



**Universidade de Brasília**  
**Instituto de Psicologia**  
**Pós-Graduação em Ciências do Comportamento**

**Análise fisiológica e comportamental de modelos animais  
desenvolvidos geneticamente para o estudo da ansiedade e da  
Doença de Alzheimer**

Tese de Doutorado

**Marcelo de Faria Salviano**

Brasília, DF

Março de 2013



**Universidade de Brasília**  
**Instituto de Psicologia**  
**Pós-Graduação em Ciências do Comportamento**

**Análise fisiológica e comportamental de modelos animais  
desenvolvidos geneticamente para o estudo da ansiedade e da  
Doença de Alzheimer**

**Marcelo de Faria Salviano**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências do Comportamento do Instituto de Psicologia da Universidade de Brasília como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências do Comportamento – Área de Cognição e Neurociências do Comportamento.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Pedro de Mello Cruz

Co-Orientador: Prof. Dr. Richard E. Brown

Brasília, DF

Março de 2013

Análise fisiológica e comportamental de modelos animais desenvolvidos geneticamente para o estudo da ansiedade e da Doença de Alzheimer.

Tese de Doutorado defendida diante e avaliada pela banca examinadora constituída por:

---

Prof. Dr. Antonio Pedro de Mello Cruz (Presidente/Orientador)

Universidade de Brasília / IP / PPB –UnB

---

Prof. Dr. Jesus Landeira Fernandez (Membro)

Pontifícia Universidade Católica /RJ

---

Prof. Dr. Francisco Dyonísio Cardoso Mendes (Membro)

Universidade de Brasília / IP / PPB –UnB

---

Prof. Dr. José Eduardo Pandóssio (Membro)

Universidade de Brasília / IP / PPB –UnB

---

Prof. Dr. Sérgio Henrique de Souza Alves (Membro)

Centro Universitário de Brasília – UniCEUB

Instituto de Educação Superior de Brasília – IESB

---

Profa. Dra. Graziela Furtado Scarpelli Ferreira (Suplente)

Universidade Católica de Brasília – UCB

Dedico essa tese aos meus pais pelo constante suporte,  
amor e educação exemplar.

Ofereço à minha esposa amada, Wanessa, que me  
apoiou em todos os momentos, principalmente nas  
horas mais difíceis.

## Agradecimentos

Agradeço primeiramente aos meus orientadores, Pedro e Richard, pelos ensinamentos e dedicação ao meu processo de aprendizagem.

À amiga Graziela Ferreira pelo suporte constante desde o meu mestrado, por viabilizar a utilização em parceria das estruturas do seu antigo laboratório no IESB e por ter sido sempre prestativa durante a execução dos experimentos.

Aos amigos Marília Carvalho e Kalliu Couto pela ajuda na execução dos experimentos e suporte nas etapas iniciais.

Ao IESB e todos os funcionários do biotério por disponibilizarem a estrutura laboratorial para a execução dos experimentos iniciais.

Ao Instituto Federal de Brasília (IFB), pelo apoio à minha capacitação e pela licença concedida para execução do estágio no exterior.

Aos coordenadores de Ensino do IFB campus Planaltina e às colegas da cadeira de Biologia Silvia Fernandes e Diane Fiamoncini pelo suporte durante meu período de licença.

À CAPES pelo suporte financeiro durante o estágio no exterior.

Ao prof. Landeira e ao Vitor Gomes pelo envio das linhagens geneticamente selecionadas e pelas constantes reflexões científicas.

Aos funcionários do programa de pós-graduação do PPB, em especial à Joyce Novais, pelo constante suporte às demandas administrativas e prestatividade na resolução dos problemas.

Aos professores do departamento de Psicologia da UnB, pelos ensinamentos e orientações, especialmente ao prof. Gerson Janczura.

Ao departamento de Cirurgia Experimental da Faculdade de Saúde da UnB e à Livia Santana pelo apoio na coleta dos dados fisiológicos dos ratos.

Ao Laboratório de Farmacologia Molecular da UnB por ter viabilizado a análise fisiológica realizada e à minha ex-orientadora Marília Barros, pelo suporte nessa etapa do projeto.

Aos colegas Kurt Stover, Timothy O'Leary e Rhian Gunn pela ajuda durante toda minha estadia no laboratório da Dalhousie University, por todos os ensinamentos transmitidos e suporte nas etapas de coleta de dados e escrita dos artigos.

Aos professores Heather Schellinck e Vincent LoLordo pelo suporte logístico e pelas reflexões científicas.

À Dalhousie University e ao Psychology and Neuroscience Department, especialmente ao prof. Richard Brown, por terem viabilizado o processo de intercâmbio no exterior e por todo o suporte e ajuda oferecidos para minha boa convivência no novo lar. Graças a eles pude vivenciar uma experiência única em minha vida: conhecer e fazer parte da cultura canadense e renovar minha motivação pela ciência.

Às minhas irmãs, demais familiares e todos os amigos que participaram dessa jornada, sempre me apoiando e incentivando nos momentos difíceis.

# ÍNDICE

Abreviaturas.....	1
Lista de Figuras.....	3
Lista de Tabelas.....	5
Resumo.....	6
Abstract.....	8
1. Introdução.....	10
1.1. Modelos genéticos de comportamento.....	12
1.2. O desenvolvimento de modelos genéticos para o estudo da ansiedade.....	13
1.2.1. Neurofisiologia do medo/ansiedade.....	15
1.2.1.1. Papel do eixo HPA.....	15
1.2.2. Modelo de condicionamento aversivo.....	17
1.2.3. Modelos etologicamente fundamentados.....	18
1.2.4. Modelos de ansiedade baseados na seleção genética.....	20
1.2.4.1. Linhagens com altos e baixos padrões de congelamento.....	21
1.2.5. Interações entre os modelos animais.....	23
1.3. Modelos animais de manipulação genética para o estudo da Doença de Alzheimer.....	24
1.3.1. Fatores genéticos da doença de Alzheimer.....	25
1.3.2. Modelos genéticos animais da Doença de Alzheimer.....	26
1.3.3. Efeitos ambientais e fatores de risco.....	28
2. Objetivos e planejamento experimental.....	30
3. Relevância do estudo.....	32
4. Experimento I.....	33
4.1. Métodos.....	33
4.1.1. Experimento I.1.....	34
4.1.1.1. Caixa de condicionamento de medo ao contexto.....	35
4.1.1.2. Análise de corticosterona.....	36
4.1.2. Experimento I.2.....	36

4.1.2.1. Equipamentos e análise comportamental.....	37
4.1.2.2. Procedimento experimental.....	39
4.1.3. Análise estatística.....	40
4.2. Resultados.....	41
4.2.1. Experimento I.1 – Concentração de corticosterona.....	41
4.2.2. Experimento I.2.....	41
4.3. Discussão.....	45
5. Experimento II.....	51
5.1. Métodos.....	51
5.1.1. Condições de alojamento.....	51
5.1.2. Pesagem.....	52
5.1.3. Testes comportamentais.....	52
5.1.4. Análise estatística.....	61
5.2. Resultados.....	61
5.3. Discussão.....	74
6. Discussão Geral.....	83
7. Referências Bibliográficas.....	87
8. Anexos.....	112
Artigo referente ao experimento I	
Artigo referente ao experimento II	

“Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e de repente, você estará fazendo o impossível.” – São Francisco de Assis

“Ciência é buscar e duvidar, provar e refutar, inovar e decepcionar, conceitos base para o desenvolvimento” – Marcelo Salviano

## Abreviaturas

<b>3xTgAD</b>	Linhagem com três mutações da Doença de Alzheimer familiar
<b>5-HT1A</b>	Receptor serotoninérgico subtipo 1A
<b>5xFAD</b>	Linhagem com cinco mutações da Doença de Alzheimer familiar
<b>ACTH</b>	Hormônio adrenocorticotrópico
<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>APOE</b>	Apolipoproteína E
<b>APP</b>	Proteína precursora de $\beta$ -amilóide
<b>A<math>\beta</math></b>	$\beta$ -amilóide
<b>C57BL/6J</b>	Linhagem controle não-transgênica
<b>CAC</b>	Carioca de Alto Congelamento
<b>CBC</b>	Carioca de Baixo Congelamento
<b>CHF</b>	Carioca High Freezing
<b>CLF</b>	Carioca Low Freezing
<b>CRF</b>	Fator de liberação de corticotropina
<b>CS</b>	Estímulo condicionado
<b>DA</b>	Doença de Alzheimer
<b>EPM</b>	Erro padrão da média
<b>FAD</b>	Doença de Alzheimer familiar
<b>FISH</b>	Linhagem Fisher
<b>FRL</b>	Flinders Resistant Line
<b>FSL</b>	Flinders Sensitive Line
<b>HPA</b>	Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal
<b>LCE</b>	Labirinto em Cruz Elevado
<b>LEW</b>	Linhagem Lewis
<b>LTP</b>	Potenciação a longo prazo
<b>MCP</b>	Matéria Cinzenta Periaquedutal
<b>NFT</b>	Enovelados neurofibrilares
<b>RHA</b>	Linhagem Roman High Avoidance
<b>RLA</b>	Linhagem Roman Low Avoidance
<b>S5</b>	Quinta geração da seleção genética
<b>S9F1</b>	Filhotes da nona geração, antes de serem selecionados
<b>SERT</b>	Transportador de serotonina
<b>SHR</b>	Spontaneously Hipertensive Rats
<b>SMA</b>	Eixo simpático-medular adrenal
<b>TAG</b>	Transtorno de Ansiedade Generalizada
<b>Tg2576</b>	Linhagem transgênica para a Doença de Alzheimer

<b>TNF</b>	Teste do Nado Forçado
<b>US</b>	Estímulo incondicionado
<b>WKHA</b>	Wistar Kyoto-derived hyperactive rats
<b>WKHT</b>	Wistar Kyoto-derived hypertensive rats
<b>WKY</b>	Linhagem Kyoto

## Lista de Figuras

- Figura 1.** Representação esquemática do circuito de ativação neuroendócrina frente.....Pg.16  
a um estímulo aversivo.
- Figura 2.** Representação da hipótese A $\beta$  intraneural causadora da Doença de Alzheimer.....Pg.25
- Figura 3.** Esquema ilustrativo da caixa de condicionamento da resposta de congelamento...Pg.35
- Figura 4.** Ilustração do Labirinto em Cruz Elevado utilizado no experimento I.....Pg.37
- Figura 5.** Concentrações de corticosterona das linhagens CAC e CBC da .....Pg.41  
5ª geração imediatamente após o 2º dia do teste de medo condicionado e uma semana  
depois, sem exposição prévia ao teste.
- Figura 6.** Comportamentos de machos e fêmeas das linhagens CAC e CBC da .....Pg.43  
10º geração submetidos ao labirinto em cruz elevado.
- Figura 7.** Comportamentos de machos e fêmeas das linhagens CAC e CBC da .....Pg.44  
10º geração submetidos ao teste do nado forçado.
- Figura 8.** Percentual de congelamento no segundo dia do teste de medo condicionado .....Pg.45  
ao contexto em ratos machos e fêmeas das linhagens CAC e CBC da 10º geração.
- Figura 9.** Foto do labirinto em cruz elevado utilizado no experimento II. ....Pg.54
- Figura 10.** Foto da caixa de transição claro-escuro utilizada no experimento II. ....Pg.55
- Figura 11.** Foto do teste do nado forçado utilizado no experimento II. ....Pg.56
- Figura 12.** Foto do teste de suspensão pela cauda utilizado no experimento II. ....Pg.57
- Figura 13.** Foto do labirinto aquático de Morris utilizado no experimento II. ....Pg.57
- Figura 14.** Ilustração das posições das plataformas utilizadas no labirinto aquático de .....Pg.59  
Morris utilizado no experimento II.
- Figura 15.** Foto da caixa de condicionamento utilizada no experimento II. ....Pg.60

**Figura 16.** Foto da caixa de teste de memória à pista sonora utilizada no experimento II. ....Pg.61

**Figura 17.** Peso corporal de camundongos machos e fêmeas da linhagem 5xFAD e do .....Pg.62 grupo controle, antes e depois do período de isolamento social.

**Figura 18.** Índice de reatividade dos camundongos do experimento II durante a.....Pg.63 primeira manipulação aos 6 meses de idade.

**Figura 19.** Comportamentos de camundongos machos e fêmeas das linhagens 5xFAD e ....Pg.65 controle submetidos ao labirinto em cruz elevado.

**Figura 20.** Comportamentos de camundongos machos e fêmeas das linhagens 5xFAD e ....Pg.66 controle submetidos à caixa de transição claro/escuro.

**Figura 21.** Comportamentos de camundongos machos e fêmeas das linhagens 5xFAD e.....Pg.68 controle submetidos ao teste do nado forçado e ao teste de suspensão pela cauda.

**Figura 22.** Comportamentos de camundongos machos e fêmeas das linhagens 5xFAD e ....Pg.71 controle submetidos ao labirinto aquático de Morris.

**Figura 23.** Percentual de congelamento no teste de medo condicionado ao contexto .....Pg.72 em camundongos machos e fêmeas das linhagens 5xFAD e controle.

**Figura 24.** Percentual de congelamento no teste de medo condicionado discreto em .....Pg.73 camundongos machos e fêmeas das linhagens 5xFAD e controle.

## **Lista de Tabelas**

**Tabela 1.** Escala de reatividade do camundongo à manipulação do experimentador.....Pg.53

**Tabela 2.** Resumo esquemático dos efeitos de condições de alojamento, genótipo e .....Pg.75  
sexo em camundongos 5xFAD e seu grupo controle analisado em vários testes  
comportamentais.

## Resumo

Diversos modelos animais geneticamente modificados têm sido recentemente utilizados no estudo experimental de funções psicológicas e psicopatologias. Usualmente, tais modelos são desenvolvidos por meio de cruzamentos seletivos bidirecionais ou pela engenharia genética, tais como animais *knock in*, *knock out* ou transgênicos. O presente estudo analisou a correlação fisiológica e comportamental de dois modelos genéticos diferentes. No experimento 1, machos da 5ª geração de uma nova linhagem de ratos Wistar selecionados para alta (CAC) ou baixa (CBC) resposta de congelamento ao contexto foram utilizados para avaliar o nível sanguíneo de corticosterona e ratos machos e fêmeas da 10ª geração foram utilizados para avaliar reações indicativas de ansiedade no labirinto em cruz elevado (LCE), comportamento indicativo de depressão no teste do nado forçado (TNF), assim como medo condicionado ao contexto. As medidas fisiológicas indicaram concentrações semelhantes de corticosterona nos machos das linhagens CAC e CBC da 5ª geração. Nos testes comportamentais da 10ª geração, as fêmeas da linhagem CAC apresentaram maior nível de comportamento indicativo de ansiedade do que a linhagem CBC, assim como maior congelamento ao contexto previamente associado ao choque elétrico. Os machos apresentaram comportamentos indicativos de ansiedade semelhantes entre as linhagens e maior congelamento ao contexto da linhagem CAC comparado à CBC. No TNF, não houve diferenças entre as linhagens ou entre os sexos analisados. Essas diferenças nas respostas emocionais da nona geração de ratos selecionados, somados a resultados prévios de outras gerações, indicam um potencial uso desse modelo no estudo de correlações entre traço de ansiedade e reações de defesa. No segundo experimento, foram investigados os efeitos do isolamento social sobre o comportamento de camundongos machos e fêmeas transgênicos para a doença de Alzheimer (cepa 5xFAD) e seu grupo controle (B6SJL) submetidos a uma bateria de testes que incluíram testes de reatividade à manipulação, ansiedade, desamparo aprendido e memória e aprendizagem. Os resultados mostraram que o isolamento social, especialmente entre camundongos fêmeas, causou perda de peso, aumento de reatividade à manipulação e diminuição de comportamento indicativo de depressão, mas não afetou medidas de ansiedade e atividade locomotora. Além disso, fêmeas isoladas tiveram prejuízo na memória de medo condicionado ao contexto e um pequeno prejuízo na memória visuo-espacial. Camundongos 5xFAD tiveram menores níveis de comportamentos indicativos de ansiedade e depressão, mas sem prejuízos

cognitivos significativos comparados com o grupo controle, e os 5xFAD isolados não se mostraram mais sensíveis aos efeitos da separação do que animais controle. Desses resultados, concluímos que o período de um mês de isolamento social não foi suficiente para induzir comportamentos indicativos de depressão, mas afetou a memória espacial e a aversiva de camundongos fêmeas. A validação desses dois modelos animais geneticamente modificados para simular experimentalmente transtornos de ansiedade e a doença de Alzheimer em humanos é discutida.

**Palavras-chave:** modelos animais geneticamente modificados, linhagens, modelos animais de ansiedade, doença de Alzheimer, 5xFAD.

## Abstract

Several animal models genetically modified have recently used in the experimental study of psychological functions and psychopathologies. These models are usually developed through bidirectional selective breeding or by using genetic engineering, such as *knock in*, *knock out* or transgenic animals. The present study further analyzed behavioral and physiological correlates of two different genetic models. In experiment 1, males from the 5<sup>TH</sup> generation of new lines of Wistar rats selectively bred for high (CHF) and low (CLF) contextual freezing response were used to analyze blood corticosterone levels and males and females from the 10<sup>th</sup> generation were used to investigate anxiety-like reactions in the elevated plus-maze (EPM), depressive-like behavior in the forced swim test (FST) as well as contextual fear conditioning. Physiological measures showed similar corticosterone concentrations in males from both lines CHF and CLF. Behavioral results of the 10<sup>th</sup> generation showed that female CHF line rats had higher anxiety-like behavior compared to CLF line and higher freezing in a context previously associated with electric shock as well. Male rats showed similar anxiety-like behavior between both lines and a higher contextual freezing of CHF line compared to CLF. In FST, there were no differences between lines or sexes. These differences in emotionality responses from the tenth generation of selected rats, added to previous results from other generations, indicates a potential use of this model in the study of correlations between anxiety trait and defensive reactions. In a second experiment, we investigated the effects of social isolation on behavior of male and female transgenic mice of Alzheimer disease (5XFAD strain) and their B6SJL wildtype (WT) littermates in a test battery including wildness, anxiety, behavioral despair and learning and memory tests. Our results indicate that social isolation, especially between female mice, caused body weight loss, increased wildness scores and decreased depression-like behavior but did not affect measures of anxiety or locomotion activity. Furthermore, isolated females showed an impaired context conditioned fear memory and a minor impaired visuo-spatial memory. The 5xFAD mice had impaired anxiety and depressive-like behaviors, but no significant impairments on cognition were found, and 5xFAD isolated mice were not more sensitive to the effects of separation than their wildtype littermates. From these results we conclude that the period of one month of social separation was not enough to induce behavioral despair but it did affected spatial memory and aversive memory of female mice. The validity of these two animal models

genetically modified to experimentally simulate anxiety disorders and Alzheimer disease in humans is discussed.

**Keywords:** genetic animal model, strains, animal models of anxiety, Alzheimer disease, 5xFAD.

## 1. Introdução

Modelos animais são amplamente utilizados no estudo experimental de funções psicológicas. No entanto, muitas vezes tornam-se limitados quando transpostos para o estudo de transtornos comportamentais em humanos. Uma das razões é que doenças psicológicas têm etiologias multifatoriais e sintomatologia complexa, influenciadas por diferenças interindividuais, genes, fatores ambientais, entre outros. Além disso, o traço para um determinado transtorno pode se expressar de maneira diferente em indivíduos de uma mesma população, ainda que esses estejam sob a influência dos mesmos fatores ou variáveis psicológicas.

Um passo muito importante no campo da pesquisa experimental vem sendo o desenvolvimento de modelos animais geneticamente modificados para acentuar ou superexpressar determinados traços de um dado transtorno comportamental. Com isso, espera-se haver uma reprodução mais válida dos traços patológicos de sujeitos portadores de um transtorno.

Uma das dificuldades enfrentadas em estudos que manipulam características genéticas é a associação correta de um traço comportamental e aquilo que ele representa na patologia estudada. Não são raros os casos onde características comportamentais são manipuladas geneticamente com o intuito de se investigar sua influência sobre um traço emocional, porém deve-se certificar que elas estão de fato correlacionadas. No intuito de desenvolver linhagens de ratos com traços exacerbados de ansiedade, por exemplo, Broadhurst et al. (1958, 1975) selecionaram animais que apresentavam altos índices de defecação em um teste de ansiedade (campo aberto), sendo essa característica considerada em muitos estudos como um índice indicativo de ansiedade. No entanto, outros estudos mostraram que mesmo após muitas gerações esses animais não demonstraram níveis elevados de ansiedade medidos em outros testes diferentes daqueles em que os animais vinham sendo selecionados, como o labirinto em cruz elevado e o teste de esquiva condicionada (Paterson et al, 2001). As características manipuladas geneticamente, portanto, devem ser analisadas cuidadosamente quando se busca o desenvolvimento de modelos animais geneticamente modificados na pesquisa experimental de transtornos comportamentais tipicamente humanos.

O estudo de inúmeras características genéticas em humanos apresenta uma série de restrições éticas e metodológicas, visto a necessidade de isolar e analisar os diversos fatores relacionados à causa e efeito das mesmas. Por isso, busca-se modelos animais que possam substituir o homem como objeto de estudo. Esses permitem uma maior abrangência no sentido de se esclarecer mecanismos neurofisiológicos relacionados ao comportamento, minimizando as restrições acima citadas associadas aos estudos em humanos (Lassalle, 2007).

Para que um modelo animal seja validado, ele deve ser avaliado de acordo com os critérios de semelhança, previsibilidade e homologia (Blanchard et al., 2001; Graeff & Zangrossi, 2003; Treit et al., 1993). A semelhança diz respeito ao grau de similaridade fenomenológica entre o comportamento humano e o comportamento definido operacionalmente no modelo empregado, enquanto a previsibilidade visa estabelecer correlações entre os efeitos de uma mesma droga na clínica e no modelo animal. Dessa forma, se um tratamento farmacológico demonstra, por exemplo, efeito ansiolítico ou ansiogênico de um dado composto no modelo animal, esse deve induzir os mesmos efeitos na clínica, e vice-versa. Finalmente, a homologia pressupõe que as mesmas variáveis psicobiológicas envolvidas na etiologia e tratamento do transtorno em humanos atuem também no modelo animal.

Diversos modelos animais com nematelmintos, moscas-da-fruta, cachorros domésticos, ratos e camundongos, têm sido utilizados na tentativa de explicar (1) as variações genéticas envolvidas no processo cognitivo, na personalidade, psicopatologias, e adicção; (2) as causas que levam a essas diferenças; (3) a influência do meio ambiente e do convívio social sobre a expressão gênica; e (4) seus efeitos no comportamento do animal. Com isso, será possível desvencilhar ou entender a interação entre as causas genéticas e as causas ambientais como fatores de variação do comportamento, e ainda identificar com exatidão os respectivos genes responsáveis (Maxson, 2007).

Atualmente, esses modelos vêm sendo desenvolvidos basicamente de duas formas distintas: através de seleções genéticas mantidas por várias gerações ou através do desenvolvimento de organismos geneticamente modificados por meio de engenharia genética. Em ambos os casos, a avaliação de alterações comportamentais é parte crucial do desenvolvimento do modelo genético animal em questão.

## 1.1. Modelos genéticos de comportamento

O meio ambiente influencia a expressão dos genes. Esses, por sua vez, influenciam o comportamento do indivíduo (Landgraf & Wigger, 2003). Portanto, o fenótipo (incluindo o comportamento) se dá em função do genótipo, do ambiente e da relação gene-ambiente e gene-gene. A maioria dos fenótipos relacionados com os estudos cérebro-comportamento lidam com traços complexos, em que múltiplas variáveis interferem no resultado. Uma pessoa pode, por exemplo, ter um fenótipo fixo (herdado dos pais), porém expressar genótipos momentaneamente ativos, resultado da ativação de genes em instantes particulares ao longo da vida (Jones, 2007).

Os fatores genéticos exercem grande influência sobre as diferenças inter-individuais e tais diferenças podem ser acessadas, dentre outras formas, através do comportamento dos animais (Ramos & Mormede, 2007). Tomando essa influência como verdadeira, pode-se supor que cruzamentos seletivos baseados no comportamento podem influenciar a característica de uma população. Hendley et al. (1983), Landgraf & Wigger (2002) e Ramos et al. (2003), por exemplo, demonstraram claramente que cruzamentos seletivos, mantidos por várias gerações, criam populações com níveis comportamentais e neurofisiológicos diferenciados das linhagens de origem. Um grande número de novas linhagens de ratos e camundongos já foi desenvolvido através da seleção de diferentes fenótipos como altos e baixos níveis de defecação (Blizard & Adams, 2002), de vocalização ultrasônica (Brunelli & Hofer, 1996), de pressão arterial (Hendley et al., 1983), de resistência à imobilidade (Weiss et al., 1998) e de níveis de comportamentos de resposta emocional ou processos de aprendizagem (Gomes & Landeira-Fernandes, 2008; Liebsch et al, 1998b; Ponder et al, 2007; Ramos et al, 2003).

Com o intuito de se produzir animais geneticamente selecionados, ratos e camundongos têm sido muito utilizados por apresentarem um curto período de vida, uma vez que um grande número de gerações é necessário, e por serem filogeneticamente próximos aos seres humanos. Além disso, eles têm um alto potencial biótico, gerando uma grande prole em pouco tempo. Outra vantagem desses animais é o fato do seu genoma já ter sido completamente seqüenciado, viabilizando estudos genéticos mais refinados (Lassalle, 2007). Um tipo de seleção que vem sendo praticada é através de endocruzamentos (irmão x irmã), e quando são obtidas 20 gerações

de animais dessa forma, passam a ser chamados de uma linhagem isogênica (Lassale, 2007). Atualmente, existem centenas de linhagens isogênicas de roedores obtidos segundo esse critério, sendo alguns deles extensivamente utilizados, como é o caso dos ratos Wistar Kyoto (WKY), Lewis (LEW), Fisher (FISH), dentre outros.

Ao identificar diferenças comportamentais causadas pela seleção genética, deve-se averiguar se o traço selecionado é, de fato, responsável pela característica apontada, uma vez que uma informação genética pode ser responsável por dois ou mais traços diferentes e vice-versa. Hendley et al. (1983), em um estudo genético feito com ratos, utilizaram linhagens de animais naturalmente hipertensos (SHR, do inglês *spontaneously hypertensive rats*) que, além de apresentarem pressão sanguínea elevada, também se mostravam comportamentalmente mais ativos quando expostos a ambientes novos ou familiares. Apesar de existirem muitas razões que justifiquem uma ligação gênica entre esses fenótipos (pressão sanguínea e atividade locomotora) (Tucker & Johnson, 1981), Hendley e Ohlsson (1991) mostraram que esses traços se segregavam independentemente, uma vez que foram capazes de produzir duas novas linhagens a partir das SHR: uma hipertensa mas normotativa (WKHT) e outra normotensa mas hiperativa (WKHA). Essas técnicas de cruzamentos seletivos vêm sendo muito utilizados para o estudo de transtornos psicológicos, como a ansiedade.

## **1.2. O desenvolvimento de modelos genéticos para o estudo da ansiedade**

Todo animal está sujeito a diversas ameaças e pressões do seu meio, seja por um possível predador ou por uma tarefa a ser cumprida a tempo. Para superar tais situações, seu organismo é capaz de se adaptar, resultando, por exemplo, em um estado emocional mais apropriado aos estímulos ambientais presentes. Entre as emoções mais evidenciadas frente a situações dessa natureza destacam-se o medo e a ansiedade (Calabrese et al., 2007). O primeiro ocorre principalmente quando a integridade física do indivíduo está sob risco iminente de um estímulo/situação definido, enquanto o segundo é caracterizado por um perigo potencial, não tão evidente ou não conscientemente percebido (LeDoux, 1998). Ambos parecem estar intimamente

associados, estando o circuito neural do medo inclusive envolvido em alguns tipos de ansiedade (LeDoux, 1998).

O medo e a ansiedade são emoções normais que aumentam a chance de sobrevivência frente a diferentes tipos de estímulos estressógenos e, portanto, têm um valor adaptativo importante (Blanchard et al., 2003; Graeff & Hetem, 2004; Nesse, 1999). Ademais, a ansiedade pode ser identificada sob dois aspectos gerais. O primeiro, denominado ansiedade-traço, refere-se à predisposição de um indivíduo para reagir com maior ou menor grau de ansiedade diante de uma situação potencialmente ameaçadora. O traço é determinado por fatores genéticos e ambientais (Graeff & Hetem, 2004). O segundo aspecto, denominado ansiedade-estado, está relacionado ao momento de vida do indivíduo, ou seja, um estado emocional transitório. Esse varia de acordo com um evento estressógeno (Lister, 1990).

Um grau moderado de ansiedade é considerado um facilitador para resolução de tarefas cognitivas (Calabrese et al., 2007; Diamond et al., 1999; Nicholas et al., 2006). Porém, é uma resposta desconfortável e não-prazerosa que induz alterações comportamentais, psicofisiológicas e cognitivo-subjetivas (Calabrese et al., 2007). Ademais, o grau de exigência a que estamos submetidos atualmente tem sido apontado como um dos principais fatores para o aparecimento de psicopatologias relacionadas ao excesso de medo ou ansiedade. Portanto, a ansiedade pode se tornar patológica no homem em virtude de sua intensidade e/ou duração frente a um determinado estímulo/situação (Graeff, 1989; Sapolsky, 1993).

O controle das emoções traz vantagens evolutivas, especialmente em animais sociais, como os mamíferos. Aparentemente, os animais mais complexos foram selecionados segundo o mesmo padrão de respostas de defesa, uma vez que tais padrões aumentam significativamente as chances de sobrevivência do animal. Isso pode significar que eles apresentam mecanismos emocionais semelhantes, viabilizando então o uso de modelos animais (Nesse, 1999). Para isso deve-se investigar detalhadamente a natureza e fatores intervenientes dos distúrbios emocionais em questão, assim como as alterações neurofisiológicas causadoras de transtornos de medo/ansiedade para que se tenha uma melhor concepção de saúde e bem estar dos indivíduos, incluindo-se aqui, os seres humanos.

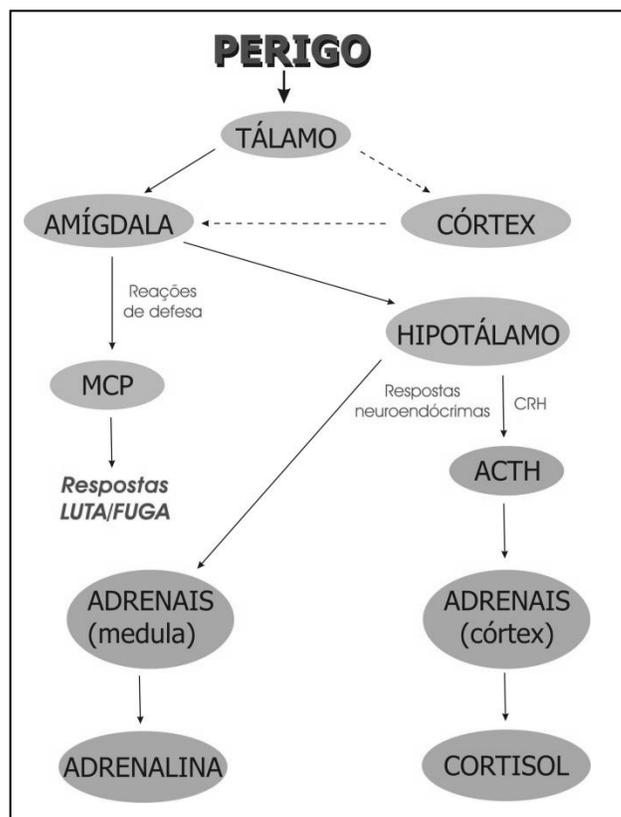
### 1.2.1. Neurofisiologia do medo/ansiedade

O circuito neural envolvido no medo/ansiedade (normal e patológico) envolve, primeiramente, a percepção e integração das informações sensoriais advindas dos estímulos sinalizadores de perigo (inatos ou aprendidos). Durante e após o processamento sensorial, as informações resultantes são enviadas ao tálamo que, por sua vez, projeta para a amígdala. Essa última pode ocorrer por dois caminhos distintos; uma via direta (tálamo-amígdala) e uma indireta fazendo interface com regiões corticais (tálamo-córtex-amígdala; Figura 1). As informações provenientes da primeira via chegam aos núcleos laterais da amígdala, que organizam uma série de reações fisiológicas e comportamentais para a defesa do organismo. As informações vindas da via tálamo-córtex-amígdala são enviadas pelo tálamo para o córtex cerebral, o qual, após análise mais refinada das informações de perigo, projeta para a amígdala, uma importante estrutura relacionada ao processamento de aspectos mnemônicos e emotivos (Fanselow & LeDoux, 1999).

A amígdala, por sua vez, emite um comando para duas outras estruturas: a matéria cinzenta periaquedutal (MCP) e o hipotálamo (Kim & Gorman, 2005). A MCP é responsável, dentre outros aspectos, pela deflagração dos principais componentes comportamentais do padrão de luta/fuga. Já o hipotálamo comanda diversas reações neuroendócrinas.

#### 1.2.1.1. Papel do eixo HPA

Conforme ilustrado na Figura 1, uma das respostas do hipotálamo frente a um estímulo aversivo é regulada pela sua porção lateral, que envia impulsos nervosos, através da medula espinhal, para a porção medular das glândulas supra-renais, objetivando a liberação de adrenalina (eixo simpático-medular adrenal; SMA). Através do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), entra em cena um segundo padrão de reação fisiológica. O hipotálamo paraventricular comanda o fator de liberação de corticotropina (CRF, do inglês *corticotropin-releasing factor*) que, através de uma atuação na hipófise (ou pituitária), faz com que a glândula libere na corrente sanguínea o hormônio adrenocorticotrópico (ACTH). O ACTH atuará, por sua vez, na porção cortical das glândulas supra-renais, ordenando que essa libere glicocorticóides, em especial o cortisol (Korte, 2001). A dosagem de cortisol no sangue de primatas ou corticosterona em roedores pode, portanto, ser utilizada como uma medida do grau de ativação do eixo HPA e, possivelmente, do nível de medo e ansiedade em animais (Andersen et al., 2004; Kim & Gorman, 2005).



**Figura 1.** Circuito de ativação neuroendócrina frente a um estímulo aversivo. (Baseado em Fanselow & LeDoux, 1999).

A ativação do eixo HPA está diretamente relacionada com transtornos de ansiedade e depressão (Lanfumeey et al., 2008), além de modular a consolidação da memória em tarefas motivadas por estímulos aversivos (Marchand et al., 2007). Tal efeito pôde ser constatado ao ser demonstrado que déficits no medo condicionado ao contexto de animais adrenalectomizados podem ser prevenidos pela administração de corticosterona tanto antes quanto depois do condicionamento (Pugh et al., 1997). Por outro lado, estudos sobre a ativação do eixo HPA feito em linhagens de ratos selecionados com altos e baixos níveis de aprendizado na tarefa de esquivo ativa de duas vias (RHA e RLA, respectivamente) mostraram dados controversos (Carrasco et al., 2008). Já foi relatada uma maior liberação de ACTH pela linhagem RHA, assim como

ausência de diferenças hormonais entre as linhagens RHA e RLA (Castanon et al., 1992), ou mesmo maiores concentrações de ACTH e corticosterona em animais da linhagem RLA sob estresse, mas não em estado basal (Gentsch et al., 1982). O papel do eixo HPA sobre o desenvolvimento de psicopatologias ainda não está totalmente elucidado e estudos que visem o seu melhor entendimento contribuiriam para a validação de novos modelos animais com base no critério da homologia, visto a equiparação entre os processos psicofisiológicos.

Com o intuito de ampliar nosso conhecimento acerca das bases biológicas das emoções – normais e patológicas – diferentes testes/modelos experimentais têm sido desenvolvidos com base no comportamento dos animais. Os modelos experimentais empregados no estudo do medo e ansiedade podem ser, essencialmente, classificados em dois tipos: os testes baseados na etologia e os baseados na aprendizagem, que serão discutidos a seguir.

### **1.2.2. Modelo de condicionamento aversivo**

Um modelo animal de ansiedade baseado em aprendizagem amplamente utilizado desde a década de 1980 é o teste de medo condicionado ao contexto e discreto, que é baseado nos comportamentos de resposta dos animais a estímulos aversivos (Bouton & Bolles, 1980). Esse modelo consiste em uma forma de condicionamento pavloviano onde os animais são treinados a associar um estímulo neutro (p.ex. um som, uma luz ou um determinado contexto ambiental) a um estímulo aversivo (p.ex. um choque elétrico). Depois que essa associação é formada, o animal passa a apresentar reações de medo diante do estímulo condicionado aversivo. A associação aversiva pode ser conseguida com apenas uma única sessão e permanecer por muito tempo.

A resposta de congelamento é altamente adaptativa, pois movimentos tornam o animal mais detectável por seus predadores, já que costumam atacar preferencialmente presas móveis ao invés de imóveis (para revisão, ver Fendt & Fanselow, 1999).

Uma contribuição atual dos modelos animais é o fato de eles se mostrarem altamente eficientes quanto à ação de drogas psicotrópicas. Os animais experimentais são ferramentas vivas primordiais para o desenvolvimento de novos medicamentos mais eficazes e com menos efeitos

colaterais (Graeff, 1999). Sendo assim, as primeiras análises farmacológicas mostraram que modelos de conflito tinham maior valor preditivo que os de supressão condicionada (Zangrossi & Graeff, 2004). Entretanto, os testes de conflito foram pouco eficazes para detectar os efeitos ansiolíticos de drogas que atuam primariamente sobre a neurotransmissão serotoninérgica. Tais estudos reforçaram o uso de modelos etológicos, uma vez que esses se mostraram mais eficientes para fins farmacológicos (Cruz et al., 1997).

### **1.2.3. Modelos etologicamente fundamentados**

Os modelos etologicamente fundamentados visam à manipulação direta das variáveis independentes, interferindo minimamente em outros mecanismos psicobiológicos, como memória, dor e atenção (Cruz et al., 1997; Ferreira, 2005) e sem que haja a necessidade de treino prévio ou condicionamento do comportamento do animal (File & Hyde, 1978). Nesse caso, os estímulos manipulados experimentalmente fazem parte da ecologia do animal e induzem estados de ansiedade de maneira inata. Para ratos, por exemplo, o odor ou o som de um felino são estímulos que sinalizam a presença potencial desse felino, desencadeando reações fisiológicas e comportamentais de defesa (Blanchard & Blanchard, 1998; Blanchard et al., 1993).

Um dos primeiros modelos animais de ansiedade utilizados nesse sentido foi o teste de interação social, validado na década de 1970 por File e Hyde (1978). Esse consistiu na utilização de uma forma natural do comportamento de ratos, a interação social, como medida dependente. Era medido o tempo de interação social (cheirar, seguir ou catar o parceiro) entre um par de ratos machos. Tais procedimentos tinham algumas vantagens em relação aos modelos de aprendizagem, uma vez que dispensavam a privação de comida ou água, aplicação de choques elétricos ou de treinamentos prévios extensos.

Atualmente, existem diversos modelos animais etologicamente fundamentados sendo extensivamente utilizados (para uma revisão, ver Cruz et al., 1997), incluindo transição claro/escuro, vocalização ultrasônica, interação presa-predador, campo aberto e o labirinto em cruz elevado (Blanchard et al., 1990, 1993; Cruz et al., 1997; Pellow et al., 1985; Rodgers et al., 1997). Vale ressaltar que esse último foi utilizado no presente trabalho e portanto será descrito a seguir com mais detalhes.

O Labirinto em Cruz Elevado (LCE) foi desenvolvido por Handley e Mithani (1984) e validado farmacológica, fisiológica e comportamentalmente por Pellow et al. (1985). O LCE é um modelo animal etologicamente baseado no medo natural de roedores a espaços abertos e a alturas. Pela sua simplicidade, validade ecológica e sensibilidade bidirecional (utilizado para drogas ansiolíticas e ansiogênicas), esse modelo apresenta inúmeras vantagens no estudo da ansiedade (Cruz et al., 1997; Pellow et al., 1985). Por exemplo, esse é um ótimo modelo para o desenvolvimento de novas drogas ansiolíticas e ansiogênicas, não requer treinamento dos animais – o que encurta o tempo do experimento – e possui um baixo custo experimental.

A exposição ao LCE consiste em introduzir ratos na encruzilhada de quatro braços, dois abertos e dois fechados, dispostos perpendicularmente uns aos outros e elevados 50 cm em relação ao solo. Quando ratos são expostos a essa situação experimental, tendem a evitar os braços abertos, permanecendo mais tempo nos braços fechados. Vale ressaltar que o espaço aberto é, mais do que a altura e a novidade do ambiente, a principal causa do comportamento de defesa (Treit et al., 1993).

O comportamento de defesa do animal no modelo do LCE é computado a partir de índices tradicionais de exploração: número de entradas e tempo de permanência nos braços abertos. Além dos índices convencionais de comportamento de defesa, outras medidas comportamentais de ansiedade vêm sendo investigadas no LCE. Alguns padrões de comportamento de avaliação de risco (*risk assessment*) têm se mostrado mais sensíveis do que as categorias clássicas da simples avaliação da exploração, particularmente no que se refere aos resultados do efeito ansiolítico esperado de agonistas 5-HT<sub>1A</sub> (Cole & Rodgers, 1994; Cao & Rodgers, 1997; Griebel et al., 1997). Cruz, Frei e Graeff (1994), utilizando uma análise etofarmacológica do comportamento de ratos no LCE, categorizaram outras medidas etológicas de comportamentos que eram alteradas em sentidos opostos por drogas ansiolíticas (nitrazepam e midazolam) e ansiogênicas (pentilenotetrazol e FG-7142). Assim, diversos estudos passaram também a utilizar, além das medidas clássicas, as denominadas medidas etológicas para mensurar comportamentos de defesa (que estão correlacionados com a ansiedade) em animais expostos ao modelo do LCE. Essas consistiam nos comportamentos de espreitar, esquadrihar e exploração das extremidades dos braços abertos. O primeiro, interpretado como um comportamento indicativo de maior ansiedade, consiste na saída parcial do animal dos braços

fechados, colocando a cabeça e as patas dianteiras na plataforma central ou nas entradas dos braços abertos, freqüentemente acompanhado de um estiramento do corpo. Os demais são interpretados como um indicativo de menor ansiedade, onde esquadrihar é considerado quando o animal coloca a cabeça em direção ao precipício do braço aberto, olhando em qualquer direção, e exploração das extremidades quando o animal alcança a porção final de um dos braços abertos até que sua cabeça fique para fora do aparato.

Vale ressaltar que a maioria dos testes comportamentais mencionados avalia a ansiedade-estado dos animais, ou seja, como eles enfrentam uma situação aversiva em um dado momento. Portanto, não correspondem necessariamente a transtornos de ansiedade humanos, que são caracterizados por um estado crônico de ansiedade. Tais deficiências estariam mais fortemente relacionadas a distúrbios na ansiedade-traço desses indivíduos. A fim de aprimorar o teor seletivo dos modelos animais utilizados frente ao seu valor de semelhança, previsibilidade e homologia, tem-se estudado o comportamento de ratos e camundongos selecionados ao longo das gerações para expressarem em maior ou menor grau uma determinada característica, a exemplo de animais mais ou menos ansiosos. Assim, tais testes avaliam a ansiedade-traço dos animais experimentais (para revisão, ver Ramos & Mormede, 1998; Staay, 2006).

#### **1.2.4. Modelos de ansiedade baseados na seleção genética**

Nos últimos 50 anos, foram desenvolvidos diversos modelos animais de ansiedade, cuja utilidade para o desenvolvimento de novos compostos ansiolíticos e para a compreensão das bases psicobiológicas da ansiedade é indiscutível (Blanchard et al., 2003). Contudo, de uma maneira geral, esses modelos apresentam uma limitação muito importante ao manipularem, na verdade, reações de defesa plenamente adaptativas de um organismo frente a uma ameaça em potencial (Cruz et al., 1997). Qualquer indivíduo está sujeito a diferentes níveis de medo/ansiedade, podendo se comportar de forma diferenciada a algum tipo de teste ou modelo. Por exemplo, qual a patologia relacionada ao comportamento de um rato ao evitar os braços abertos de um labirinto em cruz elevado (supostamente um ambiente aversivo) ou ao exibir a postura de congelamento em um contexto potencialmente ameaçador (choques elétricos)? Baseados nessas perguntas que permanecem sem resposta, alguns pesquisadores têm até mesmo

questionado o uso desses modelos como fontes de acesso às bases psicobiológicas da ansiedade patológica.

Na busca de um modelo que solucionasse parte desse problema, vêm sendo desenvolvidas linhagens de diferentes roedores com níveis altos ou baixos de medo/ansiedade, avaliados em diversos testes animais de ansiedade, incluindo o LCE (p.ex., Conti et al., 2004; Liebsch et al., 1998a), o campo aberto (p.ex. Ramos et al., 2003) e o medo condicionado (Gomes & Landeira-Fernandez, 2008; Ponder et al., 2007). Vale ressaltar que um modelo animal representa ou corresponde a um comportamento análogo em humanos, enquanto que o teste avalia e induz tal comportamento. O teste se refere ao processo no qual as observações são cuidadosamente coletadas em experimentos padronizados. O modelo é desenvolvido por meio de um consenso entre os experts das áreas do conhecimento (Staay, 2006).

Outro fator abordado por esse tipo de procedimento é a análise dos fatores genéticos sobre o comportamento dos animais. A maioria dos testes comportamentais avalia a ansiedade-estado dos animais, ou seja, como eles enfrentam uma situação aversiva em um dado momento. O estudo de animais com diferentes níveis de ansiedade, por meio do uso de linhagens com altos e baixos índices de reações de defesa, fornece dados mais fiéis sobre a interação gene-ambiente e pode explicar as diferenças encontradas em pacientes que apresentam respostas fisiológicas e comportamentais diferenciadas, mesmo se tratando de um mesmo tratamento farmacológico ou psicológico (Belzung & Griebel, 2001; Mormède & Ramos, 1999).

#### **1.2.4.1. Linhagens com altos e baixos padrões de congelamento**

Muitos modelos animais de ansiedade com roedores são altamente sensíveis a fatores ambientais, mas não têm associações claras quando comparados com humanos (Wahlsten et al., 2006). Por outro lado, o aprendizado ao medo e à ansiedade também é visto em humanos. Apesar de existirem correlações neuroanatômicas e farmacológicas dessas respostas, a influência genética ainda não foi totalmente elucidada. De fato, o medo aprendido parece ser um fator hereditário tanto em roedores (Caldarone et al., 1997) quanto em humanos (Hettema et al., 2003). Além disso, a neuroanatomia envolvida em tal processo é similar nos dois organismos (LeDoux, 2000). Portanto, procedimentos associativos de condicionamento aversivo vêm sendo utilizados na tentativa de selecionar ratos com diferentes traços de reações de defesa diante

de estímulos ou contextos que sinalizam perigo em potencial (Ponder et al., 2007; Sartori et al., 2011a; Steckler et al., 2008).

Uma análise fatorial feita por Brigman et al. (2009), comparando medidas de medo condicionado e de comportamentos relacionados à ansiedade de várias linhagens isogênicas de camundongos, mostrou uma sobreposição de ambos os comportamentos no mesmo fator, sugerindo que ambos mensuram o mesmo tipo de estado emocional. Dessa forma, o uso do medo condicionado ao contexto tem se mostrado um teste comportamental confiável para a seleção de animais com diferentes perfis de ansiedade e no desenvolvimento de novos modelos genéticos do comportamento baseado em fenótipos emocionais diferentes (Ponder et al., 2007; Radcliffe et al., 2000; Wehner et al., 1997).

Uma linhagem de cruzamento seletivo baseado no percentual de congelamento no paradigma do medo condicionado tem sido desenvolvida independentemente em diferentes laboratórios e o fenótipo selecionado tem sido mantido por muitas gerações (Gomes & Landeira-Fernandez, 2008; Ponder et al., 2007; Radcliffe et al., 2000; Wehner et al., 1997). Essas linhagens podem ser úteis no desenvolvimento de modelos animais que tenham uma correlação mais próxima de patologias emocionais como o transtorno da ansiedade generalizada (Gomes et al., 2011).

Ao se utilizar tais modelos de aprendizagem ao medo para a produção de linhagens genética e comportamentalmente diferentes, é importante averiguar se os traços selecionados são realmente referentes a uma diferença no sistema de emoção do animal ou se ao processo de aprendizagem em si. Surge, então, a necessidade de submeter a linhagem selecionada a outros modelos animais que visem esclarecer esse tipo de associação. Pode-se utilizar, para isso, modelos como o labirinto aquático de Morris, para averiguar diferenças no processo de aprendizado, concomitantemente a testes de ansiedade, como o campo aberto, labirinto em zero elevado e o teste de transição claro/escuro (Ponder et al., 2007) ou, ainda, o próprio LCE (Liebsch et al., 1998b).

