



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

**PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES NMDA DO CÓRTEX PRÉ-
FRONTAL NA HIPERATIVIDADE LOCOMOTORA E
EMOCIONALIDADE DOS RATOS SHR e SLA16**

Acadêmica: M. Sc. Natalli Granzotto

Orientador: Prof. Dr. Geison Souza Izídio

Florianópolis

Abril, 2022

Natalli Granzotto

**PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES NMDA DO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL
NA HIPERATIVIDADE LOCOMOTORA E EMOCIONALIDADE DOS RATOS
SHR e SLA16**

Tese submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Farmacologia
da Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau
de Doutora em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Geison Souza
Izídio

Florianópolis

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Granzotto, Natalli

PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES NMDA DO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL NA
HIPERATIVIDADE LOCOMOTORA E EMOCIONALIDADE DOS RATOS SHR e
SLA16 / Natalli Granzotto ; orientador, Geison Souza
Izídio, 2022.

79 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós
Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Farmacologia. 2. Genética do comportamento. 3.
Farmacogenética. 4. Farmacologia do TDAH. I. Souza Izídio,
Geison. II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

Natalli Granzorro

PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES NMDA DO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL NA HIPERATIVIDADE LOCOMOTORA E EMOCIONALIDADE DOS RATOS SHR e SLA16

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.(a) Lisiane de Oliveira Porciuncula, Dra.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof.(a) Pablo Pandolfo, Dr.
Universidade Federal Fluminense

Prof.(a) Leandro José Bertoglio, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Doutora em Farmacologia.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof., Dr.
Geison Souza Izídio

Florianópolis, 2022.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente eu gostaria de agradecer imensamente a minha família, que foi meu maior suporte mesmo antes de eu nascer. Um obrigado muito especial ao meu avô, que infelizmente não pode assistir a esse momento tão importante ao nosso lado, mas que foi a minha primeira inspiração, a primeira pessoa que me fez acreditar que a educação é o maior instrumento de transformação humana, que me ensinou a ler e me disse que eu poderia ser o que eu quisesse. Em seguida, gostaria de agradecer a minha vó Maria, que seguiu me incentivando a descobrir meu caminho através do estudo, sempre muito amorosa e compreensiva. A minha mãe, que é a mulher mais guerreira que eu conheço, e que, com muito amor, sempre me faz refletir sobre as minhas escolhas. Obrigada a toda a minha família, pela paciência e pela compreensão em todas as minhas ausências.

Obrigada muito especial também a minha irmã Bárbara, que é a minha maior companheira desde que me entendo por gente, e que esteve ainda mais próxima de mim nas fases mais difíceis desse processo e que comemorou comigo cada ponto que deu certo do projeto. Ao Henrique, que entrou na minha vida justamente quando eu começava a engrenar o doutorado, e que foi de uma importância inestimável, me ajudando a segurar todas as barras das limitações que eu nem podia imaginar que enfrentaria, obrigada por todo o carinho, a paciência e a compreensão.

Obrigada ao meu orientador e amigo, Geison, que aceitou embarcar em um projeto tão novo pra ele quanto era pra mim. Abriu as portas do laboratório mais uma vez e tentou tornar o caminho um pouco mais leve, o que não foi uma tarefa fácil devido ao período que vivemos. As minhas amigas de empreitada, Ariela e Julia, por me ajudarem em várias partes que eu não teria como fazer sozinha. E que fora do laboratório foram um apoio extremamente importante pra que eu conseguisse chegar ao fim desse processo. Obrigada Aline, Rafael, Breno, José e Santiago, pelas discussões científicas e momentos de descontração no laboratório. Agradeço também a todos os outros integrantes do LGC, das várias “levas”, que me acompanharam nessa década de história. Um obrigado especial ao prof. André Ramos, que foi meu primeiro orientador no lindo caminho da ciência, e que sigo admirando.

Obrigada a todos os amigos que estiveram ao meu lado nessa longa jornada, e que entenderam quando não pude estar presente, e que me acolheram com carinho nos momentos que precisei.

Agradeço imensamente também ao PPG Farmacologia – UFSC, e a todos os docentes e servidores, que contribuíram direta ou indiretamente para meu crescimento profissional e pessoal. Em especial gostaria de agradecer ao Prof. Leandro Bertoglio, prof. Áurea Elizabeth Linder, prof. Helena Cismarosti, prof. Antônio Pádua Carobrez e prof. Thereza de Lima, que cederam espaços ou equipamentos sem os quais o meu projeto teria sido inviável. Ao LAMEB, também agradeço a estrutura que foi vital na realização de grande parte das análises deste trabalho. A Luciana Honorato por toda a atenção e disponibilidade.

Aos colegas da Farmacologia, agradeço o companheirismo nessa luta em prol de uma ciência brasileira de qualidade. Gostaria de agradecer em especial a Fernanda, Hugo, Jaqueline e Vans, que me ajudaram em diversos pontos da complexa cirurgia esterotáxica. Também ao Ericks, que me ajudou muito com as análises moleculares.

Aos professores que aceitaram compor a banca de avaliação deste trabalho, pelas contribuições valiosas para a qualidade deste trabalho.

À CAPES e CNPq pelo suporte financeiro.

A todos que não foram nomeados, mas que colaboraram de alguma forma para a execução deste trabalho.

RESUMO

A linhagem de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) é atualmente o modelo animal padrão-ouro no estudo do transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH). A partir dela, recentemente, desenvolvemos a linhagem congênica SLA16, que tem todo o *background* genético idêntico ao da linhagem SHR, com exceção de uma região genômica diferencial (RGD) no cromossomo 4. Esta manipulação genética gerou uma linhagem com fenótipo ainda mais hiperativo e de menor emocionalidade do que os SHR. No presente trabalho, avaliamos no primeiro capítulo, pela primeira vez, as diferenças comportamentais ao longo de toda a vida dos animais. Para isto, machos e fêmeas de ambas as linhagens foram repetidamente expostos ao teste do campo aberto (CA), da 4ª semana aos 24 meses de idade. De maneira geral, os animais SLA16 exibiram, um perfil de maior atividade locomotora, menor emocionalidade e maior impulsividade durante toda a vida, quando comparados aos SHR. Também pudemos observar índices locomotores mais altos nas fêmeas comparadas aos machos. No segundo capítulo, avaliamos a participação da via glutamatérgica do receptor NMDA (NMDAR) no controle da atividade locomotora, processamento emocional e memória de curta duração nas duas linhagens, uma vez que o gene que codifica uma de suas subunidades (GluN2B) está presente na RGD. Para isto, utilizamos uma abordagem farmacológica, administrando o antagonista de NMDAR - MK-801, ou veículo, em diferentes doses, intraperitonealmente em machos e fêmeas de ambas as linhagens submetendo-as ao teste do CA e do reconhecimento de objeto (RO). De maneira geral, os SLA16 apresentaram maior sensibilidade comportamental ao MK-801, do que os SHR e efeitos farmacogenéticos importantes foram demonstrados em algumas doses. Também pode-se observar maior sensibilidade nas fêmeas do que nos machos de ambas as linhagens. Finalmente, no capítulo 3, avaliamos a participação das neurocircuitarias do NMDAR da região do córtex pré-frontal (CPF) ventromedial no controle da hiperatividade, emocionalidade e memória de curta duração. Para isso, injetamos MK-801, ifenprodil (IFN – antagonista NMDAR seletivo para subunidade GluN2B) ou veículo, intra-CPF por meio de cânulas-guia implantadas previamente, e a seguir, submetemos os animais ao teste do CA e RO. De maneira geral, foi observado um efeito farmacogenético em resposta ao MK-801, onde apenas os animais SLA16 responderam à dose mais baixa, apresentando hipolocomoção. As duas linhagens responderam de maneira idêntica à dose mais alta do MK-801 e ao IFN. Também analisamos a quantidade relativa das proteínas GluN2A e GluN2B no CPF, amígdala e hipocampo, mas não houve diferença entre as linhagens. Em suma, os dados apontam que a linhagem SLA16 é mais hiperativa, impulsiva e tem menores índices experimentais de emocionalidade, quando comparadas à linhagem SHR, ao longo de toda a vida, independentemente do sexo. A via do NMDAR participa do controle destes comportamentos, bem como pode explicar parte das diferenças observadas entre SLA16 e SHR. Contudo, especificamente na região do CPF, esta via parece estar envolvida na diferença comportamental dos parâmetros emocionais, mas não dos parâmetros motores.

Palavras-chave: SLA16; SHR; receptor NMDA; sistema glutamatérgico, TDAH, hiperatividade, CPF.

ABSTRACT

The spontaneously hypertensive rat (SHR) strain is currently the gold standard animal model in the study of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD). We have recently developed the congenic strain SLA16, which has the genetic background identical to the strain SHR, except for a differential genomic region (DGR) on chromosome 4. This genetic manipulation generated a strain with an accentuated hyperactive phenotype and less reactive than SHR. In the present work, we evaluated, for the first time, these behavioral differences longitudinally. For this, in the first chapter, males and females of both strains were repeatedly exposed to the Open Field (OF) test, from the 4th week to 24 months of age. In general, SLA16 animals exhibited a lifetime profile of hyperactivity, less emotional processing, and higher impulsivity when compared to SHR, regardless of sex. We also observed higher locomotor indices in females compared to males. In the second chapter, we evaluated the participation of the glutamatergic pathway of the NMDA receptor (NMDAR) in the control of locomotor activity, emotional processing, and short-term memory in both strains since the gene encodes one of its subunits (GluN2B) is located in the RGD. For this, we use a pharmacological approach, administering the NMDAR antagonist - MK-801 (0 – 0.3 mg/kg, intraperitoneally), in males and females of both strains, and then submitting them to the OF and object recognition test (OR). Overall, SLA16 rats showed higher behavioral sensitivity to MK-801 than SHR characterizing a pharmacogenetic effect. It is also possible to observe greater sensitivity to MK-801 in females than in males of both strains. Finally, in Chapter 3, we evaluated the role of NMDAR neurocircuitry in the prefrontal cortex (PFC) region in the control of hyperactivity, emotional processing, and short-term memory. For this, we injected MK-801, ifenprodil (IFN – selective NMDAR antagonist for GluN2B subunit) or vehicle, intra-PFC through previously implanted guide cannulas, and then submitted the animals to the OF and OR. In summary, a pharmacogenetic effect was observed in response to the lowest dose of MK-801, because locomotion was diminished only in SLA16 animals. The two strains responded identically to the higher dose of MK-801 and IFN. We also analyzed the relative amount of GluN2A and GluN2B proteins in PFC, amygdala, and hippocampus, but there was no difference between strains. In summary, the data show that the SLA16 strain is more hyperactive, impulsive, and has lower experimental emotionality indices, when compared to the SHR strain, throughout life, regardless of gender. The NMDAR pathway participates in the control of these behaviors, in addition to explaining part of the differences observed between SLA16 and SHR. However, specifically in the PFC region, this pathway is involved in the behavioral differences only in emotional parameters, but not in motor parameters.

Keywords: SLA16; SHR; NMDA receptor; glutamatergic system, ADHD, hyperactivity, PFC.

LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS

AMG = Amígdala

AMPA = ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol-4-propionico

AMPAR = receptor glutamatérgico tipo ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol-4-propionico

ANOVA = Análise de Variância

Anxrr16 = *anxiety related response QTL 16* (QTL para respostas relacionadas à ansiedade 16)

CA = Campo Aberto

CAMK = proteína cinase dependente de cálcio/calmodulina

CEUA/UFSC = Comitê de Ética no Uso de Animais em pesquisa da Universidade Federal de Santa Catarina

CPF = Córtex Pré-Frontal

DA = Dopamina

EPM = Erro Padrão da Média

GLU = glutamato

GluD2 = subunidade $\delta 2$ do receptor ionotrópico de glutamato

GluN2B = Subunidade NR2B do receptor NMDA

GluRs = Receptores de glutamato

HPC = Hipocampo

KA = receptor glutamatérgico tipo cainato

LEW = Linhagem de ratos Lewis

LCE = Labirinto em Cruz Elevado

LGC = Laboratório de Genética do Comportamento da Universidade Federal de Santa Catarina

LTP = *long term potentiation*

mGLUR7 = receptor metabotrópico de glutamato tipo 7

NAc = Núcleo *Accumbens*

NMDA = N-metil-D-aspartato

NMDAR = Receptor glutamatérgico tipo N-metil-D-aspartato

ODD = Transtorno Desafiador de Oposição

PKC = Proteína cinase C

QTL = *Locus* para Características Quantitativas

RGD = Região Genômica Diferencial

SAL = Salina 0,9%

SLA16 = SHR.Lewis/Anxrr16

SN = Substância Negra

SNC = Sistema Nervoso Central

SHR = Ratos Espontaneamente Hipertensos

TCI = Transtornos do controle de impulsividade

TDAH = Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade

UFSC = Universidade Federal de Santa Catarina

WKY = Wistar-Kyoto

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Os ratos SLA16 têm seu genoma praticamente idêntico aos SHR.....	14
Figura 2 – Destaque para a região genômica diferencial (RGD) em animais da linhagem SLA16.....	15
Figura 3 – Desenho experimental do primeiro bloco de experimentos.....	22
Figura 4 – Perfil comportamental no teste de Campo Aberto ao longo da vida dos machos SHR e SLA16.....	25
Figura 5 – Perfil comportamental no teste de Campo Aberto ao longo da vida das fêmeas SHR e SLA16.....	27
Figura 6 – Desenho experimental dos experimentos 3 e 4.....	38
Figura 7 – Efeito do MK-801 no comportamento dos machos no Campo Aberto.....	40
Figura 8 – Efeito da administração de MK-801 no comportamento das fêmeas no Campo Aberto.....	42
Figura 9 Desenho experimental dos experimentos 5 e 6.....	55
Figura 10 – Desenho experimental dos experimentos 7 e 8.....	55
Figura 11 – Efeito do MK-801 no Córtex Pré-Frontal sobre os comportamentos do Campo Aberto.....	58
Figura 12 – Efeito do MK-801 no Córtex Pré-Frontal sobre o teste de Reconhecimento de Objeto.....	60
Figura 13 Efeito do Ifenprodil no Córtex Pré-Frontal sobre os comportamentos do Campo Aberto.....	62
Figura 14 – Efeito do Ifenprodil no Córtex Pré-Frontal sobre o teste de Reconhecimento de Objeto.....	63
Figura 15 GluN2A e GluN2B nas regiões encefálicas dos SHR e SLA16, por western blotting normalizado por B-actina.....	65

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. HIPÓTESE DO CAPÍTULO 1.....	19
3. OBJETIVOS CAPÍTULO 1.....	20
3.1. OBJETIVO GERAL.....	20
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
4.1. ANIMAIS.....	21
4.2. CAMPO ABERTO.....	21
4.3. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS.....	21
4.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS E REPRESENTAÇÕES GRÁFICAS.....	22
4.5 PONTO FINAL HUMANITÁRIO.....	23
5. RESULTADOS.....	24
5.1 EXPERIMENTO 1 – PERFIL COMPORTAMENTAL DOS MACHOS NO CAMPO ABERTO.....	25
5.2 EXPERIMENTO 2 – PERFIL COMPORTAMENTAL DAS FÊMEAS NO CAMPO ABERTO.....	26
6.DISCUSSÃO.....	28
7. CONCLUSÕES DO CAPÍTULO 1.....	34
8. HIPÓTESE DO CAPÍTULO 2.....	35
9. OBJETIVOS CAPÍTULO 2.....	36
9.1. OBJETIVO GERAL.....	36
9.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
10. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
10.1 ANIMAIS.....	37
10.2 CAMPO ABERTO.....	37
10.3 DROGAS.....	37
10.4 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS.....	38
10.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS E REPRESENTAÇÕES GRÁFICAS.....	38
11. RESULTADOS.....	39
11.1 EXPERIMENTO 3 – EFEITO DO MK-801 SOBRE O COMPORTAMENTO DOS MACHOS.....	39

11.2 EXPERIMENTO 4 – EFEITO DO MK-801 SOBRE O COMPORTAMENTO DAS FÊMEAS.....	41
12. DISCUSSÃO.....	43
13. CONCLUSÕES DO CAPÍTULO 2.....	47
14. HIPÓTESE CAPÍTULO 3.....	48
15. OBJETIVOS.....	49
15.1 OBJETIVO GERAL.....	49
15.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	49
16. MATERIAL E MÉTODOS.....	50
16.1 ANIMAIS.....	50
16.2 CAMPO ABERTO.....	50
16.3 RECONHECIMENTO DE OBJETOS.....	50
16.4 DROGAS.....	51
16.5 EUTANÁSIA, COLETA E PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS.....	51
16.6 NEUROCIRURGIA E MICROINJEÇÕES.....	52
16.7 WESTERN BLOTTING.....	53
16.8 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS.....	53
16.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS E REPRESENTAÇÕES GRÁFICAS.....	56
17. RESULTADOS.....	57
17.1 EXPERIMENTO 5 – EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTRA-CÓRTEX PRÉ-FRONTAL DE MK-801.....	57
17.2 EXPERIMENTO 6 – EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTRA-CÓRTEX PRÉ-FRONTAL DE IFENPRODIL.....	61
17.3 EXPERIMENTO 7 – QUANTIFICAÇÃO DE GLUN2A EM REGIÕES ENCEFÁLICAS.....	64
17.4 EXPERIMENTO 8 – QUANTIFICAÇÃO DE GLUN2B EM REGIÕES ENCEFÁLICAS.....	64
18. DISCUSSÃO.....	66
19. CONCLUSÕES DO CAPÍTULO 3.....	70
20. CONCLUSÃO GERAL.....	71
REFERÊNCIAS.....	72

1. INTRODUÇÃO

Do ponto de vista neuroquímico, os transtornos psiquiátricos humanos são extremamente complexos. Há muito tempo, os pesquisadores tentam entender a neurobiologia destes, para buscar tratamentos eficientes e com o mínimo de efeitos adversos possíveis. Contudo, dada a complexidade destes transtornos, uma das estratégias mais adotada é tentar seccioná-los, através de diferentes abordagens experimentais, para facilitar a compreensão das suas diferentes facetas e o transtorno como um todo. Tendo em vista a impossibilidade de manipular o sistema nervoso de forma tão objetiva em humanos, os pesquisadores vêm tentando modelar o comportamento em animais de laboratório. Esta abordagem tem se mostrado extremamente válida, uma vez que há uma grande similaridade entre as vias neurobiológicas dos mamíferos (KAS et al., 2011; LEE; GOTO, 2015).

Os roedores, em particular, apresentam alta homologia genética, fisiológica e anatômica com os seres humanos, além de não exigirem grandes instalações e possibilitarem fácil manipulação e reprodução (quando comparados com outros modelos animais), o que reforça seu valor na pesquisa biomédica (BRYDA, 2013; SMITH; BOLTON; DWINELL, 2019). Neste sentido, a elucidação do controle e da modulação de traços como a hiperatividade e emocionalidade, em roedores, torna-se muito importante, uma vez que estas estão presentes em diferentes transtornos humanos, como o transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH), o transtorno bipolar, o transtorno obsessivo compulsivo (TOC) e a esquizofrenia, entre outros (LOGAN; MCCLUNG, 2016; MEYER; FELDON, 2010; SAGVOLDEN et al., 2005).

A linhagem de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) foi desenvolvida na década de 1960 no Japão por Okamoto e Aoki (1963). O objetivo inicial destes pesquisadores era estudar o fenômeno da hipertensão arterial sistêmica. Para isso, eles cruzaram animais que tivessem a pressão arterial mais alta durante sucessivas gerações. Contudo, neste processo de seleção artificial, além da hipertensão, outros fenótipos também foram observados nesta linhagem, dentre eles a hiperatividade, a impulsividade motora e uma baixa reatividade emocional (SAGVOLDEN et al., 2005).

Outra característica interessante da linhagem SHR é a alta atividade na área central do campo aberto (CA), um índice clássico de ansiedade/emocionalidade em roedores (PRUT; BELZUNG, 2003; STANFORD, 2016). Esta linhagem inclusive foi uma das utilizadas para o mapeamento de regiões genômicas associadas aos fenótipos de ansiedade/emocionalidade (RAMOS et al., 1999).

Inicialmente, Ramos e colaboradores analisaram o comportamento de seis linhagens isogênicas de ratos expostas a aparatos clássicos para medir ansiedade experimental: CA labirinto em cruz elevado (LCE) e caixa clara e escura (CBP). Neste trabalho, ficou demonstrado que o par SHR e Lewis (LEW) era o mais contrastante para o comportamento emocional, sem grandes diferenças na atividade motora *per se*, e por isso foi escolhido como modelo genético para o estudo das bases neurobiológicas da ansiedade. LEW e SHR contrastam particularmente para a medida de locomoção no centro do CA, onde os SHR exibem altos scores enquanto os LEW não exploram muito essa região (RAMOS et al., 1997).

