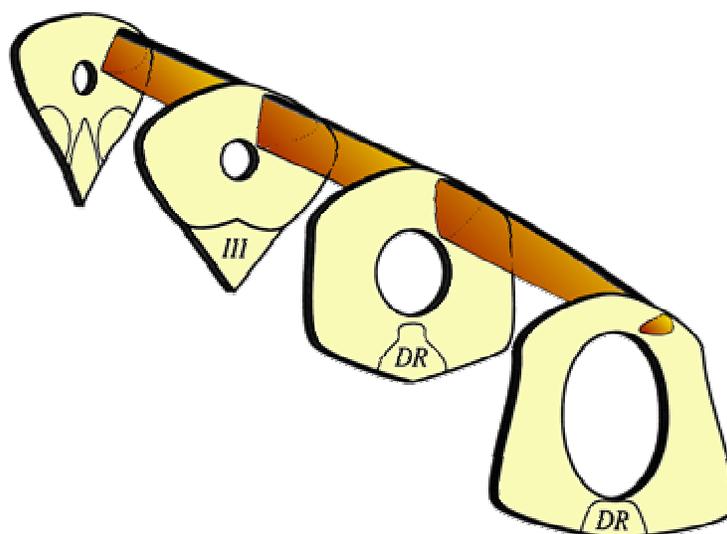


Figura 4. Coluna dorsolateral da MCPA (Bandler *et al.*, 1991).

A coluna dorsomedial (MCPAdm) situa-se imediatamente abaixo do aqueduto (Figura 5). Ao contrário da MCPAdl, seus neurônios projetam-se extensivamente para o tronco cerebral, em particular para as regiões rostral-ventromedial e ventrolateral (Bandler e Depaulis, 1991), bem como para o núcleo

pontino da micção (região-M) ou núcleo de Barrington (Blok e Holstege, 1994, 1996).

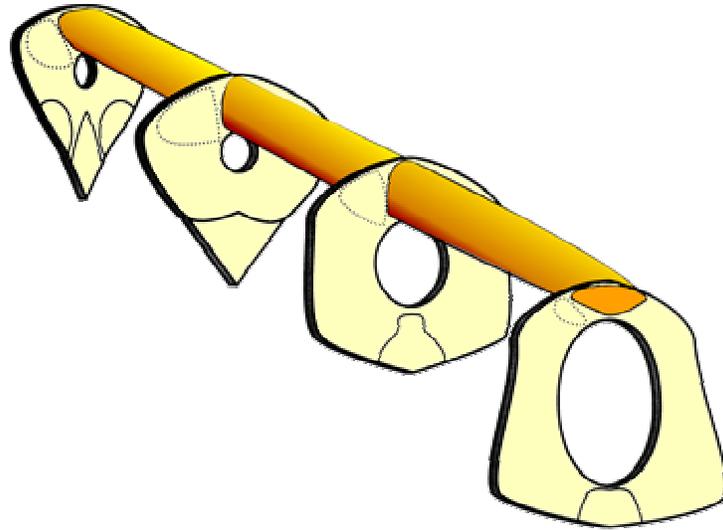


Figura 5. Coluna dorsomedial da MCPA (Bandler *et al.*, 1991).

A coluna lateral (MCPAlt) projeta-se maciçamente para as regiões ventromedial, ventrolateral e dorsal bulbar (Bandler e Tork, 1987, Bandler e Depaulis, 1991) (Figura 6). A MCPAlt intermediária rostral recebe densas aferências do núcleo espinhal do trigêmio, assim como aferências dos núcleos do hipotálamo anterior, pré-óptico e amígdala central. A MCPAlt caudal envia projeções profusas para o bulbo. Tanto a MCPAlt intermediária, quanto caudal, recebem aferências densas de áreas corticais e subcorticais. A coluna lateral também envia projeções para o núcleo da micção de Barrington.

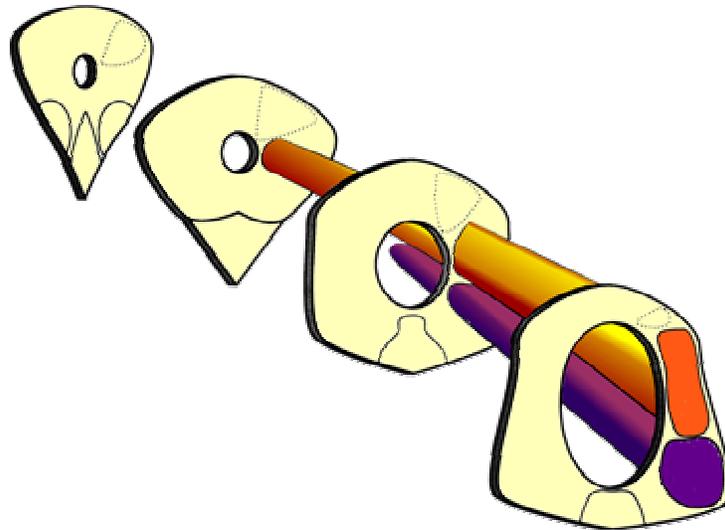


Figura 6. Colunas lateral e ventrolateral da M CPA (Bandler *et al.*, 1991).

Da mesma forma da coluna lateral, os neurônios da coluna ventrolateral (MCPAvI) projetam-se para o bulbo rostral e caudal, e recebem aferências profusas das áreas corticais e subcorticais similares, bem como das regiões lumbar e cervical da medula espinhal. Diferentemente da MCPAdI, as aferências do córtex pré-frontal medial provêm das áreas pré-límbica e infralímbica rostrais, bem como dos córtices insulares agranulares dorsal e ventral, sem contribuições do giro cingulado anterior e córtex perirrinal (Floyd *et al.*, 2000).

#### 1.6. INTEGRAÇÃO FUNCIONAL DA M CPA

As funções da M CPA têm sido abordadas sob dois ângulos. O primeiro diz respeito ao papel da M CPA na mediação da analgesia e, o segundo, aborda seu papel na integração de respostas comportamentais a estímulos ameaçadores ou estressantes (reação de defesa). Há, contudo, um certo consenso de que tanto a

analgésia, quanto as reações comportamentais sejam melhor compreendidas como componentes de respostas integradas fundamentais à sobrevivência do animal (Fanselow, 1991).

Embora as projeções da MCPAvI sejam similares às apresentadas pela MCPAlI, estudos com microinfusão de aminoácidos excitatórios mostraram que a excitação dos neurônios da MCPAvI produz efeitos opostos àqueles da MCPAlI, tais como a diminuição na atividade somatomotora e simpática acompanhados de inibição geral do comportamento (Bandler e Depaulis, 1991; Lovick, 1991). No entanto, estudos recentes mostraram que a resposta hipotensora não é eliciada em ratos não anestesiados (Morgan e Carrive, 2001). Trabalhos utilizando marcação de neurônios por imunoreatividade à proteína *c-fos*, sugerem que a MCPAvI seja mobilizada sempre que a inibição comportamental estiver associada a estímulos aversivos (Canteras e Goto, 1999).

Além da eliciação de diferentes respostas pela estimulação das diferentes colunas da MCPA, estudos com microinjeção de aminoácidos excitatórios sugerem que respostas distintas de defesa também possam ser evocadas em diferentes regiões dentro de uma mesma coluna. Segundo Bandler e Keay (1996), a estimulação da região intermediária da coluna dorsal da MCPA produziria “reações de confrontação” que, no caso dos ratos, estariam associadas ao comportamento de “boxear”, em postura ereta. A estimulação da mesma região em gatos estaria associada à reação de confrontação caracterizada por piloereção, arqueamento das costas, retração das orelhas, exposição das presas e garras, juntamente com vocalização. Por outro lado, estes autores sugerem que a microinjeção de aminoácidos excitatórios no terço caudal da coluna lateral

evocaria reações de fuga e congelamento (imobilidade tensa). De fato, estudos de nosso laboratório mostraram que várias respostas somáticas de defesa (imobilidade, trote, galope e saltos) podem ser eliciadas pela estimulação de uma única área da MCPAd, mesmo quando a área estimulada permanece constante, como é o caso da estimulação com pulsos de intensidade fixa e frequência variável (Sudré *et al.*, 1993, Bittencourt, 2003, Bittencourt *et al.*, 2003).

Estudos com ratos machos da linhagem CPBWE-zob mostraram que a estimulação elétrica do hipotálamo lateral induz comportamentos agressivos intraespecíficos. A estimulação desta área resultou em ataque com mordida ou com salto sobre o oponente, coices no ventre, mordidas na cabeça e na região do pescoço, culminando em “engalfinhamento” (Figura 7). A luta podia terminar em postura submissa ou na retirada do rato atacante. O comportamento de ataque cessava com o término da estimulação (Kruk *et al.*, 1984). A estimulação da MCPA, principalmente na porção rostral, também induziu comportamentos agressivos, tais como, aproximação, piloereção e mordidas na região da cabeça e pescoço. A estimulação simultânea do hipotálamo e da MCPA resultou em ataques mais diretos do que a estimulação destas áreas separadamente. Embora jamais tenhamos observado a agressão por estimulação da região caudal das colunas dorsais e lateral da MCPA do rato, a estimulação destas áreas produz respostas típicas de medo, como as reações de congelamento e fuga (Sudré *et al.*, 1993, Bittencourt, 2003, Bittencourt *et al.*, 2003).

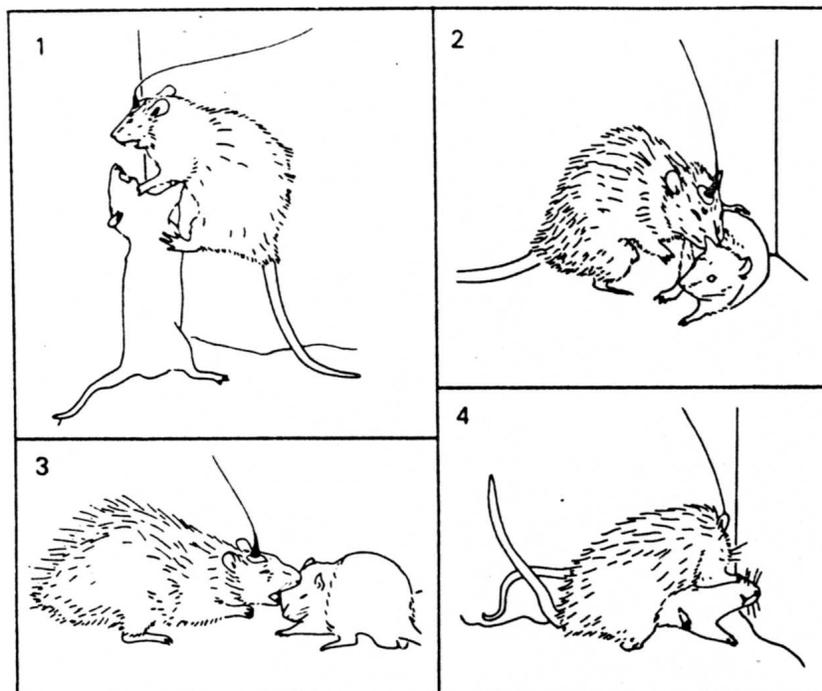


Figura 7. Comportamentos agressivos induzidos por estimulação elétrica do hipotálamo. 1 - ataque com salto, 2 - mordida e puxão na pele, 3 - mordida na cabeça, 4 - engalfinhamento (Kruk *et al.*, 1984).

Recentemente, estudos realizados em nosso laboratório verificaram que a estimulação intracraniana, por variação de intensidade e frequência de corrente elétrica, ou por microinfusão de aminoácido n-metil D-aspártico (NMDA) em áreas restritas da região dorsal da MCPA, produzem padrões hierárquicos de respostas, com a produção seqüencial de exoftalmia, imobilidade, corrida, micção, defecação e saltos, respectivamente (Bittencourt, 2003, Bittencourt *et al.*, 2003).

A eliciação de respostas defensivas diferentes com limiares idênticos ou muito próximos sugere a existência de outros mecanismos subjacentes além da mera topografia comportamental ou do efeito de somação espacial produzido pelo aumento da amplitude da corrente elétrica (Sudré *et al.*, 1993; Schenberg *et al.*,

2001). De fato, os resultados descritos acima, demonstraram que a variação de frequência de um pulso quadrado de baixa intensidade, um estímulo que não produz somação espacial, é capaz de evocar todas as respostas defensivas em uma mesma área da MCPA (colunas lateral e dorsolateral). Além disso, os resultados obtidos com microinfusões NMDA na MCPA indicam a despolarização de corpos celulares ao invés de fibras de passagem.

O mecanismo neuronal que controla a eliciação dos padrões de defesa, bem como dos comportamentos singulares que os compõem, ainda permanece obscuro. Desconhece-se, por exemplo, se as respostas individuais da reação de defesa são todas produzidas na MCPAd, ou se algumas se originam em outro lugar do cérebro, secundariamente à ativação generalizada da reação de defesa. Também não está claro se as várias respostas da reação de defesa têm uma representação topográfica diferenciada na MCPAd ou se elas são o reflexo de padrões distintos de disparo de uma mesma população de neurônios desta estrutura. Por fim, conhece-se pouco acerca das outras estruturas, rostrais ou caudais à MCPAd, envolvidas na gênese das respostas individuais da reação de defesa. Não obstante, estudos de nosso laboratório deram passos importantes no sentido de esclarecer as funções das aferências da MCPA provenientes do núcleo pré-mamilar dorsal do hipotálamo (Cezário, 2001) e do colículo superior (Bittencourt, 2003, Bittencourt *et al.*, 2003).

Padrões cardiovasculares distintos também são eliciados pela estimulação de uma mesma área da MCPAd com estímulos elétricos similares. Schenberg *et al.* (1993) demonstraram que as respostas cardiovasculares da reação de defesa de ratos não anestesiados dependem da intensidade. Assim, enquanto os ratos

controles apresentaram bradicardia durante a reação de congelamento, os ratos com desnervação sinoaórtica apresentaram taquicardia, demonstrando participação do barorreflexo cardíaco durante o comportamento de congelamento. Em contraste, durante o comportamento de fuga observou-se aumentos simultâneos da pressão arterial e frequência cardíaca, indicando a desativação do barorreflexo. Estes resultados são importantes pois reproduzem os reajustes hemodinâmicos dos comportamentos de congelamento e fuga naturais (Adams *et al.*, 1979).

Os comportamentos defensivos também são eliciados pela estimulação das camadas profundas do colículo superior (Redgrave e Dean, 1991, Sudré et al., 1993). Conforme mencionamos, estudos recentes de nosso laboratório corroboraram a importância destas estruturas na reação de defesa. De fato, Blanchard *et al.* (1977) demonstraram que embora a MCPA seja necessária para a deflagração das respostas defensivas de ratos selvagens, a lesão do colículo superior impede a detecção visual do predador. Portanto, a distância entre predador (experimentador) e presa (rato selvagem) é um fator determinante das formas específicas das reações defensivas. Desta forma, enquanto a resposta a uma distância superior a 3 metros é o congelamento, ameaças situadas entre 2 e 3 metros induzem a fuga na presença de uma via de escape. Alternativamente, o rato acuado salta e morde o predador. Certamente, a visão exerce um papel determinante na avaliação da distância entre predador e presa.

Por fim, nosso trabalho visa a comparação comportamental entre ratos que já passaram por um processo artificial de seleção, mais particularmente, os ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), e aqueles ratos que mantêm seu repertório

comportamental “diferenciado”, ou seja, mais próximo aos padrões de animais selvagens que ainda não foram submetidos à domesticação, por exemplo, os ratos de esgoto ou ratazanas (*Rattus norvegicus sp*).

## 2. OBJETIVO

1. Verificar, por meio da análise logística de limiares, se existem diferenças entre os repertórios de defesa induzidos pela estimulação elétrica da MCPA de ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), machos (WISm) ou fêmeas (WISf), SHR machos (*Rattus norvegicus albinus*) e ratos selvagens (*Rattus norvegicus sp*) machos (SEL), determinando possíveis influências do sexo, ambiente e variabilidade genética.
2. Comparar as linhagens em 3 testes comportamentais
  - 2.1. Peritaxia na arena com 50 cm de diâmetro (teste da arena).
  - 2.2. Comportamento exploratório e em resposta à aproximação do experimentador em um corredor de 40 m (teste do corredor).
  - 2.3. Desempenho no labirinto em cruz-elevado (LCE).