Para se avaliar os efeitos de uma manipulação genética ou farmacológica sobre fatores distintos como emocionalidade, capacidade cognitiva, habilidade motora e sensorial, o

comportamento de um mesmo animal tem sido investigado não apenas em um único tipo de teste comportamental, mas em uma bateria deles (Fraser et al., 2010).

### **1.2.5. Interações entre os modelos animais**

A utilização de uma bateria, ou sequência, de testes comportamentais deve ser feita considerando os possíveis efeitos da repetição de testes e a influência de cada teste sobre o subsequente. Para minimizar tal interferência, tem-se utilizado baterias de testes comportamentais seguindo uma ordem de testes: do menos para o mais aversivo (Andreatini & Bacellar, 1999; Fraser et al., 2010).

Um estudo realizado por Andreatini e Bacellar (1999), por exemplo, avaliou a correlação entre o comportamento de animais submetidos ao teste do nado forçado (TNF) e ao LCE, com um grupo exposto ao LCE seguido da exposição ao TNF (LCE – TNF) e outro grupo na ordem inversa (TNF – LCE). As exposições em cada modelo tiveram um intervalo de 7 dias e ambos os grupos foram comparados com animais que não foram expostos a testes preliminares, apenas manipulação (HAND-TNF e HAND-LCE). O referido estudo não encontrou diferenças no TNF entre os animais submetidos previamente ao LCE ou à manipulação (LCE-TNF x HAND-TNF), enquanto que a mudança dessa ordem influenciou o comportamento dos animais no segundo teste. A execução do TNF uma semana antes do LCE (TNF-LCE), em comparação aos animais que foram apenas manipulados (HAND-LCE), diminuiu a porcentagem de tempo nos braços abertos, sugerindo um efeito ansiogênico.

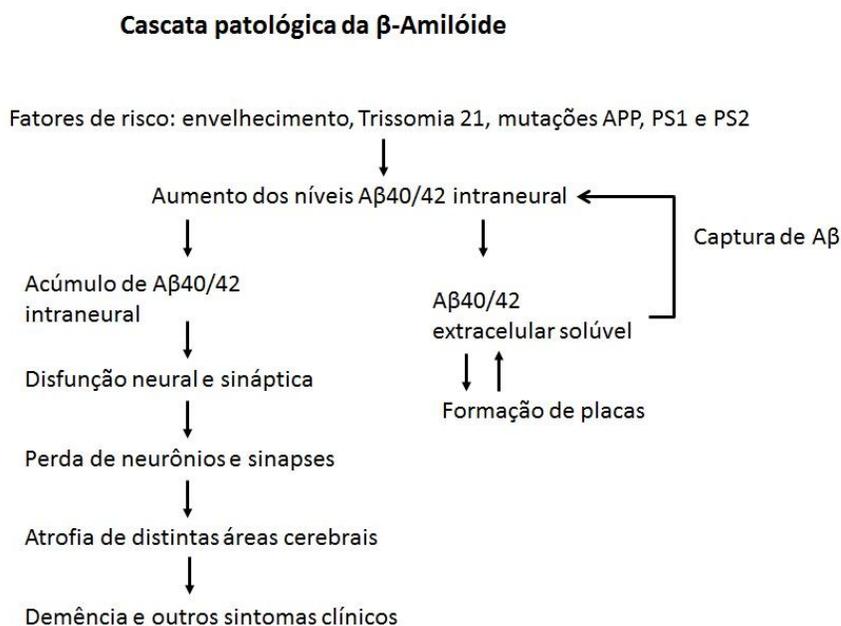
Outros estudos mostram ainda a interferência de uma bateria de testes com intervalos menores, como 24 horas, ou até mesmo sem intervalo entre cada exposição (Fraser et al., 2010). Dessa forma, ao se utilizar uma bateria de testes comportamentais deve-se levar em consideração o intervalo entre os testes, os tipos de testes e a ordem dos mesmos para que não se tenha problemas relacionados a interferência (para revisão, ver Schellinck et al., 2010).

### 1.3. Modelos animais de manipulação genética para o estudo da doença de Alzheimer

A Doença de Alzheimer (DA) é um transtorno neurodegenerativo progressivo caracterizado pela redução da capacidade cognitiva, da memória, da habilidade de fala, da coordenação motora, da orientação espacial e distúrbios de emoção como irritabilidade e depressão (Forstl & Kurz, 1999; Trobe et al., 1996). Atualmente vem crescendo acentuadamente o número de casos de pessoas com demência no mundo, com 35,6 milhões de pessoas em 2010 (World Alzheimer Report, 2010). No Brasil, esse número é estimado em 7,1% da população acima dos 65 anos de idade. Considerando que o número de portadores da DA representa 50-60% dos casos de demência (Ferri et al., 2005), a incidência da doença é significativa e tende a duplicar nos próximos 20 anos, uma vez que o número de pessoas idosas vem crescendo. O diagnóstico da doença não é simples, pois, principalmente nos primeiros estágios, confunde-se com sintomas do processo de envelhecimento normal e de outros casos de demência (Gauthier et al., 2006). O diagnóstico definitivo só pode ser feito com exame pós-morte do tecido neural com a identificação de enovelados neurofibrilares (NFT) e placas amilóides (Waldemar et al., 2007).

A neuropatologia que caracteriza a DA vem sendo sustentada pela hipótese das placas amilóides por mais de 20 anos. Segundo essa hipótese, as patologias associadas à DA são causadas pelo depósito de proteínas amilóides e que o acúmulo de NFT, neurodegeneração, danos vasculares e demência ocorrem como consequência desse evento (Hardy & Allsop, 1991). Um dos principais argumentos que sustentam essa hipótese surgiu a partir de estudos genéticos que investigaram casos de Doença de Alzheimer Familiar (FAD, do inglês *familial Alzheimer disease*) (Bertram et al., 2010). Descobriu-se que as formas familiares da DA apresentam mutações no gene que produz a proteína precursora de  $\beta$ -amilóide (APP) ou das enzimas que fragmentam essas proteínas (PS1 e PS2), resultando num acúmulo de fragmentos anormais dessa proteína (principalmente A $\beta$ 40 e A $\beta$ 42), além do acúmulo de NFT formados especialmente pela proteína *tau* (Wirhth & Bayer, 2010). A Figura 2 ilustra esse processo. Dessa forma, modelos transgênicos de animais portadores dessas mutações de APP ou de PS1 passaram a ser

intensivamente estudados a fim de esclarecer o desenvolvimento da DA e identificar possíveis fatores de risco genético.



**Figura 2.** Representação da hipótese  $A\beta$  intraneurais (Adaptado de Wirths et al., 2004).

### 1.3.1. Fatores genéticos da doença de Alzheimer

A DA é uma doença multifatorial influenciada por fatores hereditários e ambientais. Após os 65 anos de idade, o risco de desenvolvimento da DA dobra a cada 5 anos, por isso o número de casos aumenta com o envelhecimento da população mundial (Ferri et al., 2005). Além da idade, baixo nível educacional e ocupacional, baixo estímulo mental durante a infância e baixa atividade mental e física na terceira idade têm sido apontados como fatores que aumentam o risco de DA (Whalley et al., 2000; Scarmeas et al., 2001; Lindsay et al., 2002). A grande maioria dos casos de DA são esporádicos, enquanto que 5-10% são casos de DA familiar, causados por mutações hereditárias que levam ao desenvolvimento precoce da DA (normalmente dos 16 aos 65 anos). Estudos genéticos com FAD revelaram três principais mutações causadoras da doença: APP, PS1 e PS2. Essas mutações são autossômicas dominantes e responsáveis por 30-50% dos casos de DA (Bekris et al., 2010).

A similaridade da patologia cerebral entre a DA e a síndrome de Down levantou questionamentos acerca de uma possível base molecular comum envolvida na patologia de ambas as doenças. As características da DA encontradas em portadores de síndrome de Down foram então explicadas após a descoberta de um gene de FAD, o APP, no cromossomo 21 (St George-Hyslop et al., 1987). Em seguida, foi detectada a primeira mutação no APP em famílias britânicas, tendo sido então denominada mutação de London (Goate et al., 1991). Nos últimos 20 anos, vários estudos genéticos vêm revelando a presença de outros loci gênicos relacionados à FAD, tais como o gene PS1 (localizado no cromossomo 14) e o PS2 (no cromossomo 1) (Bekris et al., 2010; Kumar-Singh et al., 2006). Além da descoberta de mutações genéticas relacionadas à FAD, muitos polimorfismos genéticos têm sido relacionados à forma esporádica da DA. O mais estudado desses é a quarta variação alélica ( $\epsilon 4$ ) da apolipoproteína E (APOE), que representa o fator de risco genético mais forte relacionado à DA. Portadores heterozigotos dessa variação alélica têm sua chance de desenvolver a DA aumentada em 3 vezes, e nos portadores homozigotos o risco chega a ser 15 vezes maior (Farrer et al., 1997).

### **1.3.2. Modelos genéticos animais da Doença de Alzheimer**

Apesar da semelhança genômica com os humanos, a maioria dos modelos genéticos animais utilizados não possuem as mesmas doenças genéticas que possuímos. Dessa forma deve-se identificar quais tipos de mutações levam ao surgimento da doença investigada para que seja produzida uma alteração no genoma do modelo animal utilizado, a fim de induzir total ou parcialmente os sintomas da doença em humanos (Simmons, 2008).

Atualmente existem duas formas principais de se desenvolver modelos animais com doenças tipicamente humanas, uma de forma indireta e outra de forma direta. A primeira utiliza um método que usa radiação ou reagentes químicos que causam mutações. Porém, esse método não é muito preciso e causa mutações em larga escala, tornando difícil a identificação das reais causas da doença. Por outro lado, pelo método de indução direto apenas os genes envolvidos na doença são manipulados. Esse método inclui a técnica de transgenia, inserção ou deleção de genes (*knock-in* e *knock-out*), modificação condicional de genes ou rearranjos cromossômicos

(Hardouin & Nagy, 2000). O presente estudo utilizou um modelo transgênico de indução da doença de Alzheimer que será descrito adiante.

Com a identificação de parte dos genes causadores da DA, tais genes têm sido utilizados no desenvolvimento de modelos animais da DA e têm contribuído consideravelmente no entendimento da patofisiologia da doença. Esses modelos consistem no desenvolvimento de ratos ou camundongos transgênicos portadores dos genes causadores da DA em humanos. Dessa forma, modelos transgênicos de animais portadores de mutações, como o APP ou o PS1, desenvolveram a patologia idade-dependente de deposição de placas  $\beta$ -amilóide ( $A\beta$ ), similar ao que se encontra em pacientes diagnosticados com DA, como prejuízo precoce de memória visuo-espacial (O'Leary & Brown, 2009; Philipson et al., 2010; Stover & Brown, 2012). O camundongo Tg 2576 é um dos modelos mais estudados, onde expressa a mutação Swedish, que induz o desenvolvimento de placas patológicas por volta dos 9-12 meses de idade, além de perda de astrócitos, microglíocitos e piora em diferentes formas de memória, como a espacial e a de trabalho (Hsiao et al., 1996).

Apesar dos modelos genéticos da DA representarem um grande espectro da patologia da doença, como o acúmulo de  $\beta$ -amilóide, muitos deles deixam de investigar o papel de algumas características-chave da DA, como a perda neuronal e a formação de NFT. Tal problema foi em parte solucionado com o desenvolvimento de modelos genéticos portadores de múltiplas mutações coexpressas. Dessa forma, modelos genéticos com coexpressão de mutações no APP e PS1 – como os modelos APP/PS1KI (Casas et al., 2004), APP/PS1 (Schmitz et al., 2004) e 5XFAD (Oakley et al., 2006) – apresentaram perda neuronal, além do acúmulo típico de  $\beta$ -amilóide. De forma similar, camundongos transgênicos que expressam mutações APP/tau foram utilizados no desenvolvimento do modelo transgênico triplo (3xTgAD, com mutações no APP-Swedish e P301L e knock-in do gene PS1M146V) que resultou em um modelo que produz uma patologia similar ao acúmulo de NFT, além da deposição de placas (Oddo et al., 2003).

Um dos modelos transgênicos da DA mais agressivos e de desenvolvimento mais precoce já produzidos é o 5xFAD, um modelo de camundongo duplo transgênico APP/PS1 que coexpressa cinco mutações da DA, que levam a uma formação de placas  $A\beta$  acelerada, aumento da produção de  $A\beta_{x-42}$  e morte neuronal acentuada. Esse modelo foi gerado pela introdução de mutações no APP Swedish, Florida e London, além de mutações M146L e L286V no PS1

(Oakley et al., 2006). Já foi relatado que camundongos transgênicos 5xFAD tiveram um aumento nos níveis de placas A $\beta$  com apenas 2 meses de idade (Kimura & Ohno, 2009) e com 4 a 6 meses (Jawhar et al., 2012).

Além de ser um dos poucos modelos que apresenta perda neuronal, o modelo animal 5xFAD desenvolve uma série de deficiências comportamentais. Foi relatado que camundongos 5xFAD com 4 a 5 meses de idade desenvolveram deficiência na memória de trabalho quando testados no labirinto em Y (Oakley et al., 2006). Com 6 meses de idade apresentaram deficiências mnemônicas quando testados no labirinto aquático de Morris (Ohno et al., 2006), no teste do medo condicionado (Ohno et al., 2006) e no medo condicionado ao contexto (Devi & Ohno, 2010; Kimura & Ohno, 2009). Além disso, esses camundongos com 9 meses de idade apresentaram deficiência no teste de aversão condicionada ao sabor (Devi & Ohno, 2010).

### **1.3.3. Efeitos ambientais e fatores de risco**

As causas exatas da DA ainda não foram esclarecidas, mas existem muitos fatores de risco que vêm sendo apontados como causadores de um desenvolvimento precoce ou mais acelerado da doença. A influência de fatores ambientais ou do convívio social do animal sobre a expressão gênica do seu material genético tem sido intensivamente estudada e é denominada epigenética (Liu et al., 2008). Embora uma série de fatores ambientais já tivesse sido associada à DA, existiam poucos estudos replicáveis e de meta-análise que evidenciassem o envolvimento claro desses fatores à doença. Estudos recentes, no entanto, têm demonstrado que alguns alimentos da nossa dieta, como alimentos mediterrâneos, peixe e alimentos com alto teor de ômega-3, e fatores não alimentares, como exercício, cigarro, traumatismo craniano, infecções, inflamações sistêmicas, anos de educação, atividade intelectual e exposição a pesticidas podem alterar significativamente o risco de uma pessoa desenvolver a DA (Bilbul & Schipper, 2011; Chouliaras et al., 2010). Além desses, outro importante fator de risco da DA é a solidão, uma condição psicológica debilitante. Em humanos, a solidão tem sido associada a inúmeras consequências fisiológicas e psicológicas, como aumento de resistência vascular, pressão sanguínea elevada, alterações na imunidade, aumento da atividade do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal, distúrbios de personalidade e depressão (Cacioppo & Hawkley, 2009). Dessa forma, o

desenvolvimento de um modelo animal que seja correspondente à solidão em humanos seria de grande utilidade no estudo da influência de fatores ambientais sobre o desenvolvimento da DA.

Em roedores, a solidão tem sido alvo de desenvolvimento de modelos animais através do isolamento social de animais que eram previamente mantidos alojados em grupo. O isolamento de animais que são tipicamente sociais tem consequências neuronais, endócrinas e comportamentais tanto em ratos como em camundongos (Brenes et al, 2008; Brown et al., 2011). Em um experimento onde ratos foram submetidos a um tratamento de isolamento social, Brenes et al. (2008) mostraram que esses animais tiveram uma concentração significativamente menor de noradrenalina e maior de serotonina comparado aos animais que foram mantidos alojados em grupo. Essas descobertas têm correlação com estudos em humanos com depressão, onde esses pacientes apresentavam níveis mais elevados de glicocorticóides e uma diminuição nos níveis de noradrenalina (Sierksma et al., 2010).

Os efeitos comportamentais do isolamento social em animais inclui um aumento da atividade locomotora e da ansiedade (Kabuki et al., 2009), aumento de comportamento relacionado à depressão (Martin & Brown, 2010), déficit de memória associativa (Chida et al, 2006) e aumento da agressividade (Vloeberghs et al., 2006). Vale ressaltar que muitos dos efeitos comportamentais e neuroquímicos resultantes do isolamento social dependem da idade do animal isolado e da duração do isolamento (Martin & Brown, 2010; Miura et al., 2002).

O isolamento social de camundongos, portanto, tem sido útil no desenvolvimento de modelos de solidão e depressão em humanos. Assim como a solidão tem sido comumente relacionada à depressão em humanos, em camundongos o isolamento social resulta em comportamentos relacionados à depressão. Além disso, alguns experimentos farmacológicos têm reforçado tais modelos, onde a administração de antidepressivos em camundongos isolados socialmente se mostrou eficiente em reduzir comportamentos relacionados à depressão medidos no teste de nado forçado e de suspensão pela cauda (Brown et al., 2011) e no teste de comportamentos agressivos (Koike et al., 2009).

O isolamento social em camundongos transgênicos para a DA tem sido utilizado na tentativa de simular o efeito da depressão como fator de risco no desenvolvimento da doença em humanos. No entanto, o uso de isolamento social em modelos animais da DA tem gerado dados

conflitantes. Um estudo utilizando camundongos transgênicos da DA relatou que o isolamento social desde o desmame até os 6 meses de idade agravou o déficit em tarefas de memória espacial, aumentou a ansiedade e hiperatividade, diminuiu a proliferação de células hipocâmpais e aumentou o depósito de placas  $\beta$ -amilóide e a neurodegeneração desses animais (Dong et al., 2004). Outros estudos mostraram ausência de efeito do isolamento social por 6 meses, onde camundongos transgênicos 3xTgAD não tiveram alterações na concentração de placas  $\beta$ -amilóide no hipocampo e sem déficit significativo de memória espacial avaliada no labirinto aquático (Pietropaolo et al., 2009). Os resultados acerca do efeito do isolamento social sobre a deposição de  $\beta$ -amilóide podem variar de acordo com o modelo transgênico utilizado e com o período de isolamento social. Camundongos 3xTgAD não apresentam o mesmo grau de comprometimento cognitivo em tarefas de aprendizagem espacial comparado a camundongos Tg2576 (Billings et al., 2005; Dong et al., 2004). Além disso, o modelo animal 3xTgAD começa a apresentar patologias associadas às placas amilóides por volta dos 6 meses de idade enquanto tal processo só começa a partir dos 9 meses em camundongos Tg2576 (Billings et al., 2005).

## **2. Objetivos e planejamento experimental**

O presente trabalho foi distribuído em duas etapas e teve como objetivo geral avaliar a influência genética em medidas comportamentais e endócrinas relacionadas à ansiedade, depressão e aprendizagem em dois modelos animais: um de seleção de linhagens de ratos com traços altos e baixos de reações de defesa, e outro de camundongos transgênicos desenvolvidos para o estudo da doença de Alzheimer.

A primeira etapa do estudo, realizada no Laboratório de Psicobiologia do Departamento de Processos Psicológicos Básicos do Instituto de Psicologia da Universidade de Brasília e no Laboratório de Psicofisiologia do IESB, visou dar sequência a uma série de estudos realizados, desde 1995, em colaboração com o Laboratório de Neurociências e Comportamento do Departamento de Psicologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-RJ) utilizando-se linhagens de ratos com traços altos e baixos para a resposta de congelamento condicionado ao contexto. A segunda etapa foi realizada por meio de um convênio internacional

com o Laboratório de Psicologia e Neurociência da Dalhousie University, Halifax, Canadá, sob a supervisão do prof. Dr. Richard E. Brown. Essa etapa utilizou camundongos transgênicos com propensão a desenvolver a doença de Alzheimer precocemente.

Mais especificamente, este trabalho se propôs a avaliar a concentração hormonal de corticosterona de ratos com altos (CAC) e baixos (CBC) níveis de reações de defesa da 5ª geração e a avaliar o perfil comportamental dos animais provenientes da 9ª geração nos testes de ansiedade do LCE e do medo condicionado ao contexto e no teste de depressão do teste do nado forçado. Com os resultados desses testes, aliado a resultados previamente publicados sobre as linhagens CAC e CBC, buscou-se validar as linhagens como um modelo genético animal para o estudo do Transtorno da Ansiedade Generalizada em humanos. Esse modelo foi utilizado ainda para avaliar o efeito do gênero sobre o desenvolvimento das características genéticas selecionadas dos ratos CAC e CBC.

Na segunda etapa do projeto foi avaliada a influência de um dos fatores de risco da doença de Alzheimer (depressão), induzido através do isolamento social, sobre o desenvolvimento de sintomas comportamentais apresentados por camundongos transgênicos (5xFAD), portadores de cinco mutações gênicas causadoras da doença de Alzheimer em humanos. Os efeitos do isolamento social, da manipulação genética e do gênero foram avaliados utilizando medidas do peso corporal e de uma bateria de sete testes comportamentais que avaliaram respostas de reação à manipulação, ansiedade (labirinto em cruz elevado e caixa de transição claro-escuro), desamparo aprendido (teste do nado forçado e teste de suspensão pela cauda) e memória e aprendizagem (labirinto aquático de Morris e condicionamento de medo ao contexto e a estímulos discretos ou pistas). A extensa quantidade de testes comportamentais foram utilizadas uma vez que existem poucos dados comportamentais da linhagem utilizada, principalmente sob as condições experimentais empregadas no presente estudo.

### 3. Relevância do estudo

Muitos estudos científicos têm focado o uso da genética como uma ferramenta para o estudo do comportamento e para analisar as causas das diferenças individuais encontradas na população. Esses estudos têm mostrado avanços promissores no entendimento da influência das variações genéticas sobre mecanismos neurofisiológicos e a identificação dos efeitos dos genes e de fatores ambientais sobre transtornos neuropsicológicos. Para isso, vêm sendo empregados métodos clássicos de manipulação genética, como a seleção artificial de roedores, assim como métodos avançados que envolvem engenharia genética, como técnicas de produção de *knock-out* e transgênicos. Esses métodos têm possibilitado avanços significativos na identificação e manipulação de genes específicos que conferem melhorias ou prejuízos nos sintomas de psicopatologias, tais como transtornos de ansiedade ou a doença de Alzheimer.

Uma verificação aprofundada das causas de uma doença neurológica envolve a elucidação de proteínas, neurotransmissores, células e sistemas envolvidos na neurocircuitaria cerebral. Dado que esses elementos são produzidos, ou pelo menos influenciados por genes e esses, por sua vez, influenciados por interações com o ambiente, o papel de cada um deles sobre o comportamento pode ser estudado através de modelos animais. Tais modelos são úteis não só para a seleção de novos compostos farmacológicos, como também para o mapeamento dos circuitos neurais envolvidos nas patologias. Um dos experimentos realizados no presente trabalho contribui para a investigação da influência que genes humanos causadores da doença de Alzheimer exerce sobre um modelo animal não-humano (modelo transgênico) e, ainda, a influência de um dos fatores de risco apontados em estudos clínicos (a depressão) sobre o desenvolvimento da doença no modelo genético utilizado (5xFAD).

No caso de modelos para o estudo da ansiedade, depara-se com limitações decorrentes do fato dos mesmos manipularem, na verdade, reações de defesa adaptativas diante de situações ambientais potencialmente perigosas. Assim, como utilizar tais respostas adaptativas como modelos de reações de caráter desajustador e não adaptativo observadas nos diversos transtornos de ansiedade ou outras doenças neuropsicológicas? Na tentativa de se buscar um modelo que minimize – em parte – esse aspecto, foram desenvolvidas linhagens de ratos com altos e baixos

níveis de reação de defesa (CAC=Carioca de Alto Congelamento; e CBC=Carioca de Baixo Congelamento), selecionadas por várias gerações. O presente estudo constitui uma importante contribuição para o desenvolvimento dessas linhagens através da realização de testes comportamentais e fisiológicos testando, assim, sua validade para o estudo do medo/ansiedade. Com isso, busca-se aprimorar também as ferramentas disponíveis para auxiliar no desenvolvimento de novos compostos mais eficientes e com menos efeitos colaterais para o tratamento dos distúrbios da ansiedade, assim como ajudar a elucidar processos neurofisiológicos e comportamentais que ainda não estejam totalmente claros.

## **4. Experimento I**

### **4.1. Métodos**

Os animais utilizados nesse experimento foram ratos Wistar com altos e baixos níveis de reações de defesa, provenientes do Instituto de Psicologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-RJ). Lá, as duas linhagens de ratos com níveis diferenciados de reações de defesa foram obtidas a partir de cruzamentos selecionados de ratos que apresentavam padrões comportamentais semelhantes. A seleção foi feita de acordo com a porcentagem do comportamento de congelamento a um contexto previamente associado a choque nas patas, teste este denominado de condicionamento de medo ao contexto, descrito mais adiante. Os animais que apresentaram as maiores porcentagens de congelamento foram denominados Carioca de Alto Congelamento (CAC) e os que apresentaram menores taxas, denominados Carioca de Baixo Congelamento (CBC). Os animais classificados num mesmo padrão comportamental foram cruzados entre si e seus filhotes submetidos ao mesmo protocolo sobredito.

Essa seleção comportamental teve início em agosto de 2006 com ratos Wistar oriundos da Fundação Oswaldo Cruz – RJ. Cada linhagem foi constituída inicialmente a partir de uma única população com aproximadamente 100 animais, de onde foram selecionados os 10 machos e fêmeas que apresentaram a maior porcentagem de congelamento. Esses foram cruzados entre si para gerar a próxima geração do CAC. O critério de seleção para a linhagem CBC foram os animais que apresentaram a menor porcentagem de congelamento. No acasalamento, evitou-se

cruzamentos endogâmicos (irmão x irmã) para prevenir mutações indesejadas e não se ter futuros problemas de fertilização. Dessa forma, essa linhagem é classificada como *Outbred* (para maiores detalhes ver Gomes, 2008).

O presente estudo utilizou duas gerações distintas desses animais que foram utilizados em dois experimentos. O primeiro (experimento I.1) para analisar o nível de corticosterona sanguíneo de animais da quinta geração (S5) previamente submetidos ou não a uma experiência aversiva. No segundo experimento (experimento I.2), animais da nona geração (S9F1) foram utilizados para avaliar comportamentos relacionados à ansiedade, à depressão e à memória aversiva ao contexto. Todos os procedimentos experimentais relatados aqui foram realizados segundo o Guia de Uso de Animais Experimentais estabelecido pela Sociedade Brasileira de Neurociência e Comportamento (SBNeC). Os métodos de manipulação e o sacrifício dos animais foram revisados e aprovados pelo Comitê de Cuidados e Uso Animal do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília (UnB).

#### **4.1.1. Experimento I.1**

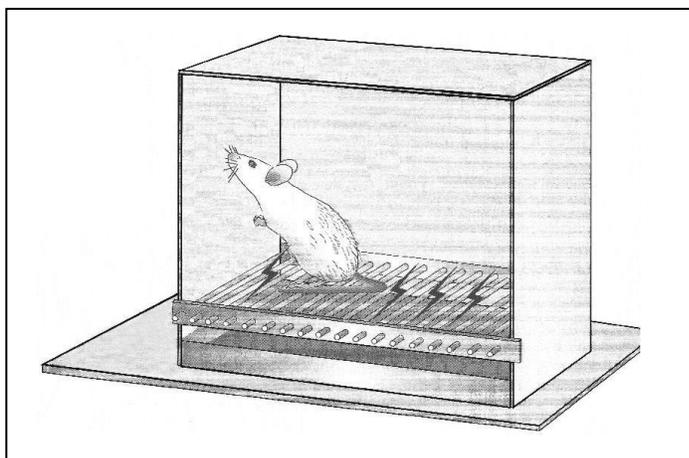
Ratos da geração S5 foram obtidos do Departamento de Psicologia da PUC-Rio e enviados ao laboratório da UnB. Os testes começaram uma semana após o alojamento dos animais no biotério para que eles pudessem se aclimatar ao novo ambiente e evitar efeitos intervenientes decorrentes do transporte. Sete machos de cada linhagem, CAC e CBC, com 8 meses de idade, pesando entre 250 e 335g, foram mantidos em grupos de 3-5 animais em caixas-ninho de acrílico (45 x 28 x 13 cm). Os animais foram alojados em uma sala com um ciclo claro-escuro de 12 horas, com as luzes acendendo às 8 horas, sendo os experimentos realizados durante a fase clara do ciclo. Água e comida foram fornecidos *ad libitum*.

Nesse experimento os animais foram submetidos ao teste de medo condicionado ao contexto, descrito abaixo e imediatamente após o segundo e último dia de testes foi coletado sangue para análise da concentração de corticosterona (como descrito na seção 4.1.1.2). Uma segunda amostra de sangue foi coletada após uma semana. O percentual de congelamento condicionado ao contexto não foi avaliado, uma vez que esses animais já tinham sido previamente expostos ao modelo no laboratório da PUC-Rio para que fossem fenotipados e

selecionados. Esse teste foi escolhido como um gerador de estresse, pois ele é o mesmo teste que vem sendo utilizado na seleção das novas linhagens.

#### 4.1.1.1. Caixa de Condicionamento de medo ao contexto

Para o condicionamento de medo ao contexto utilizou-se uma caixa de condicionamento confeccionada com paredes de acrílico transparente (27,5 x 30,5 cm) e assoalho gradeado (18 barras de aço inoxidável espaçadas a 1 cm entre si) que permitiam a passagem de uma corrente elétrica (Figura 3). A corrente elétrica foi liberada por meio de um estimulador de choques (Grason-Stadler (EUA), modelo E 600B), comandado por um programa de computador e um sistema de interface que permitia o controle do número de choques elétricos a serem liberados, bem como os intervalos entre as apresentações desses estímulos.



**Figura 3.** Esquema ilustrativo da caixa de condicionamento da resposta de congelamento (adaptado de Carlson, 2002).

A caixa estava situada dentro de uma câmara de isolamento acústico parcial, iluminada por uma lâmpada incandescente amarela (20W). Uma ventoinha instalada na câmara de isolamento atuou como exaustor de ar e ruído de fundo. Uma micro-câmera, acoplada à câmara de isolamento e conectada a um monitor de TV e um vídeo-cassete instalados em uma sala adjacente à sala de experimentos permitiu a gravação das sessões experimentais.

No teste de medo condicionado, cada rato foi submetido a uma sessão treino no modelo de medo condicionado ao contexto, onde cada animal foi colocado dentro da caixa de condicionamento, podendo explorá-la livremente por 4 min. Ao término desse intervalo, três

choques (1 segundo de duração e 0,6 mA de intensidade) foram liberados no assoalho da caixa de condicionamento, em intervalos fixos de 20s. A intensidade utilizada no presente experimento foi baseada no estudo de Baldi et al. (2004). Após o terceiro choque, o sujeito permaneceu na caixa por mais 2min sendo, em seguida, reconduzido ao biotério. Ao final de cada sessão treino, o assoalho e as paredes da caixa de condicionamento foram limpos com um papel umedecido com solução amoníaca e secados com um secador de cabelo. Vinte e quatro horas após a sessão treino, cada animal foi submetido a uma sessão teste. Essa consistiu em recolocar o sujeito na caixa de condicionamento por um período de 8 min, sem a aplicação de choques elétricos.

#### **4.1.1.2. Análise de corticosterona**

As amostras de sangue com aproximadamente 0,2ml foram coletadas em duas diferentes situações, a primeira imediatamente após a sessão de teste do condicionamento ao contexto (2º dia do procedimento) e a segunda 7 dias depois. A segunda amostra foi coletada sem nenhum tipo de situação estressante prévia do animal, visando a análise da concentração basal de corticosterona das linhagens testadas. Todos os animais foram anestesiados por inalação com isoflurano antes da coleta do sangue por punção cardíaca, sendo a coleta feita num período máximo de 2 minutos. As amostras de sangue foram centrifugadas por 5 min a 1200 rpm a 4°C para isolar aproximadamente 50µl de plasma que ficou congelado a -80°C até a análise. O nível de corticosterona do plasma foi mensurado em ng/ml em duplicata utilizando um kit padrão de radioimunoensaio (Coat-A-Count Rat Corticosterone, Diagnostic Products Corporation, USA) no Laboratório de Farmacologia Molecular da UnB, seguindo o protocolo utilizado por Calil & Marcondes (2006).

#### **4.1.2. Experimento I.2**

A 9ª geração dos ratos selecionados foram enviados da PUC-Rio para o biotério do Laboratório de Psicofisiologia do Instituto de Ensino Superior de Brasília (IESB). Após 7 dias, os animais da linhagem CAC foram acasalados entre si, assim como os da linhagem CBC. Seus filhotes, denominados de geração S9F1, foram utilizados nos experimentos descritos adiante, após atingirem o peso de 200-250g. Nesse experimento foram utilizados 8 ratos machos da

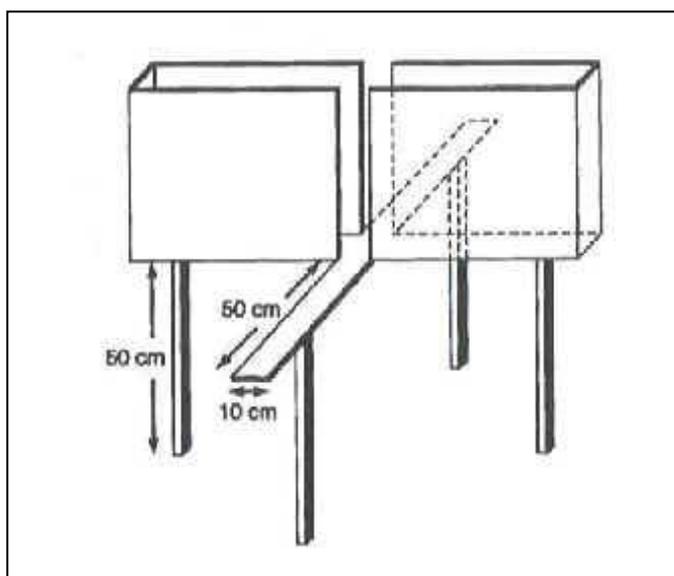
linhagem CAC, 6 machos CBC, 8 fêmeas CAC e 8 fêmeas CBC.

#### 4.1.2.1. Equipamentos e análise comportamental

O presente experimento utilizou três modelos animais de ansiedade e depressão: labirinto em cruz elevado, teste do nado forçado e medo condicionado ao contexto. Suas especificações estão descritas a seguir e o registro do comportamento dos animais foi realizado por dois pesquisadores previamente treinados em que o índice de concordância entre os examinadores foi igual ou maior que 90%.

##### Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

O LCE utilizado (Figura 4) seguiu as especificações de Pellow et al. (1985), consistindo em um aparato de madeira com cor natural e com quatro braços (50x10cm cada), dispostos em forma de cruz, elevados a 50 cm do solo. Dois dos braços eram abertos e contornados por uma pequena borda de acrílico transparente de 0,5 cm de altura para minimizar eventuais quedas dos animais. Os outros dois braços, dispostos perpendicularmente aos abertos, eram revestidos por paredes laterais de 50 cm de altura, sendo denominados braços fechados. Uma arena central de 10x10cm unia os quatro braços entre si.



**Figura 4.** Ilustração do Labirinto em Cruz Elevado utilizado no experimento.

O LCE foi instalado no Laboratório de Psicofisiologia do IESB, em um cubículo experimental iluminado por uma lâmpada fluorescente (20W), colocada verticalmente a 150cm acima do aparato. As sessões experimentais foram filmadas e gravadas por meio de uma vídeo-câmera montada verticalmente acima do labirinto e conectada a um monitor de TV e um vídeo-cassete instalados em uma sala adjacente à sala de experimento.

Nas sessões do LCE foram analisados os parâmetros comportamentais clássicos e os etológicos, como vem sendo utilizado em nosso laboratório (Carvalho et al., 2012). O primeiro consistiu em: (1) número de entradas nos braços abertos (EBA); (2) porcentagem de entradas nos braços abertos ( $100 \times \text{entradas nos abertos} / (\text{entradas nos abertos} + \text{entradas nos fechados})$ ) (%EBA); (3) tempo de permanência nos braços abertos (TBA); (4) porcentagem de tempo nos braços abertos ( $100 \times \text{tempo no aberto} / (\text{tempo no aberto} + \text{tempo no fechado})$ ) (%TBA); (5) número de entradas nos braços fechados (EBF); (6) tempo de permanência nos braços fechados (TBF); e (7) tempo de permanência na plataforma central. Um aumento no EBA, %EBA, TBA e/ou %TBA são considerados como indicadores comportamentais de um efeito ansiolítico no LCE (Cruz, 1994).

O segundo conjunto de parâmetros consistiu na análise do número de explorações da extremidade dos braços abertos e o tempo gasto na realização dos comportamentos de espreitar e esquadrinhar. A exploração das extremidades foi considerada quando o animal alcançou a porção final de um dos braços abertos até que sua cabeça ficasse para fora do aparato. Espreitar foi definido como a saída parcial do animal dos braços fechados, colocando a cabeça e as patas dianteiras na plataforma central ou nas entradas dos braços abertos, freqüentemente acompanhado de um estiramento do corpo. Esquadrinhar, por sua vez, foi considerado quando o animal colocou a cabeça em direção ao precipício do braço aberto, olhando em qualquer direção. Esses últimos vêm se mostrando úteis para a detecção de efeitos de manipulações farmacológicas dos sistemas serotoninérgicos e GABAérgicos (Cruz et al., 1994; Fernandes et al., 1996; Griebel et al., 2002; Setem et al., 1999).

### **Teste do Nado Forçado (TNF)**

O aparato utilizado seguiu as especificações determinadas por Porsolt et al. (1977), onde um cilindro de acrílico (65cm de altura e 35cm de diâmetro) foi preenchido com água a uma

altura de 55cm, de tal forma que o animal não teve nenhum tipo de apoio que o permitia parar de nadar. A água foi mantida a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  e trocada a cada sujeito. Os animais foram submetidos por dois dias consecutivos, respeitando o mesmo horário de exposição. O procedimento experimental foi o mesmo utilizado previamente em nosso laboratório (Gomes et al., 2010), onde, no primeiro dia (sessão treino), o animal permaneceu por 15 minutos (estabelecendo-se a situação aversiva inescapável) e, no segundo dia (sessão teste), apenas por 5 minutos. Nesse experimento, foram computadas as medidas clássicas de tempo total de nado e de imobilidade, além da latência para imobilidade descritas por Porsolt et al. (1977, 1978 e 1979). Todos os tempos foram contabilizados em segundos.

Para fins de concordância entre os observadores, a parada do nado foi considerada quando o animal movimentasse apenas lentamente as patas dianteiras para manter a cabeça fora da água, sem tirá-las da superfície da água, ou quando de fato permanecesse imóvel, sem qualquer movimento, apenas boiando. Todas as sessões de teste foram gravadas por uma vídeo-camera horizontalmente posicionada na linha da água do cilindro.

### **Condicionamento de medo ao contexto**

O mesmo aparato da caixa de condicionamento descrito anteriormente (item 4.1.1.1) foi utilizado nesse experimento, sendo que o registro da resposta de congelamento, nas sessões treino e teste, seguiram a técnica de amostragem de evento. A cada intervalo de 2 s, indicado por um bip emitido pelo programa do computador, os observadores marcavam manualmente, em uma folha de registro, se uma resposta de congelamento ocorria ou não ao final desse intervalo. A resposta de congelamento foi definida, operacionalmente, como sendo a ausência de qualquer movimento motor corporal, exceto o respiratório. Baseado no registro de ocorrências foi calculada a porcentagem de congelamento nas sessões treino e teste.

#### **4.1.2.2. Procedimento experimental**

Ratos machos e fêmeas da geração S9F1 foram alocados em dois grupos, de acordo com a sua linhagem: (1) alta (CAC) e (2) baixa resposta de congelamento ao contexto (CBC). Todos os animais foram expostos ao labirinto em cruz elevado, teste do nado forçado e medo condicionado ao contexto, seguindo essa ordem, a fim de minimizar o efeito do estresse provocado pela exposição ao aparato anterior.

A exposição dos animais ao labirinto em cruz elevado consistiu na colocação de cada um deles na plataforma central do aparato, com a cabeça voltada para um dos braços fechados, podendo explorá-lo livremente por 5 min. Após cada sessão, o animal foi reconduzido à sua caixa-ninho e o aparato foi higienizado com uma flanela umedecida com solução de etanol a 20%.

Um dia após a sessão no labirinto em cruz elevado, cada rato foi submetido à primeira sessão no teste do nado forçado. Nessa sessão, cada animal permaneceu no aparato por 15 min, sendo retirado e secado com um secador de cabelos em seguida. Vinte e quatro horas depois, os mesmos animais foram submetidos à sessão de teste seguindo o mesmo protocolo, porém por um período de 5 min. Quarenta dias após o teste do nado forçado, eles foram submetidos às duas sessões do teste de condicionamento de medo ao contexto, com um período de 24h entre elas (como descrito anteriormente). O longo período entre a exposição ao nado forçado e à caixa de condicionamento se deu na tentativa de minimizar os possíveis efeitos intervenientes entre os testes, uma vez que o grau de estresse provocado pelo primeiro é elevado (Andreatini & Bacellar, 1999).

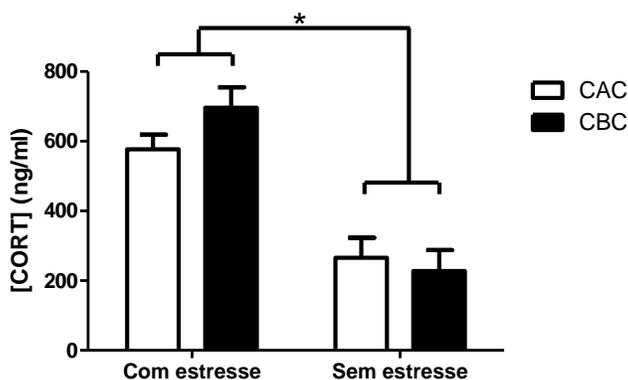
#### **4.1.3. Análise estatística**

Os dados da concentração de corticosterona da linhagem S5 foram analisados por meio de uma Análise de Variância de duas vias (two-way ANOVA) para medidas repetidas, sendo analisados os efeitos da linhagem e da exposição prévia à situação aversiva. As diferenças comportamentais avaliadas na geração S9F1 foram analisadas com uma ANOVA de duas vias sendo as linhagens (CBC/CAC) e o sexo (macho/fêmea) considerados como o primeiro e segundo fator, respectivamente. Nos casos em que houve interação entre os fatores, apenas os que apresentaram nível de significância menor que 0,05 foram mostrados. Em todos os casos onde se observou um efeito significativo na ANOVA, foi empregado o teste *t* não-pareado como teste *post-hoc* para avaliar as diferenças entre as linhagens do mesmo sexo. Todos os testes foram feitos utilizando-se o programa StatView (Versão 5.0.1, SAS Institute Inc., San Francisco, CA).

## 4.2. Resultados

### 4.2.1. Experimento I.1 – Concentração de Corticosterona

Ambas as linhagens de ratos machos de CAC e CBC mostraram um aumento significativo da concentração de corticosterona após a exposição ao teste de medo condicionado ao contexto, comparado com os dados da semana seguinte ao estresse [ $F(1,12)=45,23$ ;  $p<0,0001$ ]. Entretanto, não houve diferenças no nível de corticosterona entre as linhagens analisadas [ $F(1,12)=1,827$ ;  $p>0,05$ ] (Figura 5)



**Figura 5.** Média (+EPM) das concentrações de corticosterona (ng/mL) dos animais imediatamente após o 2º dia do teste de medo condicionado (grupo “com estresse”) e uma semana depois, sem exposição prévia ao teste (grupo “sem estresse”) de machos de ambas as linhagens da geração S5. (\*) Representa diferença significativa entre os grupos ( $p<0,0001$ ).

### 4.2.2. Experimento I.2

#### Labirinto em cruz elevado

Uma fêmea e um macho da linhagem CBC e um macho da CAC não foram analisados, pois caíram do aparato. Os animais da linhagem CAC tiveram menor percentual de tempo nos braços abertos [ $F(1,23)=8,78$ ;  $p<0,01$ ] (Figura 6A), menor número de entradas nos braços abertos [ $F(1,23)=20,79$ ;  $p<0,0001$ ] (Figura 6B), menor número de comportamentos de esquadrihar [ $F(1,23)=5,54$ ;  $p<0,05$ ] (Figura 6C) e de exploração das extremidades dos braços

abertos [ $F(1,23)=15,38$ ;  $p<0,001$ ] (Figura 6D) quando comparado com a linhagem CBC. Uma interação entre sexo e linhagem foi encontrada ao se avaliar o número de entradas nos braços abertos [ $F(1,23)=6,13$ ;  $p<0,05$ ]. Analisando os comportamentos anteriormente citados por sexo, separadamente, foram encontradas diferenças significativas apenas entre fêmeas, onde a linhagem CAC permaneceu mais tempo nos braços abertos [ $t(13)= -3,515$ ;  $p<0,01$ ] (Figura 6A), teve um menor número de entradas nos braços abertos [ $t(13)= -5,682$ ;  $p<0,0001$ ] (Figura 6B), menor número de comportamentos de esquadrihar [ $t(13)= -2,574$ ;  $p<0,05$ ] (Figura 6C) e menor exploração das extremidades [ $t(13) = -4,287$ ;  $p<0,001$ ] (Figura 6D) quando comparado com ratos fêmeas da linhagem CBC. Os machos da linhagem CAC tiveram uma tendência não significativa de apresentar menor percentual de tempo nos braços abertos [ $t(10)= -1,252$ ;  $p>0,05$ ] (Figura 6A), menor número de entradas nos braços abertos [ $t(10)= -1,289$ ;  $p>0,05$ ] (Figura 6B), menor número de comportamentos de esquadrihar [ $t(10)= -0,850$ ;  $p>0,05$ ] (Figura 6C) e menor exploração das extremidades [ $t(10)= -1,432$ ;  $p>0,05$ ] (Figura 6D) quando comparado com os ratos machos da linhagem CBC. Não foram encontradas diferenças significativas no tempo de espreitar dos braços fechados [ $F(1,23)<1$ ] (Figura 6E) ou no número de entradas nos braços fechados [ $F(1,23)<1$ ] (Figura 6F) de ambos os sexos avaliados. Além disso, os machos de ambas as linhagens apresentaram menor percentual de tempo nos braços abertos [ $F(1,23)=5,50$ ;  $p<0,05$ ], menor número de entradas nos braços abertos [ $F(1,23)=14,92$ ;  $p<0,001$ ], menor número de comportamentos de esquadrihar [ $F(1,23)=4,80$ ,  $p<0,05$ ], menor número de exploração das extremidades [ $F(1,23)=5,84$ ,  $p<0,05$ ] e maior tempo de espreitar [ $F(1,23)=9,03$ ;  $p<0,01$ ] quando comparado às fêmeas.