Posteriormente, Ramos e colaboradores (1999) conduziram o cruzamento das linhagens LEW e SHR para a obtenção de uma linhagem F2 híbrida que permitiu o screening genético para análise de QTL. Este trabalho resultou no mapeamento do primeiro QTL para estudo da emocionalidade em ratos, chamado originalmente de Ofil1 (*open field inner locomotion #1*) que mais tarde foi rebatizado de Anxrr16 (*anxiety related response #16*) pela base de dados genômicos do rato (RGD). Este *locus* abarca pouco mais da metade do cromossomo 4, e contém pouco mais de mil genes descritos e contribui com 61,3% da variação fenotípica associada ao parâmetro de locomoção central. Curiosamente, quando a os alelos desse *locus* são herdados da linhagem parental LEW, os animais exibem níveis de exploração central ainda maiores que os apresentados pela parental SHR, e não menores como seria de se esperar. Este efeito transgressivo e contraintuitivo é relativamente comum no contexto da análise de QTL (RAMOS et al., 1999). Apesar de inicialmente os efeitos do Anxrr16 terem sido descrito apenas em fêmeas, trabalhos posteriores ampliaram este efeito também em machos (MORMÈDE et al., 2002).

Esta região genômica do cromossomo 4 do rato parece bastante interessante do ponto de vista da genética do comportamento. Os trabalhos que se seguiram a partir do modelo genético SHR e LEW demonstraram a importância da região do *Anxrr16* em particular. Um estudo que analisou o comportamento de animais híbridos criados a partir do cruzamento entre LEW e SHR direcionados por marcação molecular na região do *Anxrr16*, além de um outro QTL previamente descrito no trabalho de Ramos e colaboradores (*Anxrr17* – localizado no cromossomo 7), demonstrou que os animais que possuíam alelos LEW na região do *Anxrr16* (chamados de *high line*) tinham maiores níveis exploratórios no OF quando comparados aos que tinham alelos SHR nesta região (chamados de *low line*) (MORMÈDE et al., 2002). O efeito do *Anxrr16* também foi ampliado para o comportamento dos machos, que neste trabalho exibiram maior contraste fenotípico do que as fêmeas. Além disso, esse trabalho também revelou que os animais *low line* tinham menores índices de exploração apenas nas regiões e condições mais aversivas (como o centro do CA), corroborando que este QTL está mais envolvido com o processamento emocional do que com a locomoção em si (MORMÈDE et al., 2002).

Outros estudos utilizando animais provenientes do cruzamento serial entre SHR e LEW ainda ampliaram os efeitos da região do *Anxrr16* para o consumo de etanol, a analgesia induzida pelo estresse (exposição ao odor de predador) e a sensibilização a cocaína, todos parâmetros com fortes componentes emocionais (IZÍDIO et al. 2011; VENDRUSCOLO et al, 2006; 2009).

Para entender melhor como o QTL *Anxrr16* influencia o comportamento emocional dos ratos, foi escolhida a estratégia de construção de uma linhagem congênica. Animais das linhagens LEW e SHR foram cruzados, e os descendentes híbridos foram retrocruzados com a parental SHR. Por meio de uma série de genotipagens e seleção genética dos reprodutores, após 10 gerações de cruzamentos (N10) a região do *Anxrr16* foi isolada dos LEW em um *background* genético SHR. A partir daí os animais congênicos começaram a ser cruzados entre si, e após 20 gerações de cruzamentos seletivos, tornaram-se uma linhagem isogênica que foi batizada de SHR.LEW-*Anxrr16* (SLA16) (DE MEDEIROS et al., 2013). A linhagem SLA16 foi desenvolvida inteiramente no

Laboratório de Genética do Comportamento (LGC) e é a primeira linhagem congênica de ratos desenvolvida para estudar as bases genéticas do comportamento emocional (Figura 1).

A região genômica diferencial (RGD) entre os SLA16 e os SHR é um pouco maior que apenas o QTL *Anxrr16*, englobando cerca de 86.3 Mpb que vai do marcador D4Mh11 ao D4Rat76. Como os animais SLA16 e SHR (que se tornou o controle genético dos SLA16) são criados sob as exatas mesmas condições, as diferenças comportamentais apresentadas podem ser atribuídas aos genes desta RGD. No primeiro trabalho que descreveu esta nova linhagem, De Medeiros e colaboradores confirmaram o efeito transgressivo e contraintuitivo do *Anxrr16*, revelando que os SLA16 apresentam um perfil ainda menos tipo-ansioso do que a parental SHR (que já é considerado um modelo de baixa ansiedade comparado a outras linhagens de rato). Neste trabalho, os SLA16 exibiram um perfil de maior exploração nas regiões aversivas dos aparatos (OF, LDB, EPM e caixa de atividades em protocolo curto) quando comparados ao SHR. Contudo, num teste de caixa de atividade com 22,5h de habituação não houve diferença entre as linhagens, o que sugere que o *Anxrr16* está mais ligado a um fator de novidade ou desafio do que apenas na atividade motora. (De Medeiros et al., 2013)

Após o desenvolvimento da linhagem SLA16, abriu-se uma gama de possibilidades de dissecar a influência do *Anxrr16*, não só quanto ao comportamento emocional, mas também quanto a outros fenótipos interessantes. Uma nova análise de QTL conduzida por Anselmi e colegas, utilizando animais F2 cruzados de SHR e LEW, demonstrou a sobreposição de novos *locus* para a memória e aprendizado. Neste trabalho o fenótipo no CA, teste de esquiva discriminativa, alternância espontânea, reconhecimento de objetos e medo condicionado ao contexto, foi cruzado com os dados genotípicos, e foram reportados não só novos QTLs para a memória na mesma região, como também foi possível confirmar a influência destes QTLs na linhagem SLA16. Os dados confirmaram mais uma vez que os SL16 apresentam um perfil de maior exploração e menor emocionalidade quando comparados aos SHR, além de demonstrar pela primeira vez que os SLA16 têm um desempenho cognitivo prejudicado em relação aos SHR (que já são considerados que tem uma

performance pobre nos testes de memória, sendo considerados o modelo genético padrão ouro do transtorno de déficit de atenção e hiperatividade).

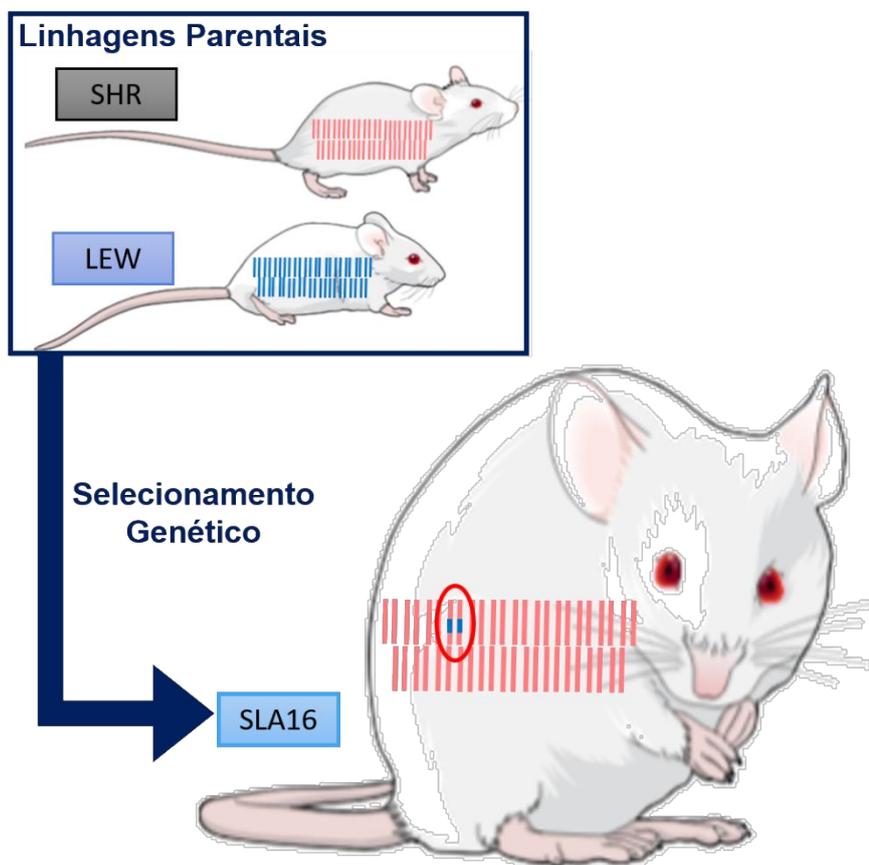


Figura 1. Os ratos SLA16 têm seu genoma praticamente idêntico aos SHR, com exceção da região genômica diferencial (RGD) no cromossomo 4, proveniente da linhagem Lewis (LEW). As barras coloridas representam os cromossomos de cada linhagem.

Atualmente, sabe-se que os animais SLA16 se locomovem ainda mais no CA do que animais SHR, inclusive na região central (ANSELM I et al., 2016; DE MEDEIROS et al., 2013), mesmo em protocolos mais longos que os habituais (GRANZOTTO, 2016). Além disso, quando estes animais são expostos repetidamente ao CA, parecem não apresentar habituação locomotora da mesma maneira que os SHR (GRANZOTTO, 2016), um dado intrigante e ainda pouco explorado. Este conjunto de dados experimentais apontam para uma possível diferença quanto a estratégia comportamental escolhida por cada uma das linhagens.

A RGD, apesar de relativamente pequena comparada ao genoma todo da linhagem, engloba cerca de mil e cem genes. Dentre estes, alguns que são fortes

genes candidatos para explicar a diferença comportamental entre as duas linhagens estão envolvidos direta ou indiretamente com o sistema glutamatérgico (VELÁZQUEZ et al., 2019). Por exemplo, temos mapeados na RGD os genes (1) *grin2b* que codifica a subunidade GluN2B; (2) *grid2* que codifica a subunidade $\delta 2$ do receptor ionotrópico de glutamato – GluD2; (3) *grip2* que codifica a proteína 2 de interação com o receptor de glutamato; e (4) *grm7* que codifica o receptor metabotrópico de glutamato tipo 7 (mGLUR7) (Figura 2).

Dentre estes, o *grin2b* mostra-se como o mais promissor, uma vez que já foi associado ao neuroticismo, prejuízos cognitivos, de desenvolvimento, e de atenção em humanos (ARAGAM et al., 2012; LEMKE et al., 2014; MASCHERETTI et al., 2017; RIVA et al., 2014). Além disso, polimorfismos neste gene também já foram relacionados aos transtornos psiquiátricos como o TDAH, o transtorno desafiador de oposição (ODD – do inglês *oppositional defiant disorder*) autismo e transtornos do controle de impulsividade (TCI) (COMINGS et al., 2000; DORVAL et al., 2007; PAN et al., 2015; ZAINAL et al., 2015).

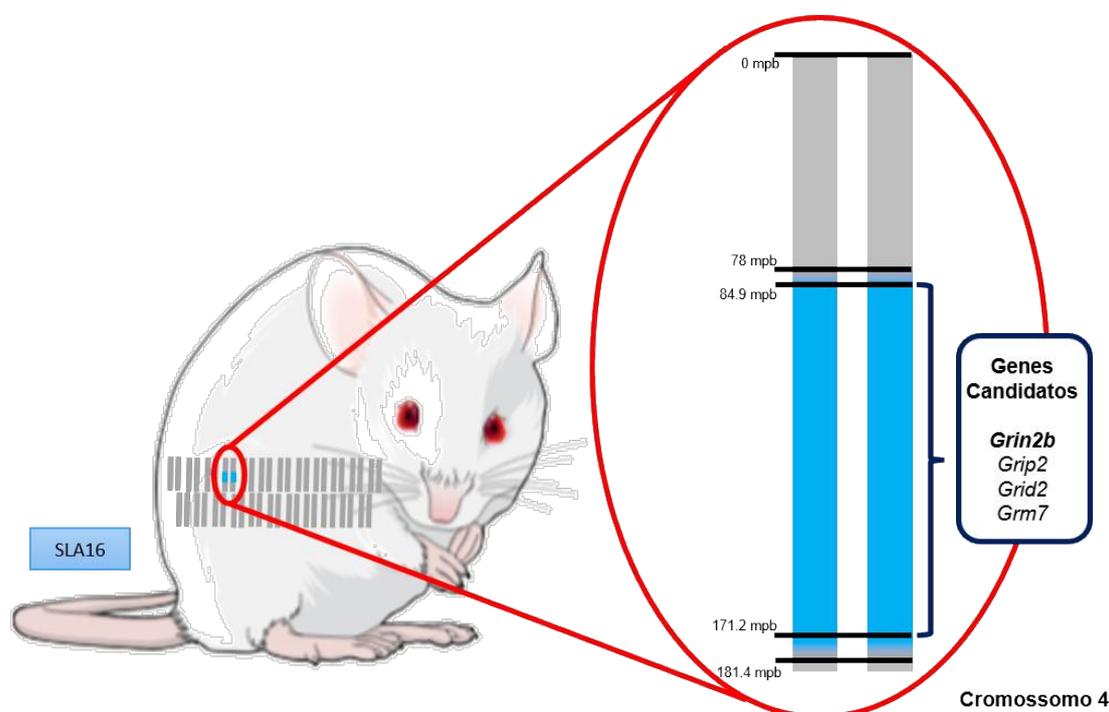


Figura 2. Destaque para a região genômica diferencial (RGD) em animais da linhagem SLA16. A RGD encontra-se no cromossomo 4 e abriga cerca de mil e cem genes. Dentre eles, o *grin2b*, *grip2*, *grid2* e *grm7*, que são genes que podem explicar o perfil comportamental da linhagem.

O sistema glutamatérgico é o principal sistema de neurotransmissão excitatória do SNC, que responde aos níveis de glutamato (GLU), um neurotransmissor do tipo aminoácido. Estima-se que aproximadamente dois terços dos neurônios corticais sejam glutamatérgicos. Os receptores glutamatérgicos podem ser ionotrópicos ou metabotrópicos. Dentre os ionotrópicos, cuja principal característica é formar um poro permeável a íons específicos, existem três tipos: kainato (KA), AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol-4-propionico) e NMDA (N-metil-D-aspartato). Os receptores AMPA e KA frequentemente são agrupados como receptores não-NMDA. Já os receptores do tipo metabotrópico são receptores transmembranas acoplados à proteína G com oito subtipos descritos (mGLUR1-mGLUR8). Os receptores do tipo NMDA são formados pela combinação de quatro subunidades que se organizam formando um poro central. As subunidades podem ser de três famílias: GluN1 (8 subtipos descritos); GluN2 (A, B, C ou D) e GluN3 (A ou B).

Durante um estímulo fraco, os NMDAR estão levemente ativados, pois seu poro central permanece obstruído por Mg^{2+} . Eles ganham realmente importância durante estímulos fortes ou repetitivos, quando os receptores AMPA/KA já foram ativados levando a despolarização da membrana e consequente deslocamento do Mg^{2+} (gerado pela mudança de voltagem). Esta desobstrução permite a permeabilidade do canal aos íons Ca^{2+} que desencadeia um aprimoramento da eficiência sináptica (NAKANISHI, 1992). Os NMDAR têm atraído um crescente interesse devido ao seu importante papel na plasticidade sináptica, no desenvolvimento neurológico e, consequentemente, na sua participação em doenças neurológicas (MAYER, 2016).

Os NMDAR são estruturas tetraméricas formadas necessariamente por duas unidades GluN1, que possuem sítio de interação para glicina, e comumente duas unidades GluN2, que possuem sítios de ligação para glutamato (MAYER, 2016). A incorporação das subunidades GluN3 são menos comuns, e seu papel ainda não está bem elucidado (PAOLETTI, 2011). As diferentes combinações de subunidades geram diferenças quanto a afinidade aos ligantes, à sensibilidade ao bloqueio do poro central exercido pelo Mg^{2+} , ao efeito estimulatório da glicina e até a farmacocinética (NAKANISHI, 1992).

As subunidades GluN2 estão expressas de maneiras diferentes no SNC. A GluN2A está predominantemente expressa no córtex cerebral e hipocampo, a GluN2B parece estar bem distribuída em todo o prosencéfalo, já a GluN2C e GluN2D parecem estar preferencialmente expressos no cerebelo, diencéfalo e tronco cerebral (NAKANISHI, 1992).

Existe ainda, uma correlação temporal na expressão dos diferentes tipos de subunidades. Em roedores, a subunidade GluN2B parece ser a mais expressa nos primeiros dias pós-natais, quando quase não é possível detectar a unidade GluN2A, que vai ganhar importância mais para o fim do desenvolvimento, ultrapassando os níveis de GluN2B (PAOLETTI, 2011). Esta informação reforça o papel da subunidade GluN2B no desenvolvimento e maturação de várias estruturas cerebrais, com especial destaque ao córtex cerebral.

As subunidades GluN2 possuem domínios citoplasmáticos com sítios de fosforilação para proteína cinase C (PKC) e proteína cinase dependente de cálcio/calmodulina (CAMK), duas proteínas bastante importantes nos processos de plasticidade sináptica (como por exemplo na LTP – do inglês *long term potentiation*) (NAKANISHI, 1992; PAOLETTI, 2011).

Mozhui e colaboradores (MOZHUI et al., 2010) demonstraram que a variação de fenótipos relacionados à ansiedade em camundongos parece ter uma relação direta com a expressão de genes de receptores de glutamato (GluRs) variando de acordo com a linhagem. Boyce-Rustay e Holmes (2006), demonstraram que a manipulação genética de subunidades de GluN2 pode gerar modificação no perfil emocional de camundongos, gerando alterações no perfil comportamental exibido no CA e no LCE, entre outros testes. Pinar e colaboradores (2015) mostraram que a administração de antagonistas do sistema glutamatérgico no período de desenvolvimento, induz uma hipolocomoção no CA, bem como um comportamento tipo-ansioso diminuído no LCE na fase adulta. Também já foi demonstrado que, mesmo na fase adulta, xenobióticos podem diminuir o perfil de emocionalidade, em roedores, através da modulação do sistema glutamatérgico (STANGHERLIN; NOGUEIRA, 2014).

De fato, a injeção de antagonistas de NMDAR em diferentes estruturas cerebrais leva à mudança no perfil exploratório de ratos (JARDIM; GUIMARÃES, 2001, 2004; MATHEUS; GUIMARÃES, 1997). Por exemplo, o córtex pré-frontal (CPF) já foi correlacionado com a ação de antagonistas do NMDAR em humanos (BREIER et al., 1997) e em ratos (FEENSTRA; BOTTERBLOM; VAN UUM, 2002). Além disso, também já foi demonstrado que a administração de antagonistas NMDAR sistemicamente estimulam a liberação de glutamato na região do CPF (MOGHADDAM et al., 1997; ZUO et al., 2006).

2. HIPÓTESE CAPÍTULO 1

A primeira etapa do trabalho testou a seguinte hipótese: Animais da linhagem SLA16 apresentam comportamentos relacionados ao TDAH mais exacerbados, do que os animais SHR, ao longo de toda a vida.

Ou seja, acreditamos que os animais SLA16 têm um perfil comportamental de maior hiperatividade e toma mais riscos do que animais da linhagem SHR, durante toda a vida. Caso esta hipótese seja verdadeira, podemos sugerir a linhagem SLA16 como um modelo alternativo bem interessante para o estudo da hiperatividade, um endofenótipo do TDAH.

3. OBJETIVOS CAPÍTULO 1

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o perfil comportamental das linhagens SHR e SLA16 ao longo da vida dos animais.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o comportamento locomotor dos machos no teste do campo aberto de ambas as linhagens, desde a adolescência até a idade avançada.
- Avaliar o comportamento emocional dos machos teste do campo aberto de ambas as linhagens, desde a adolescência até a idade avançada.
- Caracterizar o comportamento locomotor das fêmeas no teste do campo aberto de ambas as linhagens, desde a adolescência até a idade avançada.
- Avaliar o comportamento emocional das fêmeas no campo aberto de ambas as linhagens, desde a adolescência até a idade avançada.

4. MATERIAL E MÉTODOS CAPÍTULO 1

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*) das linhagens SHR (*Spontaneously Hypertensive Rats*) e SLA16 (SHR.LEW/Anxrr16) de ambos os sexos criados no Laboratório de Genética do Comportamento (LGC/UFSC). A idade dos animais durante os testes variou de 4 semanas a 24 meses.

Os animais foram mantidos em grupos de até 6 indivíduos por gaiola. Quando os animais excederam 300g as caixas foram divididas (3 indivíduos por gaiola) para melhor conforto dos animais. A temperatura do biotério foi mantida entre 20°C e 24°C e com ciclo claro/escuro de 12/12h com as luzes acesas às 7h.

Os cálculos de número amostral foram realizados com o programa G*Power (*Franz Faul – Kiev*), a partir de dados de distribuição e erro padrão de experimentos similares do LGC. Todos os procedimentos foram aprovados no Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFSC) sob o número de protocolo 8177251119.