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. ANIMAIS

##### 3.1.1. Ratos Wistar

Nos experimentos com estimulação intracraniana foram utilizados ratos Wistar, machos e fêmeas (*Rattus norvegicus albinus*), pesando entre 240 e 280 g, de diferentes ninhadas, fornecidos pelo biotério do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, da Universidade Federal do Espírito Santo (Figura 8). Adicionalmente, foram

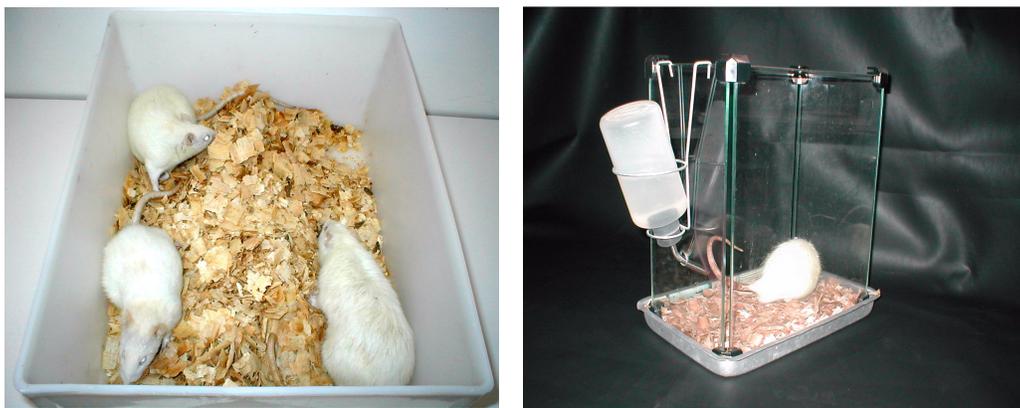


Figura 8. Ratos Wistar em gaiolas de polipropileno do biotério central (esquerda) e em gaiolas de vidro do laboratório (direita).

feitos testes comportamentais com ratos Wistar jovens machos. A idade, peso e tamanho (extremidade da cauda ao focinho) foram monitorados, selecionando-se como jovens os ratos com peso inferior a 100 g (Figura 9). Este critério também foi adotado para os ratos selvagens nascidos no biotério. No laboratório, os animais

eram mantidos em gaiolas individuais com paredes de vidro (25 x 15 x 30 cm) e assoalho coberto com serragem. Os ratos tinham livre acesso à água e comida e

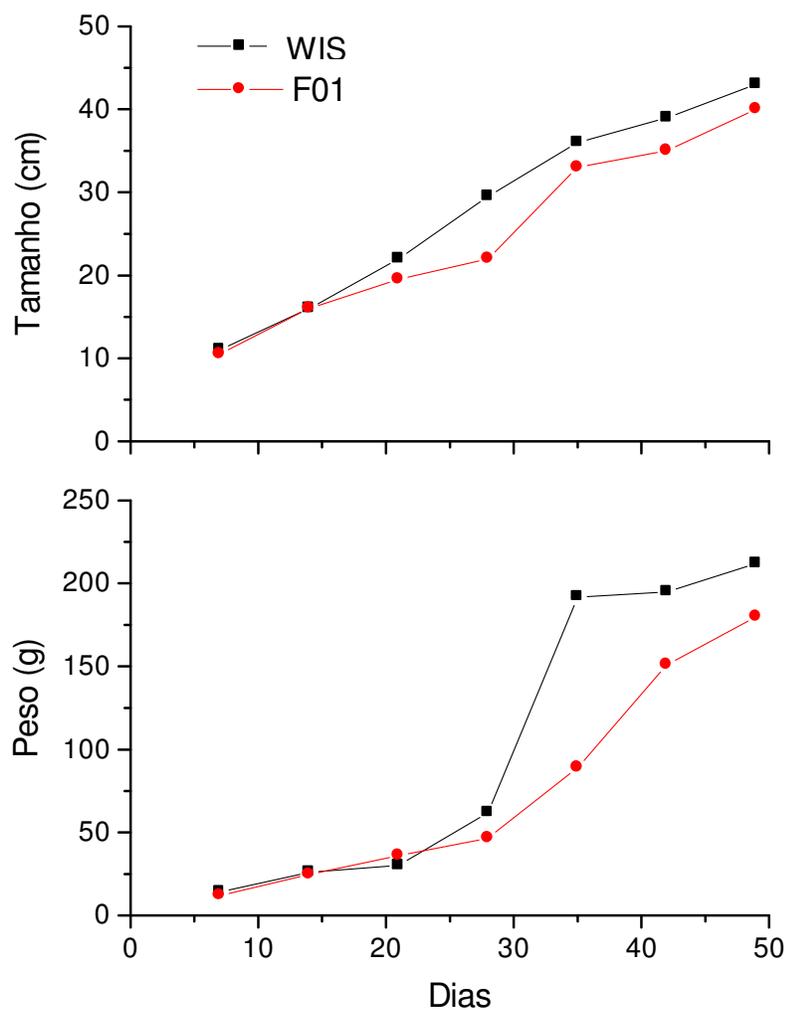


Figura 9. Gráfico ilustrativo do crescimento dos ratos Wistar e G01. As medidas referem-se a um indivíduo de cada linhagem.

eram mantidos em ambiente com ciclo de iluminação de 12 h (luzes acesas às 6:00 h) e temperatura controlada (20-25°C).

### 3.1.2. Ratos Espontaneamente Hipertensos

Foram utilizados ratos machos, adultos, isogênicos e espontaneamente hipertensos (*Rattus norvegicus albinus*) da linhagem SHR ( $n = 20$ ), pesando cerca de 240 a 280 g. Estes ratos, fornecidos pelo biotério do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, da Universidade Federal do Espírito Santo, descendem de matrizes provenientes do biotério da UNIFESP. Os animais eram mantidos em gaiolas individuais com paredes de vidro (25 x 15 x 30 cm) e assoalho coberto com serragem. Os ratos tinham livre acesso à água e comida e eram mantidos em ambiente com ciclo de iluminação de 12 h (luzes acesas às 7:00 h) e temperatura controlada (20-25°C).

### 3.1.3. Ratos Selvagens

Os ratos selvagens (*Rattus norvegicus sp.*), jovens e adultos ( $n = 70$  capturados e  $n = 16$  utilizados integralmente), foram capturados no período noturno, entre 19 e 24 h, numa granja de criação de galos de briga próxima à universidade (Figura 10). Para isto, utilizava-se isca de restos de comida caseira e uma armadilha com duas portas, pois verificamos que os ratos evitavam entrar em ambientes novos sem saída.

A armadilha era periodicamente vistoriada até a captura do rato. Uma vez capturado, o rato era imediatamente transferido para uma gaiola de vidro, de dimensões similares àquelas descritas para os ratos Wistar, onde permaneciam até o fim da caçada. Devido à alta agressividade destes ratos, suas gaiolas

também tinham um teto de vidro e um assoalho de tela de arame, o qual era fixado às paredes laterais com o auxílio de 2 molas (Figura 11).



Figura 10. Rato selvagem em idade adulta (*Rattus norvegicus* sp).

Estas gaiolas evitavam fugas e mordidas ao experimentador. A gaiola e o assoalho eram colocados sobre uma bandeja de alumínio, forrada com papel e serragem, para coleta de dejetos e resíduos alimentares. Ao término da caçada, as gaiolas eram remanejadas para o biotério do Laboratório de Neurobiologia, nas condições de luz e temperatura descritas acima. Os ratos permaneciam nestas gaiolas até a conclusão dos experimentos, sendo alimentados por um orifício no teto, de 1,5 cm de diâmetro, por onde introduzíamos a ração que era coletada em um recipiente de vidro preso ao assoalho, imediatamente abaixo do orifício de alimentação. Tal como nas gaiolas dos ratos Wistar, as gaiolas dos ratos selvagens tinham um orifício na parede frontal para a introdução do bico do bebedouro. As gaiolas eram periodicamente limpas, eliminando-se os dejetos e resíduos da bandeja em depósitos próprios dos ratos selvagens. Com estes cuidados, a manutenção dos ratos selvagens pôde ser feita sem necessidade de manipulação direta.

Após os experimentos, as gaiolas sujas eram imersas em cubas contendo solução de álcool iodado e água, onde permaneciam por um período mínimo de 6 horas, antes de serem lavadas. Todo o material dos animais selvagens foi manipulado com luvas e esterilizado com solução de iodo. Por fim, o experimentador fez uso permanente de luvas e máscaras cirúrgicas, evitando qualquer contato direto com os animais, reduzindo o risco de contaminação.

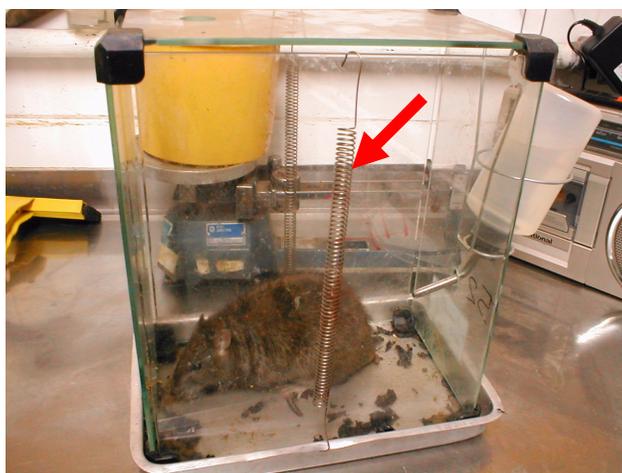


Figura 11. Gaiola anti-fuga para os ratos selvagens, com a seta em vermelho indicando as molas de proteção.

#### 3.1.4. Ratos Híbridos

Este grupo de animais originou-se do cruzamento de um rato macho selvagem (*Rattus norvegicus* sp) e uma rata Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) ( $n = 10$ ). Os animais eram mantidos em gaiolas coletivas de polipropileno (35 cm x 55 cm), com assoalho coberto com serragem, nas quais havia uma toca-ninho de

aço inoxidável para melhor acomodação (Figura 12). Esta toca tinha uma portinhola que permitia o isolamento dos ratos para limpeza da caixa de polipropileno. Os ratos tinham livre acesso à água e comida e eram mantidos em ambiente com temperatura controlada (20-25°C).

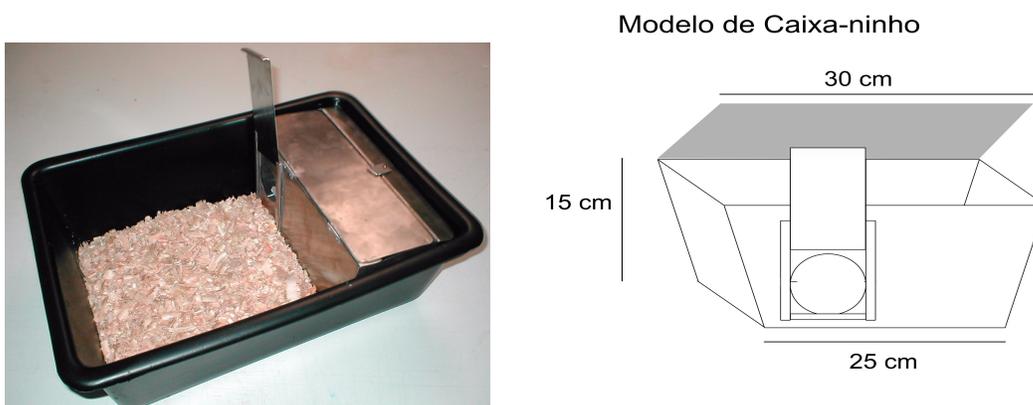


Figura 12. Caixa de manutenção dos ratos selvagens, com assoalho forrado por palha e a toca-ninho para acomodação e criação ao fundo (à esquerda). Projeto básico de construção da toca-ninho (à esquerda).

### 3.1.5. Ratos *Selvagens* nascidos no biotério

Este grupo de animais originou-se do cruzamento de um casal de ratos selvagens capturados (*Rattus norvegicus* sp) ( $n = 13$ ). O casal que serviu como matriz foi colocado numa caixa especialmente projetada para reduzir o estresse do cativeiro. Esta gaiola era feita de ferro esmaltado (pois, havendo alguma saliência, os ratos selvagens roem o alumínio), com 48 x 42 x 33 cm (Figura 13). Seu interior era composto por uma toca totalmente escura de 24 x 15,5 x 18 cm, um pátio frontal de 24 x 26,5 x 17,5cm, com iluminação atenuada por uma porta de

acrílico azul, e um páteo lateral de 24 x 42 x 33 cm, onde havia um orifício para bebedouro e uma porta para introdução de alimento. Os compartimentos podiam ser isolados por portinholas móveis, mantendo-se os ratos em um compartimento enquanto o introduzia-se o alimento no páteo lateral. O isolamento dos ratos na toca também possibilitava a troca da serragem das bandejas de aço inoxidável dos páteos frontal e lateral. Os ratos tinham livre acesso à água e comida e temperatura controlada (20-25°C). Durante dois meses, a fim de desencadear o processo de acasalamento, os ratos foram submetidos ao tratamento com os hormônios estradiol (0,45 µg/ml), dissolvidos na água. A infertilidade foi, certamente, devida ao estresse da captura e vida em cativeiro, uma vez que o tratamento hormonal não foi necessário para a procriação dos ratos selvagens nascidos no biotério.



Figura 13. Criadouro de ratos selvagens especialmente projetado para reduzir ao máximo a luminosidade e os ruídos externos, evitando altos níveis de estresse nos animais. A seta amarela indica a toca de procriação (à esquerda). Rato dentro da toca (à direita).

## 3.2. ELETRODO

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

## 3.3. CIRURGIA

### *3.3.1. Ratos Wistar Machos, Fêmeas e Espontaneamente hipertensos*

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

pequenos parafusos de aço inoxidável que serviam de âncora para a prótese cirúrgica (Figura 14).

Em seguida era feita a craniotomia ao nível da fissura sagital com exposição do córtex cerebral que serviu de referência para a implantação do eletrodo em área pré-determinada, de acordo com as seguintes coordenadas estereotáxicas (Paxinos & Watson, 1986): antero-posterior = 7.2 no sentido rostral a partir do plano interaural; lateral = 0.4 a partir do plano mediano e vertical = 4.4 a partir da superfície do seio venoso.



Figura 14. Crânios dos ratos mostrando os pontos de fixação dos parafusos para ancoragem da prótese de acrílico e a prótese e o tubo de proteção. Os ganchos no tubo serviram para fixar a prótese, por meio de elásticos, a ganchos similares do cabo elétrico.

Tomou-se o cuidado de afastar o seio venoso durante a implantação, evitando-se a ruptura do mesmo durante a introdução do eletrodo. Para minimizar a resistência à penetração, fazia-se uma pequena abertura na dura-máter, com o auxílio de uma agulha hipodérmica. Em seguida à implantação, preenchia-se o campo cirúrgico com resina acrílica autopolimerizável (JET, São Paulo, Brasil),

soldando o eletrodo e os parafusos numa prótese sólida. Um tubo plástico de 1 cm de altura de diâmetro era fixado sobre a prótese para proteção do eletrodo.

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

### *3.3.2. Ratos Selvagens*

Devido ao alto índice de óbitos dos ratos selvagens em cativeiro, optou-se por operá-los 1 a 3 dias após a captura. Para isto, colocava-se a gaiola do rato numa caixa de plástico ligeiramente maior que a gaiola (34 x 22 x 33 cm), juntamente com um algodão embebido em éter etílico. A caixa era tampada e



Figura 15. Anestesia do rato selvagem: indução parcial com éter e indução profunda com hidrato de cloral.

aguardava-se a anestesia do animal que podia ser observado através do plástico translúcido (Figura 15). Uma vez anestesiado, o rato era retirado da gaiola, administrado com meia dose de hidrato de cloral (200 mg/kg, IP) e fixado ao aparelho estereotáxico (David Koff, USA), repetindo-se os procedimentos cirúrgicos descritos para o rato Wistar (Figura 16). Tomou-se o cuidado de usar luvas e máscaras cirúrgicas durante todo o procedimento. Ao término da cirurgia os animais recebiam 0,2 ml de penicilina-G benzatina (24.000 UI, IM) e eram polvilhados com veneno anti-pulga (Baygon, Bayer) (Figura 16). Em seguida, os animais eram alojados em gaiolas individuais, sobre uma placa térmica, até se recuperarem da anestesia, sendo transferidos ao biotério do laboratório.



Figura 16. Rato polvilhado com anti-pulgas (acima à esquerda). Cirurgia estereotáxica do rato selvagem (demais figuras).

### 3.4. ESTIMULAÇÃO INTRACRANIANA

Cinco dias após a cirurgia estereotáxica, os ratos Wistar eram colocados numa arena cilíndrica de acrílico transparente, com 60 cm de altura e diâmetro, para serem estimulados. As sessões de estimulação com pulso senoidal (60 Hz, 1 min) utilizavam intensidades crescentes, em passos de 5  $\mu$ A, até a obtenção da resposta de galope. Como os ratos apresentavam diferentes limiares de respostas, o tempo de cada sessão variava, em média, cerca de 40 minutos. Após a primeira resposta de defesa (exoftalmia e/ou imobilidade), adotavam-se intervalos de 5 minutos, permitindo o retorno dos ratos à condição de repouso, ou similar. Os ratos que não exibiram a resposta de corrida (trote e/ou galope) com intensidades inferiores a 70  $\mu$ A foram excluídos do experimento.

A estimulação dos ratos selvagens foi realizada na mesma arena, no entanto, com um teto na altura de 60 cm (Figura 17). Adicionalmente, os ratos eram previamente anestesiados com éter, permitindo a colocação do cabo de estimulação. A estimulação era realizada 1 h após a conexão do cabo, permitindo a recuperação da anestesia. Ao final da sessão de estimulação, os ratos eram novamente anestesiados, por meio de um algodão embebido em éter, introduzido na arena, sendo então recolocados em suas gaiolas.



Figura 17. Montagem experimental para ratos Wistar e ratos selvagens. A seta vermelha no canto superior direito da figura direita indica a tampa da arena para a estimulação intracraniana dos ratos selvagens.

### 3.5. REGISTROS COMPORTAMENTAIS

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

Tabela 1. Etograma do rato na ausência ou presença da estimulação elétrica da matéria cinzenta periaquedutal dorsal.

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

Por sua vez, a 'reação de congelamento' (*freezing behavior*) foi definida como uma postura de imobilidade tensa (ver etograma) acompanhada de exoftalmia, paralisia das vibrissas (mistacioplegia) e, às vezes, defecação e micção, aparentando um estado de hipervigilância. A reação de congelamento ocorreu isoladamente, ao longo de todo período de estimulação, ou após a fuga, antes do término do estímulo, quando foi freqüentemente acompanhada de defecação e micção. Por fim, a reação de fuga consistiu nas respostas de corrida (trote e/ou galope) e saltos, acompanhadas de exoftalmia. Por outro lado, a defecação eliciada por estimulação da MCPA não foi acompanhada por comportamentos específicos, como farejar e escolha de local, ou posturas, como o arqueamento do dorso. Também não há relatos de encobrimento das fezes no comportamento de defecação do rato. É importante notar que a defecação pode requerer a contração da musculatura abdominal e interferir com outras respostas de defesa, tais como o trote e galope. Tal como para a defecação, não observamos nenhum comportamento especial associado à micção, propriamente

### **3.6. TESTE DO CORREDOR**

Neste teste, os ratos foram posicionados num dos lados de um corredor que media 40 metros de comprimento por 1,10 de largura. Tal corredor era marcado em intervalos lineares de 1 metro, com fitas adesivas brancas que facilitavam a observação do experimentador, bem como por placas numeradas colocadas nas laterais de cada quadrante, representando o mesmo. Ao final do corredor, encontrava-se uma barreira de isopor de 1m de altura. Esta barreira era

composta de uma portinhola regulada por um sistema de roldanas, que a fazia subir e descer, permitindo aos ratos, especialmente os selvagens, entrarem numa armadilha estrategicamente colocada atrás da parede de isopor (Figura 18). Ao serem soltos, os ratos percorriam livremente o corredor por um período de 10 minutos. O número de quadrantes lineares (1 x 1,10 m) era, então, calculado.