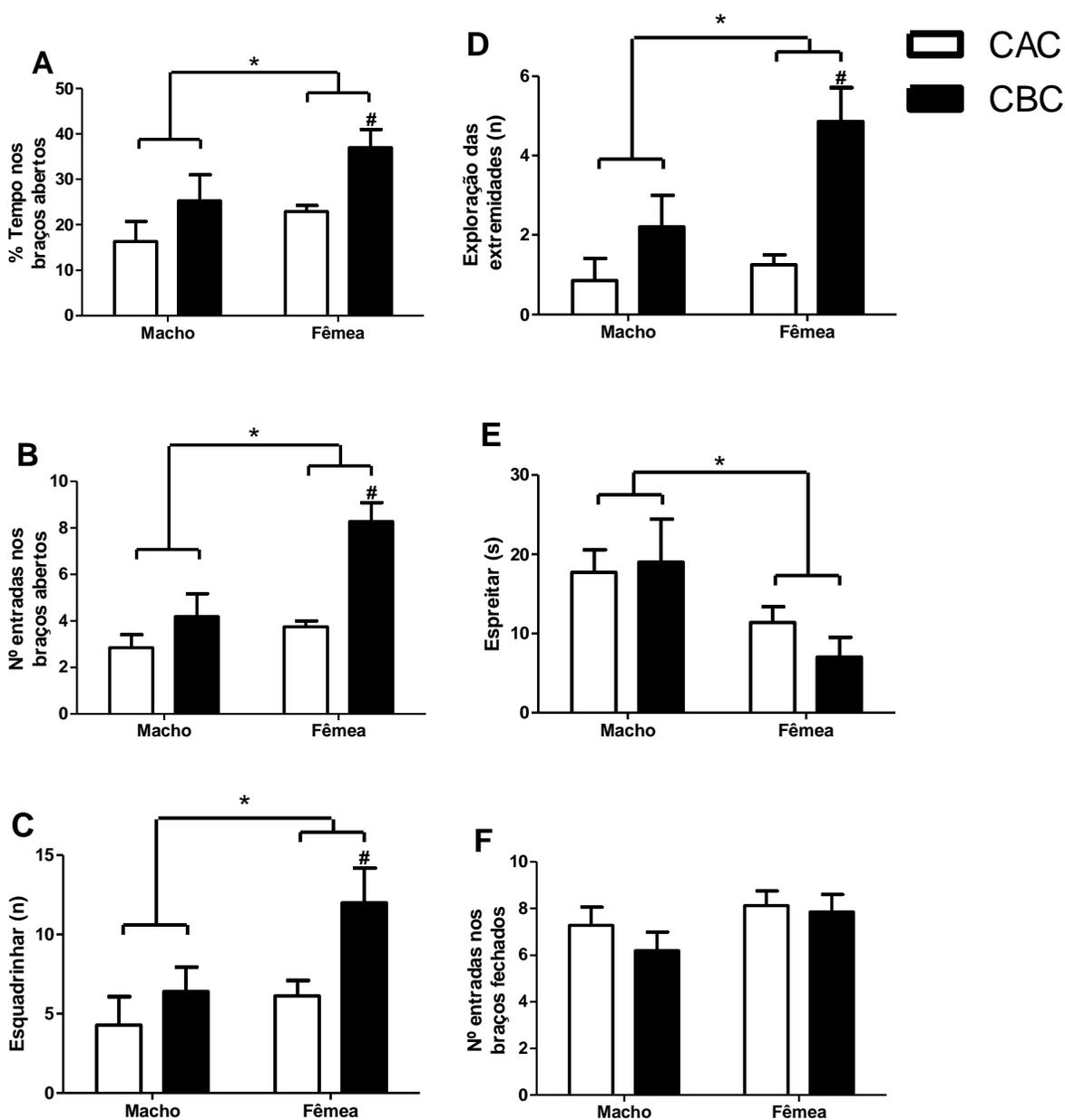
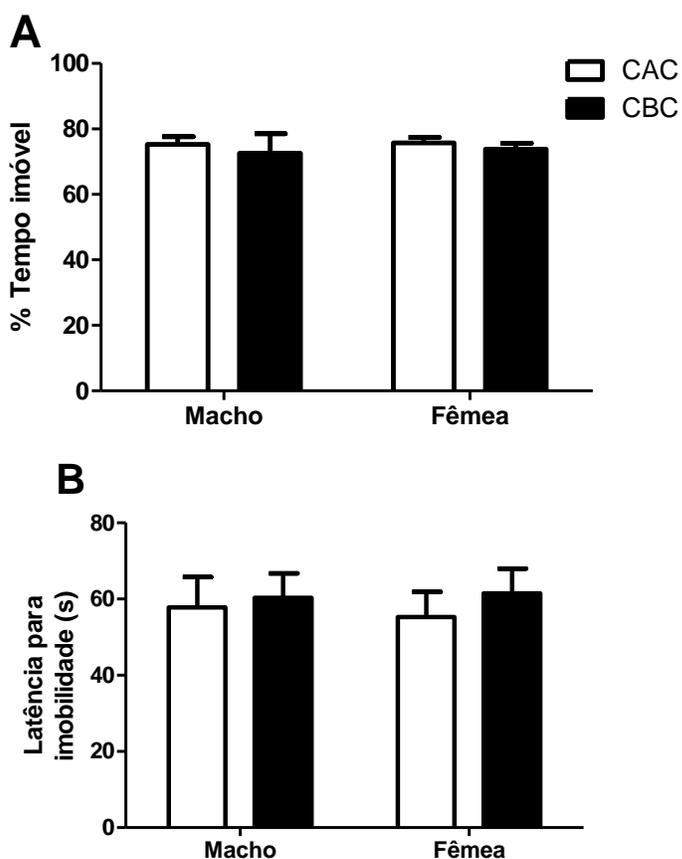


Figura 6. Média (+EPM) do percentual de tempo nos braços abertos (A), número de entradas nos braços abertos (B), número de comportamentos de esquadrinhar (C), número de explorações das extremidades (D), tempo de espreitar (E) e número de entradas nos braços fechados (F) de ratos machos e fêmeas S9F1 no LCE. (\*) Representa efeito significativo de sexo ( $p < 0,05$ ) e (#) representa efeito de linhagem ( $p < 0,05$ ).

### Teste do Nado Forçado

Não foram encontradas diferenças entre as linhagens ou os sexos pesquisados segundo o percentual de tempo imóvel [ $F(1,26)<1$ ] (Figura 7A) ou à latência para imobilidade [ $F(1,26)<1$ ] (Figura 7B).



**Figura 7.** Média (+EPM) do percentual de tempo imóvel (A) e latência para imobilidade (B) de machos e fêmeas S9F1 no teste do nado forçado.

### Condicionamento de Resposta de Congelamento

A linhagem CAC apresentou um maior percentual de tempo de congelamento ao contexto comparado com ratos CBC [F(1,26)=13,55;  $p < 0,01$ ] e machos apresentaram maior tempo de congelamento do que fêmeas [F(1,26)=11,99;  $p < 0,01$ ] (Figura 8).

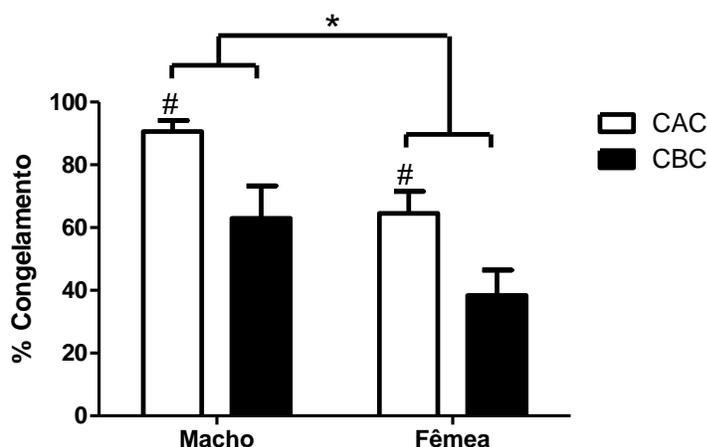


Figura 8. Média (+EPM) do percentual de congelamento no segundo dia do teste de medo condicionado ao contexto em ratos machos e fêmeas S9F1. (\*) Representa efeito significativo de sexo ( $p < 0,01$ ) e (#) representa efeito de linhagem ( $p < 0,05$ ).

### 4.3. Discussão

Foi mostrado que fêmeas da linhagem CAC permaneceram menos tempo nos braços abertos do labirinto em cruz elevado, assim como menos entradas nos braços abertos, comportamento de esquadrihar e exploração das extremidades dos braços abertos, comparado com fêmeas da linhagem CBC, um fenótipo indicativo de maior ansiedade (Cruz et al., 1994; Ramos et al., 1997; Setem et al., 1999). Ratos machos CAC tiveram uma tendência a apresentar o mesmo padrão comportamental que as fêmeas, mas as diferenças não foram significativas ao se comparar com os machos da linhagem CBC. Como não houve diferenças entre as linhagens quanto ao número de entradas nos braços abertos do labirinto em cruz elevado ou ao tempo de nado no teste do nado forçado, propõe-se que as diferenças fenotípicas encontradas não são decorrentes de diferenças no nível de atividade locomotora dos animais das duas linhagens (Cruz et al., 1994; Ramos et al., 1998). Os dados sugerem que as fêmeas das linhagens CAC/CBC

podem ser utilizadas como um modelo de ansiedade traço, uma vez que os níveis basais de comportamentos indicativos de ansiedade, nesses animais, foram diferentes uns dos outros, sem que houvesse exposição prévia a estímulos aversivos. Ao contrário da ansiedade estado, a ansiedade traço não varia de acordo com o momento e é considerada uma característica permanente do indivíduo (Belzung & Griebel, 2001).

A seleção genética resultante da nona geração dos Carioca Alto/Baixo Congelamento mostrou resultados semelhantes em estudos com outras gerações das linhagens CAC/CBC (Dias et al., 2009; Gomes et al., 2011; Gomes & Landeira-Fernandez, 2008) e corroboram os resultados de outros estudos que utilizaram o teste de medo condicionado ao contexto para desenvolver novas linhagens geneticamente selecionadas (Ponder et al., 2007; Radcliffe et al., 2000; Wehner et al., 1997). Mesmo que os animais utilizados no presente estudo tenham sido selecionados de acordo com níveis indicativos de medo/ansiedade aprendido – ou, potencialmente, de acordo com suas capacidades cognitivas – seus comportamentos indicativos de ansiedade analisados no labirinto em cruz elevado mostraram diferenças significativas entre as linhagens selecionadas em quase todos os parâmetros indicativos de ansiedade. Apesar de nossos resultados não terem demonstrado diferenças significativas entre machos das linhagens CAC/CBC no LCE, um estudo anterior utilizando as mesmas linhagens mostrou que machos CAC da 4ª geração apresentaram um maior nível de comportamentos indicativos de ansiedade, quando comparados com ratos Wistar sem seleção genética prévia (Dias et al., 2009).

Um bom modelo animal deve satisfazer os três critérios de validade mencionados anteriormente: semelhança, previsibilidade e homologia. O desenvolvimento de linhagens de ratos selecionados para altos e baixos níveis de medo condicionado ao contexto tem se mostrado um modelo útil para o estudo de animais “psicopatológicos” com níveis anormais (elevado/reduzido) de ansiedade, respondendo a um dos critérios de validade por semelhança com Transtorno de Ansiedade Generalizada (TAG). Como alguns dos sintomas apresentados por pacientes com Transtorno de Ansiedade Generalizada são tensão muscular (DSM-IV-TR), inibição do comportamento motor e congelamento mental (American Psychiatric Association, 2000; de Beurs et al., 1999; Golbin et al., 2004; Gorwood, 2004; Lyonfields et al., 1995), eles podem ser correlacionados com o comportamento de congelamento apresentado por roedores submetidos ao teste de medo condicionado ao contexto (Antoiadis & McDonald, 1999; Luyten et

al., 2011; Phillips & LeDoux, 1994). Um modelo de Transtorno de Ansiedade Generalizada deve ser capaz de mostrar ansiedade “generalizada”, difusa e não-focal, a um estímulo não-específico ao longo do tempo (Luyten et al., 2011). O modelo proposto no presente estudo oferece validade por semelhança, uma vez que a ansiedade identificada foi selecionada para tal, e não induzida. Além disso, o alto nível de comportamento relacionado à ansiedade da linhagem CAC, comparado à linhagem CBC, foi significativamente maior em fêmeas do que em machos, similar ao que se vê em estudos epidemiológicos de Transtorno de Ansiedade Generalizada em humanos, onde mulheres têm maior propensão ao desenvolvimento da doença (Gater et al., 1998; Hettema et al., 2001; Lewinsohn et al., 1998). Futuros testes farmacológicos com compostos ansiolíticos e ansiogênicos seriam de grande valia para determinar a validade da previsibilidade da resposta farmacológica.

O presente estudo mostrou que machos tiveram um maior percentual de congelamento ao contexto do que fêmeas de ambas as linhagens, assim como descrito por Gomes e Landeira (2008) ao testar as três primeiras gerações. Em modelos animais, os machos normalmente superam as fêmeas em estudos de esquiva inibitória, apresentando maiores latências de reentrada em câmaras previamente associadas a choque (Drago et al., 1980; Heinsbroek et al., 1984; Kudo et al., 2004) ou apresentando congelamento mais prolongado quando o choque é sinalizado pelo contexto (Barker & Galea, 2010; Gupta et al., 2001; Maren et al., 1994; Wiltgen et al., 2001), quanto por estímulos discretos (Pryce et al., 1999). Alguns estudos têm mostrado que o estrogênio está envolvido na redução de resposta de congelamento condicionado ao contexto em ratos fêmeas (Gupta et al., 2001). Nosso estudo também mostrou diferença de sexo no labirinto em cruz elevado, apesar de muitos estudos não terem encontrado tais diferenças em testes de ansiedade (Bridges & Starkey, 2004; Marcondes et al., 2001; Rauch et al., 2006; Rodgers & Cole, 1993; Stock et al., 2000). No entanto, ratos que foram previamente expostos a choques elétricos inescapáveis e testados no labirinto em cruz elevado mostraram diferenças significativas de sexo, onde machos tiveram níveis de comportamentos indicativos de ansiedade maiores, assim como os dados mostrados no presente estudo (Steenbergen et al., 1990). Essas descobertas sugerem que as diferenças na resposta de medo condicionado que têm sido selecionadas por muitas gerações parecem estar influenciando o sistema emocional de ambas as linhagens CAC/CBC de forma sexo-dependente.

O teste de medo condicionado ao contexto tem sido usado também em estudos de processos mnemônicos, mensurando a memória aversiva (para revisão, vide Rudy et al., 2004). Não se pode negar que esse teste depende de processos mnemônicos, mas estudos recentes têm mostrado que a ansiedade influencia o comportamento de medo condicionado ao contexto (Ponder et al., 2007; Sartori et al., 2011b; Silva et al., 2002; Silva & Frussa-Filho, 2000). Um estudo utilizando a sexta geração de ratos da linhagem CAC mostrou a ausência de diferenças cognitivas analisadas no teste de reconhecimento de novos objetos, quando comparado com ratos Wistar do grupo controle (Dias et al., 2009). Novos testes cognitivos devem ser feitos com essas linhagens, mas esses dados indicam que o método de seleção utilizado no modelo genético dos CAC/CBC tem selecionado animais de acordo com seu traço de ansiedade e não pelas suas habilidades cognitivas.

Outras evidências na bibliografia suportam a hipótese de que o medo condicionado ao contexto está mais relacionado a padrões comportamentais de ansiedade. Cruzamentos seletivos de camundongos com altos níveis de comportamentos relacionados à ansiedade, testados no LCE, também resultaram no aumento de congelamento condicionado ao contexto (Sartoli et al., 2011). Além disso, Sokoloff et al. (2011) identificaram múltiplos marcadores ligados a locos gênicos (QTL ou *Quantitative Trait Loci*) de comportamentos relacionados à ansiedade, analisados no teste de medo condicionado e no teste do campo aberto, sendo esse um teste amplamente usado como teste de ansiedade. Esses estudos demonstram a existência de um compartilhamento de uma porção da estrutura gênica dos comportamentos relacionados ao medo condicionado e à ansiedade.

A ansiedade é representada por traços complexos que têm sido estudados em uma série de modelos animais, e alguns pesquisadores têm encontrado uma comorbidade entre ansiedade e depressão (Cryan & Holmes, 2005; Merikangas et al., 2003; Wegener et al., 2012). Landgraf e Wigger (2002) mostraram que animais com altos padrões de ansiedade apresentam comportamentos relacionados à depressão e passividade mais elevados, quando confrontados a uma situação de estresse. Novos estudos farmacológicos têm demonstrado tratamentos terapêuticos eficientes para ambos os tipos de transtornos (Carr et al., 2011; Holmes et al., 2003; Nikiforuk et al., 2011). Porém, nenhum desses estudos investigou diferenças no traço ou em fatores genéticos. Nosso estudo não encontrou diferença em comportamentos relacionados à

depressão analisados no teste do nado forçado. Da mesma forma, um estudo prévio utilizando a quarta geração da linhagem CAC também não encontrou diferenças entre a linhagem e o grupo controle no teste do nado forçado (Dias et al., 2009).

Essa ausência de correlação entre ansiedade e depressão também foi encontrada em um modelo genético para o estudo da depressão, desenvolvido através de cruzamentos seletivos para alta sensibilidade a agentes anti-colinesterase irreversíveis, denominado modelo de Flinders Sensitive Line (FSL). Essa nova linhagem teve seu traço significativamente elevado de imobilidade no teste do nado forçado revertido por um tratamento crônico de uma droga antidepressiva. Esse mesmo resultado não foi encontrado na linhagem selecionada para resistência ao mesmo composto, a Flinders Resistant Line (FRL) (El Khoury et al., 2006; Overstreet & Russell, 1982; Overstreet et al., 2005; Schiller et al., 1992). Sob condições basais, sem intervenção farmacológica ou agentes estressores, não foram descobertas diferenças entre as linhagens FSL e FRL (Overstreet et al. 1995) e o tratamento com benzodiazepínicos exerceu efeito ansiolítico similar em ambas as linhagens, sem que houvessem diferenças entre as linhagens (Schiller et al. 1991). Esses dados, em conjunto com os até então gerados com a presente linhagem CAC/CBC, não são suficientes para se determinar o mecanismo neurofisiológico que está sendo afetado pela seleção genética empregada, mas corrobora a hipótese de que os traços genéticos de modelos animais de ansiedade e depressão são distintos.

Finalmente, o presente estudo investigou a liberação de corticosterona dos ratos das linhagens CAC e CBC da quinta geração para analisar a resposta fisiológica dos animais em estado basal ou quando submetidos a um agente estressor. Foi encontrado um aumento significativo da concentração de corticosterona nos animais re-expostos à câmara de medo condicionado. Porém, nenhuma diferença entre as linhagens CAC e CBC foi encontrada em qualquer das condições testadas, com ou sem estresse prévio à coleta do sangue. Muitos estudos que avaliaram a influência da corticosterona no medo condicionado encontraram uma correlação positiva entre a concentração desse hormônio e a consolidação da memória aversiva quando se usa um estímulo condicionado preditivo (CS), mas não com medo condicionado ao contexto (Hui et al., 2004; Marchand et al., 2007; Roozendaal et al., 2006; Zorawski & Killcross, 2002). Marchand et al. (2007) analisaram o nível de corticosterona em ratos testados no condicionamento ao contexto e ao tom e os efeitos da injeção de corticosterona nesses mesmos

testes. O nível de corticosterona aumentou depois da apresentação pareada do tom e do choque e foi significativamente maior que a apresentação apenas do choque. A injeção do hormônio após a sessão de associação potencializou o pareamento do CS durante a apresentação do tom no dia do teste, mas não houve o mesmo efeito no condicionamento ao contexto.

Nossos estudos foram os primeiros a avaliar o nível de corticosterona das linhagens CAC e CBC, sendo que os resultados não são suficientes para argumentar que não existem diferenças no sistema neuroendócrino dos ratos testados. No entanto, nossos resultados sugerem que a seleção segundo a resposta de medo condicionado ao contexto até a quinta geração não influenciou a liberação de corticosterona. Touma et al. (2008) desenvolveram recentemente um novo modelo genético de camundongos selecionados segundo o nível de ativação do eixo HPA submetidos a estresse. A hipótese sugerida pelos nossos dados poderia ser melhor esclarecida com exposição de animais com a alta ou baixa reatividade do eixo HPA ao teste de medo condicionado ao contexto. Porém, até o momento, tal teste ainda não foi realizado nos referidos camundongos. Mais estudos fisiológicos devem ser feitos a fim de contribuir com a validação segundo critérios de homologia, como vias de neurotransmissores envolvidos, dosagem de hormônios ACTH e CRF e testes de sensibilidade de receptores glicocorticóides ao longo do eixo HPA.

Os dados apresentados no presente trabalho, juntamente com outros dados publicados sobre a linhagem de ratos CAC/CBC, sustentam a viabilidade do uso de ratos com altos e baixos traços de medo condicionado ao contexto como um modelo de transtorno de ansiedade generalizada ou de ansiedade-traço. Nossos resultados corroboram a hipótese de que existe um link entre medo condicionado ao contexto e ansiedade, onde animais selecionados para alto percentual de medo condicionado ao contexto mostram alto comportamento relacionado à ansiedade, especialmente em ratos fêmeas. Esse é o primeiro estudo a analisar diferenças entre sexo em linhagens CAC/CBC em testes de ansiedade, sendo encontrado menores níveis de comportamentos relacionados à ansiedade e ao medo condicionado em fêmeas quando comparadas com machos. Possivelmente, o uso de linhagens selecionadas de ratos com traços mais ansiosos, que mostram um traço elevado de aversão, podem promover modelos de ansiedade com melhores critérios de validade, comparados com modelos baseados no “estado” ou com modelos de deleção de genes específicos. Dessa forma, mais estudos são necessários

para melhor validar o presente modelo, especialmente segundo os critérios de previsibilidade e homologia.

## 5. Experimento 2

### 5.1. Métodos

Para esse projeto foram adquiridos camundongos machos transgênicos B6SJL-Tg (APPSwFILon, PSEN1\*M146L\*L286V)6799Vas/J (5xFAD) e fêmeas controle (Wt, wildtype) da Jackson Laboratories (JAX stock#006554, Bar Harbor, ME, USA), que serviram como reprodutores. Os camundongos usados nos experimentos foram os filhotes resultantes desses cruzamentos, nascidos e mantidos no laboratório de Psicologia e Neurociência da Dalhousie University, Halifax, Canadá. Camundongos 5xFAD são heterozigotos e co-expressam o gene humano APP695 com três mutações – Swedish (K670N, M671L), Florida (I716V) e London (V717I) – e o gene PS1 com duas mutações (M146L e L286V). A genotipagem foi realizada pelo Dr. Christopher Sinal (Pharmacology Department, Dalhousie University) por análise de PCR de amostras coletadas por perfurações da orelha. Os animais foram mantidos em caixas-ninho de acrílico (18,8 x 28,0 x 12,5cm), com cobertura de maravalha e filtro em cima. Ração (Purina #5001) e água foram fornecidos *ad libitum*. O biotério foi mantido em temperatura constante ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) num ciclo claro-escuro 12:12 invertido, com as luzes se acendendo às 21h e 30min.

#### 5.1.1. Condições de alojamento

Após o desmame (22 dias de idade), camundongos da mesma ninhada foram alojados em grupos de 2-4 animais do mesmo sexo e, quando atingiram 20 semanas de idade, os camundongos foram pesados e colocados em condições de alojamento diferentes. Metade deles (5xFAD: 8 machos + 8 fêmeas; Wt: 10 machos + 10 fêmeas) foram alojados em caixas-ninho individuais e a outra metade (5xFAD: 10 machos + 9 fêmeas; Wt: 8 machos + 9 fêmeas) permaneceram na mesma caixa-ninho em que estavam, em grupos de até 4 animais. Essa nova condição de alojamento foi mantida por 30 dias, quando os camundongos foram pesados

novamente e mensurados de acordo com a escala de reatividade à manipulação (wildness), detalhada mais adiante, para então dar início aos demais testes comportamentais. A duração desse período foi escolhida com base nos resultados obtidos em uma pesquisa prévia em nosso laboratório (Martin & Brown, 2010), onde camundongos mantidos isolados socialmente demonstraram comportamentos indicativos de depressão.

Depois de avaliada a reatividade dos animais, eles foram submetidos a uma bateria de testes comportamentais na seguinte ordem: labirinto em cruz elevado, caixa de transição claro-escuro, teste do nado forçado, teste de suspensão pela cauda, labirinto aquático de Morris e teste de medo condicionado ao contexto e discreto. Os animais foram divididos em seis grupos experimentais, baseados em três variáveis (condição de alojamento, genótipo e sexo), tendo sido os experimentos conduzidos com base em um delineamento fatorial completamente randomizado de 2 X 2 X 2. Os testes de ansiedade foram realizados primeiro por serem os menos aversivos e para que se pudesse medir a ansiedade basal dos animais imediatamente após o período de isolamento. Todos os testes foram realizados durante a fase escura do ciclo claro-escuro e todos foram finalizados em menos de um mês. O experimentador foi mantido cego quanto ao genótipo dos camundongos até o término do experimento. Os animais foram tratados de acordo com os regulamentos do Canada Council on Animal Care e o protocolo experimental foi aprovado pelo Dalhousie University Committee on Animal Care.

### **5.1.2. Pesagem**

Os camundongos foram pesados primeiramente quando foram isolados e mais uma vez antes dos testes começarem. A mudança do peso ao longo do período de um mês foi utilizado como uma medida indicativa de depressão, por se considerar que ela aumenta o apetite (Romans et al., 2007; Martin & Brown, 2010).

### **5.1.3. Testes comportamentais**

#### **Escala de reatividade à manipulação**

Quando os camundongos foram pesados após os 30 dias de separação social, eles foram mensurados de acordo com a escala de reatividade à manipulação (wildness score) desenvolvida por Wahlsten et al. (2003). Essa escala foi utilizada para avaliar se o isolamento surtiu efeito no

temperamento e reatividade ao toque dos animais. Depois do isolamento, alguns roedores têm apresentado um aumento na agressividade (Fone & Porkess, 2008). Assim sendo, a escala de reatividade foi usada para examinar diferenças entre cepas e o efeito do isolamento social sobre a resistência à manipulação. A escala de reatividade tem níveis que variam de 0 a 6, sendo “0” quando há mínima resistência à manipulação e “6” quando o animal pula da mão do experimentador, pula da caixa e corre pela sala (Tabela 1).

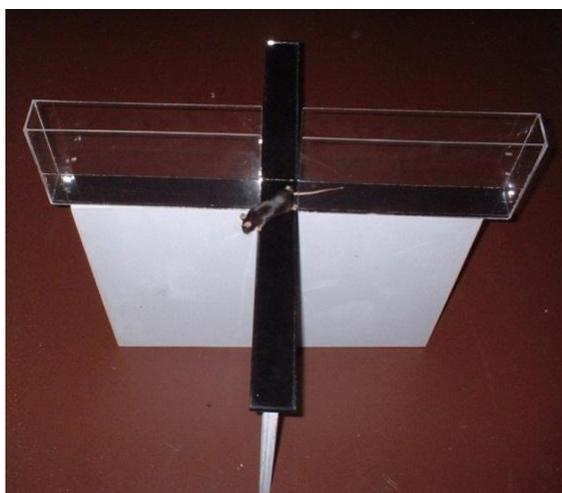
**Tabela 1.** Escala de reatividade do camundongo à manipulação do experimentador (adaptada de Wahlsten et al., 2003).

Índice	Comportamento	Comentários
0	Mínima resistência à captura	
1	Evita o contato correndo pela caixa	Deve completar pelo menos uma volta pela caixa, indo de um canto ao outro ou percorrendo pelas bordas
2	Pula nas paredes da caixa	Quando é perseguido, não se esconde entre os companheiros de caixa para esperar sua vez; o camundongo é frequentemente capturado pela cauda, na parede
3	Pula para fora da caixa	Tanto pulos longos do assoalho da caixa ou pulos curtos das paredes; geralmente é capturado depois de aterrissar na mesa.
4	Corre para longe da caixa	Com ou sem a perseguição intensa do experimentador
5	Pula da mesa ou aparato para o piso	Normalmente enquanto é perseguido; pode acontecer com um pulo longo do assoalho da caixa; geralmente é capturado um pouco depois de aterrissar
6	Corre em volta da sala	Não precisa completar um circuito completo; qualquer situação que requeira perseguição ativa para recapturar

### Labirinto em cruz elevado

O aparato do LCE utilizado era feito de acrílico, com o piso pintado de cinza e paredes translúcidas que continha quatro braços (30 X 5 cm cada) dispostos em forma de cruz, elevados a 45 cm do solo. Dois dos braços são abertos e contêm uma pequena borda de acrílico transparente de 1cm de altura para minimizar eventuais quedas dos animais. Os outros dois braços, dispostos perpendicularmente aos abertos, são revestidos por paredes laterais de 15cm de altura e são

denominados braços fechados. Uma arena central de 5 X 5 cm une os quatro braços entre si (Figura 9). Cada camundongo foi colocado na área central com a cabeça voltada para um dos braços abertos e mantido lá por 5 min para explorar livremente o aparato. Após cada sessão, o labirinto foi limpo com uma solução de álcool etílico a 70% para eliminar sujeiras e pistas olfatórias; depois foi seco. A sessão experimental foi iluminada com uma luz branca (70W) e gravada com uma filmadora digital localizada a 1m do labirinto. Para cada animal, foi avaliada a frequência e duração de entrada e permanência nos braços abertos e fechados, comportamento de esquadrihar, postura de estiramento, congelamento, cruzamento da linha e comportamento de levantar sobre as patas traseiras. Posturas de estiramento foram definidas como o estiramento do corpo antes de retornar à posição original, esquadrihar quando o animal colocava a cabeça em direção ao precipício do braço aberto e cruzamento da linha quando o animal cruzava uma linha demarcada no meio de cada braço do aparato com as quatro patas.



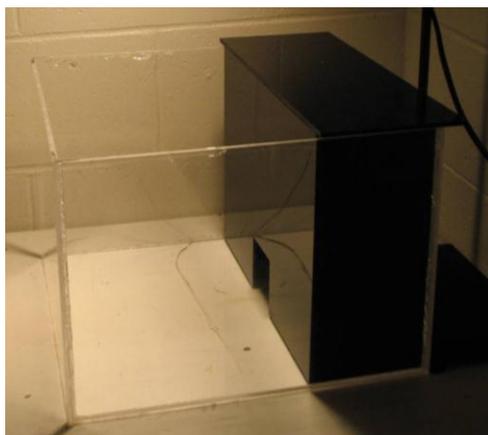
**Figura 9.** Foto do labirinto em cruz elevado utilizado.

### **Caixa de transição claro-escuro**

A caixa de transição claro-escuro mede a ansiedade incondicionada e comportamento exploratório em roedores (Bourin & Hascoët, 2003). O aparato é feito de acrílico (45 X 27 X 27cm) e foi dividido em dois compartimentos. O compartimento pequeno (18 X 27cm) foi pintado de preto, enquanto que o maior (27 X 27cm) foi mantido incolor. O compartimento escuro foi coberto com uma tampa de acrílico pintada de preto e separada do compartimento claro por uma porta (7.5 X 7.5cm), localizada no nível do solo, no meio da parede (Figura 10).

Uma lâmpada incandescente de 60W foi colocada a 40 cm acima do centro do compartimento claro, conferindo uma forte iluminação (640 lux, Sekonic Flashmate).

Utilizando o procedimento validado por Costall et al. (1989) para sensibilidade à ansiedade, os camundongos foram colocados no centro do compartimento claro, voltados com a face para a porta e mantidos por 5 min para livre exploração. Os comportamentos foram avaliados por um experimentador sentado a 1m do aparato, utilizando o programa Hindsight (MS-DOS Versão 1.5) e uma filmadora para casos de reavaliação. Após 5 min de teste, os animais foram retirados e o aparato foi limpo com solução de álcool etílico 70%, uma vez que sujeira na caixa claro-escuro retira o componente neofóbico associado ao aparato (Bourin & Hascoët, 2003). Quatro tipos de comportamento dos animais foram analisados: tempo de permanência nos compartimentos claro e escuro, número de transições entre os compartimentos e número de comportamentos de espreitar. O tempo despendido nos compartimentos foi utilizado para calcular o percentual de tempo no compartimento claro. As transições foram definidas como o número de vezes que o camundongo passou para o compartimento oposto com todas as quatro patas e o comportamento de espreitar foi definido quando apenas a cabeça e as patas dianteiras do animal no compartimento escuro passaram para o compartimento claro, seguido de um recuo para o compartimento escuro.



**Figura 10.** Foto da caixa de transição claro-escuro utilizada no experimento.

### **Teste do nado forçado**

Para o teste do nado forçado foi utilizado um becker de 2L com 13 cm de altura de água (1600 mL) a  $22 \pm 2$  °C. A água era funda o suficiente para evitar que o camundongo encostasse

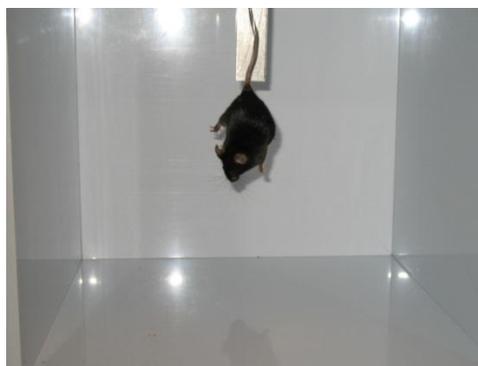
sua cauda no fundo do becker (Figura 11). Cada animal foi testado em sessões de 6 min, filmadas a uma distância de 1m, tendo sido mensurados tempo, frequência e latência para imobilidade, utilizando-se o programa Hindsight (MS-DOS Versão 1.5). O tempo de imobilidade foi convertido em percentual de tempo da sessão e tal comportamento foi definido como a suspensão de todos os movimentos, exceto aqueles necessários para permanecer boiando, como o movimento suave de uma das patas. (Porsolt et al., 1997; Martin & Brown, 2011).



**Figura 11.** Foto do teste do nado forçado utilizado.

### **Teste de suspensão pela cauda**

O teste de suspensão pela cauda mede a resposta do animal à contenção. Nesse teste, o camundongo foi fixado pela cauda a uma haste de alumínio, utilizando-se fita adesiva transparente (Scotch). A haste, medindo  $11,5 \times 2,2 \times 0,15$ cm, ficava suspensa verticalmente do teto de uma caixa ( $32 \times 33 \times 33$ cm) que continha uma abertura frontal para permitir a visualização do animal pelo observador e para a filmagem (Figura 12). Cada animal foi testado em uma única sessão de 6 min e a duração da imobilidade, definida como a suspensão de todos os movimentos, foi registrada no programa Hindsight para MS-DOS Versão 1.5 e convertida em percentual de tempo da sessão. A frequência e a latência para imobilidade também foram analisadas e todas as sessões foram filmadas para eventual re-análise.



**Figura 12.** Foto do teste de suspensão pela cauda.

### **Labirinto aquático de Morris**

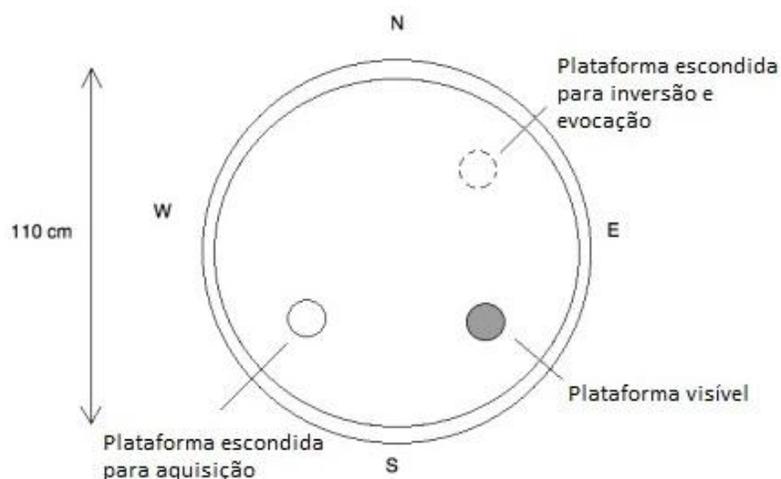
O labirinto aquático é usado para avaliar a memória visuo-espacial (Morris, 1984) e consiste em uma piscina circular de polipropileno (110cm de diâmetro e 20cm de altura), que foi preenchida com água a temperatura ambiente ( $22 \pm 2$  °C), com 14 cm de profundidade, como descrito detalhadamente em Brown e Wong (2007). Foram adicionados 500 mL de tinta branca não tóxica (Schola, Marieville, Quebec) para tornar a água opaca e garantir a camuflagem da plataforma de escape. Essa plataforma era constituída de um cilindro de acrílico pintado de branco (13,75 cm de altura e 9 cm de diâmetro). O nível da água foi a 0,5 cm acima da plataforma, tornando-a invisível. Para sessões que exigiam uma plataforma visível, foi acoplado um prolongamento vermelho com uma bandeira colorida (Figura 13).



**Figura 13.** Foto do labirinto aquático de Morris utilizado.

O labirinto aquático estava localizado no chão de uma sala (5,2m × 2,4m), com pôsteres e móveis ao redor das paredes que serviram como pistas visuais extra-labirinto. A atuação dos camundongos foi gravada em vídeo por uma filmadora localizada a 2,1m acima da piscina e os dados analisados por um programa computacional (Watermaze, Actimetrics, Inc., Evanston, IL). Durante o teste, a sala foi levemente iluminada com luz branca (30lx). O teste do labirinto aquático de Morris consistiu em quatro fases: aquisição (treino), inversão (treino), evocação (teste) e sessão com plataforma visível. Na fase de aquisição, durante os três primeiros dias com quatro sessões cada, os animais foram treinados a nadar até encontrar uma plataforma submersa invisível localizada no quadrante Sudoeste da piscina. Cada animal foi retirado da caixa de transporte utilizando-se um pote de plástico e colocado na piscina com o focinho voltado para a borda em uma posição inicial aleatória (Norte, Sul, Leste ou Oeste), sendo que as posições não se repetiam num mesmo dia. Se o camundongo não conseguisse encontrar a plataforma em 60s, ele era guiado manualmente até a plataforma e lá permanecido por aproximadamente 10s. O intervalo entre as sessões foi de 5 min, aproximadamente.

Nas sessões de inversão, os animais eram treinados (4 sessões/dia por 3 dias) a encontrar a plataforma da mesma maneira descrita na sessão de aquisição. Porém, nessa fase, a plataforma foi colocada no quadrante oposto ao anterior: no Nordeste. No sétimo dia foi testada a memória espacial do camundongo na sessão de evocação, que consistiu de uma sessão única de 60s sem qualquer plataforma. No último dia de teste, 8º dia, o animal passou por 4 sessões que continham uma plataforma visível colocada no quadrante Sudeste (Figura 14). Em todas as sessões foram analisados a latência para localização da plataforma, distância percorrida, velocidade de nado e percentual de tempo de tigmotaxia (nado nas bordas). Na sessão de evocação (sem a plataforma), ao invés da latência para a localização da plataforma, foi analisado o número de vezes que o animal cruzou a localização imaginária da plataforma, o percentual de tempo de permanência no quadrante correto e a proximidade do local imaginário da plataforma.



**Figura 14.** Ilustração das posições das plataformas utilizadas no labirinto aquático de Morris.

### Teste de medo condicionado ao contexto e à pista discreta

O teste de medo condicionado ao contexto e discreto utilizou uma caixa de condicionamento (Med Associates, St. Albans, VT, USA) que tinha um alto-falante interno e dimensões de  $30,5 \times 24,1 \times 21,0$  cm. O alto-falante foi conectado a um computador que continha o software Freeze-frame (Actimetrics) e liberava um tom de 30s a 80dB e 1000Hz como pista sonora (CS). A caixa de condicionamento também era conectada a um programa que liberava choques nas grades do assoalho por 2s a 0,5 mA (US). Essa caixa estava localizada dentro de uma caixa de isolamento acústico parcial com uma filmadora localizada do lado de fora para que o experimentador pudesse registrar a atividade do animal e para casos de re-análise dos dados. Antes de cada dia de experimento, o aparato foi calibrado para garantir que o choque elétrico e o som estivessem sendo administrados corretamente (Figura 15).

Os camundongos foram levados para a sala experimental um de cada vez e, quando colocados na caixa de condicionamento, o programa Freeze-frame começava a sessão. Durante as sessões, o comportamento de congelamento foi considerado como a imobilidade total do animal, com exceção dos movimentos respiratórios, e foram registrados manualmente por um experimentador, utilizando o método de amostragem de tempo a cada 10s. O procedimento experimental consistiu em duas fases: treino e teste. Durante o treino, o estímulo condicionado (CS) e o incondicionado (US) foram apresentados separados por um intervalo de 20s. Essa

sessão ocorreu no 1º dia com duração total de 14 min e apresentação do CS pareado com US por quatro vezes. Após o início da sessão, os animais exploraram o aparato por 2 min antes da primeira apresentação do CS-US. Cada apresentação consistiu em um tom de 30s, seguido por um intervalo de 20s e, então, a apresentação do choque nas patas por 2s. Após o choque, foi dado um intervalo de 2 min antes da próxima apresentação de CS-US.



**Figura 15.** Foto da caixa de condicionamento utilizada no experimento.

O teste mnemônico ocorreu nos dias 2 e 3 do experimento, onde os camundongos foram divididos em dois grupos: um exposto ao teste de contexto no dia 2 e ao teste com pista sonora no dia 3, e o outro com essa ordem trocada. Na sessão de teste de memória ao contexto os animais foram recolocados na caixa de condicionamento por 5 min sem apresentação de choque ou som. Na sessão de teste de memória à pista sonora o animal foi colocado em uma nova caixa, diferente da qual o som foi apresentado. Essa nova caixa foi aromatizada com extrato de laranja (Club House) e tinha o assoalho de acrílico e as paredes e o teto com listras brancas e pretas. Um alto-falante, conectado ao computador com o programa Freeze-frame, estava localizado em um dos lados da caixa (Figura 16). O teste com a pista sonora teve 7,5 min de duração, com 3 min iniciais sem qualquer apresentação de estímulo, seguido de um som de 80 dB por 3 min. Após a apresentação do som, o animal permaneceu na caixa por mais 1,5 min antes de ser retirado do aparato.



**Figura 16.** Foto da caixa de teste de memória à pista sonora utilizada no experimento.

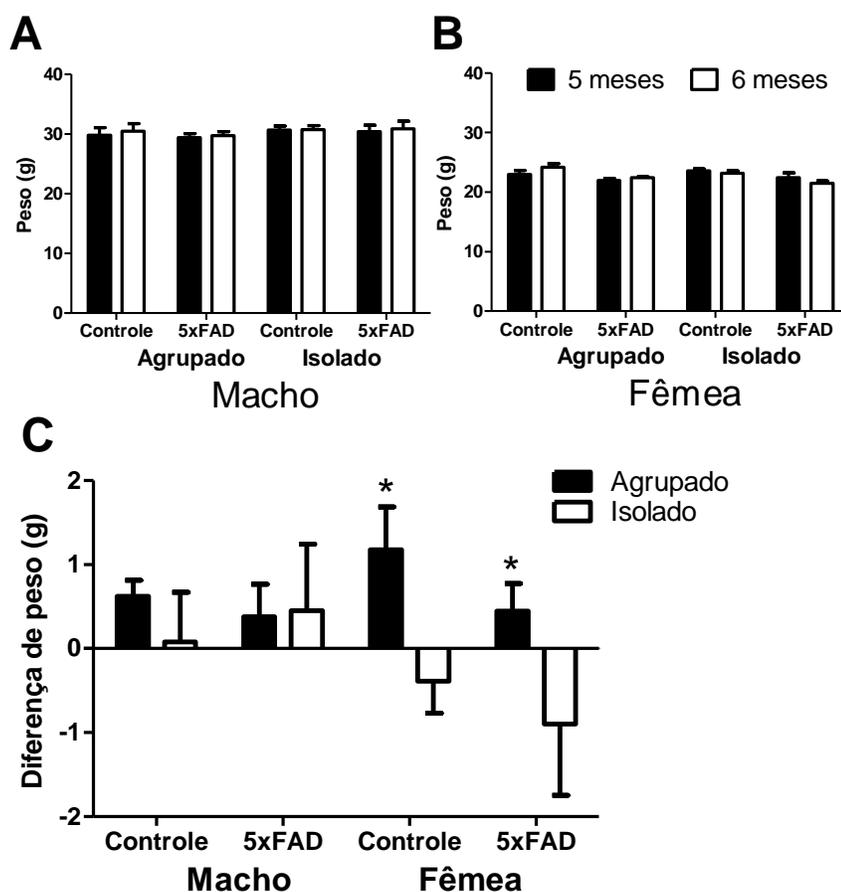
#### **5.1.4. Análise estatística**

Todos os dados foram analisados utilizando-se o programa StatView V5.01 (SAS Instruments Inc.), no qual três fatores (condições de alojamento, genótipo e sexo) foram comparados em uma ANOVA de três vias (three-way ANOVA). Nos casos em que foram encontradas interações significativas ou tendências para tal, foram feitas comparações *post hoc* com two-way ANOVA (para comparações com dois fatores) ou teste *t* (para comparações com um fator). Apenas interações com efeitos significativos foram mostrados.

## **5.2. Resultados**

### **Pesagem**

Os camundongos machos de ambos os genótipos, transgênico e controle, se mostraram mais pesados que as fêmeas, tanto em condições agrupada ( $F(1,32)=87,463$ ,  $p<0,0001$ ) ou separada ( $F(1,32)=144,523$ ,  $p<0,0001$ ) (Figura 17A e 17B). Comparando o peso dos animais antes e depois do período de separação, os camundongos fêmeas separadas perderam peso depois de um mês de isolamento social ( $F(1,32)=7,592$ ,  $p<0,01$ ), mas o mesmo não ocorreu com os machos  $F(1,32)<1$  (Figura 17C). Não houve efeito de genótipo ( $F(1,64)<1$ ) na diferença dos pesos antes e depois do período de separação (Figura 17C).

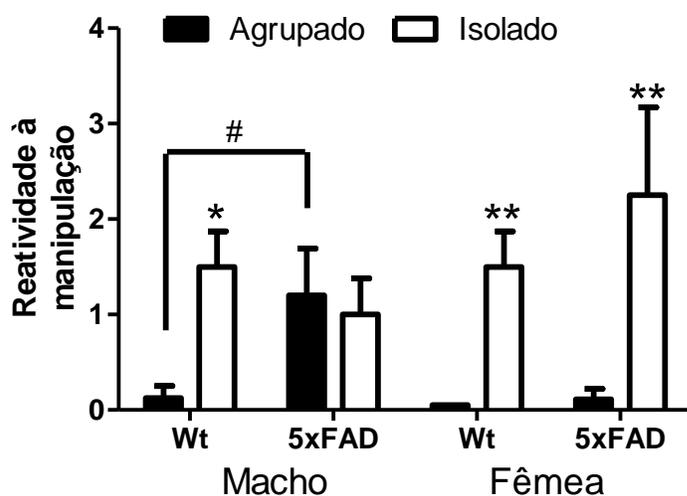


**Figura 17.** Média (+EPM) do peso corporal de camundongos machos (A) e fêmeas (B) antes (5 meses) e depois (6 meses) do período de isolamento social; (C) média ( $\pm$ EPM) da diferença de peso entre esses dois períodos. (\*) Representa diferença significativa na variação do peso entre as condições de alojamento ( $p < 0,01$ ).

### Escala de reatividade à manipulação

Camundongos separados demonstraram maiores níveis de reatividade à manipulação em comparação com os animais mantidos agrupados ( $F(1,64)=15,915$ ,  $p < 0,001$ ; Figura 18) e houve uma interação significativa entre genótipo e sexo ( $F(1,64)=4,169$ ,  $p < 0,05$ ). Fêmeas isoladas socialmente, de ambos os genótipos, tiveram níveis significativamente maiores de reatividade do que fêmeas agrupadas ( $F(1,32)=15,561$ ,  $p < 0,001$ ). O teste  $t$  de amostras independentes demonstrou que machos controle separados apresentaram níveis significativamente maiores de reatividade do que machos controle agrupados ( $t(16)= 3,170$ ,  $p < 0,01$ ). Um teste  $t$  de amostras

pareadas mostrou que machos 5xFAD agrupados tiveram reatividade maior do que machos controle agrupados ( $t(7)=-2,434$ ,  $p<0,05$ ).