4.2 CAMPO ABERTO

O campo aberto (CA) é um aparato clássico utilizado para avaliar traços de emocionalidade e/ou locomoção em roedores. O aparato consiste em uma arena quadrada medindo 1 m² e com paredes de 40 cm de altura. A área dos 90 cm² centrais é considerada a região central, enquanto a área restante, contígua às paredes é considerada a área periférica. Os testes foram realizados com iluminação de 12 lux. A análise dos vídeos foi feita por meio do software ANY-maze (Stoelting Co., v. 7.04), onde foram quantificados os parâmetros: locomoção total, locomoção na região central, tempo no centro e número de visitas ao centro. Também foi calculada a porcentagem de locomoção central (locomoção central / locomoção total x 100). A locomoção total é o parâmetro principal de comportamento locomotor dos animais, enquanto os demais parâmetros relacionados à região central podem refletir refletem mais componentes do processamento emocional dos animais, e o número de visitas ao centro do aparato pode ser relacionado à tomada de risco.

4.3 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

Experimentos 1 e 2

Os animais foram testados individualmente no CA. Cada animal foi liberado no centro do aparato e seu comportamento foi analisado durante 5 minutos. Este teste foi repetido semanalmente desde o desmame dos animais (4 semanas), até a 10ª semana de vida (Figura 3). Após a 10ª semana, os animais foram retestados ao completar 12 e 16 semanas, e novamente aos 6, 12, 18 e 24 meses, resultando em 13 medidas.

No experimento 1 foram utilizados 12 animais machos de cada linhagem. Já no experimento 2 foram testadas 12 fêmeas de cada linhagem.

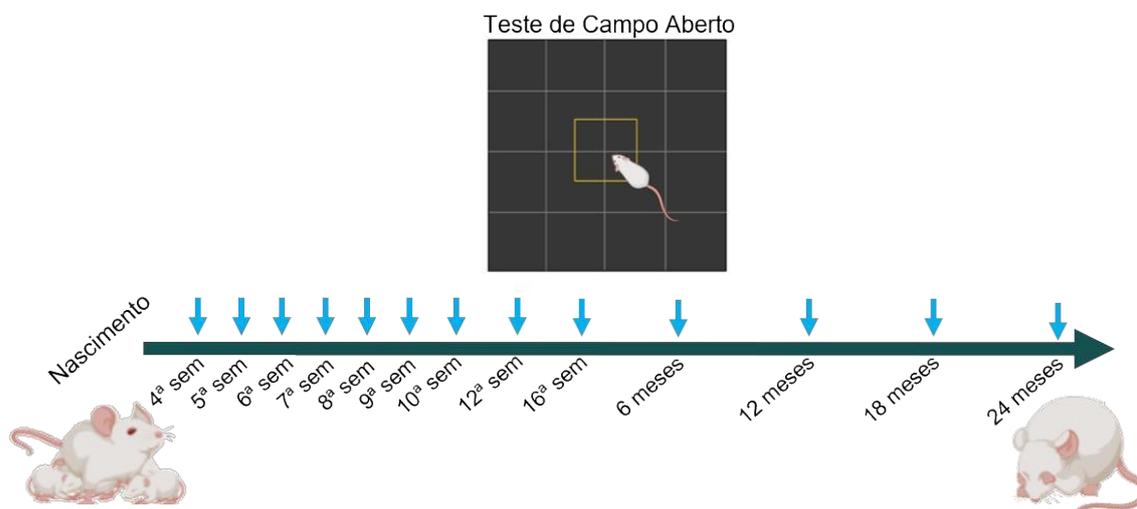


Figura 3. Desenho experimental do primeiro bloco de experimentos. Os animais retestados no campo aberto ao longo de um período de 2 anos.

4.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS E REPRESENTAÇÕES GRÁFICAS

As análises estatísticas dos resultados experimentais foram realizadas por meio do *software* Statística (StatSoft; v 10). A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e a homogeneidade das variâncias pelo teste de Levene, e a seguir os dados foram submetidos à estatística paramétrica de análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas, separadamente por sexos. Quando necessário também foi realizado o teste post-hoc de Duncan. Foram considerados significativos os resultados com $p < 0,05$. Como linhagens isogênicas podem ter efeitos mais sutis do que

linhagens heterogênicas, também consideramos efeitos marginais quando $p < 0,07$ e tendências quando $p < 0,10$. Os gráficos foram construídos por meio do *software* Prism (GraphPad, v. 6.01).

4.5 PONTO FINAL HUMANITÁRIO

Em todo o desenvolvimento do projeto (neste e nos capítulos que se seguem) foi realizado o cuidado quanto aos pontos finais humanitários. Os animais em experimentação foram observados, sendo realizada a eutanásia nos animais que apresentaram, em qualquer momento do período experimental, os seguintes aspectos: incapacidade de se mover dentro da gaiola; imobilidade mesmo ao ser estimulado; incapacidade de ingerir água e alimento, quando houve perda de peso de 20% de comparado ao início do experimento, ferimentos graves por automutilação ou brigas, tumores ou crescimento de caroços aparentes. Os casos em que a eutanásia foi considerada a opção mais cabível para minimização do sofrimento do animal, ela foi realizada através do método de sobre dose de anestésico – quetamina (300 mg/kg) e xilazina (30 mg/kg).

5. RESULTADOS

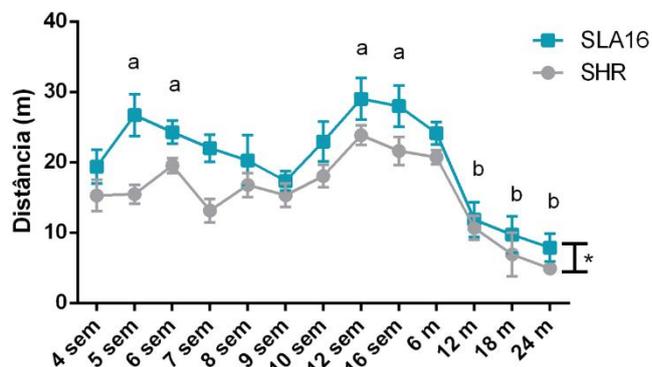
5.1 EXPERIMENTO 1 – PERFIL COMPORTAMENTAL DOS MACHOS NO CAMPO ABERTO

Para traçar o período comportamental dos machos das duas linhagens, realizamos o teste de CA repetidamente ao longo da vida dos animais (Figura 4).

A ANOVA de duas vias revelou efeito de **linhagem** para 3 parâmetros. Locomoção total [F(1,4)=107,84, p=0,005; SLA16>SHR]. Locomoção no centro [F(1,4)=28,641, p=0,006; SLA16>SHR]. Porcentagem de locomoção central [F(1,4)=12,758, p=0,0233, SLA16>SHR].

A ANOVA de duas vias também revelou efeito da **idade** para 5 parâmetros. Locomoção total [F(12,48)=18,737, p<0,001]. Podemos destacar no post-hoc, que os maiores níveis de locomoção foram nas 5^a, 6^a, 12^a e 16^a semanas e os menores nos 12, 18 e 24 meses. Locomoção no centro [F(12,48)=4,162, p=0,002], o *post-hoc* revelou que as medidas de 12 e 16 semanas e 6 meses foram as maiores. Porcentagem de locomoção central [F(12,48)=2,190, p=0,028], o *post-hoc* revelou que as medidas de 16 semanas e 12 meses foram as maiores. Tempo no centro [F(12,48)=3,200, p=0,002], o *post-hoc* revelou que as medidas de 16 semanas, 12, 18 e 24 meses foram as maiores. Visitas ao centro [F(12,48)=3,474, p=0,001], o *post-hoc* revelou que as medidas de 10, 12, 16 semanas, 6, 12 e 18 meses foram as maiores.

Não houve interação entre linhagem e idade para nenhuma das variáveis analisadas.

A Locomoção Total

Perfil Comportamental
Machos

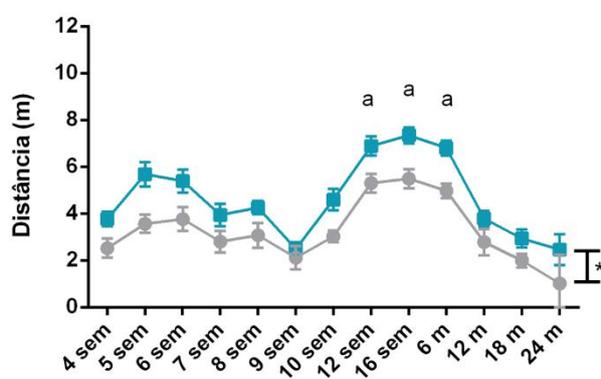
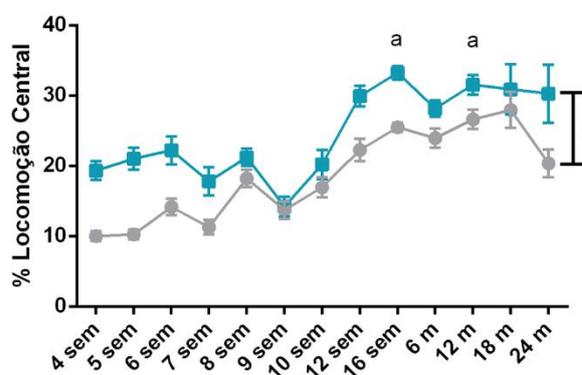
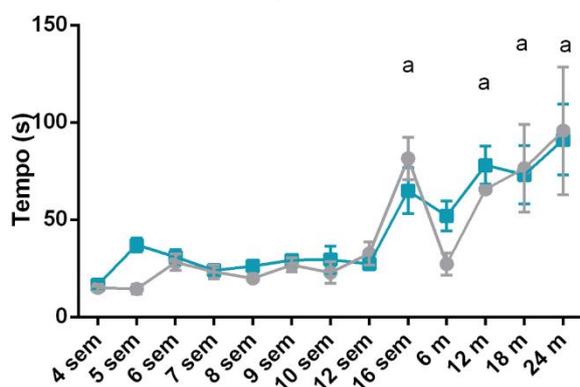
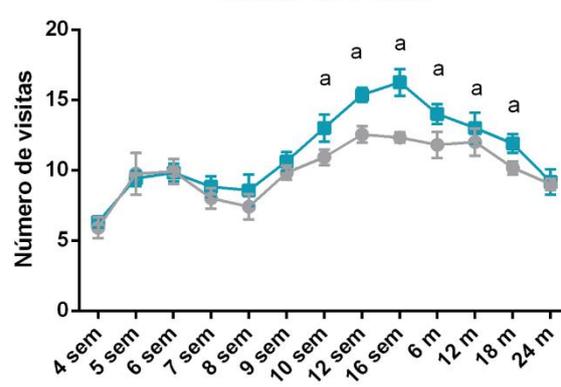
B Locomoção no Centro**C** % Locomoção central**D** Tempo no centro**E** Visitas ao centro

Figura 4. Perfil comportamental no teste de Campo Aberto ao longo da vida dos machos SHR e SLA16. A. Locomoção total; B. Locomoção na área central; C. Porcentagem de locomoção central; D. Tempo no centro; E. Visitas ao centro; * Efeito geral de linhagem $p < 0,05$; a = significativamente maiores em relação as outras semanas que não têm a letra "a"; b = significativamente menores em relação as outras semanas que não têm a letra b; post-hoc de Duncan $p < 0,05$.

5.2 EXPERIMENTO 2 – PERFIL COMPORTAMENTAL DAS FÊMEAS NO CAMPO ABERTO

Para traçar o período comportamental das fêmeas das duas linhagens, realizamos o teste de CA repetidamente ao longo da vida dos animais (Figura 5).

A ANOVA de duas vias revelou efeito de **linhagem** para 5 parâmetros. Locomoção total [F(1, 4)=21,050, p=0,005; SLA16>SHR]. Locomoção no centro [F(1,4)=23,776, p=0,003; SLA16>SHR]. Visitas ao centro [F(1,4)=27,090, p=0,002; SLA16>SHR].

A ANOVA de duas vias revelou efeito de **tratamento** para 8 parâmetros. Locomoção total [F(12,48)=25,667, p=0,001], o *post-hoc* revelou que as medidas de 12, 18 e 24 meses foram menores que as anteriores. Locomoção no centro [F(12,48)=4,327, p=0,001], o *post-hoc* revelou que a medida de 16 semanas foi maior e a de 6 meses menor que as demais. Porcentagem de locomoção central [F(12,48)=18,406, p=0,001], o *post-hoc* revelou que as medidas de 12, 18 e 24 meses foram as maiores. Tempo no centro [F(12,48)=17,701, p=0,001], o *post-hoc* revelou que as medidas de 12, 18 e 24 meses foram maiores que todas as anteriores. Visitas ao centro [F(12,48)=3,813, p=0,001], o *post-hoc* revelou que as medidas de 16 semanas e 18 meses foram maiores que as demais.

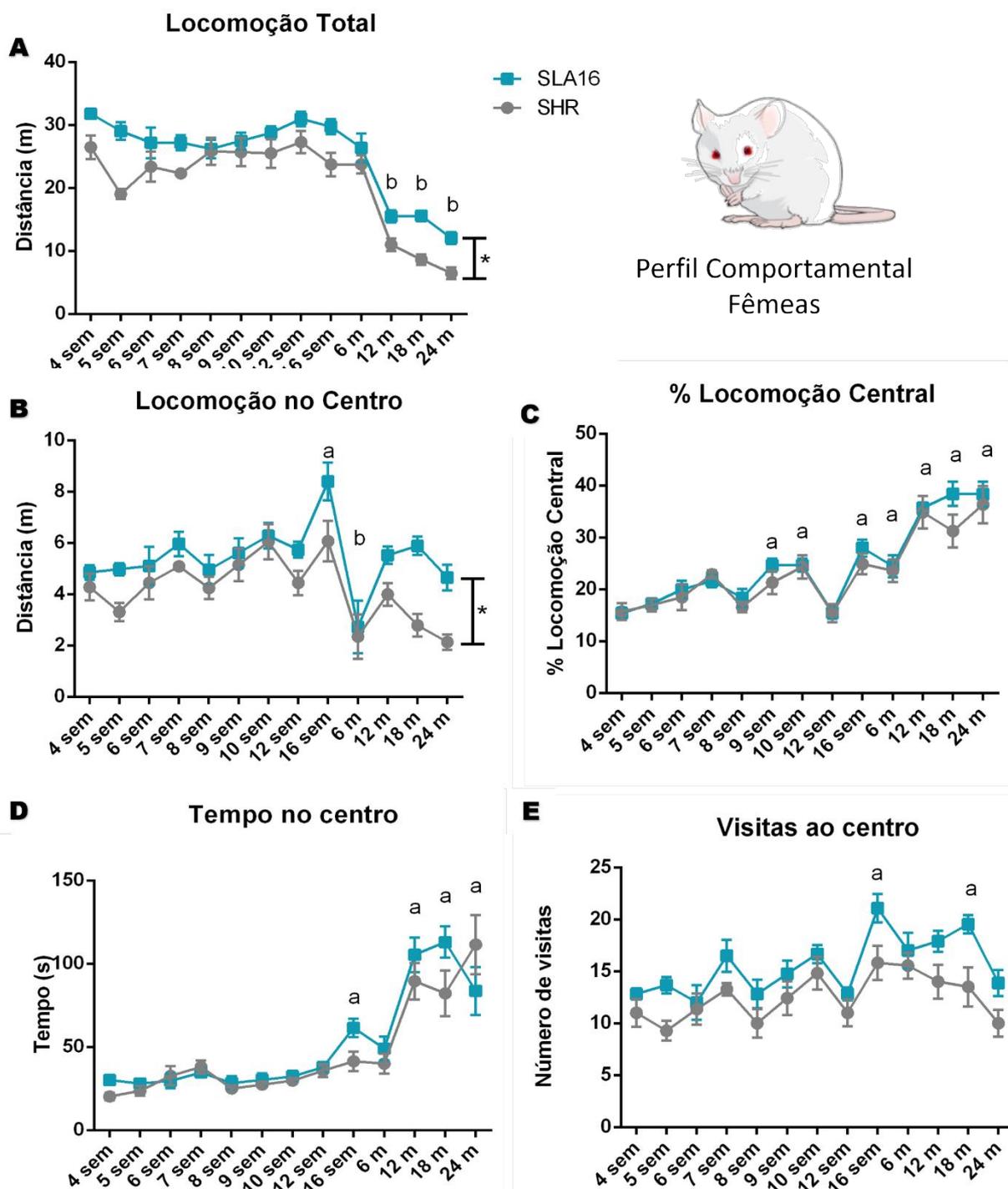


Figura 5. Perfil comportamental no teste de Campo Aberto ao longo da vida das fêmeas SHR e SLA16. A. Locomoção total; B. Locomoção na área central; C. Porcentagem de locomoção central; D. Tempo no centro; E. Visitas ao centro; * Efeito geral de linhagem $p < 0,05$; a = significativamente maiores em relação as outras semanas que não tem a letra "a"; b = significativamente menores em relação as outras semanas que não tem a letra b; post-hoc de Duncan $p < 0,05$.

6. DISCUSSÃO

Neste capítulo, avaliamos o perfil comportamental de machos e fêmeas das linhagens SHR e SLA16 ao longo da vida. Para isso, realizamos o teste de CA repetidamente em diferentes idades destes animais. Em suma, animais da linhagem SLA16 se locomovem mais e se arriscam mais no centro do aparato, do que animais SHR, ao longo de toda a vida. Também encontramos mudanças de perfil comportamental ao longo da vida nos dois sexos.

O efeito geral de linhagem revelou que os SLA16 se locomovem mais do que os SHR durante praticamente toda a vida no CA, tanto os machos quanto as fêmeas. Neste tipo de paradigma o animal é colocado em uma situação de conflito entre seu instinto exploratório e de cautela (PRUT; BELZUNG, 2003). Grande parte dos animais, nesta situação, exhibe o comportamento de tigmotaxia – uma tendência a permanecer próximo às paredes evitando áreas mais abertas. Acredita-se que esse é um comportamento adaptativo importante, uma vez que permite que o animal esconda-se rapidamente de predadores, além de facilitar a orientação espacial (PADILLA et al., 2009). O CA é um aparato amplamente validado para avaliar este tipo de comportamento como indicativo de medo ou ansiedade, sendo suprimido por drogas ansiolíticas ou exacerbado por drogas ansiogênicas (PRUT; BELZUNG, 2003).

Além disso, já foi demonstrado que o comportamento no CA pode ser modulado por seleção artificial de cruzamentos (BELZUNG; GRIEBEL, 2001). Este é o caso também da linhagem SLA16, que a partir do cruzamento entre linhagens contrastantes para a locomoção no centro do CA, desenvolveu um comportamento hiperlocomotor e de baixa ansiedade quando comparada às linhagens parentais (DE MEDEIROS et al., 2013).

Esta diferença no comportamento entre SHR e SLA16, apesar de bastante interessante, já foi demonstrado em animais adultos em diversos trabalhos do nosso grupo (ACUÑA et al., 2018; ANSELMINI et al., 2016; DE MEDEIROS et al., 2014; PÉRTILE et al., 2017; VELÁZQUEZ et al., 2019). Mas pela primeira vez demonstramos a influência da RGD também no período da infância, adolescência e na idade avançada.

Granzotto e seus colaboradores (submetido) demonstraram que, após repetidas exposições, as linhagens SHR e SLA16 mantêm o perfil exploratório

no CA com alta locomoção e intensa exploração da região aversiva, ambos mais evidentes nos SLA16. Este fato levantou questionamentos a respeito da habituação destes animais ao aparato e levou à realização do presente protocolo. A locomoção em um ambiente novo é considerada um comportamento de resposta ao estresse e a habituação ao ambiente, uma forma de estratégia de enfrentamento (*coping*) a eventos estressores (MCNAUGHTON, 1982). Mais especificamente, a habituação no CA representa um aprendizado não associativo dependente do hipocampo (POVEDA et al., 2020). Diferentes neurocircuitarias influenciam a habituação dos roedores, mas os neurotransmissores que merecem destaque neste contexto são: dopamina, serotonina, acetilcolina e glutamato (LEUSSIS; BOLIVAR, 2006).

É interessante pontuar que a habituação neste tipo de protocolo de exploração é diferente da habituação elicitada por protocolos com estímulos externos mais intensos, como choques ou mesmo tons altos. Essas duas formas de habituação diferem nas neurocircuitarias envolvidas e podem sofrer modulação farmacológica divergente (GRANT, 1974; LANGEN; DOST, 2011; LEATON, 1981; WILLIAMS; HAMILTON; CARLTON, 1974). Como demonstrado por Williams e colaboradores ainda na década de 1970, este tipo de habituação deve envolver a neurotransmissão colinérgica, que em última análise deve ser bastante similar entre SLA16 e SHR, uma vez que não envolve diretamente genes da RGD. Ao mesmo tempo que isto explicaria a falta de habituação das duas linhagens ao CA, algumas hipóteses precisam ser levantadas para explicar o fato que os animais SLA16 apresentam uma consistente e maior atividade locomotora ao longo da vida neste aparato.