Figura 18. Teste do corredor, no qual utilizou-se marcas e numerações no chão e uma barreira de isopor.

Passado o período de exploração, o experimentador entrava no corredor e, com velocidade de 1 metro por segundo, aproximava-se do rato, parando ao observar o direcionamento da cabeça do rato para o experimentador. O número

de quadrantes entre o experimentador e o rato, no momento em que este reconhecia o experimentador como uma possível ameaça, bem como aqueles quadrantes percorridos pelo animal ao fugir do experimentador eram calculados. Terminado o teste, o experimentador retornava ao movimento, encurralando o rato no canto fechado do corredor, a fim de observar seus comportamentos de defesa nesta situação de acuação. Os experimentos eram realizados no período da tarde.

### **3.7. LABIRINTO-EM-CRUZ ELEVADO**

Os grupos SHR e WISm foram testados no LCE do Laboratório de Neuropsicofarmacologia do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. O LCE era feito de madeira e fórmica branca e consistia de dois braços abertos e dois braços fechados por paredes laterais medindo 28 cm de altura. Cada braço media 50 cm de comprimento por 10 cm de largura, e estavam posicionados a uma altura de 82 cm do solo (Figura 19). Os braços abertos eram circundados por uma borda de acrílico, com 1 cm de altura. O rato era colocado na região central, permitindo-se que o animal explorasse livremente o aparelho por um período de 5 minutos. Durante este tempo, media-se os tempos despendidos nas explorações dos braços abertos e fechados, bem como o número de entradas com as quatro patas em cada um dos braços. O LCE era limpo com álcool etílico (10%) após cada sessão para remoção de pistas olfatórias. Durante todo o período, a sala era preparada de forma a reduzir ao máximo ruídos externos e a

luz consistia de uma lâmpada de tungstênio vermelha (127 V, 15 W). Os ratos eram testados uma única vez. Os experimentos eram realizados no período da tarde.

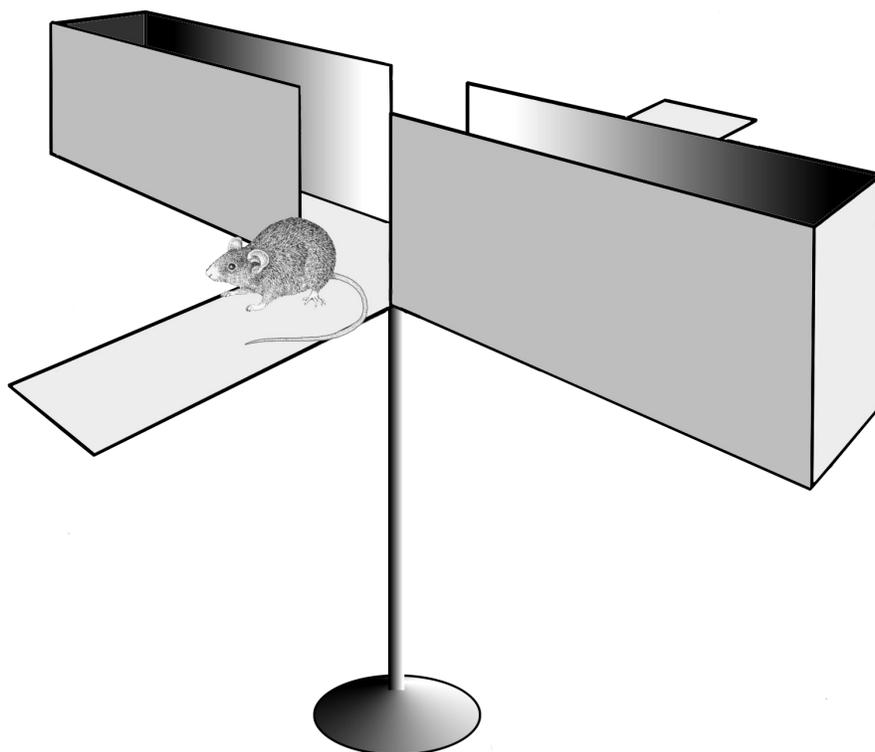


Figura 19. Labirinto-em-cruz elevado.

### 3.8. TESTE DA ARENA

Antes da realização da cirurgia para o implante do eletrodo que seria necessário na estimulação intracraniana, os ratos eram submetidos à mesma arena cilíndrica de acrílico transparente, com 60 cm de diâmetro e altura. No fundo desta, foram marcados quadrantes periféricos e um círculo central (Figura 20). Durante um período de 10 minutos, os ratos eram observados, quantificando o

número de quadrantes atravessados na periferia, bem como o número de cruzamentos no perímetro central. Foram testados os ratos dos grupos Wistar macho, selvagens capturados, ratos híbridos e ratos selvagens nascidos e criados em laboratório (geração G01). Nos grupos de ratos selvagens, a colocação na arena consistia de abaixar a toca especialmente projetada dentro da arena, então, parcialmente coberta para evitar a fuga destes. Após o término da sessão, estes mesmos animais eram induzidos a entrarem novamente em suas respectivas tocas, comportamento realizado com grande facilidade devido o baixo limiar de reatividade destes animais.

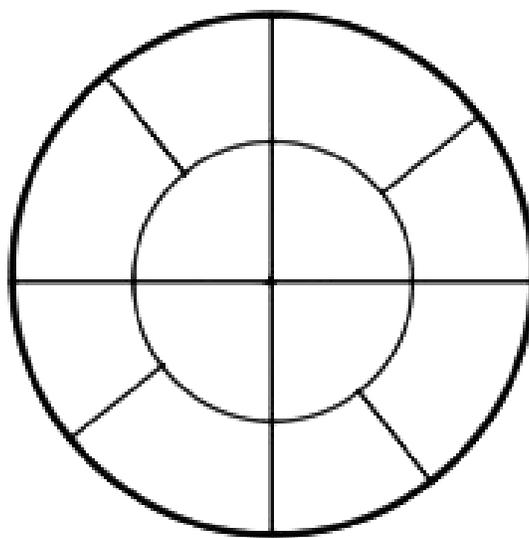


Figura 20. Assoalho da arena, de 50 cm de diâmetro, mostrando as divisões do anel periférico e do círculo interno.

### 3.9. ANÁLISE HISTOLÓGICA

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

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

### 3.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA

#### *3.10.1 Análise das variáveis contínuas (testes da arena, corredor e LCE).*

Os dados foram submetidos à análise univariada de variância (ANOVA) seguida de comparações por testes t para duas amostras para linhagens de uma mesma idade, ou pareados para idades de uma mesma linhagem. As diferenças foram consideradas significantes para  $p < 0,05$  (critério de Bonferroni). Todas as análises foram realizadas pelo procedimento “GLM” do programa Statistical Analysis System (SAS<sup>®</sup>, Cary, EUA).

#### *3.10.2 Análise das variáveis binárias (ajustes de curvas de probabilidade de resposta)*

Os resultados dos ratos cujos eletrodos localizaram-se na MCPA foram submetidos à análise estatística. As curvas de probabilidade de resposta foram obtidas por ajuste logístico das freqüências acumuladas das respostas em função do logaritmo das intensidades de corrente ou volume, de acordo com o modelo,

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

onde  $P$  é a probabilidade esperada da resposta  $y_{ij}$  para um dado estímulo  $x_{ij}$ ,  $\alpha_j$  é o intercepto e  $\beta_j$  a inclinação da *jésima* curva intensidade-resposta (grupos WISm, WISf e SHR, ou grupos WISm, WISmE e SEL).

Efeitos intensidade-dependentes significantes foram avaliados pelo chi-quadrado de Wald ( $\chi^2_w = [\beta_j/\text{e.p.}]^2$ ), onde e.p. é o erro padrão de  $\beta_j$ . As curvas intensidade-resposta foram parametrizadas por meio de variáveis indicadoras e comparadas através de testes de coincidência por razão de verossimilhanças, para locação ou paralelismo das regressões. As regressões foram comparadas pela diferença dos desvios de verossimilhança ( $-2\text{LogLikelihood deviance}$  ou  $-2\text{LogLD}$ ) do modelo completo ( $k$  parâmetros) e dos respectivos modelos reduzidos ( $k-r$  parâmetros), proporcionando valores de  $\chi^2$  com  $r$  graus de liberdade ( $\chi^2_r$ ). Os  $\chi^2_r$  dos testes gerais de locação e paralelismo ( $r = 4$  e  $2$  g.l., respectivamente), assim como o  $\chi^2_w$ , foram considerados significantes ao nível de 5%. Os  $\chi^2_r$  dos testes pareados para locação e paralelismo ( $r = 1$  g.l.) foram considerados significantes ao nível de 5% segundo o critério de Bonferroni. O ajuste por máxima verossimilhança foi realizado pelo procedimento "Logistic" do programa SAS. A intensidade mediana ( $I_{50}$ ) assim como seu erro padrão (e.p.) e o respectivo intervalo de confiança (I.C. 95%) foram computados pelas fórmulas que se seguem,

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

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

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

$$\text{s.e.}(I_{50}) = I_{50} \{\text{s.e.}[\text{Log}(I_{50})]\}$$

$$\text{I.C. 95\% (I}_{50}) = \pm 1,96 \{\text{s.e. (I}_{50})\}$$

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

Respostas cuja frequência reduzida não permitiu o ajuste de curvas de limiares foram analisadas por meio de testes de  $\chi^2$  de tabelas de contingência das frequências máximas de resposta, para o nível descritivo de  $\alpha = 0,05$  (critério de Bonferroni).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. LOCALIZAÇÃO DOS SÍTIOS ESTIMULADOS

Os eletrodos na MCPA foram localizados nas colunas dorsolateral (52), dorsomedial (19) e lateral (25) (Tabela 2). Os eletrodos das colunas dorsolateral localizaram-se, predominantemente na região intermediária, e em menor número nas regiões rostral e caudal (Figuras 21 e 22).

Tabela 2. Localização dos eletrodos dos distintos grupos segundo as colunas da MCPA.

Área Estimulada	WISm	WISmE	WISf	SHR	SEL	Total
MCPA dorsomedial	6	3	5	3	2	19
MCPA dorsolateral	8	12	12	11	9	52
MCPA lateral	6	5	4	6	4	25
Total	20	20	21	20	15	96

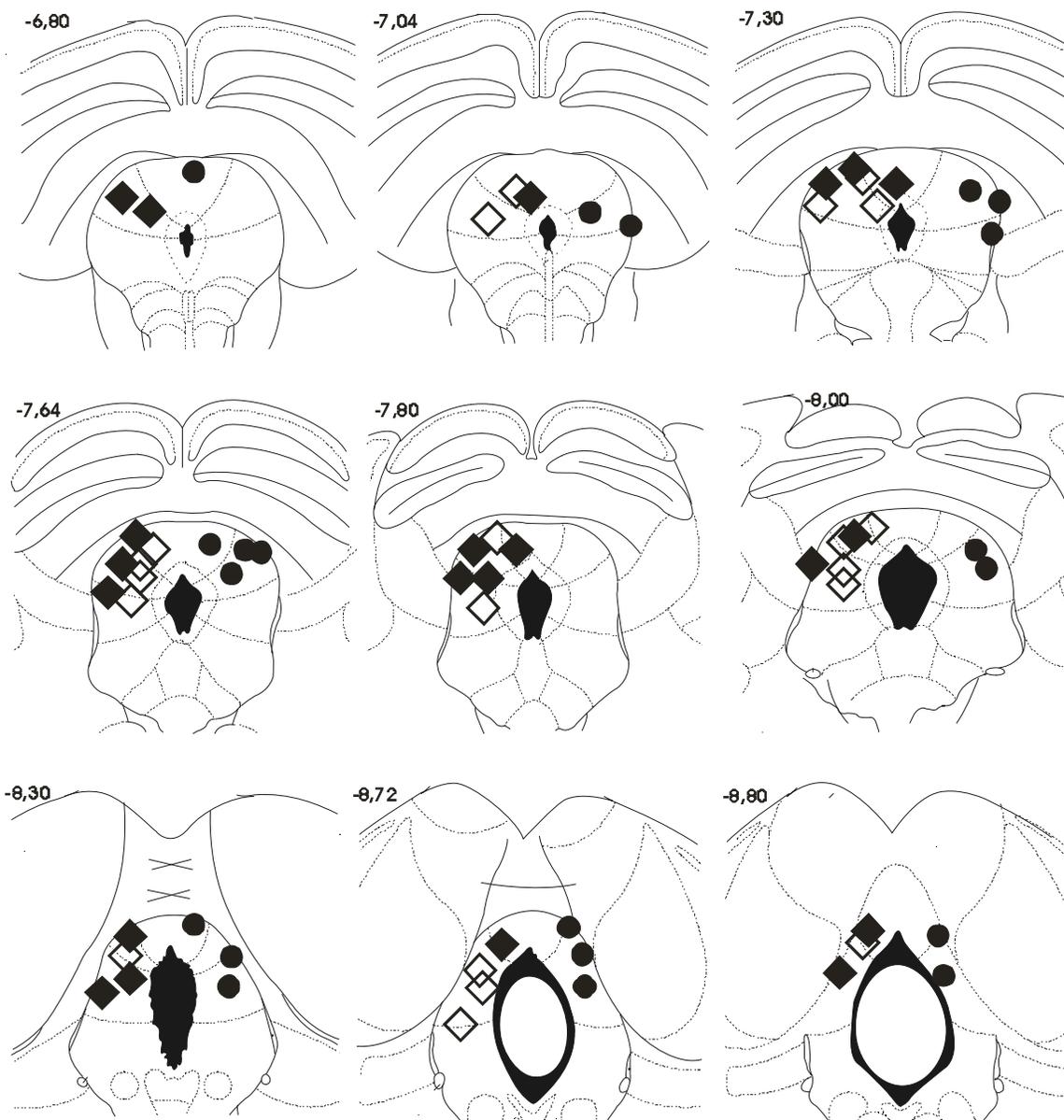


Figura 21. Sítios da MCPA cuja estimulação induziu as respostas defensivas nos ratos Wistar machos (●), Wistar fêmeas (◆) e SHR (◇). Números indicam as coordenadas ântero-posteriores em relação ao bregma (mm). Os pontos podem representar mais de um animal estimulado.

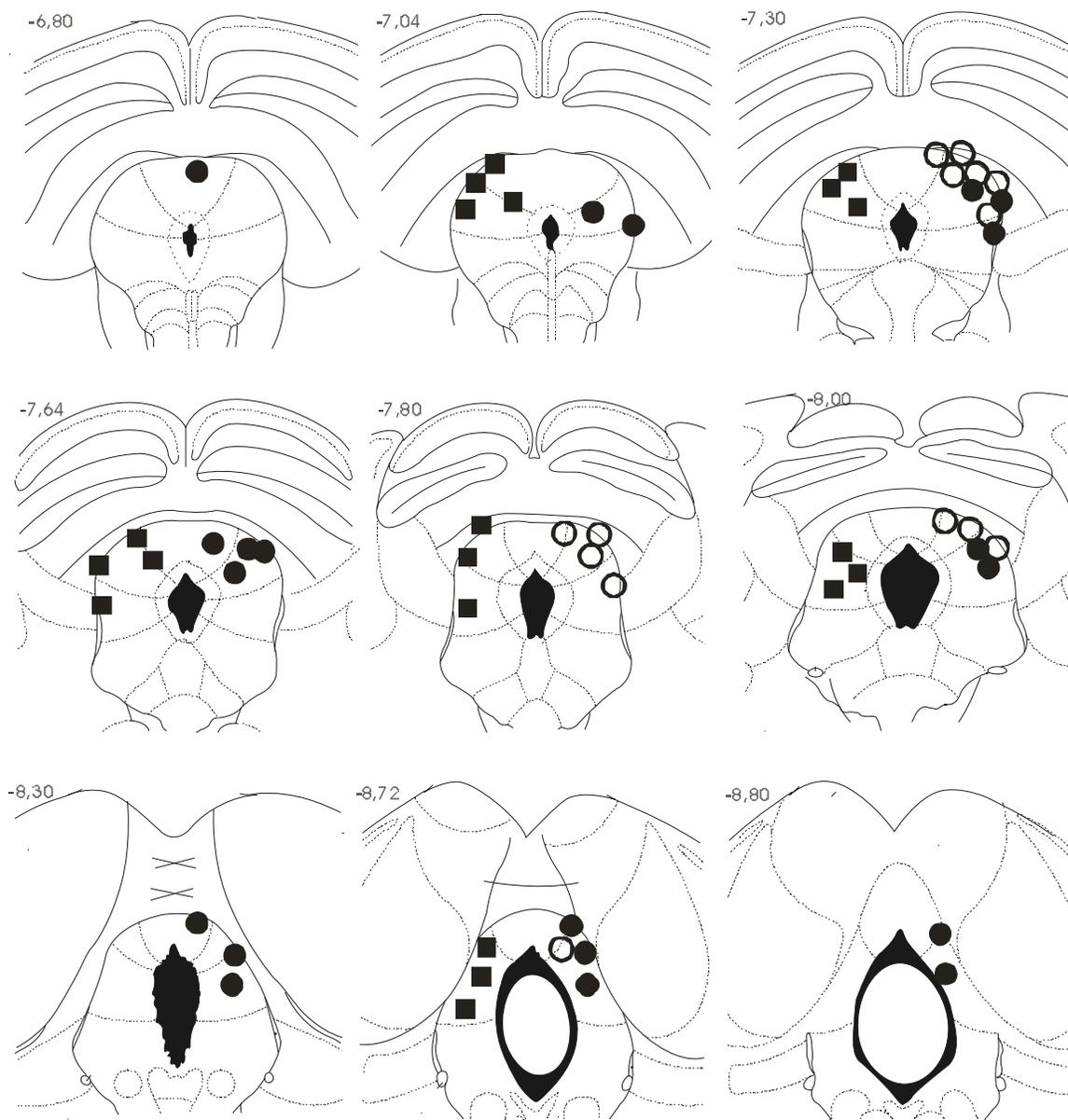


Figura 22. Sítios da MCPA cuja estimulação induziu as respostas defensivas nos ratos Wistar machos (●), Wistar machos com éter (■) e ratos selvagens (○). Números indicam as coordenadas ântero-posteriores em relação ao bregma (mm). Os pontos podem representar mais de um animal estimulado.