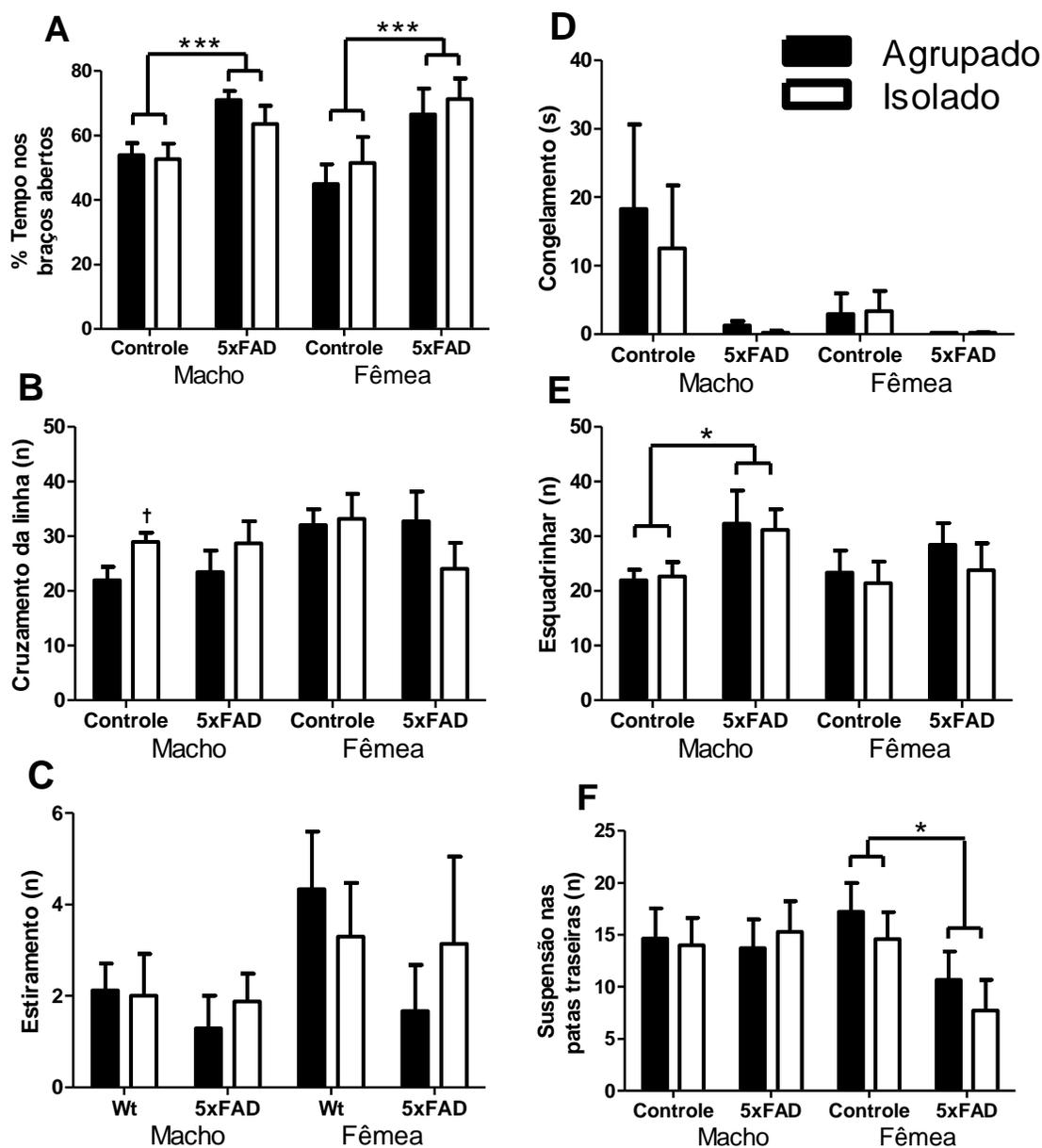
**Figura 18.** Média (+EPM) do índice de reatividade durante a primeira manipulação aos 6 meses de idade. (\*) Representa diferença significativa entre as condições de alojamento ( $*p<0,01$ ;  $**p<0,001$ ) e (#) representa diferença entre genótipos ( $p<0,05$ ) do mesmo sexo e condições de alojamento.

### Labirinto em cruz elevado

Um camundongo fêmea separada transgênica não foi utilizada na análise, pois caiu do aparato. Não foram encontradas diferenças significativas entre camundongos separados ou agrupados segundo a porcentagem de tempo nos braços abertos ( $F(1,63) < 1,00$ ; Figura 19A), ou entre machos e fêmeas ( $F(1, 63) < 1,00$ ). Entretanto, camundongos transgênicos permaneceram significativamente mais tempo nos braços abertos do que os camundongos controle ( $F(1,63)=16,318$ ,  $p<0,0001$ ), indicando um menor nível de ansiedade da linhagem 5xFAD. Não houve diferença no número de cruzamento das linhas entre as diferentes condições de alojamento ( $F(1,63) < 1,00$ ), de genótipo ( $F(1,63) < 1,00$ ) ou de sexo ( $F(1,63) = 2,886$ ,  $p>0,05$ ; Figura 19B), indicando ausência de diferença na atividade locomotora. Uma análise post-hoc mostrou que camundongos machos separados controle tiveram um maior número de cruzamento das linhas comparado com animais agrupados ( $t(16)=2,452$ ,  $p<0,05$ ). Não foram constatadas diferenças na

postura de estiramento entre as condições de alojamento ( $F(1,63) < 1,00$ ), genótipo ( $F(1,63)=1,569$ ,  $p > 0,05$ ) ou sexo ( $F(1,63) = 2,914$ ,  $p > 0,05$ ; Figura 19C).

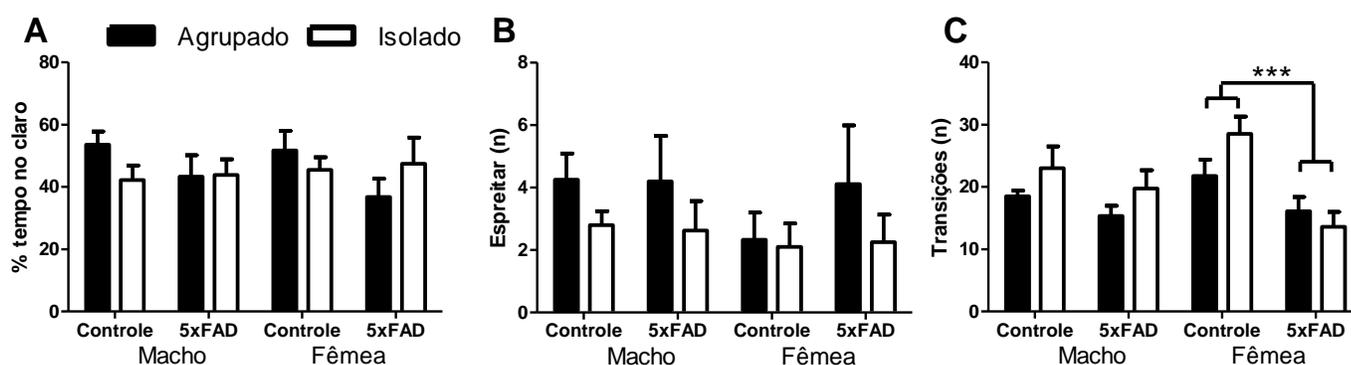
Não houve diferença significativa entre animais agrupados e separados no tempo de congelamento ( $F(1,63) < 1,00$ ; Figura 19E) ou entre machos e fêmeas ( $F(1, 63)=2,666$ ,  $p > 0,05$ ), mas os camundongos transgênicos congelaram menos que o grupo controle ( $F(1,63)=5,045$ ,  $p < 0,05$ ), indicando um menor índice de ansiedade desses animais. Não houve diferenças significativas entre camundongos agrupados ou separados no número de comportamentos de esquadrinhar ( $F(1,63) < 1,00$ ; Figura 19F) ou entre machos e fêmeas ( $F(1, 63) < 1,00$ ). Entretanto, camundongos machos transgênicos tiveram uma frequência maior nesse comportamento do que os machos controle ( $F(1,63)=4,954$ ,  $p < 0,05$ ), o que indica um menor índice de ansiedade dos animais transgênicos. Por fim, não foram encontradas diferenças entre as condições de alojamento ( $F(1,63) < 1,00$ ; Figura 19G), genótipo ( $F(1,63)=2,711$ ,  $p > 0,05$ ) ou sexo ( $F(1,63) < 1,00$ ) na frequência de suspensão sobre as patas traseiras. No entanto, observou-se um efeito significativo do genótipo entre camundongos fêmeas ( $F(1,31)=5,848$ ,  $p < 0,05$ ), onde as fêmeas controle tiveram maior frequência de suspensão sobre as patas traseiras do que fêmeas transgênicas.



**Figura 19.** Média (+EPM) do percentual de tempo nos braços abertos (A), número de cruzamentos da linha (B), número de posturas de estiramento (C), tempo de congelamento (D), número de comportamentos de esquadrinhar (E), e número de suspensão nas patas traseiras (F) no labirinto em cruz elevado. (\*) Representa diferença significativa entre os genótipos (\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,0001$ ) e (†) representa diferença entre as condições de alojamento († $p < 0,05$ ) no mesmo genótipo.

### Caixa de transição claro-escuro

Não houve diferenças significativas entre condições de alojamento ( $F(1,64)<1,00$ ; Figura 20A), genótipo ( $F(1,64)<1,00$ ) ou sexo ( $F(1,64)<1,00$ ) no percentual de tempo gasto no compartimento claro e sem qualquer interação significativa. Da mesma forma, não houve efeito significativo da condição de alojamento ( $F(1,64)<1,00$ ; Figura 20B), genótipo ( $F(1,64)<1,00$ ) ou sexo ( $F(1,64)<1,00$ ) no número de comportamentos de espreitar. As camundongos fêmeas 5xFAD tiveram um maior número de transições entre os compartimentos claro e escuro comparado com as fêmeas controle ( $F(1,32)=15,867$ ,  $p<0,001$ ; Figura 20C), mas não houve diferença de transições entre os camundongos machos ( $F(1,32)=1,577$ ,  $p>0,05$ ).



**Figura 20.** Média (+EPM) do percentual de tempo gasto no compartimento claro (A), número de comportamentos de espreitar (B) e número de transições entre os compartimentos (C) na caixa de transição claro/escuro. (\*\*\*) Representa diferença significativa entre genótipos ( $p<0,001$ ).

### Teste do nado forçado

Não houve diferenças significativas no tempo de imobilidade entre as condições de alojamento avaliadas ( $F(1,64)<1,00$ ; Figura 21A), mas camundongos 5xFAD permaneceram mais tempo imóveis do que os controle ( $F(1,64)=12,797$ ,  $p<0,001$ ) e as fêmeas ficaram significativamente menos tempo imóveis do que os machos ( $F(1,64)=16,763$ ,  $p<0,0001$ ). Houve uma interação significativa entre sexo e genótipo ( $F(1,64)=6,585$ ,  $p<0,05$ ) onde uma ANOVA de duas vias mostrou que fêmeas 5xFAD permaneceram menos tempo imóveis do que fêmeas do

grupo controle ( $F(1,32)=15,644, p<0,001$ ) e do que camundongos machos ( $F(1,32)=46,073, p<0,0001$ ).

Não houve diferença entre as condições de alojamento ( $F(1,64)=1,410, p>0,05$ ; Figura 21B) ou genótipos na latência para imobilidade ( $F(1,64)=2,742, p>0,05$ ), mas camundongos fêmeas demonstraram uma latência para imobilidade maior do que machos ( $F(1,64)=16,182, p<0,001$ ).

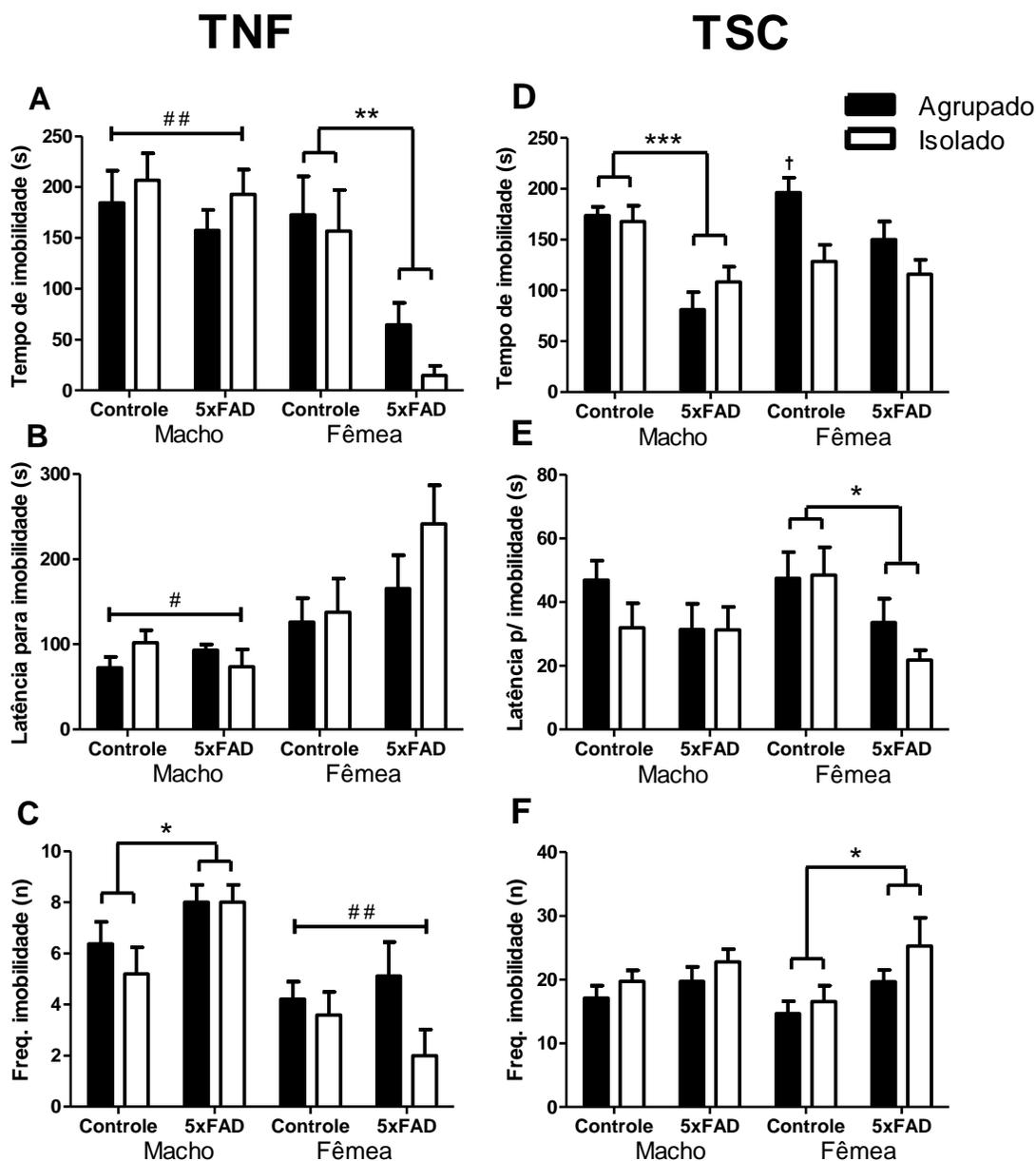
Não houve diferença entre as condições de alojamento ( $F(1,64)=3,462, p=0,0674$ ; Figura 21C) ou genótipos na frequência de imobilidade ( $F(1,64)=1,982, p<0,05$ ), mas ao se comparar tal comportamento entre os sexos, camundongos fêmeas tiveram uma frequência menor do que machos ( $F(1,64)=22,968, p<0,0001$ ). Além disso, camundongos machos 5xFAD tiveram maior frequência de imobilidade do que machos controle ( $F(1,32)=6,711, p<0,05$ ).

### **Teste de suspensão pela cauda**

Nesse teste, uma fêmea do grupo controle, separada, não foi utilizada na análise dos dados, pois ela conseguiu alcançar a haste de alumínio do aparato, comprometendo o experimento. Não foram encontradas diferenças significativas entre as condições de alojamento ( $F(1,63)=3,416, p=0,069$ ; Figura 21D) ou o sexo ( $F(1,63)=1,906, p<0,05$ ) no tempo de imobilidade no presente teste. Entretanto, camundongos do grupo controle permaneceram significativamente mais tempo imóveis do que camundongos 5xFAD ( $F(1,63)=23,258, p<0,0001$ ). Foi encontrada uma interação significativa entre sexo e genótipo ( $F(1,63)=4,534, p<0,05$ ) e entre sexo e condições de alojamento ( $F(1,63)=8,020, p<0,01$ ). A ANOVA de duas vias feita separadamente por sexo mostrou que machos 5xFAD permaneceram menos tempo imóveis do que machos controle ( $F(1,32)=25,269, p<0,0001$ ), e um teste *t* mostrou que fêmeas controle separadas permaneceram menos tempo imóveis do que fêmeas controle agrupadas ( $t(16)=-3,139, p<0,01$ ).

Não houve efeito das condições de alojamento ( $F(1,63)=1,499, p>0,05$ ; Figura 21E) ou do sexo ( $F(1,63)<1,00$ ) sobre a latência para imobilidade, mas camundongos do grupo controle tiveram uma maior latência do que 5xFAD ( $F(1,63)=7,207, p<0,01$ ). A ANOVA de duas vias, feita separadamente por sexo, mostrou que houve um efeito significativo do genótipo entre

camundongos fêmeas ( $F(1,31)=7,488$ ,  $p<0,05$ ), mas não sobre os machos ( $F(1,31)=1,154$ ,  $p>0,05$ ).



**Figura 21.** Média (+EPM) do tempo (A), latência (B) e frequência (C) de imobilidade no teste do nado forçado. Média (+EPM) do tempo (A), latência (B) e frequência (C) de imobilidade no teste de suspensão pela cauda. (\*) Representa diferença significativa entre genótipos ( $*p<0,05$ ;  $**p<0,001$ ;  $***p<0,0001$ ), (#) representa diferença entre sexo ( $\#p<0,001$ ;  $##p<0,0001$ ) e (†) representa diferença entre condições de alojamento no mesmo genótipo.

Não houve efeito das condições de alojamento ( $F(1,63)=3,636$ ,  $p=0,061$ ; Figura 21F) ou do sexo ( $F(1,63)<1,00$ ) sobre a frequência de imobilidade, mas camundongos do grupo controle tiveram uma menor frequência de imobilidade se comparado ao 5xFAD ( $F(1,63)=7,911$ ,  $p<0,01$ ). A ANOVA de duas vias, feita separadamente por sexo, mostrou que houve um efeito significativo do genótipo entre camundongos fêmeas ( $F(1,31)=6,076$ ,  $p<0,05$ ), mas não sobre os machos ( $F(1,31)=1,899$ ,  $p>0,05$ ).

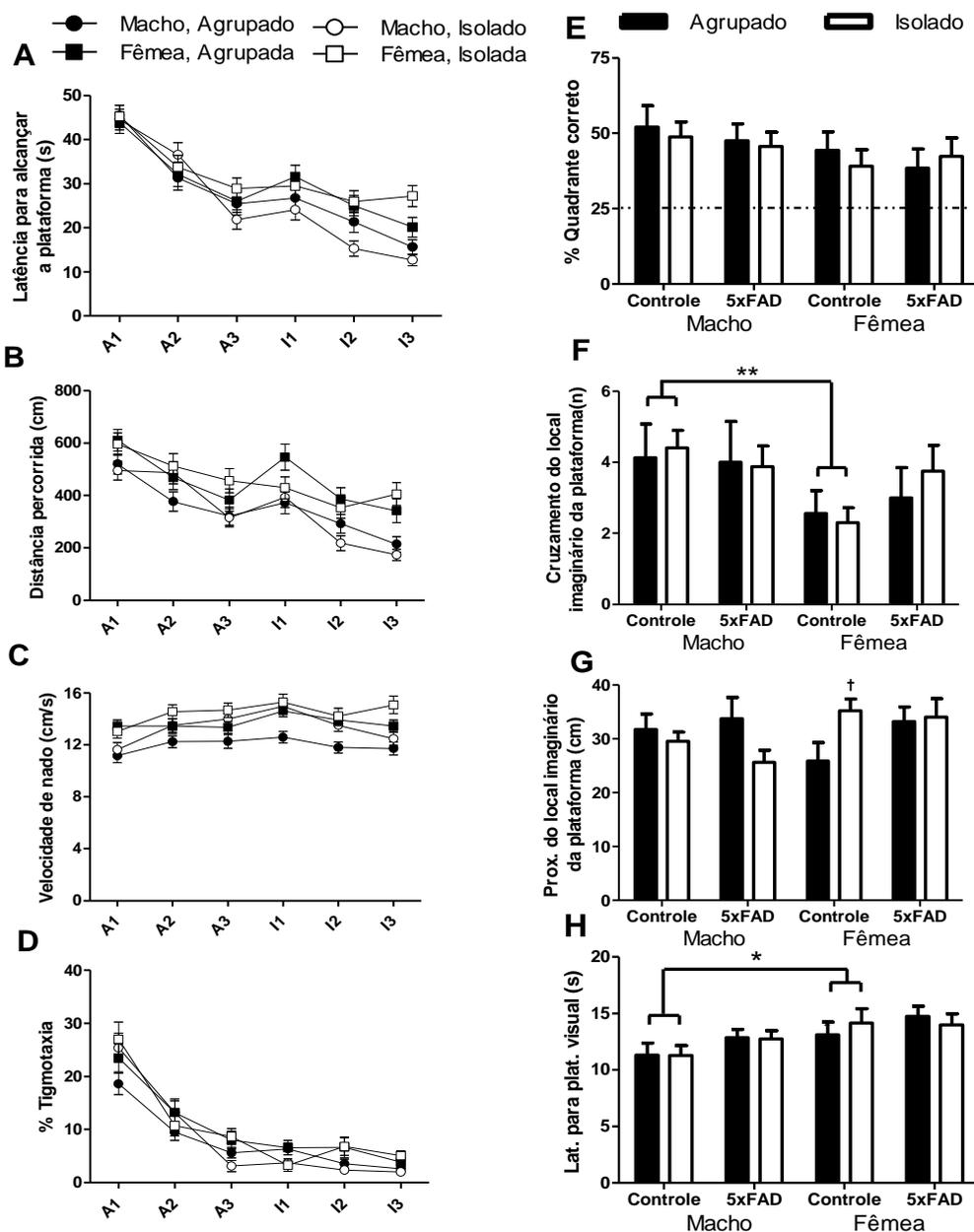
### **Labirinto aquático de Morris**

Não houve diferença na latência para alcançar a plataforma nas fases de aquisição e de inversão (treino) entre camundongos separados e agrupados ( $F(1,64)<1,00$ ; Figura 22A) ou entre transgênicos e grupo controle ( $F(1,64)<1,00$ ). No entanto, fêmeas tiveram uma latência significativamente maior para alcançar a plataforma do que os machos ( $F(1,64)=4,554$ ,  $p<0,05$ ). Todos os animais diminuíram sua latência para alcançar a plataforma ao longo dos seis dias de treino ( $F(5,320)=50,012$ ,  $p<0,0001$ ).

A distância percorrida até alcançar a plataforma escondida diminuiu significativamente ao longo das sessões de aquisição e de inversão ( $F(5,320)=22,802$ ,  $p=0,0001$ ; Figura 22B), indicando que houve o aprendizado da tarefa. Não houve diferenças entre camundongos agrupados ou separados ( $F(1,64)<1,00$ ) ou entre transgênicos e grupo controle ( $F(1,64)<1,00$ ), mas as fêmeas nadaram distâncias significativamente maiores do que os machos nas sessões de aquisição e de inversão ( $F(1,64)=14,707$ ,  $p<0,001$ ). A velocidade média de nado mudou ao longo dos dias ( $F(5,320)=6,238$ ,  $p<0,0001$ ; Figura 22C), mas a ANOVA de duas vias feita separadamente por sexo mostrou que essa diferença não foi significativa entre camundongos fêmeas ( $F(5,160)=2,085$ ,  $p=0,070$ ). Não houve diferenças significativas entre camundongos agrupados ou separados ( $F(1,64)=3,823$ ,  $p=0,0549$ ) ou entre transgênicos e grupo controle ( $F(1,64)=1,148$ ,  $p>0,05$ ), mas as fêmeas nadaram mais rápido do que os machos nas sessões de treino ( $F(1,64)=6,121$ ,  $p<0,05$ ). A ANOVA de duas vias mostrou que machos separados nadaram mais rápido do que machos agrupados ( $F(1,32)=4,688$ ,  $p<0,05$ ). Ao longo das sessões de treino, o percentual de tigmotaxia diminuiu significativamente ( $F(5,320)=56,080$ ,  $p<0,001$ ; Figura 22D), indicando boa percepção visual dos animais. Porém, não houve diferenças nesse comportamento entre camundongos agrupados e separados ( $F(1,64)<1,00$ ), entre transgênicos e grupo controle ( $F(1,64)=1,877$ ,  $p>0,05$ ) ou entre machos e fêmeas ( $F(1,64)=2,292$ ,  $p>0,05$ ).

Na sessão do teste de evocação da memória não houve diferença significativa no tempo gasto no quadrante correto entre os camundongos agrupados e separados ( $F(1,64) < 1,00$ ; Figura 22E) ou entre transgênicos e grupo controle ( $F(1,64) < 1,00$ ). Entretanto, houve uma tendência não significativa dos machos permanecerem mais tempo no quadrante correto do que as fêmeas ( $F(1,64) = 3,258$ ,  $p = 0,0758$ ). Todos os camundongos permaneceram mais tempo no quadrante correto do que o esperado pelo acaso ( $t(71) = 9,787$ ,  $p < 0,0001$ , média esperada = 25%). Não houve diferença significativa no número de cruzamentos do local imaginário da plataforma entre os animais agrupados e separados ( $F(1,64) < 1,00$ ; Figura 22F) ou entre transgênicos e grupo controle ( $F(1,64) < 1,00$ ). Mas, entre os animais do grupo controle, os machos tiveram um maior número de cruzamentos do local imaginário da plataforma do que as fêmeas ( $F(1,33) = 8,519$ ,  $p < 0,01$ ). Não houve diferença na proximidade média do local imaginário da plataforma entre animais das diferentes condições de alojamento ( $F(1,64) < 1,00$ ; Figura 22G), genótipo ( $F(1,64) < 1,00$ ) ou sexo ( $F(1,64) < 1,00$ ). No entanto, houve uma interação significativa entre condições de alojamento e sexo ( $F(1,64) = 6,078$ ,  $p < 0,05$ ) onde fêmeas controle separadas nadaram mais distante do local da plataforma do que fêmeas agrupadas do grupo controle ( $t(17) = 2,316$ ,  $p < 0,05$ ).

Não houve diferenças significativas nas latências para alcançar a plataforma visual entre os camundongos agrupados e separados ( $F(1, 64) < 1,00$ ; Figura 22H) ou entre os transgênicos e o grupo controle ( $F(1,64) = 2,535$ ,  $p > 0,05$ ), mas as fêmeas levaram mais tempo para alcançar a plataforma visual do que os machos ( $F(1,64) = 7,572$ ,  $p < 0,01$ ). A ANOVA de duas vias, feita separadamente por genótipo, mostrou que a diferença entre os sexos foi significativa entre camundongos do grupo controle ( $F(1,33) = 4,401$ ,  $p < 0,05$ ), mas não entre os transgênicos.

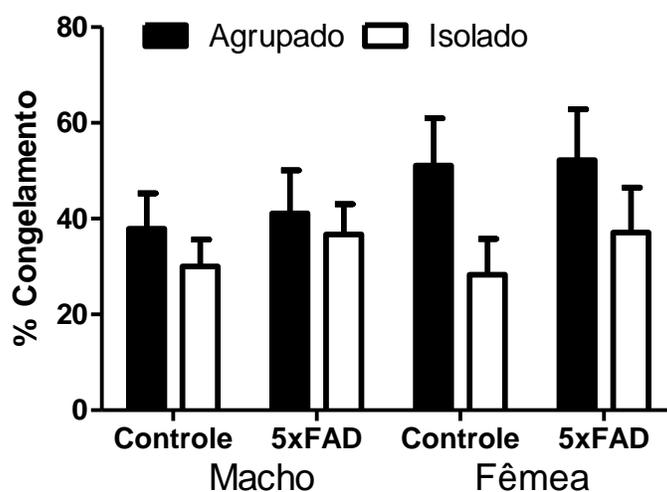


**Figura 22.** Média ( $\pm$ EPM) da latência para alcançar a plataforma invisível (A), distância percorrida (B), velocidade de nado (C) e percentual de tigmotaxia (D) ao longo das sessões de aquisição e inversão do labirinto aquático de Morris. Média ( $\pm$ EPM) do percentual de tempo gasto no quadrante correto (E), número de cruzamentos do local imaginário da plataforma (F), proximidade do local imaginário da plataforma (G) durante a sessão de evocação e latência para alcançar a plataforma visível (H) do labirinto aquático de Morris. Diferenças entre os sexos foram encontradas na latência para a plataforma, distância percorrida e velocidade de nado durante as sessões de aquisição e inversão. (\*) Representa diferença significativa entre sexo ( $*p < 0,05$ ;  $**p < 0,01$ ) do mesmo genótipo e ( $\dagger$ ) representa diferença entre as condições de alojamento ( $p < 0,05$ ) no mesmo genótipo. A linha pontilhada na figura (E) representa a atuação por chance (25%).

### Teste de medo condicionado discreto e ao contexto

Antes da realização do teste de medo condicionado, um camundongo macho transgênico agrupado morreu e, durante a sessão de condicionamento de uma fêmea transgênica agrupada, não houve emissão do som. Então, esse animal foi utilizado apenas para investigar a memória de medo condicionado ao contexto.

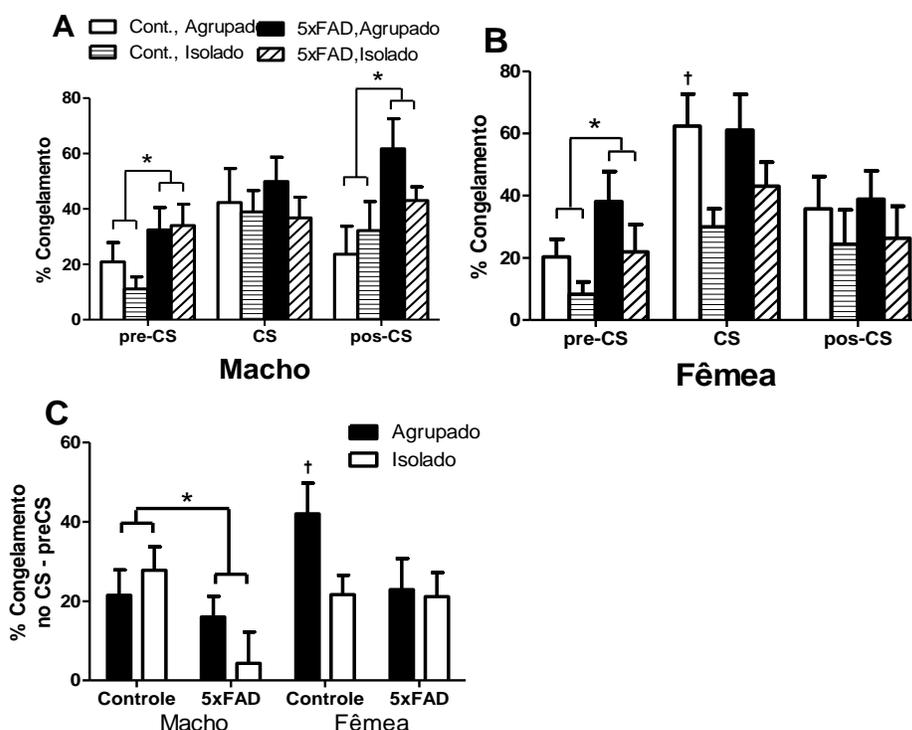
No teste de memória aversiva ao contexto, os camundongos separados tiveram o percentual de congelamento significativamente menor do que os animais agrupados ( $F(1,63)=4,502$ ,  $p<0,05$ ; Figura 23), mas não houve diferenças entre transgênicos e grupo controle ( $F(1,63)<1,00$ ) ou entre machos e fêmeas ( $F(1,63)<1,00$ ). A análise post-hoc entre camundongos fêmeas do grupo controle mostrou que os animais separados tiveram uma tendência a congelar menos que os animais agrupados ( $t(17)=-1,867$ ,  $p=0,079$ ).



**Figura 23.** Média (+EPM) do percentual de congelamento durante o teste de medo condicionado ao contexto.

O teste do condicionamento discreto foi analisado em três seções: antes (pré-CS), durante (CS) e depois (pós-CS) da apresentação do som. A ANOVA de três vias com amostras repetidas mostrou que o comportamento dos camundongos nas três seções do teste variou de acordo com o sexo ( $F(2,124)=3,198$ ,  $p<0,05$ ). Assim sendo, todas as análises foram feitas separadamente por sexo. Em machos, não houve uma diferença significativa entre camundongos agrupados ou

separados no percentual de congelamento ( $F(1,31)<1,00$ ; Figura 24A). Entretanto, houve uma diferença significativa entre transgênicos e grupo controle ( $F(1,31)=4,185$ ,  $p<0,05$ ), com os transgênicos congelando mais que o grupo controle. Uma análise post-hoc mostrou que as diferenças entre os genótipos de machos foram significativas tanto antes ( $F(1,31)=6,371$ ,  $p<0,05$ ) quanto depois da apresentação do som ( $F(1,31)=6,369$ ,  $p<0,05$ ). As fêmeas mantidas sob isolamento social congelaram significativamente menos que as agrupadas ( $F(1,31)=6,039$ ,  $p<0,05$ ; Figura 24B), mas não houve diferenças significativas no percentual de congelamento entre transgênicas e grupo controle ( $F(1,31)=1,339$ ,  $p>0,05$ ). Uma análise post-hoc mostrou que camundongos fêmeas transgênicas congelaram mais que as do grupo controle antes da apresentação do som ( $F(1,31)=5,024$ ,  $p<0,05$ ) e o teste  $t$  mostrou que as diferenças entre as condições de alojamento em fêmeas foram significativas apenas entre animais do grupo controle durante a apresentação do som ( $t(17)=-2,801$ ,  $p<0,05$ ).



**Figura 24.** Média (+EPM) do percentual de congelamento de machos (A) e fêmeas (B) durante as três fases do teste de medo condicionado discreto: antes (pre-CS), durante (CS) e depois (pos-CS) da apresentação do tom sonoro. (C) Representa a diferença do percentual de congelamento entre as fases CS e pre-CS. (\*) Representa diferença significativa entre os genótipos ( $p<0,05$ ) e (†) representa diferença entre as condições de alojamento ( $p<0,05$ ) de um mesmo genótipo.

Comparando a diferença entre o percentual de congelamento durante a apresentação do som e a seção antes disso, encontrou-se uma diferença menor entre os machos do que entre as fêmeas ( $F(1,62)=4,237$ ,  $p<0,05$ ; Figura 24C). Além disso, os camundongos transgênicos tiveram uma diferença menor do que o grupo controle ( $F(1,62)=6,918$ ,  $p<0,05$ ), indicando um déficit na memória aversiva de fêmeas e de animais transgênicos. Uma análise post-hoc mostrou que as diferenças de genótipo foram significativas entre machos ( $F(1,31)=5,181$ ,  $p<0,05$ ), mas não entre fêmeas; e as fêmeas separadas do grupo controle tiveram uma diferença significativamente menor do que as agrupadas ( $t(17)=-2,247$ ,  $p<0,05$ ).

### **5.3. Discussão**

Os resultados apresentados no presente trabalho mostraram que camundongos transgênicos 5xFAD, mantidos sob isolamento social, não se mostraram mais sensíveis ao desenvolvimento dos sintomas referentes à doença de Alzheimer, apesar de termos encontrado algumas diferenças nos comportamentos indicativos de depressão e em tarefas cognitivas. A Tabela 2 resume os efeitos sobre o comportamento de camundongos submetidos a diferentes condições de alojamento, genótipo e sexo encontrados no presente estudo. A maioria das diferenças entre machos e fêmeas variaram de acordo com a condição de alojamento ou o genótipo dos animais. Dessa maneira, tais diferenças serão discutidas de acordo com cada um dos efeitos analisados.

**Tabela 2.** Efeitos de condições de alojamento, genótipo e sexo em camundongos 5xFAD e seu grupo controle analisados em vários testes comportamentais. (\*) Representa uma tendência não significativa.

Teste comportamental	Efeito de isolamento social		Efeito de genótipo		Efeito de sexo
	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	
Peso	-	Perdeu peso	-	-	♂ + pesado
Resistência Manipulação	Maior no controle	Nível maior	-	-	-
LCE	-	-	5xFAD baixa ansiedade	5xFAD baixa ansiedade	-
Caixa C/E	-	-	-	5xFAD menos transições	-
TNF	-	-	-	5xFAD menos imóvel	♀ 5xFAD menos imóvel
TSC	-	Controle menos imóvel	5xFAD menos imóvel	5xFAD menos imóvel (*)	-
Lab.aquático	Nado + rápido	Prejuízo memória espacial do controle	-	-	♀ prejuízo memória espacial ♀ maior atividade locomotora
Cond. ao contexto	-	Prejuízo memória	-	-	-
Cond. discreto		Prejuízo memória do controle	5xFAD prejuízo memória	-	♂ prejuízo memória

## Efeito do isolamento social

Os genótipos e os sexos testados foram afetados diferentemente pelo isolamento social, onde níveis na escala de reatividade à manipulação, comportamento de desamparo aprendido, memória espacial e memória de medo condicionado discreto foram afetados em camundongos controle separados, mas não em camundongos 5xFAD. O estresse crônico, incluindo isolamento social, exposição a um intruso social e estresse crônico por imobilização, estão associados à redução na neurogênese e volume hipocampal, anormalidades no processo de potenciação a longo prazo (LTP), nas ramificações dendríticas, bem como na redução da memória contextual e da condicionada à pistas discretas (Srivareerat et al., 2009; Jeong et al., 2006; Kunimoto et al., 2010). Camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6J, mantidas isoladas socialmente por 8 semanas, por exemplo, mostraram redução da memória condicionada ao contexto e à pista discreta e déficits na memória espacial, comparado com camundongos mantidos agrupados (Kuleshkaya et al., 2011).

O primeiro trabalho a mostrar uma aceleração das debilidades na memória de jovens camundongos transgênicos para a DA, induzido pelo isolamento social, foi feito por Dong et al. (2004). Esse estudo mostrou prejuízos no condicionamento ao contexto, aceleração do depósito de A $\beta$  e fosforilações da proteína *tau* em camundongos transgênicos Tg2576, mantidos isolados desde o desmame aos 6 meses de idade, quando comparados com camundongos transgênicos mantidos agrupados. Desde então, outros estudos vêm investigando o efeito do estresse social crônico, como o isolamento social, sobre o agravamento dos sintomas relacionados à DA, como acúmulo de placas amilóides, formação de enovelados neurofibrilares, neurodegeneração, diminuição da neurogênese e prejuízos em tarefas de memória e aprendizagem (Hsiao et al., 2011; Huang et al., 2011; Pietropaolo et al., 2009; Rothman et al., 2012). No entanto, camundongos transgênicos 5xFAD isolados socialmente, do 5º ao 6º mês de vida, utilizados no presente estudo, não diferiram dos animais mantidos agrupados segundo os níveis de memória e aprendizado testados no labirinto aquático de Morris e condicionamento de medo ao contexto e discreta. Pelo menos um estudo, até agora, mostrou ausência de efeito do isolamento social sobre o acúmulo de A $\beta$  ou neurodegeneração e apenas efeitos limitados sobre medidas cognitivas (Pietropaolo et al., 2009). Se levarmos em consideração o número de fatores que podem interferir no efeito do isolamento social, é virtualmente impossível não se achar resultados

controversos. O efeito deletério induzido pelo isolamento social sobre sintomas indicativos de neurodegeneração mencionados em pesquisas anteriores podem ter sido potencializados devido ao período prolongado em que os animais foram isolados ou à linhagem utilizada (Tg 2576, 3xTgAD, APP/PS1). Até o momento, nenhum estudo desse tipo havia sido feito com camundongos transgênicos 5xFAD.

A linhagem utilizada no presente estudo parece não ser sensível ao isolamento social, principalmente entre camundongos fêmeas. Na verdade, a manipulação genética de camundongos fêmeas preveniu o prejuízo cognitivo induzido pelo isolamento social. Enquanto fêmeas do grupo controle isoladas socialmente apresentaram déficits nos testes cognitivos de memória espacial e no de memória de medo condicionado ao contexto e discreta, fêmeas transgênicas isoladas não diferiram das fêmeas agrupadas. Um estudo realizado por Kuleskaya et al. (2011) mostrou que fêmeas C57BL/6J, a mesma linhagem utilizada em nosso grupo controle, mantidas isoladas socialmente por 8 semanas depois do desmame, apresentaram prejuízos cognitivos testados no labirinto aquático e no condicionamento de medo ao contexto e discreta. Os estudos que avaliaram a interferência do isolamento na expressão do genótipo mutante da DA não investigaram a influência do sexo, uma vez que utilizaram apenas camundongos transgênicos machos (Hsiao et al., 2011; Huang et al., 2011; Rothman et al., 2012) ou agruparam os dados de ambos os sexos (Dong et al., 2004).

A ausência de déficits cognitivos em camundongos 5xFAD mantidos separados no presente estudo também pode ser explicada pelo fato de que a solidão é considerada um fator de risco para o desenvolvimento de demência e saúde debilitada apenas quando ela está associada a estados de depressão (Luanaigh & Lawlor, 2008). Nosso estudo não mostrou qualquer comportamento indicativo de depressão, o que pode explicar a ausência de efeito do isolamento social nos camundongos transgênicos testados. Ao contrário do que já foi mostrado em um estudo prévio em nosso laboratório (Martin & Brown, 2010), a ausência de efeitos ou, até mesmo, efeitos contrários sobre comportamentos indicativos de depressão em roedores isolados socialmente já foi mostrado em outros estudos (Guo et al., 2004; Karim & Arslan, 2000).

O isolamento social a longo prazo leva a inúmeras anormalidades neurais, endócrinas e comportamentais (Brain, 1975; Koike et al., 2009), incluindo diminuição de comportamento exploratório e déficits em memória e aprendizagem, sendo esses sintomas denominados “a

síndrome do isolamento” (Valzelli, 1973). Nossos dados sugerem uma diferença de sexo no efeito da separação social, uma vez que o comportamento das fêmeas foi mais afetado do que o dos machos. Camundongos fêmeas separadas por 1 mês perderam peso e mostraram maior reatividade à manipulação, menos comportamentos indicativos de depressão, piora da memória espacial e piora da memória de medo condicionado ao contexto e discreta quando comparados com os camundongos agrupados. Não foram encontradas diferenças nos testes de ansiedade. Em machos, os animais mantidos separados apresentaram maior reatividade à manipulação e maior atividade locomotora no labirinto aquático de Morris.

Machos e fêmeas têm diferentes reações comportamentais ao isolamento social e os estudos que manipulam esse fator são controversos. Enquanto alguns estudos mostram que roedores machos são mais sensíveis a estresse crônico (Guo et al., 2004; Pietropaolo et al., 2008; Weiss et al., 2004), outros mostram ausência de diferenças entre os sexos (Rodgers e Cole, 1993) ou, ainda, diferenças comportamentais mais acentuadas em fêmeas (Devi et al., 2010). Essa variação pode ser explicada, em parte, pelos diferentes períodos de isolamento empregados e a idade em que os animais foram separados (Brown et al., 2011). A separação de animais jovens leva a um amplo número de anormalidades a longo prazo no comportamento social, comunicação, cognição e comportamentos emotivos. Já a separação de animais durante a fase adulta parece produzir anormalidades em comportamentos indicativos de depressão e ansiedade (Brain, 1975; Grippo et al., 2007; Martin & Brown, 2010; Palanza, 2001).

### **Efeito do genótipo**

Modelos animais desenvolvidos para o estudo da DA têm sido fundamentais na compreensão dos prejuízos cognitivos causados pela doença, mas poucos são os estudos que investigam as consequências comportamentais não-cognitivas da DA, como a ansiedade e a depressão, comorbidades neuropsicológicas comuns dessa doença (Chung & Cummings, 2000; Wilson et al., 2007). Camundongos transgênicos 5xFAD expostos ao labirinto em cruz elevado tiveram menor tempo de permanência e frequência de entrada nos braços abertos, menos congelamento e mais comportamentos de esquadrihar do que animais não transgênicos do grupo controle, indicando um nível reduzido de ansiedade. Esses mesmos resultados foram mostrados em camundongos 5xFAD, com 6 meses de idade, testados no labirinto em cruz elevado e no campo aberto (Jawhar et al., 2012), assim como em camundongos transgênicos

hAPP/PS1 testados no labirinto em cruz elevado (Pugh et al., 2007). Muitos modelos animais da DA mostraram perfis diferentes de ansiedade, com a maioria deles mostrando uma ansiedade reduzida dos animais transgênicos. Modelos animais como Tg2576, PS1-A246E, PS2, APP<sup>swe</sup> + PS1/DeltaE9 bigênico e APP/PS1KI mostraram níveis de ansiedade reduzidos (Faure et al., 2011; Gil-Bea et al., 2007; Lalonde et al., 2003a; Lalonde et al., 2003b; Lalonde et al., 2005; Yuk et al., 2009), enquanto outros modelos, como o APP23 não mostrou diferenças significativas (Lalonde et al., 2002). A hipótese levantada para explicar esses efeitos ansiolíticos dos modelos transgênicos tem classificado esses comportamentos como uma tendência desinibitória (Lalonde et al., 2003a; Ognibene et al., 2005), onde o processo neurodegenerativo da doença pode estar afetando sistemas de defesa dos animais. No entanto, ainda não se tem estudos investigando quais seriam esses sistemas envolvidos.

A investigação dos comportamentos indicativos de depressão no teste do nado forçado e no teste de suspensão pela cauda mostrou efeitos significativos do genótipo. Nesses testes, as fêmeas transgênicas permaneceram menos tempo imóveis no teste do nado forçado e machos transgênicos permaneceram menos tempo imóveis no teste de suspensão pela cauda, quando comparados com animais do grupo controle. Estudos clínicos com pacientes portadores da DA têm sugerido que a doença leva ao surgimento da depressão e que a mesma também pode influenciar no agravamento dos sintomas da DA (Wilson et al., 2007). Até o momento, o presente estudo é o primeiro a avaliar comportamento indicativo de depressão em modelos transgênicos 5xFAD. Outros estudos com modelos da DA mostraram um aumento do tempo de imobilidade de camundongos transgênicos APP<sup>swe</sup>/PS1 bigênico e R406W expostos a um teste aquático sem possibilidade de escape (Egashira et al., 2005; Filali et al., 2009). Por outro lado, camundongos Tg2576 e APP751SWE transgênicos simples apresentaram uma diminuição significativa no tempo de imobilidade no teste do nado forçado (Gil-Bea et al., 2007; Lalonde et al., 2005), assim como os animais do presente estudo. Dessa forma, existem dados conflitantes acerca da hipótese de aumento de comportamentos relacionados à depressão em modelos da DA (Filali et al., 2009).

Além da hipótese da desinibição comportamental para explicar o comportamento ansiolítico, outra hipótese vem sendo construída para explicar a maior exposição nos braços abertos do labirinto em cruz elevado e o tempo de imobilidade reduzido no teste do nado forçado

apresentado por camundongos 5xFAD e Tg2576. Tal hipótese sugere que esses comportamentos seriam simplesmente uma consequência da hiperatividade locomotora desses animais em idade juvenil (até 9 meses) (Gil-Bea et al., 2007). Receptores colinérgicos muscarínicos M1 têm sido apontados como reguladores da atividade locomotora, uma vez que camundongos com deficiência nesses receptores ( $M1R^{-/-}$ ) apresentam menor imobilidade no teste do nado forçado assim como atividade locomotora aumentada em testes como labirinto em cruz elevado, campo aberto e caixa de transição claro-escuro (Miyakawa et al., 2001). Outro fato que corrobora tal hipótese foi mostrado por Apelt et al. (2002), onde camundongos transgênicos Tg2576 com 8 meses de idade apresentaram uma falta de receptores colinérgicos muscarínicos M1 no córtex e no hipocampo do cérebro. Isso explicaria a hiperatividade mostrada em outros modelos genéticos. Vale ressaltar que a hiperatividade mostrada no teste do nado forçado não afeta, necessariamente, a atividade locomotora mensurada em outros testes, como o labirinto aquático de Morris, utilizado no presente estudo com camundongos 5xFAD, ou o teste do Rota-rod, utilizado em estudos prévios com Tg2576 e  $M1R^{-/-}$  (Gil-Bea et al., 2007; Lalonde et al., 2003a; Miyakawa et al., 2001).

No presente trabalho, camundongos transgênicos não apresentaram diferenças em comportamentos indicativos de locomoção, sendo que não houve diferenças no número de cruzamento das linhas no labirinto em cruz elevado ou na velocidade de nado e na distância percorrida no labirinto aquático de Morris. Porém, as fêmeas transgênicas, mas não os machos, tiveram um menor número de suspensão sobre as patas traseiras no labirinto em cruz elevado e menos transições entre os compartimentos do teste da caixa de transição claro-escuro. A verificação desses parâmetros são de considerável relevância uma vez que a atividade locomotora pode interferir nas medidas dos testes comportamentais (Schellinck et al., 2010) e, especialmente, em estudos que envolvem modelos de doenças neurodegenerativas, pois a mobilidade desses animais são afetadas de forma precoce e agressiva (Gil-Bea et al., 2007; Yuk et al., 2009).

Ao se investigar diferenças entre linhagens em testes de memória e aprendizagem, deve-se demonstrar que as diferenças encontradas são ocasionadas por diferenças cognitivas e garantir que não sejam confundidas com diferenças no sistema sensorial das linhagens (Crawley, 1999; Bailey et al., 2006). Em estudos com modelos genéticos é comum não se ter o controle completo

das possíveis interações dos genes manipulados e suas consequências sobre a fisiologia normal do organismo. Muitas cepas de camundongos comercializados possuem debilidades auditivas (Jones et al. 2006) ou visuais (Chang et al., 2002; Wong & Brown, 2006) e, assim como esses, modelos de camundongos transgênicos para DA são propensos ao desenvolvimento de cegeira precoce (Brown & Wong, 2007). Em nossos experimentos não foram constatados sinais de deficiência visual, visto que todos os animais submetidos ao labirinto aquático de Morris apresentaram um decréscimo no percentual de tempo de tigmotaxia ao longo das sessões de aquisição e reduzido tempo de latência para alcançar a plataforma visível.