Wong e colegas (2003) demonstraram que a deleção genética do receptor D1 desencadeia um fenótipo hiperativo com prejuízo de habituação, perfil similar ao exibido por SHR e SLA16. Como este gene não se localiza na RGD, bem como outros genes dopaminérgicos, serotoninérgicos e colinérgicos, estes sistemas, pelo menos diretamente, são menos promissores para explicar a falta de habituação comportamental observada em SHR e SLA16. Por outro lado, Carey e colegas (1998) demonstraram que o antagonismo farmacológico do receptor glutamatérgico NMDA também induz um perfil hiperativo com prejuízo de habituação, indicando que este parece ser um sistema de neurotransmissão candidato para explicar os comportamentos exibidos por ratos SHR e SLA16.

Enquanto que na literatura vemos que a linhagem SHR apresenta um prejuízo de habituação comportamental (HENDLEY et al., 1985; LANGEN; DOST, 2011; VAN DEN BUUSE; DE JONG, 1988), Stohr e colaboradores (1998) demonstraram que ratos LEW habitam-se rapidamente entre repetidas exposições ao CA, e discutem que isto pode ter relação com o sistema dopaminérgico e a alta expressão de receptores GABAA desta linhagem.

Sabe-se que a região Anxrr16 (RGD) é contraintuitiva, ou seja, manifesta-se no sentido contrário ao esperado, uma vez que o cruzamento de SHR (uma linhagem de baixos índices de ansiedade experimental) com LEW (uma linhagem de maiores índices) resulta em uma linhagem de níveis ainda mais baixos do que a SHR. Este resultado é interessante, uma vez que nas primeiras hibridizações das duas linhagens, animais heterozigotos para esta região apresentaram índices intermediários de ansiedade. No entanto, quando isolamos os alelos LEW em homozigose na RGD, em um *background* genético todo SHR, resultando na linhagem SLA16, manifestou-se um efeito que superou as parentais. Apesar de curioso, efeitos transgressivos e contraintuitivos não são incomuns neste tipo de abordagem de análise de QTL (RAMOS et al., 1999; DE MEDEIROS et al., 2013; 2014).

Desta maneira, o conjunto de dados experimentais citados acima sugerem que alelos de genes da RGD, provenientes do LEW, devem ter exacerbado o comportamento hiperlocomotor dos animais SLA16 ao longo de toda a vida, algo interessante no contexto do estudo dos endofenótipos do TDAH.

Quando comparamos as duas linhagens, podemos observar algumas mudanças de perfil ao longo do desenvolvimento e, também, em fases mais avançadas da vida dos animais. Logo após o desmame (com 4 semanas) a atividade motora no CA estava em torno de 17 metros para os machos e 28 metros para as fêmeas, aumentando nas semanas 5 e 6 e voltando aos níveis basais em seguida. O pico de atividade motora foi atingido no final do desenvolvimento e início da fase adulta (12 e 16 semanas), voltando a cair a partir dos 6 meses e diminuindo drasticamente a partir de um ano de idade.

Trabalhos que avaliaram a locomoção no CA em diferentes idades demonstram que os machos SHR atingem o pico de locomoção entre 10 e 15

semanas (HENDLEY et al., 1985). Hsieh e Chang (2008) compararam o comportamento dos animais SHR com o seu controle genético clássico WKY das 4 semanas até um ano. Eles demonstraram que os SHR têm um aumento na distância total percorrida na 5ª semana de vida, e que a partir daí eles mantêm seu perfil hiperativo pelo menos até os 12 meses de idade. Neste trabalho, eles ainda sugerem uma queda do 6º para o 12º mês na locomoção dos SHR, um perfil bastante similar ao expressado tanto por SHR quanto por SLA16, no presente trabalho. A queda na atividade locomotora dos animais mais velhos reflete o padrão observado em ratos, mesmo de outras linhagens (ALTUN et al., 2007). Este declínio na locomoção reflete alguns prejuízos comuns do processo de envelhecimento, como a perda de massa muscular esquelética e déficits no sistema sensoriomotor (ALTUN et al., 2007; BERGMAN; ULFHAKE, 2002; ULFHAKE; BERGMAN; FUNDIN, 2002).

Podemos observar que na medida locomoção total, machos e fêmeas das linhagens SHR e SLA16 já apresentam um nível de atividade locomotora diferente desde as 4 semanas de idade (algo como a infância em seres humanos), quando foram recém desmamados. Este dado inédito, sugere que as diferenças nos níveis de atividade locomotora já existem antes mesmo da completa maturação de vias dopaminérgicas e abrem espaço para o envolvimento de outros sistemas no controle da hiperatividade (ANDREOLLO et al., 2012; MA; MA; ZHANG, 2018). Não foram observadas interações entre linhagem e repetição, indicando que de maneira geral ambas as linhagens seguem o mesmo padrão de desenvolvimento, apesar da diferença de escala.

Quanto aos parâmetros emocionais avaliados, a linhagem SLA16 exibiu um perfil de menor ansiedade/emocionalidade e de maior tomada de risco do que os SHR. Outros trabalhos do nosso grupo também já tinham sugerido esse padrão comportamental, em animais adultos (ANSELMINI et al., 2016; DE MEDEIROS et al., 2013; PÉRTILE et al., 2017; VELÁZQUEZ et al., 2019). Mas aqui expandimos, pela primeira vez, esse perfil comportamental constante para todo o período de vida dos animais, um dado muito importante no sentido de uma validação comportamental de um novo modelo genético, que supostamente será importante no estudo do TDAH.

O perfil comportamental dos animais SHR e SLA16 apresenta algumas particularidades dependendo do sexo e da idade dos animais. Quanto ao perfil

locomotor das fêmeas no CA, observamos que elas têm escores muito mais altos que os machos, logo após o desmame (cerca de 30 metros, contra 17 dos machos). Estes dados estão em acordo com outros trabalhos da literatura que mostraram este dimorfismo sexual na linhagem SHR (BAYLESS; PEREZ; DANIEL, 2015; HENDLEY et al., 1985; RAMOS et al., 1997, 2002). Este perfil de maior locomoção das fêmeas no CA tem sido demonstrado também em outras linhagens, de maneira consistente na literatura (ALSTOTT; TIMBERLAKE, 2009; MASUR; SCHUTZ; BOERNGEN, 1980; MILLER et al., 2021; PADILLA et al., 2009; SELIGER, 1977).

Hendley e colegas (1985) reportaram que fêmeas SHR exibem dois picos de atividade locomotora no CA, um no fim da adolescência (por volta das 10 semanas) e outro por volta dos 8 meses. Além disso, este trabalho demonstrou que durante todo o período analisado (4 a 56 semanas) as fêmeas exibem maior locomoção do que os machos. Nossos dados corroboram o perfil hiperativo das fêmeas SHR em relação aos machos, e demonstram que a linhagem SLA16 também exhibe este padrão. Diferentemente dos machos, a locomoção das fêmeas diminui um pouco de 5 semanas a 6 meses, mas ainda se mantém alta na comparação. Da mesma forma que os machos, a locomoção cai drasticamente a partir de um ano de idade.

Quanto à locomoção central no CA, observamos um aumento no início da fase adulta, que se sustentou até os 6 meses, caindo a partir de um ano de vida dos animais, indicando que SLA16 e SHR tem este perfil de baixa emocionalidade até a idade avançada. A avaliação do tempo no centro demonstrou um perfil parecido, apesar de ser um parâmetro com maior amplitude de variação, demonstrou que na fase de idade mais avançada (a partir dos 12 meses) os animais gastam cerca de um terço do tempo total do teste especificamente nesta região mais aversiva. De fato, o desenvolvimento da linhagem SLA16 foi pautado no comportamento emocional, para investigar as bases genéticas das diferenças exibidas entre LEW e SHR, tendo como principal indicador a locomoção no centro do CA (DE MEDEIROS et al., 2013).

Outro ponto interessante foi a observação do aumento do número de visitas ao centro a partir das 10 semanas que atinge o pico em 16 semanas e se mantém maior que os níveis iniciais até os 18 meses, revelando que este período poderia ser considerado como o de maior impulsividade dos machos destas duas

linhagens. A impulsividade é um dos fenótipos-chave na tríade de sintomas do TDAH. Adicionalmente, alguns autores discutem que seria um dos traços mais importantes de serem elucidados e controlados nesse transtorno, uma vez que está intimamente ligado a adoção de comportamentos de risco e da predisposição ao desenvolvimento da drogadição e de outras adições que comprometem a vida do indivíduo (KRAIN; CASTELLANOS, 2006; URCELAY; DALLEY, 2012).

Quanto aos parâmetros emocionais especificamente das fêmeas, a locomoção central não apresenta diferenças tão consistentes na fase adulta, comparada a fase de desenvolvimento. A porcentagem de locomoção central, no entanto aumentou de maneira mais consistente na fase adulta das fêmeas, e da mesma forma que nos machos, atingiu os maiores escores a partir de um ano de vida. O tempo no centro também aumentou muito a partir de um ano, quando as fêmeas passaram mais de um terço do tempo total do experimento na região central.

7. CONCLUSÕES DO CAPÍTULO 1

Em síntese, com os presentes dados experimentais, não foi possível rejeitar a nossa primeira hipótese de que animais da linhagem SLA16 apresentam comportamentos relacionados ao TDAH mais exacerbados, do que os animais SHR, ao longo de toda a vida. Desta maneira, trabalhando com a premissa que animais SLA16 seriam então um modelo genético mais interessante para se avaliar comportamentos relacionados ao TDAH e postulando que estas características se devam ao sistema glutamatérgico, nós iniciamos o segundo capítulo desta Tese.

CAPÍTULO 2

8. HIPÓTESE DO CAPÍTULO 2

A hipótese que foi testada neste capítulo é de que animais SLA16 são mais sensíveis aos fármacos que atuam no receptor NMDA do que os SHR.

Ou seja, como os animais SLA16 apresentam problemas de habituação ao CA e se apresentam mais hiperativos, que os SHR, desde as 4 semanas de idade, nós investigamos a participação do sistema glutamatérgico como candidato a explicar estas diferenças comportamentais. Assim, nós postulamos que os alelos da linhagem LEW, que estão presentes nos genes da RGD nos animais SLA16, devem alterar molecularmente o funcionamento do receptor NMDA. Esta alteração poderia causar aumento de sensibilidade comportamental aos fármacos que atuam no receptor NMDA, nos animais SLA16. Caso esta hipótese seja verdadeira, podemos sugerir a participação do receptor NMDA nos comportamentos exacerbados dos animais SLA16, como demonstrado no capítulo anterior.

9. OBJETIVOS CAPÍTULO 2

9.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a participação dos receptores NMDA no perfil comportamental dos ratos SLA16 e SHR.

9.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar as respostas locomotoras e emocionais dos machos de ambas as linhagens frente à administração sistêmica de antagonistas do receptor NMDA.
- Avaliar as respostas locomotoras e emocionais das fêmeas de ambas as linhagens frente à administração sistêmica de antagonistas do receptor NMDA.

10. MATERIAL E MÉTODOS

10.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*) das linhagens SHR (*Spontaneously Hypertensive Rats*) e SLA16 (SHR.LEW/Anxrr16) de ambos os sexos criados no Laboratório de Genética do Comportamento. A idade média dos animais durante os testes foi de 4 meses. Os animais foram mantidos em grupos de até 6 indivíduos por gaiola. A temperatura do biotério foi mantida entre 20°C e 24°C e com ciclo claro/escuro de 12/12h com as luzes acesas às 7h.

Os cálculos de número amostral foram realizados com o programa G*Power (*Franz Faul – Kiev*), a partir de dados de distribuição e erro padrão de experimentos similares do grupo. O trabalho foi realizado mediante aprovação do comitê de ética para o uso de animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC 8177251119).

10.2 CAMPO ABERTO

O protocolo do teste CA foi o mesmo já descrito anteriormente (seção 4.4, pág. 21). Nesta etapa, durante os 5 minutos de teste, também foram quantificados os parâmetros: locomoção total, locomoção na região central, tempo no centro, número de visitas ao centro, velocidade média, velocidade máxima e latência para a primeira saída do centro. Também foi calculada a porcentagem de locomoção central ($\text{locomoção central} / \text{locomoção total} \times 100$).

10.3 DROGAS

A droga usada nos experimentos 3 e 4 foi o MK-801 - um antagonista de NMDAR. O MK-801 (Sigma Aldrich) foi diluído em soro fisiológico (NaCl 0,9%). Os grupos controles receberam injeção do veículo. A administração foi realizada por via intraperitoneal (IP). O volume injetado foi padronizado em 2 ml/kg para injeções IP.

10.4 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

Experimentos 3 e 4

Nestes experimentos os animais foram avaliados quanto a resposta a um antagonista do receptor NMDA, o MK-801 (Figura 6). A administração foi feita por via intraperitoneal (IP), nas doses de 0,01 mg/kg; 0,03 mg/kg; 0,1 mg/kg e 0,3 mg/kg de MK-801 ou veículo (NaCl 0,9%). Após 30 minutos os animais foram liberados no centro do CA e o seu comportamento foi analisado durante 5 minutos.

Para o experimento 3 foram utilizados 8 animais machos com idade entre 4 e 5 meses de idade, para cada um dos 10 grupos experimentais. Para o experimento 4 foram utilizadas 8 fêmeas, também com 4 a 5 meses de idade, para cada um dos 10 grupos experimentais.

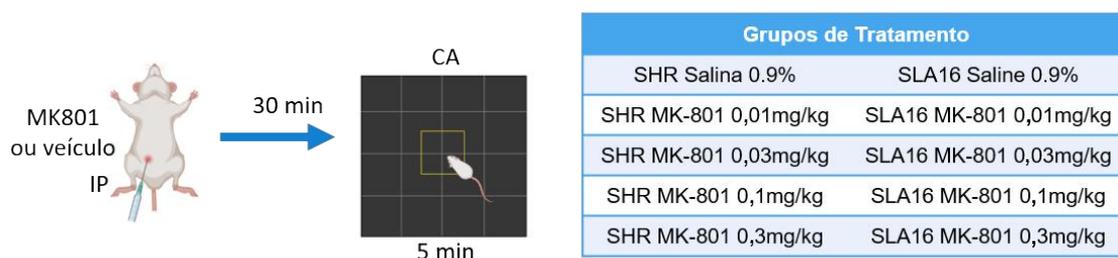


Figura 6. Desenho experimental dos experimentos 3 e 4. Os animais receberam droga ou veículo por via intraperitoneal (IP) e após 30 minutos foram colocados no teste de Campo Aberto (CA) por 5 minutos. Os grupos de tratamento estão discriminados na tabela da figura.

10.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS E REPRESENTAÇÕES GRÁFICAS

As análises estatísticas dos resultados experimentais desta seção seguiram a mesma lógica do capítulo anterior (seção 3.4) e foram realizadas utilizando o *software Statistica*. Neste capítulo, os dados foram submetidos à estatística paramétrica com análise de variância (ANOVA) de duas vias (fatores: linhagem e tratamento), separadamente por sexo. Quando aplicável também foi realizado o teste *post-hoc* de Duncan. Os gráficos desta seção também foram construídos por meio do software Prism (GraphPad, v. 6.01).

11. RESULTADOS

11.1 EXPERIMENTO 3 – EFEITO DO MK-801 SOBRE O COMPORTAMENTO DOS MACHOS

Para avaliar se o MK-801 teria um efeito diferente nos machos das duas linhagens, realizamos o protocolo de campo aberto após a administração sistêmica da droga (Figura 7).

A ANOVA de duas vias apontou um efeito significativo do fator **tratamento** para 5 parâmetros comportamentais. A seguir estão descritos os valores da ANOVA e os resultados do teste post-hoc de Duncan: Locomoção total [F(4, 62)=20,605, $p<0,001$], o teste *post-hoc* revelou que as doses de 0,1 e 0,3 mg/kg diminuíram a locomoção total. Locomoção central [F(4, 62)=13,505, $p<0,001$], o *post-hoc* mostrou que as doses de 0,01mg/kg; 0,1 mg/kg e 0,3mg/kg diminuíram a locomoção central. Tempo no centro [F(4, 62)=3,7932, $p=0,008$], o *post-hoc* demonstrou que as doses 0,03 mg/kg e 0,1 mg/kg permaneceram mais tempo no centro que o grupo controle. Visitas ao centro [F(4, 62)=4,9040, $p=0,002$], o *post-hoc* demonstrou que o grupo 0,3 mg/kg visitou menos o centro do que os demais grupos. Porcentagem de locomoção central [F(4, 62)=5,612, $p<0,001$], o *post-hoc* demonstrou que o grupo 0,03 mg/kg teve maior porcentagem que os demais grupos.

A ANOVA de duas vias também revelou efeito significativo de interação entre **linhagem** e **tratamento** para 4 parâmetros sugerindo efeitos farmacogenéticos. A seguir estão descritos os valores da ANOVA e a descrição dos resultados do teste post-hoc de Duncan, Locomoção total [F(4, 62)=9,5492, $p<0,001$], o *post-hoc* revelou que as doses de 0,01 mg/kg; 0,1 mg/kg e 0,3 mg/kg diminuíram a locomoção da linhagem SLA16, em relação ao grupo veículo, enquanto apenas a dose 0,3 mg/kg diminuiu a locomoção da linhagem SHR. Locomoção central [F(4, 62)=22,554, $p<0,001$], o *post-hoc* demonstrou que as doses de 0,01 mg/kg; 0,1 mg/kg e 0,3 mg/kg diminuíram a locomoção da linhagem SLA16, em relação ao grupo veículo, enquanto a dose 0,1 mg/kg aumentou a locomoção central da linhagem SHR, em relação ao grupo veículo. Número de visitas ao centro [F(4, 62)=6,7896, $p=0,013$], o *post-hoc* demonstrou que todas doses diminuíram este parâmetro nos SLA16 e a dose de 0,3 mg/kg diminuiu este parâmetro também nos SHR, em relação aos respectivos grupos

veículo. Além disso, o grupo SLA16 controle visitou mais o centro que o veículo SHR. Porcentagem de locomoção central [$F(4, 62)=9,8060, p<0,001$] e *post-hoc* demonstrou que as doses de 0,1 e 0,3 mg/kg diminuíram e a dose de 0,03 mg/kg aumentou este parâmetro apenas nos SLA16 e o grupo veículo SLA16 teve maior porcentagem que o grupo veículo SHR.

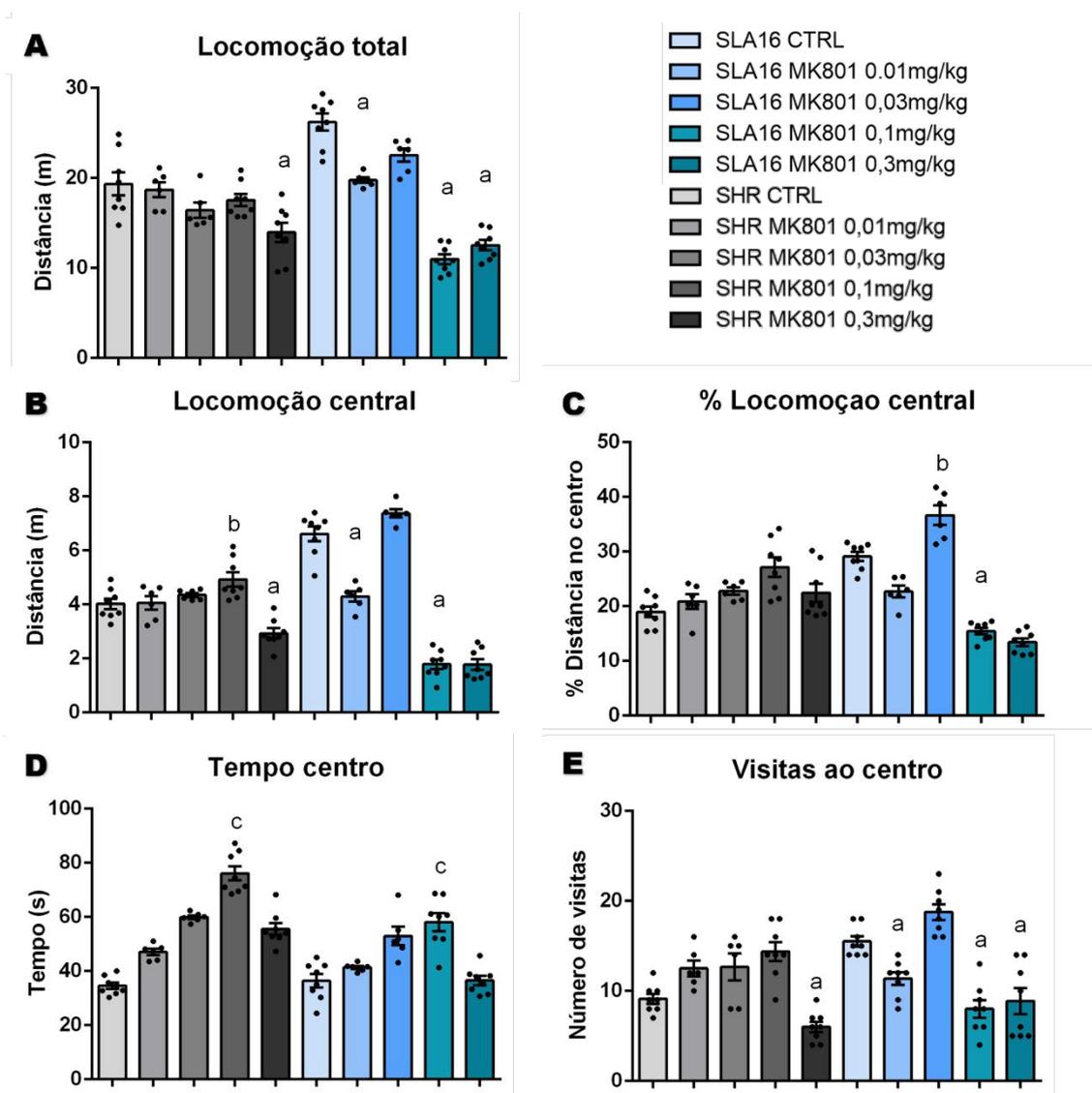


Figura 7. Efeito do MK-801 no comportamento dos machos no campo aberto. A. Locomoção Total; B. Locomoção central; C. Porcentagem de locomoção total; D. Tempo no centro. E. Visitas ao centro. CTRL = grupo salina 0,9%. a $p < 0,05$, interação entre linhagem e tratamento, menor que o veículo. b $p < 0,05$, interação entre linhagem e tratamento, maior que o veículo.