#### 4.2. DIFERENÇAS COMPORTAMENTAIS ENTRE RATOS SELVAGENS, CAPTURADOS ADULTOS, E OS RATOS WISTAR, SELVAGENS E HÍBRIDOS, JOVENS E ADULTOS, CRIADOS NO BIOTÉRIO.

##### *4.2.1. Exploração da arena de ratos machos Selvagens, capturados adultos, com ratos machos, jovens e adultos, criados em biotério, das linhagens Wistar, SHR, Selvagens e Híbridos Wistar/selvagens.*

O comportamento dos grupos na arena foi estatisticamente diferente, tanto em relação à exploração periférica ( $F_{7,76} = 8,25$ ,  $p < 0,0001$ ), quanto à exploração central ( $F_{7,76} = 7,54$ ,  $p < 0,0001$ ) (Figura 23).

As diferenças da exploração periférica foram basicamente devidas à linhagem ( $F_{3,76} = 14,81$ ,  $p < 0,0001$ ), mas também à interação desta com a idade ( $F_{3,76} = 4,09$ ,  $p < 0,01$ ), não havendo contribuição da idade isoladamente ( $F_{3,76} = 1,06$ ,  $p < 0,31$ ). De fato, a exploração periférica dos ratos WISTAR foi estatisticamente inferior àquela dos ratos SEL ( $t = 6,42$ ,  $p < 0,0001$ ) e G01 ( $t = 3,67$ ,  $p < 0,0005$ ). Particularmente, os ratos SEL jovens apresentaram valores acentuadamente superiores àqueles dos ratos WISTAR jovens ( $t = 6,79$ ,  $p < 0,0001$ ) e adultos ( $t = 5,65$ ,  $p < 0,0001$ ). Os ratos SEL jovens também diferiram dos outros grupos, apresentando valores superiores à peritaxia dos ratos SEL adultos ( $t = 3,46$ ,  $p < 0,001$ ), G01 jovens ( $t = 4,24$ ,  $p < 0,0001$ ) e adultos ( $t = 3,99$ ,  $p < 0,001$ ) e F01 jovens ( $t = 4,96$ ,  $p < 0,0001$ ) e adultos ( $t = 4,92$ ,  $p < 0,0001$ ). A comparação por teste t pareado também detectou uma diferença significativa para a idade dos ratos WISTAR, havendo uma exploração periférica maior para os

ratos adultos ( $t = 2,86$ ,  $p < 0,018$ ). Note-se que estes ratos e os SEL foram os únicos que diferiram quanto à idade, no entanto, em sentidos inversos (Tabela 3).

Tabela 3. Exploração periférica e central da arena com relação à idade e linhagem dos ratos. Símbolos indicam valores estatisticamente diferentes dos ratos Wistar jovens (\*), SEL jovens (#), G01 jovens (teste t para duas amostras,  $p < 0,05$ ).

Idade	Grupo	Periferia	Centro
Jovens	Wistar	14,44 ± 1,73	0 ± 0
	SEL	67,00 ± 10,3*	3,20 ± 3,32*
	G01	36,92 ± 2,88*#	0 ± 0#
	F01	29,60 ± 4,59#	0 ± 0#
Adultos	Wistar	23,22 ± 3,72#	0,22 ± 0,15#
	SEL	40,90 ± 6,51*#	0,80 ± 0,33#
	G01	38,69 ± 3,05*#	1,23 ± 0,26#
	F01	29,90 ± 4,59#	0,30 ± 0,15#

Similarmente, as diferenças da exploração da área central da arena foram devidas tanto à linhagem ( $F_{3,76} = 9,51$ ,  $p < 0,0001$ ), quanto à interação desta e da idade dos ratos ( $F_{3,76} = 8,07$ ,  $p < 0,0001$ ), não havendo contribuição da idade isoladamente ( $F_{3,76} = 0,07$ ,  $p < 0,79$ ) (Figura 23). Assim, a exploração central dos ratos SEL foi estatisticamente maior àquela dos ratos Wistar ( $t = 4,56$ ,  $p < 0,0001$ ), G01 ( $t = 3,65$ ,  $p < 0,0005$ ) e F01 ( $t = 4,59$ ,  $p < 0,0001$ ). Tal como se observou para a exploração da periferia, as diferenças da exploração central também foram basicamente devidas à maior atividade dos ratos SEL jovens em relação aos SEL adultos ( $t = 4,21$ ,  $p < 0,0001$ ), Wistar jovens ( $t = 5,47$ ,  $p < 0,0001$ ) e adultos ( $t = 5,09$ ,  $p < 0,0001$ ), G01 jovens ( $t = 5,97$ ,  $p < 0,0001$ ) e adultos ( $t = 3,67$ ,  $p < 0,0005$ ) e F01 jovens ( $t = 5,62$ ,  $p < 0,0001$ ) e adultos ( $t = 5,09$ ,  $p < 0,0001$ ). Note-se, por

fim, que a idade influenciou de forma inversa na exploração central dos ratos selvagens capturados em meio urbano (SEL) e criados no biotério (G01) (Tabela 3).

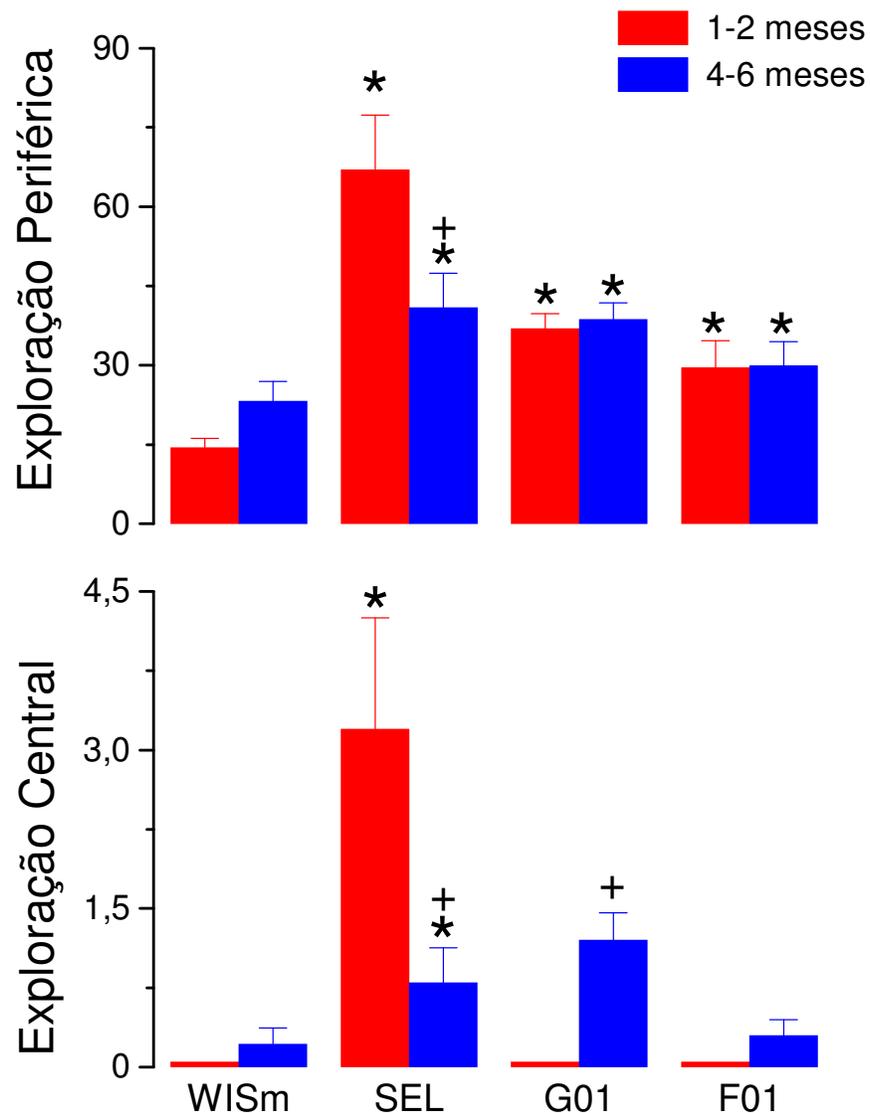


Figura 23. Exploração da arena de ratos machos selvagens, capturados adultos, com ratos machos, jovens e adultos, criados em biotério, das linhagens Wistar, SHR, selvagens e híbridos Wistar/Selvagens. \*  $p < 0,05$ , significativamente diferente do grupo WISm de mesma idade, +  $p < 0,05$ , diferença significativa entre idades do mesmo grupo (teste t para duas amostras, critério de Bonferroni).

*4.2.2. Comportamento exploratório e defensivo, no teste do corredor, de ratos Selvagens machos, capturados em idade adulta, e de ratos machos, jovens e adultos, criados em biotério, das linhagens Wistar, Selvagens e Híbridos Wistar/selvagens.*

Imediatamente após a sua soltura, os ratos SEL, G01 e F01 trotavam em direção à extremidade do corredor oposta ao experimentador. Durante o período de observação imóvel do experimentador, exploravam livremente o corredor, apresentando comportamentos de olfação, esquadrinhar, levantar, marcha e trote, às vezes chegando bastante próximo ao experimentador. Em geral, os ratos terminaram a exploração na porção central do corredor. Este comportamento exploratório foi significativamente diferente para os grupos estudados ( $F_{3,41} = 23,08$ ,  $p < 0,0001$ ). Esta diferença foi basicamente devida à menor atividade exploratória dos ratos Wistar em relação aos ratos SEL ( $t = 7,01$ ,  $p < 0,0001$ ), G01 ( $t = 6,95$ ,  $p < 0,0001$ ) e F01 ( $t = 6,40$ ,  $p < 0,0001$ ), que não diferiram entre si (Figura 24).

Ao término do período de observação imóvel, o experimentador entrava no corredor, sendo prontamente percebido pelos ratos que fugiam, por meio de trotes, até a barreira final. Acuados pelo experimentador, tentavam fugir, emitindo fortes vocalizações e saltando para mordê-lo. A distância de alerta e a amplitude de fuga dos ratos Wistar também diferiram marcadamente dos outros grupos. A distância de alerta dos Wistar foi significativamente menor que a dos ratos SEL ( $t = 7,69$ ,  $p < 0,0001$ ), G01 ( $t = 9,96$ ,  $p < 0,0001$ ) e F01 ( $t = 8,41$ ,  $p < 0,0001$ ). A amplitude de fuga dos ratos Wistar também foi significativamente menor que dos ratos SEL ( $t = 3,98$ ,  $p < 0,0005$ ), G01 ( $t = 4,89$ ,  $p < 0,0001$ ) e F01 ( $t = 3,05$ ,  $p <$

0,005). Não foram observadas diferenças entre os grupos SEL, G01 e F01 para nenhum parâmetro.

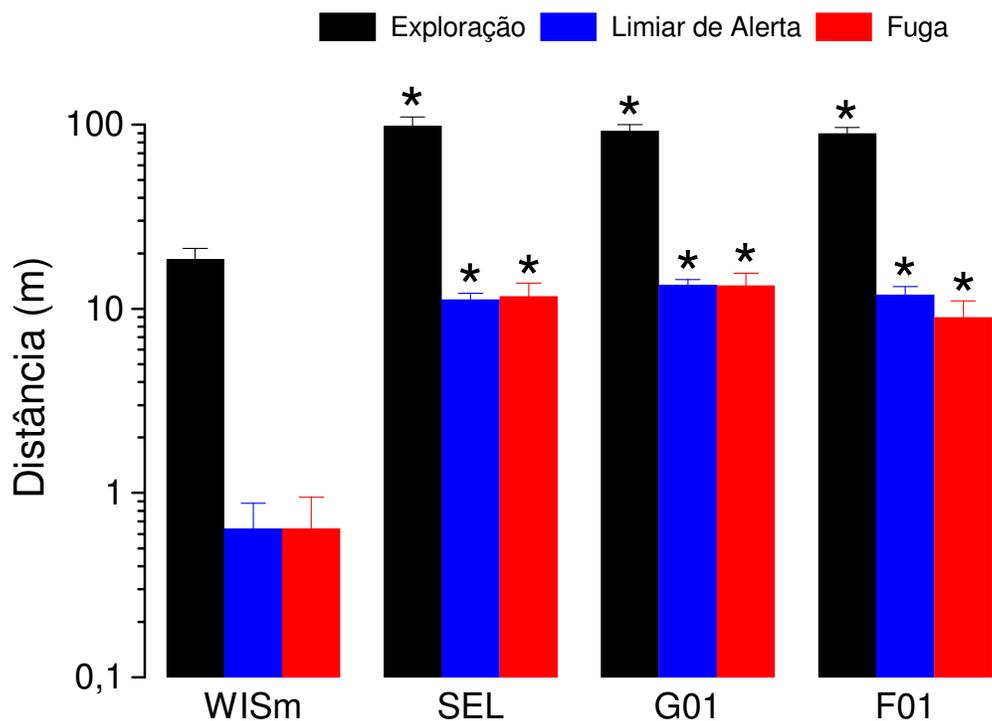


Figura 24. Comportamento exploratório e defensivo, no teste do corredor, de ratos machos selvagens, capturados em idade adulta, e de ratos machos, jovens e adultos, das linhagens Wistar, SHR, selvagens e híbridos Wistar/selvagens, criados em biotério. \*  $p < 0,05$ , significativamente diferente do grupo WISm (teste t para duas amostras, critério de Bonferroni).

#### 4.2.3. Desempenho dos ratos machos, adultos, Wistar e SHR no labirinto-em-cruz elevado.

O tempo de exploração dos braços do LCE foi marcadamente diferente para os ratos WISm e SHR ( $F_{3,102} = 70,86$ ,  $p < 0,0001$ ). Esta diferença foi devida à

linhagem do rato ( $F_{1,102} = 4,48$ ,  $p < 0,03$ ) e, principalmente, à interação desta com o braço explorado ( $F_{1,102} = 193,6$ ,  $p < 0,0001$ ). De fato, os padrões de resposta

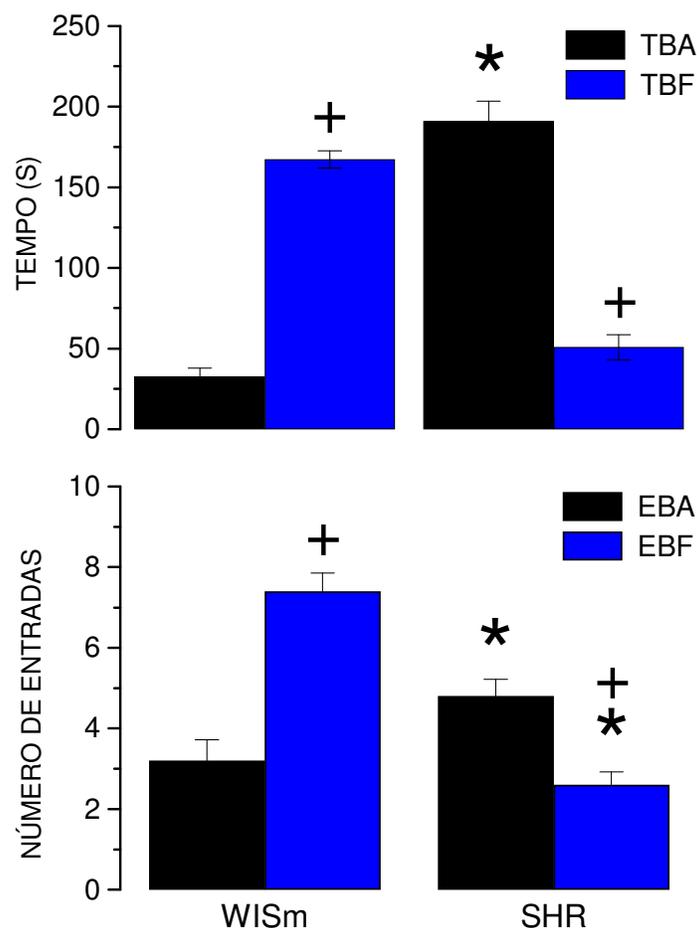


Figura 25. Desempenho dos ratos machos, adultos, Wistar e SHR no labirinto-em-cruz elevado. TBA – tempo no braço aberto, TBF – tempo no braço fechado, EBA – entradas no braço aberto, EBF – entradas no braço fechado. \*  $p < 0,05$ , diferenças significantes entre grupos para o mesmo braço do LCE, +  $p < 0,05$ , diferenças significantes entre braços para o mesmo grupo (teste t para duas amostras, critério de Bonferroni).

dos WISm e SHR foram inversos. Assim, enquanto os WISm exploraram preferencialmente os braços fechados ( $t = 8,64$ ,  $p < 0,0001$ ), os SHR

permaneceram a maior parte do tempo explorando os braços abertos do LCE ( $t = 11,54$ ,  $p < 0,0001$ ). Comparados aos WISm, os SHR também exploraram o braço aberto do LCE por períodos significativamente maiores ( $t = 11,33$ ,  $p < 0,0001$ ), despendendo menos tempo nos braços fechados ( $t = 8,34$ ,  $p < 0,0001$ ) (Figura 25).

O número de entradas nos braços abertos e fechados também foi significativamente diferente para estes grupos ( $F_{3,102} = 22,21$ ,  $p < 0,0001$ ). A diferença foi devida tanto à linhagem ( $F_{1,102} = 13,55$ ,  $p < 0,0004$ ), quanto ao braço explorado ( $F_{1,102} = 5,70$ ,  $p < 0,05$ ) e à interação destes fatores ( $F_{1,102} = 52,68$ ,  $p < 0,0001$ ). Similarmente ao observado para o tempo de exploração, o número de entradas apresentou um padrão inverso nos ratos WISm e SHR. Assim, enquanto os ratos WISm entraram mais vezes nos braços fechados ( $t = 6,11$ ,  $p < 0,0001$ ), os SHR realizaram um número maior de entradas nos braços abertos ( $t = 3,96$ ,  $p < 0,0001$ ). Por fim, comparados aos WISm, os SHR entraram mais vezes nos braços abertos ( $t = 2,52$ ,  $p < 0,01$ ) e menos vezes nos braços fechados ( $t = 7,73$ ,  $p < 0,0001$ ).