Modelos genéticos da DA vêm mostrando prejuízos na memória visuo-espacial testada no labirinto aquático de Morris e na memória de medo condicionado ao contexto (Devi & Ohno, 2010; Kimura & Ohno, 2009; Ohno, 2009), mas foram poucos os estudos que utilizaram o modelo do 5xFAD. Ao contrário do esperado, camundongos transgênicos machos e fêmeas utilizados nos presentes experimentos não mostraram diferenças significativas do grupo controle nos parâmetros analisados do labirinto aquático de Morris ou no teste de medo condicionado ao contexto. Por outro lado, machos 5xFAD tiveram um leve prejuízo na memória condicionada à pista discreta, onde apresentaram uma menor diferença entre o percentual de congelamento durante a apresentação do som e o da sessão anterior a isso no teste de medo condicionado discreto. Até o momento, a ausência de prejuízos cognitivos significativos em camundongos transgênicos 5xFAD, aos 6 meses de idade, não é comum de se encontrar, mas também não é uma surpresa, especialmente se avaliarmos estudos que utilizaram o labirinto aquático de Morris. Apesar de existirem poucos experimentos que investiguem déficit de memória espacial em camundongos 5xFAD aos 6 meses, já foram encontradas grandes (Hongpaisna et al., 2011) e pequenas (Ohno et al., 2006) diferenças entre transgênicos e grupo controle no labirinto aquático, o que sugere uma inconsistência do teste nesse tipo de avaliação. Em testes de medo condicionado, os resultados também não são consistentes, onde um prejuízo na memória de medo ao contexto foi encontrado em camundongos 5xFAD com 8 meses de idade, mas não aos 4 meses; e a memória de medo à pista discreta não diferiu dos animais controle aos 2, 4 ou 8 meses (Kaczorowski et al., 2009). Esses resultados, portanto, sugerem o desenvolvimento de mais estudos para que se possa apontar, com maior precisão, a idade em que ocorrem prejuízos mnemônicos em camundongos transgênicos dessa cepa.

Em resumo, o presente trabalho mostrou que o isolamento social de camundongos transgênicos 5xFAD não induziu uma piora significativa dos déficits cognitivos característicos de animais portadores de mutações da doença de Alzheimer familiar. O isolamento social de camundongos fêmeas, por 1 mês, causou perda de peso, aumento da reatividade à manipulação, diminuição de comportamentos indicativos de depressão e prejuízos cognitivos, mas não afetou medidas de ansiedade ou de atividade locomotora. De um modo geral, os presentes dados demonstraram uma maior susceptibilidade das fêmeas ao efeito da separação social do que machos. Além disso, fêmeas isoladas socialmente do grupo controle, mas não as transgênicas, apresentaram prejuízos no condicionamento de medo ao contexto e discreta e um pequeno prejuízo na memória visuo-espacial. Camundongos transgênicos 5xFAD apresentaram menores índices de comportamentos relacionados à ansiedade e à depressão comparados com o grupo controle. Para se avaliar se existe um impacto do isolamento social sobre camundongos da linhagem 5xFAD sugere-se a utilização de animais mais velhos e mantidos sob isolamento social por períodos mais longos.

## 6. Discussão Geral

O presente estudo investigou a influência de cruzamentos seletivos sobre o desenvolvimento de ratos com altos e baixos traços de ansiedade e a influência de fatores ambientais sobre o desenvolvimento de patologias associadas à expressão de mutações gênicas humanas em camundongos transgênicos para a doença de Alzheimer. Em ambos os experimentos o foco principal foram os efeitos da manipulação genética e de fatores ambientais sobre o comportamento dos animais de ambos os sexos. Para isso, os animais foram submetidos a uma bateria de testes comportamentais para viabilizar a investigação multifatorial dos efeitos testados em um mesmo animal. Foram investigadas diferenças emocionais (ansiedade e depressão), cognitivas (memória visuo-espacial e memória aversiva contextual e discreta) e sensoriais (habilidade motora e acuidade visual), sendo que diferenças cognitivas e sensoriais foram avaliadas apenas no experimento II. Em estudos que envolvem modelos genéticos, não são muitos os que fazem esse tipo de investigação multifatorial. Porém, ela é de suma importância, visto a interferência que fatores emocionais exercem sobre fatores cognitivos e vice-versa, além de falsas interpretações geradas por debilidades sensoriais dos animais. Esse tipo de análise também permite estudar as consequências de um processo de cruzamento seletivo, como feito no experimento I, e averiguar se a característica selecionada tem influenciado em outros processos emocionais e/ou cognitivos dos animais.

Uma bateria de testes comportamentais foi utilizada para averiguar o uso de animais selecionados com altos e baixos traços de reações de medo condicionado ao contexto como um modelo do estudo do Transtorno da Ansiedade Generalizada. Estudos com animais e humanos têm demonstrado que o medo condicionado ao contexto mostra uma clara semelhança com esse tipo de transtorno, enquanto que o medo condicionado à pista discreta parece ser válida para modelos animais com fobias específicas (Davis et al., 2010). Existem argumentos de validação substanciais para se considerar o condicionamento ao contexto como um modelo animal de Transtorno de Ansiedade Generalizada. Existe similaridade na sintomatologia humana (validade por semelhança; tensão muscular, inibição comportamental, congelamento mental, etc), o modelo responde a um grande espectro de tratamentos clínicos efetivos (validade por

previsibilidade; antidepressivos, benzodiazepínicos, antagonistas 5-HT<sub>1A</sub>) e similaridades na etiologia e mecanismos envolvidos também (validade por homologia; aversão a eventos incontrolláveis e imprevisíveis, similaridade das vias neurais envolvidas) (para revisão ver Luyten et al., 2011). No entanto, o envolvimento genético sobre o transtorno ainda não foi identificado, apesar de estudos clínicos mostrarem que existe uma hereditabilidade de 20% na população (Hettema et al., 2001; Mackintosh et al., 2006; Stein, 2009). O modelo genético utilizado no presente estudo ainda não foi submetido a todos os critérios de validação. Porém, mostra-se promissor para o desenvolvimento de um modelo de Transtorno de Ansiedade Generalizada, especialmente por utilizar animais com traços, ao invés de estados comportamentais diferenciados. Dessa forma, propõe-se a realização de novos estudos que visem a validação dos critérios de previsibilidade, através de testes farmacológicos, e de homologia, através de estudos neurofisiológicos.

Os estudos realizados em ambos os experimentos mostraram a importância de se testar machos e fêmeas na bateria de testes comportamentais, visto que houve diferenças entre eles em ambos os experimentos. No primeiro experimento, as fêmeas da linhagem CAC apresentaram comportamentos indicativos de maior ansiedade do que o CBC, enquanto que entre os machos houve uma tendência não significativa para o mesmo resultado. Apesar disso, as linhagens testadas têm diferido significativamente quanto ao seu critério de seleção (congelamento ao contexto) desde a 3ª geração. Os machos das linhagens CAC e CBC têm percentuais de congelamento maiores que as fêmeas quando expostos ao contexto previamente associado ao choque elétrico (Gomes et al., 2011; Gomes, 2012). Já no segundo experimento, as fêmeas apresentaram maior sensibilidade ao isolamento social do que os machos, além de desempenho inferior em testes de memória espacial. Tais testes, como o labirinto aquático de Morris (em roedores) ou testes de rotação espacial (em humanos), têm mostrado resultados consistentes, onde machos apresentam rendimentos melhores do que fêmeas, tanto em humanos (Driscoll et al., 2005; Epting & Overman, 1998; Maccoby & Jacklin, 1974) quanto em roedores (Voikar et al., 2001).

Diferenças entre sexo têm sido documentadas em quase todos os níveis da neurociência, desde neurônios em células de cultura até sistemas corporais avaliados por neuroimagem. Em alguns casos, o efeito do sexo pode alterar, ou até inverter, significativamente as conclusões

sobre o funcionamento cerebral tiradas de estudos com apenas um único sexo (Cahill, 2006). Em algumas áreas, como estudos sobre adicção a drogas, as evidências sobre diferenças entre sexos são tão fortes que a utilização do sexo como um fator a ser avaliado tem se tornado a norma, ao invés da exceção (Wetherington, 2007). Estudos que investigaram ambos os sexos em seus experimentos encontraram diferenças entre os sexos na atividade locomotora, ansiedade, memória e aprendizagem e resposta à dor (Frick et al., 2000; Gresack & Frick, 2003; Holmes et al., 2000; LaBuda et al., 2002; McLachlan & Yi Xing Soh, 2005; Mishima et al., 1986; Perissin et al., 2003; Voikar et al., 2001). Além disso, animais geneticamente modificados também apresentaram diferenças entre os sexos no cérebro e no comportamento, sendo ausente a diferença no grupo controle, indicando que existe uma interação entre manipulação genética e diferenças de sexo. Dorner et al. (2007), por exemplo, encontraram diferenças entre os sexos no comportamento de camundongos knock-in para a doença de Huntington (140 CAG). Também foram encontradas diferenças entre os sexos em comportamentos relacionados a ansiedade em camundongos knock-out para SERT (Ren-Patterson et al., 2006) e em camundongos deficientes em NPY (Karl et al., 2008); e diferenças em processos de memória e aprendizagem em camundongos mutantes p25 (Ris et al., 2005) e Camkk2 (Mizuno et al., 2007). Sendo assim, o presente estudo ressalta a utilização de ambos os sexos em futuros estudos que utilizem modelos animais genéticos como sujeitos experimentais.

O presente trabalho contribuiu com uma análise comportamental extensa e um teste fisiológico para o melhor entendimento e desenvolvimento de dois diferentes padrões de modelos animais genéticos: um baseado no cruzamento seletivo de ratos com altos e baixos padrões de medo aprendido e outro baseado na inserção de mutações gênicas que induzem sintomas da doença de Alzheimer em camundongos. Em nenhum deles foi possível a investigação em nível molecular e histológica das linhagens utilizadas. O próximo passo proposto no estudo com as linhagens CAC e CBC é a investigação dos genes e cromossomos envolvidos na característica que está sendo selecionada há várias gerações. Estudos que utilizaram o mesmo padrão de seleção de camundongos (congelamento ao contexto) durante um curto período (3 gerações) identificaram 5 possíveis alelos localizados em 5 cromossomos diferentes que podem estar relacionados com o padrão comportamental elevado ou diminuído selecionado ao longo das gerações (Radcliffe et al., 2000; Wehner et al., 1997). Já para aprimorar as investigações acerca de fatores ambientais que podem interferir no agravamento de sintomas

relacionados à doença de Alzheimer, propõe-se a realização de estudos histológicos – como a identificação de morte neuronal, placas amilóides e envelados neurofibrilares – e neurofisiológicos – como deficiências na neurotransmissão, no funcionamento de canais iônicos e receptores, além de anormalidades no processo de potenciação a longo prazo. Visto que tais tipos de investigação exigem equipamentos e técnicas laboratoriais bastante distintos dos utilizados nos laboratórios em que as pesquisas foram realizadas no presente projeto, a co-participação de outros laboratórios que detenham os equipamentos e pessoal capacitado será crucial nessa etapa.

## 7. Referências Bibliográficas

- American Psychiatric Association. (2000). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-IV-TR (4th ed.)*. Washington, DC: American Psychiatric Association.
- Andersen, M. L., Bignotto, M., Machado, R. B., & Tufik, S. (2004). Different stress modalities result in distinct steroid hormone responses by male rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 37, 791-797.
- Andreatini, R., & Bacellar, L. F. S. (1999). The relationship between anxiety and depression in animal models: a study using the forced swimming test and elevated plus-maze. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 32, 1121-1126.
- Antoniadis, E. A., & McDonald, R. J. (1999). Discriminative fear conditioning to context expressed by multiple measures of fear in the rat. *Behavioural Brain Research*, 101, 1 – 13.
- Apelt, J., Kumar, A., & Schliebs, R. (2002). Impairment of cholinergic neurotransmission in adult and aged transgenic Tg2576 mouse brain expressing the Swedish mutation of human  $\beta$ -amyloid precursor protein. *Brain Research*, 953, 17-30.
- Bailey, K. R., Rustay, N. R., & Crawley, J. N. (2006). Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice: practical concerns and potential pitfalls. *ILAR J.*, 47, 124–131.
- Baldi, E., Lorenzini, C. A., & Bucherelli, C. (2004). Footshock intensity and generalization in contextual and auditory-cued fear conditioning in the rat. *Neurobiology of Learning and Memory*, 81, 162–166.
- Barker, J. M., & Galea, L. A. M. (2010). Males show stronger contextual fear conditioning than females after context pre-exposure. *Physiology & Behavior*, 99(1), 82–90.
- Bekris, L. M., Yu, C. E., Bird, T. D., & Tsuang, D. W. (2010). Genetics of Alzheimer disease. *Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology*, 23, 213-227.
- Belzung, C., & Griebel, G. (2001). Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review. *Behavioural Brain Research*, 125, 141–149.
- Bertram, L., Lill, C. M., & Tanzi, R.E. (2010). The genetics of Alzheimer disease: back to the future. *Neuron*, 68, 270-281.

- Bilbul, M., & Schipper, H. M. (2011). Risk profiles of Alzheimer disease. *Canadian Journal of Neurological Sciences*, 38, 580–592.
- Billings, L., Oddo, S., Green, K., McGaugh, J., & LaFerla, F. (2005). Intraneuronal A $\beta$  causes the onset of early Alzheimer`s disease-related cognitive deficits in transgenic mice. *Neuron*, 45, 675-688.
- Blanchard, D. C., Blanchard, R. J. (1998). Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. *Annual Reviews of Psychology*, 39, 43-68.
- Blanchard, D. C., Blanchard, R. J., & Tom, R. J. (1990). Diazepam changes risk assessment in an anxiety/defense test battery. *Psychopharmacology*, 101, 511-518.
- Blanchard, D. C., Griebel, G., & Blanchard, R. J., (2001). Mouse defensive behaviors: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 25: 205– 218.
- Blanchard, D. C., Griebel, G., & Blanchard, R. J. (2003). The Mouse Test Battery: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. *European Journal of Pharmacology*, 463: 97– 116.
- Blanchard, R. J., Yudko, E. B., Rodgers, R. J., & Blanchard, D. C. (1993). Defense system psychopharmacology: an ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. *Behavioural Brain Research.*, 58, 155-165.
- Blizard, D.A., & Adams, N. (2002). The Maudsley Reactive and Nonreactive strains: a new perspective. *Behavior Genetics*, 32, 277–299.
- Bourin, M., & Hascoët, M. (2003). The mouse light/dark box test. *European Journal of Pharmacology*, 463 (1-3), 55-65.
- Bouton, M. E., & Bolles, R. C. (1980). Conditioned fear assessed by freezing and by the suppression of three different baselines. *Animal Learning & Behavior*, 8, 429–434.
- Brain, P. (1975). What does individual housing mean to a mouse? *Life Sciences*, 16, 187–200.

- Brenes, J., Rodriguez, O., & Fornaguera, J. (2008). Differential effect of environment enrichment and social isolation on depressive-like behaviour, spontaneous activity and serotonin and norepinephrine concentration in prefrontal cortex and ventral striatum. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, *89*, 85-93.
- Bridges, N. J., & Starkey, N. J. (2004). Sex differences in Mongolian gerbils in four tests of anxiety. *Physiology & Behavior*, *83*, 119–127.
- Brigman, J. L., Mathura, P., Lu, L., Williams, R. W., & Holmes, A. (2009). Genetic relationship between anxiety related and fear-related behaviors in BXD recombinant inbred mice. *Behavioural Pharmacology*, *20*, 204–209.
- Broadhurst, P.L. (1958). Determinant of emotionality in the rat: II. Antecedent factors. *British Journal of Psychology*, *49*, 12-20.
- Broadhurst, P.L. (1975). The Maudsley reactive and non-reactive strains of rats: a survey. *Behavior Genetics*, *5*, 299-319.
- Brown, R. E., Martin, A. L., & Gunn, R. K. (2011). Separation-Induced Depression in the Mouse. In: T. D. Gould (Ed.), *Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice: Characterization Using Behavioral Tests, Volume II, Neuromethods, vol. 63*. Springer Science.
- Brown, R. E., & Wong, A. A. (2007). The influence of visual ability on learning and memory performance in 13 strains of mice. *Learning & Memory*, *14*, 134–144
- Brunelli, S. A., & Hofer, M. A. (1996). Development of ultrasonic vocalization responses in genetically heterogeneous National Institutes of Health (N:NIH) rats: II. Associations among variables and behaviors. *Developmental Psychobiology*, *29*, 517-528.
- Cacioppo, J., & Hawley, L. (2009). Perceived social isolation and cognition. *Trends in Cognitive Science*, *13*, 447-454.
- Cahill, L. (2006). Why sex matters for neuroscience. *Nature Reviews Neuroscience*, *7*, 477–484.
- Calabrese, E. J., Bachmann, K. A., Bailer, A. J., Bolger, P. M., Borak, J., Cai, L., et al.(2007). Biological stress response terminology: Integrating the concepts of adaptive response and

- preconditioning stress within a hormetic dose–response framework, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 222, 122–128.
- Caldarone, B., Saavedra, C., Tartaglia, K., Wehner, J. M., Dudek, B. C., & Flaherty, L. (1997). Quantitative trait loci analysis affecting contextual conditioning in mice. *Nature Genetics*, 17, 335–337.
- Cao, B. J. & Rodgers, R. J. (1997). Influence of 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonism on plus maze behavior in mice II WAY 100635, SDZ 216-525 and NAN 190. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 58, 593-603.
- Carlson, N. R. (Ed.). (2002). *Fisiologia do comportamento*. São Paulo: Ed. Manole.
- Carr, G. V., Schechter, L. E., & Lucki, I. (2011). Antidepressant and anxiolytic effects of selective 5-HT(6) receptor agonists in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 213, 499–507.
- Carrasco, J., Márquez, C., Nadal, R., Tobeña, A., Fernandez-Teruel, A., & Armario, A. (2008). Characterization of central and peripheral components of the hypothalamus–pituitary–adrenal axis in the inbred Roman rat strains. *Psychoneuroendocrinology*, 33, 437–445.
- Carvalho, M. G., Ferreira, G. F. S., Salviano, M. F., Silva, F. M., Couto, K., C., Alves, S. H. S., et al. (2012). Envolvimento de receptores 5-HT<sub>2C</sub> do hipocampo ventral em comportamentos de defesa de ratos no labirinto em cruz elevado. *Estudos de Psicologia*, 17(1), 145-151.
- Casas, C., Sergeant, N., Itier, J. M., Blanchard, V., Wirths, O., van der Kolk, N., et al. (2004). Massive p.CA1/2 neuronal loss with intraneuronal and N-terminal truncated Abeta42 accumulation in a novel Alzheimer transgenic model. *American Journal of Pathology*, 165(4), 1289–1300.
- Castanon, N., Dulluc, J., le Moal, M., & Mormede, P. (1992) . Prolactin as a link between behavioral and immune differences between the Roman rat lines. *Physiology. Behavior.*, 51, 1235–1241.
- Chang, B., Hawes, N. L., Hurd, R. E., Davisson, M. T., Nusinowitz, S., & Heckenlively, J. R. (2002). Retinal degeneration mutants in the mouse. *Vision Research.*, 42, 517–525.

- Chida, Y., Sudo, N., Mori, J., & Kubo, C. (2006). Social isolation stress impairs passive avoidance learning in senescence-accelerated mouse (SAM). *Brain Research, 1067*, 201-208.
- Chouliaras, L., Sierksma, A. S., Kenis, G., Prickaerts, J., Lemmens, M. A. M., Brasnjevic, I., et al. (2010). Gene-environment interaction research and transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *International Journal of Alzheimers Disease, 1-27*.
- Chung, J. A., & Cummings, J. L. (2000). Neurobehavioral and neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease. *Neurologic Clinics, 18*, 829-846.
- Cole, J. C. & Rodgers, R. J. (1994). Ethological evaluation of the effects of acute and chronic buspirone treatment in murine elevated plus-maze test: Comparison with haloperidol. *Psychopharmacology, 4*, 288-296.
- Conti, L. H., Jirout, M., Breen, L. Vanella, J. J., Schork, N. J., & Printz, M. P. (2004). Identification of quantitative trait loci for anxiety and locomotion phenotypes in rat recombinant inbred strains. *Behaviour Genetics, 34*, 93-103.
- Costall, B., Jones, B. J., Kelly, M. E., Naylor, R. J., & Tomkins, D. M. (1989). Exploration of mice in a black and white test box: validation as a model of anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior, 32*, 777-785.
- Crawley, J.N. (1999). Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice: experimental design and evaluation of general health, sensory functions, motor abilities, and specific behavioral tests. *Brain Research, 835*, 18-26.
- Cruz, A. P. M., Frei, F., & Graeff, F. G. (1994). Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior, 49*, 171-176.
- Cruz, A. P. M., Zangrossi, H., Graeff, F. G., & Landeira-Fernandez, J. (1997). Modelos Etofarmacológicos e suas Implicações Para a Seleção de Drogas Ansiolíticas. *Psicologia: Teoria e Pesquisa, 13*, 269-278.
- Cryan, L. F., & Holmes, A. (2005). The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. *Nature Review Drug Discovery, 4*, 775-790.

- Davis, M., Walker, D. L., Miles, L., & Grillon, C. (2010). Phasic vs sustained fear in rats and humans: role of the extended amygdale in fear vs anxiety. *Neuropsychopharmacology Reviews*, 35, 105-135.
- de Beurs, E., Beekman, A. T., van Balkom, A. J., Deeg, D. J., van Dyck, R., & van Tilburg, W. (1999). Consequences of anxiety in older persons: its effect on disability, well-being and use of health services. *Psychological Medicine*, 29, 583–593.
- Devi, L., & Ohno, M. (2010). Genetic reductions of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1 and amyloid-beta ameliorate impairment of conditioned taste aversion memory in 5XFAD Alzheimer's disease model mice. *European Journal of Neuroscience*, 31, 110-118.
- Diamond, D. M., Park, C. R., Heman, K. L., & Rose, G. M. (1999). Exposing rats to a predator impairs spatial working memory in the radial arm water maze. *Hippocampus*, 9, 542–552.
- Dias, G. P., Bevilaqua, M. C., Silveira, A. C., Landeira-Fernandez, J. & Gardino, P. F. (2009) Behavioral profile and dorsal hippocampal cells in Carioca high-conditioned freezing rats. *Behavioural Brain Research*, 205, 342-348.
- Dong, H., Goico, B., Martin, M., Csernansky, C., Bertchume, A., & Csernansky, J. (2004). Modulation of hippocampal cell proliferation, memory, and amyloid plaque deposition in APPsw (Tg2576) mutant mice by isolation stress. *Neuroscience*, 127, 601-609.
- Dorner, J. L., Miller, B. R., Barton, S. J., Brock, T. J., & Rebec, G.V. (2007). Sex differences in behavior and striatal ascorbate release in the 140 CAG knock-in mouse model of Huntington's disease. *Behavioural Brain Research*, 178, 90–97.
- Drago, F., Bohus, B., Scapagnini, U., & de Wied, D. (1980). Sexual dimorphism in passive avoidance behavior of rats: Relation to body weight, age, shock intensity and retention interval. *Physiology Behavior*, 24, 1161–1164.
- Driscoll, I., Hamilton, D. A., Yeo, R. A., Brooks, W. M., & Sutherland, R. J. (2005). Virtual navigation in humans: The impact of age, sex, and hormones on place learning. *Hormones and Behavior*, 47, 326–335.
- Egashira, N., Iwasaki, K., Takashima, A., Watanabe, T., Kawabe, H., Matsuda, T., et al. (2005). Altered depression-related behavior and neurochemical changes in serotonergic neurons in mutant R406W human tau transgenic mice. *Brain Research*, 1059, 7–12.

- El Khoury, A., Gruber, S. H., Mork, A., & Mathe, A. A. (2006). Adult life behavioral consequences of early maternal separation are alleviated by escitalopram treatment in a rat model of depression. *Progress in Neuropsychopharmacol & Biological Psychiatry*, *30*(3), 535–540.
- Epting, L. K., & Overman, W. H. (1998). Sex sensitive tasks in men and women: A search for performance fluctuations across the menstrual cycle. *Behavioral Neuroscience*, *112*, 1304–1317.
- Fanselow, M. S., & Ledoux, J. E. (1999). Why we think plasticity underlying Pavlovian fear conditioning occurs in the basolateral amygdala. *Neuron*, *23*, 229-232.
- Farrer, L. A., Cupples, L. A., Haines, J. L., Hyman, B., Kukull, W. A., Mayeux, R., et al. (1997). Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *Jama*, *278*, 1349-1356.
- Faure, A., Verret, L., Bozon, B., El Tannir, N., Tayara, N., Ly, M., et al. (2011). Impaired neurogenesis, neuronal loss, and brain functional deficits in the APPxPS1-Ki mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, *32* (3), 407-418.
- Fendt, M., & Fanselow, M. S. (1999). The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *23*, 743-760.
- Fernandes, C., File, S. E., & Berry, D. (1996). Evidence against oppositional and pharmacokinetic mechanisms of tolerance to diazepam's sedative effects. *Brain Research*, *734*, 236–242.
- Ferreira, G. G. S. (2005), *Atenuação de estados de ansiedade em ratos expostos ao labirinto em cruz elevado como efeito de infusões de um antagonista serotoninérgico no hipocampo ventral*. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brasil
- Ferri, C. P., Prince, M., Brayne, C., Brodaty, H., Fratiglioni, L., Ganguli, M., et al. (2005). Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet*, *366*, 2112–2117.

- Filali, M., Lalonde, R., & Rivest, S. (2009). Cognitive and non-cognitive behaviors in an APPswe/PS1 bigenic model of Alzheimer's disease. *Genes Brain Behavior*, 8, 143–148.
- File, S. E., & Hyde, J. R. (1978). Can social interaction be used to measure anxiety? *British Journal of Pharmacology*, 62, 19–24.
- Fone, K., & Porkess, V. (2008). Behavioural and neurochemical effects of post-weaning social isolation in rodents- relevance to developmental neuropsychiatric disorders. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 32, 1087-1102.
- Forstl, H., & Kurz, A. (1999). Clinical features of Alzheimer's disease. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, 249,288-290.
- Fraser, L.M., Brown, R.E., Hussin, A., Fontana, M., Whittaker, A., O'Leary, T.P., et al. (2010). Measuring anxiety- and locomotion-related behaviours in mice: a new way of using old tests. *Psychopharmacology*, 211, 99-112.
- Frick, K. M., Burlingame, L. A., Arters, J. A., & Berger-Sweeney, J. (2000). Reference memory, anxiety and estrous cyclicity in C57BL/6NIA mice are affected by age and sex. *Neuroscience*, 95, 293–307.
- Gater, R., Tansella, M., Korten, A., Tiemens, B. G., Mavreas, V. G., & Olatawura, M. O. (1998). Sex differences in the prevalence and detection of depressive and anxiety disorders in general health care settings. *Archives of General Psychiatry*, 55, 405–413.
- Gauthier, S., Reisberg, B., Zaudig, M., Petersen, R. C., Ritchie K, Broich K, et al. (2006). Mild cognitive impairment. *Lancet* 367,1262-1270.
- Gentsch, C., Lichtsteiner, M., Driscoll, P., & Feer, H. (1982). Differential hormonal and physiological responses to stress in Roman high- and low-avoidance rats. *Physiology. Behavior*, 28, 259–263.
- Gil-Bea, F. J., Aisa, B., Schliebs, R., & Ramirez, M.J. (2007). Increase of locomotor activity underlying the behavioral disinhibition in tg2576 mice. *Behavioral Neuroscience*, 121, 340–344.

- Goate, A., Chartier-Harlin, M. C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., et al (1991). Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature*, 349, 704-706.
- Golbin, A. Z., Kravitz, H. M., & Keith, L. G. (Eds.). (2004). *Sleep psychiatry*. London: Parthenon.
- Gomes, F., Greidinger, M., Salviano, M. F., Couto, K. C., Scaperli, G. F., Alves, S. H. S., et al. (2010). Antidepressant- and anxiogenic-like effects of acute 5-HT<sub>2C</sub> receptor activation in rats exposed to the forced swim test and elevated plus maze. *Psychology & Neuroscience*, 3, 245 – 249.
- Gomes, V.C. (2008). *Participação do Complexo Amigdalóide na Resposta de Congelamento em Ratos Geneticamente Selecionados*. Dissertação de Mestrado. Instituto de Psicologia, PUC, Rio de Janeiro.
- Gomes, V. C. (2012). *Genetic selection of two new rat lines displaying different levels of conditioned freezing behavior*. Tese de Doutorado, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.
- Gomes, V. C., & Landeira-Fernandez, J. (2008). Amygdaloid lesions produced similar contextual fear conditioning disruption in the Carioca high- and low-conditioned freezing rats. *Brain Research*, 1233, 137-145.
- Gomes, V. C, Silva, C. E. B, & Landeira-Fernandez, J. (2011). The Carioca High and Low Conditioned Freezing Lines: A New Animal Model of Generalized Anxiety Disorder. In: Kalinin, VV (Ed), *Anxiety disorders*. Croatia, InTech.
- Gorwood, P. (2004). Generalized anxiety disorder and major depressive disorder comorbidity: an example of genetic pleiotropy? *European Psychiatry*, 19, 27–33.
- Graeff, F. G. (1989). Ansiolíticos. In: *Drogas psicotrópicas e seu modo de ação* (pp.61-83). São Paulo: Ed. EPU.
- Graeff, F. G. (1999). Ansiedade, In: Graeff, F.G. & Brandão, M.L. (eds.) – *Neurobiologia das Doenças Mentais*. 5ª ed. Lemos, São Paulo, pp. 135-178.
- Graeff, F. G., & Hetem, L. A. B. (2004). Neurobiologia. In L.A.B. Hetem, F.G. Graeff (Eds.). *Transtornos de Ansiedade* (pp. 107-132).São Paulo: Ed. Atheneu.
- Graeff, F. G., & Zangrossi, H. (2003). Animal Models of Anxiety Disorders. In H. D'Haenen, J. A. den Boer, & P. Willner (Eds.). *Biological Psychiatry*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK.

- Gresack, J. E., & Frick, K. M. (2003). Male mice exhibit better spatial working and reference memory than females in a water-escape radial arm maze task. *Brain Research*, 982, 98–107.
- Griebel, G., Rodgers, R. J., Perrault, G. & Sanger, D. J. (1997). A comparative study of the effects of selective and non-selective 5-HT<sub>2</sub> receptor subtype antagonists in rat and mouse models of anxiety. *Neuropharmacology*, 36 (6), 793-802.
- Griebel, G., Simiand, J., Serradeil-Le Gal, C., Wagnon, J., Pascal, M., Scatton, B., et al. (2002). Anxiolytic- and antidepressant-like effects of the non-peptide vasopressin V<sub>1b</sub> receptor antagonist, SSR149415, suggest an innovative approach for the treatment of stress-related disorders. *Proceedings of the National Academy of Science*, 99, 6370–6375.
- Grippe, A. J., Cushing, B. S., & Carter, S. (2007). Depression-like behavior and stressor-induced neuroendocrine activation in female prairie voles exposed to chronic social isolation. *Psychoneuroendocrinology*, 32, 966–980.
- Guo, M., Wu, C. F., Liu, W., Yang, J. Y., & Chen, D. (2004). Sex difference in psychological behavior changes induced by long-term social isolation in mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 28 (1), 115-121.
- Gupta, R. R., Sen, S., Diepenhorst, L. L., Rudick, C. N., & Maren, S. (2001). Estrogen modulates sexually dimorphic contextual fear conditioning and hippocampal long-term potentiation (LTP) in rats. *Brain Research*, 888, 356–365.
- Handley, S. L. & Mithani, S. (1984). Effects of alpha-adrenoceptor agonists in a maze-exploration model of “fear”-motivated behavior. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 327, 1262-1267.
- Hardouin, N., & Nagy, A. (2000). Gene-trap-based target site for cre-mediated transgenic insertion. *Genesis*, 26, 245–252.
- Hardy, J., & Allsop, D. (1991). Amyloid deposition as the central event in the etiology of Alzheimer's disease. *Trends in Pharmacological Sciences*, 12, 383-388.
- Heinsbroek, R. P., van Oyen, H. G., & van de Poll, N. E. (1984). The pituitary-adrenocortical system is not involved in the sex difference in passive avoidance. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 20, 663–668.

- Hendley, E. D., Atwater, D. G., Myers, M. M., & Whitehorn, D. (1983). Dissociation of genetic hyperactivity and hypertension in SHR. *Hypertension*, *5*, 211-217.
- Hendley, E. D., & Ohlsson, W. G. (1991). Two new inbred rat strains derived from SHR: WKHA, hyperactive, and WKHT, hypertensive, rats. *American Journal of Physiology*, *261*, H583-H589.
- Hettema, J. M., Annas, P., Neale, M. C., Kendler, K. S., & Fredrikson, M. (2003). A twin study of the genetics of fear conditioning. *Archives of General Psychiatry*, *60*, 702–708.
- Hettema, J. M., Neale, M. C., & Kendler, K. S. (2001). A review and meta-analysis of the genetic epidemiology of anxiety disorders. *American Journal of Psychiatry*, *158*, 1568–1578.
- Holmes, A., Heilig, M., Rupniak, N. M., Steckler, T., & Griebel, G. (2003). Neuropeptide systems as novel therapeutic targets for depression and anxiety disorders. *Trends in Pharmacological Sciences*, *24*, 580–588.
- Holmes, A., Parmigiani, S., Ferrari, P. F., Palanza, P., & Rodgers, R. J. (2000). Behavioral profile of wild mice in the elevated plus-maze test for anxiety. *Physiology and Behavior*, *71*, 509–516.
- Hsiao, K., Chapman, P., Nilsen, S., Eckman, C., Harigaya, Y., Younkin, S., et al. (1996). Correlative memory deficits, A $\beta$  elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science*, *274*, 99-102.
- Hsiao, Y. H., Chen, P. S., Chen, S. H., & Gean, P. W. (2011). The involvement of Cdk5 activator p35 in social isolation-triggered onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficit in the transgenic mice. *Neuropsychopharmacology*, *36*, 1848-1858.
- Huang, H. J., Liang, K. C., Ke, H. C., Chang, Y. Y., & Hsieh-Li, H. M. (2011). Long-term social isolation exacerbates the impairment of spatial working memory in APP/PS1 transgenic mice. *Brain Research*, *1371*, 150–160.
- Hui, G. K., Figueroa, I. R., Poytress, B. S., Roozendaal, B., McGaugh, J. L., & Weinberger, N. M. (2004). Memory enhancement of classical fear conditioning by post-training injections of corticosterone in rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, *81*, 67–74.
- Jawhar, S., Trawicka, A., Jenneckens, C., Bayer, T.A., Wirths, O. (2012). Motor deficits, neuron loss, and reduced anxiety coinciding with axonal degeneration and intraneuronal A $\beta$

- aggregation in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 33, 196.e29–196.e40.
- Jeong, Y. H., Park, C. H., Yoo, J., et al. (2006). Chronic stress accelerates learning and memory impairments and increases amyloid deposition in APPV717I-CT100 transgenic mice, an Alzheimer's disease model. *FASEB J*, 20(6), 729–31.
- Jones, B. C. (2007). Some basics, mendelian traits, polygenic traits, complex traits. In: Jones, B.C., Mormede, P. (Eds.), *Neurobehavioral Genetics: methods and applications* (pp. 29-36). USA: CRC press.
- Jones, S. M., Jones, T. A., Johnson, K. R., Yu, H., Erway, L. C., & Zheng, Q. Y. (2006). A comparison of vestibular and auditory phenotypes in inbred mouse strains. *Brain Research*, 1091, 40–46.
- Kabuki, Y., Mizobe, Y., Yamada, S., & Furuse, M. (2009). Dietary L-tyrosine alleviates the behavioural alterations induced by social isolation stress in mice. *Brain Research Bulletin*, 80, 389-396.
- Kaczorowski, C. C., Sametsky, E., Shah, S., Vassar, R., & Disterhoft, J. F. (2009). Mechanism underlying basal and learning intrinsic excitability in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 32, 1452-1465.
- Karim, A., & Arslan, M. I. (2000). Isolation modifies the behavioural response in rats. *Bangladesh Medical Research Council Bulletin*, 26, 27–32.
- Karl, T., Duffy, L., & Herzog, H. (2008). Behavioural profile of a new mouse model for NPY deficiency. *European Journal of Neuroscience*, 28, 173–180.
- Kim, J., & Gorman, J. (2005). The psychobiology of anxiety. *Clinical Neuroscience Research*, 4, 335-347.
- Kimura, R., & Ohno, M. (2009). Impairments in remote memory stabilization precede hippocampal synaptic and cognitive failures in 5XFAD Alzheimer mouse model. *Neurobiology of Disease*, 33, 229-235.

- Koike, H., Ibi, D., Mizoguchi, H., Nagai, T., Nitta, A., Takuma, K., et al. (2009). Behavioral abnormality and pharmacologic response in social isolation-reared mice. *Behavioural Brain Research*, 202, 114-121.
- Korte, S. M. (2001). Corticosteroids in relation to fear, anxiety and psychopathology. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 25, 117-142.
- Kudo, K., Qiao, C. X., Kanba, S., & Arita, J. (2004). A selective increase in phosphorylation of cyclic AMP response element-binding protein in hippocampal CA1 region of male, but not female, rats following contextual fear and passive avoidance conditioning. *Brain Research*, 22, 233–243.
- Kuleskaya, N., Rauvala, H., & Voikar, V. (2011). Evaluation of Social and Physical Enrichment in Modulation of Behavioural Phenotype in C57BL/6J Female Mice. *PLoS ONE*, 6(9), e24755
- Kumar-Singh, S., Theuns, J., Van Broeck, B., Pirici, D., Vennekens, K., Corsmit, E., et al. (2006). Mean age-of-onset of familial Alzheimer disease caused by presenilin mutations correlates with both increased Abeta42 and decreased Abeta40. *Human Mutation*, 27, 686-695.
- Kunimoto, S., Nakamura, S., Wada, K., & Inoue, T. (2010). Chronic stress-mutated presenilin 1 gene interaction perturbs neurogenesis and accelerates neurodegeneration. *Experimental Neurology*, 221(1), 175–85.
- LaBuda, C. J., Mellgren, R. L., & Hale, R. L. (2002). Sex differences in the acquisition of a radial maze task in the CD-1 mouse. *Physiology and Behavior*, 76, 213–217.
- Lalonde, R., Dumont, M., Staufenbiel, M., & Strazielle, C. (2005). Neurobehavioral characterization of APP23 transgenic mice with the SHIRPA primary screen. *Behavioural Brain Research*, 157, 91–98.
- Lalonde, R., Dumont, M., Staufenbiel, M., Sturchler-Pierrat, C., & Strazielle, C. (2002) Spatial learning, exploration, anxiety, and motor coordination in female APP23 transgenic mice with the Swedish mutation. *Brain Research*, 956, 36–44.

- Lalonde, R., Lewis, T. L., Strazielle, C., Kim, H., & Fukuchi, K. (2003a). Transgenic mice expressing the betaAPP695SWE mutation: Effects on exploratory activity, anxiety, and motor coordination. *Brain Research*, *977*, 38 – 45.
- Lalonde, R., Qian, S., & Strazielle, C. (2003b). Transgenic mice expressing the PS1-A246E mutation: effects on spatial learning, exploration, anxiety, and motor coordination. *Behavioural Brain Research*, *138*, 71-79.
- Landgraf, R., & Wigger, A. (2002). High vs. Low anxiety-related behavior rats: an animal model of extremes in trait anxiety. *Behavioral Genetics*, *32*, 301-314.
- Landgraf, R., & Wigger, A. (2003). Born to be Anxious: Neuroendocrine and Genetic Correlates of Trait Anxiety in HAB Rats. *Stress*, *6* (2), 111–119.
- Lanfume, L., Mongeau, R., Cohen-Salmon, C., & Hamon, M. (2008). Corticosteroid–serotonin interactions in the neurobiological mechanisms of stress-related disorders. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *32*, 1174–1184.
- Lassalle, J. M. (2007). Animal resources in behavioral neurogenetics. In: Jones, B.C., Mormede, P. (Eds.), *Neurobehavioral Genetics: methods and applications*. CRC press. USA.
- LeDoux, J. E. (1998). Fear and the brain: where have we been, and where are we going? *Biological Psychiatry*, *44*, 1229-1238.
- LeDoux, J. E. (2000). Emotion circuits in the brain. *Annu. Rev. Neurosci.*, *23*, 155–184.
- Lewinsohn, P. M., Gotlib, I. H., Lewinsohn, M., Seeley, J.R., & Allen, N. B. (1998). Gender differences in anxiety disorders and anxiety symptoms in adolescents. *Journal of Abnormal Psychology*, *107*(1), 109-117.
- Liebsch, G., Linthorst, A. C. E., Neumann, I. D., Reul, J. M. H. M., Holsboer, F. M. D., & Landgraf, R. (1998a). Behavioral, Physiological, and Neuroendocrine Stress Responses and Differential Sensitivity to Diazepam in Two Wistar Rat Lines Selectively Bred for High- and Low-Anxiety–Related Behavior. *Neuropsychopharmacology*, *19*, 381-396.
- Liebsch, G., Montkowski, A., Holsboer, F., & Landgraf, R. (1998b). Behavioural profiles of two Wistar rat lines selectively bred for high or low anxiety-related behaviour. *Behavioural Brain Research*, *94*, 301–310.

- Lindsay, J., Laurin, D., Verreault, R., Hebert, R., Helliwell, B., Hill, G. B., et al. (2002). Risk factors for Alzheimer's disease: a prospective analysis from the Canadian Study of Health and Aging. *American Journal of Epidemiology*, *156*, 445-453.
- Lister, R.G. (1990). Ethologically based animal models of anxiety disorders. *Pharmacology & Therapeutics*, *46*, 321-340.
- Liu, L., Li, Y., & Tollefsbol, T. O. (2008). Gene-environment interactions and epigenetic basis of human diseases. *Current Issues in Molecular Biology*, *10*, 25-36.
- Luanagh, C., & Lawlor, B. (2008). Loneliness and the health of older people. *International Journal of Geriatric Psychiatry*, *23*(12), 1213-1221.
- Luyten, L., Vansteenwegen, D., van Kuyck, K., Gabriëls, L., & Nuttin, B. (2011). Contextual conditioning in rats as an animal model for generalized anxiety disorder. *Cognitive, Affective & Behavioral Neuroscience*, *11*, 228-244.
- Lyonfields, J. D., Borkovec, T. D. & Thayer, J. F. (1995). Vagal tone in generalized anxiety disorder and the effects of aversive imagery and worrisome thinking. *Behavior Therapy*, *26*, 457-466.
- Maccoby, E. E., & Jacklin, C. N. (1974). *The psychology of sex differences*. Stanford University Press, Stanford, CA.
- Mackintosh, M. A., Gatz, M., Wetherell, J. L., & Pedersen, N. L. (2006). A twin study of lifetime generalized anxiety disorder (GAD) in older adults: genetic and environmental influences shared by neuroticism and GAD. *Twin Research and Human Genetics*, *9*, 30 - 37.
- Marchand, A. R., Barbelivien, A., Seillier, A., Herbeaux, K., Sarrieau, A., & Majchrzak, M. (2007). Contribution of corticosterone to cued versus contextual fear in rats. *Behavioural Brain Research*, *183* (1), 101-110.
- Marcondes, F. K., Miguel, K. J., Melo, L. L., & Spadari-Bratfisch, R. C. (2001). Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze test. *Physiology & Behavior*, *74*, 435-440.
- Maren, S., De Oca, B., & Fanselow, M.S. (1994). Sex differences in hippocampal long-term potentiation (LTP) and Pavlovian fear conditioning in rats: positive correlation between LTP and contextual learning. *Brain Research*, *661*, 25-34.

- Martin, A., & Brown, R. (2010). The lonely mouse: verification of a separation-induced model of depression in female mice. *Behavioural Brain Research*, *207*, 196-207.
- Maxson, S. C. (2007). A history of behavior genetics. In: Jones, B.C., Mormede, P. (Eds.), *Neurobehavioral Genetics: methods and applications*. CRC press. USA. pp. 1-16.
- McLachlan, C.S., & Yi Xing Soh, C. (2005). Differences in anxiety-related behavior between apolipoprotein E-deficient C57BL/6 and wild type C57BL/6 mice. *Physiology Research*, *54*, 701–704.
- Merikangas, K. R., Zhang, H., Avenevoli, S., Acharyya, S., Neuenschwander, M., & Angst, J. (2003). Longitudinal trajectories of depression and anxiety in a prospective community study: the Zurich cohort study. *Archives of General Psychiatry*, *60*, 993-1000.
- Mishima, N., Higashitani, F., Teraoka, K., & Yoshioka, R. (1986). Sex differences in appetitive learning of mice. *Physiology Behavior*, *37*, 263–268.
- Miura, H., Qiao, H., & Ohta, T. (2002). Influence of aging and social isolation on changes in brain monoamine turnover and biosynthesis of rats elicited by novelty stress. *Synapse*, *46*, 116–124.
- Miyakawa, T., Yamada, M., Duttaroy, A., & Wess, J. (2001). Hyperactivity and intact hippocampus-dependent learning in mice lacking the M1 muscarinic acetylcholine receptor. *Journal of Neuroscience*, *21*, 5239–5250.
- Mizuno, K., Antunes-Martins, A., Ris, L., Peters, M., Godaux, E., & Giese, K. P. (2007). Calcium/calmodulin kinase kinase  $\beta$  has a male-specific role in memory formation. *Neuroscience*, *145*, 393–402.
- Mormède, P., & Ramos, A. (1999). Genetics and emotional behaviors—experimental studies. In: B. C. Jones, P. Mormède (Eds.). *Neurobehavioral genetics: methods and applications* (pp. 301–315). Boca Raton: CRC Press.
- Morris, R. G. M. (1984). Development of a water maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, *11*, 47–60.
- Nesse, R. M. (1999). Proximate and evolutionary studies of anxiety, stress and depression: synergy at the interface. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *23*, 895–903.

- Nicholas, A., Munhoz, C. D., Ferguson, D., Campbell, L., & Sapolsky, R. (2006). Enhancing cognition after stress with gene therapy. *The Journal of Neuroscience*, 26, 11637–11643.
- Nikiforuk, A., Kos, T., & Wesolowska, A. (2011). The 5-HT<sub>6</sub> receptor agonist EMD 386088 produces antidepressant and anxiolytic effects in rats after intrahippocampal administration. *Psychopharmacology (Berl)*, 217, 411–418.
- Oakley, H., Cole, S., Logan, S., Maurs, E., Shao, P., Craft, J., et al. (2006). Intraneuronal  $\beta$ -amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *The Journal of Neuroscience*, 26, 10129-10140.
- Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J. D., Murphy, M.P., Golde, T.E., Kaye, R., et al. (2003). Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular A $\beta$  and synaptic dysfunction. *Neuron*, 39, 409–421.
- Ognibene, E., Middei, S., Daniele, S., Adriani, W., Ghirardi, O., Caprioli, A., et al. (2005). Aspects of spatial memory and behavioral disinhibition in Tg2576 transgenic mice as a model of Alzheimer's disease. *Behavior Brain Research*, 156, 225-232.
- Ohno, M. (2009). Failures to reconsolidate memory in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Learning Memory*, 92, 455–459.
- Ohno, M., Chang, L., Tseng, W., Oakley, H., Citron, M., Klein, W., et al. (2006). Temporal memory deficits in Alzheimer's mouse models: rescue by genetic deletion of BACE1. *European Journal of Neuroscience*, 23, 251-260.
- O'Leary, T. P., & Brown, R. E. (2009). Visuo-spatial learning and memory deficits on the Barnes maze in the 16-month-old APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> mouse model of Alzheimer's disease. *Behavioural Brain Research*, 201 (1), 120-127.
- Overstreet, D. H., Friedman, E., Mathé, A. A., & Yadid, G. (2005). The Flinders Sensitive Line rat: a selectively bred putative animal model of depression. *Neuroscience Biobehavioral Review*, 29, 739–759.
- Overstreet, D. H., Pucilowski, O., Rezvani, A. H., & Janowsky, D. S. (1995). Administration of antidepressants, diazepam and psychomotor stimulants further confirms the utility of

- flinders sensitive line rats as an animal model of depression. *Psychopharmacology (Berl)*, *121*(1), 27–37.
- Overstreet, D. H., & Russell, R. W. (1982). Selective breeding for diisopropyl fluorophosphate-sensitivity: behavioural effects of cholinergic agonists and antagonists. *Psychopharmacology (Berl)*, *78*(2), 150–155.
- Palanza, P. (2001). Animal models of anxiety and depression: how are females different? *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *25*, 219–233.
- Paterson, A., Whiting, P. J., Gray, J. A., Flint, J., & Dawson, G. R. (2001). Lack of consistent behavioural effects of Maudsley reactive and non-reactive rats in a number of animal tests of anxiety and activity. *Psychopharmacology*, *154*, 336–342.
- Pellow, S., Chopin, P., File, S. & Briley, M. (1985). Validation of open:close arm entries in a elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, *14*, 149-167.
- Perissin, L., Facchin, P. & Porro, C. A. (2003). Tonic pain response in mice: effects of sex, season and time of day. *Life Sciences*, *72*, 897–907.
- Philipson, O., Lord, A., Gumucio, A., O'Callaghan, P., Lannfelt, L., & Nilsson, L. N. (2010). Animal models of amyloid-beta-related pathologies in Alzheimer's disease. *FEBS Journal*, *277*, 1389-1409.
- Phillips, R. G., & LeDoux, J. E. (1994). Lesions of the dorsal hippocampal formation interfere with background but not foreground contextual fear conditioning. *Learning & Memory*, *1*, 34 – 44.
- Pietropaolo, S., Brana, C., Feldon, J., Yee, B., Sun, Y., & Li, R. (2009). Limited impact of social isolation on Alzheimer-like symptoms in a triple transgenic mouse model. *Behavioral Neuroscience*, *123*, 181-195.
- Pietropaolo, S., Singer, P., Feldon, J., & Yee, B. K. (2008). The postweaning social isolation in C57BL/6 mice: preferential vulnerability in the male sex. *Psychopharmacology (Berl)*, *197*, 613–628.