11.2 EXPERIMENTO 4 – EFEITO DO MK-801 SOBRE O COMPORTAMENTO DAS FÊMEAS

Para avaliar se o MK-801 teria um efeito diferente nas fêmeas das duas linhagens realizamos o protocolo de Campo Aberto após administração sistêmica da droga (Figura 8).

A ANOVA de duas vias revelou efeito de **linhagem** em 4 medidas comportamentais. Locomoção total [F(1, 62)=22,636, $p<0,001$; SLA16>SHR], locomoção central [F(1, 62)=5,181, $p=0,026$; SLA16>SHR], número de visitas ao centro [F(1, 62)=4,5497, $p=0,037$; SLA16>SHR], e porcentagem de locomoção central [F(1, 62)=9,926, $p=0,039$, SLA16>SHR].

A ANOVA revelou efeito de **tratamento** para 5 medidas comportamentais. A seguir estão descritos os valores da ANOVA e a descrição dos resultados do teste *post-hoc* de Duncan: Locomoção total [F(4, 62)=9,633, $p<0,001$]. O *post-hoc* revelou que o grupo 0,3 mg/kg teve menor locomoção que os demais grupos. Locomoção central [F(4, 62)=17,984, $p<0,001$]. O *post-hoc* revelou que os grupos 0,01 e 0,03 mg/kg aumentaram e o 0,3 mg/kg diminuiu este parâmetro, em relação ao grupo controle. Tempo no centro [F(4, 62)=8,052, $p<0,001$]. O *post-hoc* revelou que os grupos 0,01 mg/kg e 0,03 mg/kg aumentaram este parâmetro, em relação aos demais grupos. Número de visitas ao centro [F(4, 62)=12,264, $p<0,001$]. O *post-hoc* revelou que os grupos de 0,01 e 0,03 mg/kg aumentaram e o de 0,3 mg/kg diminuiu este parâmetro, em relação ao grupo controle. Porcentagem de locomoção central [F(4, 62)=12,037, $p<0,001$]. O *post-hoc* revelou que as doses de 0,01 e 0,03 mg/kg aumentaram e a dose de 0,3 mg/kg diminuiu este parâmetro, em relação ao grupo controle.

Também houve uma tendência a interação entre **linhagem e tratamento** para o tempo no centro [F(4, 62)=2,117, $p=0,080$], em que o teste *post-hoc* revelou que a dose de 0,01mg/kg só aumentou o tempo no centro da linhagem SHR.

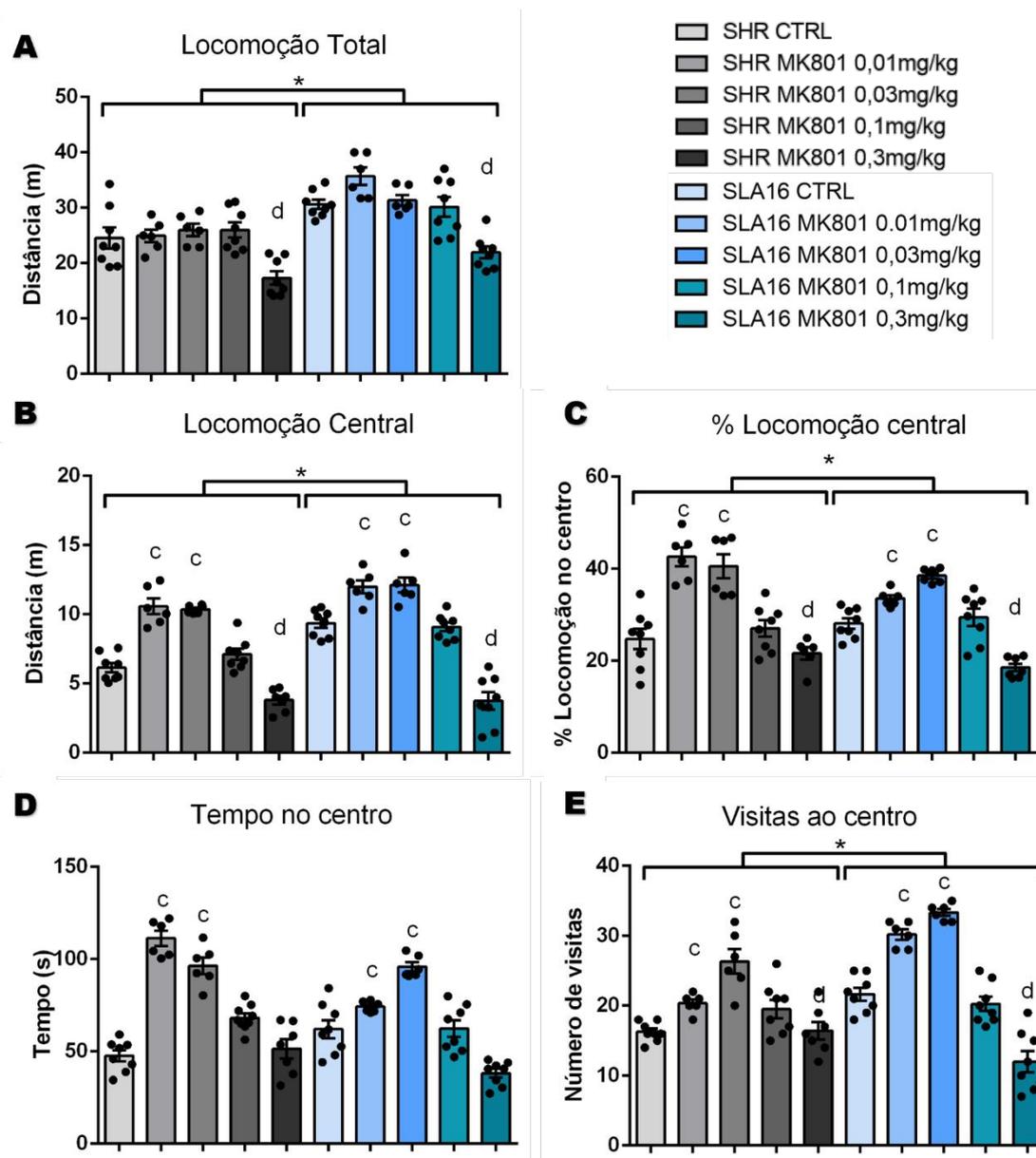


Figura 8. Efeito da administração de MK-801 no comportamento das fêmeas no Campo Aberto. A. Locomoção total; B. Locomoção na área central; C. Visitas ao centro; D. Tempo no centro; E. Visitas ao centro. * Efeito geral de linhagem $p < 0,05$; c Efeito de tratamento, maior que o veículo, $p < 0,01$; d Efeito de tratamento, menor que o veículo, $p < 0,01$.

12. DISCUSSÃO

Neste capítulo, avaliamos a participação dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA no controle da atividade locomotora e emocional das linhagens SHR e SLA16. Para tanto, realizamos o teste do CA com diferentes doses do antagonista MK-801 em machos e fêmeas. Resumidamente, machos da linhagem SLA16 apresentaram maior sensibilidade comportamental a esta droga do que os SHR. Também encontramos mudanças de perfil comportamental após tratamento entre os sexos, onde pudemos observar um efeito farmacogenético apenas nos machos, enquanto as fêmeas exibiram efeitos de tratamento mais robustos.

O uso de antagonistas do receptor NMDA de maneira aguda estimula a atividade motora e o metabolismo de dopamina, da mesma maneira que os psicoestimulantes clássicos (SUKHANOV et al., 2004). Entretanto, nos machos, a dose mais alta de MK-801 (0,3 mg/kg) reduziu a locomoção total, central, tempo no centro e número de visitas ao centro de ambas as linhagens.

Alguns trabalhos na literatura demonstram um perfil diferente de resposta de outras linhagens de rato à administração aguda de MK-801. No geral, este tipo de intervenção parece induzir uma hiperlocomoção nos animais (FEINSTEIN; KRITZER, 2013). Contudo, estes trabalhos envolveram ratos de outras linhagens com padrão de atividade locomotora considerado normal, não-hiperativas. A inversão de resposta observada no presente trabalho pode ser devida a um efeito teto de locomoção dos nossos animais modelos de hiperatividade.

Devido a um padrão de resultados bastante parecido ao exibido em resposta aos psicoestimulantes dopaminérgicos, Sukhanov e colegas ainda propõe que o antagonismo dos receptores NMDA pode ser bastante promissor no tratamento do TDAH (SUKHANOV et al., 2004). Esta via sistêmica possui influência em diversas regiões encefálicas, bem como em diversos sistemas de neurotransmissão, o que é uma limitação bastante importante até o momento. No entanto, vale destacar que conforme a tecnologia de *delivery* farmacológico direcionado avançar, permitindo ação restrita a neurocircuitarias específicas, esta ainda pode ser uma via de enorme potencial terapêutico no contexto do TDAH.

De maneira interessante, os dados do experimento 3 demonstraram um efeito farmacogenético das doses de 0,01 mg/kg; 0,03 mg/kg e 0,1 mg/kg de MK-801. Isto é, o efeito do MK-801 nestas doses dependeu da linhagem (ou genótipo) em que foi aplicado. Enquanto a dose mais baixa (0,01 mg/kg) foi capaz de diminuir a atividade locomotora, emocional e impulsividade dos SLA16, esta não teve qualquer efeito nos SHR. Este perfil mais resistente dos SHR, também foi observado para a dose de 0,03 mg/kg, que aumentou a porcentagem de exploração da região aversiva apenas nos SLA16. Curiosamente, a dose de 0,1 mg/kg aumentou levemente a locomoção no centro dos SHR enquanto diminuiu de maneira significativa esta medida comportamental nos SLA16.

Sukhanov e colaboradores (2004) reportaram que machos SHR são mais resistentes ao efeito comportamental do MK-801 no CA, quando comparados aos WKY. Porém, é importante lembrar que nos SHR a resposta hiperlocomotora pode ser limitada por um efeito teto de uma linhagem naturalmente hiperativa diferentemente de outras linhagens que reportam um grande aumento na atividade locomotora induzido pelo MK-801.

Também demonstrou-se que a dose de 0,3 mg/kg de MK-801 diminui a exploração do centro dos SHR, enquanto aumentou dos WKY (SUKHANOV *et al.*, 2004). Nossos dados corroboram os efeitos ansiogênicos dessa alta dose nos SHR, e demonstram que os SLA16, apesar de mais sensíveis - uma vez que já exibem resposta à dose de 0,1 mg/kg, respondem no mesmo sentido.

Yao e Lawrence (2005) demonstraram através de ensaios de hibridização *in situ* que os animais SHR tem uma maior densidade de ligação a receptores NMDA no *locus coeruleus* do que seu controle genético WKY. Isto pode significar que os SHR têm uma maior expressão deste receptor comparado ao WKY. Sabe-se que nesta região existem receptores NMDA pré-sinápticos em terminais GABAérgicos e noradrenérgicos e que esses se expressam de maneira diferencial entre SHR e WKY (KAEHLER *et al.*, 2004). Isso é um indício de que, pelo menos nesta região, a via do NMDA regula estes dois outros sistemas, exercendo influência no controle autonômico e na função sensorial, o que pode ser uma das explicações dos comportamentos contrastantes nessas duas linhagens (KAEHLER *et al.*, 2004).

Quanto a impulsividade, já foi demonstrado que a dose de 0,3 mg/kg de MK-801 é capaz de melhorar este parâmetro no teste de tolerância ao atraso de recompensa (*tolerance to delay of reward*) nos SHR (SUKHANOV *et al.*, 2004). Nossos dados demonstram que essa dose foi capaz de diminuir o número de visitas ao centro do CA, indicando que os animais se arriscaram menos, corroborando uma diminuição da impulsividade. Nesse parâmetro, também foi possível observar uma maior sensibilidade da linhagem SLA16 que respondeu de maneira similar já a doses mais baixas.

Apesar de a estatística não ter revelado o efeito geral de linhagem observado anteriormente, o teste post-hoc da interação entre linhagem e tratamento revelou que o grupo controle SLA16 teve maior locomoção total, central, porcentagem de locomoção central e visitou mais o centro que o grupo controle SHR. Estes dados corroboram o perfil hiperativo, de menor emocionalidade e maior impulsividade dos SLA16 em relação aos SHR. Já quando administramos o MK-801 nas fêmeas, observamos resultados diferentes dos encontrados em machos. Nas fêmeas foi possível observar o efeito geral de linhagem de maneira consistente nos parâmetros locomotores e nos emocionais, confirmando que as fêmeas SLA16 também apresentam um perfil hiperativo, de menor emocionalidade e possivelmente maior impulsividade quando comparadas às SHR (DE MEDEIROS *et al.* 2013, ANSELMINI *et al.* 2016, ACUÑA *et al.* 2018)

No experimento 4, pode-se observar efeitos mais robustos do MK-801 nas fêmeas do que o observado nos machos. A dose mais alta foi capaz de diminuir a atividade motora, parâmetros emocionais e as visitas ao centro do CA. Já as doses de 0,01 mg/kg e 0,03 mg/kg não alteraram a locomoção total, mas aumentaram a exploração e tempo no centro, tendo um efeito tipo-ansiolítico em ambas as linhagens. Estas doses também aumentaram as visitas ao centro, podendo ter induzido uma maior impulsividade nas fêmeas.

Feinstein e Kritzer (2013) demonstraram que as fêmeas exibem uma maior sensibilidade comportamental aos efeitos do MK-801. Neste trabalho, os machos exibiram um aumento de locomoção apenas na dosagem mais alta (0,2 mg/kg), enquanto as fêmeas tiveram esta resposta para as doses de 0,1 e 0,2 mg/kg. É interessante notar que este trabalho foi desenvolvido com ratos Sprague-Dawley, uma linhagem não-hiperativa. A escassez de outros trabalhos

na literatura com protocolos parecidos realizados com fêmeas SHR certamente dificulta a interpretação dos nossos resultados.

Na análise comportamental das fêmeas, não observamos os efeitos farmacogenéticos quanto a resposta ao MK-801, revelado pela inexistência de interação entre linhagem e tratamento. A manifestação dos fenótipos influenciados pelo *Anxrr16* parece sofrer grande influência do sexo, e já foi demonstrado que nas fêmeas os parâmetros emocionais avaliados no CA são mais facilmente observados na fase de diestro-proestro (IZÍDIO et al., 2011). Além disso, outros fatores também podem explicar essa diferença de resposta em relação aos machos. Por exemplo, sabe-se que o perfil hormonal pode interferir com a farmacocinética e farmacodinâmica em algumas situações. Além disso, genes codificados nos cromossomos sexuais também podem ter influência sobre estes parâmetros. (SCHOLL et al., 2019; SPOLETINI et al., 2012).

13. CONCLUSÕES DO CAPÍTULO 2

Em suma, com os presentes dados experimentais, até o presente momento, não foi possível rejeitar a nossa segunda hipótese de que os animais SLA16 são mais sensíveis ao antagonismo do receptor glutamatérgico NMDA, quando comparados aos SHR. A influência do MK-801 sobre a atividade locomotora e nos parâmetros emocionais, bem como o efeito farmacogenético observado em machos, corroboram o potencial papel desta via na explicação da diferença fenotípica das linhagens.

CAPÍTULO 3

14. HIPÓTESE CAPÍTULO 3

A hipótese que guiou esta sessão é de que os animais SLA16 também são mais sensíveis aos efeitos comportamentais de antagonistas do receptor NMDA aplicados no CPF.

Ou seja, como os animais SLA16, principalmente machos, parecem ser mais sensíveis aos efeitos de fármacos glutamatérgicos administrados sistemicamente, nós partimos da premissa que o mesmo fenômeno aconteceria localmente, em uma região de conhecida importância para a hiperatividade e o TDAH. Após os experimentos farmacológicos, nós avaliamos se os resultados poderiam ser explicados por uma diferença de quantidade proteica das subunidades do receptor NMDA (GluN2A e GluN2B), entre as linhagens.

15. OBJETIVOS

15.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a participação dos receptores NMDA, e subunidades, da região do CPF, no perfil comportamental dos ratos SLA16 e SHR.

15.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar as respostas de ambas as linhagens frente à administração intra-CPF de antagonistas do receptor NMDA no CA.
- Avaliar as respostas de ambas as linhagens frente à administração intra-CPF de antagonistas do receptor NMDA no RO.
- Analisar a quantidade relativa de GluN2A no CPF, amígdala e hipocampo das duas linhagens.
- Analisar a quantidade relativa de GluN2B no CPF, amígdala e hipocampo das duas linhagens.

16. MATERIAL E MÉTODOS

16.1 ANIMAIS

Os animais utilizados nesta sessão tiveram a mesma origem e foram mantidos sob as mesmas condições das seções anteriores (descrito detalhadamente na sessão 1.3.1). A diferença desta seção é que a idade média dos animais foi de 5 a 6 meses e os animais foram alocados em caixas de até 3 indivíduos após o procedimento cirúrgico.

16.2 CAMPO ABERTO

O protocolo do teste CA foi o mesmo já descrito anteriormente (seção 4.2, pág. 21). Da mesma forma, nesta etapa, durante os 5 minutos de teste, também foram quantificados os parâmetros: locomoção total, locomoção na região central, tempo no centro, número de visitas ao centro. Também foi calculada a porcentagem de locomoção central (locomoção central / locomoção total x 100).

16.3 RECONHECIMENTO DE OBJETOS

O teste de reconhecimento de objetos (RO) foi realizado visando analisar a memória de curta duração dos animais (memória de trabalho) (ANTUNES & BIALA, 2012). O protocolo consistiu em três fases: habituação, treino e teste. A habituação aconteceu durante os 5 minutos de CA descritos no item anterior. A fase de treino foi caracterizada por 3 minutos de exploração de duas cópias idênticas de um objeto (objetos: O1 e O2 - latinhas de suco) posicionadas a 10 cm de distância das paredes da arena do CA. Após 15 minutos do fim do treino, os animais foram reexpostos ao mesmo ambiente, porém uma das cópias usadas no treino foi substituída por um objeto diferente (objeto novo - garrafinha de suco) e a outra foi mantida (objeto familiar)

A análise dos vídeos do experimento foi realizada com auxílio do ANY-maze (Stoelting Co., v. 7.04). Quanto a fase de treino, foram quantificados os parâmetros: número de investigações do O1, número de investigações do O2, tempo de investigação do O1, tempo de investigação do O2. Quanto a fase de teste, foram quantificados os parâmetros: número de investigações do Objeto Familiar, número de investigações do Objeto Novo, tempo de investigação do Objeto Familiar, tempo de investigação do Objeto Novo.

A partir dos resultados foi calculado o Índice de Discriminação quanto ao tempo (ID), o Índice de Discriminação quanto ao número de investigações (IDN), Índice de Reconhecimento quanto ao tempo (IR) e Índice de Reconhecimento quanto ao número de Investigações (IRN). As fórmulas usadas foram:

[ID = tempo de investigação do objeto novo – tempo de investigação do objeto familiar / tempo de investigação total]

[IDN = número de investigação do objeto novo – número de investigação do objeto familiar / tempo de investigação total]

[IR = tempo de investigação do objeto novo / tempo total de investigação]

[IR = tempo de investigação do objeto novo / tempo total de investigação]

16.4 DROGAS

A droga usada no experimento 5 foi o MK-801 - um antagonista de NMDAR, e no experimento 6 foi usado ifenprodil – um antagonista seletivo para subunidade GluN2B. O MK-801 (Sigma Aldrich) foi diluído em soro fisiológico (NaCl, 09%) e o IFN (Sigma Aldrich) em DMSO 0,1%. Os grupos controles receberam injeção do veículo. A administração foi realizada por microinfusão diretamente no CPF por meio de cânulas-guia implantadas cirurgicamente (descrito adiante). O volume injetado foi padronizado em 0,5 ul/lado.