#### 4.3. EFEITOS DO SEXO E LINHAGEM SOBRE OS LIMIARES DA REAÇÃO DE DEFESA INDUZIDA POR ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DA MATÉRIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL

##### 4.3.1. *Comparação dos limiares da reação de defesa dos grupos Wistar Macho, Wistar Fêmea e SHR*

Todas respostas somáticas de defesa, quais sejam, imobilidade, trote, galope, corrida e salto, bem como a exoftalmia, resultaram em regressões altamente significantes para todos os grupos ( $15,8 < \chi^2_w < 67,6$ , 1 g.l.,  $p < 0,0001$ ). A resposta de micção dos ratos WISm também apresentou regressão estatisticamente significativa ( $\chi^2_w = 13,3$ , 1 g.l.,  $p < 0,0005$ ). Por outro lado, a resposta de defecação dos ratos WISm apresentou um ajuste com significância marginal ( $\chi^2_w = 3,02$ , 1 g.l.,  $p < 0,08$ ). Em contraste, o grupo SHR não forneceu ajustes significantes para as respostas de micção ( $\chi^2_w = 2,02$ , 1 g.l.,  $p < 0,15$ ) e defecação ( $\chi^2_w = 0,7$ , 1 g.l.,  $p < 0,40$ ). Por fim, a resposta de defecação não foi observada nos ratos WISf (Figura 26).

Em geral, os limiares das respostas de defesa dos ratos WISm foram inferiores aos limiares dos outros grupos. Em contraste, não foram observadas diferenças de paralelismo (Figuras 26 e 27). Comparados aos ratos WISm, os limiares dos ratos WISf foram significativamente mais elevados para imobilidade ( $\Delta I_{50} = 28\%$ ,  $\chi^2 = 19,5$  1 g.l.,  $p < 0,0001$ ), exoftalmia ( $\Delta I_{50} = 22\%$ ,  $\chi^2 = 13,0$ , 1 g.l.,  $p < 0,0005$ ), trote ( $\Delta I_{50} = 41\%$ ,  $\chi^2 = 27,7$ , 1 g.l.,  $p < 0,0001$ ), corrida ( $\Delta I_{50} = 21\%$ ,  $\chi^2 = 10,7$ , 1 g.l.,  $p < 0,001$ ), salto ( $\Delta I_{50} = 20\%$ ,  $\chi^2 = 13,7$ , 1 g.l.,  $p < 0,0005$ ) e micção ( $\Delta I_{50} = 57\%$ ,  $\chi^2 = 13,7$ , 1 g.l.,  $p < 0,0005$ ). Notavelmente, o sexo não teve influência alguma sobre os limiares da resposta de galope ( $\Delta I_{50} = 6\%$ ,  $\chi^2 = 0,96$ , 1 g.l.,  $p < 0,33$ ). Os limiares do grupo WISm foram inferiores aos limiares do grupo SHR para todas as respostas. Limiares significativamente superiores foram observados para imobilidade ( $\Delta I_{50} = 33\%$ ,  $\chi^2 = 23,1$ , 1 g.l.,  $p < 0,0001$ ), exoftalmia ( $\Delta I_{50} = 46\%$ ,  $\chi^2 = 38,0$ , 1 g.l.,  $p < 0,0001$ ), trote ( $\Delta I_{50} = 49\%$ ,  $\chi^2 = 32,2$ , 1 g.l.,  $p <$

0,0001), corrida ( $\Delta I_{50} = 46\%$ ,  $\chi^2 = 35,6$ , 1 g.l.,  $p < 0,0001$ ), salto ( $\Delta I_{50} = 47\%$ ,  $\chi^2 = 31,4$ , 1 g.l.,  $p < 0,0001$ ) e micção ( $\Delta I_{50} = 208\%$ ,  $\chi^2 = 32,3$ , 1 g.l.,  $p < 0,0001$ ). Os limiares do grupo SHR também foram superiores aos do grupo WISf para exoftalmia ( $\Delta I_{50} = 20\%$ ,  $\chi^2 = 10,3$ , 1 g.l.,  $p < 0,001$ ), corrida ( $\Delta I_{50} = 21\%$ ,  $\chi^2 = 9,3$ , 1 g.l.,  $p < 0,005$ ) e micção ( $\Delta I_{50} = 96\%$ ,  $\chi^2 = 7,5$ , 1 g.l.,  $p < 0,006$ ).

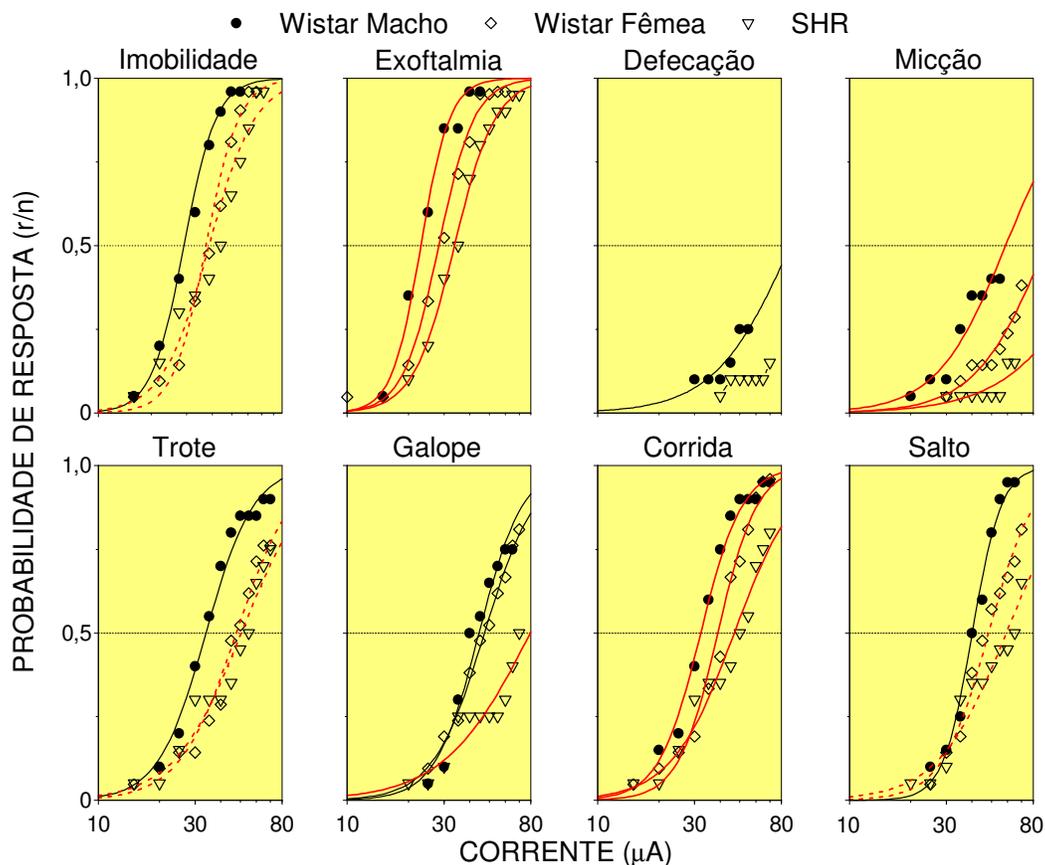


Figura 26. Curvas de probabilidade de resposta dos comportamentos de defesa produzidos por pulsos senoidais (0-70  $\mu\text{A}$ , 60 Hz, 60 s) aplicados à MCPA dos ratos WISM, WISf e SHR. As curvas intensidade-resposta representam as funções logísticas de melhor ajuste. Curvas vermelhas tracejadas indicam diferenças significativas em relação aos ratos WISM. As curvas vermelhas sólidas indicam diferenças significativas em relação aos demais grupos ( $p < 0,05$ , critério de Bonferroni, teste de  $\chi^2$  da razão das verossimilhanças). r – respostas, n – ratos estimulados.

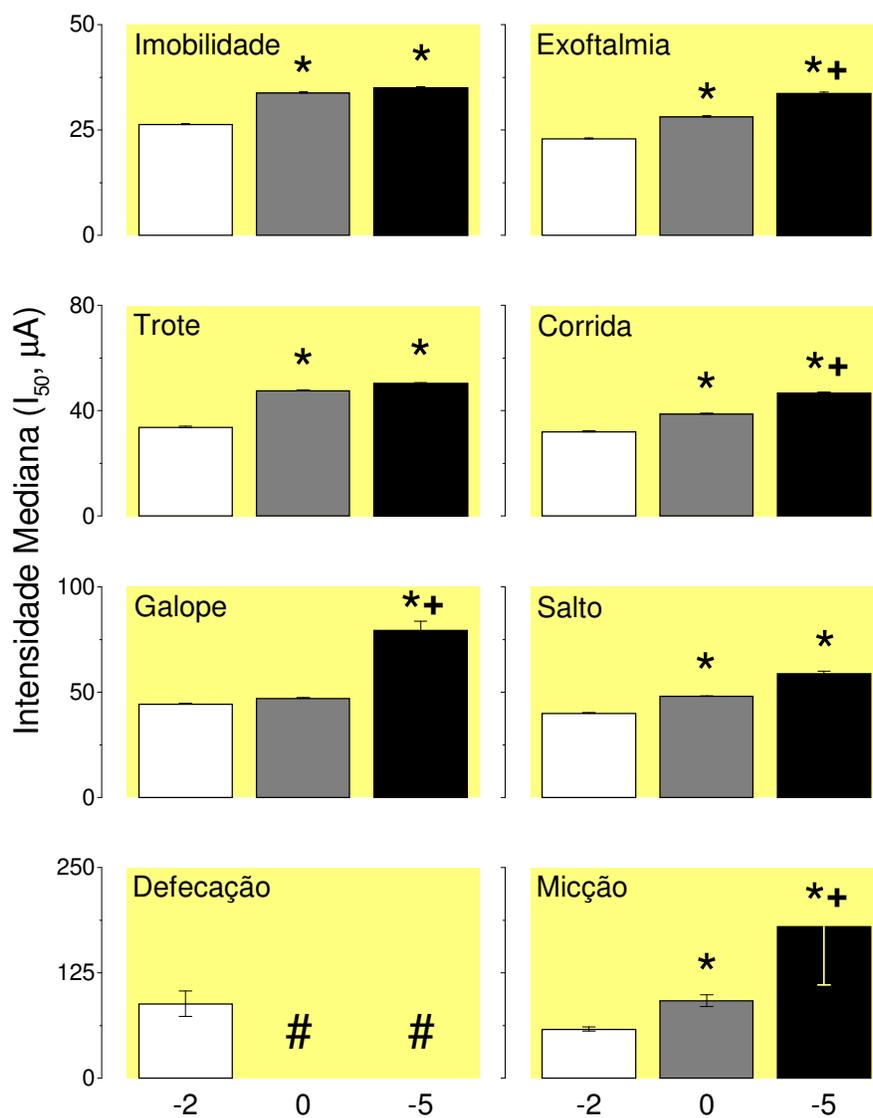


Figura 27. Intensidades medianas ( $I_{50}$ ) dos comportamentos de defesa produzidos por pulsos senoidais (0-70  $\mu\text{A}$ , 60 Hz, 60 s) aplicados à MCPA dos ratos WISm, WISf e SHR. \*  $p < 0,05$ , significativamente diferente dos ratos WISm, +  $p < 0,05$ , significativamente diferente dos ratos WISf. (critério de Bonferroni, teste de  $\chi^2$  da razão das verossimilhanças). # valores não estimáveis dada a reduzida frequência de respostas.

#### 4.3.2. Comparação dos limiares da reação de defesa dos grupos Wistar

##### *Macho, Wistar Macho após éter e Selvagem após éter.*

Similarmente aos grupos anteriores, todas respostas somáticas de defesa, quais sejam, imobilidade, trote, galope, corrida e salto, bem como a exoftalmia, apresentaram regressões altamente significantes ( $10,7 < \chi^2_w < 64,4$ , 1 g.l.,  $p < 0,001$ ). Ajustes inferiores, porém também significantes, foram observados para a resposta de micção dos ratos WISmE ( $\chi^2_w = 5,0$ , 1 g.l.,  $p < 0,02$ ). Em contraste, não foram obtidos ajustes significantes para a resposta de micção dos ratos SEL ( $\chi^2_w = 0,7$ , 1 g.l.,  $p < 0,40$ ). Tampouco foram obtidos ajustes significantes para as respostas de defecação dos ratos WISmE ( $\chi^2_w = 1,7$ , 1 g.l.,  $p < 0,19$ ) e SEL, que não apresentaram a resposta (Figura 28).

Uma hora após a recuperação da anestesia, observou-se efeitos variáveis do éter sobre os limiares das respostas de defesa dos ratos Wistar. Assim, enquanto o éter aumentou significativamente os limiares de exoftalmia ( $\Delta I_{50} = 22\%$ ,  $\chi^2 = 13,0$ , 1 g.l.,  $p < 0,0005$ ), houve uma redução acentuada dos limiares de galope ( $\Delta I_{50} = -24\%$ ,  $\chi^2 = 9,9$ , 1 g.l.,  $p < 0,001$ ) e salto ( $\Delta I_{50} = -33\%$ ,  $\chi^2 = 18,3$ , 1 g.l.,  $p < 0,0001$ ). Por sua vez, o éter não alterou os limiares das respostas de imobilidade ( $\Delta I_{50} = 7\%$ ,  $\chi^2 = 3,4$ , 1 g.l.,  $p < 0,06$ ), trote ( $\Delta I_{50} = 19\%$ ,  $\chi^2 = 1,2$ , 1 g.l.,  $p < 0,27$ ) e corrida ( $\Delta I_{50} = -12\%$ ,  $\chi^2 = 1,14$ , 1 g.l.,  $p < 0,28$ ). Também foram observadas diferenças significantes de paralelismo, com redução da inclinação das regressões de imobilidade ( $\Delta \beta = -46\%$ ,  $\chi^2 = 9,1$ , 1 g.l.,  $p < 0,005$ ), galope ( $\Delta \beta =$

-44%,  $\chi^2 = 6,1$ , 1 g.l.,  $p < 0,01$ ) e salto ( $\Delta\beta = -58\%$ ,  $\chi^2 = 17,5$ , 1 g.l.,  $p < 0,0001$ ). (Figuras 28 e 29).

Uma hora após a recuperação da anestesia, os limiares dos ratos SEL foram marcadamente mais elevados que os limiares dos ratos WISmE para imobilidade ( $\Delta I_{50} = 35\%$ ,  $\chi^2 = 8,7$ , 1 g.l.,  $p < 0,005$ ), galope ( $\Delta I_{50} = 99\%$ ,  $\chi^2 = 54,9$ , 1 g.l.,  $p < 0,0001$ ), corrida ( $\Delta I_{50} = 55\%$ ,  $\chi^2 = 21,1$ , 1 g.l.,  $p < 0,0001$ ) e salto ( $\Delta I_{50} = 99\%$ ,  $\chi^2 = 46,2$ , 1 g.l.,  $p < 0,0001$ ). Em contraste, não foram observadas alterações para exoftalmia ( $\Delta I_{50} = 1\%$ ,  $\chi^2 = 0,04$ , 1 g.l.,  $p < 0,84$ ) e trote ( $\Delta I_{50} = 12\%$ ,  $\chi^2 = 1,7$ , 1 g.l.,  $p < 0,18$ ).

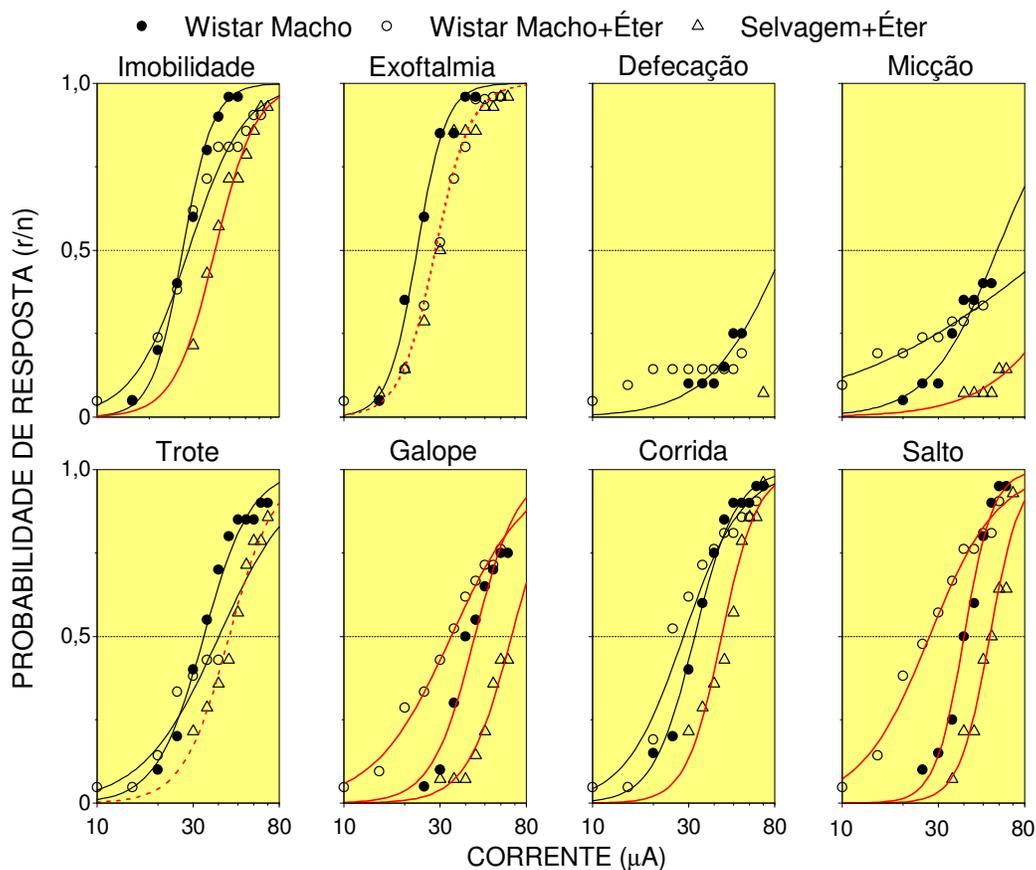


Figura 28. Curvas de probabilidade de resposta dos comportamentos de defesa produzidos por pulsos senoidais (0-70  $\mu\text{A}$ , 60 Hz, 60 s) aplicados à MCPA dos ratos WISM, WISMÉ e SEL. As curvas intensidade-resposta representam as funções logísticas de melhor ajuste. Curvas vermelhas tracejadas indicam diferenças significativas em relação aos ratos WISM. As curvas vermelhas sólidas indicam diferenças significativas em relação aos demais grupos ( $p < 0,05$ , critério de Bonferroni, teste de  $\chi^2$  da razão das verossimilhanças). r – respostas, n – ratos estimulados.