- Ponder, C. A., Kliethermes, C. L., Drew, M. R., Muller, J., Das, K., Risbrough, V. B., Crabbe, J. C., Conrad Gilliam, T., & Palmer, A. A. (2007). Selection for contextual fear conditioning affects anxiety-like behaviors and gene expression. *Genes, Brain and Behavior*, 6, 736-749.
- Porsolt, R.D., Anton, G., Blavet, N., & Jalfre, M. (1978). Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *European Journal of Pharmacology*, 47, 379-391
- Porsolt, R. D., Bertin, A., Blavet, M. D., & Jalfre, M. (1979). Immobility induced by forced swimming in rats: effects of agents which modify central catecholamine and serotonin activity. *European Journal of Pharmacology*, 57, 201-210.
- Porsolt, R. M., Le Pichon, M., & Jalfre, M. (1977). Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*, 266, 730-732.
- Pryce, C. R., Lehmann, J., & Feldon, J. (1999). Effect of sex on fear conditioning is similar for context and discrete CS in Wistar Lewis and Fischer rat strains. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 64, 753-759.
- Pugh, C. R., Tremblay, D., Fleshner, M., & Rudy, J.W. (1997). A selective role for corticosterone in contextual-fear conditioning. *Behavioural Neurosciences*, 111, 503-511.
- Pugh, P.L., Richardson, J.C., Bate, S.T., Upton, N., & Sunter, D. (2007). Non-cognitive behaviours in an APP/PS1 transgenic model of Alzheimer's disease. *Behavior Brain Research*, 178, 18-28
- Radcliffe, R. A., Lowe, M. V., & Wehner, J. M. (2000). Confirmation of Contextual Fear Conditioning QTLs by Short-Term Selection. *Behavior Genetics*, 30(3), 183-191 .
- Ramos, A., Berton, O., Mormede, P., & Chaouloff, F. (1997). A multiple-test study of anxiety-related behaviours in six inbred rat strains. *Behavior Brain Research*, 85, 57-69.
- Ramos, A., Correia, E. C., Izidio, G. S., & Bruske, G. R. (2003). Genetic selection of two new rat lines displaying different levels of anxiety-related behaviors. *Behavior Genetics*, 33: 657-668.
- Ramos, A., Mellerin, Y., Mormede, P., & Chaouloff, F. (1998). A genetic and multifactorial analysis of anxiety-related behaviours in Lewis and SHR intercrosses. *Behavior Brain Research*, 96, 195-205.

- Ramos, A., & Mormede, P. (1998). Stress and emotionality: a multidimensional and genetic approach. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *22*, 33-57.
- Ramos, A., & Mormede, P. (2007). Genetic analysis of emotional behaviors using animal models. In: Jones, B.C., Mormede, P. (Eds.), *Neurobehavioral Genetics: methods and applications* (pp. 291-306). USA: CRC press.
- Rauch, S. L., Shin, L. M., & Phelps, E. A. (2006). Neurocircuitry models of posttraumatic stress disorder and extinction: human neuroimaging research – Past, present, and future. *Biological Psychiatry*, *60*, 376–382.
- Ren-Patterson, R. F., Cochran, L. W., Holmes, A., Lesch, K. P., Lu, B., & Murphy, D. L. (2006). Gender-dependent modulation of brain monoamines and anxiety-like behaviors in mice with genetic serotonin transporter and BDNF deficiencies. *Cellular Molecular Neurobiology*, *26*, 755–780.
- Ris, L., Angelo, M., Plattner, F., Capron, B., Errington, M. L., Bliss, T. V., et al. (2005). Sexual dimorphisms in the effect of low-level p25 expression on synaptic plasticity and memory. *European Journal of Neuroscience*, *21*, 3023–3033.
- Rodgers, R. J., Cao, B. J., Dalvi, A., & Holmes, A. (1997). Animal models of anxiety: an ethological perspective. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, *30*, 289–304.
- Rodgers, R. J., & Cole, J. C. (1993). Influence of social isolation, gender, strain, and prior novelty on plus-maze behavior in mice. *Physiology & Behavior*, *54*, 729–736.
- Romans, S. E., Tyas, J., Cohen, M. M., & Silverstone, T. (2007). Gender differences in the symptoms of major depressive disorder. *Journal of Nervous Mental Disease*, *195*, 905–911.
- Rooszendaal, B., Hui, G. K., Hui, I. R., Belau, D. J., McGaugh, J. L., & Weinberger, N. M. (2006). Basolateral amygdala noradrenergic activity mediates corticosterone-induced enhancement of auditory fear conditioning. *Neurobiology of Learning and Memory*, *86*, 249–255.
- Rothman, S.M., Herdener, N., Camandola, S., Texel, S.J., Mughal, M.R., Cong, W.-N., et al. (2012). 3xTgAD mice exhibit altered behavior and elevated A $\beta$  after chronic mild social stress. *Neurobiology of Aging*, *33* (4), 830.e1-830.e12.

- Rudy, J. W., Huff, N. C., & Matus-Amat, P. (2004). Understanding contextual fear conditioning: insights from two-process model. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *28*, 675-685.
- Sapolsky, R. M. (1993). Neuroendocrinology of the Stress-response. In: J. B. Becker, S. M. Breedlove, D. Crews (Eds.). *Behavioral endocrinology* (pp. 287-324). London: The MIT Press.
- Sartori, S. B., Hauschild, M., Bunck, M., Gaburro, S., Landgraf, R., & Singewald, N. (2011b). Enhanced fear expression in a psychopathological mouse model of trait anxiety: pharmacological interventions. *PLoS One*, *6*, E16849.
- Sartori, S. B., Landgraf, R., & Singewald, M. (2011a). The clinical implications of mouse models of enhanced anxiety. *Future Neurology*, *6*(4), 531-571.
- Scarmeas, N., Levy, G., Tang, M. X., Manly, J., & Stern, Y. (2001). Influence of leisure activity on the incidence of Alzheimer's disease. *Neurology*, *57*, 2236-2242.
- Schellinck, H. M., Cyr, D. P., & Brown, R. E. (2010). How many ways can mouse behavioral experiments go wrong? Confounding variables in mouse models of neurodegenerative diseases and how to control them., *Advances in the Study of Behavior*, *41*, 255-366.
- Schiller, G. D., Daws, L. C., Overstreet, D. H., & Orbach, J. (1991). Lack of anxiety in an animal model of depression with cholinergic supersensitivity. *Brain Research Bull*, *26*(3), 433-435.
- Schiller, G. D., Pucilowski, O., Wienicke, C., & Overstreet, D. H. (1992). Immobility-reducing effects of antidepressants in a genetic animal model of depression. *Brain Research Bull*, *28*(5), 821-823.
- Schmitz, C., Rutten, B. P., Pielen, A., Schafer, S., Wirths, O., Tremp, G., et al. (2004). Hippocampal neuron loss exceeds amyloid plaque load in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *American Journal of Pathology*, *164*, 1495-1502.
- Setem, J., Pinheiro, A. P., Motta, V. A., Morato, S., & Cruz, A. P. (1999). Ethopharmacological analysis of 5-HT ligands on the rat elevated plus-maze. *Pharmacology. Biochemistry. Behavior*, *62*, 515-521.
- Sierksma, A., van den Hove, D., Steinbusch, H., & Prickaerts, J. (2010). Major depression, cognitive dysfunction and Alzheimer's disease: is there a link? *European Journal of Pharmacology*, *626*, 72-82.

- Silva, R. H., & Frussa-Filho, R. (2000). The plus-maze discriminative avoidance task: a new model to study memory-anxiety interactions. Effects of chlordiazepoxide and caffeine. *Journal of Neuroscience Methods*, *102*, 117–125.
- Silva, R. H., Kameda, S. R., Carvalho, R. C., Rigo, G. S., Costa, K. L., Taricano, I. D., et al. (2002). Effects of amphetamine on the plus-maze discriminative avoidance task in mice. *Psychopharmacology*, *160*, 9–18
- Simmons, D. (2008). The use of animal models in studying genetic disease: transgenesis and induced mutation. *Nature Education*, *1*(1).
- Sokoloff, G., Parker, C. C., Lim, J. E., & Palmer, A. A. (2011). Anxiety and fear in a cross of C57BL/6J and DBA/2J mice: mapping overlapping and independent QTL for related traits. *Genes, Brain and Behavior*, *10*, 604–614.
- Srivareerat, M., Tran, T.T., Alzoubi, K.H., & Alkadhi, K.A. (2009). Chronic Psychosocial Stress Exacerbates Impairment of Cognition and Long-Term Potentiation in  $\beta$ -Amyloid Rat Model of Alzheimer's Disease. *Biological Psychiatry*, *65* (11), 918-926.
- St George-Hyslop, P. H., Tanzi, R. E., Polinsky, R. J., Haines, J. L., Nee, L., Watkins, P. C., et al. (1987). The genetic defect causing familial Alzheimer's disease maps on chromosome 21. *Science*, *235*, 885-890.
- Staay, J. (2006). Animal models of behavioral dysfunctions: Basic concepts and classifications, and an evaluation strategy. *Brain Research Reviews*, *52*, 131-159.
- Steckler, T., Stein, M. B., & Holmes, A. (2008). Developing Novel Anxiolytics: Improving Preclinical Detection and Clinical Assessment. In: R. A. McArthur, F. Borsini (Eds.). *Animal and Translational Models for CNS Drug Discovery*. New York: Academic Press.
- Steenbergen, H. L., Heinsbroek, R. P. W., Van Hest, A., & Van De Poll, N. E. (1990). Sex-dependent effects of inescapable shock administration on shuttlebox-escape performance and elevated plus-maze behavior. *Physiology and Behavior*, *48* (4), 571-576.
- Stein, M. B. (2009). Neurobiology of generalized anxiety disorder. *The Journal of Clinical Psychiatry*, *70*(Suppl. 2), 15 – 19.
- Stock, H., Foradori, C., Ford, K., & Wilson, M. A. (2000). A lack of tolerance to the anxiolytic effects of diazepam on the plus-maze: comparison of male and female rats. *Psychopharmacology*, *147*, 362–370.

- Stover, K., & Brown, R. E. (2012). Age-related changes in visual acuity, learning and memory in the APP<sup>swE</sup>/PS1<sup>dE9</sup> mouse model of Alzheimer's disease. *Behavioural Brain Research*, *231* (1), 75-85.
- Touma, C., Bunck, M., Glasl, L., Nussbaumer, M., Palme, R., et al. (2008). Mice selected for high versus low stress reactivity: a new animal model for affective disorders. *Psychoneuroendocrinology* *33*, 839–862.
- Treit, D., Menard, J., & Royan, C. (1993). Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *44*, 463- 469.
- Trobe, J. D., Waller, P. F., Cook-Flannagan, C. A., Teshima, S. M., & Bieliauskas, L. A. (1996). Crashes and violations among drivers with Alzheimer disease. *Archives Neurology*, *53*, 411-416.
- Tucker, D. C., & Johnson, A. K. (1981). Behavioral correlates of spontaneous hypertension. *Neuroscience Biobehavioral Reviews*, *5*, 463-471.
- Valzelli, L., (1973). The “Isolation Syndrome” in mice. *Psychopharmacologica (Berl.)* *31*, 305–320.
- Vloeberghs, E., Van Dam, D., Coen, K., Deyn, P., & Staugenbiel, M. (2006). Aggressive male APP23 mice modeling behavioural alterations in dementia. *Behavioral Neuroscience*, *120*, 1380-1383.
- Voikar, V., Koks, S., Vasar, E., & Rauvala, H. (2001). Strain and gender differences in the behavior of mouse lines commonly used in transgenic studies. *Physiology Behavior*, *72*, 271–281.
- Wahlsten, D., Bachmanov, A., Finn, D. A., & Crabbe, J. C. (2006). Stability of inbred mouse strain differences in behavior and brain size between laboratories and across decades. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, *103*, 16364–16369.
- Wahlsten, D., Metten, P., & Crabbe, J. (2003). A rating scale for wildness and ease of handling laboratory mice: results for 21 inbred testing strains in two laboratories. *Genes, Brain and Behavior*, *2*, 71-79.

- Waldemar, G., Dubois, B., Emre, M., Georges, J., McKeith, I. G., Rossor, M., et al. (2007). Recommendations for the diagnosis and management of Alzheimer's disease and other disorders associated with dementia: EFNS guideline. *European Journal of Neurology*, *14*, e1-26.
- Wegener, G., Mathé, A. A., & Neumann, I. D. (2012). Selectively bred rodents as models of depression and anxiety. In: J. Cryan, & A. Reif (Eds.). *Behavioral Neurogenetics*. Springer Verlag.
- Wehner, J. M., Radcliffe, R. A., Rosmann, R. T., Christensen, S. C., Rasmussen, D. L., Fulker, D. W., & Wiles, M. (1997). Quantitative trait locus analysis of contextual fear conditioning in mice. *Nature Genetics*, *17*, 331–334.
- Weiss, I. C., Pryce, C., R., Jongen-Relo, A. L., Nanz-Bahr, N., I., & Feldon, J. (2004). Effect of social isolation on stress-related behavioural and neuroendocrine state in the rat. *Behavioural Brain Research*, *152* (2), 279-295.
- Weiss, J. M., Cierpial, M. A., & West, C. H. K. (1998). Selective breeding of rats for high and low motor activity in a swim test: toward a new animal model of depression. *Pharmacology Biochemistry Behavior*, *61*, 49–66.
- Wetherington, C. L. (2007). Sex-gender differences in drug abuse: A shift in the burden of proof? *Experimental and Clinical Psychopharmacology*, *15*, 411–417.
- Whalley, L. J., Starr, J. M., Athawes, R., Hunter, D., Pattie, A., & Deary, I. J. (2000). Childhood mental ability and dementia. *Neurology*, *55*, 1455-1459.
- Wilson, R., Krueger, K., Arnold, S., Schneider, J., Kelly, J., Barnes, L., Tang, X., & Bennett, D. (2007). Loneliness and risk of Alzheimer's disease. *Archives General Psychiatry*, *64*, 234-240.
- Wiltgen, B. J., Sanders, M. J., Behne, N. S., & Fanselow, M. S. (2001). Sex differences, context preexposure, and the immediate shock deficit in Pavlovian context conditioning with mice. *Behavioural Neurosciences*, *115*, 26–32.
- Wirhbs, O., & Bayer, T. A. (2010). Neuron loss in transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *International Journal of Alzheimers Disease*. Advance online publication. Retrieved August, 21, 2011.

- Wirhth, O., Multhaup, G., & Bayer, T. A. (2004). A modified beta-amyloid hypothesis: intraneuronal accumulation of the beta-amyloid peptide--the first step of a fatal cascade. *Journal of Neurochemistry*, *91*, 513-520.
- Wong, A. A., & Brown, R. E. (2006). Visual detection, pattern discrimination and visual acuity in 14 strains of mice. *Genes Brain Behavior*, *5*, 389-403.
- Yuk, D. Y., Lee, Y. K., Nam, S. Y., Yun, Y. W., Hwang, D. Y., Choi, D. Y., et al.(2009). Reduced anxiety in the mice expressing mutant (N141I) presenilin 2. *Journal of Neuroscience Research*, *87*, 522-531.
- Zangrossi, H. J., & Graeff, F. G. (2004). Modelos animais. In: L. A. B. Hetem & F. G. Graeff (Eds.). *Transtornos de ansiedade* (pp. 55-74). São Paulo: Atheneu.
- Zorawski, M., & Killcross, S. (2002). Posttraining glucocorticoid receptor agonist enhances memory in appetitive and aversive Pavlovian discrete-cue conditioning paradigms. *Neurobiology of Learning and Memory*, *78*, 458-64.

### Websites

- World Alzheimer Report 2010, Alzheimer's Disease International, UK, acessado em fevereiro 2013, < <http://www.alz.co.uk/research/files/WorldAlzheimerReport2010.pdf>>

## ANEXO 1

O artigo anexado abaixo refere-se aos dados coletados no experimento I e está sendo submetido à revista científica *Physiology & Behavior*

### Title: Behavioral and physiological correlates of a genetic animal model selected for high-and low-conditioned freezing

Salviano, MF<sup>1</sup>, Ferreira, GFS<sup>1,4</sup>, Greidinger, MC<sup>1,3</sup>, Couto, KC<sup>3</sup>, Barros, M<sup>2</sup>, Landeira, JF<sup>4</sup>, Cruz, APM<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Psychology, <sup>2</sup> Department of Pharmacology, Brasília University, <sup>3</sup> Department of Psychology, IESB College, <sup>4</sup>Dept. of Psychology, Pontifical Catholic University of Brasília, Brasília-DF; <sup>5</sup>Dept. of Psychology, Pontifical Catholic University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

#### Abstract

In recent years it has been a growing interest in the development of genetic animal models to investigate the bidirectional relationship between anxiety trait and defensive reaction. The present study further analyzed behavioral and physiological correlates of two generations of new lines of Wistar rats selectively bred by Gomes and Landeira-Fernandez (2008) for high (CHF) and low (CLF) contextual freezing response. In Experiment 1, blood corticosterone levels of male rats from the fifth generation were measured either after or not expositions to an aversive situation. Results indicated no differences between CHF and CLF rats' corticosterone levels. In Experiment 2, male and female rats from the tenth generation of these animals were used to assess anxiety-like reactions in the elevated plus-maze (EPM), depressive-like behavior in the forced swim test (FST) as well as aversive memory in the contextual fear conditioning. In the EPM, female rats showed lower anxiety-like behaviors than males as a whole, whereas CHF female rats were more anxious than CLF female rats. Comparing male rats in this test, CHF line had a tendency to have higher anxiety-like behavior than CLF, but this was not significant. As expected, no differences were found between lines or sexes in the FST. Finally, male and female rats from CHF line froze more than CLF line in the contextual fear conditioning. Such differences in emotionality responses from the ninth generation of selected rats further support the use of the model to study correlations between anxiety trait and defensive reactions. The face validity of the model and its use to experimentally simulate generalized anxiety disorder in humans are also discussed.

**Keywords:** genetic animal model, strains, animal models of anxiety.

#### 1. Introduction

The use of genetic models in the study of animal behavior has been widely used to investigate the influence of genetic factors in a variety of behavioral traits and possible emotionality disorders (Cryan and Holmes, 2005; Wegener, Mathe

and Neumann, 2012). Selective breeding has been shown to be a reliable technique to correlate a behavioral trait with related genes. A large number of new rat or mouse lines have already been developed selecting for many different phenotypes such as high or low defecation levels (Blizard and Adams, 2002), ultrasonic vocalization (Brunelli and Hofer, 1996), hypertension (Hendley et al., 1983), resistance to immobility (Weiss et al., 1998) and behaviors of emotionality or learning processes (Liebsch et al., 1998; Ramos et al., 2003; Ponder et al., 2007).

In a genetic model developed through selection of a particular behavior it is important to identify which are the physiological consequences and if other behaviors have been affected. Once the behavioral differences caused by genetic selection are identified, it should be determined if the selected trait is in fact responsible for the selected phenotype, as genes can be responsible for two or more different traits. For example, strains of spontaneously hypertensive rats (SHR) have high blood pressure, but also show more activity when exposed to both familiar and novel environments (Hendley et al., 1983). Hendley and Ohlsson (1991) later showed that these traits were independently segregated, as they were able to produce two new strains from SHR: hypertensive normoactive (WKHT) and normotensive hyperactive (WKHA).

The use of rodent genetic models has been a useful method to understand the correlation between a genetic predisposition to trait anxiety and learned fear, and to develop new ways to elucidate neurologic pathways and related genes (Steckler et al., 2008; Sartori, Landgraf & Singewald, 2011). A factor analysis made by Brigman et al. (2009) comparing several mouse inbred strains on various trait measures of fear conditioning and anxiety-like behavior found a coload of context fear with plus-maze anxiety-like behavior within the same factor. This might explain the fact that the use of context fear conditioning has been shown to be a reliable behavioral test to select animals with different anxiety profiles and develop new genetic models based on different emotionality phenotypes (Wehner et al., 1997; Radcliffe, Lowe and Wehner, 2000; Ponder et al., 2007).

A selective breeding line based on levels of freezing in a fear conditioning paradigm has been developed independently in different laboratories, and this phenotype has been heritable through generations (Ponder et al., 2007; Gomes and Landeira-Fernandez, 2008), with different genetic expression rates (Whener et al., 1997; Radcliffe et al., 2000) and possible correlations with emotional pathologies such as generalized anxiety disorder (Gomes, Silva and Landeira-Fernandez, 2011).

Therefore, the present study used a genetic model of rats previously developed by Gomes and Landeira-Fernandez (2008) in which two new lines of Wistar rats were selectively bred for high and low levels of freezing in response to contextual cues previously associated with footshock, termed Carioca High- and Low-Freezing (CHF, CLF) rats. Given the potential of this model as a tool for studying the development of anxiety disorders, the main objective of this study was to analyze two different generations of selected rats in two other emotionality tests, the elevated plus maze (EPM) and the forced swim test (FST). Additionally, hypothalamus-pituitary-adrenal axis response in animals in stressed and non stressed conditions through a blood corticosterone analysis was investigated.

## **2. Methods**

### **2.1. Animals**

All animals used were obtained according to procedures previously described by Gomes & Landeira-Fernandes, 2008. In summary, Wistar rats were selectively bred for differences in freezing behavior in a contextual fear conditioning test, where the rats with the highest contextual freezing scores were selected to breed the Carioca High Freezing line (CHF; avoiding brother-sister breeder pairs) and the rats with the lowest freezing levels developed the Carioca Low Freezing line (CLF). In the present study, CHF and CLF rats from the fifth generation (S5) were used to analyze the blood corticosterone level in two different situations – with or without previous aversive experience – as described below in experiment 1. Additionally, a second experiment used animals from the tenth generation to analyze anxiety-like behavior in the EPM, depressive-like behavior in the forced swim test (FST) and aversive memory in context fear conditioning. The experimenters were kept blind as to rat line throughout testing. Experimental procedures reported herein were performed under the guidelines for the use of animal experimental research established by the Brazilian Society of Neuroscience and Behavior (SBNeC), in accordance with the National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publications). Animal handling and sacrifice methods were reviewed and approved by the Committee for Animal Care and Use of the Biology Institute/UnB.

### **2.2. Experiment 1**

The S5 rats were obtained from the psychology department of PUC-Rio, where the selective breeding began, and brought to our laboratory in the University of Brasília (UnB). Tests started one week after arrival to allow animals to acclimatize to the new environment and avoid shipping effects. Seven male rats from the CHF and CLF lines at 8 months of age (weighing between 250g to 335g) were housed in acrylic cages (31 cm x 38 cm) in groups of 3-5 in an animal room under a 12h light-dark cycle (lights on at 8:00h) with food and water provided *ad libitum*. All experiments in this study were conducted during the light phase of the dark-light cycle and the animals were brought to the testing room in their home cages and allowed to adapt for 30 min before testing.

The animals were underwent contextual fear conditioning (as described below) and immediately after the second day of the test a blood sample was collected for corticosterone analysis (as described in section 2.2.2). A second blood sample was collected after one week. The freezing rate during the test was not analyzed as these animals had already been exposed to the test in their original lab for selecting purposes. This test was chosen as a stressful situation because this had been the method of selection of the new lines.

### **2.2.1. Contextual fear conditioning**

The fear conditioning chamber (25×20×20 cm) had metal walls on each side, clear plastic front and back walls and ceilings, and stainless steel bars on the floor. The chamber was placed inside of a sound-attenuating chest provided with a dim illumination (~15W) and a fan provided a low level of masking background noise. The apparatus was cleaned between animals with 20% ethanol and diluted lime scent. Behaviors were recorded with digital video and analyzed by a well-trained observer. A time-sampling procedure was employed to evaluate fear conditioning to contextual cues, in which episodes of freezing were recorded every two seconds. Freezing was defined as the total absence of body movement or vibrissa except for movements required for respiration.

The contextual fear conditioning protocol, adapted from Gomes et al. (2008), involved an acquisition and a testing trial. During acquisition, each animal was placed in the observation chamber for 4 min. At the end of this period, three unsignaled electrical footshocks were delivered at strength of 0.6 mA, with each shock lasting 1s and with an intershock interval of 20 s. The animal was returned to its home cage 2 min after the last shock. The testing trial occurred approximately 24h after training. This test consisted of placing the animal in the same chamber as the acquisition trial for 8 minutes with no footshock or other stimulation during this period. The freezing behavior was recorded only on the test trial.

### **2.2.2. Corticosterone analysis**

The blood sample was collected in two different situations, one immediately after the exposure to the context fear conditioning test trial (day 2 of procedure) and 1 week after fear conditioning. The second sample was collected without any previous stressful situation, with the aim to analyze differences in the basal concentration of blood corticosterone. All animals were anesthetized with isoflurane gas prior to cardiac puncture blood collection. Blood samples were centrifuged for 5 min at 1200 rpm, 4°C in order to isolate approximately 50µl of plasma, which was then frozen at -80°C until analyzed. Plasma corticosterone levels were measured in duplicate using a standard radio-immunoassay kit (Coat-A-Count Rat Corticosterone, Diagnostic Products Corporation, USA).

## **2.3. Experiment 2**

Ninth generation rats were shipped from PUC-Rio to our laboratory and then bred according to Gomes & Landeira-Fernandez (2008), and the pups were labeled S9F1. We tested 8 males and 8 females of the CHF line and 6 males and 8 females of the CLF line. Rats were tested at 2-3 months of age, weighing between 190g to 330g. Animals were housed as described previously in experiment 1 (section 2.2). All S9F1 animals were tested in elevated plus maze (EPM), forced swim test (FST) and contextual fear conditioning, in this order, and with a 24 hour interval between EPM and FST and 40 days between FST and the fear conditioning.

### **2.3.1. Elevated plus-maze (EPM)**

The apparatus was made of wood and consisted of two open arms (50 × 10 cm) and two perpendicular closed arms (50 × 10 × 40 cm) connected by a central area (10 × 10 cm). The maze was elevated 50 cm from the floor, and a rim of Plexiglas (1 cm high) surrounded the perimeter of the open arms to minimize falling from the arms. All animals were handled for 2 min on 5 consecutive days prior to the experimental session. Each rat was placed in the central area facing a closed arm and allowed to

freely explore the maze for 5 min. The maze was cleaned with a solution of 20% ethanol and dried between subjects. The experimental session was illuminated by a bright light (70W) and recorded by a camera located 175cm above the maze. The behavioral measures were later analyzed according to the protocol described by Cruz et al. (1994). For each animal, the frequency and duration of exploration in open- and closed-arms, head dipping, open arm end-exploration and risk-assessment behaviors were recorded. Risk assessment was defined as a stretching exiting from a closed arm with the forepaws and head only and open arm end-exploration was defined as the animal being in the distal (end) part of the open arms, crossing its head beyond the limits of the apparatus edge.

### **2.3.2. Forced swim test (FST)**

The rat FST apparatus was based on the specifications described by Porsolt, LePichnon, and Jalfre (1977) and Porsolt, Bertin, and Jalfre (1978) with some adaptations. Briefly, it consisted of a transparent cylinder (46 cm tall x 20 cm diameter) filled with water ( $26 \pm 2^\circ\text{C}$ ) to a depth of 30 cm inside which the rats were placed and forced to swim without the opportunity for escape (Gomes et al., 2010). They remained inside water until develop immobility, which was defined as the cessation of limb movements except those necessary to keep the animal afloat. Rats were tested in the FST with two exposures to the water tank spaced 24 h apart (trial session and test session, respectively). The first trial lasted 15 min and the second trial was 5 min. Only the second trial was recorded and duration of immobility and latency to immobility were analyzed. After swimming, each animal was gently dried with a towel and a hair blow dryer. The water in the tank was changed between rats.

### **2.3.3. Contextual fear conditioning**

The fear conditioning apparatus and test procedures were the same as described previously. Illumination (45 lux) was provided by a light bulb suspended above the apparatus. Expositions to the three apparatus were videotaped for behavioral scoring at a later time by a blinded and highly experienced observer.

## **2.3. Statistics**

Data from blood corticosterone of S5 lines were analyzed with a two-way repeated measures ANOVA for previous stress situation and line effects. As males and females from the S9F1 lines were tested, the differences were analyzed with a two-way ANOVA being performed for sex and line effects, and post-hoc analysis was done with a t-test for differences within lines between sexes. All tests were performed using StatView® software (Version 5.0.1, SAS Institute Inc., San Francisco,CA).

## **3. Results**

### **3.1. Experiment 1**

#### **3.1.1. Plasma corticosterone**

Both CHF and CLF male rats showed a significantly greater concentration of corticosterone after exposure to the context fear conditioning test than one week later [ $F(1,12)=45.23$ ;  $p<0.0001$ ]. There was no effect of line on corticosterone concentration [ $F(1,12)=1.827$ ;  $p>0.05$ ] (Fig. 1)

### **3.2. Experiment 2**

#### **3.2.1. Elevated plus-maze**

One female and one male from the CLF line and one male from the CHF line were not used in analysis because they fell from the apparatus. CHF line animals had a lower percentage of time spent on open arms [ $F(1,23)=8.78$ ;  $p<0.01$ ] (Fig. 2A), a lower number of entries on open arms [ $F(1,23)=20.79$ ;  $p<0.0001$ ] (Fig. 2B), a lower number of head dips [ $F(1,23)=5.54$ ;  $p<0.05$ ] (Fig. 2C) and a lower number of open arm end-explorations [ $F(1,23)=15.38$ ;  $p<0.001$ ] (Fig. 2D) compared to the CLF line.

Analyzing these behaviors separately by sex, statistical differences were found only in females, where the CHF line spent more time on open arms [ $t(13) = -3.515$ ;  $p < 0.01$ ] (Fig. 2A), had a lower number of entries on open arms [ $t(13) = -5.682$ ;  $p < 0.0001$ ] (Fig. 2B), a lower number of head dips [ $t(13) = -2.574$ ;  $p < 0.05$ ] (Fig. 2C) and a lower number of open arm end-explorations [ $t(13) = -4.287$ ;  $p < 0.001$ ] (Fig. 2D) compared to the female rats of CLF line. The male rats of CHF line had a tendency for a lower percentage of time spent on open arms [ $t(10) = -1.252$ ;  $p > 0.05$ ] (Fig. 2A), a lower number of entries on open arms [ $t(10) = -1.289$ ;  $p > 0.05$ ] (Fig. 2B), a lower number of head dips [ $t(10) = -0.850$ ;  $p > 0.05$ ] (Fig. 2C) and a lower number of open arm end-explorations [ $t(10) = -1.432$ ;  $p > 0.05$ ] (Fig. 2D) compared to the male rats of CLF line, but these were not significant. No differences were found in the time spent in risk-assessment from a closed arm [ $F(1,23) < 1$ ] (Fig. 2E) nor in the number of entries to closed arms [ $F(1,23) < 1$ ] (Fig. 2F) in both male and female rats. In addition, males of both lines showed a lower percentage of time spent in open arms [ $F(1,23) = 5.50$ ;  $p < 0.05$ ], a lower number of entries into open arms [ $F(1,23) = 14.92$ ;  $p < 0.001$ ], lower frequencies of head dips [ $F(1,23) = 4.80$ ;  $p < 0.05$ ], lower frequencies of open arm end-exploration [ $F(1,23) = 5.84$ ;  $p < 0.05$ ] and higher time spent in risk-assessment [ $F(1,23) = 9.03$ ;  $p < 0.01$ ] compared to females.

### 3.2. Forced swim test

No differences between lines or sexes were found in percent time immobile [ $F(1,26) < 1$ ] (Fig. 3A) or latency to immobility [ $F(1,26) < 1$ ] (Fig. 3B).

### 3.3. Contextual fear conditioning

CHF line rats had a greater percentage of time spent freezing than CLF rats [ $F(1,26) = 13.55$ ;  $p < 0.01$ ], and males spent more time freezing than females [ $F(1,26) = 11.99$ ;  $p < 0.01$ ] (Fig. 4).

## 4. Discussion

We showed that female CHF rats spend less time in the open arms of the EPM, as well as decreased open arm entries, fewer head dips and lower levels of exploration at the end of open arms than female CLF rats, a phenotype consistent with high anxiety behavior (Cruz et al., 1994; Ramos et al., 1997; Setem et al., 1999). Male CHF rats tended to have the same phenotype, but this was not statistically significant from male CLF rats. As there was no difference between lines for closed arm entries of the EPM or time spent swimming in the FST, we propose this is not due to differences in activity levels between the two lines (Cruz et al., 1994; Ramos et al., 1998). These data suggest that CHF/CLF lines, especially females, can be used as a model of trait anxiety, since the baseline levels of anxiety in these subjects were different from each other without previous exposure to aversive stimuli. Unlike 'state' anxiety, 'trait' anxiety does not vary from moment to moment and is considered to be an enduring feature of an individual (Belzung & Griebel, 2001).

The genetic selection over the nine generations of Carioca High/Low Freezing showed similar results to other CHF/CLF generation studies (Gomes and Landeira-Fernandez, 2008; Dias et al., 2009; Gomes, Silva and Landeira-Fernandez, 2011) and are in accordance with other studies using contextual fear conditioning to selectively breed new reactive lines (Wehner et al., 1997; Radcliffe, Lowe and Wehner, 2000; Ponder et al., 2007). Although the animals used in our study have been selected for a fear-related response (or potentially to their cognitive capabilities) their anxiety-related behaviors as analyzed on EPM showed a significant difference between the selected lines on almost all parameters indicative of anxiety. Although our results did not show significant differences between CHF/CLF male lines in the EPM, a study comparing the CHF male line from the fourth generation showed higher anxiety-related behaviors in these rats compared to a control Wistar rat group (Dias et al., 2009).

A good animal model should sufficiently meet the three validity criteria: face, predictive, and construct. In summary, the first refers to the phenomenological similarity between the behavior exhibited by the animal model and the specific symptoms of the human condition, the predictive validity successfully discriminates between effective and ineffective treatments and a construct validity is based on a robust theoretical rationale that refers to similarities in underlying mechanisms or etiology (Graeff and Zangrossi, 2003). The development of selected lines of rats with higher or lower contextual conditioned fear seem to be a useful model to study "psychopathological" animals with abnormal (elevated/lowered) anxiety, as they offer face validity for the generalized anxiety disorder (GAD). As some of the symptoms shown by patients with GAD are muscle tension (DSM-IV), inhibition of motor behavior and mental freezing (American Psychiatric Association, 2000; de Beurs et al., 1999; Lyonfields et al., 1995; Golbin et al., 2004; Gorwood, 2004), they can be correlated with the freezing behavior shown by rodents submitted to the context fear conditioning (Antoiadis & McDonald, 1999; Phillips & LeDoux, 1994; Luyten et al., 2011). A model for GAD

should be able to show a diffuse, unfocused, “generalized” anxiety for a non-specific stimulus over time (Luyten et al., 2011). The model proposed in the present study offers face validity, as the anxiety shown has been selected for and not induced. In addition, the increased anxiety-related behavior of the CHF line compared to the CLF line was significantly higher in female rats than males, much like is seen with GAD in humans, where women have a higher propensity to develop the disease (Hettema et al., 2001; Lewinsohn et al., 1998; Gater et al., 1998). Future pharmacological testing with anxiolytic medication would be able to determine predictive validity.

In the present study we found that males froze more than females in both the CHF and CLF lines, as previously found by Gomes and Landeira (2008) testing the first three generations. In animal models, males consistently outperform females in studies of inhibitory avoidance, showing higher latencies to re-enter a chamber previously associated with shock (Drago et al., 1980; Heinsbroek et al., 1984; Kudo et al., 2004) or showing more prolonged freezing, whether shock is signaled by context (Maren et al., 1994; Gupta et al., 2001; Wiltgen et al., 2001; Barker & Galea, 2010) or by a discrete CS (Pryce et al., 1999). Some studies have shown that estrogen is involved in the impaired freezing in context fear conditioned response of female rats (Gupta et al., 2001). We also found sex differences in the EPM, although many studies have not found sex differences in anxiety (Rodgers & Cole, 1993; Stock et al., 2000; Marcondes et al., 2001; Bridges & Starkey, 2004; Rauch et al., 2006). However, rats that have been previously exposed to inescapable shocks and tested in EPM showed significant sex differences, with males showing higher levels of behavior indicative of anxiety, similar to the results shown in the present study (Steenbergen, 1990). These findings suggest that the differences in the fear conditioning response that have been selected for over many generations seems to be influencing the emotional systems of both CHF/CLF lines in a sex-dependent manner.

The contextual fear conditioning test has often been used for the study of mnemonic processes, measuring aversive memory (for a review, see Rudy, Huff and Matus-Amat, 2004). It is undeniable that this test is dependent on mnemonic processes, but recent studies have shown the influence of anxiety on contextual fear conditioning behavior (Silva & Frussa-Filho, 2000; Silva et al., 2002; Ponder et al., 2007; Sartori et al., 2011). A study using the sixth generation of the CHF line showed no cognitive differences as analyzed in the novel object recognition test compared to a control Wistar rat group (Dias et al., 2009). Therefore, it seems that the breeding method used in the CHF/CLF genetic model has been selecting animals according to their anxiety rather than cognitive capabilities. However, other cognitive tests, such as the Morris water maze and the radial arm maze, should be performed to validate this issue.

Selective breeding for high- anxiety behaviors in the EPM also results in increased freezing in a contextual fear conditioning paradigm in mice (Sartoli et al., 2011). In addition, Sokoloff et al. (2011) used factor analysis in a study of anxiety and fear using the open field and fear conditioning tests, and identified multiple quantitative trait loci (QTL) for anxiety-like behavior measured in these tests. These studies demonstrate some portion of shared genetic architecture between anxiety and fear-related behaviors.

Anxiety is represented by complex traits which have been studied in several animal models, and some researchers have found co-morbidity of anxiety and depression (Merikangas et al., 2003; Cryan & Holmes, 2005; Wegener, Mathé & Neumann, 2012). Landgraf and Wigger (2002) showed that animals with high anxiety have more passive and depression-like behavior when exposed to a stress coping situation. New pharmacological studies have shown efficacy in therapeutic treatments for both types of these disorders (Holmes et al., 2003; Carr et al., 2011; Nikiforuk et al., 2011). However, none of those studies investigated trait differences or genetic factors. We found no difference in depression-like behavior as analyzed in the forced swim test. A previous study that used the fourth generation of the CHF line also found no difference in the forced swim test (Dias et al., 2009). The absence of correlation between anxiety and depression was also found in a genetic model for depression developed by selected breeding for sensitivity to irreversible anticholinesterase agents, the Flinders Sensitive Line (FSL). This new line had significantly increased immobility in the forced swim test that was reversible with chronic antidepressant drug treatment when compared to the Flinders Resistant Line (FRL; Overstreet & Russell, 1982; Schiller et al., 1992; El Khoury et al., 2006). Under baseline conditions, no differences were discovered between the FSL and FRL lines (Overstreet et al. 1995) and treatment with a benzodiazepine exerted a comparable anxiolytic effect in both FSL and FRL rats and did not differentiate between the two lines (Schiller et al. 1991).

Finally, our study investigated the blood corticosterone release of CHF/CLF lines from the fifth generation to analyze the physiological response of the selected lines to a stressor. We found a significant increase in the corticosterone concentration of animals re-exposed to the fear conditioning chamber, but no differences between lines were found in any of the blood sample conditions, with or without previous stress. Our results are not sufficient to argue that there are no differences in the neuroendocrine system of the rat lines tested. Many studies that analyzed the corticosterone influence on fear conditioning have found a positive correlation between this hormone concentration and the memory consolidation of fear when a predictive

conditioned stimulus (CS) is used, but not with context fear conditioning (Zorawski and Killcross, 2002; Hui et al., 2004; Roozendaal et al., 2006; Marchand et al., 2007). Marchand et al. (2007) analyzed the corticosterone level in rats tested in contextual and cued conditioning and the effects of a corticosterone injection on these same tests. Corticosterone increased after a paired presentation of tone and shock and was significantly higher than a shock-alone presentation. The hormone injection after the association trial potentiated the paired CS at the tone on testing day, but did not have the same effect on contextual freezing. Therefore, this suggests that selection for contextual fear conditioning response does not involve corticosterone release. Additionally, a genetic model of mice selectively bred for different responsiveness of HPA axis to stress have already been developed, indicating a genetic basis of the respective phenotype, but fear conditioning behavior was not investigated in animals selected for high or low corticosterone responsiveness (Touma et al., 2008).

In conclusion, our data taken together with other published data about the CHF/CLF rat lines support the use of rats with high and low context fear conditioning levels as a model of generalized anxiety disorder. Our results support the general idea that there is a link between context fear conditioning and anxiety, with rats selected for high contextual fear conditioning showing high anxiety-like behaviors, particularly in females. This is the first study to analyze sex differences in anxiety-like behavior in the CHF/CLF lines, and we found a lower anxiety-like and fear conditioned behaviors in females compared to males. Possibly, the use of selected anxious rat strains, which show constant high levels of fearfulness, may provide models of anxiety that have greater face, construct and/or predictive validity than 'state' or single-gene deletion models of anxiety. Therefore, more studies are required to better validate the present model, especially for construct and predictive validity.

## References

- American Psychiatric Association. (2000). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-IV-TR (4th ed.)*. Washington, DC: American Psychiatric Association.
- Andreano, J. M., & Cahill, L. (2009). Sex influences on the neurobiology of learning and memory. *Learn. Mem*, *16*, 248-266.
- Antoniadis, E. A., & McDonald, R. J. (1999). Discriminative fear conditioning to context expressed by multiple measures of fear in the rat. *Behavioural Brain Research*, *101*, 1 – 13.
- Astur, R. S., Tropp, J., Sava, S., Constable, R. T., & Marku, E. J. (2004). Sex differences and correlations in a virtual Morris water task, a virtual radial arm maze, and mental rotation. *Behavioural Brain Research*, *151*, 103–115.
- Barker, J. M., & Galea, L. A. M. (2010). Males show stronger contextual fear conditioning than females after context pre-exposure. *Physiology & Behavior*, *99*(1), 82–90.
- Belzung, C., & Griebel, G. (2001). Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: A review. *Behavioural Brain Research*, *125* (1-2), 141-149.
- Blizard, D.A., & Adams, N. (2002). The Maudsley Reactive and Nonreactive strains: a new perspective. *Behav Genet*, *32*, 277–299.
- Bridges, N. J., & Starkey, N. J. (2004). Sex differences in Mongolian gerbils in four tests of anxiety. *Physiology & Behavior*, *83*, 119–127.
- Brigman, J. L., Mathura, P., Lu, L., Williams, R. W., Holmes, A. (2009). Genetic relationship between anxiety related and fear-related behaviors in BXD recombinant inbred mice. *Behav Pharmacol* *20*, 204–209.
- Brown, R. E., Stanford, L. & Schellinck, H. M. (2000). Developing standardized behavioral tests for knockout and mutant mice. *ILAR J*, *41*, 163–173.
- Brunelli, S. A., & Hofer, M. A. (1996). Development of ultrasonic vocalization responses in genetically heterogeneous National Institutes of Health (N:NIH) rats: II. Associations among variables and behaviors. *Developmental Psychobiology*, *29*, 517-528.

- Carr, G. V., Schechter, L. E., & Lucki, I. (2011). Antidepressant and anxiolytic effects of selective 5-HT<sub>6</sub> receptor agonists in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, *213*, 499–507.
- Cruz, A. P. M., Frei, F., & Graeff, F. G. (1994). Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacology, Biochemistry e Behavior*, *49*, 171-176.
- Cryan, L. F., & Holmes, A. (2005). The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. *Nature Review Drug Discov.*, *4*, 775–790.
- de Beurs, E., Beekman, A. T., van Balkom, A. J., Deeg, D. J., van Dyck, R., & van Tilburg, W. (1999). Consequences of anxiety in older persons: its effect on disability, well-being and use of health services. *Psychological Medicine*, *29*, 583–593.
- Dias, G. P., Bevilaqua, M. C., Silveira, A. C., Landeira-Fernandez, J. & Gardino, P. F. (2009) Behavioral profile and dorsal hippocampal cells in Carioca high-conditioned freezing rats. *Behavioural Brain Research*, *205*, 342-348.
- Drago, F., Bohus, B., Scapagnini, U., & de Wied, D. (1980). Sexual dimorphism in passive avoidance behavior of rats: Relation to body weight, age, shock intensity and retention interval. *Physiol. Behav.* *24*, 1161–1164.
- El Khoury, A., Gruber, S. H., Mork, A., & Mathe, A. A. (2006). Adult life behavioral consequences of early maternal separation are alleviated by escitalopram treatment in a rat model of depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, *30*(3), 535–540.
- Gater, R., Tansella, M., Korten, A., Tiemens, B. G., Mavreas, V. G., & Olatawura, M. O. (1998). Sex differences in the prevalence and detection of depressive and anxiety disorders in general health care settings. *Arch Gen Psychiatry*, *55*, 405–413.
- Golbin, A. Z., Kravitz, H. M., & Keith, L. G. (Eds.). (2004). *Sleep psychiatry*. London: Parthenon.
- Gomes, F., Greidinger, M., Salviano, M. F., Couto, K. C., Scaperelli, G. F., Alves, S. H. S., et al. (2010). Antidepressant- and anxiogenic-like effects of acute 5-HT<sub>2C</sub> receptor activation in rats exposed to the forced swim test and elevated plus maze. *Psychology & Neuroscience*, *3*, 245 – 249.
- Gomes, V. C., Silva, C. E. B., & Landeira-Fernandez, J. (2011). The Carioca High and Low Conditioned Freezing Lines: A New Animal Model of Generalized Anxiety Disorder. In: Kalinin, VV (Ed), *Anxiety disorders*. Croatia, InTech.
- Gomes, V. C., & Landeira-Fernandez, J. (2008). Amygdaloid lesions produced similar contextual fear conditioning disruption in the Carioca high- and low-conditioned freezing rats. *Brain Research*, *1233*, 137-145.
- Gorwood, P. (2004). Generalized anxiety disorder and major depressive disorder comorbidity: an example of genetic pleiotropy? *European Psychiatry*, *19*, 27–33.
- Graeff, F. G., & Zangrossi, H. (2003). Animal Models of Anxiety Disorders. In H. D'Haenen, J. A. den Boer, & P. Willner (Eds.). *Biological Psychiatry*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK.
- Gupta, R. R., Sen, S., Diepenhorst, L. L., Rudick, C. N., & Maren, S. (2001). Estrogen modulates sexually dimorphic contextual fear conditioning and hippocampal long-term potentiation (LTP) in rats. *Brain Res.*, *888*, 356–365.
- Heinsbroek, R. P., Feenstra, M. G., Boon, P., Van Haaren, F., & Van de Poll, N. E. (1988). Sex differences in passive avoidance depend on the integrity of the central serotonergic system. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, *31*, 499–503.
- Heinsbroek, R. P., van Oyen, H. G., & van de Poll, N. E. (1984). The pituitary-adrenocortical system is not involved in the sex difference in passive avoidance. *Pharmacol. Biochem. Behav.* *20*, 663–668.
- Hendley, E. D., & Ohlsson, W. G. (1991). Two new inbred rat strains derived from SHR: WKHA, hyperactive, and WKHT, hypertensive, rats. *Amer J Physiol*, *261*, H583-H589.