18.5 EUTANÁSIA, COLETA E PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS

Nos experimentos que exigem coleta de estruturas cerebrais os animais foram anestesiados com isoflurano e imediatamente após perda do reflexo da pata foram eutanasiados por decapitação. Os animais que passaram por experimentos que não exigem coleta de amostras foram eutanasiados por inalação de dióxido de carbono.

Para os experimentos com neurocirurgia, os cérebros foram removidos através de craniotomia e mergulhados em solução fixadora de paraformaldeído 4% onde permaneceram até o processamento para confirmação do posicionamento das cânulas. Já nos experimentos de *western blotting* as estruturas (CPF, AMG, HPC) foram dissecadas a fresco e imediatamente congeladas.

O processamento dos encéfalos para confirmação do posicionamento das cânulas-guia consistiu em duas lavagens com tampão fosfato (PB) 0,1M de

quinze minutos cada, seguido de 4 a 6 horas em sacarose 10%, 6 a 8 horas em sacarose 20% e finalmente sacarose 30%, onde permaneceram até o momento do congelamento e corte.

Os cortes foram realizados após congelamento no Criostato no sentido coronal e depositados sobre lâminas histológicas gelatinizadas. Para fotografias e observação na lupa, os cortes foram corados com Violeta de Cresil 0,1%.

16.6 NEUROCIRURGIA E MICROINJEÇÕES

As cirurgias de implante de cânulas-guia foram realizadas utilizando as coordenadas do Atlas Paxinos e Watson, garantindo a localização correta das injeções no CPF – região ventromedial (AP: +3,2 mm; DV: -2,1 mm; LL: +-0,5 mm a partir do bregma).

Os animais foram anestesiados com cloridrato de quetamina (90 mg/kg), cloridrato de xilazina (10 mg/kg) e tramadol (5 mg/kg). Após a perda de reflexos foi realizada tricotomia e na sequência, o crânio e os incisivos superiores foram fixados ao aparelho estereotáxico.

A desinfecção do local foi realizada com álcool iodado e foi aplicado solução anestésica de lidocaína 2% e acepromazina 0,2% por via subcutânea no local da incisão. Com auxílio de tesoura cirúrgica músculos e demais tecidos foram afastados para a exposição dos ossos da caixa craniana. As coordenadas foram determinadas utilizando-se o bregma como referência. Em seguida, foram realizadas perfurações no crânio dos animais com uma broca odontológica para implante de dois parafusos de segurança (aço inoxidável 1,40 mm) em uma região posterior, longe da região de interesse. A seguir, com auxílio da broca foram realizadas as perfurações nas coordenadas correspondentes ao CPF e inseridas as cânulas-guia (11 mm). A fixação foi feita com acrílico odontológico.

Ao término da cirurgia, os animais foram colocados em gaiolas posicionadas em cima de uma cama térmica para evitar hipotermia e permaneceram em observação pós-cirúrgica durante as primeiras horas até se recuperarem da anestesia.

Após recuperação, os animais seguiram em observação, avaliando-se possíveis sinais de dor ou desconforto. Nos três dias consecutivos os animais receberam injeção intramuscular do analgésico (AINE) flunixinolona 2,5 mg/kg. Além disso, foram pesados diariamente durante a primeira semana. Os animais que

tiveram perda de mais de 20% do peso do animal seguiram para aplicação do ponto final humanitário que consiste na eutanásia por overdose de anestesia (quetamina 200 mg/kg + xilazina 20 mg/kg).

As microinjeções dos agonistas, antagonistas ou veículo foram realizadas bilateralmente no CPF com auxílio de agulhas conectadas a um tubo de polietileno adaptado a uma microseringa e a microinjeção foi realizada com o auxílio de uma bomba de infusão. Após o término das microinjeções as agulhas foram mantidas na posição por mais 60 segundos para evitar o refluxo da solução.

16.7 WESTERN BLOTTING

A quantificação da proteína total em cada amostra foi realizada pelo método BCA. Alíquotas foram carregadas e submetidas à eletroforese em gel dodecil sulfato-poliacrilamida (SDS-PAGE) e transferidas para uma membrana de nitrocelulose incubada de um dia para o outro (aproximadamente 12 horas) com os anticorpos primários contra as subunidades GluN2A e GluN2B dos NMDAR, e β -actina, que foi utilizada como controle das amostras. Em seguida as membranas foram lavadas em solução TBS-Tween e incubadas com os anticorpos secundários adequados conjugados à peroxidase, por pelo menos 2h à temperatura ambiente.

A reatividade foi detectada com o uso de potencializadores de quimiluminescência autorradiográfica reveladas automaticamente. As bandas foram quantificadas por densitometria.

A expressão de GluN2A e GluN2B foram normalizadas pela expressão de β -actina em cada amostra.

16.8 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

Experimento 5

Os animais passaram pela neurocirurgia para implantação de cânulas bilaterais no CPF (Figura 9). Após um período de recuperação de 7 dias, os animais foram submetidos a administração de MK-801 nas doses de 10 e 25 μ g/lado ou veículo, por microinjeções bilaterais. Após 15 minutos, cada animal

foi colocado no centro do aparato CA, que explorou livremente durante 5 minutos.

Após a finalização do protocolo os animais foram eutanasiados e o encéfalo foi coletado para posterior confirmação histológica da posição das cânulas.

Neste experimento, cada grupo de tratamento/linhagem teve entre 6 e 9 animais (incluídos quando as cânulas estavam corretamente posicionadas). Foram 6 grupos experimentais: SHR tratados com MK-801 na dose de 10 µg/lado, SHR tratados com MK-801 na dose de 25 µg/lado, SHR tratados com veículo, SLA16 tratados com MK-801 na dose de 10 µg/lado, SLA16 tratados com MK-801 na dose de 25µg/lado, SLA16 tratados com veículo.

Experimento 6

Os animais passaram pela neurocirurgia para implantação de cânulas bilaterais no CPF (Figura 9). Após um período de recuperação de 7 dias, os animais foram submetidos a administração de IFN na dose de 1 µg/lado ou veículo, por microinfusões bilaterais. Após 15 minutos, cada animal foi colocado no centro do aparato CA, que explorou livremente durante 5 minutos.

Após a finalização do protocolo os animais foram eutanasiados e o encéfalo foi coletado para posterior confirmação histológica da posição das cânulas.

Neste experimento, cada grupo de tratamento/linhagem teve entre 6 e 8 animais (incluídos quando as cânulas estavam corretamente posicionadas). Foram 4 grupos experimentais: SHR tratados com de IFN 1 µg/lado, SHR tratados com veículo, SLA16 tratados com IFN na dose de 1 µg/lado, SLA16 tratados com veículo.

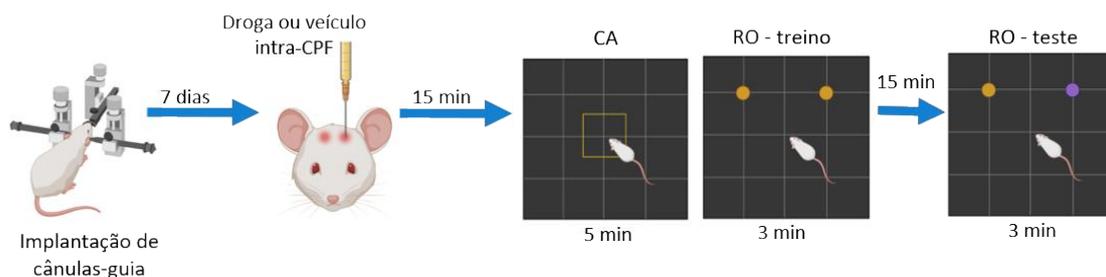


Figura 9. Desenho experimental dos experimentos 5 e 6. Os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico para implantação de cânulas e 7 dias após receberam administração bilateral de droga (MK-801 no experimento 5 ou Ifenprodil no experimento 6) ou veículo, diretamente no Córtex Pré-Frontal (CPF). Após administração os animais passaram pelo teste de Campo Aberto (CA) e Reconhecimento de Objetos (RO) em duas sessões: treino e teste.

Experimento 7

Para este experimento, 5 animais machos de cada linhagem foram eutanasiados e foi feita a dissecação das estruturas relativas ao CPF, amígdala e hipocampo. Após processamento das amostras, foi feita a análise das concentrações de proteínas do tipo GluN2A e b-actina (controle), por *western blotting* (Figura 10).

Experimento 8

Da mesma forma que no anterior, foram eutanasiados 5 animais machos de cada linhagem e foi feita a dissecação do CPF, amígdala e hipocampo (Figura 10). Após processamento das amostras, foi feita a análise das concentrações de proteínas do tipo GluN2B e b-actina (controle), por *western blotting*.

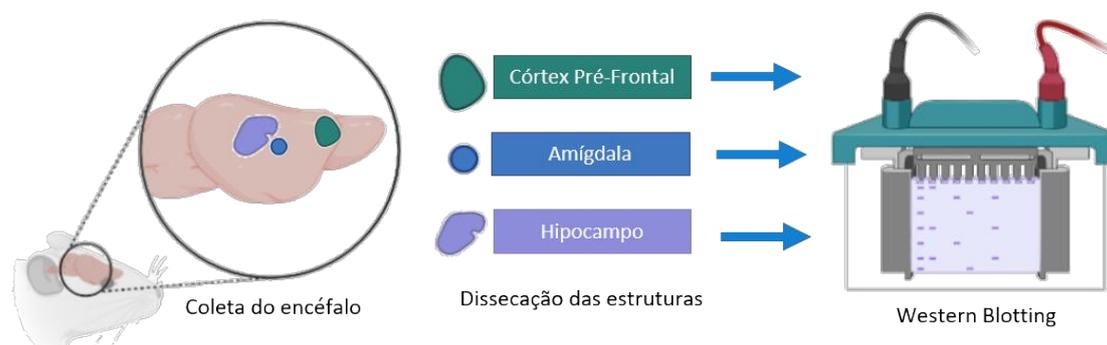


Figura 10. Desenho experimental dos experimentos 7 e 8. Após eutanásia, foram coletados os encéfalos dos animais e dissecadas as estruturas relativas ao Córtex Pré-Frontal, Amígdala e Hipocampo. Na sequência as amostras foram processadas e submetidas ao *western blotting* para quantificação de proteínas (GluN2A no experimento 7 e GluN2B no 8, β -actina como controle nos dois).

16.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS E REPRESENTAÇÕES GRÁFICAS

As análises estatísticas desta seção foram realizadas da mesma forma do capítulo anterior com o *software* Statistica (descrito na sessão 3.5). De maneira breve, realizamos análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida de teste post-hoc de Duncan quando necessário. Os gráficos também foram construídos por meio do *software* Prism.

17. RESULTADOS

17.1 EXPERIMENTO 5 – EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTRA-CÓRTEX PRÉ-FRONTAL DE MK-801

Para avaliar a participação dos receptores NMDA no CPF sobre os comportamentos observados, realizamos a administração de MK-801 diretamente no CPF dos animais e a seguir os testamos no CA (Figura 11) e no RO (Figura 12).

Campo aberto

A ANOVA de duas vias revelou efeito de **linhagem** para Locomoção total [F(1,58)=12,728, $p < 0,001$, SLA16>SHR]. Houve uma tendência para o parâmetro visitas ao centro [F(1,58)=3,239, $p = 0,077$, SLA16>SHR].

A ANOVA de duas vias revelou efeito de **tratamento** para o parâmetro Locomoção total [F(2,58)=3,563, $p = 0,035$], o *post-hoc* revelou que a dose de 25 $\mu\text{g/lado}$ foi menor que os demais grupos. Houve uma tendência de efeito de tratamento no parâmetro Tempo no centro [F(2,58)=2,879, $p = 0,064$], o *post-hoc* revelou que a dose de 25 $\mu\text{g/lado}$ diminuiu o tempo em relação aos demais grupos.

A ANOVA também revelou efeitos de **interação entre linhagem e tratamento** para 2 parâmetros. Porcentagem de locomoção central [F(2,58)=5,867, $p = 0,005$], o *post-hoc* revelou que as duas doses de MK-801 diminuiram a porcentagem de locomoção central somente da linhagem SLA16, em relação ao grupo controle. Tempo no centro [F(2,58)=5,814, $p = 0,005$], o *post-hoc* revelou que as duas doses de MK-801 foram capazes de diminuir o tempo da linhagem SLA16, mas não da linhagem SHR. Além disso, entre os grupos controles, os SLA16 permaneceram mais tempo no centro do que os SHR.

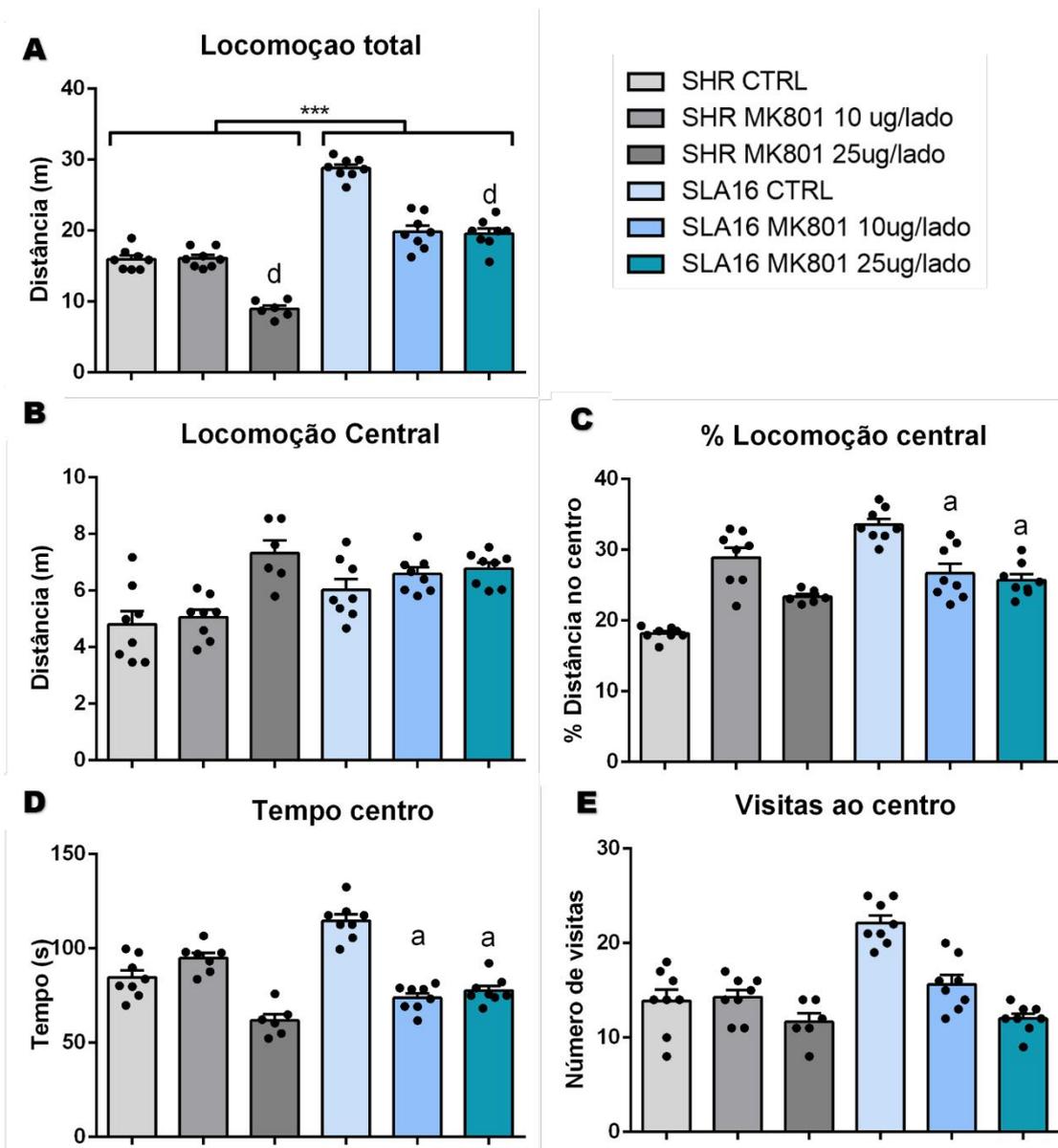


Figura 11. Efeito do MK-801 no Córtex Pré-Frontal sobre os comportamentos do Campo Aberto. A. Locomoção Total; B. Locomoção central; C. Porcentagem de locomoção total; D. Visitas ao centro. E. Tempo no centro. Representado Média + Erro Padrão da Média. CTRL = grupo salina 0,9%. *** Efeito geral de linhagem $p < 0,005$. a Interação entre linhagem e tratamento, menor que o veículo. d Efeito de tratamento, menor do que o veículo.

Reconhecimento de objeto

A ANOVA revelou um efeito geral de **tratamento** para 3 parâmetros. ID quanto ao tempo [$F(2, 58)=3,951, p=,0246$], o *post-hoc* revelou que o grupo MK-801 25 $\mu\text{g/lado}$ explorou menos o objeto novo. IR quanto ao tempo [$F(2, 58)=3,9510, p=,02462$], o *post-hoc* revelou que o grupo MK-801 25 $\mu\text{g/lado}$ investigou por menos tempo o objeto novo do que os outros grupos. IR quanto

ao número de investigações [$F(2, 56)=4,196, p=,020$], o *post-hoc* revelou que o grupo MK-801 25 µg/lado também investigou o objeto novo menos vezes do que os demais grupos. A ANOVA também revelou um efeito marginal de linhagem para o ID quanto ao número de investigações [$F(1, 56)=3,747, p=0,058, SHR>SLA16$].

Não foram encontrados efeitos significativos quanto aos parâmetros índice de preferência dos objetos no treino, tempo de exploração do objeto novo, tempo de exploração do objeto familiar, tempo total de investigação treino, tempo total de investigação teste, número total de investigações no treino, número total de investigações teste.

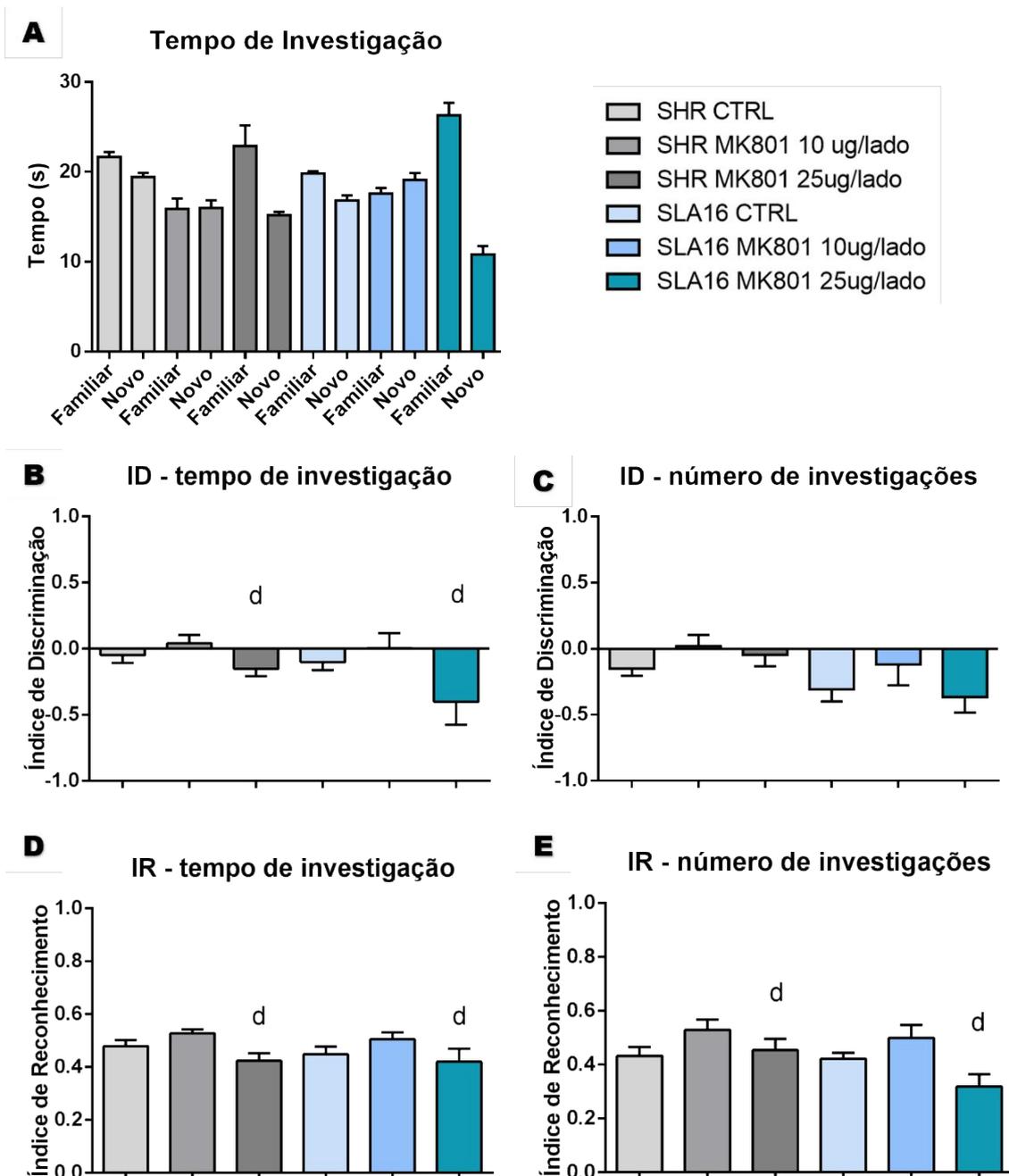


Figura 12. Efeito do MK-801 no Córtex Pré-Frontal sobre o teste de Reconhecimento de Objeto. A. Tempo de investigação total dos objetos familiar e novo; B. Índice de Discriminação (ID) quanto ao tempo de investigação; C. Índice de Discriminação quanto número de investigações; D. Índice de Reconhecimento (IR) quando ao tempo de investigação. E. Índice de Reconhecimento quanto ao número de investigações. Representado Média + Erro Padrão da Média. CTRL = grupo salina 0,9%. d Efeito de tratamento, menor que o veículo $p < 0,05$.