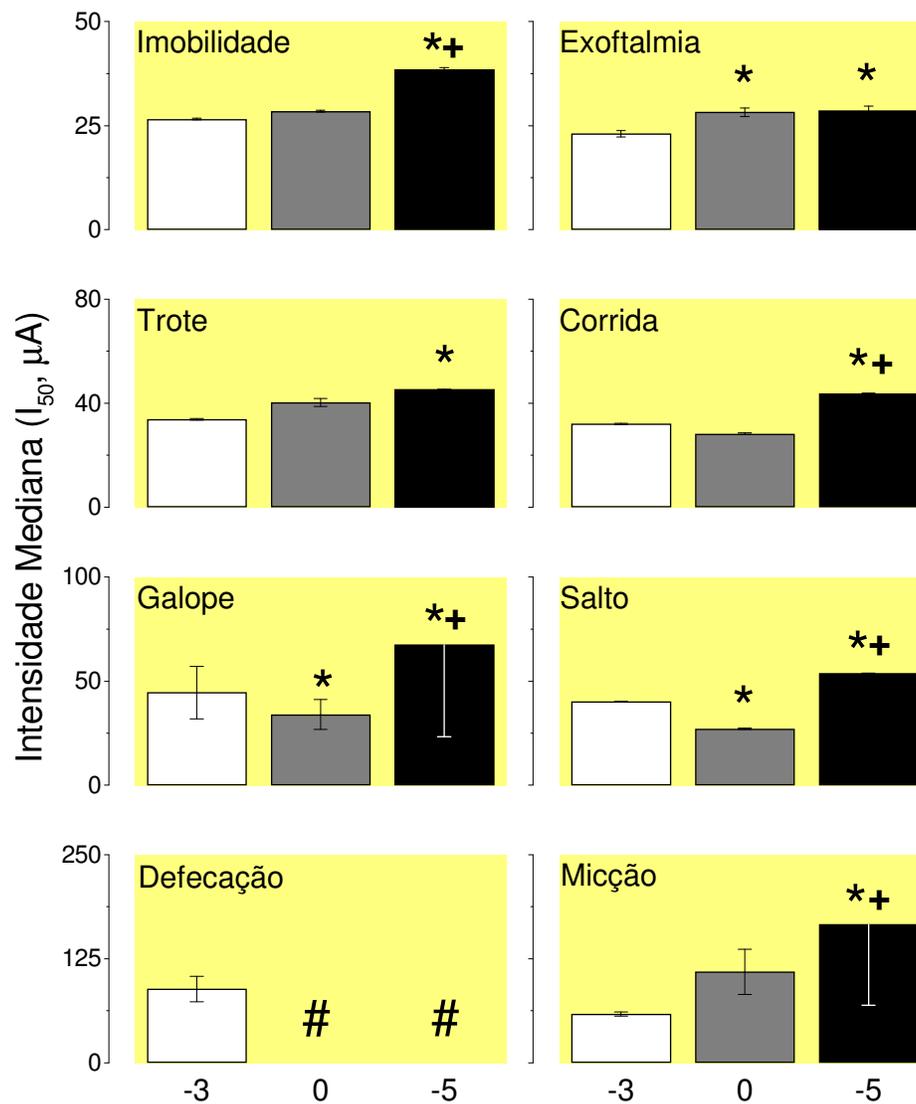


Figura 29. Intensidades medianas ( $I_{50}$ ) dos comportamentos de defesa produzidos por pulsos senoidais (0-70  $\mu A$ , 60 Hz, 60 s) aplicados à MCPA dos ratos WISm, WISmE e SEL. \*  $p < 0,05$ , significativamente diferente dos ratos WISm, +  $p < 0,05$ , significativamente diferente dos ratos WISmE (critério de Bonferroni, teste de  $\chi^2$  da razão das verossimilhanças). # valores não estimáveis dada a reduzida frequência de respostas.

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1. COMPORTAMENTO DAS LINHAGENS NA ARENA, CORREDOR E LCE

Vários estudos demonstraram diferenças marcantes entre as diversas linhagens de ratos quanto ao desempenho no arena, LCE, caixa clara-escura (*black and white box*), teste de interação social, teste de conflito experimental, resposta emocional condicionada e esquiva ativa, bem como nas respostas de vocalização ultrassônica a choques elétricos e respostas neuroendócrinas ao estresse social (Ramos e Mormède, 1998).

No que diz respeito ao comportamento na arena, Ossenkopp *et al.* (1994) demonstraram que a exposição repetida de ratos Long-Evans à arena reduzia a defecação e aumentava a atividade de locomoção central, refletindo uma habituação ao ambiente e a provável redução da resposta emocional. Em contraste, Ramos *et al.* (1997) mostraram que os ratos da linhagem BN respondiam à novidade com uma intensa resposta de defecação. Similarmente, a linhagem SHR também explora a área central da arena com maior intensidade que os ratos WKY (Knardahl e Sagvolden, 1979). Por fim, quando os ninhos dos ratos são colocados numa arena pouco iluminada que pode ser livremente explorada, os SHR saem de suas tocas mais cedo e exploram por mais tempo que os ratos WKY, demonstrando uma interação entre ritmos circadianos da atividade exploratória e a linhagem do animal (Knardahl e Sagvolden, 1979). Outros experimentos, realizados com a vigésima sétima geração dos ratos Maudsley, demonstraram que os ratos reativos têm índices de defecação mais elevados que

os não-reativos, tanto na arena, quanto em resposta à manipulação. Os ratos reativos também apresentam aumentos menores da frequência cardíaca em ambas situações (Harrington e Hanlon, 1966). Estes estudos mostram que indivíduos de uma mesma espécie podem se comportar de formas diferentes na arena.

Com relação ao LCE, os estudos de Pellow *et al.* (1985) demonstraram que os comportamentos de exploração não são influenciados pelo nível de iluminação dos braços fechados. No entanto, a exploração do LCE é fortemente influenciada pela linhagem do animal. Por exemplo, ratos Maudsley não-reativos gastam mais tempo explorando os braços abertos que os reativos (Overstreet *et al.*, 1992). Os SHR também gastam mais tempo nos braços abertos que os ratos WKY, podendo mesmo haver a inversão do padrão exploratório (Knardahl e Sagvolden, 1979). Assim, embora a maioria dos resultados sugira que os braços abertos sejam mais aversivos do que os braços fechados, o comportamento de várias linhagens sugere que os braços fechados também podem apresentar um certo nível de aversão. Alternativamente, as linhagens podem ter diferentes perfis motivacionais (exploração por alimento, parceiros, etc).

Os grupos do presente estudo exploraram a periferia da arena com maior intensidade que a região central. De fato, exceto pelo grupo SEL jovem, a exploração da região central foi praticamente nula para os demais grupos. Adicionalmente, o grupo SEL jovem apresentou atividade exploratória muito mais intensa que a atividade em idade adulta, tanto na periferia, quanto no centro da arena. A atividade exploratória do grupo SEL jovem também foi maior que a atividade dos outros grupos, jovens ou adultos, inclusive do grupo G01. As

diferenças entre os grupos de ratos jovens SEL (capturados) e G01 (nascidos em biotério) podem ter sido devidas aos ambientes diferentes nos quais eles se desenvolveram ou a um efeito específico do estresse da captura. Estas diferenças não foram observadas na idade adulta, possivelmente, devido à habituação ao cativeiro. Os ratos Wistar também diferiram quanto à idade, aumentando a exploração quando adultos. Embora a diferença entre os ratos Wistar jovens e adultos tenha sido pequena, é interessante notar que ela foi oposta à observada no grupo SEL, reforçando a possibilidade de diferenças específicas no desenvolvimento ontogenético da atividade exploratória destas linhagens. O grupo F01 apresentou atividade exploratória periférica levemente inferior àquela dos grupos SEL adulto e G01, não diferindo dos ratos Wistar. A atividade exploratória central do grupo F01 também foi inferior à destes grupos, sugerindo uma determinação poligênica deste comportamento, com contribuição de ambas as linhagens progenitoras.

A utilização do labirinto em cruz elevado no presente protocolo experimental foi de fundamental importância para confirmar a similaridade comportamental dos SHR do nosso biotério com aqueles de outras procedências. Tal como já havia sido demonstrado em estudo anterior (Nakamura-Palacios *et al.*, 1986), os nossos SHR apresentaram alta atividade exploratória dos braços abertos, confirmando os dados da literatura. Cabe salientar que os nossos SHR também apresentaram déficits de aprendizagem em testes de memória (Nakamura-Palacios *et al.*, 1986). No presente estudo, os SHR apresentaram um padrão de exploração inverso ao padrão classicamente descrito para os ratos WKY, explorando os braços abertos por mais tempo que os braços fechados.

Diferenças acentuadas entre as linhagens também foram observadas no teste do corredor. Em particular, os ratos Wistar apresentaram atividade exploratória, distância de alerta e amplitude de fuga acentuadamente menores que aquelas dos demais grupos. Em contraste, os ratos SEL, G01 e F01 apresentaram comportamentos virtualmente idênticos e limiares reduzidos de defesa (ou seja, distância de alerta e amplitude de fuga maiores). Os ratos selvagens, capturados ou nascidos em biotério, exploraram o ambiente com maior intensidade, possivelmente, devido às motivações mais acentuadas de mapear o ambiente desconhecido à procura de rotas de fuga, proteção, parceiros de um ou outro sexo, e alimentos. Por outro lado, a similaridade do comportamento dos ratos F01 e das linhagens selvagens puras (SEL e G01) indica a dominância do fenótipo selvagem neste tipo de teste. Notavelmente, a exploração do corredor, a distância de alerta e a amplitude de fuga dos ratos SEL, G01 e F01 foram 10 vezes maiores que os respectivos registros do grupo Wistar, sugerindo um claro efeito da domesticação. Saliente-se, neste caso, que as últimas respostas, que são características da exposição dos ratos a um predador, estão diretamente relacionadas às respostas obtidas por estimulação da MCPA. No presente modelo, em que o predador está sempre à vista, a distância de alerta foi idêntica à amplitude de fuga. Ou seja, a presa fugia até o final do corredor assim que detectava a aproximação do experimentador, resultando em valores iguais para os dois parâmetros. Este paradigma é diferente dos corredores retangulares ou ovais utilizados por Blanchard e colaboradores (1981, 1990). Nestes, o experimentador surpreende a presa, resultando numa distância de alerta inferior (3 m). A amplitude de fuga também era menor (3 m), pois a presa fugia para o lado oposto

do corredor oval (ou retangular) até o ponto em que perdia o experimentador de vista. Portanto, a diferença dos modelos parece explicar a diferença dos resultados. Ao contrário da alta reatividade dos ratos selvagens, os ratos Wistar limitavam-se a explorar poucos metros do corredor e não reconheciam a aproximação do experimentador como ameaçadora, prosseguindo em suas atividades exploratórias até a virtual ocorrência do contato físico.

Embora não tenhamos verificado a influência do sexo nestes experimentos, os resultados acima demonstram a influência marcante da linhagem, ambiente e experiências anteriores, por exemplo, a captura ou o desenvolvimento inicial em ambiente natural, nas respostas exploratórias da arena, no teste do corredor e no LCE, bem como um forte efeito da 'domesticação' na linhagem Wistar devida às pressões dirigidas de seleção da criação em biotérios.

## 5.2. LIMIARES DAS RESPOSTAS DE DEFESA INDUZIDAS POR ESTIMULAÇÃO DA MATÉRIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL NOS RATOS WISTAR MACHOS, WISTAR FÊMEAS E ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS

Os efeitos do sexo e da linhagem também foram revelados para a estimulação elétrica da MCPA, uma área reconhecidamente envolvida na deflagração das respostas de defesa, bem como dos seus componentes autonômicos. Comparados aos WISm, os grupos WISf e SHR apresentaram limiares mais elevados para a maioria das respostas de defesa. A única exceção foi a resposta de galope dos ratos WISm e WISf que apresentaram os mesmos limiares. Esta ausência de influência do sexo na resposta de galope é notável,

uma vez que esta é uma resposta crítica do comportamento de defesa do rato. Portanto, os presentes resultados aconselham a investigação da influência do sexo em animais castrados, ou através da monitoração do ciclo reprodutivo das fêmeas. Por fim, a frequência reduzida da resposta de defecação dos grupos WISf e SHR não permitiu o ajuste das curvas de limiares. Tampouco foram observadas diferenças entre grupos para as frequências máximas de resposta de defecação.

O grupo SHR demonstrou limiares mais elevados para todas as respostas de defesa que o grupo WISm. Adicionalmente, exceto pelas respostas de imobilidade e trote dos SHR, que não diferiram do grupo WISf, os limiares dos SHR também foram mais elevados que os observados nas fêmeas. Devido ao seu desempenho no LCE, acredita-se que a linhagem SHR seja menos ansiosa que a Wistar. Deakin e Graeff (1991) propuseram que as respostas de defesa induzidas por estimulação da MCPA são similares aos ataques de pânico e que estes são inibidos pela ansiedade. Com base nesta hipótese e no “perfil não-ansioso” dos grupo SHR, esperávamos que seus limiares fossem inferiores aos dos ratos Wistar, fato que não se confirmou. Ao contrário, os SHR apresentaram limiares mais elevados, contradizendo a hipótese de Deakin e Graeff (1991). Alternativamente, nossas premissas podem estar incorretas, ou seja, o SHR não é menos ansioso que os ratos WKY, ou a reação de defesa por estimulação da MCPA não é modelo adequado de ataques de pânico. É importante notar, no entanto, que a última premissa é parte integrante do modelo teórico de Deakin e Graeff (1991) e é apoiada por inúmeras evidências experimentais, inclusive, do nosso laboratório , (Schenberg *et al.*, 2001, Vargas e Schenberg, 2001).

### 5.3. LIMIARES DAS RESPOSTAS DE DEFESA INDUZIDAS POR ESTIMULAÇÃO DA MATÉRIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL NOS RATOS WISTAR MACHO, WISTAR MACHO APÓS ÉTER E RATOS SELVAGENS

O trabalho com ratos selvagens, capturados ou nascidos em biotério, exigiu a utilização de anestesia superficial para o seu manuseio. Portanto, incluímos um grupo controle de ratos Wistar que foram submetidos ao mesmo procedimento de anestesia com éter etílico. Embora o éter seja um anestésico geral, a exoftalmia foi a única resposta que apresentou aumentos dos limiares uma hora após a sua administração. Surpreendentemente, os limiares de galope e salto foram inferiores àqueles do grupo WISm, sugerindo um efeito “excitatório” tardio do éter. Embora existam hipóteses sobre o mecanismo de ação dos efeitos anestésicos do éter etílico, os mecanismos dos efeitos excitatórios tardios sobre as respostas de galope e salto são totalmente desconhecidos. Entretanto, efeitos euforizantes e alucinatórios do éter, que constituem a base de sua dependência química, foram descritos no final do século XVIII, muito antes da descoberta de suas propriedades como anestésico geral (Krenz *et al.*, 2003). Não obstante, o efeito facilitatório seletivo do éter sobre as respostas de galope e salto sugere uma maior susceptibilidade dos sistemas neurais que controlam estas respostas a esta substância. Em todo caso, a ausência de efeitos na maioria das respostas e a facilitação do galope e salto, bem como o aumento apenas moderado (22%) dos limiares de exoftalmia, não sugerem a presença de efeitos sedativos proeminentes do éter em ratos Wistar, uma hora após sua administração.

Similarmente aos grupos WISf e SHR, os ratos SEL apresentaram limiares mais elevados que os WISm para todas as respostas de defesa. Com exceção das respostas de exoftalmia e trote, os ratos SEL também apresentaram limiares mais elevados que aqueles do grupo WISmE. Os limiares mais elevados dos ratos SEL são surpreendentes dada a maior reatividade dos mesmos no teste do corredor, no qual apresentaram limiares de alerta e fuga 10 vezes menores que os ratos Wistar. Como a MCPA parece ser a estrutura mais caudal do sistema de defesa, a reatividade acentuada dos ratos SEL á aproximação do experimentador parece ser devida às estruturas supra-mesencefálicas responsáveis pelo reconhecimento do predador. Floyd *et al.*, (2000) demonstraram que o córtex orbitofrontal envia profusas projeções para o hipotálamo e a MCPA. Esta região frontal é composta por duas redes, orbital e medial, sendo a última o ponto de saída das projeções. No que diz respeito à MCPA, estas projeções formam três circuitos básicos direcionando-se, respectivamente, para as regiões ventrolateral, dorsolateral e lateral. Adicionalmente, dentre as colunas da MCPA, a coluna dorsolateral parece ser a estrutura crítica na deflagração das respostas de defesa. De fato, os limiares da MCPAdl à estimulação elétrica e química com NMDA são inferiores aos limiares das demais colunas (Bittencourt, 2003, Bittencourt *et al.*, 2003). Adicionalmente, Floyd e colaboradores. (2000) mostraram que a MCPAdl recebe aferências das divisões caudais das áreas pré-límbica e infralímbica e, em particular, das áreas dorsal e ventral do giro cingulado. As últimas recebem aferências diretas e indiretas do córtex visual (Vogt e Miller, 1983) que parecem estar envolvidas em processos de atenção executiva, isto é, mecanismos de atenção-para-ação (Devinsky *et al.*, 1995). O colículo superior também pode ser

responsável pela inicialização (*priming*) da MCPA aos estímulos exteroceptivos ameaçadores (Blanchard *et al.*, 1981, Redgrave e Dean, 1991). De fato, Blanchard e colaboradores (1981) mostraram que a lesão do colículo superior praticamente abole a resposta de fuga de ratos selvagens à aproximação do experimentador sem, no entanto, alterar a amplitude de fuga a um estímulo tátil. Portanto, as aferências periaquedutais do colículo superior e giro cingulado parecem operar paralelamente em processos de atenção executiva e reconhecimento de estímulos ameaçadores (Bittencourt *et al.*, 2003).