- Hendley, E. D., Atwater, D. G., Myers, M. M., & Whitehorn, D. (1983). Dissociation of genetic hyperactivity and hypertension in SHR. *Hypertension*, *5*, 211-217.
- Hettema, J. M., Neale, M. C., Kendler, K. S. (2001). A review and meta-analysis of the genetic epidemiology of anxiety disorders. *Am. J. Psychiatry*, *158*, 1568-1578.
- Holmes, A., Heilig, M., Rupniak, N. M., Steckler, T., & Griebel, G. (2003). Neuropeptide systems as novel therapeutic targets for depression and anxiety disorders. *Trends Pharmacol. Sci.* *24*, 580-588.
- Hongpaisan, J., Sun, M-K, Alkon, D. L. (2011) PKC  $\epsilon$  Activation Prevents Synaptic Loss, A $\beta$  Elevation and Cognitive Deficits in Alzheimer's Disease Transgenic Mice. *The Journal of Neuroscience*, *31*, 630-643.
- Hui, G. K., Figueroa, I. R., Poytress, B. S., Roozendaal, B., McGaugh, J. L., & Weinberger, N. M. (2004). Memory enhancement of classical fear conditioning by post-training injections of corticosterone in rats. *Neurobiol Learn Mem*, *81*, 67-74.
- Kadarmideen, H. N., & Janss, L. L. (2007). Population and systems genetics analyses of cortisol in pigs divergently selected for stress. *Physiol. Genomics*, *29*, 57-65.
- Kudo, K., Qiao, C. X., Kanba, S., & Arita, J. (2004). A selective increase in phosphorylation of cyclic AMP response element-binding protein in hippocampal CA1 region of male, but not female, rats following contextual fear and passive avoidance conditioning. *Brain Research*, *22*, 233-243.
- Landgraf, R., & Wigger, A. (2002). High vs. Low anxiety-related behavior rats: an animal model of extremes in trait anxiety. *Behav Genet*, *32*, 301-314.
- LeDoux, J. E. (2000). Emotion circuits in the brain. *Annu. Rev. Neurosci.*, *23*, 155-184.
- Lewinsohn, P. M., Gotlib, I. H., Lewinsohn, M., Seeley, J.R., & Allen, N. B. (1998). Gender differences in anxiety disorders and anxiety symptoms in adolescents. *Journal of Abnormal Psychology*, *107*(1), 109-117.
- Liebsch, G., Montkowski, A., Holsboer, F., Landgraf, R. (1998). Behavioural profiles of two Wistar rat lines selectively bred for high or low anxiety-related behaviour. *Behavioural Brain Research*, *94*, 301-310.
- Luyten, L., Vansteenwegen, D., van Kuyck, K., Gabriëls, L., & Nuttin, B. (2011). Contextual conditioning in rats as an animal model for generalized anxiety disorder. *Cogn Affect Behav Neurosci.*, *11*, 228-244.
- Lyonfields, J. D., Borkovec, T. D. & Thayer, J. F. (1995). Vagal tone in generalized anxiety disorder and the effects of aversive imagery and worrisome thinking. *Behavior Therapy*, *26*, 457-466.
- Marchand, A. R., Barbelivien, A., Seillier, A., Herbeaux, K., Sarrieau, A., & Majchrzak, M. (2007). Contribution of corticosterone to cued versus contextual fear in rats. *Behavioural Brain Research*, *183* (1), 101-110.
- Marcondes, F. K., Miguel, K. J., Melo, L. L., & Spadari-Bratfisch, R. C. (2001). Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze test. *Physiology & Behavior*, *74*, 435-440.
- Maren, S., De Oca, B., & Fanselow, M.S. (1994). Sex differences in hippocampal long-term potentiation (LTP) and Pavlovian fear conditioning in rats: Positive correlation between LTP and contextual learning. *Brain Res.*, *661*, 25-34.
- Mathews, A. (1990). Why worry? The cognitive function of anxiety. *Behav.Res.Ther.*, *28*, 455-568.
- Merikangas, K. R., Zhang, H., Avenevoli, S., Acharyya, S., Neuenschwander, M., & Angst, J. (2003). Longitudinal trajectories of depression and anxiety in a prospective community study: the Zurich cohort study. *Arch Gen Psychiatry.*, *60*, 993-1000.
- Mizuno, K., Antunes-Martins, A., Ris, L., Peters, M., Godaux, E., & Giese, K. P. (2007). Calcium/calmodulin kinase kinase  $\alpha$  has a male-specific role in memory formation. *Neuroscience* *145*, 393-402.

- Nikiforuk, A., Kos, T., Wesolowska, A. (2011). The 5-HT<sub>6</sub> receptor agonist EMD 386088 produces antidepressant and anxiolytic effects in rats after intrahippocampal administration. *Psychopharmacology (Berl)*, 217, 411–418.
- Overstreet, D. H., Commissaris, R. C., De La Garza II, R., File, S. E., Knapp, D. J., & Seiden, L. S. (2003). Involvement of 5-HT<sub>1A</sub> Receptors in Animal Tests of Anxiety and Depression: Evidence from Genetic Models. *Stress: The International Journal On The Biology Of Stress*, 6(2), 101-110.
- Overstreet, D. H., Pucilowski, O., Rezvani, A. H., Janowsky, D. S. (1995). Administration of antidepressants, diazepam and psychomotor stimulants further confirms the utility of flinders sensitive line rats as an animal model of depression. *Psychopharmacology (Berl)*, 121(1), 27–37.
- Overstreet, D. H., Russell, R. W. (1982). Selective breeding for diisopropyl fluorophosphate-sensitivity: behavioural effects of cholinergic agonists and antagonists. *Psychopharmacology (Berl)*, 78(2), 150–155.
- Phillips, R. G., & LeDoux, J. E. (1994). Lesions of the dorsal hippocampal formation interfere with background but not foreground contextual fear conditioning. *Learning & Memory*, 1, 34 – 44.
- Ponder, C. A., Kliethermes, C. L., Drew, M. R., Muller, J., Das, K., Risbrough, V. B., Crabbe, J. C., Conrad Gilliam, T., Palmer, A. A. (2007). Selection for contextual fear conditioning affects anxiety-like behaviors and gene expression. *Genes, Brain and Behavior*, 6, 736-749.
- Porsolt, R. M., Le Pichon, M., & Jalfre, M. (1977). Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*, 266, 730-732.
- Pryce, C. R., Lehmann, J., & Feldon, J. (1999). Effect of sex on fear conditioning is similar for context and discrete CS in Wistar Lewis and Fischer rat strains. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 64, 753–759.
- Radcliffe, R. A., Lowe, M. V., & Wehner, J. M. (2000). Confirmation of Contextual Fear Conditioning QTLs by Short-Term Selection. *Behavior Genetics*, 30(3), 183–191 .
- Ramos, A., Berton, O., Mormede, P., & Chaouloff, F. (1997). A multiple-test study of anxiety-related behaviours in six inbred rat strains. *Behav. Brain Res.*, 85, 57–69.
- Ramos, A., Correia, E. C., Izidio, G. S., & Bruske, G. R. (2003). Genetic selection of two new rat lines displaying different levels of anxiety-related behaviors. *Behavior Genetics*, 33: 657-668.
- Ramos, A., Mellerin, Y., Mormede, P., & Chaouloff, F. (1998). A genetic and multifactorial analysis of anxiety-related behaviours in Lewis and SHR intercrosses. *Behav. Brain Res.*, 96, 195–205.
- Rauch, S. L., Shin, L. M., & Phelps, E. A. (2006). Neurocircuitry models of posttraumatic stress disorder and extinction: Human neuroimaging research – Past, present, and future. *Biological Psychiatry*, 60, 376–382.
- Ribeiro, A.M., Barbosa, F.F., Godinho, M.R., Fernandes, V.S., Munguba, H., Melo, T.G., Barbosa, M.T., Eufrazio, R.A., Cabral, A., Izídio, G.S., & Silva, R.H. (2010). Sex differences in aversive memory in rats: Possible role of extinction and reactive emotional factors. *Brain and Cognition*, 74, 145–151.
- Rodgers, R. J., & Cole, J. C. (1993). Influence of social isolation, gender, strain, and prior novelty on plus-maze behavior in mice. *Physiology & Behavior*, 54, 729–736.
- Roosendaal, B., Hui, G. K., Hui, I. R., Belau, D. J., McGaugh, J. L., & Weinberger, N. M. (2006). Basolateral amygdala noradrenergic activity mediates corticosterone-induced enhancement of auditory fear conditioning. *Neurobiol Learn Mem*, 86, 249–55.
- Rudy, J. W., Huff, N. C., & Matus-Amat, P. (2004). Understanding contextual fear conditioning: insights from a two-process model. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 28, 675-685.

- Sartori, S. B., Hauschild, M., Bunck, M., Gaburro, S., Landgraf, R., & Singewald, N. (2011). Enhanced fear expression in a psychopathological mouse model of trait anxiety: pharmacological interventions. *PLoS One*, *6*, E16849.
- Sartori, S. B., Landgraf, R., & Singewald, M. (2011). The clinical implications of mouse models of enhanced anxiety. *Future Neurol.*, *6*(4), 531–571.
- Schiller, G. D., Daws, L. C., Overstreet, D. H., & Orbach, J. (1991). Lack of anxiety in an animal model of depression with cholinergic supersensitivity. *Brain Res Bull*, *26*(3), 433–435.
- Schiller, G. D., Pucilowski, O., Wienicke, C., & Overstreet, D. H. (1992). Immobility-reducing effects of antidepressants in a genetic animal model of depression. *Brain Res Bull*, *28*(5), 821–823.
- Setem, J., Pinheiro, A. P., Motta, V. A., Morato, S., Cruz, A. P. (1999). Ethopharmacological analysis of 5-HT ligands on the rat elevated plus-maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, *62*, 515–521.
- Silva, R. H., & Frussa-Filho, R. (2000). The plus-maze discriminative avoidance task: A new model to study memory-anxiety interactions. Effects of chlordiazepoxide and caffeine. *Journal of Neuroscience Methods*, *102*, 117–125.
- Silva, R. H., Kameda, S. R., Carvalho, R. C., Rigo, G. S., Costa, K. L., Taricano, I. D., et al. (2002). Effects of amphetamine on the plus-maze discriminative avoidance task in mice. *Psychopharmacology*, *160*, 9–18
- Sokoloff, G., Parker, C. C., Lim, J. E., & Palmer, A. A. (2011). Anxiety and fear in a cross of C57BL/6J and DBA/2J mice: mapping overlapping and independent QTL for related traits. *Genes, Brain and Behavior*, *10*, 604–614.
- Solberg, L. C., Ahmadiyeh, N., Baum, A. E., Vitaterna, M. H., Takahashi, J. S., Turek, F. W., & Redei, E. E. (2003). Depressive-like behavior and stress reactivity are independent traits in a Wistar Kyoto x Fisher 344 cross. *Mol. Psychiatry*, *8*, 423–433.
- Steckler, T., Stein, M. B., & Holmes, A. (2008). Developing Novel Anxiolytics: Improving Preclinical Detection and Clinical Assessment. In: R. A. McArthur, F. Borsini (Eds.). *Animal and Translational Models for CNS Drug Discovery*. New York, Academic Press.
- Steenbergen, H. L., Heinsbroek, R. P. W., Van Hest, A., Van De Poll, N. E. (1990). Sex-dependent effects of inescapable shock administration on shuttlebox-escape performance and elevated plus-maze behavior. *Physiology and Behavior*, *48* (4), 571-576.
- Stock, H., Foradori, C., Ford, K., & Wilson, M. A. (2000). A lack of tolerance to the anxiolytic effects of diazepam on the plus-maze: Comparison of male and female rats. *Psychopharmacology*, *147*, 362–370.
- Touma, C., Bunck, M., Glasl, L., Nussbaumer, M., Palme, R., et al. (2008). Mice selected for high versus low stress reactivity: a new animal model for affective disorders. *Psychoneuroendocrinology* *33*, 839–862.
- Tucker, D. C., & Johnson, A. K. (1981). Behavioral correlates of spontaneous hypertension. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, *5*, 463-471.
- Van Haaren, F., & Van de Poll, N. E. (1984). The number of pre-shock trials affects sex differences in passive avoidance behavior. *Physiology & Behavior*, *33*, 269–272.
- Wegener, G., Mathé, A. A., Neumann, I. D. (2012). Selectively bred rodents as models of depression and anxiety. In: J. Cryan, & A. Reif (Eds.). *Behavioral Neurogenetics*. Springer Verlag.
- Wehner, J. M., Radcliffe, R. A., Rosmann, R. T., Christensen, S. C., Rasmussen, D. L., Fulker, D. W., & Wiles, M. (1997). Quantitative trait locus analysis of contextual fear conditioning in mice. *Nature Genet.*, *17*, 331–334.
- Weiss, J. M., Cierpial, M. A., & West, C. H. K. (1998). Selective breeding of rats for high and low motor activity in a swim test: toward a new animal model of depression. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, *61*, 49–66.

- Wiltgen, B. J., Sanders, M. J., Behne, N. S., & Fanselow, M. S. (2001). Sex differences, context preexposure, and the immediate shock deficit in Pavlovian context conditioning with mice. *Behav. Neurosci.*, *115*, 26–32.
- Wiltgen, B. J., Sanders, M. J., Ferguson, C., Homanics, G. E., & Fanselow, M. S. (2005). Trace fear conditioning is enhanced in mice lacking the  $\alpha$  subunit of the GABA A. *Learn Mem.*, *12*, 327–333.
- Zhang, X., Beaulieu, J. M., Sotnikova, T. D., Gainetdinov, R. R. & Caron, M. G. (2004). Tryptophan hydroxylase-2 controls brain serotonin synthesis. *Science*, *305*, 217.
- Zhang, X., Gainetdinov, P. R., Beaulieu, J. M., Sotnikova, T. D., Burch, L. H., et. al. (2005). Loss-of-function mutation in tryptophan hydroxylase-2 identified in unipolar major depression. *Neuron*, *45*, 11–16.
- Zorawski, M., & Killcross, S. (2002). Posttraining glucocorticoid receptor agonist enhances memory in appetitive and aversive Pavlovian discrete-cue conditioning paradigms. *Neurobiol. Learn Mem.*, *78*, 458–64.

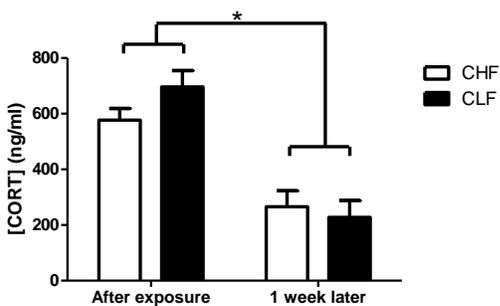
## Figures

**Fig. 1.** Mean ( $\pm$ SEM) corticosterone levels (ng/mL) collected from animals immediately after fear conditioning test (“after exposure” group) and without previous exposure to test (“1 week later” group) from both lines of S5 generation. (\*) Represents significant difference between groups ( $p < 0.0001$ ).

**Fig. 2.** Mean ( $\pm$ SEM) percent time spent in open arms(A), number of entries in open arms(B), number of head dips (C), number of open arm end-exploration (D), time of risk assessment behavior (E) and number of entries in the closed arms (F) of S9F1 male and female rats in the EPM. (\*) Represents sex effects ( $p < 0.05$ ) and (#) represent line effects ( $p < 0.05$ ).

**Fig. 3.** Mean ( $\pm$ SEM) percent time immobile (A) and latency to immobility (B) in the forced swim test in S9F1 male and females.

**Fig. 4.** Mean  $\pm$ S.E.M. of S9F1 male and female animals in the second day of context fear conditioning test. (\*) Represents sex effects ( $p < 0.01$ ) and (#) represent line effects ( $p < 0.05$ ).



**Fig. 1**

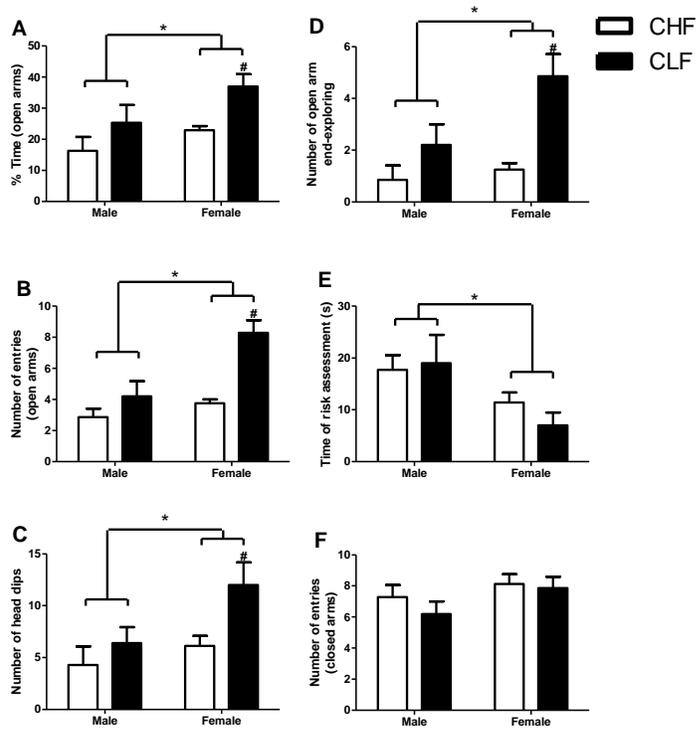


Fig. 2

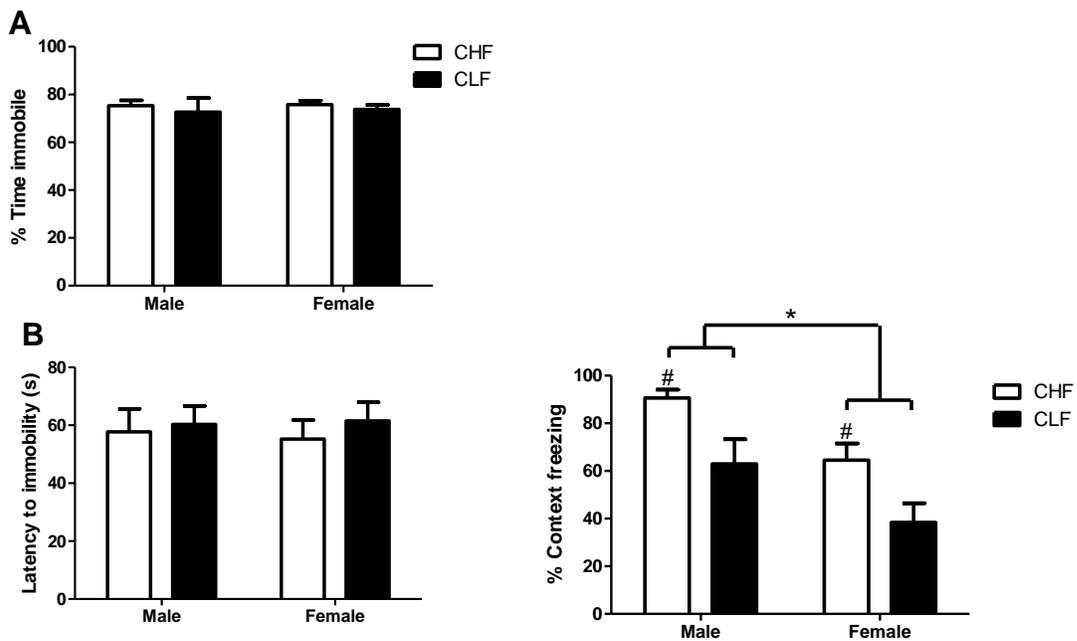


Fig. 3

Fig. 4

## ANEXO 2

O artigo anexado abaixo refere-se aos dados coletados no experimento II e está sendo concluído para ser submetido à revista científica Behavior Brain Research

### Title: Effects of Social Separation on Depression, Anxiety, Learning and Memory in the 5XFAD Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease.

Salviano, M.F.<sup>1,2</sup>, Goad, B.<sup>1</sup>, Gunn, R.<sup>1</sup>, Brown, R.E.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Psychology and Neuroscience, Dalhousie University, Halifax, Canada

<sup>2</sup> Department of Psychology, University of Brasília, Brazil

#### Abstract

In humans, loneliness increases the risk of depression and of late-life dementia (Wilson *et al*, 2007, Arch. Gen. Psychiatry 64, 234-40). Social isolation also increases depressive-like behavior in female C57BL/6J mice (Martin & Brown, 2010, Behav. Brain Res. 207, 196-207). The aim of this study was to investigate the effects of social separation on behavior of male and female 5XFAD mice and their B6SJL wildtype (WT) littermates. Mice were housed in same-sex littermate groups until five months of age and then half were separated for one month before testing. All animals were submitted to a test battery which examined their response to handling (wildness rating), anxiety-like behavior (elevated plus maze and light-dark box), behavioral despair (forced swim test and tail suspension test) and learning and memory (Morris water maze and cued and context fear conditioning). Our results indicate that social separation, especially between female mice, caused body weight loss, increased wildness scores and decreased depression-like behavior but did not affect measures of anxiety or locomotion activity. Furthermore, separated females showed an impaired context conditioned fear memory and a minor impaired visuo-spatial memory. The 5xFAD mice had impaired anxiety and depressive-like behaviors compared to their wildtype littermates and impaired cued conditioned fear memory but 5xFAD separated mice were not more sensitive to the effects of separation than their wildtype littermates. Females were more sensitive to the effects of social separation than males. Several sex differences are discussed in the study. From these results we conclude that the period of one month of social separation was not enough to induce social despair but it did affected spatial memory and aversive memory of female mice.

Keywords: genetic animal model, Alzheimer disease, social isolation, 5xFAD

## Introduction

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder which causes impairments in cognitive and executive function, with deficits occurring in most forms of memory (Reitz et al., 2011). Patients also show distractibility, increased irritability and altered emotionality (Chiu et al., 2004; Aalten et al., 2003; Lawlor & Bhriain, 2001). AD is a major cause of dementia in people aged over 60 and it is estimated that dementia affects over 24 million people. This number may double every 20 years, assuming no changes in mortality and no effective prevention strategies or curative treatments (Ferri et al., 2005).

The main cause commonly accepted for AD is the amyloid cascade hypothesis, as the deposition of  $\beta$ -amyloid plaques is the initial trigger that leads to the formation of senile plaques and neurofibrillary tangles, neuronal cell death and dementia (Small & McLean, 1999). However, new studies have contested this hypothesis based on inconclusive clinical trials targeting components of the amyloid pathway (reviewed in Reitz, 2012). Genetic approaches have identified numerous familial AD (FAD) mutations located in the APP gene, which results in an increased  $\beta$ -amyloid production. The PSEN1 gene encodes a membrane protein, presenilin (PS1), and has also been shown to be involved in  $\beta$ -amyloid production (Bertram, 2009). These data have supported the development of mouse models of FAD, as transgenic mice that express the mutant genes for APP and presenilin (PS1) show  $\beta$ -amyloid plaque development similar to AD pathology (Ohno et al, 2006). Although none of the AD transgenic models fully replicates the human disease, several studies have been reporting behavioral changes of transgenic mice that can be correlated with clinical symptoms of AD, such as early memory impairment in visual-spatial tests (Stover & Brown, 2012; O'Leary & Brown, 2009) and decreased fear conditioned memory (Jacobsen et al., 2006).

The 5XFAD transgenic mouse, developed as a model of one of the most aggressive and early onset forms of AD, overexpresses both APP and PS1 genes. These mice exhibit pathological characteristics and behavioural deficits that resemble Alzheimer's disease. As early as two months of age, amyloid plaques are visible in the brains of 5XFAD mice (Kimura & Ohno, 2009). Between 4 and 6 months of age, the 5XFAD mice experience an increase in brain A $\beta$  levels (Kimura & Ohno, 2009; Jawhar et al, 2012). Behaviourally, 5XFAD mice show deficits in hippocampus –dependant and –independent memory tasks. By 6 months of age, impairments are measurable in the Morris water maze (Ohno et al, 2006), trace fear conditioning (Ohno et al, 2006), contextual fear conditioning (Kimura & Ohno, 2009; Devi & Ohno, 2010) and spontaneous alternation in the Y-maze (Oakley et al, 2006). By 9 months of age, 5xHAD mice showed impaired conditioned taste aversion when compared to wildtype animals

The exact cause of AD has still not been determined, but many risk factors have been proposed. Although a range of environmental exposures have been linked to AD, well-replicated and meta-analyses' evidence for the involvement of clear environmental factors in AD is sparse. Recent studies, however, have shown that dietary factors, such as exposure to a Mediterranean diet, fish and high omega-3 diets, exercise, cigarette smoking, head trauma, infections, systemic inflammation, years of education and metal and pesticide exposure can significantly alter an individual's risk of developing AD (Chouliaras et al, 2010; Bilbul & Schipper, 2011). In addition, another important non-genetic risk factor for AD is loneliness, a debilitating psychological condition. In humans, loneliness has been associated with numerous physiological and psychological outcomes such as increased vascular resistance, elevated blood pressure, altered immunity, increased hypothalamic pituitary adrenocortical activity, personality disorders and depression (Cacioppo & Hawkley, 2009).

Loneliness can be modelled in rodents using periods of social isolation in group housed animals. Social isolation has neural, endocrine and behavioural consequences in rodents (Brenes et al, 2008; Brown et al., 2011). Social isolation in rats results in significantly lower norepinephrine concentration and a higher serotonin turnover rate than rats who were group housed (Brenes et al, 2008). These findings correlate with studies in humans with depression who show increased glucocorticoid, increased

serotonin and decreased norepinephrine levels (Sierksma et al, 2010). Behavioral effects of social isolation include increased locomotor activity and anxiety (Kabuki et al, 2009), increased depressive-like behaviour (Martin & Brown, 2010), deficits in associative memory (Chida et al, 2006) and increased aggressiveness (Vloeberghs et al, 2006). Several behaviour and neurochemical effects of social isolation depend on the age and on duration of isolation (Miura et al, 2002; Martin & Brown, 2010)

Social isolation in mice is useful as a model for loneliness and depression in humans. Loneliness is related to depression in humans and social separation produces depressive-like behaviours in mice (Martin & Brown, 2010). Furthermore, administration of antidepressants reduces depressive-like behaviour and aggression in isolated mice (Brown et al., 2011; Koike et al, 2009).

There is conflicting data on the effect of loneliness in mouse models of AD. Some studies have found that loneliness increased impairments in spatial memory tasks, increased anxiety and hyperactivity, decreased hippocampal cell proliferation and increased  $\beta$ -amyloid depositis and neuron degeneration in different mouse models of Alzheimer's disease (Dong et al, 2004). Others have shown no effect of social isolation for six months, as 3XTgAD mice, harbouring three FAD mutations, did not show exacerbated A $\beta$  plaques in the hippocampus and no spatial memory deficits analyzed in water maze (Pietro Paolo et al, 2009). The findings on the effect of social isolation on  $\beta$ -amyloid deposition may differ due to the different mouse models used and the different social isolation period. The 3XTgAD mouse model does not show the same degree of cognitive impairment on spatial learning tasks compared to the Tg2576 mouse model (Dong et al, 2004; Billings et al, 2005). Also the 3XTgAD mouse model shows amyloid pathology around six months of age while the Tg2576 mouse shows amyloid deposition around nine months of age (Billings et al, 2005). There are no investigations about social isolation in the 5xFAD genetic model in the literature.

The present study was conducted to address the conflicting findings regarding the effects of social isolation and whether it causes behavioural deficits in transgenic mouse models of Alzheimer's disease. For this study, the behaviour of 5XFAD mice, a mouse model of AD that demonstrates early amyloid deposition, was compared to wildtype littermates. The effects of social isolation were evaluated using body weight measures and a battery of seven behavioral tests, which examined responses to handling (wildness rating), anxiety-like behavior (elevated plus maze and light-dark box), behavioural despair (forced swim test and tail suspension test) and learning and memory (Morris water maze and cued and context fear conditioning).

## **Methods**

### **Subjects**

Male B6SJL-Tg(APP<sup>S</sup>wF<sup>L</sup>on,PSEN1\*<sup>M146L</sup>\*<sup>L286V</sup>)6799Vas/J (5XFAD) (JAX stock#006554) mice and female wildtype mice were purchased from Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME) for breeding. The mice used in the experiment were from the resultant litters born in our lab and weaned at 21 days of age. 5XFAD mice co-overexpress human APP695 with the Swedish (K670N, M671L), Florida (I716V), and London (V717I) mutations and human PS1 with two mutations (M146L and L286V). Genotyping was performed by PCR analysis of ear punch samples by Dr. Christopher Sinal (Pharmacology Department, Dalhousie University). Mice were kept in clear plastic cages (18.8 cm X 28.0 cm X 12.5 cm) with wood shavings for bedding and filter top. Mice were given ad libitum access to Purina rodent chow #5001 and tap water. The colony room was kept on a 12:12 reversed light: dark cycle with lights off at 9:30 AM and constant temperature ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ).

## **Housing conditions**

After weaning (22 days of age), mice were housed in groups of same sex littermates of 2-4, and at 20 weeks of age, the mice were weighed and put into different housing condition. Half of the mice (5xFAD: 8 males + 8 females; Wt: 10 males + 10 females) were placed into individual housing. The other half of the mice (5xFAD: 10 males + 9 females; Wt: 8 males + 9 females) remained in the same social groups. Separated mice were kept in the individual housing condition for thirty days. This duration was chosen based on the results of Martin & Brown (2010) that after thirty days of social isolation mice demonstrated behavioral despair (. After 30 days of differential housing, mice were weighed again, scored for wildness and behavioral testing began.

Behavior was analyzed in the elevated plus maze, light/dark box, forced swim test, tail suspension test, Morris water maze and cued and context fear conditioning in that order. Mice were divided into six groups based on three variables (sex, housing condition and genotype), so the experiments were conducted using a 2 X 2 X 2 completely randomized factorial design, with these variables as factors. Anxiety tests were conducted first in order to measure the subjects' baseline anxiety directly after separation and before they were repeatedly handled by the experimenter. All tests were completed over a one month period and all testing was done during the dark phase of the light/dark cycle. The experimenter was kept blind as to mouse genotype throughout testing. Mice were treated in accordance with the regulations set forth by the Canada Council on Animal Care, and the experimental protocol was approved by the Dalhousie University Committee on Animal Care.

## **Body Weights**

Mice were weighted once when they were put into isolation and again when testing began. The change in body weight over the on month period was used as a measure of depression, as it increases appetite (Romans et al, 2007; Martin & Brown, 2010).

## **Wildness Rating**

When mice were weighed after the 30 day separation period, they were scored for wildness using the rating scale developed by Wahlsten et al (2003) to see if isolation had an effect on temperament and reaction to touch. Following isolation some rodents display increased aggressiveness (Fone & Porkess, 2008) and the wildness rating was used to examine strain differences and the effect of social isolation on resistance to handling and aggressive behavior when picked up. The wildness scale had ratings from 0 to 6 and was dependent on how the mouse reacted to being handled. A "0" on the scale indicated minimal resistance to handling, while a "6" on the scale was when the mouse escaped handling, jumped form the cage e ran around the room.

## **Elevated Plus Maze**

The elevated plus maze is a test of anxiety and exploration in rats and mice (Cruz et al., 1994). The apparatus was made of Plexiglas with painted gray floors and clear walls and consisted of two open arms (30 X 5 cm) and two perpendicular closed arms (30 X 5 X 15 cm) connected by a central square (5 X 5 cm). The maze was elevated 45 cm from the floor, and a rim of Plexiglas (1 cm high) surrounded the perimeter of the open arms to minimize falling from the arms. Each mouse was placed in the central area facing an open arm and allowed to freely explore the maze for 5 min. The maze was cleaned with a solution of 70% ethyl alcohol to eliminate lingering olfactory cues and dried between subjects. The experimental session was illuminated by a bright light (70W) and recorded by a video camera located 1m from the maze. For each animal, the frequency and duration of

entries into the open- and closed-arms, head dips, stretch attend postures, grooming, line crosses, freezing and rearing were recorded. Stretch attend postures were defined as stretching the body before returning to its normal position and line crosses were recorded every time the four paws of the animal crossed a line marked in the middle of each arm of the apparatus.

### **Light Dark Transition Box**

The light dark transition box measures unconditioned anxiety and exploratory behavior in mice (Bourin & Hascoët, 2003). The light dark box (45 X 27 X 27 cm) was made of Plexiglas and was divided into two compartments. The small dark compartment (18 X 27 cm) was painted black, while the larger light component (27 X 27cm) was made of clear Plexiglas. The dark compartment was covered with a lid of black Plexiglas and separated from the light compartment by a door (7.5 X 7.5 cm) at floor level in the center of the wall. A 60-Watt bulb located 40 cm above the center of the light compartment provided bright illumination (640 lux, Sekonic Flashmate).

Using the test procedure validated by Costall et al. (1989) for anxiety sensitivity, mice were placed in the center of the light compartment facing the door and were allowed to explore the box for 5 min. Each mouse's behavior was scored by an experimenter sitting 1m from the apparatus using Hindsight (MS-DOS Version 1.5) and video-recorded for re-scoring. After the 5 min test, the mouse was returned to its home cage and the apparatus was thoroughly cleaned with 70% ethyl alcohol as a soiled L/D box removes the neophobia associated with the box (Bourin & Hascoët, 2003). Four behaviors were scored for each mouse: time (s) spent in the light and dark compartments, the number of transitions between the compartments, and the number of head pokes from the dark into the light compartment. The percentage of time spent in the light compartment was analyzed. Transitions were defined as the number of times the mouse passed into the opposite compartment with all four paws and head pokes were defined when only the head and forefeet of a mouse in the dark compartment passed into the light compartment and then retreated back into the dark compartment.

### **Forced Swim Test**

The forced swim test measures immobility to an inescapable situation and was performed using the method of Porsolt et al. (1977). A 2-L glass beaker was filled to 13 cm with tap water (1600 mL) and allowed to sit overnight to achieve room temperature ( $22 \pm 2$  °C). The water was deep enough so that mice were not able to touch the bottom of the beaker with their tails. Each mouse was tested in one 6 min trial in which the number of bouts of immobility and the duration of immobility in seconds were scored live using Hindsight for MS-DOS Version 1.5 and recorded by a video camera. The duration of immobility was then converted to a percentage of trial time. Immobility was defined as the cessation of all movements except those necessary to stay afloat, such as paddling lightly with one foot (Porsolt et al, 1997; Renard et al, 2003; Roy et al, 2005; Martin & Brown, 2011).

### **Tail Suspension Test**

The tail suspension test measures the responsiveness to restraint. In this test, the mouse was attached by the tail, using Scotch Brand Super Tape, to an aluminum strip ( $11.5 \times 2.2 \times 0.15$  cm) suspended vertically from a Med Associates test apparatus (St. Albans, VT, USA), which consisted of a box ( $32 \times 33 \times 33$  cm) open on one side to allow the observer to view the mice and for videotaping. Each mouse was tested in a single 6-min trial and the duration of immobility, defined as the cessation of all movements, was recorded using Hindsight for MS-DOS Version 1.5 and converted to a percentage of trial time. The number of bouts of immobility were also recorded by the observer and all trials were recorded with a video camera for re-scoring later.

### **Morris Water Maze**

The water maze is used to measure visio-spatial reference memory (Morris, 1984) and consisted of a circular polypropylene pool (110 cm in diameter and 20 cm high) that was filled to a depth of 14 cm with room-temperature tap water ( $22 \pm 2$  °C), as described in Brown and Wong (2007). The water was made opaque with the addition of 500 ml of nontoxic white liquid tempera paint (Schola, Marieville, Quebec) to ensure camouflage of the escape platform. The escape platform was constructed from a Plexiglas cylinder (13.75 cm high, 9 cm in diameter), which was painted white. The water level was 0.5 cm above the platform, making it invisible. The platform had a red top and colorful flag that were added for visible platform trials. The water maze was located in a room (5.2 m  $\times$  2.4 m) with posters and furniture around the walls, which served as extra-maze visual cues. The performance of mice was scored using a video camera-based computer tracking system (Watermaze, Actimetrics, Inc., Evanston, IL) on an IBM PC computer, with the camera fixed to the ceiling 2.1 m above the pool. During testing, the room was dimly lit with diffuse white light (30 lx). Mice were tested in the Morris water maze in four phases: acquisition, reversal, probe trial and visible platform trial. During acquisition (4 trials/day for 3 days), mice were trained to swim to a hidden platform that was located in the South-west quadrant. Each mouse was removed from its holding cage using a plastic container and released from a randomly assigned start location (East, North, South or West). If the mouse did not find the platform within 60 s, it was guided to the platform and allowed to stay on it for approximately 10 s. The inter-trial interval was approximately 5 min. During reversal training (4 trials/day for 3 days) the platform was moved to the opposite quadrant (North-east) and the same procedures described for acquisition training was used. On day 7, mice were tested for spatial memory in a 60 s probe trial with no platform present and on day 8 mice were tested (four trials) using a visible platform, which was placed in the South-east quadrant.

### **Trace Cued and Contextual fear conditioning**

Cued and contextual fear conditioning memory were tested in a Med Associates (St. Albans, VT, USA) fear conditioning apparatus (30.5  $\times$  24.1  $\times$  21.0 cm), which had a speaker attached to one side. The speaker was connected to a computer running Freeze-frame software (Actimetrics) and delivered the auditory cue (CS), a 30 s, 80 dB, 1000 Hz tone. The test chamber was connected to a shocker programmed to deliver a 2 s, 0.5 mA shock (US). The fear testing chamber was placed within a sound-attenuating box (55.9  $\times$  38.1  $\times$  35.6 cm) and a video camera was placed outside this box to allow scoring of mouse activity by the experimenter. Before each test day, the apparatus was manually calibrated to ensure that the shocker was administering shocks at the correct current of 0.5 mA.

Mice were brought into the lab room one at a time. The mouse was placed into the fear conditioning chamber and the Freezeframe program began the session. During all test trials, freezing behaviour was considered as the cessation of all movement apart from breathing and it was recorded by an experimenter using a 10 second time sampling method. The procedure consisted of two phases: training and testing. During training, the conditioned stimulus (CS) and unconditioned stimulus (US) were separated by a trace interval of twenty seconds. Training occurred on day 1 and consisted of a fourteen minute trial. Presentation of the CS and US occurred four times during the trial. Mice were given two minutes to explore the apparatus before the first presentation occurred. Each presentation consisted of a thirty second tone, followed by a twenty second trace interval and then presentation of a 2 second foot shock. The foot shock was followed by a two minute interval after which, the CS and US presentation occurred again.

Memory testing occurred on days 2 and 3. Mice were divided into two groups; those tested in context first and those tested with cue first. The division occurred to counterbalance test order. In the context test mice were individually placed back into the training chamber for five minutes and freezing behaviour was recorded. The cue test occurred in a new chamber where the tone was presented. The new chamber had a Plexiglass floor and was scented with pure orange extract (Club House). A

speaker, attached to a computer running Freezeframe software, was located on one side of the chamber. The cued test was 7.5 minutes: a 3 minute blank interval followed by a 3-minute long, 80 dB tone. The mouse was left in the chamber for 1.5 minutes after the tone was finished. On the third day groups were switched so that the group previously tested in context were tested with cue and those previously tested with cue were tested with context.

### **Statistical Analyses**

Data was analyzed using StatView V5.01 (SAS Instruments Inc.). The three factors (genotype, sex and housing condition) were compared using a Three-Way ANOVA. Post Hoc tests were used to examine analysis with significant interactions, using Two-Way ANOVA (for two factor comparison) or t-Test (for one factor comparison). Only significant interaction effects are reported.

## **Results**

### **Body Weights**

Wildtype and transgenic males weighed more than females in both the grouped ( $F(1,32)=87.463$ ,  $p<0.0001$ ) and separated ( $F(1,32)=144.523$ ,  $p<0.0001$ ) conditions (Fig. 1A and 1B). Comparing the animals weight before and after the separation period, the separated female mice lost weight after one month of social isolation ( $F(1,32)=7.592$ ,  $p<0.01$ ), but males did not ( $F(1,32)<1$ ) (Figure 1C). There was no effect of genotype ( $F(1,64)<1$ ) in the weight difference before and after the separation period (Fig. 1C).

### **Wildness Rating**

Separated mice had a higher wildness rating than grouped mice ( $F(1,64)=15.915$ ,  $p<0.001$ ; Fig. 2) and there was a significant sex by genotype interaction ( $F(1,64)=4.169$ ,  $p<0.05$ ). Socially isolated females, both wildtype and 5xFAD, had significantly higher wildness ratings than group housed females ( $F(1,32)=15.561$ ,  $p<0.001$ ). An independent-samples t-test showed that separated wildtype males had a significantly higher wildness score than grouped wildtype males ( $t(16)=3.170$ ,  $p<0.01$ ) and a paired-samples t-test showed that grouped 5xFAD males had a higher wildness score than grouped wildtype males ( $t(7)=-2.434$ ,  $p<0.05$ ).

### **Elevated Plus Maze**

One transgenic separated female mouse was not used in analysis because it fell from the apparatus. There was no significant difference between separated and group housed mice in the percent time spent in the open arms ( $F(1,63) < 1.00$ ; Fig. 3A), or between male and female mice ( $F(1, 63) < 1.00$ ), but the transgenic mice spent significantly more time in the open arms than the wildtype mice ( $F(1,63)=16.318$ ,  $p<0.0001$ ), which indicates less anxiety in the transgenic mice. No differences in the number of line crossings were found between housing conditions ( $F(1,63) < 1.00$ ), genotypes ( $F(1,63) < 1.00$ ) or sexes ( $F(1,63) = 2.886$ ,  $p>0.05$ ; Fig. 3B), which indicates no differences in locomotor activity. A post-hoc analysis showed that separated wildtype male mice had a higher number of line crossings than group housed mice ( $t(16)=2.452$ ,  $p<0.05$ ). No differences in the stretch attend postures were found between housing conditions ( $F(1,63) < 1.00$ ), genotypes ( $F(1,63)=1.569$ ,  $p>0.05$ ) or sexes ( $F(1,63) = 2.914$ ,  $p>0.05$ ; Fig. 3C).

There were no differences between housing conditions ( $F(1,63)=2.312$ ,  $p>0.05$ ; Fig. 3D), genotypes ( $F(1,63)<1.00$ ) or sexes ( $F(1,63)=2.739$ ,  $p>0.05$ ) in time spent grooming, but separated wildtype male mice spent less time grooming than group housed mice ( $t(16)=-2.978$ ,  $p<0.01$ ). There was no significant difference between separated and group housed mice in the time spent freezing ( $F(1,63)<1.00$ ; Fig. 3E) or between male and female mice ( $F(1,63)=2.666$ ,  $p>0.05$ ), but the transgenic mice froze less than the wildtype mice ( $F(1,63)=5.045$ ,  $p<0.05$ ), which indicates low anxiety in these mice. There was no significant difference between separated and group housed mice in the number of head dips ( $F(1,63)<1.00$ ; Fig. 3F) or between male and female mice ( $F(1,63)<1.00$ ), but the transgenic male mice had a higher number of head dips than the wildtype male mice ( $F(1,63)=4.954$ ,  $p<0.05$ ), which indicates less anxiety in these mice. Finally, there were no differences between housing conditions ( $F(1,63)<1.00$ ; Fig. 3G), genotypes ( $F(1,63)=2.711$ ,  $p>0.05$ ) or sexes ( $F(1,63)<1.00$ ) in the frequency of rears. There was a significant genotype effect between female mice ( $F(1,31)=5.848$ ,  $p<0.05$ ), as wildtype female mice had higher number of rears than transgenic female mice.

### **Light Dark Transition Box**

There was no significant effect of housing condition ( $F(1,64)<1.00$ ; Fig. 4A), genotype ( $F(1,64)<1.00$ ) or sex difference ( $F(1,64)<1.00$ ) in the percent time spent in the light compartment and no significant interactions. Likewise, there were no significant effect of housing condition ( $F(1,64)<1.00$ ; Fig. 4B), genotype ( $F(1,64)<1.00$ ) or sex ( $F(1,64)<1.00$ ) in the number of head pokes. The 5xFAD female mice showed significantly fewer transitions between the light and dark compartments than the wildtype female mice ( $F(1,32)=15.867$ ,  $p<0.001$ ; Fig. 4C) but there was no difference in transitions between males ( $F(1,32)=1.577$ ,  $p>0.05$ ).

### **Forced Swim Test**

No significant differences in time spent immobile were found between housing conditions ( $F(1,64)<1.00$ ; Fig. 5A) but 5xFAD spent less time immobile than wildtype mice ( $F(1,64)=12.797$ ,  $p<0.001$ ) and female mice spent significantly less time immobile than males ( $F(1,64)=16.763$ ,  $p<0.0001$ ). There was a significant sex by genotype interaction ( $F(1,64)=6.585$ ,  $p<0.05$ ) and a two-way ANOVA showed that female 5xFAD spent less time immobile than female wildtype mice ( $F(1,32)=15.644$ ,  $p<0.001$ ) and female 5xFAD mice spent less time immobile than males ( $F(1,32)=46.073$ ,  $p<0.0001$ ).

There was no difference between housing condition ( $F(1,64)=1.410$ ,  $p>0.05$ ; Fig. 5B) or genotypes ( $F(1,64)=2.742$ ,  $p>0.05$ ) in the latency to become immobile, but female mice had a longer latency to become immobile than males ( $F(1,64)=16.182$ ,  $p<0.001$ ). Female 5xFAD mice had a longer latency to immobility than male 5xFAD ( $F(1,32)=15.400$ ,  $p<0.001$ ).

There was no difference between housing condition ( $F(1,64)=3.462$ ,  $p=0.0674$ ; Fig. 5C) or genotypes ( $F(1,64)=1.982$ ,  $p<0.05$ ) in bouts of immobility, but female mice had fewer bouts of immobility than males ( $F(1,64)=22.968$ ,  $p<0.0001$ ). Male 5xFAD mice had more bouts of immobility than wildtype males ( $F(1,32)=6.711$ ,  $p<0.05$ ).

### **Tail Suspension Test**

One female wildtype separated mouse was deleted from the TST analysis because it reached out and grabbed the aluminum strip, compromising the experiment. We found no significant differences between housing condition ( $F(1,63)=3.416$ ,  $p=0.069$ ; Fig. 5D) or sex ( $F(1,63)=1.906$ ,  $p<0.05$ ) in the time spent immobile in the tail suspension test, but wildtype mice spent significantly more time immobile than 5xFAD ( $F(1,63)=23.258$ ,  $p<0.0001$ ). Significant sex by genotype ( $F(1,63)=4.534$ ,  $p<0.05$ )

and sex by housing ( $F(1,63)=8.020$ ,  $p<0.01$ ) interactions were found. A two-way ANOVA split by sex showed that male 5xFAD mice spent less time immobile than male wildtype mice ( $F(1,32)=25.269$ ,  $p<0.0001$ ) and a t-test showed that wildtype separated female mice spent less time immobile than wildtype group housed female mice ( $t(16)=-3.139$ ,  $p<0.01$ ).

There was no housing condition ( $F(1,63)=1.499$ ,  $p>0.05$ ; Fig. 5E) or sex effect ( $F(1,63)<1.00$ ) on the latency to become immobile, but wildtype mice had a longer latency to immobility than 5xFAD ( $F(1,63)=7.207$ ,  $p<0.01$ ). A two-way ANOVA split by sex showed that the genotype effect was significant between female mice ( $F(1,31)=7.488$ ,  $p<0.05$ ) but not in males ( $F(1,31)=1.154$ ,  $p>0.05$ ).

There was no housing condition ( $F(1,63)=3.636$ ,  $p=0.061$ ; Fig. 5F) or sex effect ( $F(1,63)<1.00$ ) on immobile bouts, but wildtype mice had fewer immobile bouts than 5xFAD ( $F(1,63)=7.911$ ,  $p<0.01$ ). A two-way ANOVA split by sex showed that the genotype effect was significant between female mice ( $F(1,31)=6.076$ ,  $p<0.05$ ) but not in males ( $F(1,31)=1.899$ ,  $p>0.05$ ).

### **Morris Water Maze**

There was no difference in latency to reach the platform in acquisition and reversal trials between separated and group-housed mice ( $F(1,64)<1.00$ ; Fig. 6A) or between wildtype and transgenic mice ( $F(1,64)<1.00$ ), but female mice had a significantly longer latency to reach the platform than males ( $F(1,64)=4.554$ ,  $p<0.05$ ). All subjects showed a significant decrease in latency to reach the platform over days in acquisition and reversal learning ( $F(5,320)=50.012$ ,  $p<0.0001$ ).