17.2 EXPERIMENTO 6 – EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTRA-CÓRTEX PRÉ FRONTAL DE IFENPRODIL

Para avaliar a participação da subunidade GluN2B no CPF sobre os comportamentos observados, realizamos a administração de IFN diretamente no CPF dos animais e a seguir os testamos no CA (Figura 13) e no RO (Figura 14).

Campo aberto

A ANOVA de duas vias revelou efeito geral de **linhagem** para 2 parâmetros. São eles: Locomoção total [$F(1, 53) = 10,158, p=0,002, SLA16>SHR$]. Locomoção central [$F(1, 53)=8,409, p=0,005, SLA16>SHR$].

A ANOVA de duas vias revelou efeito geral de **tratamento** para 2 parâmetros. São eles: Locomoção total [$F(1, 53)=4,239, p=0,044, CTRL>IFN$]. Locomoção central [$F(1, 53)=11,984, p=0,001, CTRL<IFN$]. Também houve uma tendência de efeito de tratamento para o número de visitas ao centro [$F(1, 53)=3,613, p=,063, CTRL>IFN$].

Não houve efeito nos parâmetros de tempo no centro e porcentagem de locomoção central.

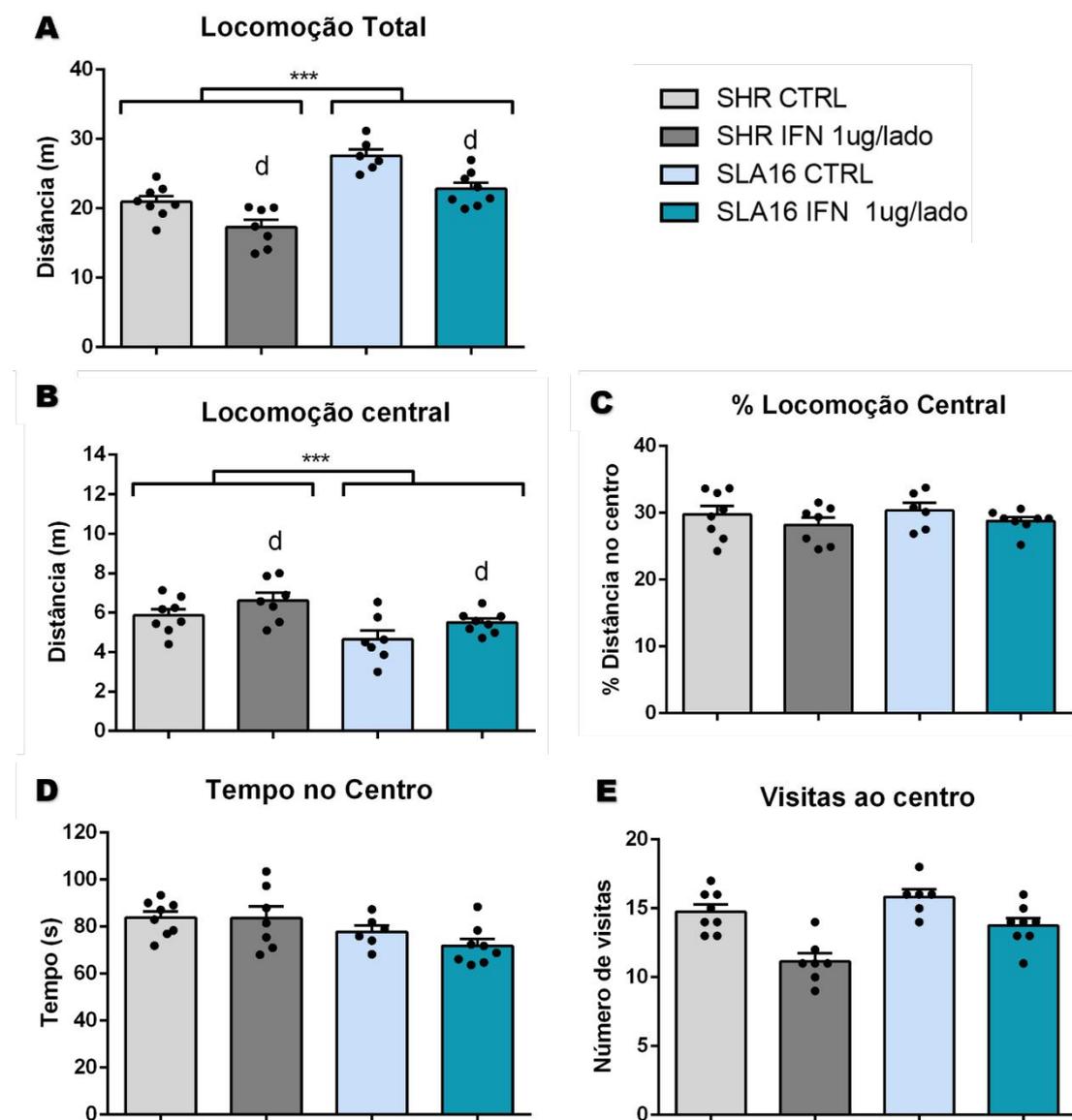


Figura 13. Efeito do Ifenprodil no Córtex Pré-Frontal sobre os comportamentos do Campo Aberto. A. Locomoção Total; B. Locomoção central; C. Porcentagem de locomoção total; D. Visitas ao centro. E. Tempo no centro. Representado Média + Erro Padrão da Média. IFN = ifenprodil. CTRL = grupo DMSO 0,1%. *** Efeito geral de linhagem $p < 0,005$ d Efeito de tratamento, menor que o veículo, $p < 0,05$.

Reconhecimento de Objetos

A ANOVA revelou um efeito geral de tratamento para 2 parâmetros. ID quanto ao tempo [$F(1, 53)=4,299$, $p=,043$, IFN 1 $\mu\text{g/lado}$ > CTRL]. IR quanto ao tempo [$F(1, 53)=4,299$, $p=,043$, IFN $\mu\text{g/lado}$ > CTRL].

Não foram encontrados efeitos quanto aos parâmetros ID quanto ao número de investigações, IR quanto ao número de investigações, índice de

preferência dos objetos no treino, tempo de exploração do objeto novo, tempo de exploração do objeto familiar, tempo total de investigação treino, tempo total de investigação teste, número total de investigações no treino, número total de investigações teste.

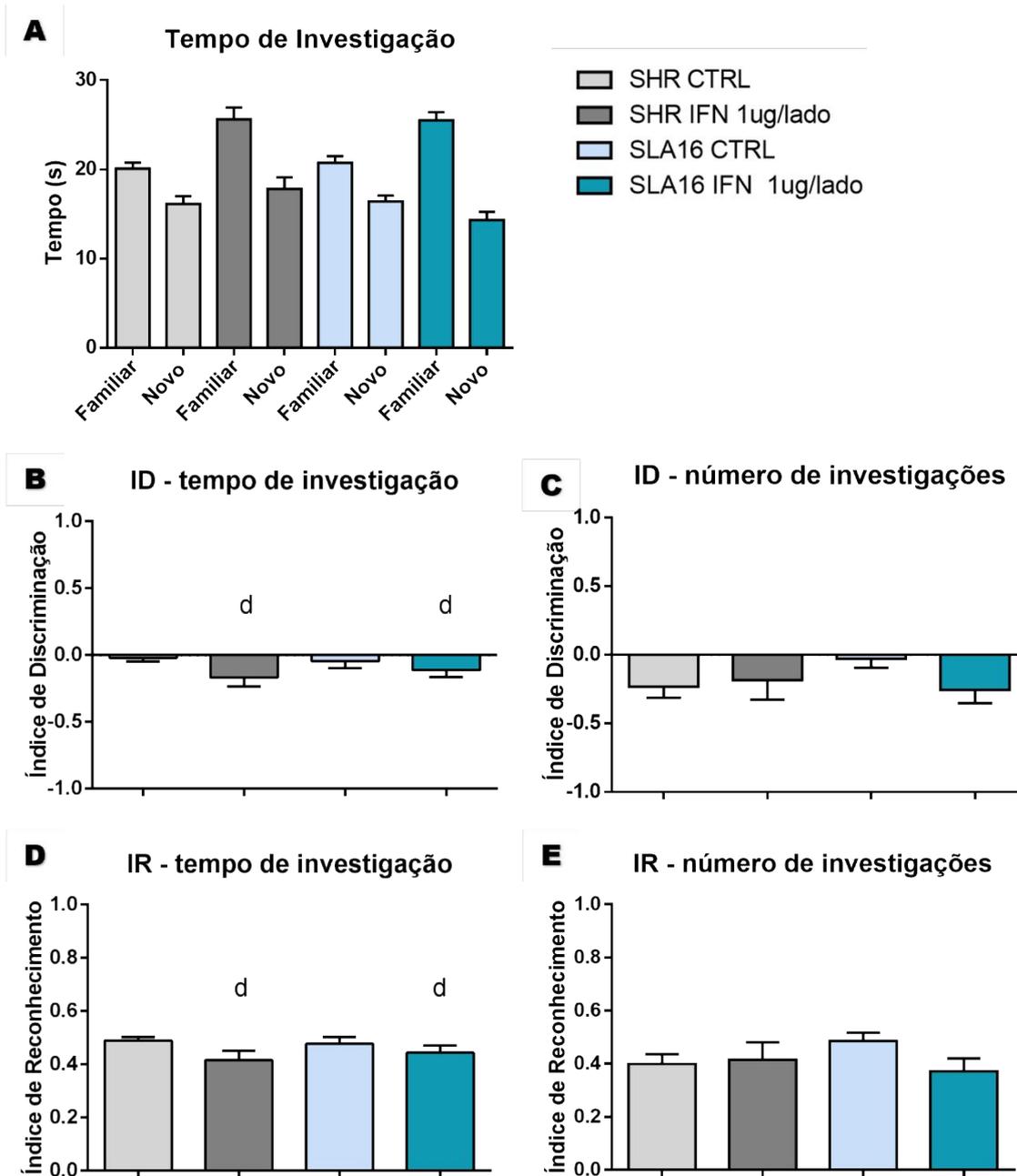


Figura 14. Efeito do Ifenprodil no Córtex Pré-Frontal sobre o teste de Reconhecimento de Objeto. A. Tempo de investigação total dos objetos familiar e novo; B. Índice de Discriminação (ID) quanto ao tempo de investigação; C. Índice de Discriminação quanto número de investigações; D. Índice de Reconhecimento (IR) quanto ao tempo de investigação. E. Índice de Reconhecimento quanto ao número de investigações. Representado Média + Erro Padrão da Média. CTRL = grupo DMSO 0,1%. d Efeito de tratamento, menor que o veículo, $p < 0,05$.

17.3 EXPERIMENTO 7 – QUANTIFICAÇÃO DE GLUN2A EM REGIÕES ENCEFÁLICAS

O teste T revelou que não há diferenças entre as linhagens quanto às quantidades relativas a GluN2A em nenhuma das três regiões encefálicas analisadas (CPF, amígdala e hipocampo) (Figura 15a, 15c, 15d).

17.4 EXPERIMENTO 8 – QUANTIFICAÇÃO DE GLUN2B EM REGIÕES ENCEFÁLICAS

A ANOVA revelou não há diferenças entre as linhagens quanto às quantidades relativas a GluN2B em nenhuma das três regiões encefálicas analisadas - CPF, amígdala e hipocampo (Figura 15b, 15d, 15f).

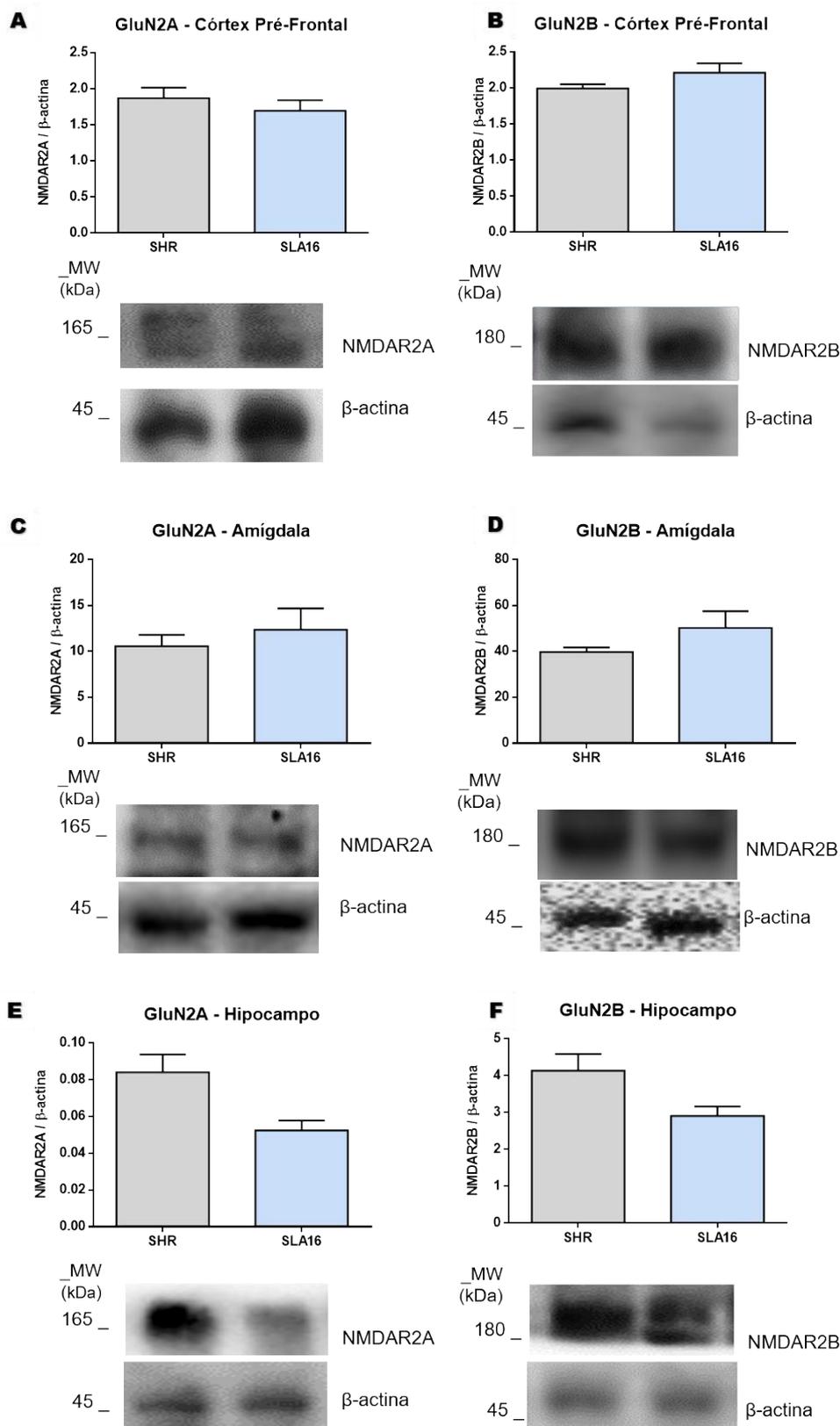


Figura 15. GluN2A e GluN2B nas regiões encefálicas dos SHR e SLA16, por *western blotting* normalizado por B-actina. A. GluN2A no córtex pré-frontal; B. GluN2B no córtex pré-frontal; C. GluN2A na Amígdala; D. GluN2B na Amígdala; E. GluN2A no Hipocampo; F. GluN2B no Hipocampo. Representados médias + EPM. NMDAR2A = Receptores NMDA contendo GluN2A. NMDAR2B = Receptores NMDA contendo GluN2B.

18. DISCUSSÃO

Neste capítulo, avaliamos a participação dos NMDAR do CPF nos comportamentos do CA, através da administração intra-estrutura de MK-801, IFN ou veículos. Em síntese, pode-se observar um efeito farmacogenético na dose mais baixa do MK-801, que diminuiu os escores locomotores apenas na linhagem SLA16. A dose mais alta de MK-801, bem como o IFN agiram da mesma forma nas duas linhagens, diminuindo os parâmetros locomotores e prejudicando a memória de curta duração dos animais. Também analisamos as quantidades relativas das subunidades GluN2A e GluN2B em diferentes regiões encefálicas, mas não houve diferença significativa entre as linhagens.

O CPF é considerado por alguns autores como uma região encefálica superior, uma vez que é responsável pelo controle de funções executivas bastante complexas. Dentre elas, podemos destacar a flexibilidade comportamental, a atenção, a memória de trabalho, o controle inibitório (incluindo das respostas emocionais) e dos comportamentos direcionados a objetivos. Considerando que estes são parâmetros em que podem ser observados prejuízos no TDAH, pode-se imaginar que esta região também estaria envolvida na fisiopatologia desse transtorno (HALPERIN; SCHULZ, 2006).

A região encefálica do CPF começou a ser cogitada como uma região-chave no contexto do TDAH a partir de observações da década de 1980 e 1990, de que humanos e outros primatas com lesões nessa região exibiam similaridades com crianças com TDAH. Além disso, o fato de o CPF sofrer forte influência dos núcleos catecolaminérgicos do tronco cerebral reforçou essa hipótese, já que havia significativa melhora dos sintomas do TDAH a partir da administração crônica de psicoestimulantes catecolaminérgicos (HALPERIN; SCHULZ, 2006).

De fato, o papel do CPF no contexto do TDAH foi corroborado a partir da observação de ensaios de ressonância magnética funcional (fMRI) que demonstraram uma hipoativação desta região, além de um volume menor da área cortical nos pacientes com TDAH, quando comparados a indivíduos controle. Estas evidências neurofuncionais e neuroanatômicas se refletem no prejuízo das funções executivas observado nos pacientes com TDAH, com

particular destaque para o controle inibitório comportamental (HILL et al., 2003; KRAIN; CASTELLANOS, 2006; VIEIRA DE MELO; TRIGUEIRO; RODRIGUES, 2018).

Neste contexto, o sistema glutamatérgico também ganha destaque, uma vez que é o principal sistema neuroexcitatório dos mamíferos, e influencia diretamente os sistemas catecolaminérgicos. Quanto a via do receptor NMDA, em particular, já foram documentados polimorfismos genéticos no gene *grin2b* em pacientes com TDAH (DORVAL et al., 2007). Esse sistema também já foi implicado nos modelos animais do TDAH. Miller e colaboradores (2014) demonstraram que a linhagem SHR tem uma hiperfunção glutamatérgica no CPF, e isto poderia ser um dos fenômenos-chave para explicar boa parte dos endofenótipos de TDAH expressos por esta linhagem. Neste trabalho, sugere-se inclusive que a modulação glutamatérgica desta região poderia ser um promissor alvo para o desenvolvimento de novos fármacos para tratar o TDAH.

O experimento 5 revelou um efeito hipolocomotor da dose mais alta de MK-801 (25 µg/lado), sem interações com o genótipo dos animais, indicando que os NMDAR do CPF participam do controle locomotor, mas provavelmente não são os responsáveis pela diferença de locomoção observada entre as linhagens. Em contrapartida, pode-se observar um efeito farmacogenético quanto a porcentagem de exploração do centro e tempo de permanência nesta região, indicando que os NMDAR do CPF podem ter papel importante na diferença de emocionalidade observada entre SLA16 e SHR.