No entanto, os limiares mais elevados do grupo SEL também poderiam ser explicados pelo estresse de captura ou pela maior susceptibilidade destes animais aos efeitos sedativos do éter. De fato, a literatura é rica em exemplos de profundas modificações comportamentais de animais selvagens submetidos às condições de cativeiro. Dependendo da espécie, a captura e o cativeiro podem ser insuportavelmente penosos, podendo resultar em miopatia por estresse ou falência renal (Harthoorn *et al.*, 1974; Zbrozyna, 1976). Somente estudos posteriores com ratos selvagens nascidos em biotério e estimulados sem o auxílio de anestesia prévia com éter poderão responder a estas questões.

## 6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no teste do corredor, no LCE e pela estimulação elétrica da MCPA sugerem fortes influências da linhagem dos ratos, do ambiente e da experiência pregressa destes diferentes grupos de animais, contrariando as idéias clássicas de instinto e padrão de ação fixa.

Confirmando nossas hipóteses anteriores, os ratos Wistar apresentaram alto grau de domesticação, modificando grande parte de seu repertório comportamental, principalmente no que diz respeito à fuga e exploração.

A investigação da influência ontogenética sobre o comportamento exploratório na arena identificou algumas diferenças, principalmente, para o grupo de ratos SEL jovens com alta locomoção periférica e reduzida na região central, respostas que diminuem com a idade. O contrário foi observado no grupo G01.

As influências do sexo foram confirmadas na estimulação elétrica da MCPA, na qual o grupo WISf apresentou limiares maiores do que o grupo WISm, com exceção para a resposta de galope, uma resposta vital no comportamento de defesa. Tal fato sugere possíveis efeitos dos hormônios sobre o comportamento.

A utilização do éter etílico para manipulação dos ratos selvagens pode ter afetado seletivamente algumas das respostas que compõem o comportamento de fuga do animal. Os limiares tanto do galope quanto do salto destes ratos foram reduzidos

uma hora após a recuperação com éter, sugerindo um efeito excitatório tardio desta substância.

Exceto para o teste do corredor, os ratos selvagens apresentaram limiares mais elevados para todas as respostas de defesa do que os demais grupos. Alguns possíveis fatores que explicam esta contraditória condição seriam: 1) influência do ambiente e experiência pregressa, já que utilizamos apenas ratos capturados neste experimento; 2) efeitos do éter; 3) efeitos do próprio estresse da captura e, portanto, de hormônios, sobre as respostas dos ratos; e, 4) principalmente, influências de áreas supra-mesencefálicas responsáveis pelo reconhecimento do predador.

## 7. RESUMO

A estimulação da matéria cinzenta periaquedutal (MCPA) de ratos reproduz um conjunto de respostas comportamentais defensivas, mais especificamente, imobilidade (IMO), exoftalmia (EXO), trote (TRT), micção (MIC), defecação (DEF), galope (GLP) e saltos (SLT). O presente estudo averiguou a influência dos fatores genéticos, ambientais e sexuais nos limiares destas respostas. Para tal, utilizou-se ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) machos manuseados com éter (WME) e sem éter (WM), fêmeas (WF) ou espontaneamente hipertensos (SHR) e selvagens (*Rattus norvegicus sp.*) capturados (SEL) e criados em biotério (HBR e F01). Foram implantados eletrodos na MCPA dos ratos dos grupos WM (20), WME (21), WF (20) e SEL (14). Posteriormente, os ratos foram colocados numa arena circular de 60 cm de diâmetro e altura e estimulados com pulsos senoidais (0-70  $\mu$ A, 60 Hz). Os registros comportamentais foram feitos de forma binária, registrando a ocorrência ou ausência das respostas. Os grupos WM, SEL e HIB (cruzamento de Wistar e selvagem) foram submetidos ao teste de corredor que verificava a reatividade do animal ao predador (aproximação do experimentador), bem como a exploração do local por um período de 10 minutos. A fim de comprovar as diferenças comportamentais entre a linhagem SHR e a Wistar, utilizamos o labirinto-em-cruz-elevado (LCE), contabilizando o número de entradas nos braços abertos e fechados, bem como o tempo de permanência nestes. Por fim, os ratos dos grupos WM, SEL, F01 e HBR foram submetidos, quando jovens e quando adultos, ao teste exploratório da arena (a mesma utilizada na estimulação

elétrica da MCPA), na qual registrou-se o número de locomoção nos quadrantes periféricos, bem como na região central.

Os resultados foram analisados por meio do modelo logístico, fornecendo curvas de probabilidade de resposta e as intensidades medianas da população ( $I_{50}$ ). O comportamento dos grupos envolvidos no teste de exploração da arena apresentaram diferenças estatisticamente relevantes, tanto em relação à exploração periférica, quanto à exploração central. As diferenças na exploração periférica deveram-se à linhagem e à interação desta com a idade, com os maiores valores sendo observados para o grupo SEL jovens, seguido pelos grupos F01, HBR e, por último, WM. No teste do corredor, observou-se limiares reduzidos tanto para alerta quanto para a resposta de fuga ao predador para os grupos SEL, F01 e HBR, o que não ocorreu para o grupo WM. O grupo SHR, como esperado, apresentou maior número de entradas nos braços abertos do LCE, bem como maior tempo de permanência nestes, condição oposta no grupo WM, confirmando um nível de ansiedade possivelmente inferior nestes animais.

Na estimulação elétrica da MCPA, todas as respostas de defesa foram observadas para todos os grupos. No entanto, a resposta de defecação, em todos os grupos estimulados eletricamente, não forneceu ajustes significantes. Todas as respostas de defesa diferiram significativamente em relação ao grupo WM. Ao compararmos os grupos WM, WF e SHR, observamos, para todas as respostas, exceto para o GLP do grupo WF, limiares mais reduzidos para o primeiro grupo. O grupo SHR apresentou limiares mais elevados para as demais respostas, exceto para o trote quando comparado ao grupo WF.

Os resultados obtidos no teste de exploração da arena apresentam diferenças entre os grupos SEL jovens e F01 podem ter sido devidas aos ambientes diferentes nos quais eles se desenvolveram ou a um efeito específico do estresse da captura. Estas diferenças não foram observadas na idade adulta, possivelmente devido à habituação ao cativeiro. Adicionalmente, a inversão das respostas entre os grupos WM e SEL reforça a possibilidade de diferenças específicas no desenvolvimento ontogenético da atividade exploratória destas linhagens. No o teste do corredor, por sua vez, encontramos diferentes perfis motivacionais entre as linhagens, e ainda, indica uma dominância do fenótipo selvagem neste tipo de teste, fato este comprovado, principalmente, pelas respostas dos grupos F01 e HBR, ou seja, que não tiveram nenhum tipo de experiência pregressa em ambiente natural .

Os resultados obtidos nas sessões de estimulação elétrica da MCPA apontam para possíveis efeitos do sexo e da linhagem, particularmente para uma ausência da influência do sexo na resposta de GLP (WM x WF), uma vez que esta é uma resposta crítica do comportamento de defesa do rato. Tais resultados aconselham futuras investigação sobre a influência de hormônios nos animais do grupo WF. Os limiares mais elevados apresentados pelo grupo SHR contradizem a hipótese de Deakin e Graeff (1991), a qual afirma que elevados níveis de ansiedade inibem ataques de pânico, que são mimetizadas pelo nosso modelo experimental. Com relação às sessões de estimulações dos grupos WM, WME e SEL, notoriamente, o grupo SEL apresentou limiares mais elevados para todas as respostas de defesa quando comparados aos outros dois grupos, sugerindo possíveis efeitos do éter, assim como, o próprio estresse da captura e cativeiro,

além de influências de áreas supra-mesencefálicas sobre as respostas de defesa. O conjunto destas respostas apontam para a indiscutível influência de fatores ambientais, genéticos e de experiência prévia sobre a funcionalidade da MCPA resultando em comportamentos defensivos com uma maior dilatação estimulatória, possivelmente resultante de uma diferente avaliação do perigo oferecido pela estimulação ou pelo ambiente. Além destas respostas quantitativas, outras respostas qualitativas foram claramente observadas neste grupo de animais, como por exemplo, a agressividade intraespecífica e interespecífica, aversão à ambientes iluminados e baixa tolerância à substâncias como o éter e o hidrato de cloral.

## 8. ABSTRACT

Stimulation of dorsal periaqueductal gray matter of rats produces defensive responses of immobility (IMO), exophthalmus (EXO), trotting (TRT), micturition (MIC), defecation (DEF), running (RUN) and jumping (JUM). The present study appraised the importance of genetic, environmental and sexual factors in the threshold of these defensive responses. The groups of rats were divided in male (WM), with and without ether anesthetic induction (WME), and female (WF) Wistar rats, spontaneously hypertensive rats (SHR) (*Rattus norvegicus albinus*), or wild rats (*Rattus norvegicus sp.*) (WR) trapped in natural environment and born in lab (F01 and HBR).

Rats were implanted with electrodes aimed to the periaqueductal gray matter (WM=20, WME=21, WF=20, SEL=14), and stimulated with electrical sine-wave pulses (0-70  $\mu$ A, 60 Hz) in the open-field (60cm). Threshold curves were modeled through the logistic model, affording population estimates of median intensities, recording the occurrence or not of the behavior. The WM, SEL and HBR groups were submitted to the corridor test to estimate the exploratory and defensive responses. The SHR and WM groups were submitted to the plus-maze test to prove the typical SHR exploratory responses in the open arms. The number of exploratory behaviors in the open arms and closed arms, and the time expended in those explorations were recorded. The WM, SEL, F01 and HBR groups were submitted to the arena test when young and adult ages, recorded the locomotion through the central and peripheral areas to the open-field.

The WM, SEL, F01 and HBR groups revealed marked differences in the arena test. These differences showed some possibly influence of strain and age, with the highest values to the SEL young group, and F01 and HBR groups. In the corridor test, reduced thresholds were observed to the defensive and exploratory responses to the SEL, F01 and HBR groups. The opposite were recorded to the WM group, suggesting marked influence of domestication. The SHR group showed highest number of enters in the open arms and expended many time in the exploration, like usually do. The opposite condition were observed in the WM group.

To the the stimulation of dorsal periaqueductal gray matter, defensive responses were all observed whatever rat group. However, defecation responses lacked significant fit. Apart from the jumping response of WF rats, thresholds of remaining behaviors were significantly lower for WM rats. Thus, compared to this group, WF rats showed moderate threshold increases for IMO and JUM. Thresholds of defensive somatic responses of SHR and WR groups showed marked mean increases as compared to WM rats. There were also marked threshold increases for EXO in WR group. The present data suggest that both sex and genetic factors influence the defensive responses induced by electrical stimulation of PAGd.

The results of the arena test revealed differences in the young SEL group and F01 group. These differences coming of the strike different environments that the two groups developed, or proper the stress capture effect. These result don't occurred to the adult age of both groups, indicated a kind of habituation behavior to the captivity. Moreover, the opposite results of the WM and SEL groups reinforced

the specific differences in the ontogenetic development of the exploratory behavior in these strains. The corridor test revealed quite different motivational profiles that are too variable among the strains, yet the results of these tests indicated some phenotypic dominance especially to the responses of the F01 and HBR groups (the groups that haven't any kind of experience in the natural environment).

The results obtained in the intracranially electrical stimulation sessions to point out to possible effects of the sex and strains and an absence of sex influence in the GLP responses (WM and WF groups), a very important component of the rat defensive behavior. These results advise for future investigations about the hormone influence in the female rats (WF group). The highest thresholds showed by the SHR group contradict the Deakin & Graedd hypothesis (1991), that assert that highest levels of anxiety state inhibited panic attacks. These panic attacks are revealed in our experiments with defensive behavior, an animal model to human experience of these attacks.

The SEL group showed highest thresholds when compared with WM and WME groups for all defensive responses. The same thing doesn't occur with other both groups, suggesting possible ether effects and the effect of the capture stress and captivity environment. Other possibility is the influences of supramesencephalic projections to the PAG. The set of these responses to point out to indisputable influences of environment factors, genetic factors and learning (experience) in the PAG functions. The defensive behaviors assumed highest thresholds because the rats developed different risk assessment behavior or and different environments (stress and lab). Besides these quantitative responses,

other qualitative responses were obtained in these groups, e.g, the agonistic behavior, the aversion to the shining places and the low tolerance to some substances like ether and cloral hydrate.

## 9. REFERÊNCIAS

1. Adams DB (1979). Brain mechanisms for offense, defense and submission. *Behav. Brain Sci.*, 2: 201-241.
2. Alcock J (2001). Animal behavior. 7<sup>th</sup> ed. Massachussets : Sinauer.
3. Arita J, Hashimoto R e Kimura F (1991). The activity of catecholamine syntesis in the hypothalamus of female normotensive Wistar Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *Brain Res.*, 543: 157-159.
4. Bandler R e Keay KA (1996). Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray and the integration of emotional expression. *Prog. Brain Res.*, 107: 285-300.
5. Bandler R e Carrive P (1988) Integrated defence reaction elicited by excitatory amino acid microinjection in the midbrain periaqueductal grey region of the unrestrained cat. *Brain Research* 439: 95-106.
6. Bandler R e Depaulis A (1991). Midbrain periaqueductal control of defensive behavior in the cat and the rat. In: Depaulis A e Bandler R (Eds). *The Midbrian Periaqueductal Gray Matter: Functional, Anatomical and Neurochemical Organization*. New York: Plenum, 175-198.
7. Bandler R e Tork I (1987). Midbrain periaqueductal gray region in the cat has afferent and efferent connections with solitary tract nuclei. *Neurosci. Lett.*, 74: 1-6.
8. Beach FA (1961). Hormones and behavior. New York : Hoeber.
9. Benesová O e Benes V (1970). Interindividual differences in reactivity to stress in selected rats. *Activ. Nerv. Sup.*, 12: 176-178.

10. Bentley D e Hoy RR (1974). The neurobiology of cricket song. *Scientific American*, 231: 34-44.
11. Bittencourt AS (2003). Especialização funcional do teto do mesencéfalo: Propriedades intrínsecas da matéria cinzenta periaquedutal, colículo superior e das estruturas adjacentes. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES.
12. Bittencourt AS, Carobrez AP, Zamprogno LP, Tufik S e Schenberg LC (2003) organization of single components of defensive behaviors within distinct columns of periaqueductal gray matter of the rat: role of *n*-methyl-D-aspartic acid glutamate receptors. *Neuroscience* (submetido para publicação).
13. Blanchard DC, Blanchard RJ e Rogers, RJ (1991). Risk assessment and animal models of anxiety. In: Olivier B, Mos J, Slangen SL. Animal models in pharmacological sciences. Birkhäuser Verlag : Basel.
14. Blanchard DC, Blanchard RJ e Rogers, RJ (1990). Pharmacological and neural control of anti-predator in the rat. *Aggres. Behav.*, 16: 165-175.
15. Blanchard DC e Blanchard RJ (1989). Antipredator defensive behaviors in a visible burrow system. *J. Comp. Psychol.*, 103: 70-82.
16. Blanchard DC, Willians G, Lee MC e Blanchard RJ (1981). Taming of wild *Rattus norvegicus* by lesions of the mesencephalic central gray. *Physiological Psychology*, 9: 157-163.
17. Blanchard RJ e Blanchard DC (1977). Aggressive behavior in the rat. *Behav. Biol.*, 21: 197-224.

18. Blanchard RJ e Blanchard DC (1971). Defensive reactions in the albino rat. *Learn. Motiv.*, 2: 351-362.
19. Blanchard RJ e Blanchard DC (1970). Dual mechanisms in passive avoidance. *Psychon. Sci.*, 19: 3-4.
20. Blanchard RJ e Blanchard DC (1969a). Crouching as an index of fear. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 67: 370-375.
21. Blanchard RJ, Dielman TE e Blanchard DC (1969b). Post-shock crouching: familiarity with the stimulus situation. *Psychosom. Sci.*, 10: 371-372.
22. Blok BF e Holstege G (1996). The neuronal control of micturition and its relation to the emotional motor system. *Prog. Brain Res.*, 107: 113-126.
23. Blok BF e Holstege G (1994). Direct projections from the periaqueductal gray to the pontine micturition center (M-region). An anterograde and retrograde tracing study in the cat. *Neurosci. Lett.*, 166: 93-96.
24. Bolles RC (1970). Species-specific defense reactions and avoidance learning. *Psychol. Rev.*, 77: 32-48.
25. Broadhurst PL (1975). The Maudsley Reactive and Nonreactive strains of rats, a survey. *Behav. Genet.*, 5: 299-319.
26. Broadhurst PL (1969). Psychogenetics of emotionality in the rat. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 159: 806-824.
27. Broadhurst PL e Levine S (1963). Behavioural consistency in strains of rats selectively bred for emotional elimination. *Br. J. Psychol.*, 54: 121-125.
28. Broadhurst PL (1962). A note on further progress in a psychogenetic selection experiment. *Psychol. Rep.*, 10: 65-66.

29. Broom D (1981). *Biology of Behaviour*. New York : Cambridge University Press.
30. Brown JR, Ye H, Bronson RT, Dikkes P e Greenberg ME (1996). A defect in nurturin in mice lacking the immediate early gene fosB. *Cell*, 86: 297-309.
31. Canteras NS e Goto M (1999). Fos-like immunoreactivity in the periaqueductal gray of rats exposed to a natural predator. *NeuroReport*, 10: 413-418.
32. Canteras NS e Swanson LW (1992). The dorsal premammillary nucleus: an unusual component of the mammillary body. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 89: 10089-10093.
33. Carlson NR (2001). *Fisiologia do comportamento*. 7ed. São Paulo : Manole.
34. Cezário AF (2001) – Caracterização das funções comportamentais do núcleo pré-mamilar dorsal do hipotálamo. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES.
35. Changeaux JP (1985). *O homem neuronal*. Lisboa : Dom Quixote.
36. Cianarello RD, Lipsky A e Axelrod J (1974). Association between fighting behavior and catecholamine biosynthetic activity in two inbred mouse sublines. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 71: 3006-3008.
37. Cooper KW (1957). *Biology of eumenine wasps: V. Digital communication in wasps*. *J. Exp. Zool.* 134: 469-514.
38. Courvoisier H, Moisan MP, Sarrieau A, Hendley ED e Mormède P (1996). Behavioral and neuroendocrine reactivity to stress in the WKHA/Wistar inbred rat strains, a multifactorial and genetic analysis. *Brain Res.*, 743: 77-85.