Distance swam to find the hidden platform significantly decreased over acquisition and reversal trials ( $F(5,320)=22.802$ ,  $p=0.0001$ ; Fig. 6B). There was no significant difference between separated and group housed mice ( $F(1,64)<1.00$ ) or between wildtype and transgenic mice ( $F(1,64)<1.00$ ), but female mice swam significantly longer distances in acquisition and reversal trials than males ( $F(1,64)=14.707$ ,  $p<0.001$ ). Mean swim speed changed over days ( $F(5,320)=6.238$ ,  $p<0.0001$ ; Fig. 6C), but a two-way ANOVA split by sex showed that this difference was not significant between female mice ( $F(5,160)=2.085$ ,  $p=0.070$ ). No significant differences were found between separated and group housed mice ( $F(1,64)=3.823$ ,  $p=0.0549$ ) or between wildtype and transgenic mice ( $F(1,64)=1.148$ ,  $p>0.05$ ), but female mice swam faster than males in acquisition and reversal trials ( $F(1,64)=6.121$ ,  $p<0.05$ ). A two-way ANOVA showed that the separated males swam faster than group housed males ( $F(1,32)=4.688$ ,  $p<0.05$ ). Over acquisition and reversal trials, percent thigmotaxis significantly decreased ( $F(5,320)=56.080$ ,  $p<0.001$ ; Fig. 6D). There was no significant difference in percent thigmotaxis between separated and group housed mice ( $F(1,64)<1.00$ ), between wildtype and transgenic mice ( $F(1,64)=1.877$ ,  $p>0.05$ ) or between male and females ( $F(1,64)=2.292$ ,  $p>0.05$ ).

In the probe trial of memory test, there was no significant difference in the percent time spent in the correct quadrant between separated and group housed mice ( $F(1,64)<1.00$ ; Fig. 6E) or between wildtype and transgenic mice ( $F(1,64)<1.00$ ), but there was a trend for male mice spend more percent time in the correct quadrant than females ( $F(1,64)=3.258$ ,  $p=0.0758$ ). All mice spent significantly greater time in the correct quadrant than would be expected by chance ( $t(71)=9.787$ ,  $p<0.0001$ , hypothesized mean = 25). There was no significant difference in the correct number of annulus crossings between separated and group housed mice ( $F(1,64)<1.00$ ; Fig. 6F) and between wildtype and transgenic mice in the probe trial ( $F(1,64)<1.00$ ), but males wildtype mice had a higher number of correct annulus crossings than female wildtype mice ( $F(1,33)=8.519$ ,  $p<0.01$ ). There was no difference in the mean proximity to the correct annulus between separated and group housed mice in the probe trial ( $F(1,64)<1.00$ ; Fig. 6C), wildtype and transgenic mice ( $F(1,64)<1.00$ ) or between male and females ( $F(1,64)<1.00$ ), but there was a significant interaction between sex and housing condition ( $F(1,64)=6.078$ ,  $p<0.05$ ) as wildtype separated female mice swam farther from the platform annulus during the probe trial than group housed wildtype females ( $t(17)=2.316$ ,  $p<0.05$ ).

There was no significant difference in subjects' latencies to reach the visual platform between separated and group-housed mice ( $F(1, 64) < 1.00$ ; Fig. 6D) and between wildtype and transgenic mice ( $F(1,64) = 2.535$ ,  $p > 0.05$ ), but female mice took significantly longer to reach the visual platform than males ( $F(1,64) = 7.572$ ,  $p < 0.01$ ). A two-way ANOVA split by genotype showed that the sex difference on the latency to reach the visual platform was significant between wildtype mice ( $F(1,33) = 4.401$ ,  $p < 0.05$ ) but not in 5xFAD mice.

### **Trace Cued and Contextual Fear Conditioning**

Before the trace cued and contextual fear conditioning test was conducted one group housed transgenic male mouse died and during the training trial of one group housed transgenic female mouse did not receive the tone, so this animal was used only to investigate the context fear memory.

In context memory testing, separated mice had significantly lower percent freezing than group housed mice ( $F(1,63) = 4.502$ ,  $p < 0.05$ ; Fig. 7), but no significant differences were found between wildtype and transgenic mice ( $F(1,63) < 1.00$ ) or between male and female mice ( $F(1,63) < 1.00$ ). A post-hoc analysis between wildtype female mice showed that the separated mice trend to freeze less than group housed mice ( $t(17) = -1.867$ ,  $p = 0.079$ ).

The cued memory test was divided into three sections: before (pre-CS), during (CS) and after (post-CS) the tone presentation. A three-way ANOVA with repeated measures showed that the mice behavior in the three sections of the test were sex dependent ( $F(2,124) = 3.198$ ,  $p < 0.05$ ), so all analysis were done separately by sex. In males, there was not a significant difference between separated and group housed mice in percent freezing ( $F(1,31) < 1.00$ ; Fig. 8A), but there was a significant difference between wildtype and transgenic mice ( $F(1,31) = 4.185$ ,  $p < 0.05$ ), as transgenic mice froze more than the wildtype mice. A post-hoc analysis showed that the differences between genotypes in male mice were significant both before ( $F(1,31) = 6.371$ ,  $p < 0.05$ ) and after ( $F(1,31) = 6.369$ ,  $p < 0.05$ ) the presentation of cue. In females, separated mice froze significantly less than group housed mice ( $F(1,31) = 6.039$ ,  $p < 0.05$ ; Fig. 8B), but there was no significant difference in percent freezing between wildtype and transgenic mice ( $F(1,31) = 1.339$ ,  $p > 0.05$ ). A post-hoc analysis showed that the transgenic mice froze more than the wildtype female mice before the cue presentation ( $F(1,31) = 5.024$ ,  $p < 0.05$ ) and a t-test showed that the differences between housing conditions in female mice were significant only between wildtype female mice during the presentation of cue ( $t(17) = -2.801$ ,  $p < 0.05$ ). Comparing the difference between the percent freezing during the cue presentation and the section before that, we found that males had a smaller difference than females ( $F(1,62) = 4.237$ ,  $p < 0.05$ ; Fig. 11C) and that transgenic mice had a shorter difference than wildtype mice ( $F(1,62) = 6.918$ ,  $p < 0.05$ ), which indicates a fear memory deficit in female and transgenic mice. A post hoc analysis showed that the genotype difference was significant between males ( $F(1,31) = 5.181$ ,  $p < 0.05$ ) but not between female and the separated wildtype female mice had a significant smaller difference than group housed wildtype female mice ( $t(17) = -2.247$ ,  $p < 0.05$ ).

### **Discussion**

Although the social separation affected depression-like behavior and cognitive tasks on mice, our results showed that transgenic separated mice were not more sensitive than their wildtype littermates. Table 1 summarizes the several effects of sex,

genotype and housing conditions found in the present study. Most of sex differences found were dependent on genotype or housing condition, so its effect will be discussed according to each factor.

### **Effect of social separation**

The genotypes and sexes tested were differently affected by social separation, as differences on wildness, behavior despair, spatial-memory and cued fear conditioned memory were affected in wildtype separated mice, but not in 5xFAD mice. Wildtype separated female mice had lower behavior despair, impaired spatial memory and impaired fear conditioned memory compared to group housed mice. Reduced contextual and cued fear memory and impaired spatial memory were found in a study that used female C57BL/6J mice single housed for 8 weeks (Kuleskaya et al., 2011). Chronic stressors, including social isolation, social intruder and chronic intermittent restraint stress, are associated with decreased hippocampal neurogenesis and volume, abnormalities in LTP and dendritic branching, decreased cued and contextual memory, and accelerated A $\beta$  plaque deposition and tau-phosphorylation relative to those in nonstressed controls (Dong et al., 2004; Srivareerat et al., 2009; Jeong et al., 2006; and Kunimoto et al., 2010). Dong et al. (2004), was the first study to show acceleration on memory impairment in young transgenic mice for AD induced by social isolation. Our results!!! However, another study that tested social isolation stress in the triple-transgenic mouse model of AD did not show early memory impairment or neurodegeneration in transgenic mice, similar to our results (Pietropaolo et al., 2009). The positive social isolation effect over behavioral deficits found by the previous studies mentioned might be related to the longer period of social isolation (from weaning to 6 months of age) or the strain used (Tg2576).

An alternative explanation for the absence of cognitive deficits in 5xFAD separated mice is that the loneliness is a risk factor for poor health and dementia, but only when it is associated with depression (Luanaigh & Lawlor, 2008). Our study did not show any indicative of behavior despair of 5xFAD mice, which might explain the predominant absence of social isolation effect on transgenic mice tested. In contrast of our expectations, female transgenic mice kept in individual housing for 1 month was less immobile than group housed female mice in the FST. It has already been shown that isolated rats spent less immobile time in the forced swimming test, although it was not statistically significant (Karim and Arslan, 2000). In another study, the isolated male mice, not the female ones, showed significantly less immobile time than the group-housed mice when they were isolated for 1 or 2 months (Guo et al., 2004). These results suggest that isolation could modify the despair behavior and sex difference, furthermore, might exist in such behavioral changes.

Long-term social isolation does lead to a number of neural, endocrine and behavioral abnormalities (Brain, 1975; Koike et al., 2009) including decreased exploratory behavior and learning and memory deficits, all of which together have been termed “the isolation syndrome” (Valzelli, 1973). Our data suggests a sex difference in the effect of social separation, as female mice behavior were more affected than males. Female mice separated for one month lost weight and showed higher reaction to manipulation, lower behavior despair, impaired spatial memory and impaired context and cued fear conditioned memory compared to group housed mice. No differences on anxiety tests were found. In males, the social separation had significant effect only on reaction to manipulation and motor activity on the Morris water maze. Females and males have different behavioral reactions to social isolation and the results in literature are controversial. While some studies show that male rodents are more easily affected by chronic stress (Pietropaolo et al., 2008; Guo et al., 2004; Weiss et al., 2004), others show no sex differences (Rodgers & Cole, 1993) or increased behavioral differences in females (Devi et al., 2010), as we did in the present study. This is, in part, explained by the different effect of the social isolation period and the age that the animals were separated (Brown et al., 2011). Early-life separation show a wide range of behavioral abnormalities in social behavior,

communication, cognitive, and emotional behavior, while short-term separation during adulthood appears to produce depressive-like and some anxiety-like abnormality (Martin & Brown, 2010; Palanza, 2001; Grippo et al., 2007; Brain, 1975).

### **Effect of genotype**

Many studies have demonstrated the fundamental importance of cognitive impairment of many AD animal models, but only a few studies have investigated the non-cognitive behavioral consequences of AD such as anxiety and depression, common neuropsychiatric features of AD (Chung and Cummings, 2000; Wilson et al, 2007). Transgenic mice exposed to the elevated plus-maze showed decreased time and frequency on the open arms, less freezing and more head dip behaviors than their wildtype, indicating a reduced level of anxiety. These same results were showed in 6 months old 5xFAD mice tested on elevated plus-maze and open field paradigm (Jawhar et al., 2012), as with hAPP/PS1 transgenic mouse model tested in elevated plus-maze (Pugh et al., 2007). Several AD mouse models showed different anxiety profiles, and most of them showing reduced anxiety of transgenic mice. Mouse models like Tg2576, PS1-A246E, PS2, bigenic APP<sup>swe</sup> + PS1/DeltaE9 and APP/PS1KI mice have shown reduced anxiety (Faure et al., 2011; Lalonde et al., 2003a; Lalonde et al., 2003b; Lalonde et al., 2005; Gil-Bea et al., 2007, Yuk et al., 2009), whereas other AD mouse models, such as APP23 did not demonstrate any change in their anxiety level (Lalonde et al., 2002). Some authors have been explaining these anxiolytic-like behaviors of transgenic models in terms of disinhibitory tendencies (Lalonde et al., 2003a; Ognibene et al., 2005).

In the present study, transgenic mice did not show differences in the number of line crossings of the elevated plus-maze or in the swim speed and distance traveled in the Morris water maze. However, female, but no male, transgenic mice had a decreased number in rear behavior in the elevated plus-maze and reduced transitions between compartments of the light dark box test. At 6 months of age, other study using the 5xFAD does not show considerable locomotor differences (Jawhar et al., 2012), while others transgenic models of AD seems to be more sensitive to differences in locomotor activity (Gil-Bea et al., 2007; Yuk et al., 2009), which might compromise anxiety behavior measures (Schellinck et al., 2010).

The investigation of behavior despair in the forced swim test and tail suspension test showed a genotype effect, as transgenic female mice spent less time immobile in the forced swim test and transgenic male mice spent less time immobile in tail suspension test when compared to wildtype mice. The current study provides to our knowledge the first evaluation of depression-like behavior with the forced swim and tail suspension assay used with the 5xFAD transgenic model of AD. Others AD-like models have been used to investigate behavior despair with APP<sup>swe</sup>/PS1 bigenic and R406W transgenic mice showing higher immobility time when exposed to a water basin with no possibility of escape (Egashira et al., 2005; Filali et al., 2009) and Tg2576 and single APP751SWE transgenic mice, as ours, showing a significant decrease in immobility time (Lalonde et al., 2005; Gil-Bea et al., 2007). Therefore, there are some contradictory data related to the hypothesis of increased depression-like behavior in the mice AD model (Filali et al., 2009).

An alternative hypothesis have been suggested that the anxiolytic (or disinhibitory) behavior and reduced immobility time in the forced swim test displayed by 5xFAD and Tg2576 mice is simply a consequence of locomotor hyperactivity of the animals at early ages (up to 9 months) (Gil-Bea et al., 2007). Locomotor activity have been suggested to be regulated by M1 muscarinic cholinergic receptors, as mice deficient in these receptors displayed a reduced behavioral deficit in a forced swim test that was likely to be affected by the general hyperactivity of this type of mouse (Miyakawa et al., 2001). To support this hypothesis, it has been shown a lack of M1 muscarinic cholinergic receptors M1 cortical and hippocampal M1 receptors in the brains of 8-month-old of Tg2576 AD transgenic mice (Apelt et al., 2002), which would explain the hyperactivity shown in others genetic models. It is important to note that hyperactivity shown in forced swim test does not necessarily affect locomotor activity

measured in other tests, e.g. the Morris water maze or rotarod test, as shown in the present study with 5xFAD mice and with Tg2576 in previous studies (Gil-Bea et al., 2007; Lalonde et al., 2003a).

Several studies using AD genetic models are showing impaired visuo-spatial memory tested in the Morris water maze and context fear conditioning memory, but not many have used 5xFAD transgenic mice. In contrast of our expectations, male and female transgenic mice did not show any statistical difference from wildtype mice in analyzed parameters of the Morris water maze nor in the context fear conditioning test. Impairments in hippocampus-dependent learning and memory tested in Morris water maze have been reported in 5XFAD mice with 4–6 months of age (Ohno et al, 2006) and in a recent study 7- 9-month-old female 5xFAD mice did not show any improvement after being trained 4 times per day for 9 days (Urano and Tohda, 2010). In the other hand our study showed a small impairment on aversive memory of 5xFAD male mice with a lower difference between the percent freezing during the cue presentation and the section before that in the trace cued memory test. We didn't find any impairment on context fear memory of 5xFAD mice at 6 months of age, as reported on previous studies (Ohno, 2009; Kimura and Ohno, 2009; Devi and Ohno, 2010). For our knowledge this is the first study to show no significant impairments in memory of 5xFAD transgenic mice at 6 months of age, which suggests more studies to point an accurate age for memory impairments of this transgenic mice strain.

In conclusion, the period of 1 month was not enough to induce depressive-like behavior in 5xFAD transgenic mice as expected. However separated female mice had several behavioral differences compared to group housed mice, such as weight loss, increased wildness score, reduced depressive-like behavior and impairments on learning and memory processes, but did not affected anxiety and locomotor measures. In general, the present results showed a higher female vulnerability to social separation compared to male mice. Transgenic mice showed reduced anxiety-like and depressive-like behaviors compared to wildtype, but more researches are needed to better understand this effect.

## References

- Aalten, P., de Vugt, M. E., Lousberg, R., Korten, E., Jaspers, N., Senden, B., et al. (2003). Behavioral problems in dementia: A factor analysis of the neuropsychiatric inventory. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, *15*, 99–105.
- Apelt, J., Kumar, A., & Schliebs, R. (2002). Impairment of cholinergic neurotransmission in adult and aged transgenic Tg2576 mouse brain expressing the Swedish mutation of human  $\beta$ -amyloid precursor protein. *Brain Research*, *953*, 17-30.
- Bertram, L. (2009). Alzheimer's disease genetics: current status and future perspectives. *International Review of Neurobiology*, *84*, 167-184.
- Bertram, L., McQueen, M. B., Mullin, K., Blacker, D., & Tanzi, R. E. (2007). Systematic meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies: The AlzGene database. *Nat. Genet.* *39*, 17–23.
- Bilbul, M., & Schipper, H. M. (2011). Risk profiles of Alzheimer disease. *Can. J. Neurol. Sci.*, *38*, 580–592.
- Billings, L., Oddo, S., Green, K., McGaugh, J., & LaFerla, F. (2005). Intraneuronal A $\beta$  causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. *Neuron*, *45*, 675-688.
- Bourin, M., & Hascoët, M. (2003). The mouse light/dark box test. *European Journal of Pharmacology*, *463* (1-3), 55-65
- Brain, P. (1975). What does individual housing mean to a mouse? *Life Sci.*, *16*, 187–200.

- Brenes, J., Rodriguez, O., & Fornaguera, J. (2008). Differential effect of environment enrichment and social isolation on depressive-like behaviour, spontaneous activity and serotonin and norepinephrine concentration in prefrontal cortex and ventral striatum. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, *89*, 85-93.
- Brown, R. E., & Wong, A. A. (2007). The influence of visual ability on learning and memory performance in 13 strains of mice. *Learn Mem*, *14*, 134-144
- Brown, R. E., Martin, A. L., & Gunn, R. K. (2011). Separation-Induced Depression in the Mouse. In: T. D. Gould (Ed.), *Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice: Characterization Using Behavioral Tests, Volume II, Neuromethods*, vol. 63. Springer Science.
- Cacioppo, J., & Hawkley, L. (2009). Perceived social isolation and cognition. *Trends in Cognitive Science*, *13*, 447-454.
- Cacioppo, J., Hughes, M., Waite, L., Hawkley, L., & Thisted, R. (2006). Loneliness as a specific risk factor for depressive symptoms in older adults: Cross-sectional and longitudinal analyses. *Psychology and Aging*, *21*, 140-151.
- Chida, Y., Sudo, N., Mori, J., & Kubo, C. (2006). Social isolation stress impairs passive avoidance learning in senescence-accelerated mouse (SAM). *Brain Research*, *1067*, 201-208.
- Chiu, Y. C., Algase, D., Whall, A., Liang, J., Liu, H. C., Lin, K. N., et al. (2004). Getting lost: Directed attention and executive functions in early Alzheimer's disease patients. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, *17*, 174-180.
- Chouliaras, L., Sierksma, A. S., Kenis, G., Prickaerts, J., Lemmens, M. A. M., Brasnjevic, I., et al. (2010). Gene-environment interaction research and transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Int J Alzheimers Dis*, 1-27.
- Chung, J. A., & Cummings, J. L. (2000). Neurobehavioral and neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease. *Neurol. Clin.*, *18*, 829-846.
- Cruz, A. P. M., Frei, F., & Graeff, F. G. (1994). Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacology, Biochemistry e Behavior*, *49*, 171-176.
- Cryan, J., & Mombereau, C. (2004). In search of a depressed mouse: utility of models for studying depression-related behaviour in genetically modified mice. *Molecular Psychiatry*, *9*, 326-357.
- Cryan, J., Mombereau, C., & Vassout, A. (2005). The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: Review of pharmacological and genetic studies in mice. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *29*, 571-625.
- Cryan, J., Valentino, R., & Lucki, I. (2005). Assessing substrates underlying the behavioural effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *29*, 547-569.
- Devi, L., & Ohno, M. (2010). Genetic reductions of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1 and amyloid-beta ameliorate impairment of conditioned taste aversion memory in 5XFAD Alzheimer's disease model mice. *Eur. J. Neurosci.*, *31*, 110-118.
- Dong, H., Goico, B., Martin, M., Csernansky, C., Bertchume, A., & Csernansky, J. (2004). Modulation of hippocampal cell proliferation, memory, and amyloid plaque deposition in APPsw (Tg2576) mutant mice by isolation stress. *Neuroscience*, *127*, 601-609.

- Dong, H., Yuede, C., Yoo, H., Martin, M., Deal, C., Mace, G., & Csernansky, J. (2008). Corticosterone and related receptor expression are associated with increased  $\beta$ -amyloid plaques in isolated Tg2576 mice. *Neuroscience*, *155*, 154-163.
- Faure, A., Verret, L., Bozon, B., El Tannir, N., Tayara, N., Ly, M., et al. (2011). Impaired neurogenesis, neuronal loss, and brain functional deficits in the APPxPS1-Ki mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, *32* (3), 407-418.
- Ferri, C. P., Prince, M., Brayne, C., Brodaty, H., Fratiglioni, L., Ganguli, M., et al. (2005). Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet*, *366*, 2112-2117.
- Filali, M., Lalonde, R., Rivest, S. (2009). Cognitive and non-cognitive behaviors in an APPswe/PS1 bigenic model of Alzheimer's disease. *Genes Brain Behav.*, *8*, 143-8.
- Fone, K., & Porkess, V. (2008). Behavioural and neurochemical effects of post-weaning social isolation in rodents- relevance to developmental neuropsychiatric disorders. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *32*, 1087-1102.
- Fone, K.C.F., & Porkess, V. (2008). Behavioural and neurochemical effects of post-weaning social isolation in rodents — relevance to developmental neuropsychiatric disorders. *Neurosci Biobehav Rev*, *32* (6), 1087-1102.
- Gil-Bea, F. J., Aisa, B., Schliebs, R., & Ramirez, M.J. (2007). Increase of locomotor activity underlying the behavioral disinhibition in tg2576 mice. *Behav. Neurosci.*, *121*, 340-344.
- Grippe, A. J., Cushing, B. S., Carter, S. (2007). Depression-like behavior and stressor-induced neuroendocrine activation in female prairie voles exposed to chronic social isolation. *Psychoneuroendocrinology*, *32*, 966-980.
- Guo, M., Wu, C. F., Liu, W., Yang, J. Y., & Chen, D. (2004). Sex difference in psychological behavior changes induced by long-term social isolation in mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *28* (1), 115-121.
- Hellemans, K., Benge, L., & Olmstead, M. (2004). Adolescent enrichment partially reverses the social isolation syndrome. *Development Brain Research*, *150*, 103-115.
- Huang, H. J., Liang, K. C., Ke, H. C., Chang, Y. Y., & Hsieh-Li, H. M. (2011). Long-term social isolation exacerbates the impairment of spatial working memory in APP/PS1 transgenic mice. *Brain Res*, *1371*, 150-160.
- Jacobsen, J. S., Wu, C. C., Redwine, J. M., Comery, T. A., Arias, R., Bowlby, M., et al. (2006). Early-onset behavioral and synaptic deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 5161-5166.
- Jawhar, S., Trawicka, A., Jenneckens, C., Bayer, T.A., Wirths, O. (2012). Motor deficits, neuron loss, and reduced anxiety coinciding with axonal degeneration and intraneuronal A $\beta$  aggregation in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, *33*, 196.e29-196.e40.
- Jeong, Y. H., Park, C. H., Yoo, J., et al. (2006). Chronic stress accelerates learning and memory impairments and increases amyloid deposition in APPV717I-CT100 transgenic mice, an Alzheimer's disease model. *FASEB J*, *20*(6), 729-31.
- Kabuki, Y., Mizobe, Y., Yamada, S., & Furuse, M. (2009). Dietary L-tyrosine alleviates the behavioural alterations induced by social isolation stress in mice. *Brain Research Bulletin*, *80*, 389-396.

- Karim, A., Arslan, M. I. (2000). Isolation modifies the behavioural response in rats. *Bangladesh Med. Res. Counc. Bull.* 26, 27–32.
- Kimura, R., & Ohno, M. (2009). Impairments in remote memory stabilization precede hippocampal synaptic and cognitive failures in 5XFAD Alzheimer mouse model. *Neurobiology of Disease*, 33, 229-235.
- Koike, H., Ibi, D., Mizoguchi, H., Nagai, T., Nitta, A., Takuma, K., et al. (2009). Behavioral abnormality and pharmacologic response in social isolation-reared mice. *Behavioural Brain Research*, 202, 114-121.
- Kuleshkaya, N., Rauvala, H., & Voikar, V. (2011). Evaluation of Social and Physical Enrichment in Modulation of Behavioural Phenotype in C57BL/6J Female Mice. *PLoS ONE*, 6(9), e24755
- Kunimoto, S., Nakamura, S., Wada, K., & Inoue, T. (2010). Chronic stress-mutated presenilin 1 gene interaction perturbs neurogenesis and accelerates neurodegeneration. *Exp Neurol*, 221(1), 175–85.
- Lalonde, R., Dumont, M., Staufienbiel, M., & Strazielle, C. (2005). Neurobehavioral characterization of APP23 transgenic mice with the SHIRPA primary screen. *Behav Brain Res* 157, 91–98.
- Lalonde, R., Lewis, T. L., Strazielle, C., Kim, H., & Fukuchi, K. (2003a). Transgenic mice expressing the betaAPP695SWE mutation: Effects on exploratory activity, anxiety, and motor coordination. *Brain Research*, 977, 38 – 45.
- Lalonde, R., Qian, S., & Strazielle, C. (2003b). Transgenic mice expressing the PS1-A246E mutation: effects on spatial learning, exploration, anxiety, and motor coordination. *Behav. Brain Res.*, 138, 71-79.
- Lawlor, B., & Bhriain, S. N. (2001). Psychosis and behavioural symptoms of dementia: Defining the role of neuroleptic interventions. *International Journal of Geriatric Psychiatry*, 16(Suppl. 1), S2–6.
- Luanagh, C., Lawlor, B. (2008). Loneliness and the health of older people. *International Journal of Geriatric Psychiatry*, 23(12), 1213–1221.
- Martin, A., & Brown, R. (2010). The lonely mouse: verification of a separation-induced model of depression in female mice. *Behavioural Brain Research*, 207, 196-207.
- Miura, H., Qiao, H., & Ohta, T. (2002). Influence of aging and social isolation on changes in brain monoamine turnover and biosynthesis of rats elicited by novelty stress. *Synapse*, 46, 116–124.
- Miyakawa, T., Yamada, M., Duttaroy, A., & Wess, J. (2001). Hyperactivity and intact hippocampus-dependent learning in mice lacking the M1 muscarinic acetylcholine receptor. *Journal of Neuroscience*, 21, 5239–5250.
- Morris, R. G. M. (1984). Development of a water maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J. Neurosci. Methods*, 11, 47–60.
- Murray, M. E., Graff-Radford, N. R., Ross, O. A., Petersen, R. C., Duara, R., & Dickson, D. W. (2011). Neuropathologically defined subtypes of Alzheimer’s disease with distinct clinical characteristics: a retrospective study. *Lancet Neurol.*, 10, 785–796.

- Nelson, R., Guo, Z., Halagappa, V., Pearson, M., Gray, A., Matsuoka, Y., et al. (2007). Prophylactic treatment with paroxetine ameliorates behavioural deficits and retards the development of amyloid and tau pathologies in 3XTgAD mice. *Experimental Neurology*, 205, 166-176.
- Oakley, H., Cole, S., Logan, S., Maurs, E., Shao, P., Craft, J., et al. (2006). Intraneuronal  $\beta$ -amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *The Journal of Neuroscience*, 26, 10129-10140.
- Ohno, M., Chang, L., Tseng, W., Oakley, H., Citron, M., Klein, W., et al. (2006). Temporal memory deficits in Alzheimer's mouse models: rescue by genetic deletion of BACE1. *European Journal of Neuroscience*, 23, 251-260.
- O'Leary, T. P., & Brown, R. E. (2009). Visuo-spatial learning and memory deficits on the Barnes maze in the 16-month-old APPswe/PS1dE9 mouse model of Alzheimer's disease. *Behavioural Brain Research*, 201 (1), 120-127.
- Palanza, P. (2001). Animal models of anxiety and depression: how are females different? *Neurosci Biobehav Rev*, 25, 219-233.
- Palmer, K., Berger, A., Monastero, R., Winblad, B., Backman, L., & Fratiglioni, L. (2007). Predictors of progression from mild cognitive impairment to Alzheimer disease. *Neurology*, 68, 1596-1602.
- Pietro Paolo, S., Brana, C., Feldon, J., Yee, B., Sun, Y., & Li, R. (2009). Limited impact of social isolation on Alzheimer-like symptoms in a triple transgenic mouse model. *Behavioral Neuroscience*, 123, 181-195.
- Ramakers, I., Visser, P., Aalten, P., Kester, A., Jolles, J., & Verhey, F. (2009). Affective symptoms as predictors of Alzheimer's disease in subjects with mild cognitive impairment: a 10 year follow up study. *Psychological Medicine*, 11, 1-9.
- Reitz, C., Brayne, C., Mayeux, R. (2011). Epidemiology of Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol*, 7, 137-152.
- Roberson, E., & Mucke, L. (2006). 100 years and counting: prospects for defeating Alzheimer's disease. *Science*, 314, 781-784.
- Rodgers, R. J., & Cole, J.C. (1993). Influence of social isolation, gender, strain, and prior novelty on plus-maze behaviour in mice. *Physiology and Behavior*, 54 (4), 729-736.
- Romans, S. E., Tyas, J., Cohen, M. M., & Silverstone, T. (2007). Gender differences in the symptoms of major depressive disorder. *J Nerv Ment Dis*, 195, 905-11.
- Rothman, S.M., Herdener, N., Camandola, S., Texel, S.J., Mughal, M.R., Cong, W.-N., et al. (2012). 3xTgAD mice exhibit altered behavior and elevated A $\beta$  after chronic mild social stress. *Neurobiology of Aging*, 33 (4), 830.e1-830.e12.
- Schellinck, H. M., Cyr, D. P., & Brown, R. E. (2010). How many ways can mouse behavioral experiments go wrong? Confounding variables in mouse models of neurodegenerative diseases and how to control them., *Advances in the Study of Behavior*, 41, 255-366.
- Sierksma, A., van den Hove, D., Steinbusch, H., & Prickaerts, J. (2010). Major depression, cognitive dysfunction and Alzheimer's disease: is there a link? *European Journal of Pharmacology*, 626, 72-82.

- Srivareerat, M., Tran, T.T., Alzoubi, K.H., & Alkadhi, K.A. (2009). Chronic Psychosocial Stress Exacerbates Impairment of Cognition and Long-Term Potentiation in  $\beta$ -Amyloid Rat Model of Alzheimer's Disease. *Biological Psychiatry*, 65 (11), 918-926.
- Steele, M., Stuchbury, G., & Munch, G. (2007). The molecular basis of the prevention of Alzheimer's disease through healthy nutrition. *Experimental Gerontology*, 42, 28-36.
- Stover, K., Brown, R. E. (2012). Age-related changes in visual acuity, learning and memory in the APPswe/PS1dE9 mouse model of Alzheimer's disease. *Behavioural Brain Research*, 231 (1), 75-85.
- Tilvis, R. S., Kahonen-Vare, M. H., Jolkkonen, J., Valvanne, J., Pitkala, K. H., & Strandberg, T. E. (2004). Predictors of cognitive decline and mortality of aged people over a 10-year period. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.*, 59, 268-274.
- Urano, T., Tohda, C. (2010). Icaritin improves memory impairment in Alzheimer's disease model mice (5xFAD) and attenuates amyloid  $\beta$ -induced neurite atrophy. *Phytother. Res*, 24, 1658-1663.
- Valzelli, L., (1973). The "Isolation Syndrome" in mice. *Psychopharmacologica (Berl.)* 31, 305-320.
- Van de Weerd, H., & Aarsen, E. (2002). Effects of environmental enrichment for mice: variation in experimental results. *Journal of Applied Animal Welfare Science*, 5, 87-109.
- Van de Weerd, H., Baumans, V., Koolhaas, J., & van Zutphen, L. (1994). Strain specific behavioural response to environmental enrichment in the mouse. *Journal of Experimental Animal Science*, 36, 117-127.
- Van Leeuwen, S., Bonne, O., Avraham, Y., & Berry, E. (1997). Separation as a new animal model for self-induced weight loss. *Physiology and Behavior*, 62, 77-81.
- Vloeberghs, E., Van Dam, D., Coen, K., Deyn, P., & Staugenbiel, M. (2006). Aggressive male APP23 mice modeling behavioural alterations in dementia. *Behavioral Neuroscience*, 120, 1380-1383.
- Wahlsten, D., Metten, P., & Crabbe, J. (2003). A rating scale for wildness and ease of handling laboratory mice: results for 21 inbred testing strains in two laboratories. *Genes, Brain and Behavior*, 2, 71-79.
- Wei, X., Yang, J., Dong, Y., & Wu, C. (2007). Anxiolytic-like effects of oleamide in group-housed and socially isolated mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 31, 1189-1195.
- Weiss, I. C., Pryce, C., R., Jongen-Relo, A. L., Nanz-Bahr, N., I., & Feldon, J. (2004). Effect of social isolation on stress-related behavioural and neuroendocrine state in the rat. *Behavioural Brain Research*, 152 (2), 279-295.
- Wilson, R., Krueger, K., Arnold, S., Schneider, J., Kelly, J., Barnes, L., Tang, X., & Bennett, D. (2007). Loneliness and risk of Alzheimer's disease. *Archives General Psychiatry*, 64, 234-240.

## Figures

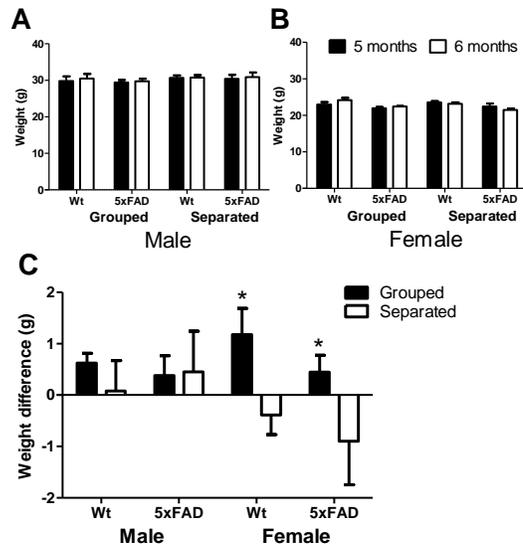


Fig. 1. Mean (+SEM) body weight (g) of (A) male and (B) female mice before (5 months) and after (6 months) the social separation period. (C) Mean (+SEM) difference of weight between these two periods. (\*) Represents significant difference in weight gain between housing condition ( $p < 0.01$ ).

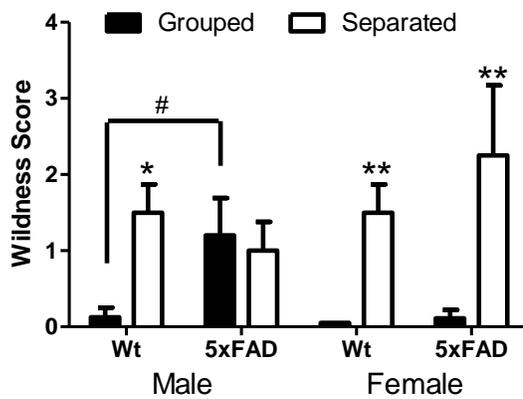


Fig. 2. Mean (+SEM) wildness rating upon first being handled at six months of age. (\*) Represents significant difference between housing condition ( $*p < 0.01$ ,  $**p < 0.001$ ) and (#) represents difference between genotypes ( $p < 0.05$ ) in the same sex and housing condition.

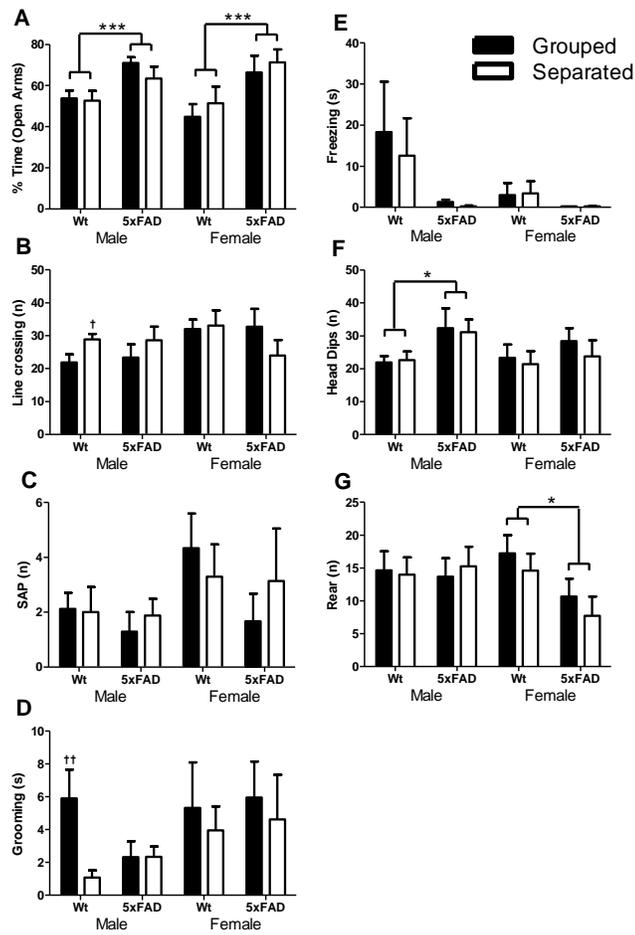


Fig. 3. Mean (+SEM) percent time spent in the open arms(A), number of line crossings (B), number of stretch attend postures (SAP)(C), time spent grooming (D), number of head dips (E), time freezing (F) and number of rears (G) in the elevated plus maze. (\*) Represents significant difference between genotypes (\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.0001$ ) and (†) represents difference between housing condition (†† $p < 0.01$ , † $p < 0.05$ ) in the same genotype.

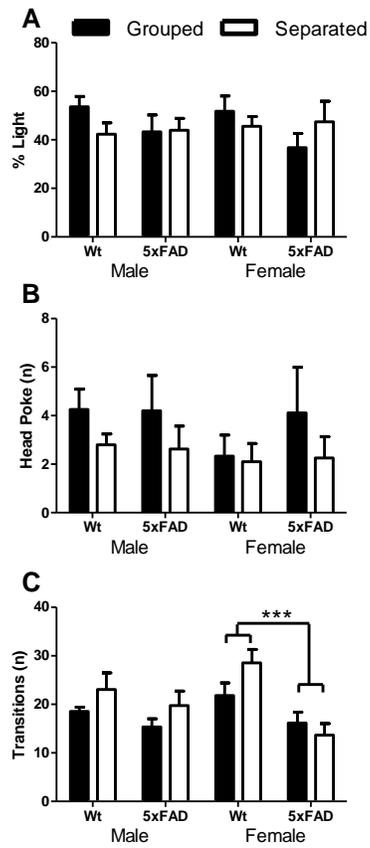


Fig. 4. Mean (+SEM) percent time spent in the light compartment (A), number of head poke (B) and number of transitions between the light and dark compartments (C) in the light/dark box test. (\*\*\*) Represents significant difference between genotypes ( $p < 0.001$ ).

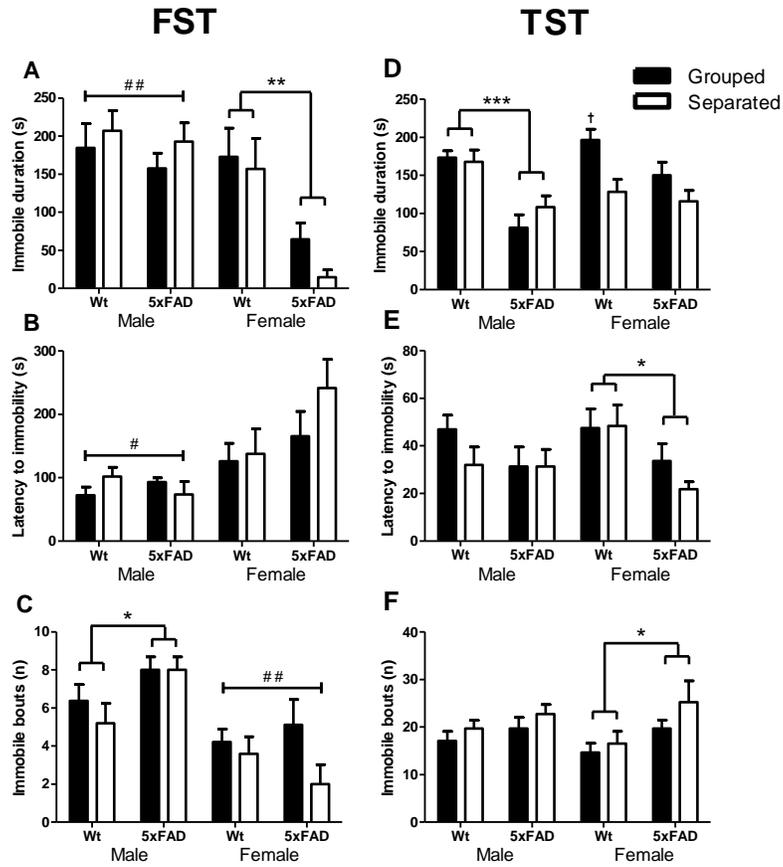


Fig. 5. Mean (+SEM) time immobile (A), latency to immobility (B) and number of bouts of immobility (C) in the forced swim test. Mean (+SEM) time immobile (D), latency to immobility (E) and number of bouts of immobility (F) in the tail suspension test. (\*) Represents significant difference between genotypes (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ , \*\*\* $p < 0.0001$ ), (#) represents difference between sex (# $p < 0.001$ , ## $p < 0.0001$ ) and (†) represents difference between housing condition ( $p < 0.05$ ) in the same genotype.

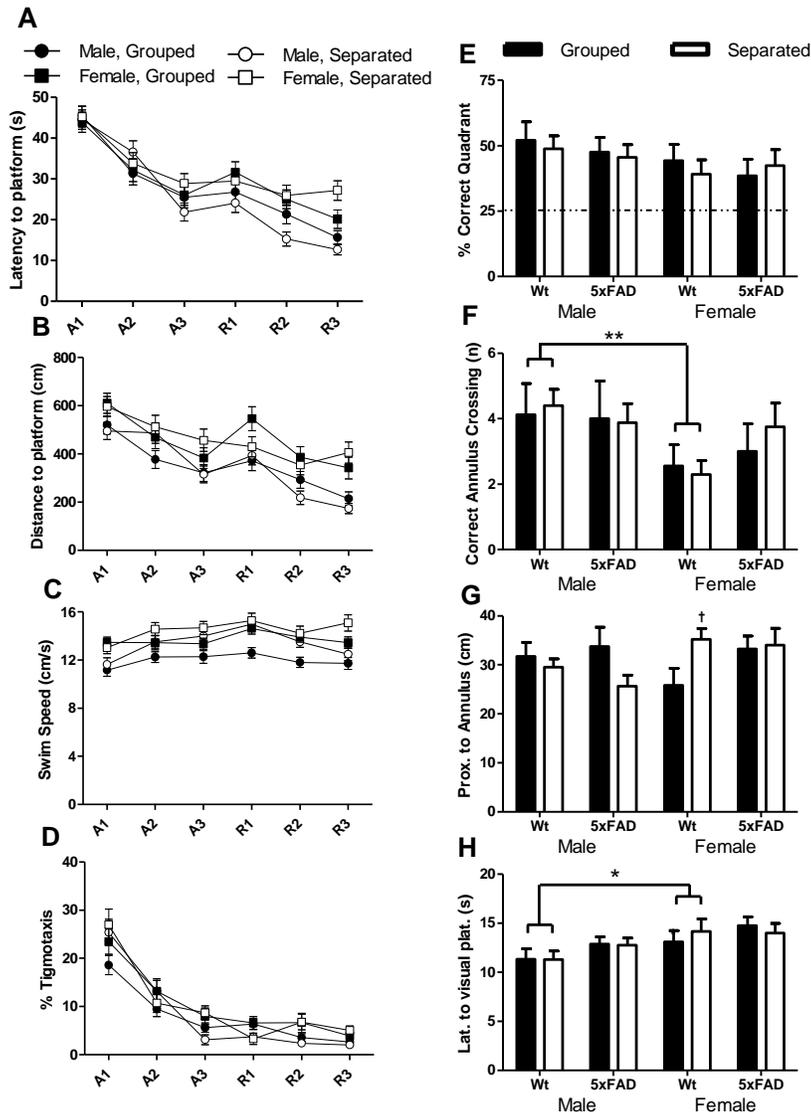


Fig. 6. Mean ( $\pm$  SEM) latency to reach the hidden platform (A), distance swam (B), swim speed (C) and percent tigmotaxis (D) across acquisition and reversal trials in the Morris water maze. Mean ( $\pm$ SEM) percent time spent in the correct quadrant (E), number of correct annulus crossings (F), proximity to annulus (G) during the probe trial and latency to reach the visual platform (H) of the Morris water maze. Sex differences were found in latency to platform, distance swam and swim speed ( $p < 0.05$ ) during acquisition and reversal trials, (\*) represents significant difference between sex (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ) in the same genotype, (#) represents difference between sex ( $p < 0.05$ ) and (†) represents difference between housing condition ( $p < 0.05$ ) in the same genotype. Dotted line in figure represents chance performance.

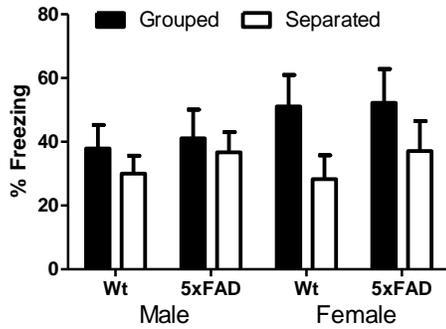


Fig. 7. Mean ( $\pm$ SEM) percent time freezing during the context memory test. Differences in house condition were found ( $p < 0.05$ ). Falta uma cruz em cima da barra das fêmeas separadas Wt

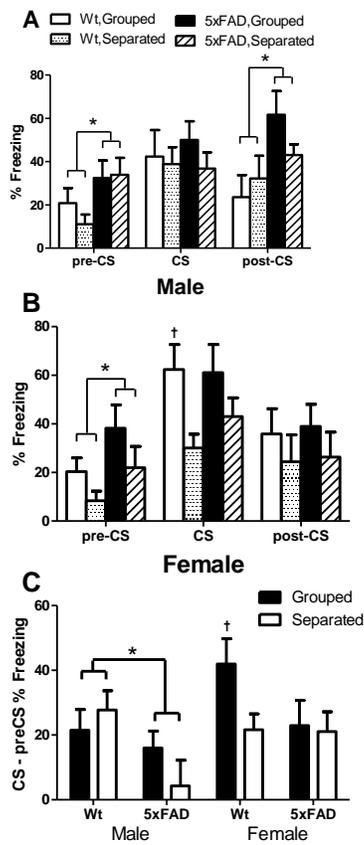


Fig. 8. Mean ( $\pm$ SEM) percent time freezing during the three phases of the cued memory test, before (pre-CS), during (CS) and after (post-CS) the tone presentation in male (A) and female (B) mice. (C) Represents the difference of percent freezing between during and before the tone. (\*) Represents significant difference between genotypes ( $p < 0.05$ ) and (†) represents difference between housing condition ( $p < 0.05$ ) in the same genotype.

Table 1. Effects of sex, genotype and housing conditions of 5xFAD male and female mice and their wildtype (Wt) analyzed on several behavioral tests. (\*) Represents a non-significant tendency

Behavioral Test	Social isolation effect		Genotype effect		Sex effect
	Male	Female	Male	Female	
Body Weight	-	lost weight	-	-	♂ heavier
Wildness	Higher in Wt	Higher score	-	-	-
EPM	-	-	5xFAD low anxiety	5xFAD low anxiety	-
LDB	-	-	-	5xFAD less transitions	-
FST	-	-	-	5xFAD less immobile duration	♀ less behavior despair in 5xFAD
TST	-	Lower behavior despair in Wt	5xFAD less immobile duration	5xFAD less immobile duration (*)	
MWM	Swam faster	Impaired spatial-memory in Wt	-	-	♀ higher motor activity ♀ impaired spatial-memory
Context FC	-	Impaired memory	-	-	-
Cued FC		Wt with impaired memory	5xFAD impaired memory	-	♂ impaired memory