O CPF pode ser subdividido em três regiões anatômicas funcionais: a medial (CPFm), a lateral (CPF_l) e a orbitofrontal (CPF_o). O CPFm recebe projeções do córtex para-hipocampal e temporal que medeiam informações relacionadas a memória. Recebe também projeções excitatórias dos núcleos da linha média do tálamo e projeções do córtex orbitofrontal, da amígdala e do estriado ventral. O CPFm também emite projeções aferentes para áreas motoras. O CPFm, com particular destaque para a região ventro-medial (CPF_{vm}), desempenha um papel bastante importante na regulação de emoções negativas. Já foi demonstrado, por exemplo, que o CPF_{vm} é capaz de suprimir a atividade da AMG, modulando as respostas de medo (QUIRK et al., 2003). Além disso, também já foi demonstrado que o CPF_{vm} apresenta projeções diretas para os interneurônios inibitórios da AMG (MCDONALD; MASCAGNI;

GUO, 1996). Evidências destas circuitarias, e do seu efeito de controle de emoções negativas também já foi demonstrado em humanos (HISER; KOENIGS, 2018). Adicionalmente, o papel do CPFvm no controle das respostas emocionais também pode ser explicado por suas densas projeções para os núcleos basolateral e central da AMG, além das projeções para o hipotálamo e para a substância cinzenta periaquedutal (ÖNGÜR; PRICE, 2000).

Também avaliamos o desempenho da memória de trabalho dos animais após administração do MK-801, visto que os NMDAR do CPF costumam participar do controle de performance cognitiva neste tipo de tarefa. Neste experimento, os dados revelaram ID negativos nos grupos controles, indicando que tanto SHR quanto SLA16 não foram capazes de discriminar o objeto novo do objeto familiar. Esta baixa performance cognitiva, ou prejuízo da memória de trabalho já são esperados para os SHR, e aqui demonstramos que os SLA16 têm desempenho equivalente. Além disso, outros trabalhos demonstram que o antagonismo dos receptores NMDA no CPF leva a um prejuízo da ativação da via CPF-HPC, prejudicando não só a plasticidade sináptica, mas também o desempenho em teste de memória de curta duração (JAY; BURETTE; LAROCHE, 1995; SHIKANAI et al., 2018).

Além disso, houve um efeito de tratamento, em que a dose mais alta do MK-801 reduziu ainda mais a exploração do objeto novo, podendo ser interpretada como uma indução de neofobia. Os NMDAR podem regular a sinalização glutamatérgica de maneira dependente de sua composição de subunidades. Enquanto os NMDAR contendo GluN2B recrutam AMPAR para regiões sinápticas e extra-sinápticas, os NMDAR contendo GluN2A apenas potencializam o recrutamento (HALL; RIPLEY; GHOSH, 2007; LIU et al., 2004). Como a RGD contém apenas o gene para a subunidade GluN2B, e não as demais componentes do NMDAR, e levando em consideração o comportamento promiscuo do MK-801, tentamos refinar os resultados, injetando um antagonista de NMDAR seletivo para a subunidade GluN2B, o IFN.

No entanto, o experimento 7 revelou apenas o efeito hipocomotor corroborando que os NMDAR do CPF podem participar do controle motor nestes animais. Diferenças comportamentais, quanto à resposta ao IFN em relação ao MK-801, já foram relatadas para outros parâmetros relacionados ao comportamento emocional em outros modelos, já a resposta motora não parece

diferir tanto, em acordo com o que observamos (FRASER et al., 1996). Não foram observadas interações entre genótipo e tratamento nos parâmetros emocionais. Estes resultados poderiam *a priori* indicar que escolhemos uma dose de IFN que não foi suficiente para a observação do efeito farmacogenético. Outra possível interpretação é que os NMDAR que geraram o efeito farmacogenético, em resposta ao MK-801 no CPF, não são os que contém a subunidade GluN2B. Particularmente, seria mais factível acreditar na primeira hipótese, visto que as demais subunidades do receptor NMDA não têm os seus genes compreendidos na RGD. Desta maneira, outras subunidades, que não as GLUN2B devem apresentar-se idênticas entre os animais SHR e SLA16.

Quando avaliamos as subunidades GluN2A e GluN2B nas regiões do CPF, AMG e HPC nos animais *naive*, observamos as mesmas quantidades de proteínas entre as linhagens. Ou seja, as diferenças comportamentais entre as linhagens, observadas na resposta ao MK-801, podem ser provenientes de pequenas alterações estruturais dos receptores NMDA, visto que aparentemente elas não poderiam ser explicadas pela quantidade natural destes receptores no CPF. Esta hipótese genética versa que existem diferenças no DNA do gene *grin2b*, entre as linhagens, que estão causando a produção de proteínas qualitativamente diferentes no CPF. Certamente, este ponto deverá ser futuramente investigado, por exemplo, através do sequenciamento do gene *grin2b* nas linhagens SHR e SLA16. Podemos ainda sugerir estudos de expressão de RNAm no CPF destas linhagens bem como estudos de *binding*, de segundos mensageiros, ou de bioinformática, que nos ajudem a compreender a participação dos receptores NMDA, e suas subunidades, na diminuição da hiperatividade locomotora nestas linhagens.

19. CONCLUSÕES DO CAPÍTULO 3

Essencialmente, neste último capítulo pudemos observar que os animais SLA16 exibem uma maior sensibilidade aos efeitos comportamentais do MK-801 na região do CPF, quando comparados aos SHR. Esse efeito não pode ser observado na resposta ao IFN. Considerando que não houve diferenças nas quantidades brutas das subunidades GluN2A e GluN2B em nenhuma das regiões analisadas, a diferença pode ser devida a polimorfismos no gene *grin2b*, que afetam a conformação da proteína GluNB. No entanto, esta hipótese precisará agora ser perseguida com estudos adicionais de sequenciamento genético.

20. CONCLUSÃO GERAL

Em conjunto, nossos dados demonstram a potencialidade da linhagem SLA16 como um modelo alternativo para o estudo de endofenótipos do TDAH, tendo em vista seu perfil hiperativo ao longo de toda a vida. Também demonstramos, pela primeira vez, o perfil de resposta a antagonistas glutamatérgicos da linhagem SLA16. Neste sentido, há um efeito farmacogenético interessante que condiciona um perfil de maior sensibilidade aos efeitos da administração sistêmica de MK-801, na linhagem SLA16 quando comparada à SHR. Também demonstramos nestas linhagens, que o sistema glutamatérgico via receptor NMDA da região do CPF participa do controle da atividade motora e do comportamento emocional dos animais. Finalmente, a quantidade de proteínas das subunidades GLUN2B são similares nas duas linhagens, sugerindo uma provável diferença alélica que afete a conformação da proteína.

REFERÊNCIAS

- ACUÑA, L. R. et al. Effects of Repeated Treatment with Midazolam in SHR and SLA16 Rat Strains in the Triple Test. **Behavior genetics**, v. 48, n. 6, p. 440–450, 1 nov. 2018.
- ALSTOTT, J.; TIMBERLAKE, W. Effects of rat sex differences and lighting on locomotor exploration of a circular open field with free-standing central corners and without peripheral walls. **Behavioural brain research**, v. 196, n. 2, p. 214–219, 23 jan. 2009.
- ALTUN, M. et al. Behavioral impairments of the aging rat. **Physiology & behavior**, v. 92, n. 5, p. 911–923, 5 dez. 2007.
- ANDREOLLO, NA; SANTOS, EF; ARAÚJO, MR; LOPES, LR. Rat's age versus human's age: what is the relationship? **Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, v. 25, n. 1, p.49-51, 2012.
- ANSELMINI, M. et al. Genetic evidence for chromosome 4 loci influencing learning and memory. **Neurobiology of learning and memory**, v. 131, p. 182–191, 2016.
- ARAGAM, N. et al. TMPRSS9 and GRIN2B Are Associated with Neuroticism: a Genome-Wide Association Study in a European Sample. **Journal of Molecular Neuroscience** **2012 50:2**, v. 50, n. 2, p. 250–256, 2012.
- BAYLESS, D. W.; PEREZ, M. C.; DANIEL, J. M. Comparison of the validity of the use of the spontaneously hypertensive rat as a model of attention deficit hyperactivity disorder in males and females. **Behavioural brain research**, v. 286, p. 85–92, 1 jun. 2015.
- BELZUNG, C.; GRIEBEL, G. Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review. **Behavioural brain research**, v. 125, n. 1–2, p. 141–149, 8 nov. 2001.
- BERGMAN, E.; ULFHAKE, B. Evidence for loss of myelinated input to the spinal cord in senescent rats. **Neurobiology of aging**, v. 23, n. 2, p. 271–286, 2002.
- BOYCE-RUSTAY, J. M.; HOLMES, A. Genetic Inactivation of the NMDA Receptor NR2A Subunit has Anxiolytic- and Antidepressant-Like Effects in Mice. **Neuropsychopharmacology** **2006 31:11**, v. 31, n. 11, p. 2405–2414, 2006.
- BREIER, A. et al. **KETAMINE-INDUCED PSYCHOSIS AND PREFRONTAL CORTEX Association of Ketamine-Induced Psychosis With Focal Activation of the Prefrontal Cortex in Healthy Volunteers** *Am J Psychiatry*. [s.l: s.n.].
- BRYDA, E. C. The Mighty Mouse: The Impact of Rodents on Advances in Biomedical Research. **Missouri Medicine**, v. 110, n. 3, p. 207, 2013.

- CAI, J. et al. Influence of polymorphisms in genes SLC1A1, GRIN2B, and GRIK2 on clozapine-induced obsessive–compulsive symptoms. **Psychopharmacology** 2013 **230:1**, v. 230, n. 1, p. 49–55, 10 maio 2013.
- CAREY, R. J.; DAI, H.; GUI, J. Effects of dizocilpine (MK-801) on motor activity and memory. **Psychopharmacology**, v. 137, n. 3, p. 241–246, 1998.
- COMINGS, D. E. et al. Multivariate analysis of associations of 42 genes in ADHD, ODD and conduct disorder. **Clinical genetics**, v. 58, n. 1, p. 31–40, 2000.
- DE MEDEIROS, G. F. et al. Low-Anxiety rat phenotypes can be further reduced through genetic intervention. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, 2013.
- DE MEDEIROS, G. F. DE et al. The Long Way from Complex Phenotypes to Genes: The Story of Rat Chromosome 4 and Its Behavioral Effects. **World Journal of Neuroscience**, v. 04, n. 03, p. 203–215, 2014.
- DORVAL, K. M. et al. Association of the glutamate receptor subunit gene GRIN2B with attention-deficit/hyperactivity disorder. **Genes, brain, and behavior**, v. 6, n. 5, p. 444–452, 2007.
- FEENSTRA, M. G. P.; BOTTERBLOM, M. H. A.; VAN UUM, J. F. M. Behavioral arousal and increased dopamine efflux after blockade of NMDA-receptors in the prefrontal cortex are dependent on activation of glutamatergic neurotransmission. **Neuropharmacology**, v. 42, n. 6, p. 752–763, 1 maio 2002.
- FEINSTEIN, I.; KRITZER, M. F. Acute N-methyl-D-aspartate receptor hypofunction induced by MK801 evokes sex-specific changes in behaviors observed in open-field testing in adult male and proestrus female rats. **Neuroscience**, v. 228, p. 200–214, 2013.
- FRASER, C. M. et al. Interactions between ifenprodil and dizocilpine on mouse behaviour in models of anxiety and working memory. **European neuropsychopharmacology**, v. 6, n.4, p. 311–316, 1996.
- GRANZOTTO, N. Efeitos farmacogenéticos do tratamento com cafeína em ratos isogênicos SHR e SLA16. 2016. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2016.
- GRANT, M. Cholinergic influences on habituation of exploratory activity in mice. **Journal of Comprehensive Physiology and Psychology**, v.86, n. 5, p. 853-857, 1974.
- HALPERIN, J. M., & SCHULZ, K. P. Revisiting the role of the prefrontal cortex in the pathophysiology of attention-deficit/hyperactivity disorder. **Psychological bulletin**, v. 132, n. 4, p. 560–581, 2006.
- HALL, B. J., RIPLEY, B., GHOSH, A. NR2B signaling regulates the development of synaptic AMPA receptor current. **The Journal of neuroscience**, v. 27, n.49, p. 13446–13456, 2007.

- HENDLEY, E. D. et al. Age, sex and strain differences in activity and habituation in SHR and WKY Rats. **Physiology & Behavior**, v. 34, n. 3, p. 379–383, 1 mar. 1985.
- HILL, P. Attention, Genes and ADHD. **Child and adolescent mental health**, v. 8, n. 3, p. 150, 2003.
- HISER, J., KOENIGS, M. The Multifaceted Role of the Ventromedial Prefrontal Cortex in Emotion, Decision Making, Social Cognition, and Psychopathology. **Biological psychiatry**, v. 83, n.8, p. 638–647, 2018.
- HSIEH, Y. L.; YANG, C. C. Age-series characteristics of locomotor activities in spontaneously hypertensive rats: A comparison with the Wistar-Kyoto strain. **Physiology and Behavior**, v. 93, n. 4–5, p. 777–782, 18 mar. 2008.
- IZÍDIO, G. S. et al. The influence of sex and estrous cycle on QTL for emotionality and ethanol consumption. **Mammalian genome**, v. 22, p. 329-340, 2011.
- JARDIM, M. C.; GUIMARÃES, F. S. GABAergic and glutamatergic modulation of exploratory behavior in the dorsomedial hypothalamus. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 69, n. 3–4, p. 579–584, 2001.
- JARDIM, M.; GUIMARÃES, F. Role of glutamate ionotropic receptors in the dorsomedial hypothalamic nucleus on anxiety and locomotor behavior. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 79, n. 3, p. 541–546, 2004.
- JAY, T. M., BURETTE, F., LAROCHE, S. NMDA receptor-dependent long-term potentiation in the hippocampal afferent fibre system to the prefrontal cortex in the rat. **The European journal of neuroscience**, v. 7, n. 2, p. 247–250, 1995.
- KAS, M. et al. Advances in multidisciplinary and cross-species approaches to examine the neurobiology of psychiatric disorders. **European neuropsychopharmacology**, v. 21, n. 7, p. 532–544, 2011.
- KRAIN, AL; CASTELLANOS, FX. Brain development and ADHD. **Clinical Psychology Reviews**, v. 26, n. 4), p.433-444, 2006
- LANGEN, B; DOST, R. Comparison of SHR, WKY and Wistar rats in different behavioural animal models: effect of dopamine D1 and alpha2 agonists. **Attention Deficit Hyperactivity Disorder**, v. 3, n. 1, p.1-12, 2011.
- LEATON, RN. Habituation of startle response, lick suppression, and exploratory behavior in rats with hippocampal lesions. **Journal of Comprehensive Physiology and Psychology**, v.95, n. 5, p. 813-826, 1981.
- LEE, Y.; GOTO, Y. Prefrontal cortical dopamine from an evolutionary perspective. **Neuroscience bulletin**, v. 31, n. 2, p. 164–174, 2015.
- LEMKE, J. R. et al. GRIN2B mutations in west syndrome and intellectual disability with focal epilepsy. **Annals of Neurology**, v. 75, n. 1, p. 147–154, 2014.

LEUSSIS, M. P.; BOLIVAR, V. J. Habituation in rodents: A review of behavior, neurobiology, and genetics. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 30, n. 7, p. 1045–1064, 2006.

LIU, L., et al. Role of NMDA receptor subtypes in governing the direction of hippocampal synaptic plasticity. **Science**, v. 304, n. 5673, p. 1021–1024, 2004.

LOGAN, R. W.; MCCLUNG, C. A. Animal models of bipolar mania: The past, present and future. **Neuroscience**, v. 321, p. 163–188, 2016.

MA, Z; MA, Y; ZHANG, N. Development of brain-wide connectivity architecture in awake rats. **Neuroimage**, v. 176, p. 380-389, 2018.

MASCHERETTI, S. et al. Complex effects of dyslexia risk factors account for ADHD traits: evidence from two independent samples. **Journal of child psychology and psychiatry, and allied disciplines**, v. 58, n. 1, p. 75–82, 2017.

MASUR, J.; SCHUTZ, M. T.; BOERNGEN, R. Gender differences in open-field behavior as a function of age. **Developmental psychobiology**, v. 13, n. 2, p. 107–110, 1980.

MATHEUS, M. G.; GUIMARÃES, F. S. Antagonism of non-NMDA receptors in the dorsal periaqueductal grey induces anxiolytic effect in the elevated plus maze. **Psychopharmacology 1997 132:1**, v. 132, n. 1, p. 14–18, 1997.

MAYER, M. L. Structural biology of glutamate receptor ion channel complexes. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 41, p. 119–127, 2016.

MCDONALD, A. J.; MASCAGNI, F.; GUO, L. Projections of the medial and lateral prefrontal cortices to the amygdala: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin study in the rat. **Neuroscience**, v. 71, n. 1, p. 55–75, 1996.

MCNAUGHTON, N. Gray's Neuropsychology of anxiety: An enquiry into the functions of septohippocampal theories. **Behavioral and Brain Sciences**, v. 5, n. 3, p. 492–493, 1982.

MEYER, U.; FELDON, J. Epidemiology-driven neurodevelopmental animal models of schizophrenia. **Progress in Neurobiology**, v. 90, n. 3, p. 285–326, 2010.

MILLER, C. K. et al. Interactions of the estrous cycle, novelty, and light on female and male rat open field locomotor and anxiety-related behaviors. **Physiology & behavior**, v. 228, 1 jan. 2021.

MOGHADDAM, B. et al. Activation of Glutamatergic Neurotransmission by Ketamine: A Novel Step in the Pathway from NMDA Receptor Blockade to Dopaminergic and Cognitive Disruptions Associated with the Prefrontal Cortex. **Journal of Neuroscience**, v. 17, n. 8, p. 2921–2927, 15 abr. 1997.

MORMÈDE, P. et al. Marker-assisted selection of a neuro-behavioural trait related to behavioural inhibition in the SHR strain, an animal model of ADHD. **Genes, brain, and behavior**, v. 1, p. 111-116, 2002.

MOZHUI, K. et al. Strain Differences in Stress Responsivity Are Associated with Divergent Amygdala Gene Expression and Glutamate-Mediated Neuronal Excitability. **Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 15, p. 5357–5367, 14 abr. 2010.

NAKANISHI, S. Molecular Diversity of Glutamate Receptors and Implications for Brain Function. **Science**, v. 258, n. 5082, p. 597–603, 1992.

OKAMOTO, K.; AOKI, K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. **Japanese circulation journal**, v. 27, n. 3, p. 282–293, 1963.

ONGÜR, D., FERRY, A. T., & PRICE, J. L. Architectonic subdivision of the human orbital and medial prefrontal cortex. **The Journal of comparative neurology**, v. 460, n. 3, p. 425–449, 2003.

PADILLA, E. et al. Strain, sex, and open-field behavior: factors underlying the genetic susceptibility to helplessness. **Behavioural brain research**, v. 201, n. 2, p. 257–264, 2009.

PAN, Y. et al. Association of genetic variants of GRIN2B with autism. **Scientific Reports 2015 5:1**, v. 5, n. 1, p. 1–5, 2015.

PAOLETTI, P. Molecular basis of NMDA receptor functional diversity. **The European journal of neuroscience**, v. 33, n. 8, p. 1351–1365, 2011.

PÉRTILE, R. A. N. et al. The Quinpirole Hypolocomotive Effects are Strain and Route of Administration Dependent in SHR and SLA16 Isogenic Rats. **Behavior Genetics 2017 47:5**, v. 47, n. 5, p. 552–563, 18 ago. 2017.

PINAR, N. et al. Effect of clozapine on locomotor activity and anxiety-related behavior in the neonatal mice administered MK-801. **Bosnian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 15, n. 3, p. 74–79, 11 ago. 2015.

POVEDA, C. M. et al. The diurnal variation of open-field habituation in rats. **Behavioural processes**, v. 178, 2020.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, n. 1–3, p. 3–33, 2003.

RAMOS, A. et al. A multiple-test study of anxiety-related behaviours in six inbred rat strains. **Behavioural brain research**, v. 85, n. 1, p. 57–69, abr. 1997.

RAMOS, A. et al. Identification of female-specific QTLs affecting an emotionality-related behavior in rats. **Molecular Psychiatry 1999 4:5**, v. 4, n. 5, p. 453–462, 8 out. 1999.

RAMOS, A. et al. Evaluation of Lewis and SHR rat strains as a genetic model for the study of anxiety and pain. **Behavioural brain research**, v. 129, n. 1–2, p. 113–123, 1 fev. 2002.

RIVA, V. et al. GRIN2B predicts attention problems among disadvantaged children. **European Child & Adolescent Psychiatry** 2014 **24:7**, v. 24, n. 7, p. 827–836, 2014.

SAGVOLDEN, T. et al. Rodent Models of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. **Biological Psychiatry**, v. 57, n. 11, p. 1239–1247, 2005.

SELIGER, D. L. Effects of age, sex, and brightness of field on open-field behaviors of rats. **Perceptual and motor skills**, v. 45, n. 3 Pt 2, p. 1059–1067, 1977.

VENDRUSCOLO, L. et al. Evidence for a female-specific effect of a chromosome 4 locus on anxiety-related behaviors and ethanol drinking in rats. **Genes, brain, and behavior**, v. 5, p. 441-450, 2006.

VENDRUSCOLO, L. et al. Marker-assisted dissection of genetic influences on motor and neuroendocrine sensitization to cocaine in rats. **Genes, brain, and behavior**, v. 8, p. 267-274, 2009.