39. Crews D (1996) Temperature-dependent sex determination: the interplay of steroid hormones and temperature. *Zoolog.Sci.* 13:1-13.
40. Darwin C (1872). A expressão das emoções no homem e nos animais. São Paulo : Companhia das Letras. *Reedição de 2000*.
41. Deakin JFW e Graeff FG (1991) 5-HT and mechanisms of defence. *J.Psychopharmacol.* 5: 305-315.
42. Devinsky O, Morrell MJ e Vogt BA (1995) Contributions of anterior cingulate cortex to behaviour. *Brain*, 118: 279-306.
43. Dörner G (1972). Sexualhormonabhängige Gerhindifferenzierung und sexualität. New York : Springer. (apud Eibl-Eibesfeldt, 1975).
44. Eibl-Eibesfeldt I (1958). Versuche über den Nestbau erfahrungsloser Ratten. Wiss. Film B 757, Göttingen (Inst. Wiss Film). (apud Eibl-Eibesfeldt, 1975).
45. Eibl-Eibesfeldt I (1961). The interactions of unlearned behavior patterns and learning in mammals. In: Delafresnaye JE. Brain mechanisms and learning. Oxford : Blackwell.
46. Eibl-Eibesfeldt I (1975). Etology: the biology of behavior. 2<sup>th</sup>. New York : Rinehart and Winston.
47. Fanselow MS (1991). The midbrain periaqueductal gray as a coordinator of action in response to fear and anxiety. In: Depaulis A and Bandler R (eds), The Midbrain Periaqueductal Gray Matter, Plenum, New York.
48. Fernandez de Molina A e Hunsperger RW (1962). Organization of the subcortical system governing defence and flight reactions in the cat. *J. Physiol.*, 160: 200-213.

49. Fernandez-Teruel A, Escorihuela RM, Castellano B, Gonzalez B e Tobena A (1997). Neonatal handling and enviromental enrichment effects on emotionality, novelty/reward seeling, and age-related cognitive and hippocampal impairments: focus on the Roman rat lines. *Behav. Genet.*, 27: 513-26.
50. Floyd NS, Price JL, Ferry AT, Keat KA e Bandler R (2000). Orbitomedial prefrontal cortical projections to diostinct longitudinal columns of the periaqueductal gray in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 422: 556-578.
51. Gentsch C, Lichtsteiner M e Feer H (1987). Open field and elevated plus-maze, a behavioural comparison between spontaneously hypertensive (SHR) and Wistar-Kyoto (WKY) rats and effects of chlordiazepoxide. *Behav. Brain Res.*, 25: 101-107.
52. Gilad VH, Rabey, JM, Eliyayek Y e Gilad GM (2000). Different effects os acute neonatal stressors and long-term postnatal handling on stress-induced changes in behavior and in ornithine decarboxylase activity of adult rats. *Brain Res. Dv.*, 14: 255-259.
53. Gray J (1991). *The Psychology of Fear and Stress*. Cambridge: Cambridge University.
54. Graybiel AM e Illing RB (1994). Enkephalin positive and acetylcholinesterase positive patch systems in the superior colliculus have matching distributions but distinct developmental histories. *J. Comp. Neurol.*, 340: 297-310.

55. Graybiel AM, Brecha N e Karten HJ (1984). Cluster and sheet pattern of enkephalin like immunoreactivity in the superior colliculus of the cat. *Neurosci.*, 12: 191-214.
56. Grohmann J (1939). Modifikation der Funktionsreifung? *Z. Tierpsychol.*, 2: 132-144 (apud Eibl-Eibesfeldt, 1975).
57. Harrington GM e Hanlon JR (1966). Heart rate, defecation and genetic differences in rats. *Psychon. Sci.*, 6: 425-426.
58. Harthoorn AM, Walt K e Young E (1974). Possible therapy for capture myopathy in captured wild animals. *Nat.*, 247: 557.
59. Hebb DO (1946). On the nature of fear. *Psychol. Rev.*, 53: 259-276.
60. Hess WR e Brugger M (1943). Das subkortikale Zentrum den affektiven Abwehrreaktion. *Acta Helv. Physiol.*, 1: 33-52. (apud Eibl-Eibesfeldt, 1975).
61. Hinde RA (1966). *Animal Behavior*. London : McGraw-Hill.
62. Hoffmann HJ, Schneider R e Crusio WE (1993). Genetic analysis of isolation-induced aggression: postnatal environmental influences in AB mice. *Behav. Genet.*, 23: 391-394.
63. Holst D von (1972). Renal failure as the cause of death in *Tupaia belangeri* exposed to persistent social stress. *J. Comp. Physiol.*, 78: 236-273.
64. Immelmann K (1983). *Introduction to ethology*. New York : Plenum.
65. Kirby RF, Callahan MF, Mccarty R e Johnson AK (1989). Cardiovascular and sympathetic nervous system responses to an acute stressor in Borderline Hypertensive Rats (BHR). *Physiol. Behav.*, 46: 309-313.
66. Knardhal S e Sagvolden T (1979). Open-field behavior of Spontaneously Hypertensive Rats. *Behav. Neural Biol.*, 27: 187-200.

67. Konishi M (1995). Neural mechanisms of auditory image formation. In: Gazanniga MS, Ed. The cognitive neurosciences. Cambridge: Mit.
68. Krech D, Rosenzweig MR e Bennet BA (1954). Enzyme concentrations in the brain and adjustive behavioral patterns. *Science*, 120: 994-996.
69. Krenz S, Zimmermann G, Kolly S e Zullino DF (2003). Ether: a forgotten addiction. *Addic.*, 98: 1167-1168.
70. Kruk MR, van der Laan CE, Meelis W, Phillips RE, Jan Mos e van der Poel AM (1984). Brain-Stimulation induced agonistic behaviour: a novel paradigm in ethopharmacological aggression research. In: K. A. Miczek, M. R. Kruk e B. Olivier (Eds.), *Ethopharmacological Aggression Research*, New York : Alan Liss.
71. Kruska D (1975a). Comparative quantitative study on brains of wild and laboratory rats. Comparison of size of allocortical brain centers. I. *J. Hirnforsch*, 16: 485-496.
72. Kruska D (1975b). Comparative quantitative study on brains of wild and laboratory rats. Comparison of size of allocortical brain centers. II. *J. Hirnforsch*, 16: 485-483.
73. Kulikov A, Aguerre S, Berton O, Ramos A, Mormede P e Chaouloff F (1997). Central serotonergic systems in the spontaneously hypertensive and LEW rats strains differ in the elevated plus-maze test of anxiety. *J. Pharmacol. Exper. Therap.*, 281: 775-784.
74. Kuo, Z.Y. (1967). The dynamics of behavior development: An epigenetic view. New York : Random House.

75. Kuo, Z.Y. (1932). Ontogeny of embryonic behavior in aves. *J Exp. Biol.* 61: 395-430.
76. Lamberty Y e Gower AJ (1996). Arm width and brightness modulation os spontaneous behavior of two strain of mice tested in the elevated plus-maze. *Physiol. Behav.*, 59: 439-444.
77. Lewin B (1997). *Genes*. New York : Oxford.
78. Lindauer (1952). Ein Beitrag zur Frage der Arbeitsteilung im Bienenstaat. *Z. Vergl. Physiol.*, 34: 299-345. (apud Eibl-Eibesfeldt, 1975).
79. Lipp HP e Hunsperger RW (1978). Threat, attack and flight elicited by electrical stimulation of the ventromedial hypothalamus of the marmoset monkey *Callithrix jacchus*. *Brain Behav.*, 15: 260-293.
80. Lorenz K (1995). Os fundamentos da etologia. São Paulo : UNESP.
81. Lorenz K (1963). Das sogenannte Böse. Vienna (Borotha-Schoeler). (apud Eibl-Eibesfeldt, 1975).
82. Lorenz K e Tinbergen N (1938). Taxis und Instinkthandlung in der Eirollbewegung der Graugans. *Z. Tierpsychol.*, 2: 1-29. (apud Eibl-Eibesfeldt, 1975).
83. Lovick TA (1991). Interactions between descending pathways from the dorsal and ventrolateral periaqueductal gray matter in the rat. In: Depaulis A e Bandler R (Eds), *The Midbrain Periaqueductal Gray Matter: Functional, Anatomical and Neurochemical Organization*. New York: Plenum.
84. McCarty R, Chiueh CC e Kopin IJ (1978). Behavioral and cardiovascular responses of spontaneously hypertensive and normotensive rats to inescapable footshock. *Behav. Biol.*, 22: 405-410.

85. McCarty R (1983). Stress, behavior and hypertension. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 7: 493-502.
86. McClearn GE e Rodgers DA (1972). Differences in alcohol preference among inbred strains of mice. *Q. J. Stud. Alcohol.*, 20: 691-695.
87. McFarland, D. (1986). *Animal Behavior. Science Technology.*
88. Mathis C, Neumann PE, Gerschenfeld SM e Crawley JN (1995). Genetic analysis of anxiety-related behaviors and response to benzodiazepine-related drugs in AXB and BXA recombinant inbred mouse strains. *Behav. Genet.*, 25: 557-568.
89. Melchers M (1963). Zur Biologie und zum Verhalten von *Cupiennius salei*, einer amerikanischen. *Ctenid. Zool. Jahrb. Syst.*, 91: 1-90. (apud Eibl-Eibesfeldt, 1975).
90. Montgomery KC (1955). The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, 48: 254-260.
91. Morgan MM e Carrive P (2001) Activation of the ventrolateral periaqueductal gray reduces locomotion but not mean arterial pressure in awake, freely moving rats. *Neurosci.*, 102: 905-910.
92. Mos J, Kruk MR, van der Poel AM e Meelis W (1982). Aggressive behavior induced by electrical stimulation in the midbrain central gray of male rats. *Aggr. Behav.*, 8: 261-284.
93. Nakamura-Palacios EM, Caldas CK, Fiorini A, Chagas KD, Chagas KN e Vasquez EC (1996). Déficits of spatial learning and working memory in spontaneously hypertensive rats. *Behav. Brain Res.*, 74: 217-221.

94. Okamoto K e Aoki K (1963). Development of a strain of Spontaneously Hipertensive Rats. *Jpn. Circ. J.*, 27: 282-293.
95. Oliveira GM, Rosa WCM e Nakamura-Palacios EM (1995). Effect of age and magnesium administration on the performance of SHR in the elevated plus-maze. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 28: 343-346.
96. Ossenkopp KP, Sorenson L e Mazmanian DS (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: 123-144.
97. Overstreet DH, Rezvani AH e Janowsky DS (1992). Maudsley Reactive and Nonreactive rats differ only in some tasks reflecting emotionality. *Physiol. Behav.*, 52: 149-152.
98. Paxinos G e Watson C (1986). The rat brain in stereotaxic coordinates. New York : Academic.
99. Peeler DF e Nowakowsky RS (1987). Genetic factors and the measurement of exploratory activity. *Behav. Neur. Biol.*, 48: 90-103.
100. Ramos A (2001). Genética do comportamento. <http://www.epub.org.br/cm/indexge.htm>
101. Ramos A e Mormède P (1998). Stress and emotionality: a multidimensional and genetic approach. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 22: 33-57.
102. Ramos A, Mellerin Y, Mormède P e Chaouloff F (1998). A genetic and multifactorial analysis of anxiety-related behaviours in LEW and SHR intercrosses. *Behav. Brain Res.*, 96: 195-205.

103. Ramos A, Berton O, Mormède P e Chaouloff F (1997). A multiple-test study of anxiety-related behaviours in six inbred rat strains. *Behav. Brain Res.*, 85: 57-69.
104. Redgrave P e Dean P (1991). Does the PAG learn about emergencies from the superior colliculus? In: Depaulis A e Bandler R, (Eds). *The Midbrain Periaqueductal Gray Matter: Functional, Anatomical and Neurochemical Organization*. New York: Plenum.
105. Richter CP (1959). Rats, man, and the welfare state. *Am. Psychol.*, 14: 18-28.
106. Roozendaal B, Wiersma A, Driscoll P, Koolhaas JM e Bohus B (1992). Vasopressinergic modulation of stress response in the central amygdala of the Roman high-avoidance and low-avoidance rat. *Brain Res.*, 596: 35-40.
107. Schenberg LC, Vasquez EC e Costa MB (1993). Cardiac baroreflex dynamics during the defence reaction. *Brain Res.*, 621: 50-58.
108. Schenberg LC, Bittencourt AS, Sudré ECM e Vargas LC (2001). Modeling panic attacks. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 25: 647-659.
109. Seitz A (1941). Die Paarbildung bei einigen Cichliden. *Tierpsychol.*, 5: 74-100. (apud Eibl-Eibesfeldt, 1975).
110. Silva AJ, Paylor R, Wehner JM e Tonegawa S (1992). Impaired spatial learning in alpha-calcium-calmodulin kinase II mutant mice. *Science*, 257: 206-211.
111. Spalding DA (1873). Instinct with original observation on Young animals. *MacMill. Mg.*, 27: 282-283.

112. Sudré ECM, Barros RR, Sudré GN e Schenberg LC (1993). Thresholds of electrically induced defence reaction of the rat: short and long-term adaptation mechanisms. *Behav. Brain Res.*, 58: 141-154.
113. Valentine CW (1930). The innate bases of fear. *J. Genet. Psychol.*, 37: 394-419.
114. Vargas LC e Schenberg LC (2001). Long-term effects of clomipramine and fluoxetine on dorsal periaqueductal gray-evoked innate defensive responses. *Psychopharmacol.*, 155: 260-268.
115. Vogel F e Motulsky AG (2000). Genética humana: problemas e abordagens. 3.ed. Rio de Janeiro : Guanabara-Koogan.
116. Vogt BA e Miller MW (1983) Cortical connections between rat cingulate cortex and visual, motor, and postsubicular cortices. *J. Comp. Neurol.* 216:192-210.
117. Williams RJ, Berry LJ e Beerstecher E (1949). Biochemical individuality: genotrophic factors in the etiology of alcoholism. *Arch. Biochem.*, 23: 275-290.
118. Zbrozyna AW (1976). Renal vasoconstriction in naturally elicited fear and its habituation in baboons. *Cardiov. Res.*, 10: 295-300.
119. Zhang SP, Bandler R e Carrive P (1990). Flight and immobility evoked by excitatory amino acid microinjection within distinct parts of the subtentorial midbrain periaqueductal gray of the cat. *Brain Res.*, 520: 73-82.

## 10. APÊNDICES

### APÊNDICE 1: PLANILHA DE REGISTRO DOS ITENS COMPORTAMENTAIS OBSERVADOS DURANTE SESSÕES DE ESTIMULAÇÃO COM VARIAÇÃO DA INTENSIDADE DE UM PULSO SENOIDAL NOS DIFERENTES RATOS.

Rato Nº: 04 Peso: 250 g Responsável: Raner Póvoa

Localização do eletrodo: Matéria cinzenta periaquedutal dorsal

Data de implante: 12/02/2002 Data de perfusão: 03/03/2002

Coordenadas	Zero	Varição	Implante
Anteroposterior	53.7	- 7.2	46.5
Lateral	13.5	-0.7	12.8
Vertical	21.0	-4.8	16.2

$\mu\text{A}$	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70
Dormir	x														
Repouso		x													
Olfação		x	x	x											
Esquadrinhar				x	x	x									
Autolimpeza															
Levantar				x	x	x									
Marcha					x	x									
Exoftalmia							x	x	x						
Imobilidade							x	x	x	x	x				
Mistacioplegia															
Defecação										x	x				
Micção									x		x				
Trote								x	x						
Galope										x	x				
Salto											x				

Obs.: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

## APÊNDICE 2: PLANILHA DE REGISTRO DAS FREQUÊNCIAS RELATIVAS (FR) E ACUMULADAS (FA) DE UM ÍTEM COMPORTAMENTAL

Grupo: SHR      Resposta: imobilidade      Local: MCPAd

Sessão: 1      Responsável: Raner

RATO	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70
1								1							
3										1					
4									1						
21														1	
24							1								
27						1									
29											1				
35											1				
40						1									
41												1			
44										1					
47														1	
48												1			
49														1	
50						1									
52					1										
61			1												
63				1											
65									1						
66										1					
FR	0	0	0	1	2	3	1	1	2	3	2	2	3	0	0
FA	0	0	0	1	3	6	7	8	10	13	15	17	20	20	20

**APÊNDICE 3: PLANILHA DE REGISTRO DO DESEMPENHO DOS RATOS NO LABIRINTO EM CRUZ-ELEVADO E NO SETOR CENTRAL DA ARENA**

<b>Rato</b>	<b>Braço Fechado</b>	<b>Braço Aberto</b>	<b>ARENA</b>	<b>DATA</b>
1	Entradas: 5 Tempo: 4'41" (281") %: 93	Entradas: 0 Tempo: 0 %: 0	4	12/09/02
2	Entradas: 6 Tempo: 3'52" (232") %: 77	Entradas: 0 Tempo: 0 %: 0	6	12/09/02
3	Entradas: 1 Tempo: 4'57" (297") %: 99	Entradas: 0 Tempo: 0 %: 0	0	12/09/02
4	Entradas: 5 Tempo: 4'08" (248") %: 82	Entradas: 3 Tempo: 05' %: 1.4	1	12/09/02
5	Entradas: 2 Tempo: 4'50" (290") %: 96	Entradas: 0 Tempo: 0 %: 0	7	12/09/02
6	Entradas: 2 Tempo: 4'22" (262") %: 87	Entradas: 1 Tempo: 06" %: 2	11	12/09/02
7	Entradas: 2 Tempo: 42" %: 14	Entradas: 5 Tempo: 2'09" (129") %: 43	12	19/09/02
8	Entradas: 1 Tempo: 30" %: 11	Entradas: 4 Tempo: 3'11" (191") %: 63	11	19/09/02
9	Entradas: 4 Tempo: 4'08" (248") %: 82	Entradas: 2 Tempo: 33" %: 11	15	19/09/02
10	Entradas: 5 Tempo: 1'58" (108") %: 36	Entradas: 5 Tempo: 1'33" (93") %: 31	4	19/09/02